V SEMANA DE FERMENTAÇÃO JAYME ROCHA DE ALMEIDA

Maio de 2011

Dorna de Fermentação
A Microbiota de um sistema artificial

Maria da Graça S. Andrietta

CPQBA/UNICAMP

- *Visão Clássica*
  - *A dorna como um sistema estático (até 1990)*

- *Visão Atualizada*
  - *Dorna como um sistema dinâmico*
  - *Um ecossistema*

Visão Clássica

- ✓ Dorna constituída pela levedura de processo e bactérias contaminantes.

A levedura fermenta, e as bactérias contaminantes consomem o açúcar:

- ✓ Queda do rendimento e;
- ✓ Produção de metabólitos .

V Semana de fermentação Jayme Rocha de Almeida Maio 2011
Fermentação sob a óptica clássica

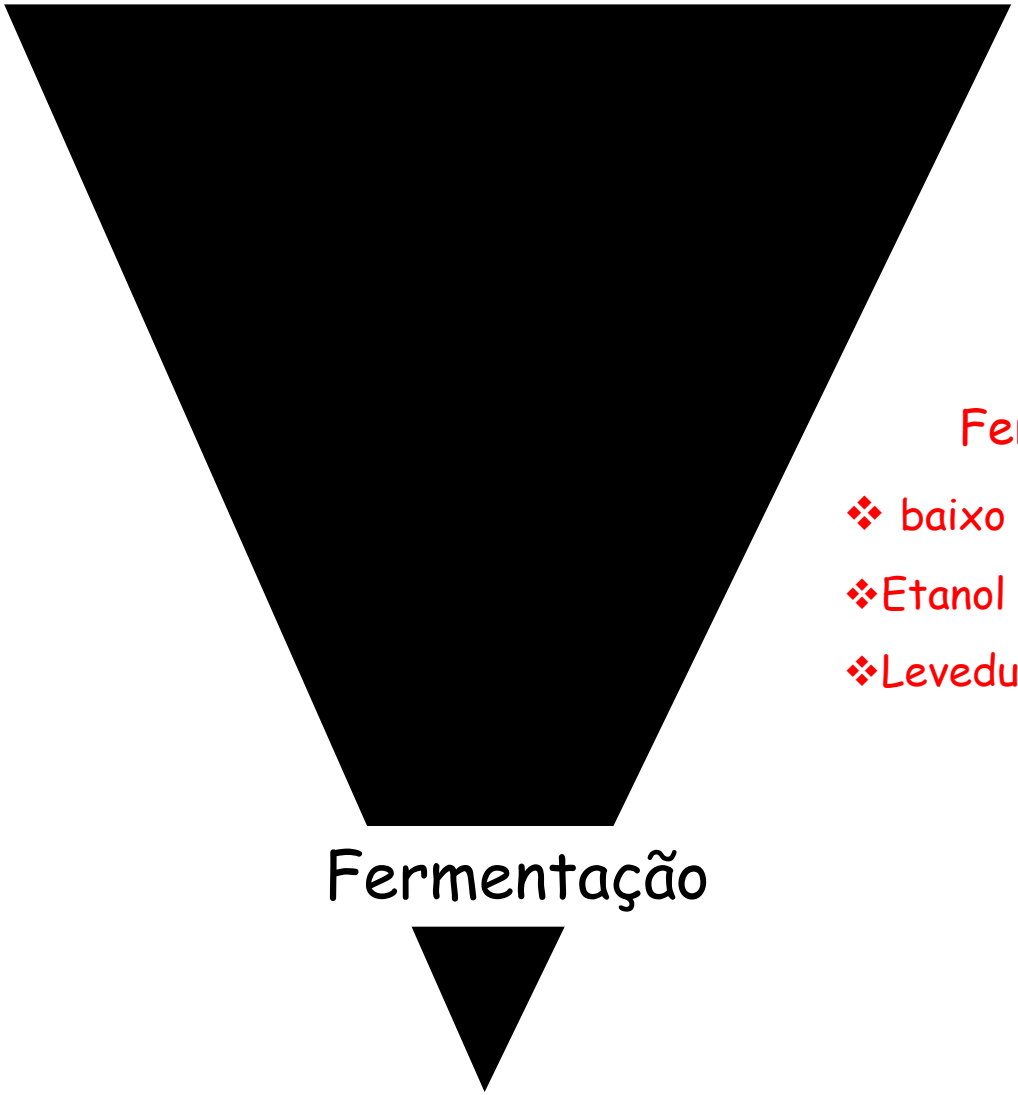
A microbiologia do processo de produção de açúcar e álcool deve ser dividida em 02 segmentos

1 – Matéria Prima; e

2 – Processo de Produção de etanol – fermentação .

