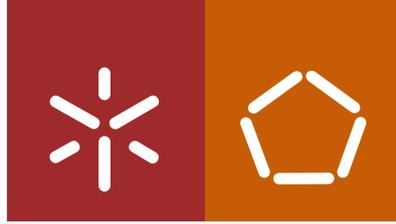




**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Mário Rui Costa Azevedo

**Estudo de fermentações com co-culturas  
aplicadas a matrizes alimentares**



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Mário Rui Costa Azevedo

## **Estudo de fermentações com co-culturas aplicadas a matrizes alimentares**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Biotecnologia

Trabalho efetuado sob a orientação de  
**Lucília Domingues, PhD**  
**Eduardo Coelho, MSc**

## DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

*Licença concedida aos utilizadores deste trabalho*



Atribuição  
CC BY

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

## DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

## Agradecimentos

Após conclusão deste projeto, não posso deixar de agradecer a inúmeras pessoas, sem as quais este percurso não teria sido possível.

A todos os docentes pelo que me ensinaram neste percurso de 5 anos, que me proporcionaram bases indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Biológica, por me ter fornecido as condições necessárias á realização da componente laboratorial.

À Fermentum, devido ao apoio através do fornecimento de matrizes cervejeiras para a realização dos ensaios fermentativos.

Ao grupo do Sol, e a todos os intervalos necessários à realização e escrita desta dissertação, de uma forma especial á Bruna, ao Rafael, ao Tiago, ao Gonçalo e à Ana Cordeiro, pelo companheirismo e ajuda não só neste ano de intenso trabalho, mas durante todo o mestrado.

Ao Pedro e à Marlene por me ajudarem na altura em que mais sentia que não ia conseguir.

Á minha família, em particular aos meus pais, ao Pedro e ao Dinis, por me terem tornado no homem que sou e me terem dado sempre apoio incondicional, sobretudo nos piores momentos.

Á Raquel, pela atenção devota e por sempre me ter dado o incentivo para ir um passo mais longe, e acima de tudo pelo tempo despendido nos momentos mais complicados, ambos imprescindíveis ao sucesso deste trabalho.

Ao Eduardo, pela ajuda disponibilizada durante todas as etapas do trabalho laboratorial, e pela paciência e disponibilidade demonstrada durante a etapa da escrita da dissertação.

E por fim, á professora Lucília por me ter oferecido total apoio na procura de um tema do meu interesse e me ter facultado um ano de trabalho nessa mesma área, quer pela dissertação, quer pelo estágio conferido na empresa Fermentum.

## Abstract

Fermentative processes performed by microorganisms are widely used in several compound's industrial production. There are currently several food processes in which the simultaneous activity of two or more microorganisms (co-cultures), in a controlled manner, is crucial for the end product. In these cases, the compounds produced in co-culture are different from those produced in pure cultures of different microorganism populations, which will have an impact on the sensory characteristics of the final product. This project aims to study co-cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Dekkera bruxellensis* applied to accelerated ageing and souring of beer. It is intended to understand the dynamic of co-cultures, both in the growth rate of all the species involved as well as the profile of metabolites produced, and to describe the existent interactions between them, whether neutral, synergic or competitive. This knowledge is to be accompanied by a compilation of analysis' methodologies usually used in the study of co-culture fermentations' dynamics. With this purpose in mind, 8 fermentation tests were assayed, 5 of which were conducted in synthetic medium intended to show the impact of different pitching rates, high glucose concentration, temperature and ethanol in the fermentation process, and the last 3 were applied to real matrices. The different assays were analyzed by flow cytometry to determine the growth profile, HPLC to determine the profile of production of primary metabolites and GC-MS to determine the secondary metabolite profile. It was concluded that *S. cerevisiae* and *D. bruxellensis* compete for glucose, being that in synthetic co-culture medium, *S. cerevisiae* consumes glucose and grows much faster than *D. bruxellensis*, even in high glucose media. *D. bruxellensis* outcompetes *S. cerevisiae* when in superior cell concentration at the start of the fermentation. On the other hand, when a bigger pitching rate benefits *S. cerevisiae* an equilibrium is reached between both populations. It was also verified early cell death by both yeast when there was a decrease in temperature to 21°C. *D. bruxellensis* shows greater tolerance to wood compounds and ethanol, demonstrating growth up to 8-10 % ethanol in extraction medium. Regarding secondary compounds, it was verified the production of mainly esters, alcohols and organic acids by both yeasts, but only *D. bruxellensis* shows production capability of ethylphenol compounds such as 4-ethylguaicol and 4-ethylphenol, showing higher production in the refermentation of beer products.

**Key-words:** co-culture; organoleptic characteristics; *Saccharomyces cerevisiae*; *Dekkera bruxellensis*; fermentation.

## Sumário

Os processos fermentativos realizados por microrganismos são amplamente utilizados na produção industrial de vários produtos e compostos. Existem vários processos nos quais a atividade simultânea de duas ou mais espécies de microrganismos (co-culturas) num ambiente controlado é de elevada importância para o produto final. Nestes casos, os compostos produzidos em co-cultura são diferentes daqueles produzidos em culturas puras de todos os microrganismos presentes, o que tem impacto nas propriedades sensoriais do produto final. O presente trabalho visa o estudo de co-culturas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Dekkera bruxellensis* aplicadas no envelhecimento e acidificação acelerados de cerveja. Pretende-se conhecer a dinâmica de co-culturas, tanto a nível do crescimento microbiano das estirpes envolvidas, como ao nível da produção de metabolitos, descrevendo as interações entre as diferentes estirpes em co-cultura, sejam elas neutras, sinérgicas ou competitivas. Para tal, realizaram-se 8 ensaios fermentativos diferentes em condições de cultura pura e co-cultura, 5 dos quais para analisar o impacto no processo fermentativo da alteração da taxa de inóculo, elevada concentração de glicose, temperatura, e de etanol, e os restantes 3 foram aplicados a matrizes alimentares. Os ensaios foram acompanhados de análise dos perfis de crescimento por citometria de fluxo, perfis de produção de metabolitos maioritários por HPLC e análise de metabolitos secundários por GC-MS. Observou-se que *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* apresentam uma relação competitiva, sendo que em co-cultura em meio ideal, *S. cerevisiae* consome glicose mais rapidamente e apresenta um crescimento bastante superior a *D. bruxellensis*, sendo o mesmo verificado para elevadas concentrações de açúcar. Já *D. bruxellensis* consegue um crescimento exponencialmente superior em situação de aumento da taxa de inóculo relativamente a *S. cerevisiae*, sendo que na situação contrária há um equilíbrio das populações. Verificou-se ainda uma morte celular precoce por parte de ambas as leveduras com a diminuição da temperatura para 21 °C. *D. bruxellensis* apresenta maior resistência ao etanol e aos compostos extraídos da madeira de barrica, demonstrando uma tolerância ao etanol até concentrações de 8-10 %. Relativamente aos compostos secundários, verifica-se essencialmente a produção de ésteres, álcoois e ácidos orgânicos pelas leveduras, mas apenas *D. bruxellensis* é responsável pela produção dos etilfenóis 4-etilguaicol e 4-etilfenol, apresentado as maiores concentrações destes metabolitos nos ensaios de refermentação de produtos cervejeiros acabados.

**Palavras chave:** co-cultura; características organolépticas; *Saccharomyces cerevisiae*; *Dekkera bruxellensis*; fermentação.

# Índice

Declaração de Integridade .....	iii
Agradecimentos.....	iv
Abstract.....	v
Sumário .....	vi
Índice de Figuras .....	ix
Índice de Tabelas .....	xiii
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos .....	xiv
1. Estado da Arte .....	1
1.1. Utilização de co-culturas na indústria alimentar.....	1
1.2. Importância de co-culturas na cerveja.....	6
1.3. Co-culturas de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> .....	9
1.4. Variáveis nas co-culturas .....	15
2. Objetivos.....	18
3. Materiais e métodos.....	19
3.1. Cultivo de leveduras .....	19
3.2. Ensaio fermentativos .....	19
3.3. Determinação da concentração celular .....	20
3.4. Análise de compostos.....	20
3.4.1. Metabolitos primários .....	20
3.4.2. Compostos minoritários .....	20
3.5. Análise estatística.....	21
4. Resultados e Discussão .....	22
4.1. Adaptação de um método para análise do crescimento em co-cultura por citometria de fluxo 22	
4.2. Efeito da taxa de inóculo.....	26
4.3. Efeito de substrato .....	30
4.3.1. Efeito de elevada concentração de glicose.....	30
4.3.2. Efeito da temperatura no ensaio com elevada concentração de glicose.....	36
4.3.3. Efeito de extrato de madeiras com diferentes concentrações de etanol .....	42
4.4. Aplicação a matrizes alimentares.....	47
4.4.1. Fermentação de 2 cervejas sujeitas a maturação acelerada a diferentes temperaturas	47
4.4.2. Fermentação de mosto de cerveja LETRA E em condições limitantes de oxigénio.....	54

4.4.3. Fermentação de cerveja LETRA E.....	60
5. Conclusões .....	67
6. Perspetivas futuras .....	69
Referências .....	70

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Diferentes relações estabelecidas entre espécies em co-cultura. Adaptado de Ciani e Comitini <sup>28</sup> . .....	4
<b>Figura 2</b> Assimilação dos açúcares cervejeiros por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Adaptado de Stewart e colaboradores <sup>35</sup> . .....	8
<b>Figura 3</b> Representação do processo de aproveitamento de leveduras não <i>Saccharomyces</i> na produção de bebidas com aromas distintos. Adaptado de Basso e colaboradores <sup>18</sup> . .....	9
<b>Figura 4</b> Representação do efeito de Custer em <i>D. bruxellensis</i> . Adaptado de Steensels e colaboradores <sup>43</sup> . .....	11
<b>Figura 5</b> Principais compostos fenólicos voláteis produzidos por <i>D. bruxellensis</i> . Adaptado de Steensels e colegas <sup>43</sup> . .....	13
<b>Figura 6</b> Objetivos da realização de co-culturas: (1) estudo das relações normais entre diferentes populações; (2) aperfeiçoamento do rendimento do cultivo de certas espécies; (3) estabelecimento de interações sintéticas entre certas populações. Adaptado de Goer e colaboradores <sup>72</sup> . .....	17
<b>Figura 7</b> Perfil de crescimento de <i>D. bruxellensis</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; curvas a laranja) e <i>S. cerevisiae</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; curvas a azul) em cultura pura. Comparação das contagens em câmara de Neubauer (curvas a tracejado) e citómetro (curvas preenchidas). As contagens relativas a <i>S. cerevisiae</i> encontram-se em eixo secundário .....	22
<b>Figura 8</b> Perfil de crescimento da co-cultura de <i>D. bruxellensis</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; curvas a laranja) e <i>S. cerevisiae</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; curvas a azul). Comparação das contagens em câmara de Neubauer (curvas a tracejado) e citómetro (curvas preenchidas). As contagens de <i>S. cerevisiae</i> encontram-se em eixo secundário. ....	23
<b>Figura 9</b> Perfis de produção de metabolitos primários das culturas puras de <i>S. cerevisiae</i> (S; curvas a azul) e <i>D. bruxellensis</i> (D; curvas a laranja) e respetiva co-cultura (SD; curvas a verde) em meio MYPG: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O ácido acético e o glicerol encontram-se representados no eixo secundário. .....	25
<b>Figura 10</b> Perfis de crescimento das co-culturas de <i>S. cerevisiae</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; curvas a azul) e <i>D. bruxellensis</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; curvas a laranja) inoculadas nas razões 1:2 (S2D; quadrados), 1:5 (S5D; triângulos) e 1:10 (S10D; losangos). As contagens de <i>S. cerevisiae</i> encontram-se em eixo secundário. .....	26
<b>Figura 11</b> Perfis de produção de metabolitos primários das co-culturas de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> nas razões 1:2 (curvas a azul), 1:5 (curvas a laranja) e 1:10 (curvas a verde): glicose (quadrados), etanol	

(triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O glicerol e o ácido acético encontram-se em eixo secundário. ....	27
<b>Figura 12</b> Perfis de crescimento das co-culturas de <i>D. bruxellensis</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; curvas a laranja) e <i>S. cerevisiae</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; curvas a azul) nas razões 1:2 (2SD; quadrados), 1:5 (5SD; triângulos) e 1:10 (10SD; losangos).....	28
<b>Figura 13</b> Perfis de produção de metabolitos primários das co-culturas de <i>D. bruxellensis</i> e <i>S. cerevisiae</i> nas razões 1:2 (curvas a azul), 1:5 (curvas a laranja) e 1:10 (curvas a verde): glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O ácido acético e o glicerol encontram-se no eixo secundário. ....	29
<b>Figura 14</b> Perfis de crescimento das culturas puras de <i>S. cerevisiae</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; 2S; curva a azul) e <i>D. bruxellensis</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; D; curva a laranja) em meio MYPG com elevada concentração de glicose.....	30
<b>Figura 15</b> Perfis de crescimento das co-culturas de <i>S. cerevisiae</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; curvas a azul) e <i>D. bruxellensis</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; curvas a laranja) S2D (inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> na razão 1:2; quadrados) e 2SD (inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> na razão 2:1; triângulos) em meio MYPG com elevada concentração de glicose. ....	31
<b>Figura 16</b> Perfis de produção de metabolitos primários das culturas puras de <i>S. cerevisiae</i> (2S; curvas a azul) e <i>D. bruxellensis</i> (D; curvas a laranja) em meio MYPG com elevada concentração de glicose: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O glicerol e o ácido acético encontram-se no eixo secundário. ....	32
<b>Figura 17</b> Perfis de produção de metabolitos primários das co-culturas de <i>S. cerevisiae</i> (cél mL <sup>-1</sup> ) e <i>D. bruxellensis</i> (cél mL <sup>-1</sup> ) 2SD (curvas a azul) e S2D (curvas a laranja) em meio MYPG com elevada concentração de glicose: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O glicerol e o ácido acético encontram-se no eixo secundário. ....	32
<b>Figura 18</b> Perfis de crescimento das culturas puras de <i>S. cerevisiae</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; 2S; curvas a azul) e <i>D. bruxellensis</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; D; curvas a laranja) a 21 °C (triângulos) e 28 °C (quadrados) em meio MYPG com elevada concentração de glicose.....	36
<b>Figura 19</b> Perfis de crescimento das co-culturas de <i>S. cerevisiae</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; curvas a azul) e <i>D. bruxellensis</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; curvas a laranja) S2D (inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> na razão 1:2) a 21 °C (quadrados) e a 28 °C (losangos) e 2SD (inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> na razão 2:1) a 21 °C (triângulos) e a 28 °C (círculos) em meio MYPG com elevada concentração de glicose. <i>D. bruxellensis</i> encontra-se no eixo secundário. ....	37

<b>Figura 20</b> Perfis de produção de metabolitos primários das culturas puras de <i>S. cerevisiae</i> (2S; curvas a azul) e <i>D. bruxellensis</i> (D; curvas a laranja) no ensaio em meio MYPG com elevada concentração de glicose a 21 °C: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O glicerol e ácido acético encontram-se no eixo secundário. ....	38
<b>Figura 21</b> Perfis de produção de metabolitos primários das co-culturas de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> 2SD (curvas a azul) e S2D (curvas a laranja) em meio MYPG com elevada concentração de glicose a 21 °C: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O glicerol e ácido acético encontram-se no eixo secundário. ....	39
<b>Figura 22</b> Perfis de crescimento de <i>D. bruxellensis</i> (curvas a laranja) em co-cultura com <i>S. cerevisiae</i> (curvas a azul), na razão 2:1 nos ensaios fermentativos com percentagem em volume de etanol de 6 % (cél mL <sup>-1</sup> ; 6%.S e 6%.D; quadrados), 8 % (cél mL <sup>-1</sup> ; 8%.S e 8%.D; triângulos) e 10 % (cél mL <sup>-1</sup> ; 10%.S e 10%.D; losangos). <i>S. cerevisiae</i> encontra-se no eixo secundário. ....	42
<b>Figura 23</b> Perfis de produção de metabolitos primários pelas co-culturas de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> em condições de percentagem em volume de etanol de 6 % (curvas a azul), 8 % (curvas a laranja) e 10 % (curvas a verde): glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O glicerol e o ácido acético encontram-se em eixo secundário. ....	44
<b>Figura 24</b> Perfis de crescimento das culturas puras (quadrados) de <i>S. cerevisiae</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; ef S; curvas a azul) e <i>D. bruxellensis</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; ef D; curvas a laranja) e respetiva co-cultura (cél mL <sup>-1</sup> ; inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> na razão 1:2; ef S2D.S e ef S2D.D; triângulos) em extrato fraco (ef). <i>S. cerevisiae</i> encontra-se no eixo secundário. ....	48
<b>Figura 25</b> Perfis de crescimento das culturas puras (quadrados) de <i>S. cerevisiae</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; EF S; curvas a azul) e <i>D. bruxellensis</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; EF D; curvas a laranja) e respetiva co-cultura (cél mL <sup>-1</sup> ; inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> na razão 1:2; EF S2D.S e EF S2D.D; triângulos) em extrato forte (EF). <i>S. cerevisiae</i> encontra-se no eixo secundário. ....	48
<b>Figura 26</b> Perfis de produção de metabolitos primários das culturas puras de <i>S. cerevisiae</i> (S; curvas a azul) e <i>D. bruxellensis</i> (2D; curvas a laranja) e respetiva co-cultura (S2D; curvas a verde) em extrato fraco: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O ácido acético encontra-se representado no eixo secundário. ....	49
<b>Figura 27</b> Perfis de produção de metabolitos primários das culturas puras de <i>S. cerevisiae</i> (EF S; curvas a azul) e <i>D. bruxellensis</i> (EF 2D; curvas a laranja) e respetiva co-cultura (EF S2D; curvas a verde) em extrato forte: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O ácido acético encontra-se representado no eixo secundário. ....	50

<b>Figura 28</b> Perfis de crescimento das culturas puras de <i>S. cerevisiae</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; S, curva azul) e <i>D. bruxellensis</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; 2D, curva laranja) em mosto cervejeiro de LETRA E. <i>D. bruxellensis</i> encontra-se no eixo secundário. ....	54
<b>Figura 29</b> Perfis de crescimento das co-culturas de <i>S. cerevisiae</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; curvas a azul) e <i>D. bruxellensis</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; curvas a laranja) S2D (inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> na razão 1:2; quadrados) e 2SD (inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> na razão 2:1; triângulos) em mosto cervejeiro de LETRA E. <i>D. bruxellensis</i> encontra-se no eixo secundário.....	55
<b>Figura 30</b> Perfis de produção de metabolitos primários pelas culturas puras de <i>S. cerevisiae</i> (S; curvas a azul) e <i>D. bruxellensis</i> (2D; curvas a laranja) em mosto cervejeiro de LETRA E: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O ácido acético encontra-se no eixo secundário. ....	56
<b>Figura 31</b> Perfis de produção de metabolitos primários pelas co-culturas de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> 2SD (curvas a azul) e S2D (curvas a laranja) em mosto cervejeiro de LETRA E: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O ácido acético encontra-se no eixo secundário. ....	56
<b>Figura 32</b> Perfis de crescimento das culturas puras de <i>S. cerevisiae</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; S, curva azul) e <i>D. bruxellensis</i> (cél mL <sup>-1</sup> ; 2D, curva laranja) em LETRA E. <i>D. bruxellensis</i> encontra-se no eixo secundário. ....	61
<b>Figura 33</b> Perfis de crescimento das co-culturas de <i>S. cerevisiae</i> (curvas a azul) e <i>D. bruxellensis</i> (curvas a laranja) S2D (inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> na razão 1:2; quadrados) e 2SD (inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> na razão 2:1; triângulos) em LETRA E. <i>D. bruxellensis</i> encontra-se no eixo secundário. ....	61
<b>Figura 34</b> Perfis de produção de metabolitos primários pelas culturas puras de <i>S. cerevisiae</i> (S; curvas a azul) e <i>D. bruxellensis</i> (2D; curvas a laranja) em LETRA E: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O ácido acético encontra-se no eixo secundário. ....	62
<b>Figura 35</b> Perfis de produção de metabolitos primários pelas co-culturas de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> em LETRA E 2SD (curvas a azul) e S2D (curvas a laranja): glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O ácido acético encontra-se no eixo secundário. ....	63

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> Evolução de populações de diferentes leveduras durante a produção de vinho. Adaptado de Renouf e colaboradores <sup>21</sup> . .....	5
<b>Tabela 2</b> Representação das eficiências fermentativas em culturas puras e diferentes co-culturas de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> . Adaptado de Meneghin e colegas <sup>53</sup> . .....	14
<b>Tabela 3</b> Generalização das principais características de <i>D. bruxellensis</i> e <i>S. cerevisiae</i> . De notar que pode haver bastante variabilidade em certas características ao nível das diferentes estirpes. Adaptado de Colomer e colaboradores <sup>44</sup> . .....	15
<b>Tabela 4</b> Representação das concentrações dos compostos minoritários para os ensaios fermentativos com elevadas concentrações de glicose. ....	34
<b>Tabela 5</b> Representação das concentrações dos compostos minoritários para os ensaios fermentativos com elevadas concentrações de glicose a 21 °C.....	40
<b>Tabela 6</b> Representação das concentrações dos compostos minoritários para os ensaios fermentativos em extrato de madeiras com percentagem em volume de etanol em 6 %, 8 % e 10 %. ....	45
<b>Tabela 7</b> Representação das concentrações dos compostos minoritários para os ensaios em extrato fraco de Argus.....	51
<b>Tabela 8</b> Representação das concentrações dos compostos minoritários para os ensaios em extrato forte de Argus.....	52
<b>Tabela 9</b> Representação das concentrações dos compostos minoritários para os ensaios em mosto cervejeiro de LETRA E.....	58
<b>Tabela 10</b> Representação das concentrações dos compostos minoritários para os ensaios em LETRA E. ....	64

## Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

4-EC - 4-etilcatecol

4-EG - 4-etilguaicol

4-EP - 4-etilfenol

4-VC - 4-vinilcatecol

4-VG - 4-vinilguaicol

4-VP - 4-vinilfenol

AAB - *Acetic acid bacteria*

AMPs - *Antimicrobial peptides*

APY - 2-acetilpirrolina

ATPH - acetiltetrahidropiridina

ETPH - 2-etiltetrahidropiridina

ef - extrato fraco

EF - extrato Forte

GC-MS - *Gas chromatography - mass spectrometry*

HPLC - *High efficiency liquid chromatography*

LAB - *Lactic acid bacteria*

MYPG - *Malt yeast peptone agar*

# 1. Estado da Arte

Co-cultura tem por definição uma cultura de células, em que duas ou mais diferentes populações de células são crescidas com algum tipo de contacto entre elas. A técnica de co-cultura tem vindo a ser utilizada com vários objetivos, desde o estudo de interações naturais ou sintéticas entre diferentes populações, até à otimização de processos (eficiência maior numa co-cultura do que na soma das diferentes populações em culturas puras).

As suas aplicações são variadas, e incluem: pesquisa de fármacos<sup>1</sup>, ecologias sintéticas<sup>2</sup>, produção de bio-etanol a partir de resíduos<sup>3</sup> e em matrizes alimentares, mais especificamente na produção de iogurte, kefir, vinho e cerveja, como será abordado com maior detalhe nos tópicos 1.1 e 1.2 do Estado da Arte.

## 1.1. Utilização de co-culturas na indústria alimentar

Vários exemplos de aplicações das co-culturas podem ser encontrados em fermentações alimentares, entre elas: i) a produção de iogurte, um fermentado resultante do leite; ii) o kefir, um produto resultante da fermentação do leite com grãos de kefir; iii) o vinho, que advém da fermentação espontânea do mosto da uva por diversos microrganismos; e iv) a cerveja, cujo processo inclui fermentação por culturas puras, ou em casos específicos, como as *sour ales*, recorrendo a culturas sequenciais ou co-culturas.

O iogurte é um dos lacticínios mais consumidos no mundo inteiro. Embora o processo de produção deste fermentado do leite apresente diferenças consoante o produtor, no geral, consiste na fermentação láctica que resulta na gelificação do leite, devido à destabilização das proteínas<sup>4</sup>, sendo a acidificação do ácido láctico resultante da fermentação responsável pelo processo de coagulação<sup>5</sup>.

Durante o processo, a fermentação láctica é levada a cabo por bactérias formadoras de ácido láctico (*Lactic Acid Bacteria*, LAB), entre elas, espécies de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, que convertem lactose em ácido láctico<sup>5</sup>. Além da acidificação, a microflora do iogurte produz também outros metabolitos responsáveis pelos diferentes sabores e aromas que distinguem os diversos tipos de iogurte, sendo os principais o ácido láctico e o acetaldeído<sup>6</sup>.

*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* representam, no iogurte, uma inter-relação típica de co-culturas. Estas duas espécies são adicionadas como cultura *starter* na produção do iogurte, cuja relação foi primeiramente descrita por Orla-Jensen e Churchill<sup>7</sup> como sendo simbiótica. Mais tarde, Pette e Lolkema<sup>8</sup> caracterizam uma relação antibiótica seguida à simbiótica. Estes autores

descreveram que *L. bulgaricus* estimula o crescimento de *S. thermophilus* na fase logarítmica de crescimento, mas inibe o seu crescimento numa fase mais tardia devido à produção de ácido láctico. Esta relação simbiótica é também observada aquando da sua adição numa razão 1:1, havendo uma maior produção de acetaldeído quando comparado com a soma de duas monoculturas individuais destas mesmas espécies<sup>9</sup>.

As leveduras também podem ocorrer em culturas mistas no iogurte, no entanto, na maioria dos casos, causam a deterioração do produto. As espécies encontradas, normalmente *Kluveyromices* e *Saccharomyces*, podem ser originárias de ingredientes como fruta ou mel, e têm no iogurte um meio de excelência devido ao baixo pH<sup>10</sup>, sendo necessária a refrigeração do produto para inibir o seu crescimento<sup>11</sup>. Contudo, em alguns casos, foi provada a existência de relações sinérgicas entre leveduras e as LAB. As leveduras proporcionam fatores de crescimento, como aminoácidos ou proteínas, que são utilizados pelas bactérias, enquanto que alguns compostos produzidos pelas bactérias são utilizados pelas leveduras como fonte de energia<sup>12</sup>.

Outro exemplo de co-culturas em matrizes alimentares é o kefir, uma matriz alimentar resultante de uma fermentação alternativa do leite, onde se inoculam grãos de kefir. Estes consistem em polissacáridos associados a um complexo diversificado de microrganismos, entre eles bactérias e leveduras. Estes microrganismos funcionam como culturas iniciais na fermentação do leite. Contudo, ao contrário do iogurte, o produto resultante é carbonatado e apresenta um sabor mais ácido e levemente amargo, devido acima de tudo à ação das leveduras existentes, bem como de LAB<sup>13,14</sup>.

Relativamente à flora existente no kefir, destacam-se diferentes espécies. Esta diversidade contribui para a produção de vários compostos voláteis, que resultam num aroma mais complexo do produto final<sup>15</sup>, como se verifica na produção de outros produtos, como a cerveja<sup>16-19</sup> ou o vinho<sup>20-23</sup>. Dertli e colaboradores<sup>14</sup> analisaram as diferentes espécies de microrganismos existentes em grãos de kefir de 4 regiões diferentes da Turquia, destacando-se *Enterobacteriaceae* e *Lactobacillaceae* enquanto famílias bacterianas dominantes, sendo *Lactobacillus kefirifaciens* a espécie LAB dominante, e *Saccharomyces cerevisiae* a principal espécie de levedura presente. Além das espécies LAB já referidas, é de notar também a existência nos grãos de kefir de bactérias produtoras de ácido acético (*Acetic Acid Bacteria*, AAB) maior que no leite. Isto porque o seu metabolismo é estimulado, devido à existência de etanol (produzido pelas leveduras presentes na matriz alimentar).

O etanol é o principal composto produzido na fermentação (fermentação alcoólica), destacando-se também os já referidos ácido acético (fermentação acética), ácido láctico (fermentação láctica) e metabolitos como manitol, glicerol e alguns ésteres. Esta diversidade de compostos permite por um lado

uma sinergia tanto entre LAB como AAB e leveduras. Foi provado que tanto o crescimento como a produção de ácido láctico por LAB são estimulados por vitaminas e aminoácidos produzidos por leveduras<sup>24</sup>.

O vinho é uma das bebidas alcoólicas mais consumidas no planeta. De acordo com a Organização Internacional da Vinha e do Vinho, em 2014 foram produzidos cerca de 270 MhL de vinho no mundo<sup>25</sup>. O vinho é produzido pela fermentação do mosto de uva por parte de microrganismos (sendo o mais comum a levedura *Saccharomyces cerevisiae*), e a sua qualidade e complexidade está dependente dos tipos de microrganismos presentes na fermentação, bem como do *terroir* (região/geografia/clima da vinha), entre outros fatores<sup>20-22,26,27</sup>.

Um dos fatores a ter em conta no estudo da complexidade do aroma dos vinhos por parte de enólogos é a influência de leveduras não *Saccharomyces*, que são capazes de alterar as características organolépticas finais do vinho. É cada vez maior o interesse em controlar as culturas que procedem à fermentação espontânea do mosto de uva, fazendo muitas vezes uso de co-culturas, de modo a alterar certos traços específicos de interesse do vinho, nomeadamente através da obtenção de diferentes concentrações de metabolitos, como ácidos orgânicos, álcoois, aldeídos, ésteres, terpenos, lactonas, acetatos, entre outros, o que proporciona um perfil analítico aprimorado do produto final<sup>20-22,28</sup>. Para tal, são fulcrais as diferentes interações que podem ser estabelecidas entre os diferentes microrganismos em cultura, como representado na **Figura 1**.

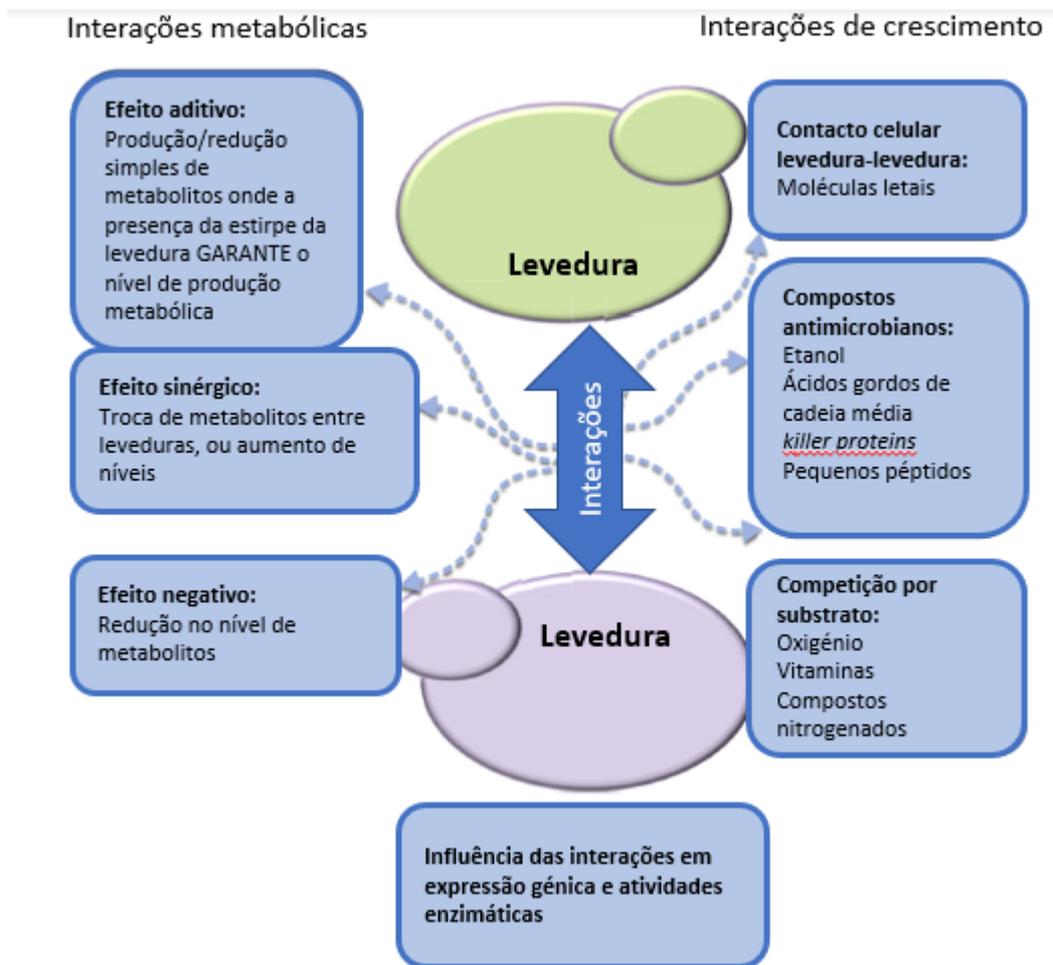


Figura 1 Diferentes relações estabelecidas entre espécies em co-cultura. Adaptado de Ciani e Comitini<sup>29</sup>.