A Microbiota Bacteriana

Matéria Prima



Fermentação

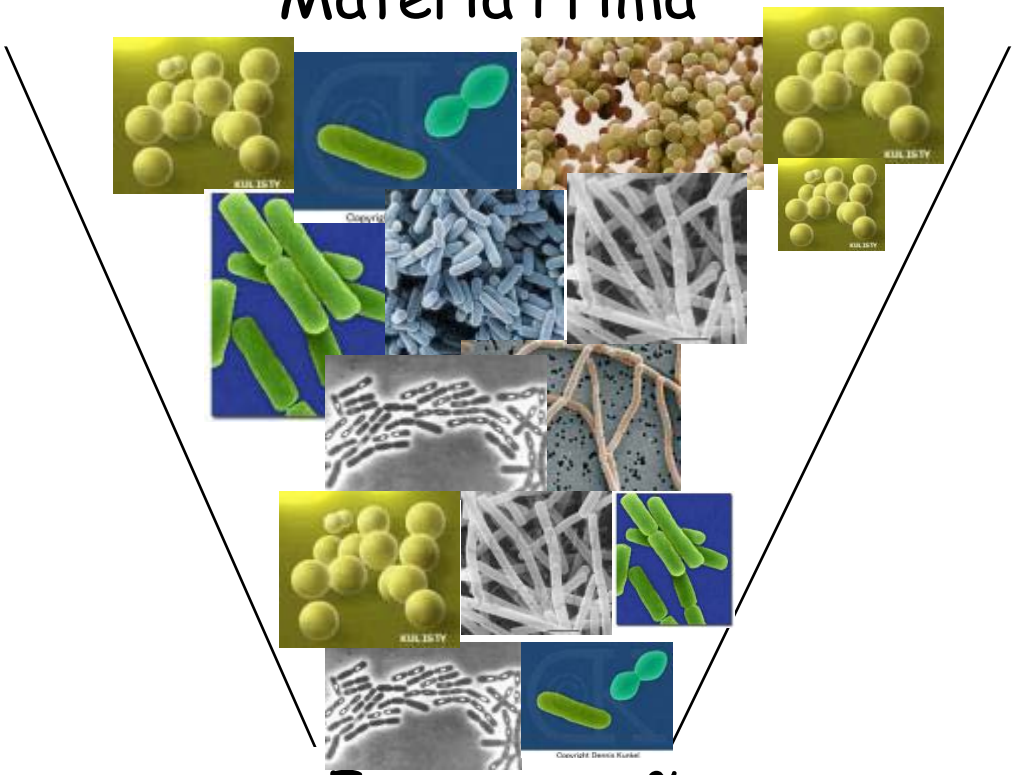
Matéria Prima

- pH ótimo
- Temperatura ideal
- Disponibilidade de nutriente
- Sem inibidores (etanol,ácido etc..)

Fermentação

- baixo pH
- Etanol e ácido no meio
- Levedura de processo

Matéria Prima



Fermentação

Matéria Prima

- ✓ A carga microbiana da matéria prima é variada sendo função principalmente da origem da mesma.

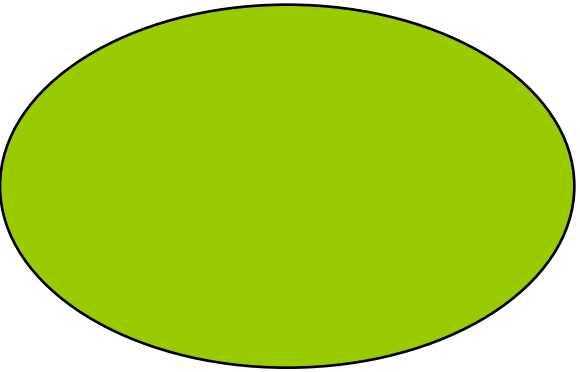
- ✓ Ela pode variar, principalmente em número, em função do tipo de operação (prática agrícolas, logística de transporte. etc...)

Matéria Prima

FONTE	BACTÉRIAS			
	Cocos Gram$^+$	**Bastonete esporulado Gram$^+$**	**Bastonete não esporulado Gram$^+$**	**Bastonete Gram $^-$**
PERDERSON & HUCKER (1946)	*Leuconostoc mesenteroides ; Micrococcus sp*	*Bacillus sp*		*Escherichia coli*
DUCAN & COLMER (1946)				*Escherichia coli; Aerobacter aerogenes; A. cloacae;*
BEVAN & BONDI (1971)	*Leuconostoc sp;*	*Bacillus cereus*		*Pseudomonas*
TILBURY (1970)				*Pseudomonas, Xanthomonas*
TILBURY (1975)	*Leuconostoc mesenteroides; L. dextranicum; L. paramesenteroides;*		*Lactobacillus plantarum; L. casei*	
LIMA (1974)	*Leuconostoc mesenteroides ; L. dextranicum; L. citrovorum*			*Pseudomonas, Aerobacter aerogenes*
SILVA (1988)	*Leuconostoc mesenteroides*	*Bacillus sp*	*Lactobacillus plantarum; L brevis; L. fermentum; L. confuses; L. brevis; L. viridescens; L. . bucheneri*	*Enterobacteriaceae (família)*
MAEDA (1997)				*Acetobacter*