No entanto, efeitos negativos podem surgir aquando da utilização de co-culturas, sendo o principal o efeito inibitório originário de metabolitos tóxicos, como o etanol em leveduras não *Saccharomyces* (que por norma apresentam uma baixa tolerância a este composto) durante a produção do vinho. Foi demonstrado, em fermentações do vinho, que as LAB produzem substâncias, além do ácido láctico, que inibem o crescimento das leveduras. No trabalho de Renouf e colaboradores<sup>21</sup> observa-se que, em estágios iniciais da fermentação, há uma preponderância de *S. cerevisiae*, relativamente às restantes espécies mais sensíveis (Tabela 1). Estes autores verificaram que à medida que se aproximava do dia 30 de fermentação, foi observado um declínio de *S. cerevisiae* relativamente a *D. bruxellensis*. Esta observação mostra uma capacidade de *D. bruxellensis* de adaptação a situações de stress. Os autores referem um possível mecanismo de *cross-tolerance* posto em prática por *D. bruxellensis*, em que a sujeição a um stress menor (neste caso, maceração a frio), dota o organismo de resistência a stresses maiores. Como resultado, observa-se que *D. bruxellensis* faz uso desta fase *lag* para se adaptar às condições adversas do meio, com vista a proliferar durante a fase em que o meio se encontrará mais inóspito para o desenvolvimento dos restantes microrganismos.

**Tabela 1** Evolução de populações de diferentes leveduras durante a produção de vinho. Adaptado de Renouf e colaboradores<sup>21</sup>.

Dia	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Candida cantarelli</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
1	90	5	5	*	-
2	85	5	5	5	-
4	100	-	-	-	-
8	100	-	-	-	-
12	90	10	-	-	-
16	70	30	-	-	-
20	55	45	-	-	-
24	15	85	-	-	-
30	5	95	-	-	-

\*Não existe detecção de estirpes. O valor de *threshold* desta análise foi limitado pelo número de colónias testadas.

Outro fator a ter em conta é a competição pelos nutrientes necessários em solução, em que o exemplo mais comum é o consumo de açúcares, vitaminas e compostos com azoto por parte de leveduras não *Saccharomyces*, o que limita o crescimento da levedura *S. cerevisiae*. Por outro lado, em vez de competição, pode ocorrer uma sinergia entre culturas, onde metabolitos produzidos por um microrganismo podem ser utilizados como substrato por outro microrganismo, o que se traduz em melhores rendimentos em co-cultura do que monoculturas separadas<sup>29</sup>, traduzindo-se num produto final com composição diferente. Sadoudi e colegas<sup>22</sup> verificaram uma produção menor de ácido acético numa co-cultura de *S. cerevisiae*/*M. pulcherrima* quando comparado com uma monocultura de *S. cerevisiae*, podendo tal ser explicado por uma interação levedura-levedura ou um co-metabolismo do ácido acético<sup>30</sup>.

A disponibilidade de oxigénio também pode ter repercussões no desenvolvimento das espécies presentes em cultura e nas características finais do produto. No caso de *S. cerevisiae* verifica-se o efeito de Crabtree<sup>31</sup>, que dá preferência à realização da fermentação na presença de O<sub>2</sub> e elevadas concentrações de glicose. No entanto, em *D. bruxellensis*, além deste efeito, existe outro efeito que leva ao bloqueamento da fermentação em anaerobiose e a sua estimulação na presença de oxigénio (efeito de Custer)<sup>32</sup>, pelo que o crescimento e metabolitos resultantes de culturas puras nas mesmas condições de arejamento ou uma co-cultura em diferentes condições vai levar à obtenção de meios fermentativos diferentes, e consequentemente, produtos finais diversificados.

## 1.2. Importância de co-culturas na cerveja

A cerveja é uma das bebidas mais antigas confeccionadas pelo homem (primeiros relatos remontam a cerca de 6000 atrás)<sup>33</sup> e uma das bebidas alcoólicas mais consumidas no mundo (só em 2016 foram produzidos  $1.96 \times 10^6$  hL)<sup>34</sup>.

Existem muitas variedades de cerveja (*stout*, *bock*, entre outras)<sup>35</sup>, mas estas classificam-se essencialmente em duas famílias: *ale* e *lager* (mais consumida), dependo do tipo de leveduras utilizadas. Nas cervejas *ale* (o tipo mais semelhante à cerveja antiga), a fermentação é levada a cabo essencialmente por *S. cerevisiae* a temperaturas mais elevadas (18 °C – 25 °C). Como as células tendem a ficar à tona da suspensão, estas são designadas por *top-fermenting*. Por outro lado, a fermentação das cervejas do tipo *lager* é levada a cabo a temperaturas mais baixas (5 °C– 15 °C), por *Saccharomyces pastorianus*, que tende a depositar-se no fundo da suspensão, pelo que estas leveduras são designadas por *bottom-fermenting*<sup>33</sup>. Em ambos os casos, a fermentação é um processo minuciosamente controlado, quer ao nível da temperatura, pH, e restantes parâmetros. Há outros tipos de cerveja, em que a fermentação é um processo espontâneo, como ocorre no vinho. No caso das cervejas belgas *lambic*, por exemplo, a fermentação é iniciada por microrganismos residentes na cervejaria, que são introduzidos por exposição do mosto durante o seu arrefecimento, antes da sua transferência para pipas de madeira, para fermentação e envelhecimento<sup>36</sup>. Geralmente, este processo de fermentação espontânea é o utilizado para a produção da maior parte das cervejas do estilo *sour*, como cervejas em que o mosto é essencialmente constituído por fruta, como é o exemplo das cervejas *Spontan Blueberry Sour Ale* ou *Kiwi Berliner Weisse B.A*, produzidas pela marca Cerveja LETRA<sup>37</sup>, ou também as *American coolship ales*<sup>38</sup>.

As estirpes de *Saccharomyces* sempre foram as mais usadas na maior parte dos processos de fermentação (vinho, cerveja, pão, etc). Na produção de cerveja, destacam-se 4 das suas características mais importantes: i) produção eficiente de etanol em elevadas quantidades; ii) efeito de Crabtree, que consiste na tendência para fermentar açúcares a etanol, mesmo na presença de oxigénio, em caso de elevadas concentrações de açúcar; iii) elevada tolerância ao etanol e a outras pressões seletivas do ambiente; e iv) a sua capacidade de floculação, que facilita a sua remoção da suspensão após realizada a fermentação<sup>39</sup>.

Estas e outras características positivas resultam da evolução natural ao longo dos anos, mas acima de tudo da ação humana, quer pela escolha das estirpes mais adequadas, quer pela sua reciclagem entre fermentações. Ao contrário do vinho, que é sazonal, e cujos microrganismos responsáveis dependem acima de tudo do *terroir* da vinha, na produção da cerveja, as leveduras podem ser colhidas no final da fermentação e reutilizadas (processo designado *backslopping*). Isto resulta num

contínuo crescimento e divisão das células no ambiente do tanque de fermentação, levando a uma contínua seleção dos indivíduos melhor adaptados a esse mesmo ambiente<sup>40</sup>. O sinal mais óbvio de adaptação das leveduras ao ambiente cervejeiro é a obtenção de alguma característica desejável nesse mesmo ambiente, mas que resulte num fardo no ambiente natural das mesmas. Um exemplo é a capacidade das leveduras *Saccharomyces* de fermentar maltotriose, um açúcar que não é encontrado em grandes concentrações no seu habitat natural, mas existe em ambientes cervejeiros, permitindo-lhe acesso a uma nova fonte de energia, como representado na **Figura 2**.

Apesar de todas as vantagens apresentadas, a utilização na fermentação de leveduras apenas do género *Saccharomyces* não chega para corresponder às expectativas do mercado, e como tal, assim como nos produtos vinícolas, recorre-se a leveduras não *Saccharomyces* com vista a obter produtos com características sensoriais mais complexas. Estes microrganismos, apesar de normalmente apresentarem menores rendimentos de produção de etanol e terem uma resistência muito menor aos stresses ambientais durante a fermentação (como no vinho)<sup>21</sup>, têm um impacto positivo no produto final.

Já foi provado que *Dekkera bruxellensis* (que ao contrário da maior parte das leveduras não *Saccharomyces*, distingue-se pela sua resistência a meios inóspitos), por exemplo, tem a capacidade de produzir ésteres que conferem um aroma frutado e levam a cargo a degradação enzimática de algumas proteínas<sup>41</sup>. Contudo, a sua presença nem sempre é propositada. Em processos pouco controlados, esta levedura pode aparecer como um agente de deterioração, estando envolvida no aparecimento de compostos que têm um efeito negativo no sabor do vinho e, por vezes, no caso da cerveja. No entanto, estes compostos, que constituem o carácter “*brett*”, são bastante apreciados nas cervejas do estilo *sour*, que são obtidas por maturação da cerveja fermentada, essencialmente em barricas de casca de carvalho, que detêm características de bebidas maturadas previamente<sup>42</sup>.

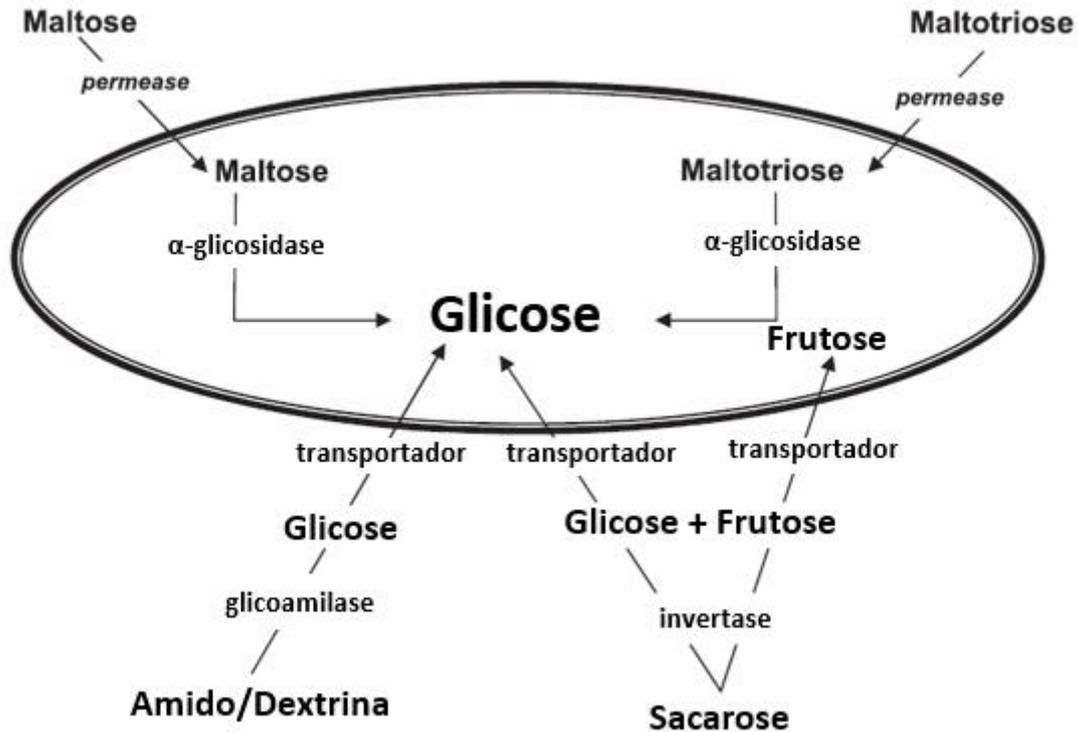


Figura 2 Assimilação dos açúcares cervejeiros por *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado de Stewart e colaboradores<sup>35</sup>.

Esta levedura possui ainda outros aspetos de interesse. Como consegue fermentar açúcares não fermentáveis por *S. cerevisiae*, como por exemplo dextrinas, *D. bruxellensis* é utilizada na produção de cervejas com baixo teor calórico<sup>43</sup>. Outra utilidade desta levedura é o facto de possuir atividade de β-glicosidase o que lhe permite hidrolisar celobiose. Este açúcar está presente na madeira das barricas de casca de carvalho e não é geralmente utilizado por *S. cerevisiae*, possibilitando a libertação de compostos ligados ao açúcar, que só exibem propriedades organoléticas quando libertados<sup>44</sup>.

Em suma, o maior foco de interesse na utilização de leveduras não *Saccharomyces* passa pelo aumento da complexidade do sabor do produto final, pelo que isso vai além da produção de etanol e dióxido de carbono. Os compostos de maior interesse são então os compostos intermediários do metabolismo dos microrganismos em cultura e alguns subprodutos. O processo que vai desde a escolha de novas leveduras até a obtenção do produto inovador encontra-se representado na **Figura 3**.

De entre estes compostos, destacam-se ésteres etílicos (succinato de etilo, lactato de etilo, entre outros), que são responsáveis pelo aroma frutado, ácido acético, compostos fenólicos voláteis, ácido isovalérico, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido láctico, ácidos gordos, terpenos entre outros<sup>18,36,39</sup>. O maior ou menor consumo de açúcares também é um fator a ter em conta. Leveduras que tenham uma baixa taxa de consumo de açúcar dão origem a produtos com mais açúcares residuais, e por isso, mais doces<sup>36</sup>.

No meio de todas as combinações possíveis de culturas, as co-culturas de *Saccharomyces/Brettanomyces* apresentam um maior interesse, acima de tudo para a obtenção de produtos maturados. Por outro lado, o uso de LAB é também bastante comum, como por exemplo, *Lactobacillus delbrueckii*, utilizado para acidificar a cerveja sem recorrer a barricas<sup>45</sup>. Numa co-cultura de *S. cerevisiae* e LAB para a produção de cerveja e cachaça reparou-se que estas contribuem para a produção de ácidos orgânicos e compostos aromáticos, levando à descida do pH e à inibição do crescimento de microrganismos de detioração<sup>46</sup>. Noutro estudo, reparou-se ainda que a utilização de LAB aumentou a qualidade da bebida, uma vez que a concentração de álcoois maioritários, como propanol, isobutanol, entre outros, foi maior na co-cultura do que numa cultura pura de *S. cerevisiae*<sup>47</sup>.

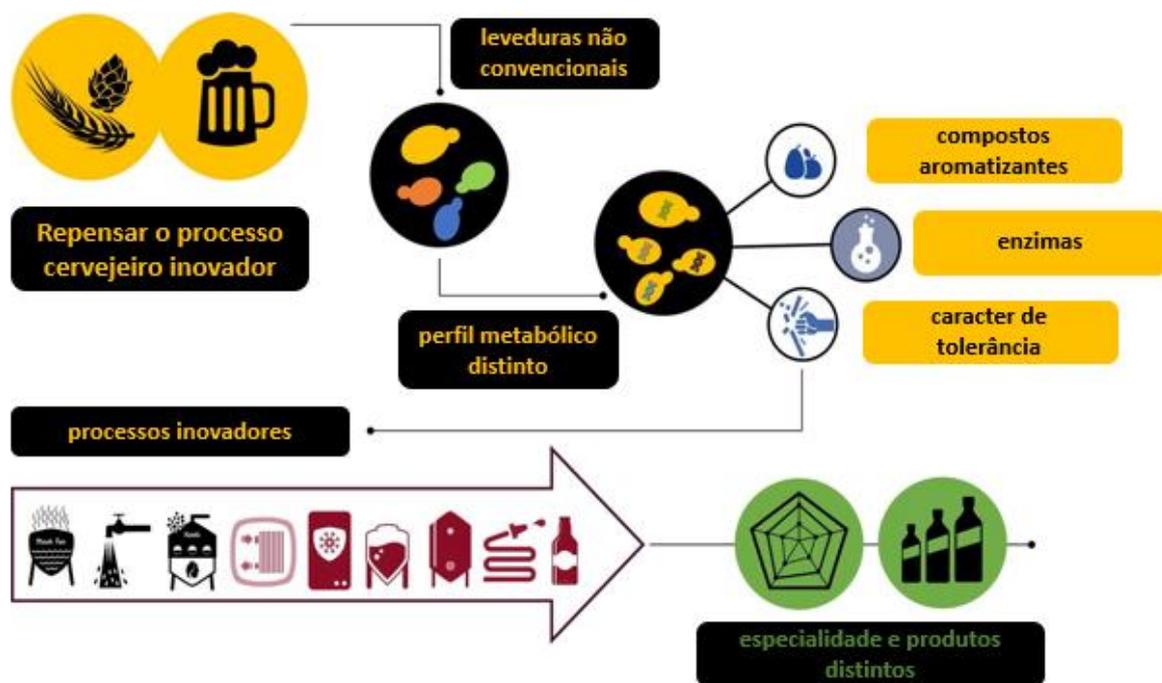


Figura 3 Representação do processo de aproveitamento de leveduras não *Saccharomyces* na produção de bebidas com aromas distintos. Adaptado de Basso e colaboradores<sup>18</sup>.

### 1.3. Co-culturas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*

*Brettanomyces bruxellensis* (ou *Dekkera bruxellensis*, a designação cientificamente correta, atribuída depois de se descobrir que o género possuía espécies asporogénicas<sup>48</sup>), é uma levedura que apresenta forma variável (esférica e elipsoidal, na maior parte das vezes), cujo nome origina das palavras

gregas *bretano* (britânico, onde o organismo foi isolado pela primeira vez) e *myces* (fungo). Esta levedura foi originalmente descrita por Niels Hjeltr Claussen em 1904 (colega de Emile Christian Hansen, na Carlsberg), tendo sido isolada e responsabilizada pela segunda fermentação ocorrida nas *stock ales* inglesas. Este processo viria a resultar no primeiro microrganismo patenteado da história (patente britânica GB190328184)<sup>49</sup>.

Esta levedura é encontrada frequentemente, como já referido, no vinho<sup>21,27,50-53</sup> e na cerveja<sup>17,19</sup>. No entanto, esta espécie tem também vindo a ser utilizada em conjunto com outras leveduras para a produção de bebidas alcoólicas características, destacando-se as cervejas acídicas.

Por outro lado, esta levedura foi também isolada em locais de produção industrial de bio-etanol. Devido à sua tolerância a ambientes com pH baixo, a pressões osmóticas e concentrações de etanol elevadas, e capacidade de proliferar em ambientes de escassez nutricional, *D. bruxellensis* tem nos tanques de produção de bio-etanol um local de proliferação por excelência. Uma estirpe em particular descobriu-se ser a única produtora ativa de etanol a partir de amido num processo contínuo, havendo a possibilidade de ser um bom contribuidor para o processo de produção industrial de bio-etanol, ou mesmo o principal motor do processo. Esta descoberta sugere ainda que durante a fase de maior produção de etanol, *D. bruxellensis* sobrepôs-se à estirpe existente de *S. cerevisiae*, sem afetar o rendimento final na produção de etanol<sup>54</sup>.

Relativamente a *S. cerevisiae*, esta espécie apresenta características fenotípicas semelhantes, como elevada resistência ao stress osmótico e elevada taxa de crescimento em ambientes com escasso oxigénio e baixo pH. Isto permite-lhe também tolerar certos ambientes desprovidos de nutrientes existentes durante as fermentações alcoólicas. Uma característica que *D. bruxellensis* apresenta a par de *S. cerevisiae* é o efeito de Crabtree: fermenta açúcares a etanol, ainda que exista oxigénio suficiente para realizar a respiração aeróbia, em condição de elevada concentração de açúcar<sup>31</sup>. Este efeito ocorre apenas quando as concentrações de açúcar são elevadas, e constitui um mecanismo de competição, designado “*make-accumulate-consume*”, em que a levedura primeiramente produz etanol para prevenir o crescimento de microrganismos competidores, sendo que de seguida consome o etanol aquando da depleção dos açúcares fermentáveis<sup>31</sup>. *D. bruxellensis* é também caracterizada pela produção (e mais tarde, consumo) de elevadas quantidades de ácido acético, e, como tal, é capaz de sobreviver em ambientes com baixo pH resultantes<sup>48</sup>.

A disponibilidade de oxigénio é também um fator a ter em conta no seu crescimento. Tal como *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* é uma espécie anaeróbia facultativa, e está sujeita à inibição do processo fermentativo em ambiente totalmente anaeróbio, sendo estimulado na presença de oxigénio (efeito

negativo de Pasteur, ou efeito de Custer)<sup>55</sup>. Isto pode ser explicado pelo processo de produção de ácido acético a partir de acetaldeído, que origina a produção de NADH. Quando um aceitador de elétrons como o oxigénio surge, o NADH é rapidamente convertido a NAD<sup>+</sup><sup>55</sup>. Contudo, num ambiente anaeróbio, sem esse aceitador, a célula fica com défice de NAD<sup>+</sup>, o que faz parar a glicólise<sup>56</sup>. *S. cerevisiae* consegue repor este balanço sem a presença de oxigénio através da produção de metabolitos secundários como o glicerol, que não é produzido em *D. bruxellensis*. Isto confere à primeira vantagem em meios ricos, e à segunda em meios desprovidos de nutrientes. O efeito de Custer em *D. bruxellensis* encontra-se representado na Figura 4.

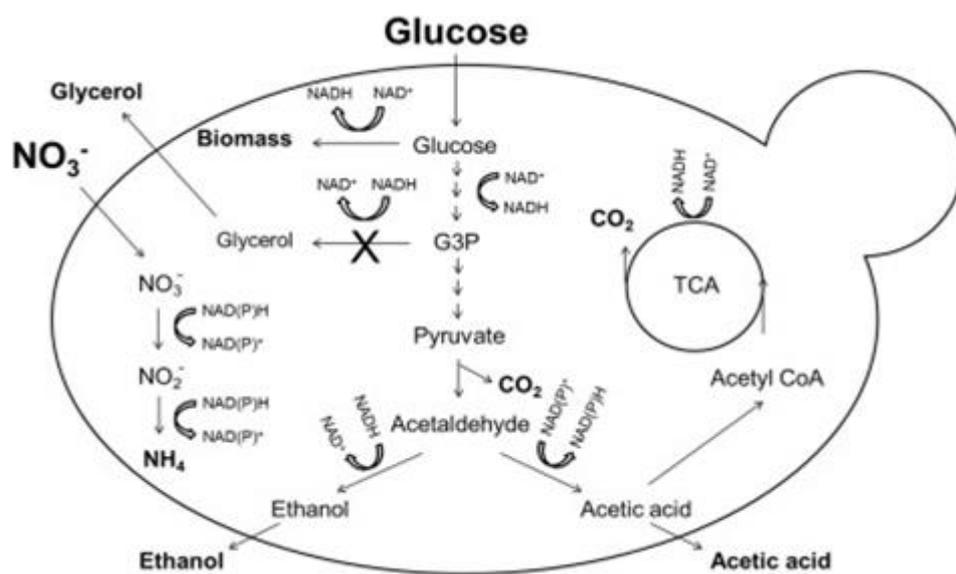


Figura 4 Representação do efeito de Custer em *D. bruxellensis*. Adaptado de Steensels e colaboradores<sup>19</sup>.

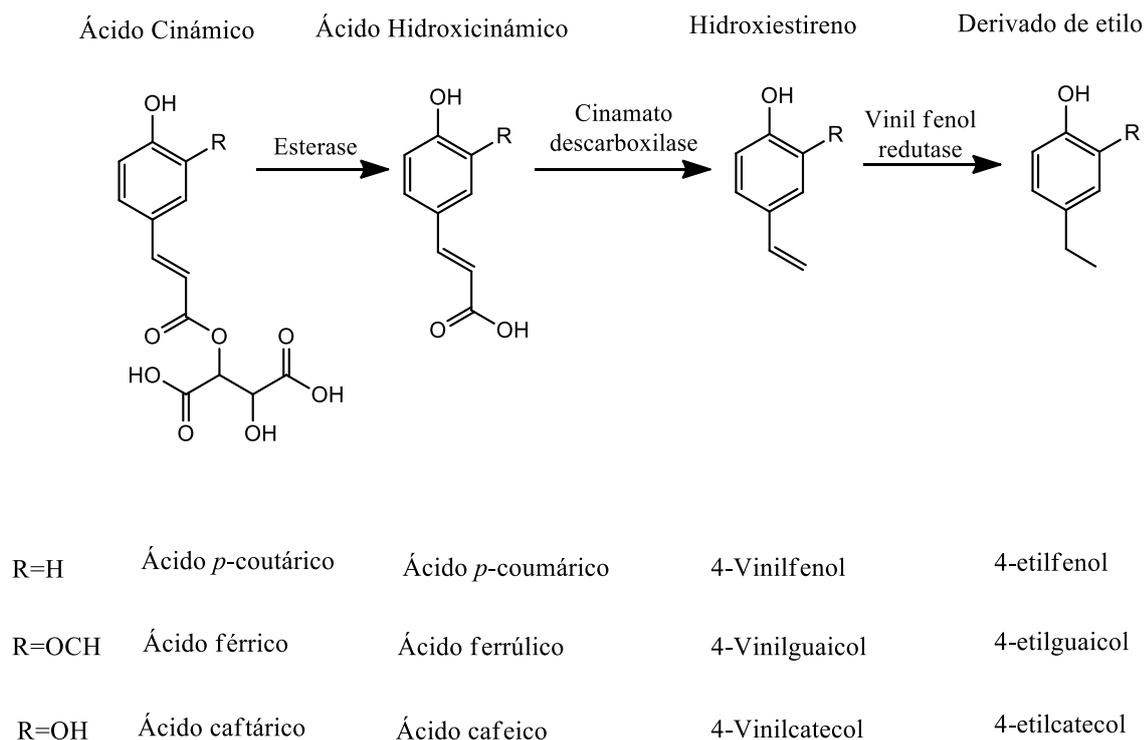
Relativamente ao consumo de azoto, *D. bruxellensis* apresenta uma panóplia de fontes bastante mais diversificada em relação a *S. cerevisiae*, uma vez que pode utilizar nitrato como fonte única de azoto, ou consumi-lo juntamente com outras fontes<sup>57</sup>. Apesar do metabolismo do azoto constituir um gasto avultado de energia, continua a fornecer uma vantagem a *D. bruxellensis* em meios com elevadas concentrações de nitrato. Também pode usar aminoácidos como fonte de azoto, sendo a glutamina o aminoácido preferido<sup>58</sup>.

Esta levedura pode também obter energia de diferentes açúcares. De entre estes, o principal é a glicose, sendo que também consegue fermentar maltose, sacarose (cuja utilização eficiente depende da existência de um transportador adequado) e frutose, no entanto, a uma taxa mais lenta<sup>59</sup>. No entanto, além destes, todo o género *Brettanomyces* é capaz de degradar açúcares não fermentáveis por *Saccharomyces*, como celobiose e dextrinas<sup>60</sup>.

Relativamente aos metabolitos produzidos, *D. bruxellensis* é responsável pela produção de muitos compostos responsáveis por alterações sensoriais nas bebidas. 2-etiltetrahidropiridina (ETPH), 2-acetiltetrahidropiridina (ATPH) e 2-acetilpirrolina (APY) e ácidos gordos voláteis são os principais compostos relacionados com os aromas de vinho detiorado<sup>61</sup>, ésteres voláteis responsáveis por aromas frutados<sup>62</sup> e glicerol (que *D. bruxellensis* não produz em grandes quantidades) não tem um aroma específico.

Ésteres voláteis são compostos também bastante importantes. *D. bruxellensis* é caracterizada por produzir no caso específico de cervejas *lambic* quantidades baixas de acetato de isoamilo, e quantidades mais elevadas de decanoato de etilo e lactato de etilo em comparação com as cervejas obtidas da fermentação das leveduras tradicionais *Saccharomyces*<sup>43</sup>.

No entanto, são os compostos fenólicos voláteis os mais importantes, não só pela sua influência no sabor (aroma fenólico), mas também por serem uma medida da atividade de *D. bruxellensis*, sendo isto especialmente importante no seu controlo quando a sua presença não é desejada<sup>63</sup>. De facto, os compostos fenólicos voláteis são de tal maneira característicos de *D. bruxellensis* que esta levedura é utilizada, devido ao seu odor relacionado com estes compostos voláteis, para atrair a mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*), fazendo uso da sua capacidade de transformação de ácidos cinâmicos em etilfenóis<sup>64</sup>. Na **Figura 5** estão representados, entre outros, os 6 principais compostos fenólicos produzidos por *D. bruxellensis*: 4-etilguaicol (4-EG), 4-etilfenol (4-EP), 4-etilcatecol (4-EC) e os seus precursores 4-vinilguaicol (4-VG), 4-vinilfenol (4-VP) e 4-vinilcatecol (4-VC).



**Figura 5** Principais compostos fenólicos voláteis produzidos por *D. bruxellensis*. Adaptado de Steensels e colegas<sup>49</sup>.

Na literatura estão descritos vários estudos do comportamento destas espécies em culturas mistas. Meneghin e os seus colaboradores testaram co-culturas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, com concentrações iniciais desta na ordem das 10 e 1000 células/ml, com e sem reciclagem celular.<sup>53</sup> Repararam que com a concentração inicial de 1000 células/ml, com e sem reciclagem, o pH era menor e a produção de álcool e era menor e mais lenta do que em culturas puras de *S. cerevisiae* ou *D. bruxellensis*. Mencionam ainda uma sensibilidade semelhante por parte de ambas as espécies aquando da adição à cultura de etanol a 8 %, e para percentagens de 5 % de etanol adicionado sem reciclagem celular inibia o crescimento de *D. bruxellensis* (sendo que com reciclagem celular isto não se verificava).

**Tabela 2** Representação das eficiências fermentativas em culturas puras e diferentes co-culturas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*. Adaptado de Meneghin e colegas<sup>53</sup>.

Ensaio Fermentativo		Eficiência da Fermentação (%)
Sistema em <i>batch</i> sem reciclagem de células	<i>S. cerevisiae</i>	76,0
	<i>D. bruxellensis</i>	70,05
	<i>S. cerevisiae</i>	86,3
Sistema em <i>batch</i> com reciclagem de células	<i>S. cerevisiae</i> + 10 células <i>D. bruxellensis</i> /mL	80,3
	<i>S. cerevisiae</i> + 100 células <i>D. bruxellensis</i> /mL	78,4
	<i>D. bruxellensis</i>	33,3

Abbott e colaboradores<sup>52</sup>, num estudo em puré de milho, aferiram que *S. cerevisiae* possui uma vantagem sobre *D. bruxellensis* num alcance de 0-8 % de etanol, sendo que para valores acima, o seu crescimento parava. Contudo, referem que *D. bruxellensis* só reverteria essa vantagem em caso da acumulação de valores industrialmente relevantes de ácido acético, de modo a competir com *S. cerevisiae*. Em 1989, provou-se que esta inibição se prendia com uma forma não dissociada deste ácido, que atuaria de forma sinérgica com o etanol e que causava a inibição, e não a descida do pH<sup>65</sup>.

Renouf e colegas<sup>21</sup> estudaram as interações entre diferentes espécies em co-cultura no vinho, em comparação com as diferentes culturas puras. De notar que, ao longo do tempo, a maior percentagem de leveduras não-*Saccharomyces* sempre foi *D. bruxellensis*. Foi verificado que o tempo necessário para consumir a totalidade de açúcares foi menor em co-cultura do que em cultura pura de *S. cerevisiae*, o que poderá indicar metabolismos sinérgicos. Estes autores repararam numa evolução igual nas populações de ambas as espécies (apesar do domínio de *S. cerevisiae*) até ao dia 25 da experiência, a partir do qual houve um decréscimo na população de *S. cerevisiae*, e um aumento na população de *D. bruxellensis*, num período com um nível baixo de açúcares.

Na **Tabela 3** encontram-se resumidas as diferentes características que caracterizam *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*.

**Tabela 3** Generalização das principais características de *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae*. De notar que pode haver bastante variabilidade em certas características ao nível das diferentes estirpes. Adaptado de Colomer e colaboradores<sup>44</sup>.