Fermentação

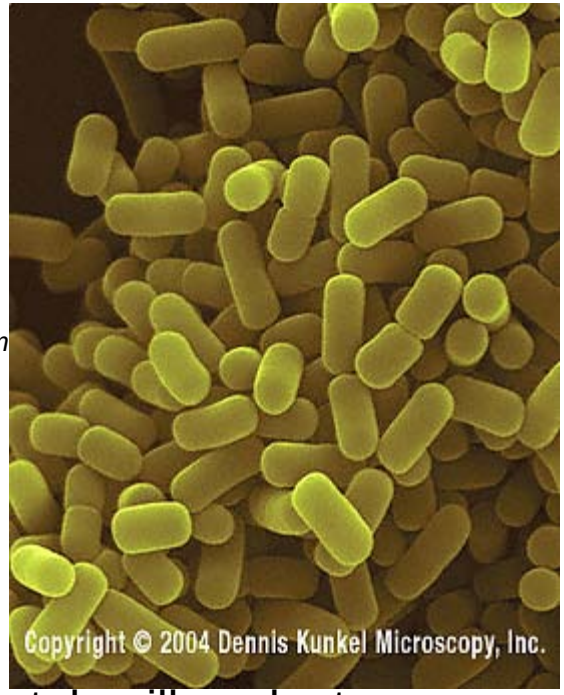
- ✓Bastonetes esporulados Gram +
- ✓Bastonetes não esporulados Gram+



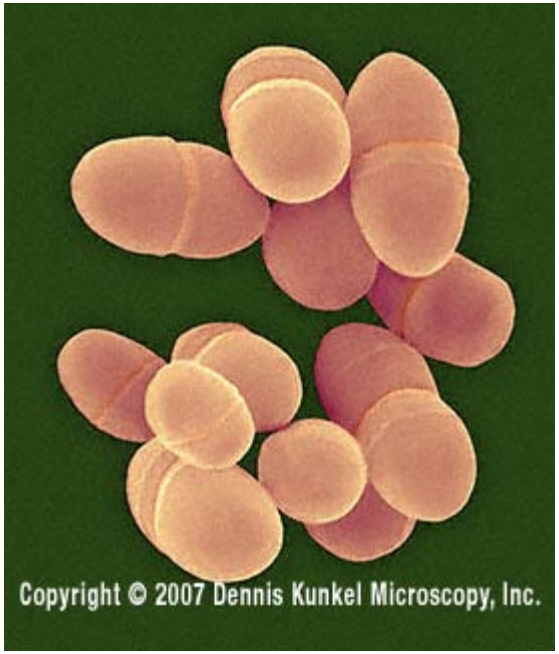
Fermentação

GALLO (1989)	**GRAM $^{+}$**			**GRAM $^{-}$**
Porcentagem de isolados (total de 334 linhagens)	98,61%			1,39%
	Bastonetes Gram^{+} esporulados	**Bastonetes Gram^{+} não esporulados**	**Cocos Gram^{+}**	**Bastonete Gram $^{-}$**
Porcentagem de isolados (total de 334 linhagens)	26,58%	**59,75%**	12,28%	1,39%
Representantes Isolados	*B. coagulans* *B.stearothermophilus* *B. megaterium* *B. brevis* *B. lentus* *B. pasteurii*	*L. plantarum* *L. animalis* *L fermentum* *L. helveticus* *L. buchneri* *L. acidophilus* *L. vitulinus* *L. viridescens* *L. amylophilus* *L. agilis* *L. reuteri* *L. delbrueckii* *L. murinus* *L. coryniformis* *L. sake*	*Staphylococcus* *Streptococcus* *Pediococcus* *Micrococcus*	Enterobactérias

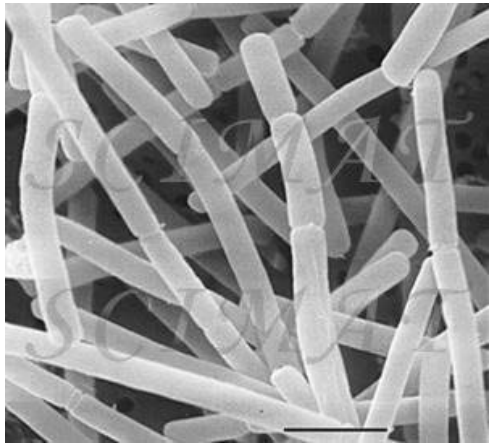
Lactobacillus buchneri



Lactobacillus plantarum

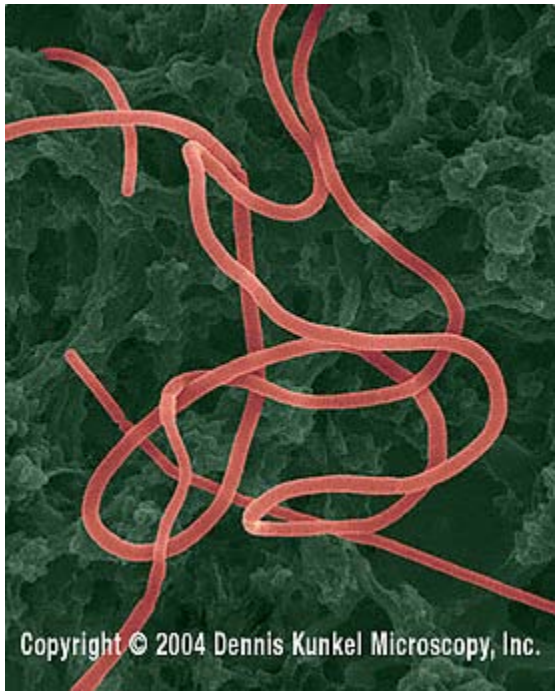


Lactobacillus lactis

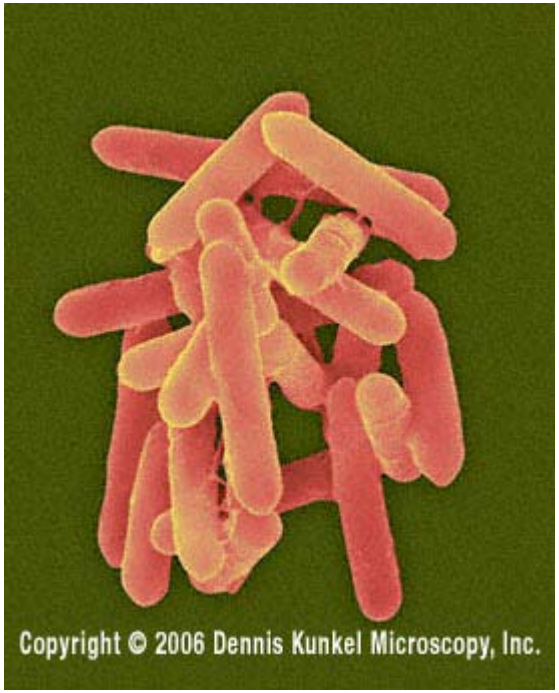


Lactobacillus delbrueckii

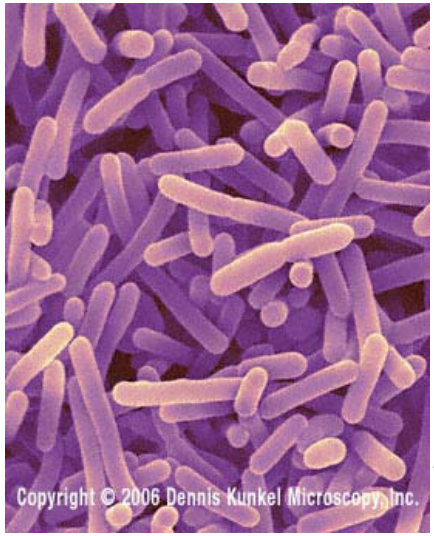
Lactobacillus fermentum



Bacillus megaterium



Bacillus subtilis



Bifidobacterium

Skinner et al (2004)
Avaliação da contaminação bacteriana na produção de etanol a partir de milho

Avaliação de 03 plantas que produzem etanol a partir de milho.

✓Os níveis de contaminação variaram de 10^6 a 10^8;

✓Concluem que a contaminação bacteriana atua de forma endemica e não foram capazes de associar nenhum tipo de oscilação no processo em função dos níveis de contaminação;

✓

✓Concluem que mesmo com esses níveis de contaminação, todas as fermentações foram consideradas saudáveis

•

•Predomínio de *Lactobacillus - 51, 38 e 77%*

PREJUIZOS AO PROCESSO ASSOCIADO A PRESENÇA DE CONTAMINAÇÃO???

O QUE SE AFIRMA:

Que a contaminação afeta o rendimento fermentativo

MAS:

Os trabalhos são contraditórios e trazem dados que variam de 10 a 90%

Fonte	Perdas
Serra *et al* (1979)	15%
Amorim *et al* (1981)	55%
Alterthum *et al* (1984)	14-90%
Cruz *et al* (1985)	40%
Kha & Hoq (1990)	11,4%

Problemas CONCRETOS causados pela contaminação: Operacionais

Fábrica de Açúcar

- ✓ *Espessamento do caldo em função da goma formada pelos microrganismos presentes na matéria prima. Isso acarreta problemas na produção da sacarose*

Nessa etapa do processo a presença de <u>Leuconostoc</u> merece destaque

Problemas CONCRETOS causados pela contaminação:
Operacionais

Fermentação

- ✓ ***Floculação do fermento pela presença de alguns tipos específicos de Lactobacillus.***

A FLOCULAÇÃO DO FERMENTO ACARRETA PROBLEMAS NO QUE DIZ RESPEITO A:

- ✓ ***Operação de centrifuga***
- ✓ ***Diminuição da área de contato do açúcar com o microrganismo (perda de produtividade)***

Alcarde 2011 -Testou a habilidade de 5 espécies de *Lactobacillus* e 2 de *Bacillus* em promover a floculação em 2 linhagens de leveduras de processo (PE2 e VR1)