		<i>D. bruxellensis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Consumo	Glicose	✓	✓
	Maltose	✓	✓
	Maltotriose	✓	✓
	Dextrinas	✓	✗
	Celobiose	✓	✗ <sup>1</sup>
	Nitrato	✓	✗
Produção	Etanol	✓	✓
	Glicerol	✗ <sup>2</sup>	✓
	Ácido Acético	✓	✗ <sup>3</sup>
	Sabor fenólico	✓	✗
Fermentação	Efeito de Crabtree	✓	✓
	Efeito de Custer	✓	✗
	Temperatura ótima de fermentação (°C)	21-25	24-28
	Atenuação	Elevada	Normal
Mecanismos de melhoria de estirpes	Floculação	Baixa	Baixa-Elevada
	Acasalamento/reprodução	✗	✓
melhoria de estirpes	Sensibilidade UV	✓	✓
	Recombinação Homóloga	✗	✓
	CRISPR-Cas9	✗	✓

<sup>1</sup>Algumas estirpes foram comprovadas como capazes de utilizar celobiose

<sup>2</sup>Reportado em pequenas quantidades, apenas nalguns estudos

<sup>3</sup>Tipicamente produzido. Mas em quantidades bastante mais pequenas em comparação com *D. bruxellensis*

## 1.4. Variáveis nas co-culturas

A utilização de co-culturas requer o controlo de certas variáveis que vão afetar o seu desempenho, desde o crescimento dos diferentes microrganismos, à produção de metabolitos, ou mesmo à sua sobrevivência. O estudo destas variáveis resulta, portanto, na otimização dos resultados obtidos, sendo que os diferentes objetivos na utilização de co-culturas se encontra esquematizado na **Figura 6**. Isto é necessário, sobretudo, na pesquisa de fármacos, onde se pretende que as co-culturas e meios utilizados representem da forma mais fiel possível os tecidos humanos *in vivo*, de modo a possibilitar uma monitorização de elevada resolução das interações dos respetivos fármacos nas interações entre as células<sup>1</sup>.

Primeiramente, é ideal ter em conta o ambiente extracelular. É nele em que as diferentes culturas vão crescer, e está diretamente relacionado com a interação entre as mesmas. A estabilidade que o meio pode (ou não) dar às interações estabelecidas entre as culturas pode definir o seu comportamento. As diferentes populações podem ter um comportamento cooperativo num certo ambiente ou com certas

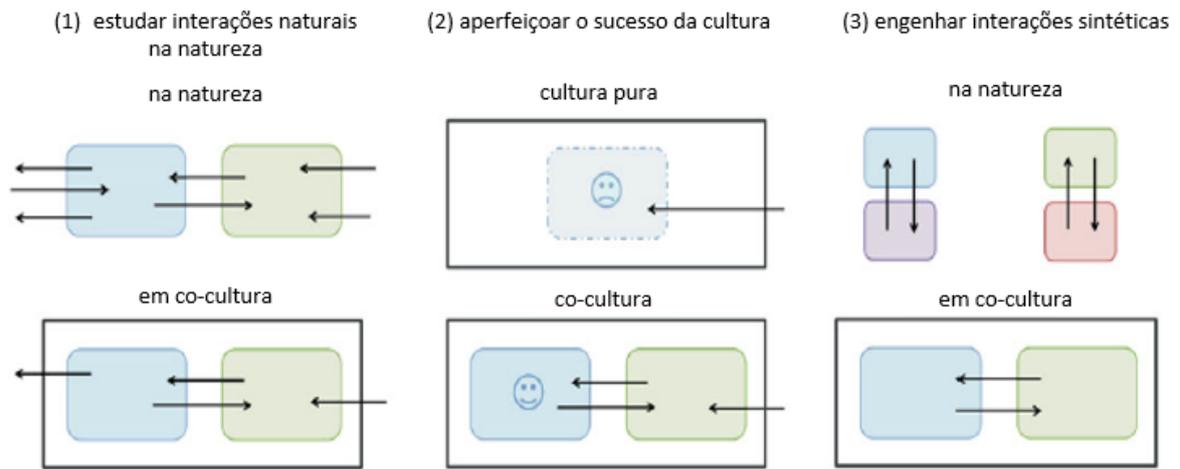
populações, mas competitivo com outras populações ou noutras condições<sup>2</sup>. Um exemplo disso é um sistema sintético com 3 populações diferentes de *E. coli*, em que cada estirpe beneficia o crescimento de uma e inibe a proliferação da outra<sup>66</sup>.

Quanto mais populações houver em cultura, maior será o número de interações entre as células, o que pode resultar em várias vias reacionais, o que torna o processo bastante complexo. Por esta razão, a maioria dos estudos realizados com co-culturas apresenta apenas 2 populações diferentes<sup>20,23,53,67,68</sup>. É necessário também definir o nível de semelhança entre as espécies utilizadas, genética e ecologicamente. Podem ser da mesma estirpe, diferindo apenas na expressão de alguns genes, ou serem completamente diferentes. Por outro lado, podem cooperar entre si, ou apresentar papéis antagónicos, como predador/presa, ou hospedeiro/parasita.

Em alguns casos, é necessário ter em conta uma possível separação (parcial ou total) das culturas. Isto pode ser necessário, sobretudo, em situações em que uma das espécies produza compostos tóxicos para as outras<sup>69</sup>. Por outro lado, caso a separação seja inevitável, devido a incompatibilidades com o meio, é possível a utilização de material permeável. Por exemplo, quando uma das culturas produz metabolitos utilizados pelas outras.

De notar também que é necessário ter em conta o volume a utilizar. Este aspeto é essencial quando se pretender realizar ora um *scale up*, para volumes industriais ou a pequena escala, com a finalidade de realizar testes de elevada resolução. Neste último caso, o volume a utilizar deve ser mantido ao mínimo possível, de forma a minimizar os custos. Por vezes, é possível manter volumes assimétricos para as diferentes culturas, contudo, à medida que se aumenta o volume, torna-se cada vez mais complicado manter a composição pretendida do meio<sup>70</sup>.

Em co-cultura, raramente as populações são estabilizadas ao mesmo nível, sendo que normalmente há uma espécie dominante sobre todas as outras. Os rácios entre elas devem, portanto, ser otimizados, tendo em conta o objetivo pretendido com a realização da respetiva co-cultura. Este controlo populacional pode ser efetuado de várias formas, como a utilização de compostos com toxicidade seletiva para certas culturas, manipulação genética, variação do pH, entre outros. Estes mecanismos podem servir, eventualmente, para manipular certas culturas, de forma a que estas coexistam com as restantes<sup>71</sup>.



**Figura 6** Objetivos da realização de co-culturas: (1) estudo das relações normais entre diferentes populações; (2) aperfeiçoamento do rendimento do cultivo de certas espécies; (3) estabelecimento de interações sintéticas entre certas populações. Adaptado de Goer e colaboradores<sup>72</sup>.

## 2. Objetivos

Dada a crescente competição no mercado alimentar, sobretudo das bebidas alcoólicas, é cada vez maior a necessidade da introdução de variáveis nos processos de fabrico dos produtos que permitam a obtenção de uma maior gama de escolhas. E é nesta necessidade que se enquadra o presente projeto, sendo que os objetivos visados são:

- Conhecer a dinâmica de crescimento de co-culturas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* quando submetidas a diferentes pressões seletivas (temperatura, percentagem de etanol, oxigénio e elevada concentração de glicose);
- Avaliar os perfis de crescimento e perfis de produção de metabolitos primários e secundários das várias condições estudadas;
- Escolher o conjunto de condições mais favoráveis para a produção de compostos característicos das estirpes em co-cultura, com impacto sensorial;
- Aplicar as co-culturas e as variáveis selecionadas em fermentações de cerveja e mosto de cerveja;

## 3. Materiais e métodos

### 3.1. Cultivo de leveduras

Utilizaram-se as leveduras *S. cerevisiae* (estirpe Wyeast 1762 Belgian Abbey II) e *D. bruxellensis*, isolada de cerveja maturada em barrica, identificada por sequenciação com 97 % de homologia (DNA ribossomal 18S, região ITS) com *D. bruxellensis*. Os inóculos foram preparados com 5 dias de antecedência no caso de *D. bruxellensis*, e 3 dias no caso de *S. cerevisiae*, em matrizes de 50 mL de volume com 30 mL de meio MYPG (*Maltose Yeast Peptone Glucose*) esterilizado em autoclave (121 °C, 15 min), constituído por extrato de malte (3 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (3 g L<sup>-1</sup>), glicose (10 g L<sup>-1</sup>) e peptona (2 g L<sup>-1</sup>), mantidos a temperatura constante de 28 °C, a 150 rpm. No dia inicial da fermentação, era retirado de cada matraz, assepticamente, o volume necessário para obter a taxa de inóculo pretendida para aquela fermentação.

### 3.2. Ensaio fermentativos

Para início dos ensaios fermentativos, determinou-se a concentração celular dos inóculos por contagem com recurso a câmara de Neubauer, com vista a averiguar qual o volume necessário de inóculo para obter as taxas de inóculo pretendidas. Prepararam-se as fermentações em câmara de fluxo laminar mantendo condições assépticas. As fermentações foram conduzidas a 28 °C (com exceção do ensaio 4.3.2, que se realizou a 21 °C) e 150 rpm em matrizes de 50 mL, fechados com rolhas de algodão, utilizando duplicados independentes para cada condição, sendo acompanhados por amostragens periódicas. Os ensaios foram realizados em meio MYPG para os ensaios 4.1 e 4.2; meio MYPG com concentrações de 10 g L<sup>-1</sup> de extrato de malte, 10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 8 g L<sup>-1</sup> de peptona e 140 g L<sup>-1</sup> de glicose para os ensaios 4.3.1 e 4.3.2; extrato de madeiras obtido segundo o método descrito por Coelho e colaboradores<sup>42</sup> para o ensaio em 4.3.3.; cerveja Argus maturada em barrica de casca de carvalho americana com contacto prévio com vinho do Porto, a duas condições de temperatura diferentes, 30 °C e 50 °C, segundo a metodologia utilizada por Coelho e colaboradores<sup>73</sup> para o ensaio 4.4.1; mosto de LETRA E (gentilmente fornecido pela empresa Fermentum – Engenharia das Fermentações Lda) para o ensaio 4.4.2; e cerveja LETRA E (gentilmente fornecida pela empresa Fermentum – Engenharia das Fermentações Lda) para o ensaio 4.4.3.

O ensaio 4.4.2 foi ainda realizado com *airlock*, destinado a simular um estado de limitante de oxigénio.

### 3.3. Determinação da concentração celular

A concentração celular dos inóculos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Após avaliação do citómetro de fluxo como método viável e alternativo à câmara de Neubauer, recorreu-se à sua utilização para contagem celular das amostras retiradas dos ensaios fermentativos. Utilizou-se para o efeito um citómetro de fluxo EC800 Sony Biotechnology, PBS a um caudal de  $40 \mu\text{L min}^{-1}$ , sendo analisados a morfologia, tamanho e fluorescência a 488 nm dos eventos.

As amostras foram todas analisadas individualmente, com diluições compreendidas entre 1:1 e 1:50, consoante a biomassa das amostras. A análise celular foi realizada segundo os seus valores em FS (tamanho) e FL (autofluorescência), num gráfico cartesiano, tendo sido previamente averiguados 2 “clusters”, correspondendo cada um aos locais de maior probabilidade de acontecimentos correspondentes a *D. bruxellensis* ou *S. cerevisiae*, sendo que eram estes os locais que eram contabilizados como número total de células de cada um dos microrganismos em estudo.

### 3.4. Análise de compostos

#### 3.4.1. Metabolitos primários

Os metabolitos primários, nomeadamente glicerol, ácido acético e etanol, bem como a fonte de açúcar (glicose) foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  como fase móvel, a 5 mM, caudal a  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , volume de injeção  $20 \mu\text{L}$ , coluna Aminex HPX-87H (BioRad), temperatura do forno de  $60^\circ\text{C}$ , e um detetor RI Knauer K2300.

As amostras foram homogeneizadas em vortex, e no caso de amostras de ensaios fermentativos que pressuponham elevadas concentrações de glicose e/ou etanol, foram realizadas diluições de 1:3. As amostras eram então centrifugadas, e filtradas a  $0,22 \mu\text{m}$  para *vials* de HPLC, utilizando *inserts* dentro dos *vials* para amostras com menor volume disponível. Os cromatogramas foram analisados recorrendo ao software Star-Chromatography Workstation versão 6.9.3 (Varian).

#### 3.4.2. Compostos minoritários

Para análise dos compostos voláteis minoritários, prepararam-se amostras utilizando o protocolo proposto por Oliveira e colaboradores<sup>74</sup>. Transferiu-se 8 mL das amostras para um tubo Pyrex, adicionando-se a cada um  $100 \mu\text{L}$  de padrão interno (4-nonanol) e  $400 \mu\text{L}$  de diclorometano. Os tubos Pyrex com a amostra colocaram-se sob agitação com magneto durante 15 min. Os extratos foram então

recuperados com uma pipeta de Pasteur, e desidratados com sulfato de sódio anidro, tendo sido analisados de seguida.

Os compostos minoritários foram analisados por cromatografia de gás acoplada com espetrometria de massa (GC-MS), sendo utilizado um cromatógrafo Varian 3800, equipado com um injetor 1079 e um detetor de massa ion-trap (Varian Saturn 2000). Injetou-se 1  $\mu\text{L}$  de amostra em modo splitless (30s) numa coluna Sapiens-Wax MS Teknokroma (30m x 0,25mm, filme com espessura de 0,25  $\mu\text{m}$ ). O gás de transporte utilizado foi o hélio, a um fluxo constante de 1,3  $\text{mL min}^{-1}$ . O detetor foi programado para o modo impacto eletrónico, com uma energia de ionização de 70 eV, e uma gama de aquisição entre os 35  $\text{m z}^{-1}$  e 300  $\text{m z}^{-1}$ . A temperatura do forno foi ajustada inicialmente para 60  $^{\circ}\text{C}$ , durante 2 min, e de seguida aumentada para 234  $^{\circ}\text{C}$  a 3  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , de 234  $^{\circ}\text{C}$  para 250  $^{\circ}\text{C}$  a 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , e finalmente a 250  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Os compostos foram identificados com recurso ao software Star-Chromatography Workstation versão 6.9.3 (Varian). Esta análise foi realizada comparando os espetros de massa e tempo de retenção das amostras com o padrão puro. A quantificação de cada composto volátil minoritário foi efetuada de acordo com o método de calibração interna e a concentração foi expressa como equivalentes de 4-nonanol, convertidos para concentrações expressas em  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

### **3.5. Análise estatística**

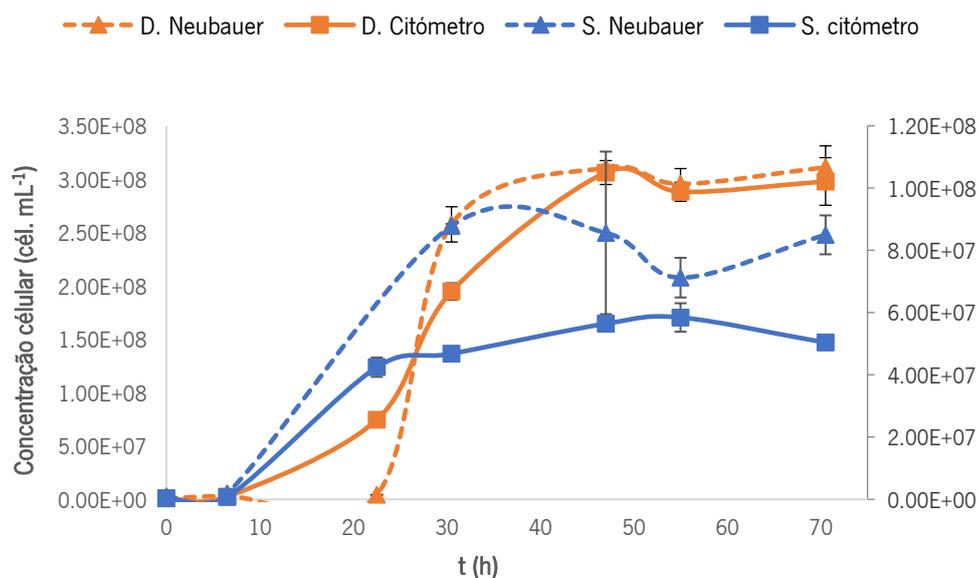
Todos os ensaios foram realizados em duplicado, e os valores obtidos estão representados com as médias e respetivos erros absolutos das médias.

## 4. Resultados e Discussão

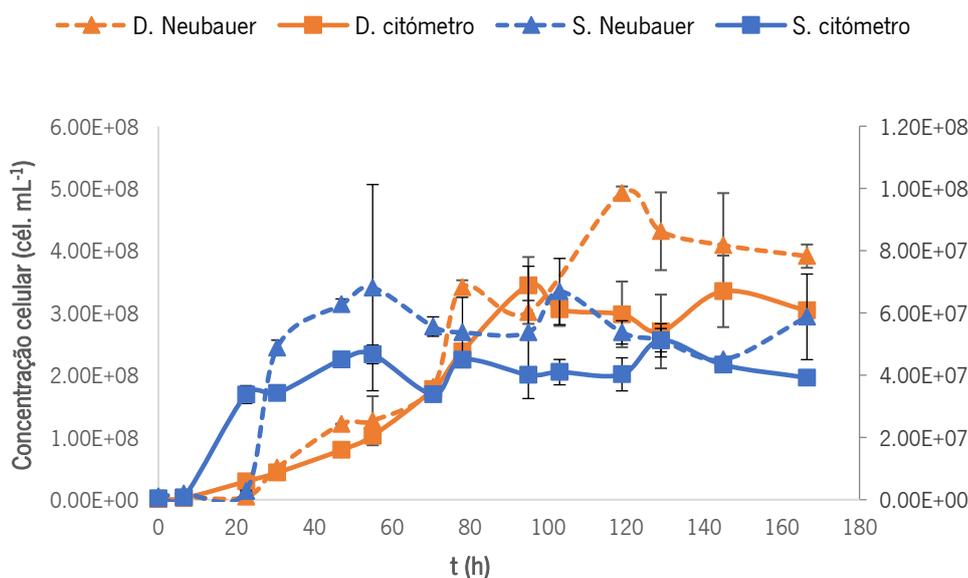
### 4.1. Adaptação de um método para análise do crescimento em co-cultura por citometria de fluxo

O primeiro ensaio fermentativo teve como objetivo a avaliação da citometria de fluxo como método viável de contagem celular para os parâmetros utilizados. Num estudo realizado por Camacho-Fernández e colaboradores, por comparação de resultados obtidos por estes dois métodos de análise, chegou-se à conclusão que a câmara de Neubauer permite obter valores mais precisos e exatos, enquanto a citometria de fluxo destaca-se pela reprodutibilidade<sup>75</sup>.

Primeiramente realizaram-se as contagens do número de células na câmara de Neubauer, diferenciando-se as células por tamanho e morfologia, tendo-se de seguida comparado estes valores com os valores das contagens obtidos por citometria de fluxo. Pretendeu-se também com este ensaio avaliar o comportamento de cada uma das leveduras em cultura pura e co-cultura em meio sintético, servindo como meio de comparação para os ensaios fermentativos seguintes. Realizou-se um ensaio fermentativo em meio MYPG de duas culturas puras de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* e uma co-cultura de ambas na razão de 1:1, com um inóculo de  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>. Estas contagens estão representadas nas **Figuras 7 e 8**.



**Figura 7** Perfil de crescimento de *D. bruxellensis* (cél mL<sup>-1</sup>; curvas a laranja) e *S. cerevisiae* (cél mL<sup>-1</sup>; curvas a azul) em cultura pura. Comparação das contagens em câmara de Neubauer (curvas a tracejado) e citómetro (curvas preenchidas). As contagens relativas a *S. cerevisiae* encontram-se em eixo secundário



**Figura 8** Perfil de crescimento da co-cultura de *D. bruxellensis* (cél mL<sup>-1</sup>; curvas a laranja) e *S. cerevisiae* (cél mL<sup>-1</sup>; curvas a azul). Comparação das contagens em câmara de Neubauer (curvas a tracejado) e citómetro (curvas preenchidas). As contagens de *S. cerevisiae* encontram-se em eixo secundário.

Por observação dos resultados, é notória uma semelhança nos perfis obtidos no citómetro com os perfis obtidos na câmara de Neubauer, contudo, existe distanciamento de alguns pontos. Entre estes, destaque para os pontos das 22,5 h e 30,5 h das culturas puras. Isto poderá dever-se ao facto de estes pontos se situarem na fase de crescimento exponencial da levedura, onde as células se encontram em constante divisão, sendo possível que algumas células que se encontrassem nesta fase tenham sido contadas como um evento na câmara de Neubauer, e dois eventos no citómetro, e vice-versa. Isto tem especial importância na contagem de *D. bruxellensis*, que adota uma forma longitudinal quando se encontra em divisão, dificultando a distinção entre células individualizadas.

Outros fatores devem ser tidos em conta quando comparados os valores obtidos nas contagens dos dois métodos. Primeiramente, as amostras eram analisadas imediatamente na câmara de Neubauer quando eram retiradas, sendo de seguida congeladas antes de serem analisadas por citómetro. Isto pode ter tido repercussões na viabilidade celular, podendo ter originado inclusive rutura, o que justifica o facto de para a mesma condição os resultados das contagens da câmara de Neubauer serem constantemente superiores às do citómetro.

Também as diluições podem constituir um fator importante, uma vez que para se proceder às contagens das mesmas amostras na câmara de Neubauer, eram necessárias diluições superiores (1:20-

1:50) do que as efetuadas para análise no citómetro (1:10), estando maiores erros associados a diluições superiores.

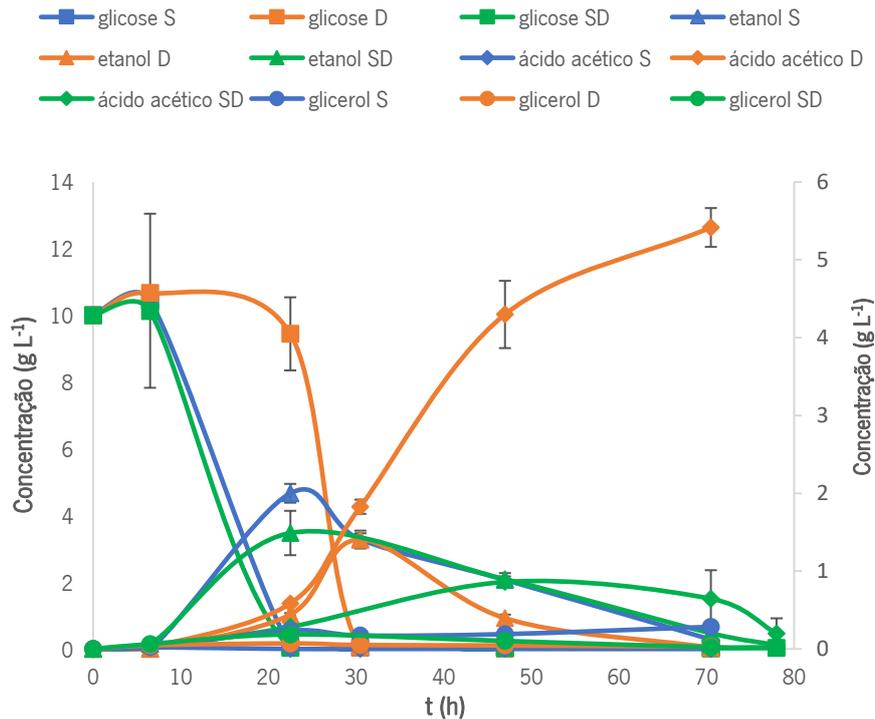
Relativamente a *D. bruxellensis* em cultura pura, esta apresenta uma fase *lag* de adaptação ao meio, que dura sensivelmente entre 10-20 h, seguindo-se uma fase exponencial que dura até cerca das 30 h, atingindo uma concentração celular máxima de cerca de  $3 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>, mantendo-se nessa concentração ao longo do tempo.

A levedura *S. cerevisiae* entra na fase exponencial mais cedo, relativamente a *D. bruxellensis*, a partir das 7-8 h, duração da sua fase *lag*, contudo, tem maior duração que a fase exponencial de *D. bruxellensis*, durando aproximadamente 18-23 h (não sendo, no entanto, possível averiguar com maior exatidão o intervalo de tempo da fase de crescimento exponencial, devido ao intervalo de amostragem) atingindo uma concentração celular menor, entre  $6 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>.

Em co-cultura, ambos os microrganismos apresentam diferenças no seu crescimento. *D. bruxellensis* nunca chega a entrar propriamente numa fase exponencial, sendo observável um crescimento linear, que segue uma fase *lag* mais curta (7-8 h). Este crescimento linear dura até perto das 100-120 h, quando entra em fase estacionária, atingindo uma concentração celular máxima entre  $3 \times 10^8$  -  $4 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>.

*S. cerevisiae* também apresentou algumas diferenças no seu perfil de crescimento. Com uma fase *lag* que durou entre 10-20 h, entrou numa fase exponencial que durou 10 h, tendo iniciado a fase estacionária por volta das 25-30 h, a uma concentração celular máxima de  $5 \times 10^7$  -  $7 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>.

A análise dos metabolitos primários destes ensaios fermentativos por HPLC encontra-se representada na **Figura 9**.



**Figura 9** Perfis de produção de metabolitos primários das culturas puras de *S. cerevisiae* (S; curvas a azul) e *D. bruxellensis* (D; curvas a laranja) e respetiva co-cultura (SD; curvas a verde) em meio MYPG: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O ácido acético e o glicerol encontram-se representados no eixo secundário.

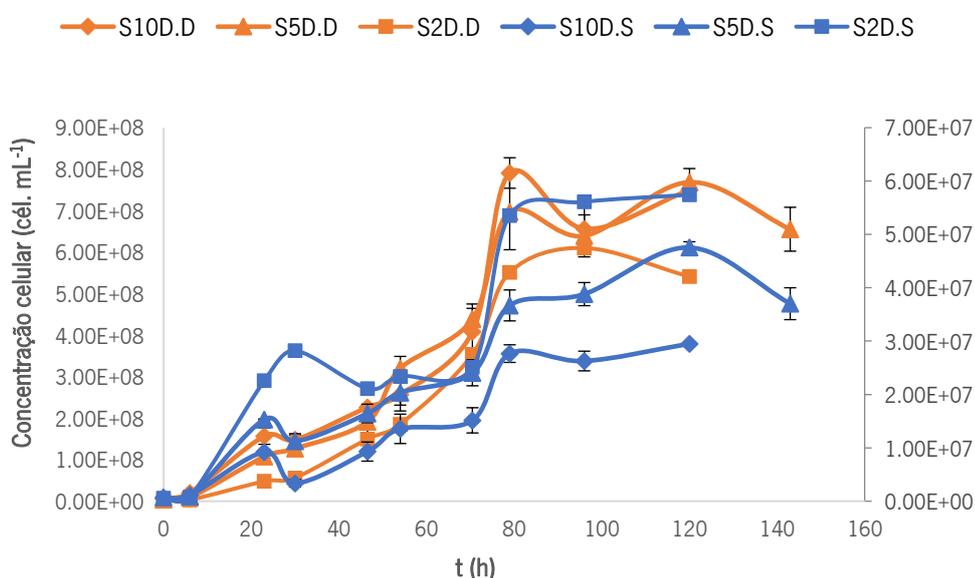
É possível ver pela **Figura 9** a fase *lag* de *D. bruxellensis*, que dura até perto das 20h, altura em que a levedura começa a consumir glicose e se começa a observar a formação de etanol e ácido acético. Estes metabolitos atingiram uma concentração máxima de  $3,28 \pm 0,28 \text{ g L}^{-1}$  e  $5,42 \pm 0,25 \text{ g L}^{-1}$ . Também foi verificada a produção de glicerol, ainda que em quantidades bastante menores ( $0,07 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ ).

*S. cerevisiae* consumiu a fonte de açúcar disponível mais rapidamente, tendo esta sido totalmente consumida antes das 22 h, altura em que já não foi detetada. Esta levedura teve uma concentração máxima de etanol verificada de cerca de  $4,67 \pm 0,28 \text{ g L}^{-1}$ , sendo que não se verificou produção de ácido acético. Houve produção de glicerol apenas em quantidades mais baixas ( $0,28 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ ).

Na co-cultura a glicose foi consumida à mesma velocidade da cultura pura de *S. cerevisiae*, tendo sido esgotada antes das 22 h novamente, acompanhada pela produção de etanol (concentração máxima de  $3,48 \pm 0,27 \text{ g L}^{-1}$ ). Mais uma vez, verificou-se produção de glicerol em quantidades vestigiais ( $0,19 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ ), e uma concentração de ácido acético produzido bastante menor do que na cultura pura de *D. bruxellensis* ( $0,65 \pm 0,27 \text{ g L}^{-1}$ ).

## 4.2. Efeito da taxa de inóculo

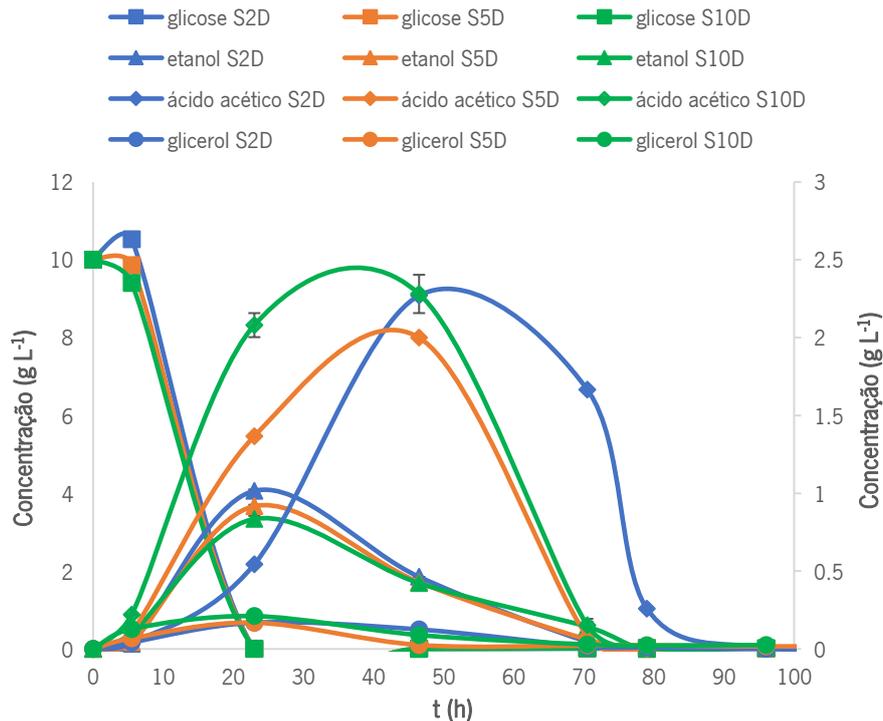
Realizaram-se 2 ensaios fermentativos para averiguar o efeito de diferentes taxas de inóculo inicial de cada uma das leveduras no seu crescimento em co-cultura. Testou-se em cada ensaio 3 taxas de inóculo diferentes, favorecendo cada uma das leveduras. Utilizaram-se 3 razões diferentes: 1:2, 1:5 e 1:10. Realizaram-se dois ensaios, cada um favorecendo uma levedura diferente, com inóculos de  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  para a levedura não favorecida, e  $2 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ,  $5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  e  $1 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  para a levedura favorecida. Os perfis de crescimento do ensaio que favorece *D. bruxellensis* encontram-se representados na **Figura 10**.



**Figura 10** Perfis de crescimento das co-culturas de *S. cerevisiae* (cél  $\text{mL}^{-1}$ ; curvas a azul) e *D. bruxellensis* (cél  $\text{mL}^{-1}$ ; curvas a laranja) inoculadas nas razões 1:2 (S2D; quadrados), 1:5 (S5D; triângulos) e 1:10 (S10D; losangos). As contagens de *S. cerevisiae* encontram-se em eixo secundário.

Nos 3 casos é possível observar que *D. bruxellensis*, neste caso a levedura favorecida, tem um crescimento exponencialmente superior relativamente a *S. cerevisiae*, aumentado também a concentração celular máxima com o aumento da razão de inóculo, sendo cerca de  $6,10 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ,  $7,69 \times 10^8 \pm 1,30 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  e  $7,91 \times 10^8 \pm 3,68 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  para as razões de 1:2, 1:5 e 1:10 respetivamente. A levedura *S. cerevisiae* apresenta uma dinâmica de crescimento semelhante, mas atinge concentrações celulares menores.

Os perfis de produção de metabolitos primários correspondentes a este ensaio estão representados na **Figura 11**.



**Figura 11** Perfis de produção de metabolitos primários das co-culturas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* nas razões 1:2 (curvas a azul), 1:5 (curvas a laranja) e 1:10 (curvas a verde): glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O glicerol e o ácido acético encontram-se em eixo secundário.