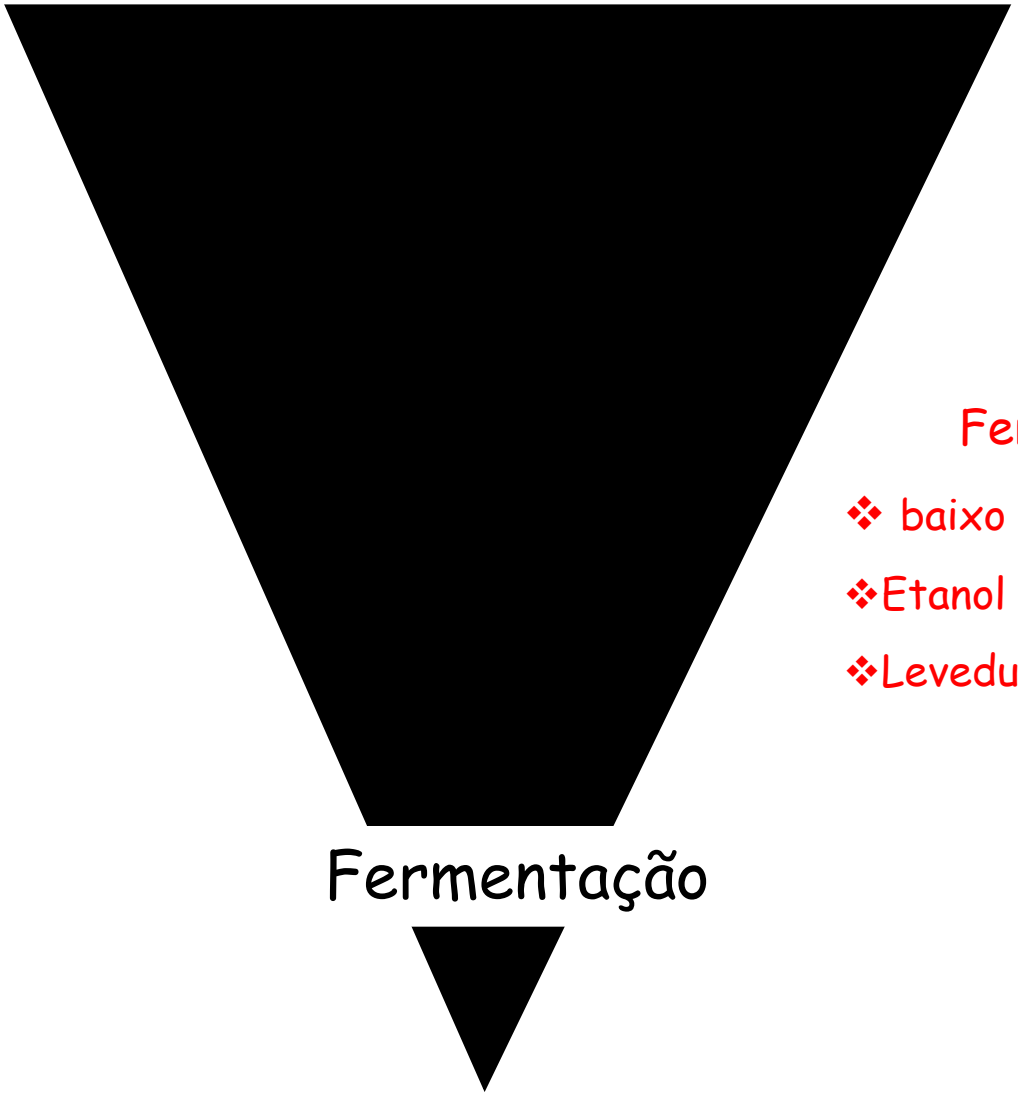
✓As espécies de Lactobacillus :***plantarum***, ***fructivorans***, ***fermentum***, ***buchneri*** e ***fructosus*** são capazes de provocar a floculação das 02 linhagens de leveduras estudadas;

✓Para que essa floculação ocorra se faz necessário uma relação levedura/bactéria, a qual varia em função da espécie de *Lactobacillus;*

✓Os Bacillus estudados não apresentam a capacidade da provocar a floculação do fermento.

A Microbiota Fúngica (Leveduras)

Matéria Prima



Fermentação

Matéria Prima

- pH ótimo
- Temperatura ideal
- Disponibilidade de nutriente
- Sem inibidores (etanol,ácido etc..)

Fermentação

- baixo pH
- Etanol e ácido no meio
- Levedura de processo

Cabrini & Gallo (1999)

Representantes	Caldo Primário (%)	Mosto (%)	Leite (%)
S. cerevisae/S. uvarium	12	53,86	41,18
S. coreanus	12	15,38	5,88
S. Baynus	4	Não detectado	35,3
S. pretorienses	Não detectado	Não detectado	5,88
Candida entomophila	60	11,55	5,88
Candida membranaefaciens	Não detectado	3,84	Não detectado
Candida rhagii	Não detectado	Não detectado	5,88
Candida rugosa	4	Não detectado	Não detectado
Rhodotorula glutinis	Não detectado	3,84	Não detectado
S. Chevalieri	Não detectado	7,69	Não detectado
Torulopsis datilla	8	3,84	Não detectado

Leveduras associadas aos processos fermentativos:

Saccharomyces sensu stricto – Leveduras do gênero *Saccharomyces* vinculadas a industria da fermentação

A partir de 2000

S. cerevisae, S. bayanus, S. pastoriamus, S. paradoxus, S. cariocanus, S. kurdiavzevii e S. mikatae.

A microbiota do processo de fermentação já esta bem elucidado.

Agente da fermentação - Leveduras pertencentes ao grupo *Saccharomyces sensu stricto*

Contaminantes: Bactérias do ácido lático e *Bacillus*

Porque ocorrem distorções nas avaliações da flora TIPICA do processo da fermentação

Em relação a bactérias:

1 – Momento da amostragem,

2 – Condução de análise – GRAM.

Em relação as leveduras:

1 – Falta de informação,

2 – Momento da amostragem.

Semana de fermentação Jayme Rocha de Almeida
Maio 2011
Fermentação sob a óptica Atualizada

Se faz necessário entender se tratar de um processo dinâmico, mas com propriedades de seleção natural;

- ✓ Trata-se de um ecossistema artificial

Assim deve- se levar em conta:

1 - Fatores abióticos: instalações, temperatura etc...

2 – Comportamento das leveduras

3 - As interações entre as diferentes populações (leveduras e bactérias) – antagonismos, sinergismo,

4 - A influência da matéria prima, na ecologia da fermentação alcoólica

- ✓ Sua composição nutricional (intrínseco + extrínseco)
- ✓ Inibidores (ácidos +HMF + fenois)
- ✓ Sua carga microbiana (determinante) .

Estudo de caso com fermentação de vinho (Fleet, 1999)

1 - Fatores abióticos

1.1. Instalações: Hoje se sabe que a maioria das leveduras que dominam as fermentações de vinho são provenientes dos equipamentos e não da propriamente da matéria prima.

1.2. Temperatura: A tolerância ao etanol é uma função da temperatura do processo, assim fermentações conduzidas à temperaturas menores podem selecionar linhagens de leveduras que quando expostas a temperaturas maiores não apresentam o desempenho esperado.

2. Comportamento das leveduras

2.1 – Instinto de ocupação do espaço físico (dorna)

Existe um "comportamento" na população de leveduras, mesmo que sejam de espécies diferentes

Início da safra – Levedura "povoa" a dorna, taxa de brotamento em torno de 20%, após atingir determinada concentração (1 a 5 $x10^8$ células/ml) a taxa de brotamento se estabiliza em torno de 10-13%

Fenômeno do "QUORUM SENSING"

2. 2 - Floculação e Quorum Sensing (QS)

Floculação – Características social que depende da cooperação de um grupo de células em determinado tempo.Acontece com as leveduras em uma situação de stress (alto teor alcoólico/temperatura/produtos inibidores etc...). Existe uma sinalização entre as leveduras para que isso ocorra.

Moléculas que funcionam como sinalizadores em leveduras associados ao fenômeno de floculação parecem ser: o próprio etanol associado com outra molécula triptofol.

O fenômeno da floculação esta intimamente ligado ao instinto de preservação da população.

Associado a presença do genes conhecidos como FLO.

Um desses genes, o FLO1 é conhecido como um "GREENBEARD" gene. Ele promove a cooperação entre as leveduras *Saccharomyces* de maneira a manter a preservação da população.

Esse gene é expresso quando as leveduras se encontram em situação de stress.

2.3- Leveduras killer

São leveduras capazes de produzir uma toxina, a qual tem a capacidade de matar outras leveduras.

São várias os gêneros leveduras capazes de produzir essas toxinas, a qual será diferente de levedura para levedura.

Table 1. Main characteristics of some investigated yeast killer toxins (Young, 1987; Magliani *et al.*, 1997; Marquina *et al.*, 2002; Schmitt & Breinig, 2002; Buzzini *et al.*, 2004a; Golubev, 2006)

Species	Strain	Killer toxin label	Genetic basis	Toxin size (kDa)	Primary receptor	Mechanism of action
Debaryomyces hansenii	CYC 1021		Chromosomal	23	β-(1,6)-glucan	
Hanseniaspora uvarum	470		dsRNA	18	β-(1,6)-glucan	
Kluyveromyces marxianus	NCYC 587	K6		42		
Kluyveromyces lactis	AWJ137		dsDNA	156	Chitin	Cell cycle arrest in G1
Kluyveromyces waltii	IFO 1666T			> 10		
Pichia acaciae	NRRL Y-18665		dsDNA	187	Chitin	Cell cycle arrest in G1, chitinase activity
Pichia anomala	WC 65	WC 65	Chromosomal	83	Cell wall β-glucan	
Pichia farinosa	KK1	SMKT	Chromosomal	14		Increase membrane permeability to ions
Pichia inositovora	NRRL Y-18709		dsDNA	> 100		
Pichia kluyveri	1002		Chromosomal	19		Formation of ion channel
Pichia membranifaciens	CYC 1106		Chromosomal	18	β-(1,6)-glucan	Formation of ion channel
Saccharomyces cerevisiae	KL88	K1	dsRNA	19	β-(1,6)-glucan	Formation of ion channel, activation of TOK1
Saccharomyces cerevisiae	NCYC 713	K2	dsRNA	21.5	β-(1,6)-glucan	Increase membrane permeability to ions
Saccharomyces cerevisiae	CBS 8112	K28	dsRNA	21	Mannoproteins	Cell cycle arrest in G1/S, cell apoptosis
Saccharomyces cerevisiae	111	KHR		20.0		Increase membrane permeability to ions
Saccharomyces cerevisiae	115	KHS		75.0		Increase membrane permeability to ions
Schwannyomyces occidentalis	ATCC 44252		Chromosomal	12.3	Mannoproteins	Plasma membrane damage
Williopsis mrakii	IFO 0895	HM-1	Chromosomal	10.7	Cell wall β-glucan	Inhibition of β-(1,3)-glucan synthesis
Williopsis mrakii	NCYC 500	K-500		1.8–5.0	Cell wall β-glucan	Increase membrane permeability to ions
Williopsis saturnus	DBVPG 4561	KT4561		62.0		
Williopsis saturnus	IFO 0117	HYI	Chromosomal	9.5		
Zygosaccharomyces bailii	412	KT412	dsRNA	10	Mannoproteins	