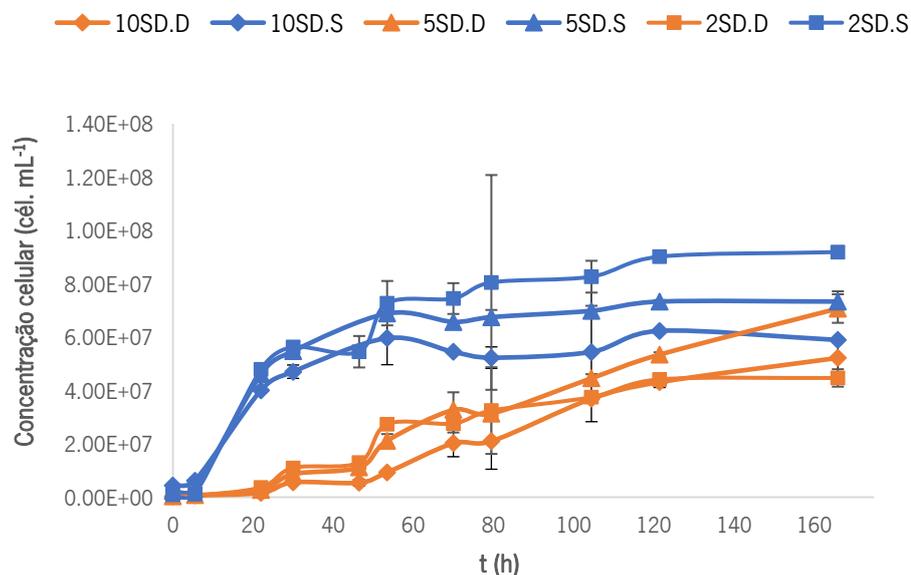
Os 3 perfis de metabolitos são bastante semelhantes, e mostram que a glicose foi consumida nas primeiras 20 h de fermentação, sendo que quando se inicia o seu consumo dá-se a produção de etanol, atingindo uma concentração máxima de  $4,06 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$  para a razão 1:2. Houve produção de ácido acético nos 3 casos, tendo a concentração máxima sido  $2,28 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ , verificada às 46,5 h na razão 1:2. Deu-se produção de glicerol, novamente em concentrações bastante mais baixas, tendo o seu máximo sido atingido no ensaio de razão 1:10, com uma concentração de  $0,21 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ .

O crescimento elevado de *D. bruxellensis* dever-se-á certamente ao seu favorecimento em relação a *S. cerevisiae*, o que lhe permite vencer a competição inicial pela glicose, o que resulta num crescimento mais acentuado. Isto por sua vez leva à produção de elevadas concentrações de etanol e ácido acético, entre outros metabolitos secundários, que tornam o meio de cultura adverso, ao qual *D. bruxellensis* apresenta maior resistência<sup>43,50,76</sup>.

Outro fator a ter em conta no comportamento de *D. bruxellensis* é a estratégia “*make-accumulate-consume*”<sup>43</sup>. Esta estratégia é verificada em ambas as leveduras relativamente ao etanol (produzir etanol, acumular no meio para impedir a proliferação dos restantes microrganismos, e mais tarde assimilar o etanol quando o açúcar tiver sido totalmente consumido), mas *D. bruxellensis* apresenta este mecanismo também no caso do ácido acético<sup>77</sup>. Desta forma, esta levedura compete com *S.*

*cerevisiae*, prevenindo o seu crescimento com a libertação de ácido acético (devido ao baixo pH derivado da produção deste metabolito), consumindo-o mais tarde aquando do esgotamento de açúcares (mecanismo conhecido como mudança diáuxica, que define a alteração na preferência por uma fonte de carbono quando há esgotamento de açúcares em condições aeróbias, presente em ambas as leveduras)<sup>78</sup>. Isto é possível derivado do mecanismo de *D. bruxellensis* de formar ácido acético a partir de etanol, fazendo uso de acetaldeído como intermediário.

Este ensaio foi repetido nas mesmas razões beneficiando *S. cerevisiae*, e os perfis de crescimento estão representados na **Figura 12**.



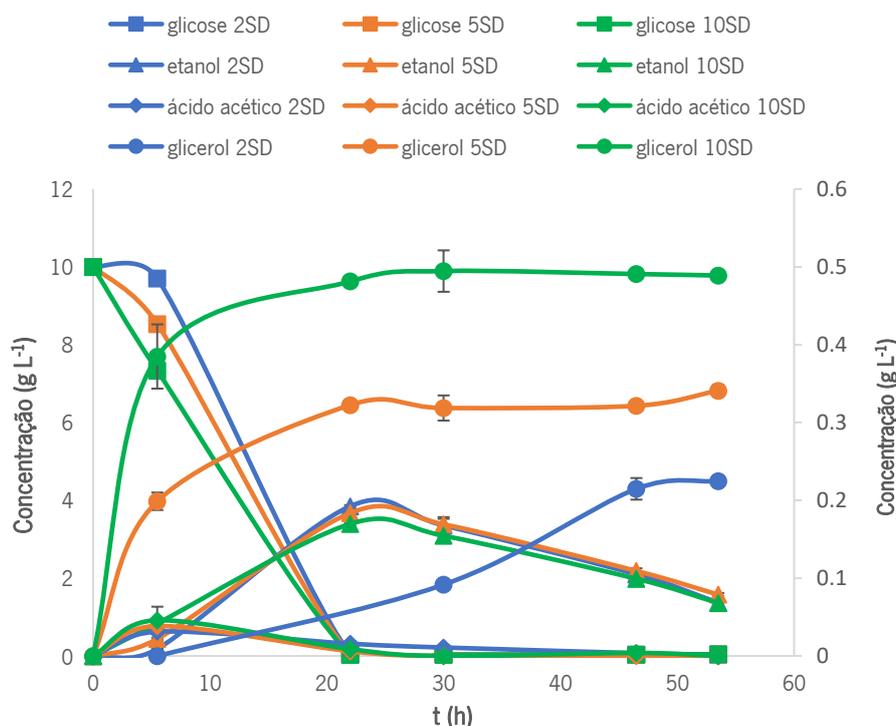
**Figura 12** Perfis de crescimento das co-culturas de *D. bruxellensis* (cél mL<sup>-1</sup>; curvas a laranja) e *S. cerevisiae* (cél mL<sup>-1</sup>; curvas a azul) nas razões 1:2 (2SD; quadrados), 1:5 (5SD; triângulos) e 1:10 (10SD; losangos).

O aumento da taxa de inóculo de *D. bruxellensis* em relação a *S. cerevisiae* tem um efeito diferente do que o aumento da taxa de inóculo no sentido oposto. *S. cerevisiae*, neste caso o organismo favorecido, cresce mais rapidamente que *D. bruxellensis*, mas contrariamente ao ensaio anterior (**Figura 10**), o aumento da taxa de inóculo de *S. cerevisiae* em relação a *D. bruxellensis* permite equilibrar as populações das duas leveduras no final do processo fermentativo. Relativamente ao ensaio na razão 1:2, *S. cerevisiae* foi constantemente superior em termos de concentração total em relação a *D. bruxellensis*, tendo, no entanto, ambos os microrganismos tido uma dinâmica de crescimento bastante semelhante.

O comportamento evidenciado pelas leveduras neste ensaio remete novamente para a adaptação a pressões do meio de *D. bruxellensis*, em detrimento de *S. cerevisiae*. Mesmo começando em

desvantagem, esta levedura consegue atingir concentrações celulares bastante elevadas (não obstante, mais baixas do que as obtidas em cultura pura).

Os perfis de produção de metabolitos primários correspondentes a estes ensaios encontram-se representados na **Figuras 13**.



**Figura 13** Perfis de produção de metabolitos primários das co-culturas de *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* nas razões 1:2 (curvas a azul), 1:5 (curvas a laranja) e 1:10 (curvas a verde): glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O ácido acético e o glicerol encontram-se no eixo secundário.

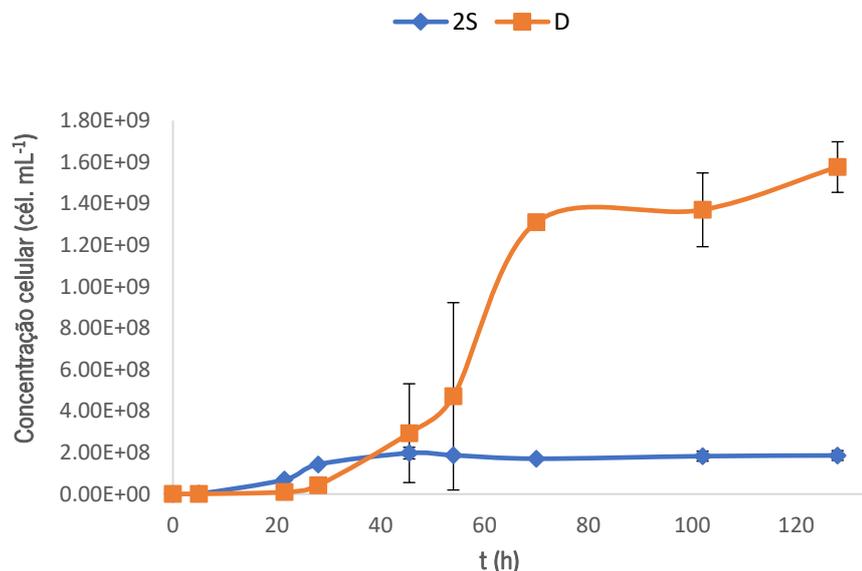
Por análise dos perfis de produção de metabolitos primários deste ensaio fermentativo, denota-se um aumento no consumo de glicose com o aumento da razão de inóculo de *S. cerevisiae* em relação a *D. bruxellensis* (contudo não se pode aferir devidamente este aumento, devido a um intervalo de amostragem insuficiente). Por outro lado, a produção de glicerol aumentou também a par do aumento da taxa de inóculo, com uma concentração máxima de  $0,22 \pm 0,00 \text{ g L}^{-1}$  para a razão 1:2,  $0,38 \pm 0,00 \text{ g L}^{-1}$  para a razão 1:5 e  $0,54 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$  para a razão 1:10. As diferentes taxas de inóculo, contudo, não provocaram alterações na produção de etanol, uma vez que o seu perfil se manteve praticamente inalterado. De notar novamente a potencial ocorrência do mecanismo de mudança diáuxica, uma vez que quando se dá o consumo total de glicose, observa-se uma diminuição na concentração do etanol, derivado do seu consumo pelas leveduras<sup>78</sup>.

Outra ilação a retirar, comum aos 3 ensaios, é a produção de concentrações bastante baixas de ácido acético, apesar de se ter verificado um crescimento (ainda que tardio) de *D. bruxellensis*. Apesar de haver um aumento às 5,5 h, o ácido acético é praticamente consumido antes das 22 h, altura em que se retirou a amostra seguinte, e coincidente com a altura em que toda a glicose já foi consumida e em que começou a produção de etanol. É possível, portanto que *D. bruxellensis* tenha convertido o acetaldeído em etanol em vez de ácido acético, utilizando a fermentação alcoólica em detrimento da fermentação acética<sup>43</sup>.

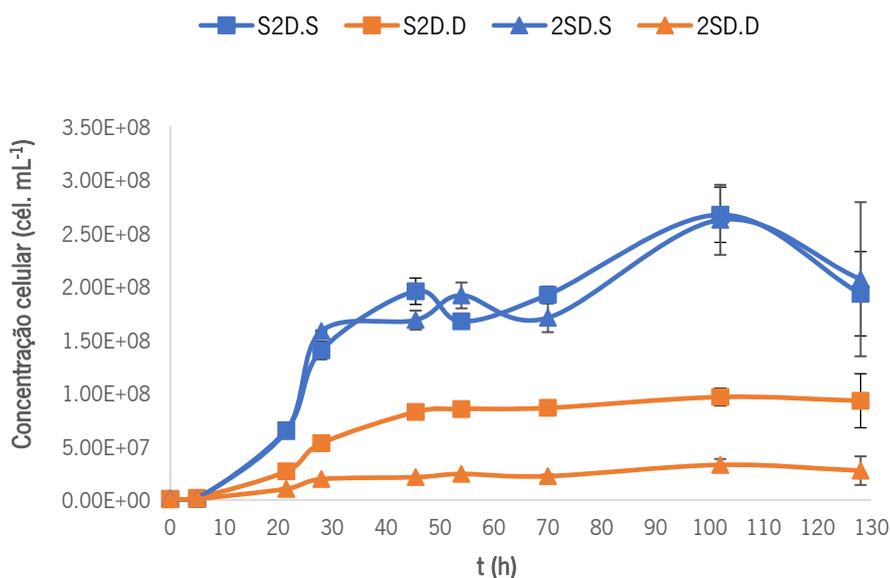
### 4.3. Efeito de substrato

#### 4.3.1. Efeito de elevada concentração de glicose

Neste ensaio fermentativo inocularam-se as leveduras *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* em meio MYPG com uma elevada concentração de glicose (140 g L<sup>-1</sup>). Este ensaio foi realizado com 4 condições diferentes: cultura pura de *D. bruxellensis* (D); cultura pura de *S. cerevisiae*, com taxa de inóculo inicial 2×10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup> (2S); 2 co-culturas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, com razões 1:2 (S2D) e 2:1 (2SD), com inóculo de 2×10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> para a levedura favorecida, e 1×10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> para a outra levedura. Os perfis de crescimento dos 4 ensaios estão exibidos nas **Figuras 14 e 15**.



**Figura 14** Perfis de crescimento das culturas puras de *S. cerevisiae* (cél mL<sup>-1</sup>; 2S; curva a azul) e *D. bruxellensis* (cél mL<sup>-1</sup>; D; curva a laranja) em meio MYPG com elevada concentração de glicose.

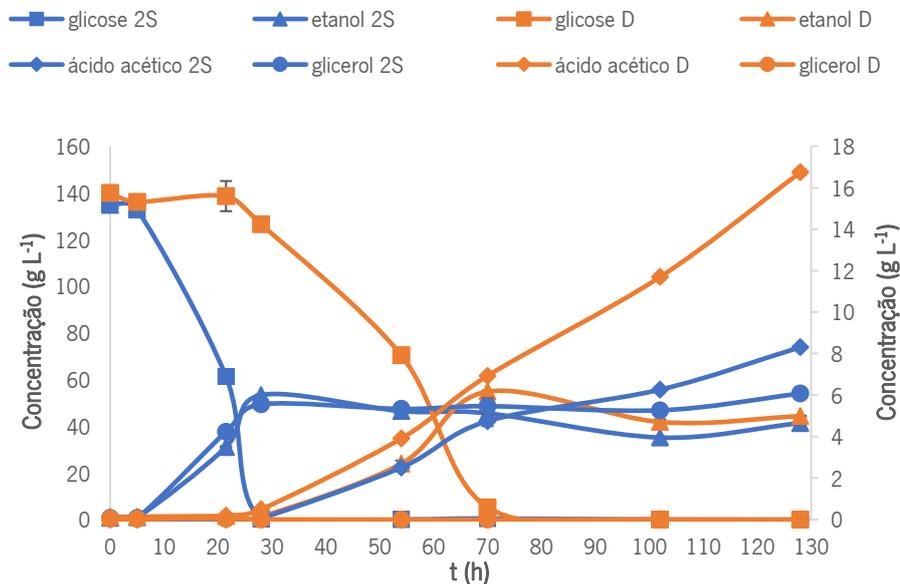


**Figura 15** Perfis de crescimento das co-culturas de *S. cerevisiae* (cél mL<sup>-1</sup>; curvas a azul) e *D. bruxellensis* (cél mL<sup>-1</sup>; curvas a laranja) S2D (inóculo de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* na razão 1:2; quadrados) e 2SD (inóculo de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* na razão 2:1; triângulos) em meio MYPG com elevada concentração de glicose.

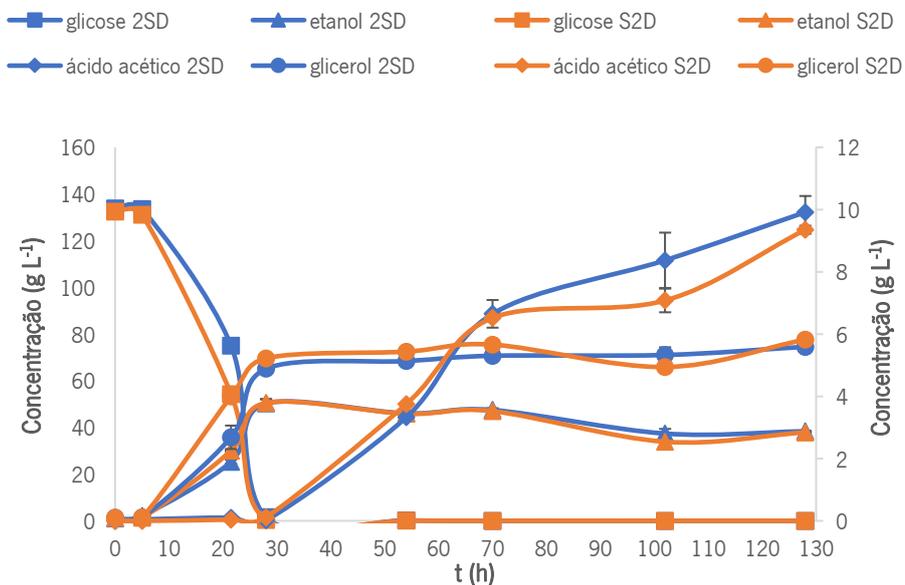
É possível observar novamente uma fase lag mais longa para *D. bruxellensis*, facilmente observável em cultura pura, durando cerca de 25-30 h, bastante mais longa que *S. cerevisiae*. Além disso, *D. bruxellensis* atinge uma maior concentração celular em cultura pura ( $1,58 \times 10^9 \pm 1,22 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>) do que *S. cerevisiae* ( $1,97 \times 10^8 \pm 2,08 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>).

Contudo, em co-cultura, *S. cerevisiae* sobrepõe-se a *D. bruxellensis* enquanto microrganismo principal. Aliás, mesmo numa razão superior (S2D), *D. bruxellensis* vê o seu crescimento rapidamente limitado pela proliferação de *S. cerevisiae*, sendo que esta levedura claramente vence a competição pelo substrato. *S. cerevisiae* atingiu a concentração celular máxima em co-cultura em S2D ( $2,67 \times 10^8 \pm 2,59 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>), e *D. bruxellensis* em cultura pura, obtendo valores ( $1,58 \times 10^9 \pm 1,22 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>) muito superiores do que em qualquer co-cultura. Isto pode-se dever não só à competição pelo substrato, mas também à rápida proliferação de *S. cerevisiae*, que pode resultar na libertação de substâncias que mais do que inibir o crescimento de *D. bruxellensis* (como é o caso do etanol) podem mesmo levar à morte celular. Branco e colegas comprovaram a libertação por parte de *S. cerevisiae* de compostos inibitórios sob a forma de péptidos antimicrobianos (*Antimicrobial Peptides*, AMPs)<sup>79</sup>. Estes AMPs correspondem a fragmentos da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, interveniente na glicólise. Estes autores repararam no efeito destes AMPs em *D. bruxellensis*, declarando morte celular total às 96 h de fermentação, realizada em meio YEPD.

Os perfis de produção de metabolitos primários destes ensaios fermentativos encontram-se representados nas Figuras 16 e 17.



**Figura 16** Perfis de produção de metabolitos primários das culturas puras de *S. cerevisiae* (2S; curvas a azul) e *D. bruxellensis* (D; curvas a laranja) em meio MYPG com elevada concentração de glicose: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O glicerol e o ácido acético encontram-se no eixo secundário.



**Figura 17** Perfis de produção de metabolitos primários das co-culturas de *S. cerevisiae* (cél mL<sup>-1</sup>) e *D. bruxellensis* (cél mL<sup>-1</sup>) 2SD (curvas a azul) e S2D (curvas a laranja) em meio MYPG com elevada concentração de glicose: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O glicerol e o ácido acético encontram-se no eixo secundário.

Em cultura pura, *S. cerevisiae* consome a glicose disponível bastante mais rápido (às 28 h já não se detetou glicose no meio) que *D. bruxellensis*, que demorou cerca de 70 h a consumir a sua totalidade. A produção de glicerol pode ser atribuída na sua quase totalidade a *S. cerevisiae*, uma vez que apenas nas culturas em que se verifica a sua presença, o glicerol atinge concentrações consideráveis (entre 5,5 e 6 g L<sup>-1</sup>), enquanto que na cultura pura de *D. bruxellensis* apenas se atingiu uma concentração máxima de 0,05±0,00 g L<sup>-1</sup>. A elevada concentração de glicerol deve-se à elevada concentração de glicose no meio, que devido ao efeito de Crabtree<sup>31</sup> resulta na produção de elevadas concentrações de etanol por via de fermentação alcoólica. O mecanismo de produção de glicerol está acoplado à glicólise, por meio dos metabolitos interconvertíveis di-hidroxiacetona fosfato e gliceráldeído-3-fosfato. A partir deste passo há produção de glicerol-3-fosfato e por fim, glicerol. Apesar de a fermentação alcoólica ser um processo que reoxida NADH, continua a haver um excesso de NADH em solução derivado da elevada produção de biomassa. A via de produção de glicerol, que faz também uso de NADH por via da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, é então utilizada para ajudar a manter o equilíbrio *redox* na célula<sup>80</sup>.

No entanto, apenas algumas estirpes de *D. bruxellensis* possuem expressão genética suficiente para a produção de glicerol-3-fosfato (por meio da enzima dependente de NADH glicerol-3-fosfato desidrogenase), e derivado à baixa concentração obtida em cultura pura, supõe-se que não é o caso da estirpe utilizada neste trabalho<sup>81</sup>.

Valores mais elevados de produção de glicerol para *S. cerevisiae* em detrimento de *D. bruxellensis* foram também atestados por Blomqvist e colaboradores, que realizaram culturas puras de 2 estirpes de *S. cerevisiae* e 3 de *D. bruxellensis* em meio sintético.<sup>82</sup>

Relativamente à produção de ácido acético, esta é superior com *D. bruxellensis* isolada, atingindo uma concentração de 16,74±0,14 g L<sup>-1</sup> na cultura pura, mas nunca passando das 10 g L<sup>-1</sup> nas co-culturas.

Outra alteração provocada pela co-cultura (perceptível pela elevada concentração inicial de glicose), é um aumento do rendimento na produção de etanol (para um rendimento teórico máximo de 0.51 (g/g) de conversão de glicose em etanol) de 68 % na cultura pura de *S. cerevisiae* para 74 % e 75 % nas condições S2D e 2SD respetivamente. Isto demonstra um efeito da co-cultura, nomeadamente o co-metabolismo da glicose em etanol, permitindo obter maiores concentrações de etanol em co-cultura do que em situação de cultura pura.

As concentrações dos compostos minoritários obtidas no final do processo de fermentação encontram-se representadas na **Tabela 4**.

**Tabela 4** Representação das concentrações dos compostos minoritários para os ensaios fermentativos com elevadas concentrações de glicose.

Composto	2S ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	D ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	S2D ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	2SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
<b>Ésteres</b>				
acetato de isobutilo	n.d.	44,1 $\pm$ 8,4	103,8 $\pm$ 2,5	73,5 $\pm$ 27,3
2-metilbutirato de etilo	n.d.	n.d.	3,5 $\pm$ 3,5	17,4 $\pm$ 3,5
acetato de isoamilo	14,3 $\pm$ 1,6	425,3 $\pm$ 49,8	242,8 $\pm$ 51,3	149,0 $\pm$ 68,6
hexanoato de etilo	14,1 $\pm$ 2,6	4,4 $\pm$ 0,3	27,7 $\pm$ 2,5	27,5 $\pm$ 4,6
lactato de etilo	6,0 $\pm$ 0,9	7,6 $\pm$ 1,9	7,2 $\pm$ 1,2	7,9 $\pm$ 0,5
octanoato de etilo	24,2 $\pm$ 3,1	n.d.	313,19 $\pm$ 48,24	291,4 $\pm$ 56,2
decanoato de etilo	2,8 $\pm$ 0,3	38,4 $\pm$ 4,3	17,2 $\pm$ 3,8	11,7 $\pm$ 2,1
succinato de dietilo	n.d.	n.d.	10,6 $\pm$ 0,3	n.d.
fenilacetato de etilo	7,1 $\pm$ 1,2	7,8 $\pm$ 1,6	7,2 $\pm$ 0,6	8,6 $\pm$ 0,1
acetato de 2-feniletano	417,8 $\pm$ 93,7	332,7 $\pm$ 30,2	280,7 $\pm$ 9,2	255,8 $\pm$ 12,4
hidrocinamato de etilo	14,5 $\pm$ 2,1	n.d.	20,4 $\pm$ 3,0	14,8 $\pm$ 0,9
<b>Álcoois</b>				
2-metil-1-propanol	1250,5 $\pm$ 162,5	69,9 $\pm$ 8,8	1026,5 $\pm$ 208,3	1048,4 $\pm$ 53,5
2-metil-1-butanol + 3 metil-1-butanol	14374,1 $\pm$ 1799,2	5198,4 $\pm$ 1296,6	817,5 $\pm$ 86,3	13327,3 $\pm$ 675,7
álcool furfúrico	12,4 $\pm$ 9,3	23,2 $\pm$ 6,2	18,4 $\pm$ 4,4	14,9 $\pm$ 0,6
2-feniletanol	20251,2 $\pm$ 2839,8	9214,7 $\pm$ 1945,7	18425,5 $\pm$ 1300,8	19429,9 $\pm$ 339,6
<b>Furanos</b>				
5-hidroxiacetilfurfural	3,3 $\pm$ 0,6	n.d.	1,4 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 1,1
<b>Ácidos</b>				
ácido propanóico	35,9 $\pm$ 9,7	33,4 $\pm$ 8,9	34,2 $\pm$ 9,9	34,7 $\pm$ 0,8
ácido isobutírico	209,1 $\pm$ 39,0	503,2 $\pm$ 156,8	226,3 $\pm$ 67,1	200,8 $\pm$ 3,9
ácido butanóico	88,2 $\pm$ 20,8	106,6 $\pm$ 29,8	74,2 $\pm$ 25,5	107,0 $\pm$ 23,5
ácido isovalérico	324,8 $\pm$ 79,9	2957,9 $\pm$ 933,3	395,5 $\pm$ 87,4	417,5 $\pm$ 20,9
ácido hexanóico	106,2 $\pm$ 35,9	575,9 $\pm$ 133,9	202,3 $\pm$ 38,9	197,4 $\pm$ 41,2
ácido octanóico	348,7 $\pm$ 102,7	2719,7 $\pm$ 287,5	501,8 $\pm$ 23,8	457,6 $\pm$ 69,3
ácido decanóico	10,3 $\pm$ 3,5	707,6 $\pm$ 51,9	16,2 $\pm$ 1,4	18,4 $\pm$ 7,6
ácido fenilacético	13,9 $\pm$ 4,2	100,7 $\pm$ 21,5	3,9 $\pm$ 0,1	17,2 $\pm$ 5,0
<b>Álcoois monoterpénicos</b>				
Linalol	3,1 $\pm$ 0,6	15,9 $\pm$ 1,6	2,8 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,5
$\beta$ -citronelol	24,2 $\pm$ 5,3	15,1 $\pm$ 0,9	22,9 $\pm$ 1,1	26,5 $\pm$ 2,2
geraniol	25,9 $\pm$ 7,2	173,3 $\pm$ 11,4	22,2 $\pm$ 3,6	23,2 $\pm$ 0,5
<b>Fenóis voláteis</b>				
4-etilguaicol	n.d.	36,4 $\pm$ 3,8	17,1 $\pm$ 2,9	12,8 $\pm$ 6,4
4-etilfenol	n.d.	12,3 $\pm$ 2,4	1,8 $\pm$ 0,6	1,8 $\pm$ 0,9
2,6-dimetoxifenol	n.d.	1,6 $\pm$ 0,4	n.d.	n.d.
tirosol	64,8 $\pm$ 13,2	8,2 $\pm$ 1,4	67,1 $\pm$ 17,9	27,9 $\pm$ 27,5
<b>Outros</b>				
acetoína	329,7 $\pm$ 104,01	n.d.	84,5 $\pm$ 7,0	157,5 $\pm$ 43,7
metionol	200,2 $\pm$ 27,2	n.d.	166,1 $\pm$ 37,7	153,9 $\pm$ 15,7

n.d. – não detetado

Por análise da **Tabela 4** denota-se que é na cultura pura de *D. bruxellensis* que se verifica maior diversidade de fenóis voláteis, verificando-se a maior concentração de 4-etilguaicol e 4-etilfenol. Não se verificando a presença de nenhum intermediário, pressupõe-se a total conversão de ácidos cinâmicos existentes inicialmente no meio (possivelmente provenientes do extrato de malte), que constituem os precursores destes 2 etilfenóis, nomeadamente o ácido *p*-cumarico e o ácido férnico.

Relativamente aos álcoois minoritários, são os componentes que existem em maior concentração neste ensaio. Com a exceção do álcool furfurílico, estes existem em maior quantidade nas condições que favorecem *S. cerevisiae* (2S e 2SD). Estes compostos originam da via de Ehrlich, por absorção de aminoácidos do meio. A levedura retira o grupo amino, e o corpo de carbono ( $\alpha$ -keto ácido) entra por uma via irreversível que eventualmente o irá transformar num álcool maioritário<sup>83</sup>. Estas elevadas concentrações de álcoois minoritários poderão dever-se à elevada concentração de aminoácidos do extrato de levedura, que existem neste ensaio e no ensaio 4.3.2., o que favorece a via catabólica de Ehrlich. Como são produzidos em quantidades superiores nas condições que favorecem *S. cerevisiae*, pressupõe-se uma maior eficácia na utilização da via de Ehrlich por esta levedura relativamente a *D. bruxellensis*.

Por outro lado, os ésteres podem ser divididos em dois grupos: os ésteres de etilo, que são formados por condensação de uma molécula de etanol com um ácido gordo de cadeia média; e os ésteres de acetato, que são formados pela condensação de ácido acético (acetato) com um álcool maioritário ou etanol<sup>84</sup>. Devido à produção de ácido acético em elevadas concentrações por *D. bruxellensis*, um éster de acetato como o acetato de isoamilo (aroma a banana) existe em concentrações superiores nas condições em que existe *D. bruxellensis*, uma vez que esta produz em elevada quantidade um dos reagentes para a sua formação. De notar a ausência de acetato de isobutilo (aroma frutado) da cultura pura de *S. cerevisiae*, mas a sua produção nas restantes condições. Contudo, como nas restantes condições a concentração de acetato de isobutilo é superior à cultura pura de *D. bruxellensis*, é possível que esta levedura não seja responsável pela produção da totalidade de acetato de isobutilo. Este pode ser formado por duas vias por *S. cerevisiae* (relatado para *S. cerevisiae*, podendo no entanto também ser válido para *D. bruxellensis*), uma fazendo uso de apenas glicose e outra via utilizando glicose e acetato<sup>85</sup>. Como *S. cerevisiae* produz acetato em concentrações bastante menores, a ausência de acetato de isobutilo poderá dever-se à utilização única ou maioritária da via do acetato. Como tal, na presença de *D. bruxellensis*, havendo produção de acetato, *S. cerevisiae* poderá fazer uso do acetato produzido pela primeira levedura para produzir acetato de isobutilo, pressupondo uma sinergia na produção deste composto por parte das duas leveduras.

Similarmente, ambas as leveduras apresentam baixas concentrações generalizadas de ésteres de etilo relativamente aos seus precursores, como é o caso do octanoato de etilo (aroma a maçã), verificando-se elevadas concentrações de ácido octanóico (ácido gordo precursor) em todas as condições; ou o decanoato de etilo (aroma frutado), que na condição 2D, apesar de estar presente uma concentração de ácido decanóico de  $707,6 \pm 51,9 \mu\text{g L}^{-1}$ , apenas apresenta uma concentração de  $38,4 \pm 4,3 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Relativamente aos álcoois monoterpénicos, destaca-se a presença em quantidades substanciais de geraniol (odor a rosas) apenas na cultura pura de *D. bruxellensis*.

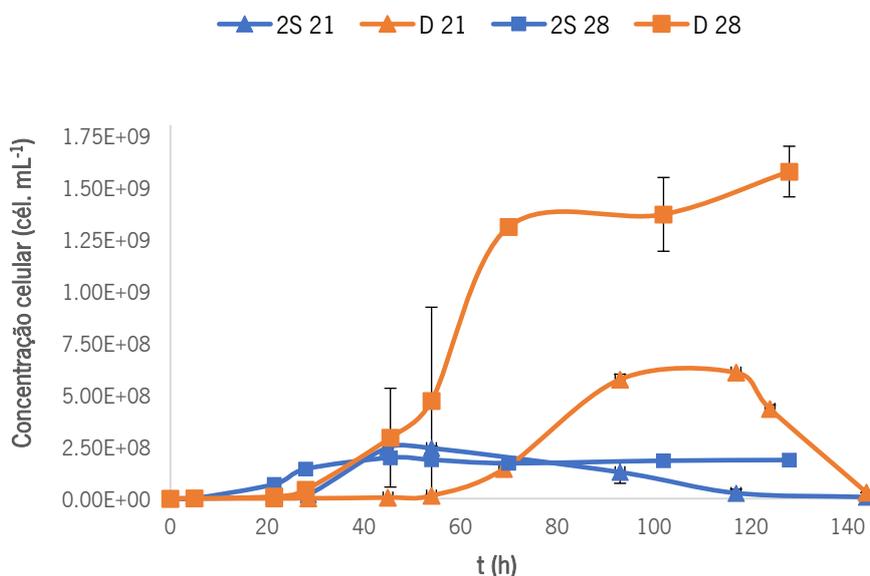
Repara-se também na produção de acetoína (aroma amanteigado) apenas nas condições em que *S. cerevisiae* se encontra presente. *S. cerevisiae* é conhecida por produzir acetoína, sendo que as concentrações produzidas variam bastante entre estirpes (de valores quase impercetíveis a valores na ordem dos 194.6 mg L<sup>-1</sup>, obtidos em mosto de uva)<sup>86</sup>.

O mesmo se atesta relativamente ao metionol (aroma complexo), que apenas é quantificado em condições em que *S. cerevisiae* se encontra presente. Perpète e colaboradores propõem uma via de formação de metionol que consiste no catabolismo do aminoácido metionina<sup>87</sup>.

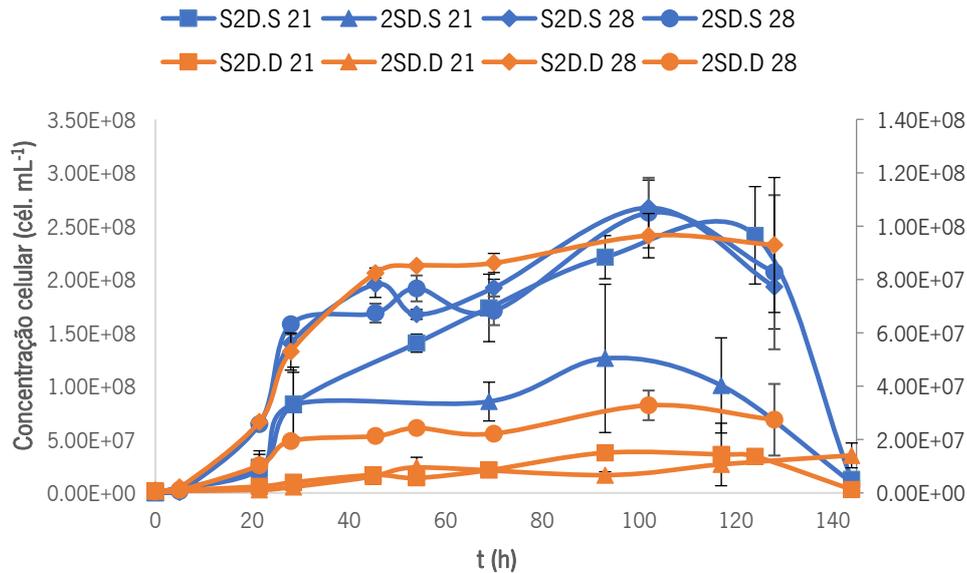
#### 4.3.2. Efeito da temperatura no ensaio com elevada concentração de glicose

Neste ensaio fermentativo procedeu-se à mesma metodologia do ensaio descrito em 4.3.1, mas utilizando uma temperatura de incubação inferior de 21 °C.

Os perfis de crescimento dos 4 ensaios estão exibidos nas Figuras 18 e 19, juntamente com os perfis de crescimento a 28 °C, para efeitos de comparação.



**Figura 18** Perfis de crescimento das culturas puras de *S. cerevisiae* (cél mL<sup>-1</sup>; 2S; curvas a azul) e *D. bruxellensis* (cél mL<sup>-1</sup>; D; curvas a laranja) a 21 °C (triângulos) e 28 °C (quadrados) em meio MYPG com elevada concentração de glicose.



**Figura 19** Perfis de crescimento das co-culturas de *S. cerevisiae* (cél mL<sup>-1</sup>; curvas a azul) e *D. bruxellensis* (cél mL<sup>-1</sup>; curvas a laranja) S2D (inóculo de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* na razão 1:2) a 21 °C (quadrados) e a 28 °C (losangos) e 2SD (inóculo de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* na razão 2:1) a 21 °C (triângulos) e a 28 °C (círculos) em meio MYPG com elevada concentração de glicose. *D. bruxellensis* encontra-se no eixo secundário.

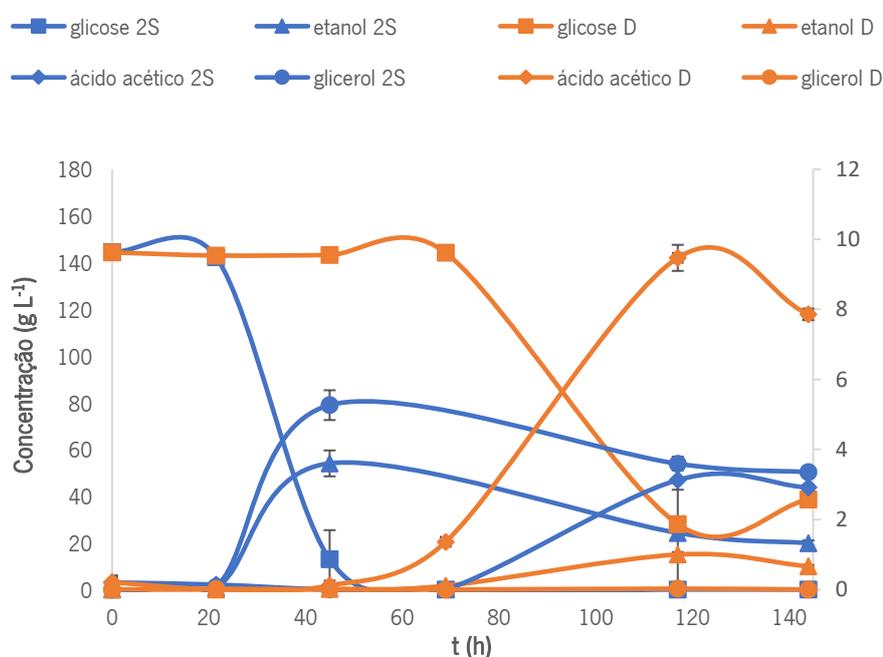
Com a diminuição da temperatura, observou-se um ligeiro aumento da biomassa na cultura pura de *S. cerevisiae*, de  $1,97 \times 10^8 \pm 2,08 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> para  $2,47 \times 10^8 \pm 5,22 \times 10^7$  células. mL<sup>-1</sup>. Já *D. bruxellensis* volta a obter uma concentração maior que *S. cerevisiae* em cultura pura ( $6,07 \times 10^8 \pm 2,84 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>), e menor em relação ao ensaio a 28 °C ( $1,59 \times 10^9$  células mL<sup>-1</sup>). Contudo, o seu crescimento é menor em competição para *S. cerevisiae*, com valores que nunca passam os  $1,50 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>.

A observação que mais se destaca neste ensaio é a rápida diminuição do número de células, por volta das 120 h de fermentação. Isto é comum à cultura pura de *D. bruxellensis*, e ambas as co-culturas, sendo a cultura pura de *S. cerevisiae* a exceção, onde a morte celular começa ainda antes das 80 h.

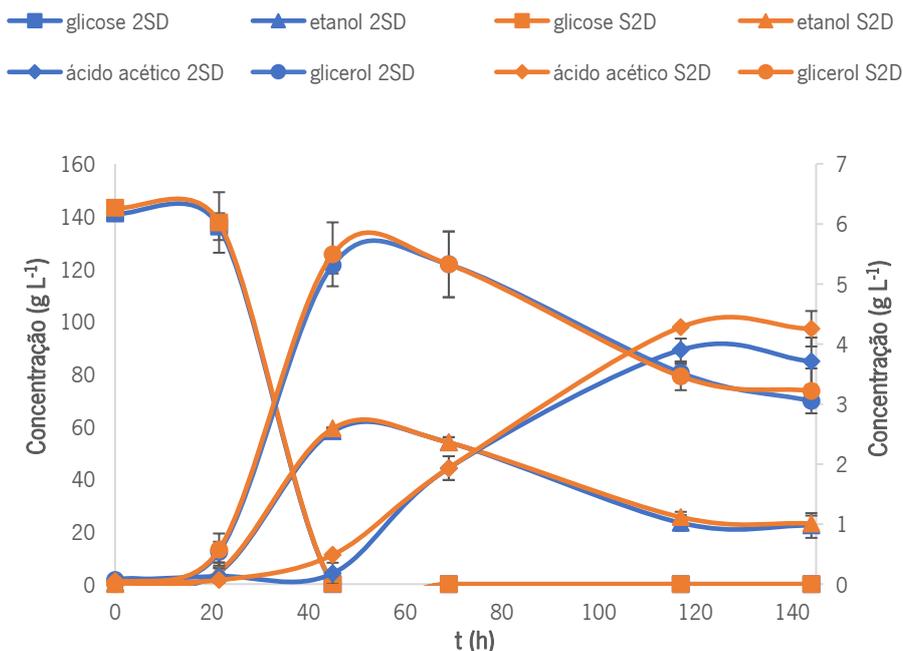
Relativamente a *D. bruxellensis*, Brandam e colaboradores realizaram um trabalho (também em meio sintético) sobre o efeito da temperatura sobre o metabolismo e cinética desta levedura, com temperaturas de 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C e 32 °C<sup>88</sup>. No ensaio a 20 °C, mais próximo do ensaio aqui discutido, os valores, apresentados sob a forma de percentagem de células viáveis, permanecem sensivelmente constantes até cerca das 125 h, onde a viabilidade começa a diminuir levemente, o que permite aferir a diminuição da temperatura como fator responsável pela repentina queda na concentração celular neste ensaio. De notar, no entanto, que os valores de citometria apenas apresentam os eventos contados, não fazendo distinção entre células viáveis e não-viáveis.

No caso de *S. cerevisiae*, Torija e colaboradores realizaram um estudo do efeito da temperatura em *S. cerevisiae*, numa matriz real (mosto vínico concentrado), com temperaturas de 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C<sup>89</sup>. Contrariamente ao obtido neste ensaio, o ensaio a 20 °C nesse trabalho demonstra uma pequena diminuição na população (medida em cfu mL<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colónias por mililitro)) apenas aos 9 dias de fermentação (216 h), e nunca diminui abaixo de 1,0×10<sup>7</sup> cfu mL<sup>-1</sup>, num processo fermentativo que durou aproximadamente 16 dias (384 h). Estes autores reparam ainda que não se nota uma fase de declínio para as temperaturas mais baixas. Walsh e colegas por outro lado, estudaram o crescimento de várias estirpes de *S. cerevisiae* e *S. uvarum* a várias temperaturas, para determinação das temperaturas ótimas e máximas de crescimento<sup>90</sup>. Estes autores, além de terem estudado o crescimento em mosto cervejeiro lupulado, testaram também em meio MYGP, sendo a maior diferença o facto de ensaio ter sido realizado sem agitação. As temperaturas ótimas obtidas (designadas como as temperaturas em que se verifica maior crescimento inicial) foram na ordem dos 31 – 35 °C. Estes valores são bastante distantes do da temperatura de 21 °C utilizada neste ensaio, o que poderá explicar a morte celular precoce verificada.

O perfil de produção de metabolitos primários do ensaio fermentativo previamente descrito encontra-se apresentado nas **Figuras 20 e 21**.



**Figura 20** Perfis de produção de metabolitos primários das culturas puras de *S. cerevisiae* (2S; curvas a azul) e *D. bruxellensis* (D; curvas a laranja) no ensaio em meio MYPG com elevada concentração de glicose a 21 °C: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O glicerol e ácido acético encontram-se no eixo secundário.



**Figura 21** Perfis de produção de metabolitos primários das co-culturas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* 2SD (curvas a azul) e S2D (curvas a laranja) em meio MYPG com elevada concentração de glicose a 21 °C: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O glicerol e ácido acético encontram-se no eixo secundário.

Com a descida de temperatura, as leveduras demoraram mais tempo a consumir a glicose do meio, existindo no meio uma concentração de  $12,93 \pm 12,51$  g L<sup>-1</sup> às 45 h na cultura pura de *S. cerevisiae*, sendo que no ensaio a 28 °C a glicose já tinha sido praticamente consumida às 28 h. Esta relação entre a temperatura e o consumo de glicose é corroborada por Brandam e colegas para *D. bruxellensis*, que verificaram no seu estudo que a menor taxa de consumo de glicose se dá a 15 °C (correspondente à menor temperatura testada), sendo cerca de 3 vezes superior a 32 °C<sup>88</sup>.

No entanto, a 21 °C, devido ao facto de a fermentação ser mais lenta, esta estende-se até cerca das 120 h, período no qual, por análise dos dados de citometria, começa a ocorrer morte celular.

Das 4 condições, a cultura pura de *D. bruxellensis* é a condição em que se verifica a maior produção de ácido acético, com uma concentração de  $9,47 \pm 0,37$  g L<sup>-1</sup>, sendo a única condição onde não compete com *S. cerevisiae*, mas numa concentração bastante menor do que no ensaio a 28 °C ( $16,74 \pm 0,14$  g L<sup>-1</sup>). Relativamente às co-culturas, não apresentam diferenças entre si ao nível das concentrações destes 4 metabolitos, apresentado 2 perfis quase idênticos.

As concentrações dos compostos minoritários obtidas no final da fermentação encontram-se representadas na **Tabela 5**.

**Tabela 5** Representação das concentrações dos compostos minoritários para os ensaios fermentativos com elevadas concentrações de glicose a 21 °C.

Composto	2S (µg L <sup>-1</sup> )	D (µg L <sup>-1</sup> )	S2D (µg L <sup>-1</sup> )	2SD (µg L <sup>-1</sup> )
<b>Ésteres</b>				
acetato de isobutilo	n.d.	190,3±22,1	244,7±13,9	204,4±15,2
2-metilbutirato de etilo	n.d.	14,9±1,1	n.d.	9,1±0,9
acetato de isoamilo	20,8±0,0	236,1±14,9	830,8±6,6	600,1±39,4
hexanoato de etilo	7,4±0,2	5,1±0,6	9,6±1,0	15,2±2,8
lactato de etilo	13,1±0,0	19,5±1,6	14,3±1,6	15,5±1,2
octanoato de etilo	24,5±2,3	n.d.	56,2±27,6	489,7±250,7
decanoato de etilo	n.d.	48,4±3,3	8,2±0,2	6,9±0,4
fenilacetato de etilo	7,7±0,2	33,5±1,1	n.d.	n.d.
acetato de 2-feniletilo	367,1±7,7	647,3±12,1	589,9±7,2	460,5±3,8
hidrocinamato de etilo	12,3±1,7	9,6±1,0	19,5±2,7	20,8±1,6
<b>Álcoois</b>				
2-metil-1-propanol	1218,8±9,1	524,8±56,0	1083,9±39,7	1179,8±46,8
2-metil-1-butanol + 3 metil-1-butanol	15628,8±292,0	11674,4±1158,3	14311,6±27,9	15301,5±429,9
álcool furfúrico	20,1±0,3	26,5±2,0	22,8±0,5	23,9±0,1
2-feniletanol	19940,5±118,3	22073,4±1418,5	20874,2±241,4	21584,4±765,9
<b>Furanos</b>				
5-hidroximetilfurfural	6,9±0,1	n.d.	1,2±1,2	n.d.
<b>Ácidos</b>				
ácido propanóico	36,7±4,8	55,7±5,3	50,4±3,3	53,6±7,1
ácido isobutírico	303,6±14,9	1348,2±151,5	438,9±5,9	385,2±6,6
ácido butanoico	45343,1±45259,5	138,7±18,9	106,0±0,1	111,4±4,5
ácido isovalérico	693,1±36,0	6303,5±577,5	1055,5±10,4	1007,7±22,9
ácido hexanoico	148,6±9,7	441,9±46,9	218,6±6,4	286,1±25,1
ácido octanoico	457,5±25,4	1009,7±20,9	601,6±14,5	581,1±14,9
ácido decanoico	15,5±1,4	217,9±0,1	16,8±0,3	n.d.
ácido fenilacético	n.d.	384,5±33,1	18,9±2,5	43,2±2,4
<b>Álcoois monoterpénicos</b>				
linalol	n.d.	21,1±0,1	3,1±0,0	2,9±0,1
β-citronelol	23,5±0,5	39,3±0,4	27,6±0,6	14,0±14,0
geraniol	23,5±1,6	91,0±4,9	39,1±0,2	41,9±1,4
<b>Fenóis voláteis</b>				
4-etilguaiaicol	n.d.	41,3±0,1	35,2±0,3	34,4±0,5
4-etilfenol	n.d.	22,2±1,0	15,1±0,9	11,1±1,8
2,6-dimetoxifenol	n.d.	2,7±0,4	n.d.	n.d.
tirosol	46,6±0,6	39,7±5,5	63,5±3,4	71,6±3,1
<b>Outros</b>				
acetoina	123,9±15,3	45,9±5,5	30,6±2,2	66,4±3,3
metionol	150,6±4,6	257,3±22,7	178,6±4,8	953,1±766,9

n.d. – não detetado

Na cultura pura de *S. cerevisiae* é possível observar um aumento na produção de certos metabolitos em relação ao ensaio a 28 °C, sendo os aumentos mais significativas as concentrações de ácido butanoico, metionol e acetato de 2-feniletilo. Em relação a este último, como a concentração do seu precursor 2-feniletanol é praticamente igual ao ensaio anterior, coloca-se a hipótese de que o metabolismo secundário de *S. cerevisiae* seja afetado pela diminuição da temperatura.

Contudo, verifica-se por outro lado, um aumento significativo na produção de ácidos orgânicos, entre eles os ácidos isobutírico (suor), isovalérico, hexanóico e octanóico. No entanto, esse aumento não se verificou na produção dos ésteres de etilo do quais alguns destes ácidos orgânicos são precursores, como é o caso do octanoato de etilo, ou mesmo o decanoato de etilo, que nem foi quantificado na cultura pura de *S. cerevisiae*.

*D. bruxellensis* por outro lado, teve uma diminuição pouco significativa na concentração dos voláteis mais característicos deste organismo, nomeadamente, 4-etilfenol e 4-etilguaicol. Verificou-se ainda diminuições nas concentrações de ésteres de acetato, nomeadamente, acetato de isoamilo (aroma a banana) e acetato de 2-feniletano. Contudo, segundo a bibliografia, *D. bruxellensis* não produz ésteres de acetato (devido à ausência de genes essenciais que codificam as enzimas para a sua produção, nomeadamente ATF1 e ATF2), apresentando até atividade de esterase<sup>44</sup>. Possivelmente, a atividade de esterase de *D. bruxellensis* diminuiu com a diminuição de temperatura, resultando numa maior concentração de ésteres de acetato final. De notar que os ésteres de acetato aparecem em maiores concentrações nas condições que favorecem *D. bruxellensis*.

Repara-se ainda num aumento da concentração do ácido isovalérico em todas as condições. O ácido isovalérico é conhecido por ser um dos principais metabolitos que constituem o carácter “brett” no vinho<sup>91</sup>.

Relativamente aos álcoois monoterpênicos, nota-se uma diminuição generalizada ao longo de todas as condições, relativamente ao mesmo ensaio a 28 °C, sendo a exceção o geraniol na condição 2SD.

No caso da co-cultura S2D, nota-se uma diminuição na maior parte dos ésteres relativamente à mesma condição a 28 °C, sendo exceções os acetatos de isoamilo e de 2-feniletano (elevada concentração do precursor 2-feniletanol) e lactato de etilo. Similarmente à cultura pura de *D. bruxellensis*, a co-cultura que favorece esta levedura apresenta também um aumento geral na concentração de ácidos orgânicos. Também esta co-cultura vê um aumento pouco significativo de 4-etilfenol e 4-etilguaicol e também de acetoína e metionol.

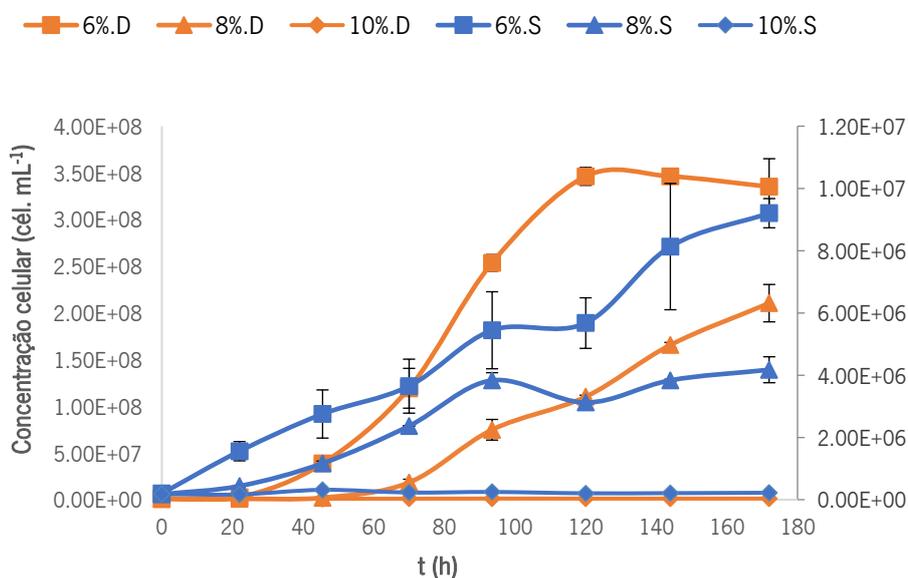
Relativamente à co-cultura que favorece *S. cerevisiae*, observou-se um aumento na produção dos ésteres relativamente ao mesmo ensaio a 28 °C, sendo eles acetato de isoamilo, octanoato de etilo e hidrocinaurato de etilo. Por outro lado, a co-cultura 2SD também teve um aumento generalizado na produção de ácidos orgânicos nas mesmas condições de prevalência de inóculo, mas com uma diminuição de temperatura. De modo igual às culturas previamente descritas com a presença de *D.*

*bruxellensis*, também este ensaio fermentativo teve um aumento dos fenóis voláteis de maior interesse com a diminuição de temperatura.

#### 4.3.3. Efeito de extrato de madeiras com diferentes concentrações de etanol

Neste ensaio fermentativo inocularam-se as leveduras *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* na razão 2:1, com inóculo de  $2 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> para *D. bruxellensis* e  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> para *S. cerevisiae*, em extrato de madeiras com etanol em 3 percentagens em volume distintas: 6 %, 8 % e 10 %.

O perfil de crescimento de cada um dos ensaios encontra-se representado na **Figura 22**.



**Figura 22** Perfis de crescimento de *D. bruxellensis* (curvas a laranja) em co-cultura com *S. cerevisiae* (curvas a azul), na razão 2:1 nos ensaios fermentativos com percentagem em volume de etanol de 6 % (cél mL<sup>-1</sup>; 6%.S e 6%.D; quadrados), 8 % (cél mL<sup>-1</sup>; 8%.S e 8%.D; triângulos) e 10 % (cél mL<sup>-1</sup>; 10%.S e 10%.D; losangos). *S. cerevisiae* encontra-se no eixo secundário.

Por análise dos gráficos, constata-se que o aumento da concentração dos compostos no extrato de madeiras atrasa e diminui o crescimento celular. *D. bruxellensis* entra em fase exponencial no ensaio a 6 % às 20 h, às 40 h a 8 % (um atraso de 20 h com o aumento de 2 % em volume de etanol em solução), e praticamente não cresce a 10 %. Em contraste, num estudo realizado em meio sintético, é reportado que *S. cerevisiae* consegue crescer em condições de até 9 %-13 % (v/v) de etanol nos intervalos de temperatura mais próximos da temperatura utilizada<sup>92</sup>. Por outro lado, Barata e colaboradores constatarem um crescimento das estirpes mais resistentes de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* no estudo em meios com até 16 % e 15 % de etanol em volume de solução, respetivamente, para um período de incubação máximo de 29 dias<sup>50</sup>. Já Bassi e colegas concluíram num estudo que se verifica proliferação

tanto de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* num meio com etanol até 10 % (havendo, no entanto, alguma variação entre estirpes de *D. bruxellensis*), notando uma inibição total de crescimento apenas a 11 %<sup>93</sup>.

Contudo, é preciso também ter em conta que nos meios com maior concentração de etanol estão presentes também em maior concentração os compostos extraídos da madeira, podendo estar o aumento da concentração destes compostos na origem da inibição de crescimento observado.

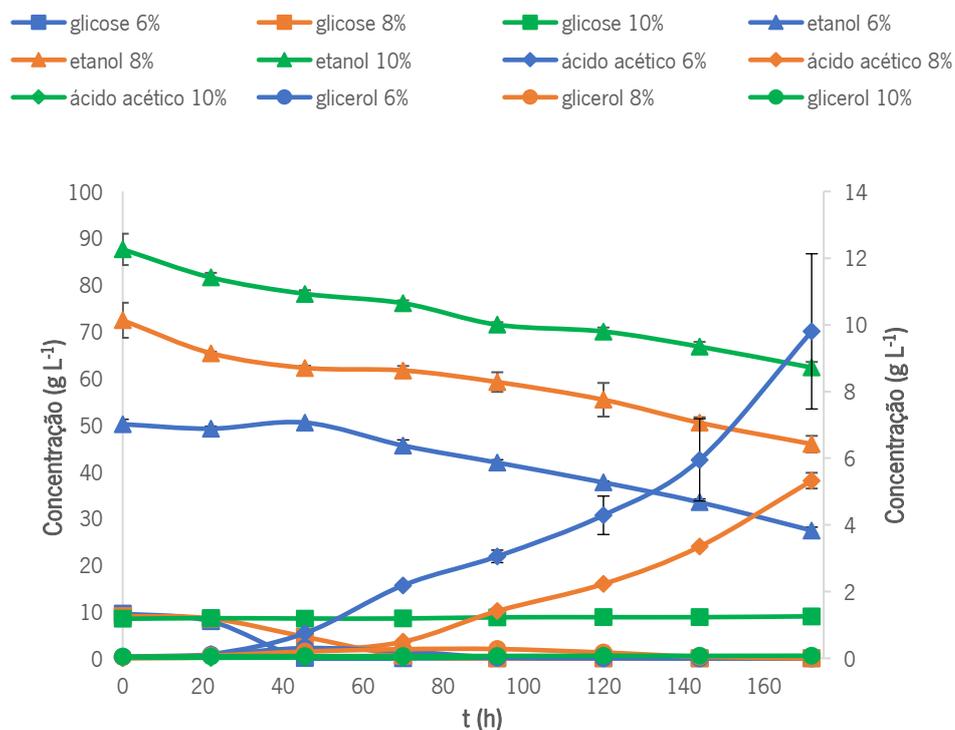
É possível reparar que uma crescente concentração de etanol aumenta o período de adaptação de *D. bruxellensis*. *S. cerevisiae* por outro lado demonstra uma menor resistência a este meio inóspito, derivado das concentrações celulares máximas bastante baixas que apresenta.

De notar também uma elevada morte celular aquando do arranque para ambas as leveduras, podendo dever-se à mudança repentina entre meios bastantes diferentes, passando de um meio ideal para um meio de difícil proliferação. Para um inóculo inicial de  $2 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> para *D. bruxellensis* e  $1 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> para *S. cerevisiae*, obtiveram-se valores de  $T_0$  na condição de 6 % em volume de etanol para ambas as leveduras concentrações celulares de  $9,63 \times 10^5 \pm 2,06 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup> e  $1,99 \times 10^5 \pm 1,83 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup> respetivamente, o que significa uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 19,9 % para *S. cerevisiae* e 48,2 % para *D. bruxellensis*. Para o ensaio a 8 %, os valores de  $T_0$  são  $1,72 \times 10^5 \pm 1,10 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> e  $6,89 \times 10^5 \pm 3,46 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> para *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* respetivamente, pelo que as taxas de sobrevivência são 17,2 % e 34,5 % respetivamente. Finalmente para 10 %, com valores de  $T_0$  de  $1,75 \times 10^5 \pm 6,74 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup> para *S. cerevisiae* e  $9,47 \times 10^5 \pm 1,30 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> para *D. bruxellensis*, tem-se uma taxa de sobrevivência de 17,5 % para *S. cerevisiae* e 47,4 % para *D. bruxellensis*. Como é possível observar pelos valores obtidos, *D. bruxellensis* apresenta uma resistência a este meio bastante superior à de *S. cerevisiae* e que lhe permitiu adaptar-se e proliferar, em detrimento de *S. cerevisiae*. Este resultado está de acordo com o que se tem verificado acerca do comportamento de *D. bruxellensis* nos ensaios anteriores, que em meio sintético não consegue competir com *S. cerevisiae* no início do processo fermentativo, mas à medida que se dá acumulação de etanol e outros metabolitos, dá-se uma troca no perfil de crescimento, estando criadas condições em que só *D. bruxellensis* prospera. E com a exceção da glicose presente inicialmente no meio, este ensaio simula essa parte final da fermentação<sup>43,50,81</sup>.

Como tal, os valores de biomassa são bastante diferentes entre as duas leveduras. *S. cerevisiae* apresenta valores de concentração celular máxima de  $9,20 \times 10^6 \pm 4,70 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> para a condição de 6 %,  $4,17 \times 10^6 \pm 4,17 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> para a condição de 8 % e  $2,48 \times 10^5 \pm 1,74 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup> para a condição de 10 %. Por outro lado, *D. bruxellensis* apresenta valores bastante superiores:  $3,65 \times 10^6 \pm 3,00 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> para a condição 6 %,  $2,10 \times 10^6 \pm 2,00 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> para a condição

8 % e  $1,19 \times 10^6 \pm 5,18 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup>. Em ambos os casos, observa-se uma diminuição da concentração celular máxima com a percentagem em volume de etanol no meio, sendo que a concentração celular máxima diminui à medida que a percentagem em volume de etanol aumenta.

Os perfis de produção de metabolitos primários dos 3 perfis encontram-se representados nas **Figura 23**



**Figura 23** Perfis de produção de metabolitos primários pelas co-culturas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* em condições de percentagem em volume de etanol de 6 % (curvas a azul), 8 % (curvas a laranja) e 10 % (curvas a verde): glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O glicerol e o ácido acético encontram-se em eixo secundário.

A condição de 6 % em volume de etanol em solução foi a qual em que se consumiu a glicose total mais rapidamente, estando esta esgotada às 44,5 h, enquanto que na condição a 8 % só é completamente esgotada às 70 h. Como praticamente não há crescimento na condição a 10 %, a glicose praticamente não é consumida ( $8,99 \pm 0,09$  g L<sup>-1</sup> às 172 h).

Aquando do consumo de glicose na condição a 6 %, nota-se uma diminuição da concentração de etanol ao longo do tempo, podendo ser interpretado como um aumento no consumo de etanol por parte das leveduras, sendo a fonte de carbono preferida quando se esgotam os açúcares. No entanto, mesmo na fermentação a 10 %, onde praticamente não há crescimento, há um decréscimo linear ao longo do tempo. Isto pode ser devido a perdas de etanol por evaporação, dado se tratar de um sistema aberto<sup>94</sup>.

Apenas baixas concentrações de glicerol foram produzidas nas condições 6 % e 8 % ( $0,31\pm 0,01$  g L<sup>-1</sup> e  $0,28\pm 0,02$  g L<sup>-1</sup>), tendo a sua produção sido praticamente inexistente na condição de 10 % ( $0,02\pm 0,00$  g L<sup>-1</sup>).

As concentrações dos compostos minoritários obtidas no final do processo de fermentação encontram-se representadas na **Tabela 6**.

**Tabela 6** Representação das concentrações dos compostos minoritários para os ensaios fermentativos em extrato de madeiras com percentagem em volume de etanol em 6 %, 8 % e 10 %.