© 2007 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

Aplicabilidade de leveduras "killer" na fermentação alcoólica

Uma levedura "killer" pode impedir a permanência de leveduras sensíveis no processo.

Assim as leveduras que apresentam fator "killer positivo" quando utilizadas como inóculo podem impedir o domínio de uma outra levedura??

Sabemos pouco sobre esse aspecto quanto as nossas leveduras??

3. As interações entre as diferentes populações (leveduras e bactérias)

3.1. Consumo de açúcar pelas bactérias ??????

			Bacteria					
Antiobiotic	Dose (ppm)	Time, (h)	*L. plantarum*	*L. fermentum*	*L. buchneri*	*B. coagulans*	*B. megaterium*	*B. subtilis*
Control	0	0	4.98	5.52	5.20	4.70	4.76	4.65
		6	6.38	5.84	6.11	5.00	4.38	6.50
		24	8.32	8.04	8.36	7.71	6.95	6.20
		48	8.26	8.04	3.26	8.28	5.76	7.5

	L. plantarum	*L. fermentum*	*L. buchneri**	*B. coagulans*	*B. megaterium*	*B. subtilis*
Sugar Consumption, (g/l)	3.30	3.92	3.81	5.76	2.73	14.37

* 24 hours

Stroppa et al, 2000

3. As interações entre as diferentes populações (leveduras e bactérias)

3.2. Ação das bacteriocinas – Compostos tóxicos que são produzidas por bactérias, semelhante ao "killer" para as leveduras. Esses compostos atuam sobre outras bactérias. Alguns estudos apontam para que esses compostos também podem ter ação sobre as leveduras??

Esses compostos são produzidas pelas bactérias láticas

4. A influência da matéria prima, no ecologia de fermentação alcoólica

A matéria prima, associada as condições de cada um dos processos é que será o determinante na seleção da microbiota das dornas de fermentação. Assim cada processo deverá ser avaliado de forma individual quanto a sua população.

- ✓Considerações
  - ✓Média de dias de safra - 230 dias/reciclo de células
  - ✓Matéria prima vinculada a logística de produção

Em relação as bactérias

Não se faz acompanhamento em relação a ecologia desses microrganismos, o que se sabe que as condições de processo selecionam as bactérias Gram positivas e basicamente as relacionadas com a produção de acido lático.

Gomes (2008) – As bactérias heterofermentativa (ácido lático + etanol + CO2) são as mais tolerantes ao ambiente das dornas que as homofermentativas (ácido latico)