Composto	6% ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	8% ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	10% ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
<b>Ésteres</b>			
acetato de isobutilo	15,0 $\pm$ 10,5	9,3 $\pm$ 3,5	n.d.
acetato de isoamilo	53,7 $\pm$ 36,2	23,5 $\pm$ 11,9	n.d.
hexanoato de etilo	3,2 $\pm$ 0,8	6,8 $\pm$ 0,2	n.d.
lactato de etilo	3,7 $\pm$ 0,8	8,9 $\pm$ 4,3	17,4 $\pm$ 2,3
octanoato de etilo	175,1 $\pm$ 89,1	182,1 $\pm$ 2,5	n.d.
decanoato de etilo	72,8 $\pm$ 21,6	66,4 $\pm$ 31,9	n.d.
succinato de dietilo	58,5 $\pm$ 30,3	73,6 $\pm$ 33,8	154,4 $\pm$ 18,9
fenilacetato de etilo	3,6 $\pm$ 2,3	2,8 $\pm$ 0,9	n.d.
acetato de 2-feniletilo	116,0 $\pm$ 72,3	20,4 $\pm$ 9,0	2,7 $\pm$ 0,4
hidrocinamato de etilo	n.d.	4,3 $\pm$ 4,3	n.d.
malato de dietilo	0,8 $\pm$ 0,8	4,8 $\pm$ 2,3	10,1 $\pm$ 1,3
<b>Álcoois</b>			
2-metil-1-propanol	14,1 $\pm$ 5,1	24,9 $\pm$ 14,2	n.d.
2-metil-1-butanol + 3 metil-1-butanol	957,5 $\pm$ 365,7	724,2 $\pm$ 353,8	158,8 $\pm$ 34,2
álcool furfurílico	20,2 $\pm$ 8,1	30,6 $\pm$ 15,5	44,4 $\pm$ 8,5
2-feniletanol	2574,2 $\pm$ 1078,1	1647,4 $\pm$ 576,4	2,8 $\pm$ 0,4
<b>Furanos</b>			
furfural	2,4 $\pm$ 2,4	n.d.	150,6 $\pm$ 12,1
5-metilfurfural	n.d.	n.d.	96,0 $\pm$ 10,2
5-hidroximetilfurfural	n.d.	n.d.	36,1 $\pm$ 5,3
<b>Ácidos</b>			
ácido propanóico	13,5 $\pm$ 8,3	8,6 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 1,0
ácido isobutírico	77,5 $\pm$ 43,4	31,7 $\pm$ 19,8	n.d.
ácido butanóico	19,8 $\pm$ 10,3	19,5 $\pm$ 8,7	4,2 $\pm$ 2,1
ácido isovalérico	145,7 $\pm$ 78,5	55,7 $\pm$ 34,9	8,4 $\pm$ 4,3
ácido hexanóico	226,3 $\pm$ 83,3	367,6 $\pm$ 167,8	14,9 $\pm$ 5,4
ácido octanóico	628,3 $\pm$ 265,4	804,3 $\pm$ 359,4	67,8 $\pm$ 18,6
ácido decanóico	447,3 $\pm$ 253,9	229,9 $\pm$ 132,7	12,7 $\pm$ 1,8
ácido fenilacético	5,6 $\pm$ 3,9	n.d.	n.d.
<b>Álcoois monoterpénicos</b>			
linalol	7,1 $\pm$ 4,1	4,9 $\pm$ 2,5	n.d.
$\beta$ -citronelol	4,4 $\pm$ 2,9	2,3 $\pm$ 1,0	n.d.
geraniol	55,0 $\pm$ 34,2	n.d.	n.d.
<b>Fenóis voláteis</b>			
4-metilguaiaicol	1,9 $\pm$ 1,0	1,6 $\pm$ 0,8	2,8 $\pm$ 0,3
4-etilguaiaicol	134,1 $\pm$ 69,5	185,6 $\pm$ 77,9	5,2 $\pm$ 1,6
4-etilfenol	11,9 $\pm$ 6,1	12,8 $\pm$ 5,9	0,9 $\pm$ 0,0
eugenol	9,1 $\pm$ 5,8	6,5 $\pm$ 2,9	8,3 $\pm$ 0,1

2,6-dimetoxifenol	2,1±0,8	4,9±0,33	9,9±0,2
tirosol	1,3±0,7	n.d.	n.d.
<b>Aldeídos</b>			
vanilina	n.d.	0,9±0,0	117,4±17,2
siringaldeído	32,4±26,1	20,5±1,8	483,5±38,9
<b>Outros</b>			
acetoina	5,5±2,5	n.d.	n.d.
metionol	11,2±5,0	16,1±8,4	2,6±0,4

n.d. – não detetado

Dado a ausência de crescimento, o ensaio a 10 % foi utilizado como controlo, exemplificando o resultado final do meio utilizado sem crescimento de microrganismos. A seguinte lista de compostos considera os metabolitos que normalmente são obtidos por extração da madeira: succinato de dietilo (aroma a maçã), malato de dietilo (aroma açucarado), furfural (aroma a amêndoa), 5-metilfurfural (aroma picante), 4-metilguaicol (aroma doce), eugenol (aroma a cravo-da-índia), 2,6-dimetoxifenol (aroma fumado), *cis-oak lactone* (aroma doce), *trans-oak lactone* (aroma a coco), vanilina (aroma a baunilha) e siringaldeído (aroma fumado, picante)<sup>73</sup>.

E de facto é coerente com o afirmado por Coelho e colaboradores<sup>73</sup>, sendo que os únicos compostos que apresentam concentrações acima dos 100 µg L<sup>-1</sup> são succinato de dietilo, furfural, vanilina e siringaldeído. De destacar também 2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol, resultante do baixo crescimento das leveduras nesta condição (158,8 µg L<sup>-1</sup>, apresentando concentrações de 724,2 µg L<sup>-1</sup> para a condição 8 % e 957,5 µg L<sup>-1</sup> para 6 %).

Com a exceção dos compostos extraídos da madeira (que aumentam de uma forma generalizada com a concentração de etanol), há uma notória diminuição generalizada da concentração de metabolitos com o aumento da concentração de etanol das condições 6 % e 8 % para a condição 10 %.

Entre as condições 6 % e 8 %, relativamente aos ésteres, de notar que só há produção de hidrocínato de etilo na condição 8 %. Verifica-se uma diminuição (ainda que por vezes pouco significativa) nos acetatos de etilo, sendo que existe maior concentração de acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, e acetato de 2-feniletano na condição 6 %. É possível que o aumento da percentagem em volume de etanol afete quer a transcrição dos genes ATF1 ou ATF2 ou a atividade das respetivas proteínas essenciais na produção de ésteres de acetato, AATases I e II, uma vez que é perceptível a existência do precursor isobutanol no meio, bem como de acetato<sup>84</sup>.

O acetato de 2-feniletano tem a maior concentração do seu precursor na condição 6 %, que quantifica uma concentração de 2-feniletanol de 2574,246±1078,1 µg L<sup>-1</sup>, o que poderá justificar o facto de existir em maior concentração na condição 6 %.

Em relação aos álcoois, há diferenças pouco significativas, além do já referido 2-feniletanol. Há maior concentração de 2-metil-1-butanol+3-metil-1-butanol na condição 6 %, e um ligeiro aumento de isobutanol de 6 % para 8 %. Verifica-se ainda a degradação quase total de furanos.

No que concerne aos ácidos orgânicos, há um aumento generalizado de 8 % para 6 %, com a exceção dos ácidos hexanóico e octanóico. De notar que a condição de 8 % apresenta também o éster de etilo do qual o ácido octanóico é precursor também em maior quantidade, mais especificamente, octanoato de etilo.

Verifica-se ainda produção de fenóis voláteis, sendo o 4-etilguaicol o composto que apresenta concentrações mais consideráveis. Não se verifica a existência de vinilfenóis, derivado do seu total consumo.

Relativamente aos aldeídos, verificou-se um consumo quase total da vanilina e de elevadas concentrações de seringaldeído. É conhecido que *S. cerevisiae* consegue converter vanilina em álcool vanílico<sup>95</sup>.

Por fim, verifica-se a produção de acetoina e metionol apenas em quantidades vestigiais.

## 4.4. Aplicação a matrizes alimentares

### 4.4.1. Fermentação de 2 cervejas sujeitas a maturação acelerada a diferentes temperaturas

Neste primeiro ensaio fermentativo realizado em matrizes alimentares foram utilizadas cervejas que sofreram maturação acelerada a 30 °C e 50 °C em barrica de casca de carvalho americano, que teve contacto prévio com vinho do Porto, com vista a obter dois produtos com propriedades diferenciadas. Para cada uma das cervejas obtidas foram realizados 3 ensaios: cultura pura de cada uma das leveduras em estudo e uma co-cultura. Os dois produtos maturados, designados doravante por extrato forte (EF) e extrato fraco (ef) para 30 °C e 50 °C respetivamente, foram submetidos às seguintes condições: cultura pura de *S. cerevisiae* (efS e EFS) com inóculo de  $1 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>; cultura pura de *D. bruxellensis* com o dobro do inóculo, ou seja,  $2 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> (ef2D e EF2D); e co-cultura com *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* com inóculos respetivos de  $1 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> e  $2 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> (efS2D e EFS2D)

Os perfis de crescimento para cada umas das condições encontram-se representados nas **Figuras 24 e 25**.

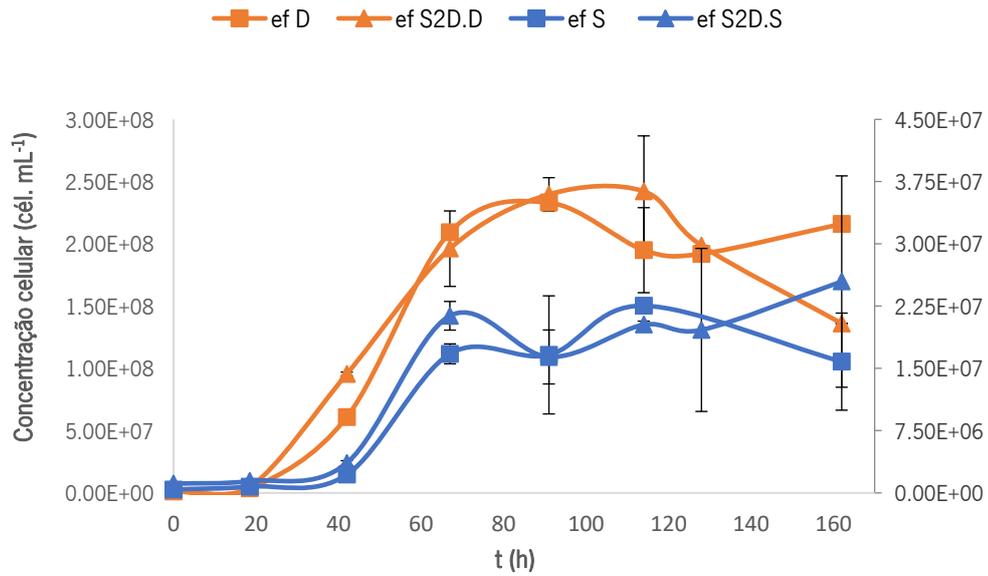


Figura 24 Perfis de crescimento das culturas puras (quadrados) de *S. cerevisiae* (cél mL<sup>-1</sup>; ef S; curvas a azul) e *D. bruxellensis* (cél mL<sup>-1</sup>; ef D; curvas a laranja) e respetiva co-cultura (cél mL<sup>-1</sup>; inóculo de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* na razão 1:2; ef S2D.S e ef S2D.D; triângulos) em extrato fraco (ef). *S. cerevisiae* encontra-se no eixo secundário.

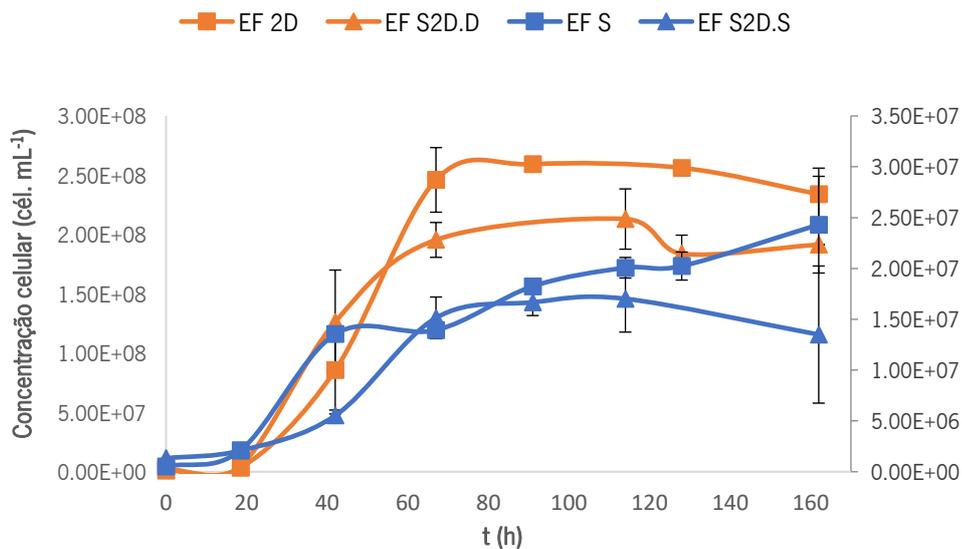
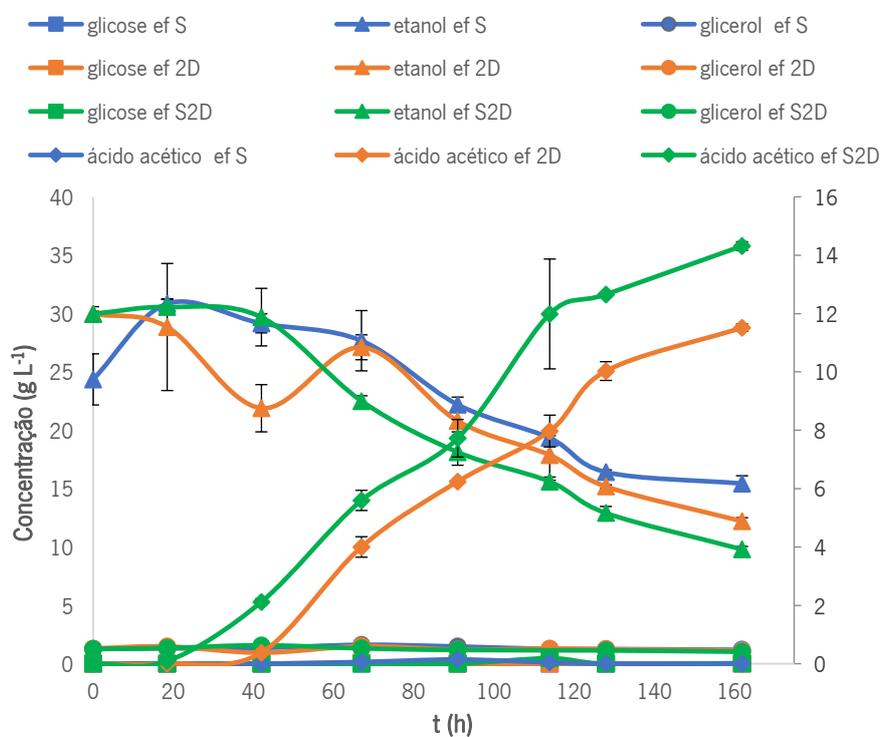


Figura 25 Perfis de crescimento das culturas puras (quadrados) de *S. cerevisiae* (cél mL<sup>-1</sup>; EF S; curvas a azul) e *D. bruxellensis* (cél mL<sup>-1</sup>; EF D; curvas a laranja) e respetiva co-cultura (cél mL<sup>-1</sup>; inóculo de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* na razão 1:2; EF S2D.S e EF S2D.D; triângulos) em extrato forte (EF). *S. cerevisiae* encontra-se no eixo secundário.

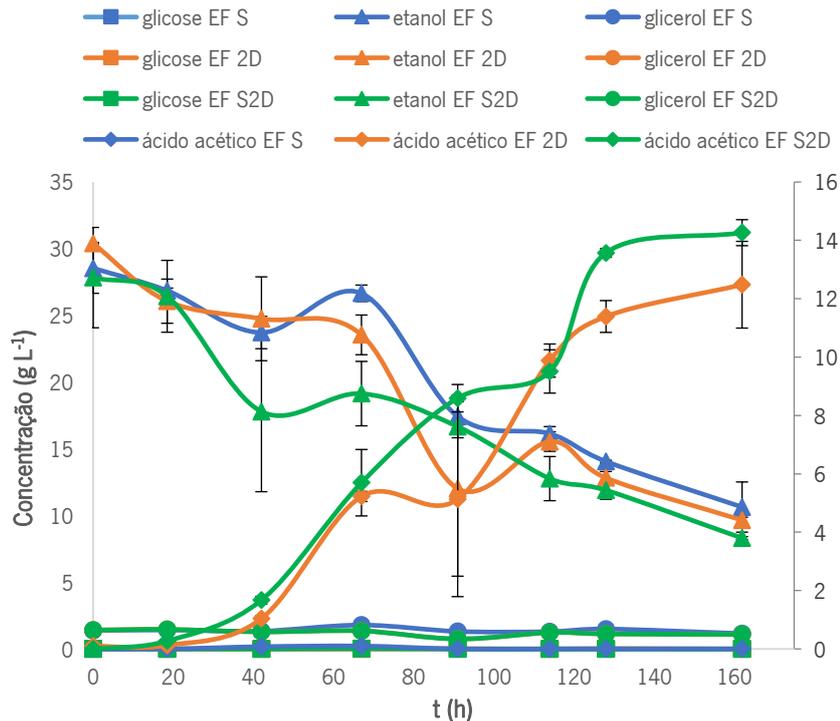
Nos dois produtos maturados, (descritos nas Tabelas 7 e 8) sem disponibilidade de glicose, *S. cerevisiae* volta a não conseguir competir com *D. bruxellensis*, como observado no ensaio 4.3.3 Comparativamente entre extratos, *D. bruxellensis* cresceu mais em cultura pura no extrato forte (concentração celular máxima de  $2.59 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>, para valores de  $2,33 \times 10^8 \pm 6,37 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> no extrato fraco), mas em co-cultura cresceu mais no extrato fraco ( $2,43 \times 10^8 \pm 4,45 \times 10^7$  células

mL<sup>-1</sup> para valores de  $2,13 \times 10^8 \pm 2,54 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> no extrato forte). Já *S. cerevisiae* tem maior proliferação no extrato fraco, sendo que cresceu mais cerca de 52 % em cultura pura no extrato fraco em detrimento do forte, e mais 65 % em co-cultura. De notar que esta cerveja tem uma concentração de etanol na ordem dos 30 g L<sup>-1</sup>, o que corresponde sensivelmente 3,8 % em volume de etanol, correspondendo ao ensaio com valor mais baixo de percentagem em volume de etanol na dissertação (com a exceção dos ensaios que começam sem etanol no meio). No entanto, é a par do ensaio 4.4.3. o único ensaio sem glicose inicial no meio.

Os perfis de produção de metabolitos primários dos ensaios referidos encontram-se representados nas Figuras 26 e 27.



**Figura 26** Perfis de produção de metabolitos primários das culturas puras de *S. cerevisiae* (S; curvas a azul) e *D. bruxellensis* (2D; curvas a laranja) e respetiva co-cultura (S2D; curvas a verde) em extrato fraco: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O ácido acético encontra-se representado no eixo secundário.



**Figura 27** Perfis de produção de metabolitos primários das culturas puras de *S. cerevisiae* (EF S; curvas a azul) e *D. bruxellensis* (EF 2D; curvas a laranja) e respectiva co-cultura (EF S2D; curvas a verde) em extrato forte: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O ácido acético encontra-se representado no eixo secundário.

Em todas as condições há uma diminuição na concentração de etanol ao longo do tempo, e nos ensaios que contam com a presença de *D. bruxellensis*, essa diminuição na concentração de etanol é acompanhada por um aumento considerável na concentração de ácido acético (concentração máxima de  $14,31 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$  em efS2D). Esse aumento coincide com a altura em que a levedura entra em fase exponencial, entre as 20 h e as 40 h. Considerando inexistência de glicose em ambos os extratos, é possível que *D. bruxellensis* tenha feito uso da elevada concentração de etanol em solução como fonte de carbono, acompanhada da libertação de ácido acético, sendo que até esse intervalo de tempo, como corroborado pelos perfis de cultura pura de *S. cerevisiae* (onde praticamente não há crescimento), o etanol terá sido perdido por evaporação<sup>94</sup>.

Nestas culturas, no entanto, uma pequena parte desta diminuição poderá dever-se à degradação do etanol em acetaldeído com libertação de NADH, com transformação em acetil-CoA, com consumo de NADH (restaurando o equilíbrio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ), que entra no ciclo do ácido cítrico para fornecer energia<sup>40</sup>.

A concentração de glicerol, por outro lado, permanece inalterada ao longo do tempo em todas as condições. Dado que a produção de glicerol se deverá unicamente a *S. cerevisiae* (como referido anteriormente, apenas algumas estirpes de *D. bruxellensis* apresentam capacidade de transformação de

glicerol-3-fosfato a glicerol, e por análise dos perfis desta dissertação, assume-se que não será o caso da estirpe utilizada), a inexistência de glicerol dever-se-á ao não crescimento de *S. cerevisiae*.

As concentrações dos compostos minoritários obtidas no final do processo de fermentação encontram-se representadas nas Tabelas 7 e 8.

**Tabela 7** Representação das concentrações dos compostos minoritários para os ensaios em extrato fraco de Argus

Composto	Extrato fraco ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	efS ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	ef2D ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	efS2D ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
<b>Ésteres</b>				
acetato de isoamilo	n.d.	n.d.	14,8 $\pm$ 2,5	17,1 $\pm$ 1,4
hexanoato de etilo	n.d.	n.d.	8,9 $\pm$ 0,5	5,3 $\pm$ 0,9
lactato de etilo	16,7 $\pm$ 0,7	16,9 $\pm$ 1,7	22,1 $\pm$ 3,8	16,6 $\pm$ 0,9
decanoato de etilo	n.d.	n.d.	8,4 $\pm$ 0,7	13,6 $\pm$ 0,2
succinato de dietilo	39,2 $\pm$ 0,4	51,5 $\pm$ 1,1	266,1 $\pm$ 222,9	43,1 $\pm$ 1,1
fenilacetato de etilo	n.d.	22,2 $\pm$ 4,2	n.d.	n.d.
acetato de 2-feniletano	2,2 $\pm$ 0,1	12,5 $\pm$ 1,1	107,5 $\pm$ 1,7	121,9 $\pm$ 3,2
malato de dietilo	8,4 $\pm$ 0,2	8,2 $\pm$ 0,1	n.d.	9,5 $\pm$ 1,0
<b>Álcoois</b>				
2-metil-1-propanol	107,5 $\pm$ 36,3	59,1 $\pm$ 6,5	14,3 $\pm$ 2,0	20,6 $\pm$ 2,4
2-metil-1-butanol + 3 metil-1-butanol	1385,2 $\pm$ 51,7	985,6 $\pm$ 55,2	652,9 $\pm$ 4,3	599,9 $\pm$ 40,8
álcool furfurílico	n.d.	12,6 $\pm$ 0,4	26,6 $\pm$ 8,0	16,6 $\pm$ 1,6
2-feniletanol	2630,1 $\pm$ 1,3	5296,7 $\pm$ 129,2	4780,6 $\pm$ 219,8	4159,4 $\pm$ 132,8
<b>Furanos</b>				
furfural	44,4 $\pm$ 1,8	n.d.	n.d.	n.d.
5-metilfurfural	16,5 $\pm$ 0,7	n.d.	n.d.	n.d.
5-hidroximetilfurfural	4,1 $\pm$ 0,3	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Ácidos</b>				
ácido propanóico	n.d.	2,2 $\pm$ 0,4	20,9 $\pm$ 4,9	25,3 $\pm$ 1,1
ácido isobutírico	n.d.	11,4 $\pm$ 0,2	17,1 $\pm$ 5,2	30,9 $\pm$ 3,6
ácido butanóico	n.d.	4,1 $\pm$ 0,5	63,6 $\pm$ 22,4	48,4 $\pm$ 5,9
ácido isovalérico	n.d.	35,8 $\pm$ 2,5	75,9 $\pm$ 22,4	94,3 $\pm$ 6,6
ácido hexanóico	38,4 $\pm$ 3,1	4,1 $\pm$ 0,8	889,6 $\pm$ 3,9	921,2 $\pm$ 31,7
ácido octanóico	89,6 $\pm$ 1,8	6,1 $\pm$ 1,6	1685,6 $\pm$ 91,4	1936,8 $\pm$ 45,2
ácido decanóico	n.d.	n.d.	97,6 $\pm$ 11,9	144,7 $\pm$ 25,2
ácido fenilacético	n.d.	n.d.	n.d.	9,8 $\pm$ 1,5
<b>Álcoois monoterpénicos</b>				
linalol	n.d.	n.d.	26,8 $\pm$ 0,8	16,9 $\pm$ 0,3
$\beta$ -citronelol	n.d.	25,2 $\pm$ 3,9	2,0 $\pm$ 2,0	2,3 $\pm$ 0,4
geraniol	n.d.	18,3 $\pm$ 0,9	75,4 $\pm$ 10,3	75,1 $\pm$ 9,0
<b>Fenóis voláteis</b>				
4-etilguaiacol	n.d.	1,0 $\pm$ 0,3	1080,0 $\pm$ 27,2	1041,9 $\pm$ 18,8
4-etilfenol	n.d.	n.d.	283,2 $\pm$ 2,0	242,4 $\pm$ 3,3
4-vinilguaicol	21,4 $\pm$ 0,3	n.d.	n.d.	n.d.
4-vinilfenol	1,8 $\pm$ 0,1	n.d.	n.d.	n.d.
eugenol	n.d.	0,7 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,0
2,6-dimetoxifenol	16,5 $\pm$ 0,5	20,6 $\pm$ 3,8	25,9 $\pm$ 0,7	19,0 $\pm$ 0,0
tirosol	12,3 $\pm$ 0,8	22,1 $\pm$ 0,5	47,2 $\pm$ 17,2	20,4 $\pm$ 3,9

<b>Lactonas</b>				
whiskey lactona I - cis-oak lactone	11,6±0,6	13,4±1,1	15,7±0,4	15,1±0,1
whiskey lactona II - trans-oak lactone	6,6±0,3	7,5±0,7	11,5±1,8	8,5±1,0
<b>Aldeídos</b>				
vanilina	74,5±1,1	n.d.	n.d.	n.d.
siringaldeído	419,3±44,8	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Outros</b>				
acetoina	n.d.	95,9±3,5	28,9±9,2	20,9±0,4
metionol	12,8±0,5	9,0±0,6	16,8±3,5	12,6±2,5

n.d. – não detetado

**Tabela 8** Representação das concentrações dos compostos minoritários para os ensaios em extrato forte de Argus

Composto	Extrato forte (µg L <sup>-1</sup> )	EFS (µg L <sup>-1</sup> )	EF2D (µg L <sup>-1</sup> )	EFS2D (µg L <sup>-1</sup> )
<b>Ésteres</b>				
acetato de isoamilo	n.d.	n.d.	9,9±0,6	9,3±0,3
hexanoato de etilo	n.d.	n.d.	3,6±0,4	4,4±1,1
lactato de etilo	15,8±1,8	22,5±0,7	18,7±2,6	17,5±2,9
decanoato de etilo	n.d.	n.d.	n.d.	13,2±0,4
succinato de dietilo	14,01±0,1	16,4±0,3	18,8±1,4	18,6±0,5
fenilacetato de etilo	n.d.	21,6±1,0	n.d.	n.d.
acetato de 2-feniletilo	n.d.	8,1±0,4	92,7±13,6	94,1±4,6
malato de dietilo	8,67±0,5	9,1±0,2	11,2±1,2	9,5±0,3
<b>Álcoois</b>				
2-metil-1-propanol	58,8±0,8	54,3±5,6	n.d.	10,1±10,1
2-metil-1-butanol + 3 metil-1-butanol	540,9±40,4	665,0±22,8	332,2±36,7	333,6±65,1
álcool furfurílico	n.d.	52,4±1,0	53,8±9,4	50,1±12,4
2-feniletanol	1943,0±79,9	3424,6±68,5	3824,1±431,2	3470,1±229,8
<b>Furanos</b>				
furfural	343,5±23,1	2,9±0,2	n.d.	n.d.
5-metilfurfural	91,9±4,4	n.d.	n.d.	n.d.
5-hidroximetilfurfural	8,4±0,8	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Ácidos</b>				
ácido propanóico	n.d.	6,2±2,9	17,1±6,5	26,9±0,2
ácido isobutírico	n.d.	20,9±0,2	17,5±2,4	39,7±8,6
ácido butanóico	n.d.	9,7±1,6	39,4±5,5	42,3±7,8
ácido isovalérico	n.d.	51,2±0,8	62,4±13,8	99,4±13,8
ácido hexanóico	49,3±1,8	22,8±0,8	672,6±12,8	743,4±47,3
ácido octanóico	22,7±2,7	30,8±6,2	1625,6±3,7	1754,3±132,5
ácido decanóico	n.d.	n.d.	66,7±21,0	168,8±17,4
ácido fenilacético	n.d.	12,1±4,0	4,4±1,4	13,8±2,7
<b>Álcoois monoterpénicos</b>				
linalol	n.d.	1,7±0,4	17,7±1,9	9,8±1,0
β-citronelol	n.d.	15,2±0,5	n.d.	2,4±0,2
geraniol	n.d.	24,4±1,3	78,3±16,6	62,9±8,9
<b>Fenóis voláteis</b>				
4-etilguaicol	n.d.	1,9±1,5	1111,1±3,2	1126,3±6,8
4-etilfenol	n.d.	n.d.	294,9±1,9	259,2±12,6
4-vinilguaicol	8,4±0,4	n.d.	n.d.	n.d.
eugenol	n.d.	0,9±0,2	n.d.	2,4±0,1

2,6-dimetoxifenol	16,9±0,3	27,9±1,5	26,0±4,7	33,5±3,1
tirosol	15,5±0,6	25,6±0,9	19,5±1,9	n.d.
<b>Lactonas</b>				
whiskey lactona I - cis-oak lactone	7,9±0,2	6,0±0,4	8,0±0,7	8,7±0,2
whiskey lactona II - trans-oak lactone	6,9±0,1	n.d.	n.d.	6,3±0,5
<b>Aldeídos</b>				
vanilina	114,9±7,7	n.d.	n.d.	n.d.
siringaldeído	566,9±20,4	n.d.	166,9±81,5	n.d.
<b>Outros</b>				
acetoína	n.d.	457,8±15,4	n.d.	n.d.
metionol	9,1±0,7	6,6±0,9	9,0±1,8	13,2±1,9

n.d. - não detetado

Relativamente às diferenças entre extratos, constata-se que a extração a 30 °C (extrato fraco) foi mais eficaz nos álcoois (2-metil-butanol + 3 -metil-butanol e 2-feniletanol), mas há mais preponderância nos furanos (furfural e 5-metilfurfural) e nos aldeídos no extrato forte. De notar também que apenas ef apresenta acetato de 2-feniletano.

*S. cerevisiae* apresenta um perfil bastante semelhante na fermentação nos dois extratos em cultura pura, destacando-se a produção de elevadas quantidades de acetoína, apresentado uma produção maior em EF (457,8 µg L<sup>-1</sup>) do que em ef (96,9 µg L<sup>-1</sup>). Como já foi referido, conhece-se a capacidade de *S. cerevisiae* produzir acetoína.

*D. bruxellensis* em cultura pura apresenta uma maior produção de ésteres em ef. Mais especificamente em relação ao succinato de dietilo, *D. bruxellensis* apresenta maior concentração em ef, o mesmo se verificando em relação às co-culturas.

Relativamente aos furanos, verificou-se a sua total degradação em todas as condições, quantificando-se apenas uma concentração vestigial de 2,9±0,2 µg L<sup>-1</sup> de furfural na condição EFS.

Acerca dos álcoois, destaca-se que na cultura pura de *D. bruxellensis* uma maior produção de 2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol em extrato fraco.

Verificou-se nos extratos iniciais a presença de apenas dois ácidos orgânicos: octanóico e hexanóico. A acumulação de elevadas concentrações destes ácidos, juntamente com o etanol, pode estar relacionada com o fraco crescimento de *S. cerevisiae*<sup>96</sup>. De notar ainda que apesar de haver elevadas concentrações destes ácidos orgânicos, não se deu a produção dos ésteres respetivos em concentrações consideráveis. Relativamente a este resultado, é possível que haja um efeito negativo sobre as enzimas Eht1 e Eeb1, principais responsáveis pela síntese destes compostos<sup>97</sup>.

Relativamente aos fenóis voláteis, verificaram-se baixas concentrações de 2,6-dimetoxifenol e tirosol em todas as condições. Contudo, o resultado mais importante a reter são as concentrações

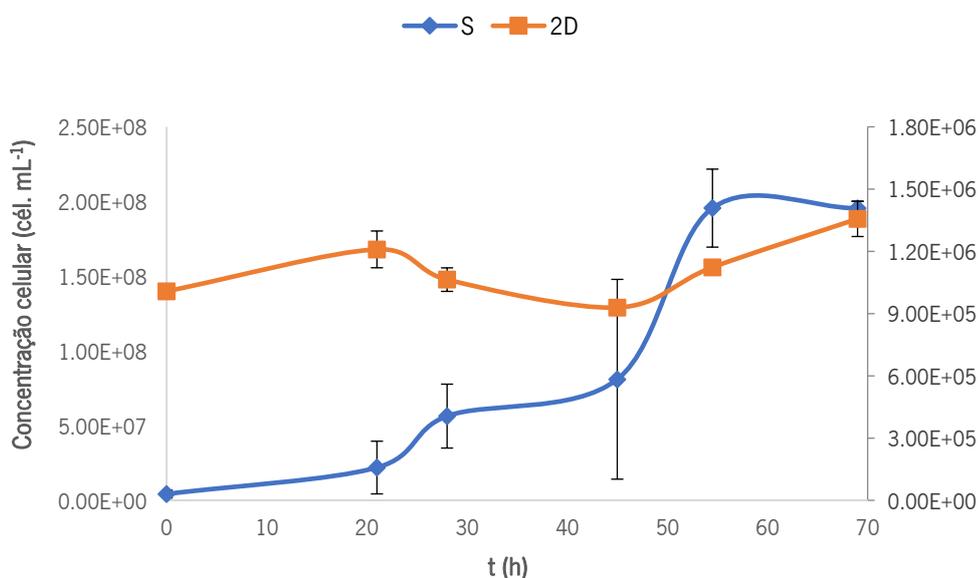
elevadas de etilfenóis obtidas, em todas as condições em que se presencia *D. bruxellensis*, pressupondo a existência de elevadas concentrações dos ácidos cinâmicos, precursores dos etilfenóis. Ácidos fenólicos estão associados a polissacarídeos existentes na parede celular das células do cereal utilizado no mosto, libertados durante o processo cervejeiro<sup>98</sup>.

Por fim, verifica-se em todas as condições uma degradação total dos aldeídos.

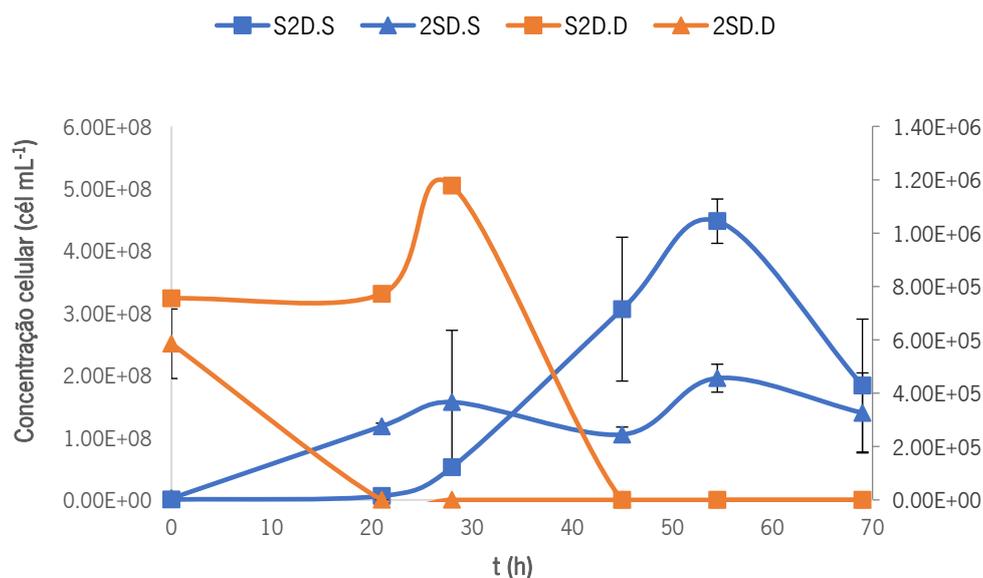
#### 4.4.2. Fermentação de mosto de cerveja LETRA E em condições limitantes de oxigénio

Este ensaio fermentativo foi realizado utilizando mosto cervejeiro (de cerveja LETRA E, retirado do fermentador após a etapa do arejamento), com a utilização de dispositivos de *airlock* na abertura do matraz, com o intuito de limitar a entrada de  $O_2$ . Foram testadas 4 condições, com inóculo de  $1 \times 10^6$  células  $mL^{-1}$ : cultura pura de *S. cerevisiae* (S); cultura pura de *D. bruxellensis* com inóculo de  $2 \times 10^6$  células  $mL^{-1}$  (2D); co-cultura de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* na razão 1:2 (S2D); e co-cultura de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* na razão 2:1 (2SD).

Os perfis de crescimento das 4 condições deste ensaio encontram-se representados nas **Figuras 28 e 29**.



**Figura 28** Perfis de crescimento das culturas puras de *S. cerevisiae* (cél  $mL^{-1}$ ; S, curva azul) e *D. bruxellensis* (cél  $mL^{-1}$ ; 2D, curva laranja) em mosto cervejeiro de LETRA E. *D. bruxellensis* encontra-se no eixo secundário.



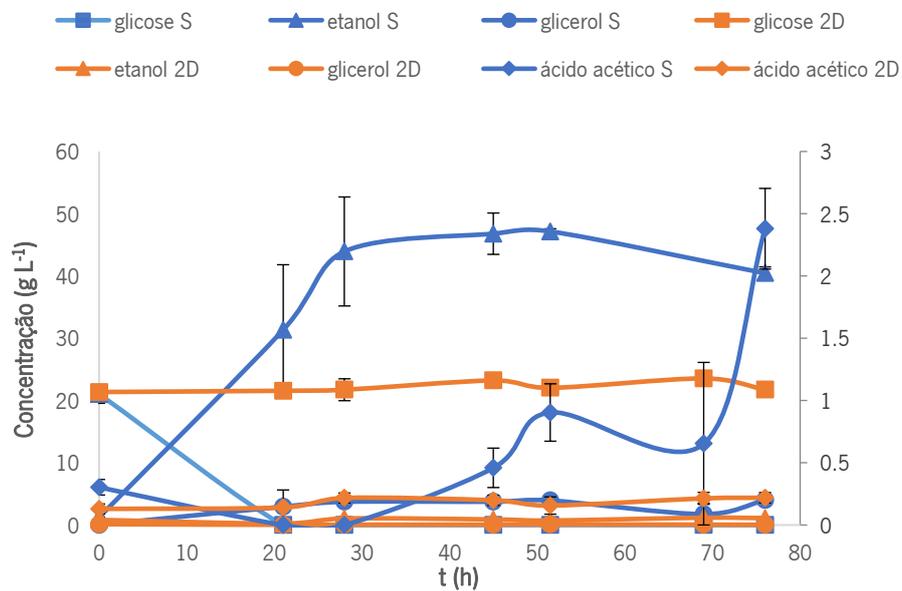
**Figura 29** Perfis de crescimento das co-culturas de *S. cerevisiae* (cél mL<sup>-1</sup>; curvas a azul) e *D. bruxellensis* (cél mL<sup>-1</sup>; curvas a laranja) S2D (inóculo de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* na razão 1:2; quadrados) e 2SD (inóculo de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* na razão 2:1; triângulos) em mosto cervejeiro de LETRA E. *D. bruxellensis* encontra-se no eixo secundário.

Num meio bastante rico em açúcar (como demonstrado na análise pelos perfis de produção de metabolitos primários representados nas **Figuras 30 e 31**), *S. cerevisiae* sobrepõe-se a *D. bruxellensis* nas 2 condições de co-cultura, e das duas leveduras é a única em cultura pura a apresentar crescimento, uma vez que nem em cultura pura *D. bruxellensis* consegue proliferar significativamente. O favorecimento de *D. bruxellensis* em co-cultura apenas aumenta a fase *lag* de *S. cerevisiae* (em cerca de 20 h).

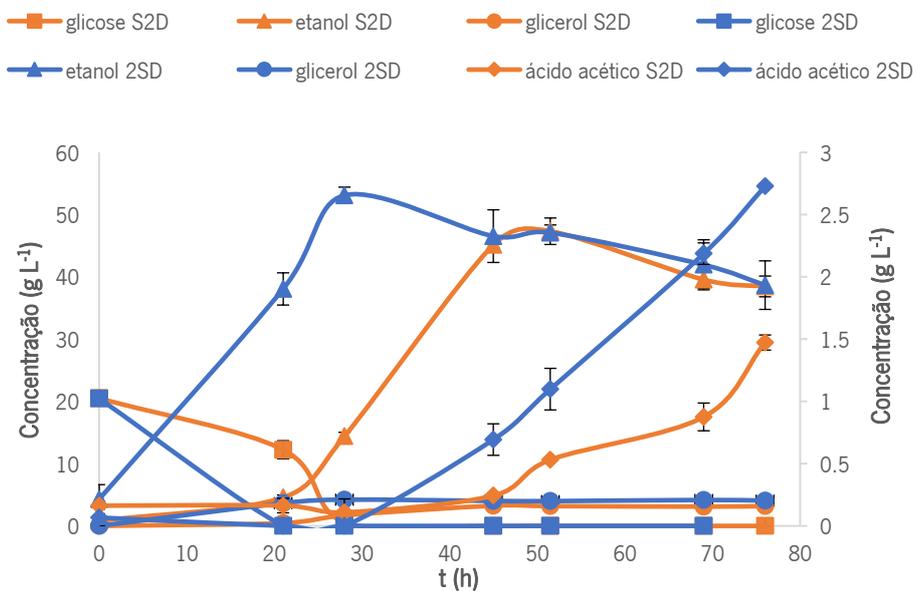
A latência constante de *D. bruxellensis* poderá dever-se ao efeito de Custer. Apesar de não se realizar em condições de estrita anaerobiose, este ensaio pretende simular tais condições, e este efeito constata que em *D. bruxellensis*, dá-se a estimulação da fermentação na presença de oxigénio, mas é inibida em anaerobiose. Isto deve-se ao facto de leveduras do género *Brettanomyces* terem a tendência a realizar fermentação acética, com consequente redução de NAD<sup>+</sup>. Em condições de aerobiose, o NADH é rapidamente reoxidado a NAD<sup>+</sup> por via da respiração aeróbia. No entanto, na ausência de O<sub>2</sub> a levedura ficam sem um aceitador final de eletrões que permita tal reoxidação, resultando num rápido decréscimo na razão NAD<sup>+</sup>/NADH, e consequente estagnação do fluxo glicolítico<sup>99</sup>. Infelizmente, não foi possível realizar o controlo da concentração de O<sub>2</sub> ao longo deste ensaio, pelo que apenas se pode conjurar uma hipótese.

De notar que o maior valor obtido de concentração celular máxima de *S. cerevisiae* foi em condição de co-cultura ( $4,48 \times 10^8 \pm 3,56 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> na condição S2D).

Os perfis de produção de metabolitos primários das condições deste ensaio encontram-se representados nas Figuras 30 e 31.



**Figura 30** Perfis de produção de metabolitos primários pelas culturas puras de *S. cerevisiae* (S; curvas a azul) e *D. bruxellensis* (2D; curvas a laranja) em mosto cervejeiro de LETRA E: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O ácido acético encontra-se no eixo secundário.



**Figura 31** Perfis de produção de metabolitos primários pelas co-culturas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* 2SD (curvas a azul) e S2D (curvas a laranja) em mosto cervejeiro de LETRA E: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O ácido acético encontra-se no eixo secundário.

Como evidenciado pela **Figura 30**, *D. bruxellensis* foi incapaz de proliferar significativamente neste meio, tendo obtido uma concentração máxima de etanol em cultura pura de apenas  $1,11 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ , sendo que nas outras condições os valores aproximam-se de  $40 \text{ g L}^{-1}$ . Fica também provado o crescimento superior de *S. cerevisiae*, uma vez que na cultura pura e na co-cultura que favorece esta levedura (2SD), a glicose foi totalmente consumida antes das 21 h, período de tempo em que foi possível retirar a segunda amostra do ensaio fermentativo (especula-se, no entanto que a glicose terá sido consumida mais rápido). Contudo, o consumo de glicose foi atrasado pelo favorecimento de *D. bruxellensis*, como evidenciado na **Figura 31**.

Constata-se ainda a obtenção das maiores concentrações de etanol nas condições em que *S. cerevisiae* se impõe ( $47,33 \text{ g L}^{-1}$  na condição S2D, o que corresponde aproximadamente a 6 % em volume de etanol). Os valores destas concentrações são da ordem dos valores encontrados no ensaio **4.3.1**, apesar de este ter uma concentração inicial de glicose na ordem dos  $140 \text{ g L}^{-1}$ , enquanto que o mosto utilizado apresenta uma concentração 7 vezes menor, na ordem dos  $20 \text{ g L}^{-1}$ , pelo que se admite fontes adicionais de açúcar, não quantificadas em HPLC, como as representadas na **Figura 2**. Na cerveja além da glicose, encontra-se também maltose e maltotriose (entre outras), fermentáveis por *S. cerevisiae*<sup>00</sup>. Contudo, de notar que o potencial fermentativo poderá ter sido afetado pelas condições limitantes de oxigénio, uma vez que o valor previsto para a concentração final de etanol seria de aproximadamente 9 %.

É também evidente a ausência de produção de ácido acético, indicando a ausência de crescimento de *D. bruxellensis*, sendo um aspeto comum aos outros ensaios em que esta levedura não prosperou.

As concentrações dos compostos minoritários obtidas no final do processo de fermentação encontram-se representadas na **Tabela 9**.

**Tabela 9** Representação das concentrações dos compostos minoritários para os ensaios em mosto cervejeiro de LETRA E.

Composto	Mosto ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	2B ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	S ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	2SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	S2D ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
<b>Ésteres</b>					
acetato de isoamilo	n.d.	n.d.	35,2 $\pm$ 35,2	63,0 $\pm$ 9,9	76,1 $\pm$ 4,5
hexanoato de etilo	n.d.	n.d.	15,2 $\pm$ 15,2	19,8 $\pm$ 3,2	35,2 $\pm$ 1,1
lactato de etilo	n.d.	n.d.	22,9 $\pm$ 0,3	30,4 $\pm$ 3,8	25,6 $\pm$ 1,7
octanoato de etilo	n.d.	n.d.	21,2 $\pm$ 1,4	16,0 $\pm$ 3,1	36,3 $\pm$ 1,1
succinato de dietilo	n.d.	n.d.	26,4 $\pm$ 4,8	22,8 $\pm$ 2,9	n.d.
fenilacetato de etilo	n.d.	n.d.	17,8 $\pm$ 0,2	11,6 $\pm$ 2,2	13,8 $\pm$ 0,3
acetato de 2-feniletilo	n.d.	n.d.	362,7 $\pm$ 70,9	329,8 $\pm$ 49,1	220,8 $\pm$ 4,4
hidrocinamato de etilo	n.d.	n.d.	2,7 $\pm$ 2,7	n.d.	n.d.
<b>Álcoois</b>					
2-metil-1-propanol	n.d.	n.d.	649,4 $\pm$ 649,4	2560,2 $\pm$ 901,2	3410,7 $\pm$ 242,0
2-metil-1-butanol + 3 metil-1-butanol	n.d.	73,0 $\pm$ 10,3	4175,4 $\pm$ 1044,3	15016,1 $\pm$ 4729,3	1914,1 $\pm$ 224,4
álcool furfurílico	152,4	112,3 $\pm$ 12,9	89,6 $\pm$ 5,9	93,6 $\pm$ 21,6	96,9 $\pm$ 9,3
2-feniletanol	201,9	349,8 $\pm$ 0,9	17039,3 $\pm$ 539,3	17703,9 $\pm$ 3282,9	19380,1 $\pm$ 978,4
<b>Furanos</b>					
furfural	682,3	620,5 $\pm$ 69,9	n.d.	n.d.	n.d.
5-metilfurfural	n.d.	240,8 $\pm$ 29,3	n.d.	n.d.	n.d.
5-hidroximetilfurfural	373,1	218,9 $\pm$ 20,7	n.d.	6,7 $\pm$ 2,4	n.d.
<b>Ácidos</b>					
ácido propanóico	15,8	13,3 $\pm$ 4,2	422,0 $\pm$ 384,2	54,8 $\pm$ 11,9	43,5 $\pm$ 1,8
ácido isobutírico	42,9	n.d.	503,2 $\pm$ 54,5	619,7 $\pm$ 156,5	538,2 $\pm$ 41,8
ácido butanóico	n.d.	n.d.	25,0 $\pm$ 4,3	22,6 $\pm$ 6,6	17,0 $\pm$ 3,3
ácido isovalérico	190,1	85,0 $\pm$ 12,1	707,1 $\pm$ 58,8	828,8 $\pm$ 159,3	641,0 $\pm$ 50,3
ácido hexanóico	n.d.	47,3 $\pm$ 5,9	158,4 $\pm$ 46,1	115,4 $\pm$ 25,9	194,9 $\pm$ 26,9
ácido octanóico	28,7	44,7 $\pm$ 6,7	443,7 $\pm$ 103,0	445,9 $\pm$ 81,6	702,4 $\pm$ 3,7
ácido decanóico	n.d.	n.d.	2,1 $\pm$ 2,1	n.d.	n.d.
ácido fenilacético	n.d.	n.d.	36,7 $\pm$ 36,7	137,2 $\pm$ 27,5	n.d.
<b>Álcoois monoterpênicos</b>					
linalol	1363,9	850,5 $\pm$ 112,8	677,1 $\pm$ 21,8	618,1 $\pm$ 61,2	669,0 $\pm$ 9,5
$\beta$ -citronelol	n.d.	n.d.	109,6 $\pm$ 8,0	85,0 $\pm$ 9,8	111,6 $\pm$ 0,2
geraniol	236,7	150,6 $\pm$ 22,2	27,6 $\pm$ 0,1	42,6 $\pm$ 6,7	9,4 $\pm$ 1,7
<b>Fenóis voláteis</b>					
4-etilguaicol	n.d.	10,9 $\pm$ 2,1	n.d.	6,6 $\pm$ 0,9	n.d.
4-vinilguaicol	258,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
eugenol	n.d.	n.d.	15,7 $\pm$ 15,7	n.d.	17,8 $\pm$ 15,1
2,6-dimetoxifenol	30,4	32,8 $\pm$ 4,8	n.d.	n.d.	n.d.
tirosol	n.d.	n.d.	104,2 $\pm$ 72,6	224,3 $\pm$ 85,5	261,1 $\pm$ 12,7
<b>Lactonas</b>					
whiskey lactona I - cis-oak lactone	n.d.	15,2 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 1,7	n.d.	n.d.
<b>Aldeídos</b>					
vanilina	318,9	354,9 $\pm$ 29,9	n.d.	n.d.	n.d.
siringaldeído	n.d.	93,6 $\pm$ 9,6	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Outros</b>					
acetoina	62,9	24,1 $\pm$ 2,3	636,5 $\pm$ 481,4	358,8 $\pm$ 132,0	1567,7 $\pm$ 167,3
metionol	n.d.	n.d.	275,7 $\pm$ 127,9	324,4 $\pm$ 47,9	214,6 $\pm$ 24,3

n.d. – não detetado

Constata-se que neste ensaio não há produção de nenhum éster por parte de *D. bruxellensis*, pelo que a presença de ésteres (essencialmente ésteres de etilo e ésteres de acetato) na co-cultura deverá ser atribuída a *S. cerevisiae*, sendo que não há deteção de nenhum éster no mosto<sup>101</sup>.

Isto juntamente com o facto de concentrações de vários metabolitos, se manterem constantes em relação aos seus valores iniciais no mosto cervejeiro suportam o crescimento praticamente inexistente de *D. bruxellensis*. Apesar de se verificar uma concentração elevada de 4-vinilguaicol inicial, o produto 4-etilguaicol só é detetado em 2 das 3 condições que contam com a presença de *D. bruxellensis* (2D e 2SD), em concentrações baixas (contudo, em nenhuma das condições foi detetada a presença de 4-vinilfenol).

De notar que o éster produzido em maiores concentrações foi o acetato de 2-feniletilo, derivado das elevadas concentrações existentes de 2-feniletanol (na ordem dos 17-19 mg L<sup>-1</sup>). Aliás, nas condições do ensaio onde existe *S. cerevisiae* verificam-se das concentrações mais elevadas de álcoois obtidas.

Verifica-se ainda a degradação total de furanos em todas as condições onde existe *S. cerevisiae*. Estes últimos são inibitórios do crescimento das leveduras e outros processos intrínsecos, mas *S. cerevisiae* tem capacidade de os degradar<sup>102</sup>.

Relativamente aos ácidos orgânicos, observa-se que não houve produção de ácido decanoico. Como tal, não foi possível a produção de decanoato de etilo, devido à ausência do principal *building block*. De forma geral, as maiores concentrações de ácidos orgânicos foram obtidas na cultura pura de *S. cerevisiae* e na co-cultura S2D.

A respeito dos álcoois monoterpénicos, observa-se um perfil diferente dos analisados até agora, tendo termo de comparação apenas com o ensaio 4.4.3., sendo o meio com maior concentração de monoterpénos inicial. Estes compostos provêm maioritariamente do lúpulo, e tratando-se de uma cerveja artesanal, faz uso de maiores quantidades de lúpulo do que uma cerveja industrial como a Argus, utilizada no ensaio anterior. Além disso, as cervejas LETRA não passam pelo processo de pasteurização, responsável pela volatilização de muitos compostos aromáticos da cerveja<sup>103</sup>. Denota-se uma diminuição na concentração de geraniol inicial, que é utilizado na produção de  $\beta$ -citronelol (aroma a limão), que aumenta de concentração. Por outro lado, verifica-se uma diminuição da concentração do linalol, que deverá ser convertido a  $\alpha$ -terpineol<sup>104,105</sup>.

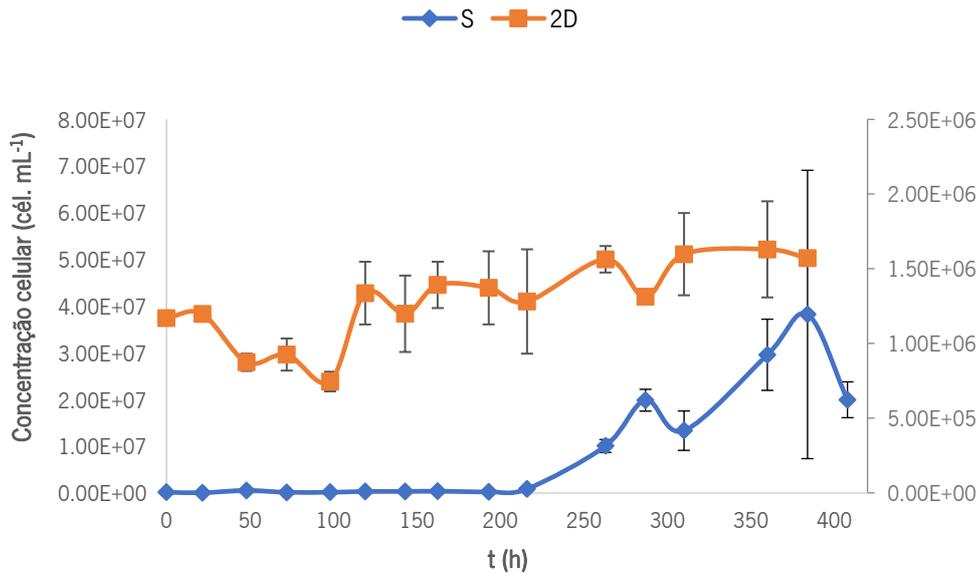
Com a exceção dos álcoois monoterpénicos (característicos de uma cerveja artesanal), este padrão é o mesmo encontrado nos ensaios 4.3.1 e 4.3.2, tendo os 3 ensaios em comum a maior concentração de açúcares em relação aos restantes ensaios, o que fomenta a maior proliferação de *S. cerevisiae*, ao que se associa uma maior produção de metabolitos secundários. Entre estes, os ésteres de

acetato e os ésteres de etilo poderão ter derivado da acumulação de acetil-CoA (possivelmente derivado de *feedback* negativo da acumulação de outros metabolitos envolvidos em processos de obtenção de energia, como a glicólise ou o ciclo do ácido cítrico)<sup>106</sup>, que foi direcionado na formação destes metabolitos<sup>101</sup>; os álcoois por sua vez poderão estar associados a um meio com uma elevada concentração de aminoácidos, que servem de substrato à formação de álcoois pela via de Ehrlich<sup>83</sup>. Enquanto que nos ensaios de elevada concentração de glicose a fonte de aminoácidos será o extrato de levedura (apresenta uma concentração 3 vezes maior nestes dois ensaios do que nos restantes ensaios em meio sintético), no caso do mosto cervejeiro, provirá do cereal, originário essencialmente da proteólise das proteínas da cevada durante o processo cervejeiro, estando o nitrogénio presente sob a forma de  $\alpha$ -aminoácidos livres (FAN).<sup>107,108</sup>

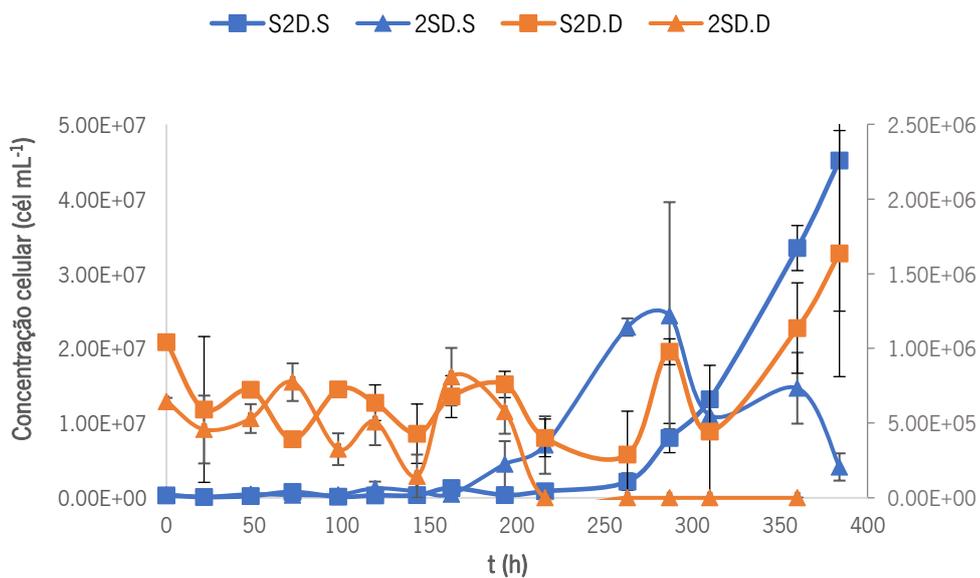
#### 4.4.3. Fermentação de cerveja LETRA E

Neste ensaio fermentativo de uma matriz alimentar utilizou-se cerveja LETRA E, em fase final de fermentação, recolhida diretamente do fermentador na fábrica da empresa Fermentum – Engenharia das Fermentações Lda. O ensaio teve 4 condições, com inóculo de  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>; cultura pura de *S. cerevisiae* (S); cultura pura de *D. bruxellensis* com o dobro do inóculo (2D); co-cultura de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* na razão 1:2 (S2D); e co-cultura de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* na razão 2:1 (2SD).

Os perfis de produção de metabolitos primários deste ensaio encontram-se representados nas Figuras 32 e 33.



**Figura 32** Perfis de crescimento das culturas puras de *S. cerevisiae* (cél mL<sup>-1</sup>; S, curva azul) e *D. bruxellensis* (cél mL<sup>-1</sup>; 2D, curva laranja) em LETRA E. *D. bruxellensis* encontra-se no eixo secundário.



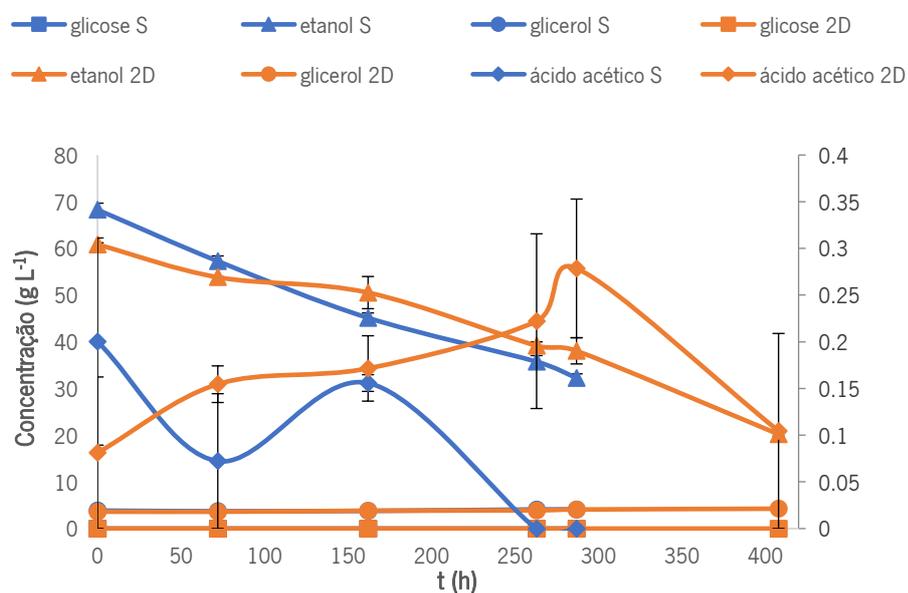
**Figura 33** Perfis de crescimento das co-culturas de *S. cerevisiae* (curvas a azul) e *D. bruxellensis* (curvas a laranja) S2D (inóculo de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* na razão 1:2; quadrados) e 2SD (inóculo de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* na razão 2:1; triângulos) em LETRA E. *D. bruxellensis* encontra-se no eixo secundário.

Este ensaio representa o único caso nesta dissertação em que *S. cerevisiae* consegue suprimir *D. bruxellensis* num meio inóspito com elevada concentração de etanol sem presença de glicose. Por análise de HPLC, representada nas **Figuras 34 e 35**, obtém-se uma média de concentração de etanol inicial de cerca de 63,53 g L<sup>-1</sup>, o que corresponde a uma de percentagem de volume de etanol em solução

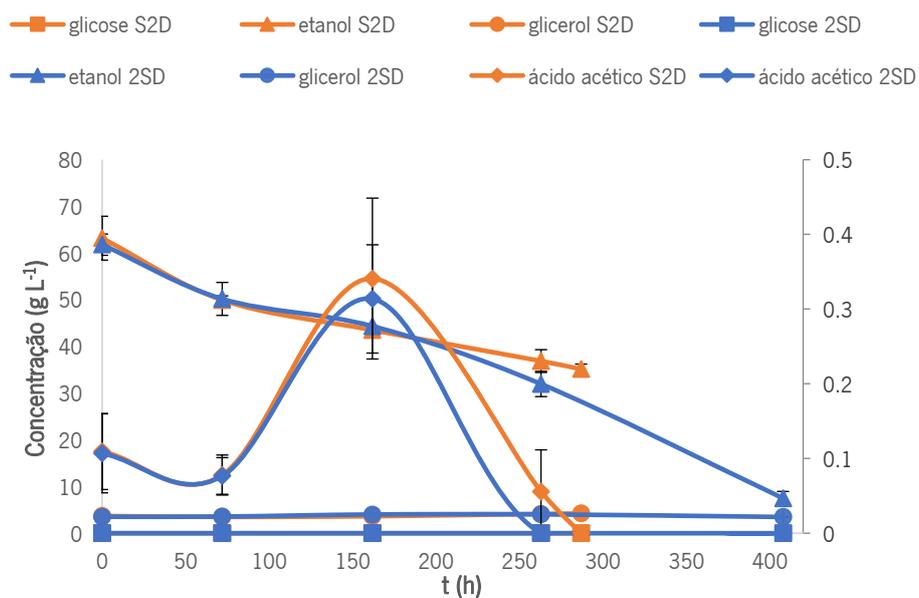
de 8,05 % (uma diferença de cerca de 1 %, uma vez que esta cerveja é comercializada como tendo 9 % de percentagem em volume de etanol).

Esta fermentação também fica caracterizada como sendo a mais longa. *S. cerevisiae* só entra em fase exponencial depois das 150 h de fermentação, correspondendo a uma fase *lag* bastante extensa. Os valores de concentração máxima celular obtidos não foram muito elevados, e associados a erros elevados, sendo o maior valor obtido na condição S2D ( $4,51 \times 10^7 \pm 2,02 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>).

Os perfis de produção de metabolitos primários deste ensaio fermentativo encontram-se nas Figuras 34 e 35.



**Figura 34** Perfis de produção de metabolitos primários pelas culturas puras de *S. cerevisiae* (S; curvas a azul) e *D. bruxellensis* (2D; curvas a laranja) em LETRA E: glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O ácido acético encontra-se no eixo secundário.



**Figura 35** Perfis de produção de metabolitos primários pelas co-culturas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* em LETRA E 2SD (curvas a azul) e S2D (curvas a laranja): glicose (quadrados), etanol (triângulos), ácido acético (losangos) e glicerol (círculos). O ácido acético encontra-se no eixo secundário.

Todos os perfis são semelhantes, apresentando uma diminuição na concentração de etanol ao longo do tempo, ausência de glicose e uma produção inexistente de ácido acético. De notar que a maior descida na concentração de etanol se verifica na condição 2SD. Enquanto que parte da diminuição da concentração de etanol possa ser atribuída à sua utilização por parte de *S. cerevisiae* como fonte de carbono, os perfis de consumo de etanol não coincidem com os perfis de crescimento de *S. cerevisiae*, pelo que certamente haverá grandes perdas por evaporação ao longo do tempo, dado a diminuição linear de concentração ao longo do tempo<sup>94</sup>.

As concentrações dos compostos minoritários obtidas no final do processo de fermentação encontram-se representadas na **Tabela 10**.

**Tabela 10** Representação das concentrações dos compostos minoritários para os ensaios em LETRA E.

Composto	Letra E ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	2D ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	S ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	2SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	S2D ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
<b>Ésteres</b>					
acetato de isobutilo	124,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2-metilbutirato de etilo	n.d.	n.d.	24,7 $\pm$ 9,9	n.d.	136,5 $\pm$ 87,1
acetato de isoamilo	2327,9	n.d.	12,3 $\pm$ 0,0	n.d.	n.d.
hexanoato de etilo	167,5	13,2 $\pm$ 0,7	n.d.	n.d.	n.d.
lactato de etilo	60,9	58,9 $\pm$ 1,4	47,1 $\pm$ 17,1	n.d.	46,1 $\pm$ 4,4
octanoato de etilo	460,3	179,3 $\pm$ 5,8	n.d.	n.d.	n.d.
decanoato de etilo	234,1	44,8 $\pm$ 1,6	n.d.	n.d.	n.d.
succinato de dietilo	102,0	360,2 $\pm$ 294,8	65,9 $\pm$ 1,6	48,9 $\pm$ 8,1	52,7 $\pm$ 6,7
fenilacetato de etilo	n.d.	9,6 $\pm$ 1,5	45,7 $\pm$ 0,1	37,7 $\pm$ 4,5	34,6 $\pm$ 5,7
acetato de 2-feniletilo	n.d.	28,9 $\pm$ 4,2	277,7 $\pm$ 78,1	96,5 $\pm$ 37,1	181,4 $\pm$ 16,3
<b>Álcoois</b>					
2-metil-1-propanol	1598,2	133,5 $\pm$ 19,6	250,5 $\pm$ 113,3	289,2 $\pm$ 193,9	n.d.
2-metil-1-butanol + 3 metil-1-butanol	27102,9	5119,2 $\pm$ 149,1	6099,6 $\pm$ 2686,9	2844,9 $\pm$ 339,2	5530,9 $\pm$ 3023,7
álcool furfúrico	191,7	171,8 $\pm$ 3,7	95,1 $\pm$ 30,1	63,8 $\pm$ 59,1	71,9 $\pm$ 4,9
2-feniletanol	26456,8	24390,9 $\pm$ 683,6	33492,3 $\pm$ 3685,3	32846,1 $\pm$ 1540,1	30389,8 $\pm$ 7019,9
<b>Ácidos</b>					
ácido propanóico	n.d.	6,0 $\pm$ 0,6	n.d.	n.d.	n.d.
ácido isobutírico	81,9	61,2 $\pm$ 1,5	179,7 $\pm$ 12,0	263,6 $\pm$ 33,6	145,6 $\pm$ 59,1
ácido butanóico	20,7	19,4 $\pm$ 0,1	72,1 $\pm$ 16,5	78,8 $\pm$ 26,2	45,2 $\pm$ 12,8
ácido isovalérico	173,4	144,2 $\pm$ 1,9	595,9 $\pm$ 58,6	1236,5 $\pm$ 332,3	579,5 $\pm$ 205,9
ácido hexanóico	n.d.	431,5 $\pm$ 8,1	n.d.	n.d.	n.d.
ácido octanóico	3003,7	1910,5 $\pm$ 73,8	n.d.	n.d.	n.d.
ácido decanóico	2119,3	262,3 $\pm$ 23,8	n.d.	n.d.	n.d.
ácido fenilacético	n.d.	n.d.	4,1 $\pm$ 4,1	17,5 $\pm$ 17,5	n.d.
<b>Álcoois monoterpênicos</b>					
linalol	1492,3	197,0 $\pm$ 10,3	184,3 $\pm$ 36,4	165,8 $\pm$ 18,7	140,2 $\pm$ 50,8
$\beta$ -citronelol	91,3	40,9 $\pm$ 3,5	163,8 $\pm$ 3,6	139,7 $\pm$ 19,2	130,5 $\pm$ 24,2
geraniol	89,4	76,1 $\pm$ 1,5	n.d.	31,5 $\pm$ 15,3	72,4 $\pm$ 10,3
<b>Fenóis voláteis</b>					
4-etilguaiaicol	n.d.	1562,5 $\pm$ 31,4	n.d.	676,7 $\pm$ 227,2	82,3 $\pm$ 58,8
4-etilfenol	n.d.	186,0 $\pm$ 3,5	n.d.	43,2 $\pm$ 21,8	n.d.
4-vinilguaicol	n.d.	39,2 $\pm$ 4,1	35,2 $\pm$ 5,9	137,4 $\pm$ 62,4	155,4 $\pm$ 55,2
4-vinilfenol	n.d.	53,8 $\pm$ 2,4	n.d.	33,2 $\pm$ 33,2	74,8 $\pm$ 40,5
2,6-dimetoxifenol	n.d.	82,5 $\pm$ 2,4	n.d.	n.d.	n.d.
tirosol	172,9	146,0 $\pm$ 16,7	251,1 $\pm$ 23,1	274,3 $\pm$ 79,2	145,4 $\pm$ 8,2
<b>Outros</b>					
acetoina	n.d.	n.d.	570,8 $\pm$ 94,8	932,6 $\pm$ 48,0	384,5 $\pm$ 126,7
metionol	202,1	111,9 $\pm$ 3,0	121,4 $\pm$ 21,7	106,9 $\pm$ 46,2	110,3 $\pm$ 18,3

n.d. – não detetado

Sendo uma cerveja artesanal, e ao contrário do mosto, um produto finalizado, esta matriz alimentar revelou ser a que apresenta maiores concentrações iniciais de ésteres, álcoois, ácidos orgânicos e alguns álcoois monoterpênicos.

Em relação aos ésteres, reparou-se que todos os ésteres de acetato presentes inicialmente no meio tiveram um decréscimo de concentração. Aliás, nas culturas com preponderância de *S. cerevisiae*

(S e 2SD), a quase totalidade dos ésteres iniciais é consumida, verificando-se por outro lado a produção de ésteres inicialmente inexistentes, nomeadamente fenilacetato de etilo e acetato de 2-feniletilo. De notar ainda que apenas na cultura pura de *D. bruxellensis* se verifica um aumento de concentração por parte do succinato de dietilo.

Relativamente aos ácidos orgânicos, verificam-se elevadas concentrações iniciais dos ácidos gordos de cadeia média, ácido octanóico e decanóico. Estes compostos foram totalmente consumidos nas condições em que se verifica a presença de *S. cerevisiae*. Curiosamente, as maiores concentrações de ácido isovalérico foram obtidas nas co-culturas.

Similarmente ao ensaio anterior, voltam-se a verificar a presença de álcoois monoterpênicos no meio inicial. Mais propriamente, verificou-se uma concentração bastante elevada de linalol, e concentrações consideráveis de  $\beta$ -citronelol e geraniol. Na cultura pura de *S. cerevisiae* verifica-se a conversão total do geraniol em solução e de grande parte do linalol, com aumento da concentração de  $\beta$ -citronelol. Como referido anteriormente, o geraniol terá sido consumido na produção de  $\beta$ -citronelol, enquanto que o linalol poderá ter sido utilizado na produção de  $\alpha$ -terpeniol. Contudo, em co-cultura, *S. cerevisiae* não consegue consumir a totalidade do geraniol, o que resulta em concentrações mais baixas de  $\beta$ -citronelol, inferindo-se que a competição com *D. bruxellensis* poderá interferir com esta via metabólica.

Quanto aos álcoois, verificam-se concentrações iniciais destes metabolitos bastante elevadas. Similarmente aos ésteres, estes compostos são também eles degradados, com a exceção recorrente do 2-feniletanol, que aumenta em todas as condições com presença de *S. cerevisiae*.

Contudo, o paradigma muda relativamente aos fenóis voláteis. Juntamente com a condição de cultura pura de *D. bruxellensis* do ensaio 4.4.1., realizado com extratos da cerveja Argus, a condição de cultura pura de *D. bruxellensis* neste ensaio representa as concentrações de etilfenóis mais elevadas de todo este estudo, atingindo uma concentração de 1562,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de 4-etilguaicol e 186,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de 4-etilfenol, obtendo uma razão 8.4 4-EG:4-EP. Estes resultados permitem inferir a existência de elevadas concentrações dos ácidos cinâmicos precursores destes etilfenóis no meio. Como foi referido anteriormente, os ácidos fenólicos estão associados a polissacarídeos existentes na parede celular das células do cereal utilizado no mosto.

Crauwels e colaboradores, num estudo em que utilizaram *Strong golden pale ale* (em comparação com LETRA E, descrita como *Belgian Dark Strong Ale*), obtiveram valores mais elevados para a razão 4-EG:4-EP, estando entre 22,7 e 29,1 para diferentes estirpes<sup>109</sup>.

Por fim, verifica-se mais uma vez a produção de acetoína apenas nas condições onde se verifica a presença de *S. cerevisiae*.

## 5. Conclusões

Este trabalho permitiu obter bastante informação acerca das dinâmicas de cultura de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, mais propriamente ao nível do crescimento, e perfis de produção de metabolitos primários dos principais compostos, bem como dos compostos secundários.

Observou-se que em meio sintético, em cultura pura, *S. cerevisiae* apresenta um crescimento mais rápido que *D. bruxellensis*, mas esta atinge concentrações celulares mais elevadas. Já em co-cultura, *D. bruxellensis* tem um crescimento mais lento, mas nos estágios finais da fermentação cresce mais que *S. cerevisiae*. Ou seja, em co-cultura verifica-se um comportamento competitivo.

Foi verificado que em cultura pura em meio sintético, *S. cerevisiae* consome a totalidade da glicose mais rápido do que *D. bruxellensis*, estando isto intimamente ligado ao seu crescimento tardio. Enquanto que a produção de glicerol é praticamente nula por parte de *D. bruxellensis*. Por outro lado, esta levedura produziu ácido acético, sendo as concentrações obtidas tanto maiores quanto a concentração inicial de açúcar.

Relativamente à taxa de inóculo, verificou-se que com o seu aumento, *D. bruxellensis* cresce bastante mais do que *S. cerevisiae*. Por outro lado, quando se aumenta o inóculo de *S. cerevisiae* em relação a *D. bruxellensis*, o seu crescimento é atrasado, mas no final da fermentação obtém concentrações celulares parecidas com *S. cerevisiae*, no entanto, não produz ácido acético.

Em meios com elevada concentração de açúcares, *S. cerevisiae* cresce mais em co-cultura do que *D. bruxellensis*, mas esta cresce mais em cultura pura.

A diminuição de temperatura de 28°C para 21°C levou à morte celular precoce das células, e a um aumento do intervalo de tempo necessário ao consumo da totalidade de glicose. Esta diminuição de temperatura resultou ainda na diminuição das concentrações de ácido acético produzido por *D. bruxellensis* e um leve aumento na produção dos compostos fenólicos voláteis de interesse produzidos por esta levedura, nomeadamente 4-etilfenol e 4-etilguaicol.

Verificou-se ainda que *D. bruxellensis* apresenta uma maior resistência e adaptação aos compostos extraídos da madeira e do etanol. Apurou-se que quanto maior a concentração de etanol no meio, maior a atenuação do crescimento de ambas as leveduras, verificando-se um limite para a sua proliferação entre os 8-10 % de percentagem em volume. O mesmo se verifica com a produção dos metabolitos secundários por parte das leveduras e de ácido acético por parte de *D. bruxellensis*, que em geral diminuem com o aumento da percentagem de etanol e compostos extraídos da madeira.

Observou-se que em situação de esgotamento de açúcares, as leveduras utilizam etanol como fonte de carbono. Enquanto que *D. bruxellensis* realiza a fermentação acética, *S. cerevisiae* possivelmente reintroduz o etanol na respiração aeróbia.

De notar também que condições limitantes de oxigénio atenuam bastante o crescimento de *D. bruxellensis*, devido ao efeito de Custer.

Por fim, relativamente aos metabolitos secundários, várias ilações foram retiradas. As condições em que *D. bruxellensis* produz maiores concentrações de etilfenóis de interesse organolético é em situação de cultura pura, na refermentação de produtos cervejeiros acabados (representados nesta dissertação pelos ensaios **4.4.1** e **4.4.3**), enquanto que as co-culturas apresentam geralmente um perfil de metabolitos secundários semelhante ao perfil da cultura pura da levedura que mais proliferou nesse meio. Observou-se também que ambas as leveduras têm capacidade de degradar furanos existentes em solução, e meios com elevadas concentrações de nitrogénio levam à produção de concentrações elevadas de álcoois secundários pela via de Ehrlich.

## 6. Perspetivas futuras

Apesar da abrangência de resultados deste trabalho, algumas etapas podem ser consideradas a realizar no futuro.

Ao nível laboratorial, certas variáveis faltam ser estudadas, nomeadamente o efeito do pH e diferentes concentrações de oxigénio no meio, com vista a averiguar qual o seu efeito no processo fermentativo. Ainda dentro deste tema, também seria importante o estudo destas co-culturas com diferentes fontes de carbono no meio, e averiguar o seu impacto quer no crescimento das leveduras, quer no seu perfil metabólico.

De seguida, são necessários estudos com diferentes estirpes de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*. A importância reside no facto de diferentes estirpes apresentarem variabilidades ao nível do metabolismo, o que eventualmente poderá resultar na obtenção de perfis metabólicos diferentes, com propriedades organoléticas interessantes.

Relativamente às propriedades sensoriais, podem-se aplicar as co-culturas estudadas a outras matrizes alimentares. Neste caso, seria interessante expandir a aplicação a outras variedades de cervejas, como as IPAs ou as *stout*. Por outro lado, o vinho também seria uma matriz de interesse ao qual aplicar as co-culturas estudadas neste trabalho.

A etapa mais importante para dar seguimento a este trabalho seria a apresentação dos produtos obtidos a um painel de provadores. Esta ação permitiria averiguar quais as características organoléticas reais das matrizes fermentadas por um grupo de profissionais treinados para o propósito.

Num futuro mais distante, um possível procedimento a adotar seria um *scale-up* à escala industrial, com vista à aplicação das co-culturas em ambiente industrial na obtenção de bebidas diferenciadas para consumo humano.

## Referências

1. Wu, M.-H., Huang, S.-B. & Lee, G.-B. Microfluidic cell culture systems for drug research. *Lab Chip* **10**, 939 (2010).
2. Tanouchi, Y., Smith, R. P. & You, L. Engineering microbial systems to explore ecological and evolutionary dynamics. *Current Opinion in Biotechnology* **23**, 791–797 (2012).
3. Izmirliglu, G. & Demirci, A. Improved simultaneous saccharification and fermentation of bioethanol from industrial potato waste with co-cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* by medium optimization. *Fuel* **185**, 684–691 (2016).
4. Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, C. & Corrieu, G. The Relative Effect of Milk Base, Starter, and Process on Yogurt Texture: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **44**, 113–137 (2004).
5. Chandan, R. C. *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks. Manufacturing Yogurt and Fermented Milks* (2007).
6. Pinto, S. M., Clemente, M. D. G. & De Abreu, L. R. Behaviour of volatile compounds during the shelf life of yoghurt. *Int. J. Dairy Technol.* **62**, 215–223 (2009).
7. Orla-Jensen, S. J. & Churchill, A. *Dairy Bacteriology*. (1921).
8. Pette, J. W. & Lolkema, H. Symbiosis and antibiosis in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Ned. Melk- en Zuiveltijdschr.* 197–208 (1950).
9. Hamdan, I. Y., Kunsman, J. E. & Deanne, D. D. Acetaldehyde Production by Combined Yogurt Cultures. *J. Dairy Sci.* **54**, 1080–1082 (1971).
10. Fröhlich-Wyder, M. T. Yeasts in dairy products. in *Yeasts in Food* 209–237 (2003).
11. Viljoen, B. C., Lourens-Hattingh, A., Ikalafeng, B. & Peter, G. Temperature abuse initiating yeast growth in yoghurt. *Food Res. Int.* **36**, 193–197 (2003).
12. Viljoen, B. C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *Int. J. Food Microbiol.* **69**, 37–44 (2001).
13. Fiorda, F. A., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Medeiros, A. P., Rakshit, S. K. & Soccol, C. R. Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. *LWT - Food Sci. Technol.* **68**, 690–697 (2016).

14. Dertli, E. & Çon, A. H. Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. *LWT - Food Sci. Technol.* **85**, 151–157 (2017).
15. Magalhães, K. T., de Pereira, G. V. M., Dias, D. R. & Schwan, R. F. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1241–1250 (2010).
16. van Rijswijck, I. M. H., Wolkers - Rooijackers, J. C. M., Abee, T. & Smid, E. J. Performance of non-conventional yeasts in co-culture with brewers' yeast for steering ethanol and aroma production. *Microb. Biotechnol.* **10**, 1591–1602 (2017).
17. Martens, H., Iserentant, D. & Verachtert, H. Microbiological aspects of a mixed yeast - Bacterial fermentation in the production of a special Belgian acidic ale. *J. Inst. Brew.* **103**, 85–91 (1997).
18. Basso, R. F., Alcarde, A. R. & Portugal, C. B. Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Res. Int.* **86**, 112–120 (2016).
19. Gilliland, B. R. B. *Brettanomyces*. i. occurrence, characteristics, and effects on beer flavour. *J. Inst. Brew.* **67**, 257–261 (1961).
20. Toro, M. E. & Vazquez, F. Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 347–354 (2002).
21. Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M. C., De Revel, G. & Lonvaud-Funel, A. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 1208–1219 (2006).
22. Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J. J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J. & Alexandre, H. Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiol.* **32**, 243–253 (2012).
23. Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I. & Ciani, M. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.* **33**, 271–281 (2013).
24. Simova, E., Simov, Z., Beshkova, D., Frengova, G., Dimitrov, Z. & Spasov, Z. Amino acid profiles of lactic acid bacteria, isolated from kefir grains and kefir starter made from them. *Int. J. Food Microbiol.* **107**, 112–123 (2006).
25. StatOIV extracts. (2014). Available at: <http://www.oiv.int/en/databases-and-statistics/statistics>.
26. Cocolin, L., Bisson, L. F. & Mills, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine

- fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**, 81–87 (2000).
27. Barata, A., Pagliara, D., Piccininno, T., Tarantino, F., Ciardulli, W., Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. *FEMS Yeast Res.* **8**, 1097–1102 (2008).
  28. Ciani, M. & Comitini, F. Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Curr. Opin. Food Sci.* **1**, 1–6 (2015).
  29. Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E. & Carrau, F. Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **157**, 245–250 (2012).
  30. Dos Santos, M. M., Gombert, A. K., Christensen, B., Olsson, L. & Nielsen, J. Identification of in vivo enzyme activities in the cometabolism of glucose and acetate by *Saccharomyces cerevisiae* by using <sup>13</sup>C-labeled substrates. *Eukaryot. Cell* **2**, 599–608 (2003).
  31. De Deken, R. H. The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *J. Gen. Microbiol.* **44**, 149–156 (1966).
  32. Barnett, J. A. & Entian, K. D. A history of research on yeasts 9: Regulation of sugar metabolism. *Yeast* **22**, 835–894 (2005).
  33. Arnold, J. P. Origin and History of Beer and Brewing: From Prehistoric Times to the Beginning of Brewing Science and Technology. in *Cleveland, Ohio: Beer Books* 34 (1911).
  34. Beer production worldwide from 1998 to 2016 (in billion hectoliters). Available at: <https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/>.
  35. Stewart, G. G., Hill, A. E. & Russell, I. 125th Anniversary Review: Developments in brewing and distilling yeast strains. *J. Inst. Brew.* **119**, 202–220 (2013).
  36. Snauwaert, I., Roels, S. P., Van Nieuwerburg, F., Van Landschoot, A., De Vuyst, L. & Vandamme, P. Microbial diversity and metabolite composition of Belgian red-brown acidic ales. *Int. J. Food Microbiol.* **221**, 1–11 (2016).
  37. Cerveja Letra. Available at: <https://www.cervejaletra.pt/pt>. (Accessed: 12th July 2019)
  38. Crauwels, S., Steensels, J., Aerts, G., Willems, K. A., Verstrepen, K. J. & Lievens, B. *Brettanomyces bruxellensis*, essential contributor in spontaneous beer fermentations providing novel opportunities for the brewing industry. *BrewingScience* (2015).
  39. Steensels, J. & Verstrepen, K. J. Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. *Annu. Rev. Microbiol.* **68**, 61–80 (2014).

40. Piškur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A. & Compagno, C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics* **22**, 183–186 (2006).
41. Keersmaecker, J. De. The Mystery of Lambic Beer. *Sci. Am.* **275**, 74–80 (1996).
42. Coelho, E., Domingues, L., Teixeira, J. A., Oliveira, J. M. & Tavares, T. Understanding wine sorption by oak wood: Modeling of wine uptake and characterization of volatile compounds retention. *Food Res. Int.* **116**, 249–257 (2019).
43. Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H. & Verstrepen, K. J. *Brettanomyces* yeasts - From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **206**, 24–38 (2015).
44. Serra Colomer, M., Funch, B. & Forster, J. The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **56**, 30–35 (2019).
45. Sawadogo-Lingani, H., Lei, V., Diawara, B., Nielsen, D. S., Møller, P. L., Traoré, A. S. & Jakobsen, M. The biodiversity of predominant lactic acid bacteria in dolo and pito wort for the production of sorghum beer. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 765–777 (2007).
46. Faria-Oliveira, F., Diniz, R. H. S., Godoy-Santos, F., Piló, F. B., Mezdri, H., Castro, I. M. & Brandão, R. L. The Role of Yeast and Lactic Acid Bacteria in the Production of Fermented Beverages in South America. in *Food Production and Industry* (2015).
47. Sakamoto, K. & Konings, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* **89**, 105–124 (2003).
48. van Der Walt, J. P. & Walt, J. P. V. a N. D. E. R. *Dekkera*, a new genus of the *Saccharomycetaceae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **30**, 273–280 (1964).
49. Claussen, N. H. On a Method for the Application of Hansen's Pure Yeast System in the Manufacturing of Well-Conditioned English Stock Beers. *J. Inst. Brew.* **10**, 308–331 (1904).
50. Barata, A., Caldeira, J., Botelho, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* **121**, 201–207 (2008).
51. Nardi, T., Remize, F. & Alexandre, H. Adaptation of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces bruxellensis* to winemaking conditions: A comparative study of stress genes expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 925–937 (2010).
52. Abbott, D. A., Hynes, S. H. & Ingledew, W. M. Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 641–647 (2005).

53. Meneghin, M. C., Bassi, A. P. G., Codato, C. B., Reis, V. R. & Ceccato-Antonini, S. R. Fermentative and growth performances of *Dekkera bruxellensis* in different batch systems and the effect of initial low cell counts in co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **30**, 295–305 (2013).
54. Reis, A. L. S., Vidal, E. E., de Moraes Jr., M. A., de Souza, R. de F. R., Torres, R. R. N. B., Leite, F. C. B. & Paiva, P. M. G. Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain. *Springerplus* **3**, 1–9 (2014).
55. Scheffers, W. A. On the inhibition of alcoholic fermentation in *Brettanomyces* yeasts under anaerobic conditions. *Experientia* **17**, 40–42 (1961).
56. Wijsman, M. R., van Dijken, J. P., van Kleeff, B. H. A. & Scheffers, W. A. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). *Antonie Van Leeuwenhoek* **50**, 183–192 (1984).
57. De Barros Pita, W., Leite, F. C. B., De Souza Liberal, A. T., Simões, D. A. & De Moraes, M. A. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **100**, 99–107 (2011).
58. Parente, D. C., Cajueiro, D. B. B., Moreno, I. C. P., Leite, F. C. B., De Barros Pita, W. & De Moraes, M. A. On the catabolism of amino acids in the yeast *Dekkera bruxellensis* and the implications for industrial fermentation processes. *Yeast* **35**, 299–309 (2018).
59. Leite, F. C. B., Basso, T. O., Pita, W. de B., Gombert, A. K., Simões, D. A. & De Moraes, M. A. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, A major contaminant in bioethanol production plants. *FEMS Yeast Res.* **13**, 34–43 (2013).
60. Ikram-UI-Haq & Ali, S. Kinetics of invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Pakistan J. Bot.* **39**, 907–912 (2007).
61. Snowdon, E. M., Bowyer, M. C., Grbin, P. R. & Bowyer, P. K. Mousy off-flavor: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 6465–6474 (2006).
62. Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S. & Delvaux, F. R. Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **96**, 110–118 (2003).
63. Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol.* **20**, 377–384 (2003).

64. Dweck, H. K. M., Ebrahim, S. A. M., Farhan, A., Hansson, B. S. & Stensmyr, M. C. Olfactory proxy detection of dietary antioxidants in drosophila. *Curr. Biol.* **25**, 455–466 (2015).
65. Pampulha, M. E. & Loureiro, V. Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **11**, 269–274 (1989).
66. Kerr, B., Riley, M. A., Feldman, M. W. & Bohannan, B. J. M. Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature* **418**, 171–174 (2002).
67. Taniguchi, M., Tohma, T., Itaya, T. & Fujii, M. Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by co-culture of *Pichia stipitis* and a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 364–370 (1997).
68. Hickert, L. R., Da Cunha-Pereira, F., De Souza-Cruz, P. B., Rosa, C. A. & Ayub, M. A. Z. Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. *Bioresour. Technol.* **131**, 508–514 (2013).
69. Payne, S., Smith, R. P. & You, L. Quantitative Analysis of the Spatiotemporal Dynamics of a Synthetic Predator – Prey Ecosystem. in *Synthetic Gene Networks: Methods and Protocols* **813**, 315–330 (2012).
70. Mason, K. M., Bigley, N. J. & Fink, P. S. Development of a novel in vitro co-culture system for studying host response to native bacterial antigens. *J. Immunol. Methods* **211**, 147–158 (1998).
71. Lenas, P. & Pavlou, S. Coexistence of three competing microbial populations in a chemostat with periodically varying dilution rate. *Math. Biosci.* **129**, 111–142 (1995).
72. Goers, L., Freemont, P. & Polizzi, K. M. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J. R. Soc. Interface* **11**, 65–77 (2014).
73. Coelho, E., Teixeira, J. A., Domingues, L., Tavares, T. & Oliveira, J. M. Factors affecting extraction of adsorbed wine volatile compounds and wood extractives from used oak wood. *Food Chem.* **295**, 156–164 (2019).
74. Oliveira, J. M., Faria, M., Sá, F., Barros, F. & Araújo, I. M. C<sub>6</sub>-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin. *Anal. Chim. Acta* **563**, 300–309 (2006).
75. Camacho-Fernández, C., Hervás, D., Rivas-Sendra, A., Marín, M. P. & Seguí-Simarro, J. M. Comparison of six different methods to calculate cell densities. *Plant Methods* 361–370 (2018).
76. Phowchinda, O., Délia-Dupuy, M. L. & Strehaiano, P. Effects of acetic acid on growth and fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **17**, 237–242 (1995).

77. Rozpedowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O. P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., Woolfit, M., Compagno, C. & Piškur, J. Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nat. Commun.* (2011).
78. Pronk, J. T., Steensma, H. Y. & van Dijken, J. P. Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**, 1607–1633 (1996).
79. 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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 843–853 (2014).
80. Michnick, S., Roustan, J. L., Remize, F., Barre, P. & Dequin, S. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast* **13**, 783–793 (1997).
81. Smith, B. D. & Divol, B. *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. *Food Microbiol.* **59**, 161–175 (2016).
82. Blomqvist, J., Eberhard, T., Schnürer, J. & Passoth, V. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 1487–1497 (2010).
83. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2259–2266 (2008).
84. Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T. & Vicente, A. A. Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 1937–1949 (2014).
85. Tashiro, Y., Desai, S. H. & Atsumi, S. Two-dimensional isobutyl acetate production pathways to improve carbon yield. *Nat. Commun.* **6**, 1–9 (2015).
86. Romano, P. & Suzzi, G. Acetoin production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol Lett* **108**, 23–26 (1993).
87. Perpète, P., Duthoit, O., De Maeyer, S., Imray, L., Lawton, A. I., Stavropoulos, K. E., Gitonga, V. W., Hewlins, M. J. E. & Richard Dickinson, J. Methionine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **6**, 48–56 (2006).
88. Brandam, C., Castro-Martínez, C., Délia, M. L., Ramón-Portugal, F. & Strehaiano, P. Effect of temperature on *Brettanomyces bruxellensis*: Metabolic and kinetic aspects. *Can. J. Microbiol.* **54**, 11–18 (2008).

89. Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M. & Mas, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* **80**, 47–53 (2003).
90. Walsh, R. M. & Martin, P. A. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces Uvarum* in a temperature gradient incubator. *J. Inst. Brew.* **83**, 169–172 (1977).
91. Licker, J. L., Acree, T. E. & Henick-Kling, T. What Is 'Brett' (*Brettanomyces*) Flavor?: A Preliminary Investigation. *ACS Symp. Ser.* **714**, 96–115 (1998).
92. Gao, C. & Fleet, G. H. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Bacteriol.* **65**, 405–409 (1988).
93. Bassi, A. P. G., Silva, J. C. G. da, Reis, V. R. & Ceccato-Antonini, S. R. Effects of single and combined cell treatments based on low pH and high concentrations of ethanol on the growth and fermentation of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 1661–1676 (2013).
94. Romero, L. E. & Cantero, D. Evaluation of ethanol evaporation losses in acetic acid fermentations. *Bioprocess Eng.* **18**, 289–291 (1998).
95. De Wulf, O. & Thonart, P. Bioconversion of vanillin to vanillyl alcohol in a two-phase reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **20**, 165–180 (1989).
96. Viegas, C. A., Rosa, M. F., Correia, I. S. & Novais, J. M. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 21–28 (1989).
97. Saerens, S. M. G., Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Voet, A. R. D., Van Dijck, P., Delvaux, F. R. & Thevelein, J. M. The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J. Biol. Chem.* **281**, 4446–4456. (2006).
98. Vanbeneden, N., Van Roey, T., Willems, F., Delvaux, F. & Delvaux, F. R. Release of phenolic flavour precursors during wort production: Influence of process parameters and grist composition on ferulic acid release during brewing. *Food Chem.* **111**, 83–91 (2008).
99. Carrascosa, J. M., Viguera, M. D., Núñez de Castro, I. & Scheffers, W. A. Metabolism of acetaldehyde and Custers effect in the yeast - *Brettanomyces abstinens*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **47**, 209–215 (1981).
100. Ferreira, I. M. P. L. V. O. Beer carbohydrates. in *Beer in Health and Disease Prevention* (2008).
101. Hirst, M. B. & Richter, C. L. Review of aroma formation through metabolic pathways of

- Saccharomyces cerevisiae* in beverage fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* **67**, 361–370 (2016).
102. Liu, Z. L., Slininger, P. J. & Gorsich, S. W. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. in *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* (2005).
103. Eblinger, H. M. & Narziß, L. *Beer*. **1**, (2004).
104. Takoi, K., Koie, K., Itoga, Y., Katayama, Y., Shimase, M., Nakayama, Y. & Watari, J. Biotransformation of hop-derived monoterpene alcohols by lager yeast and their contribution to the flavor of hopped beer. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 5050–5058 (2010).
105. Takoi, K., Itoga, Y., Koie, K., Kosugi, T., Shimase, M., Katayama, Y., Nakayama, Y. & Watari, J. The contribution of geraniol metabolism to the citrus flavour of beer: Synergy of geraniol and  $\beta$ -citronellol under coexistence with excess linalool. *J. Inst. Brew.* **116**, 251–260 (2010).
106. Nelson, D. & Cox, M. *Lehninger. Principles of Biochemistry*. Wroth, New York (2000).
107. Jones, M. & Pierce, J. S. Absorption of amino acids in wort by yeasts. *J. Inst. Brew.* **70**, 307–315 (1964).
108. Lekkas, C., Stewart, G. G., Hill, A., Taidi, B. & Hodgson, J. The Importance of Free Amino Nitrogen in Wort and Beer. *Tech. Quarterly-Master Brew. Assoc. Am.* **42**, 113–116 (2005).
109. Crauwels, S., Van Opstaele, F., Jaskula-Goiris, B., Steensels, J., Verreth, C., Bosmans, L., Paulussen, C., Herrera-Malaver, B., de Jonge, R., De Clippeleer, J., Marchal, K., De Samblanx, G., Willems, K. A., Verstrepen, K. J., Aerts, G. & Lievens, B. Fermentation assays reveal differences in sugar and (off-) flavor metabolism across different *Brettanomyces bruxellensis* strains. *FEMS Yeast Res.* **17**, (2017).