Em relação as Leveduras

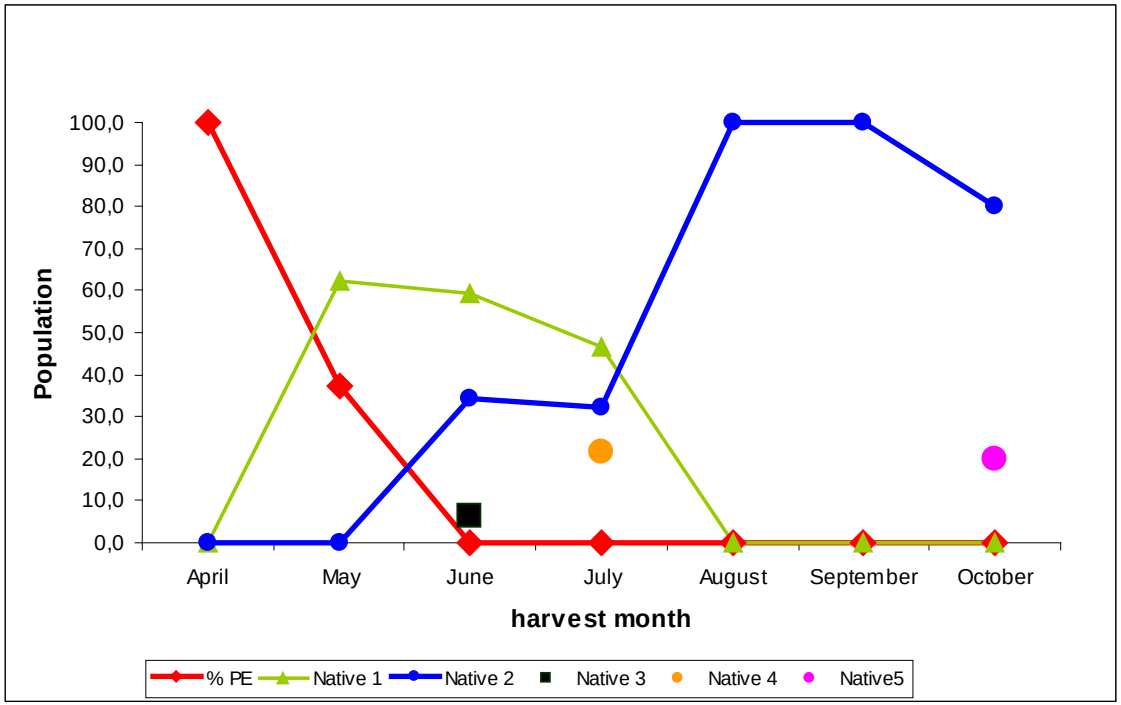
A biologia molecular permitiu o entendimento da dinâmica de leveduras nas dornas de fermentação. Com esse advento foi possível:

A) Entender que, com rara exceções ,a levedura que inicia a safra não é a que permanece durante todo o período de safra;

B) Entender que, com raras exceções, a população de leveduras nas dornas de fermentação não é constituída por uma única linhagem de levedura;e

C) Que a substituição da levedura utilizada como inóculo, é feita rapidamente e se as condições de operação são adequadas essa substituição é feita de maneira silenciosa.

Os dados a seguir são foram coletados na safra de 2010 de unidades industrias, sem relato de problemas operacionais



Abril – Apenas PE2 nas dornas

Maio – 62,5% de uma Nativa (Nativa 1) + PE

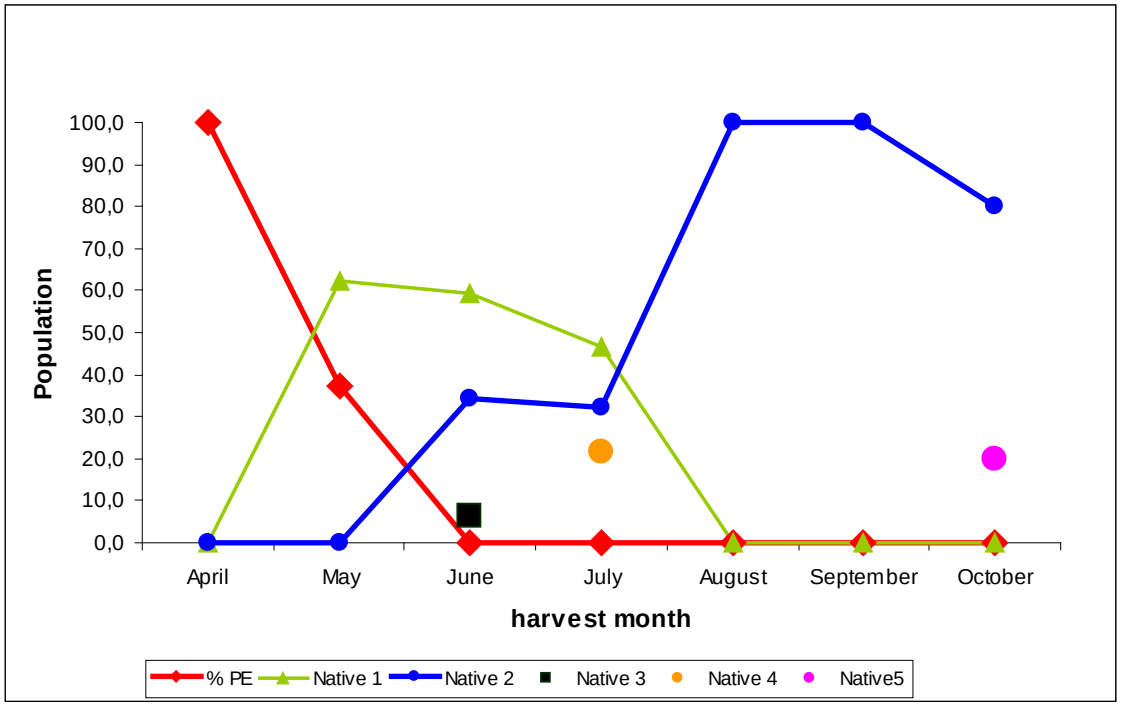
Junho – Nativa 1 (59,3%) + Nativa 2 + Nativa 3

Julho – Nativa 1 (46,4%) + Nativa 2 + Nativa 4

Agosto – Nativa 2 domina o processo

Setembro – Nativa 2 domina o processo

Outubro – Nativa 2 (80%) + Nativa 5



Porque a Nativa 2 não apareceu no começo da safra?

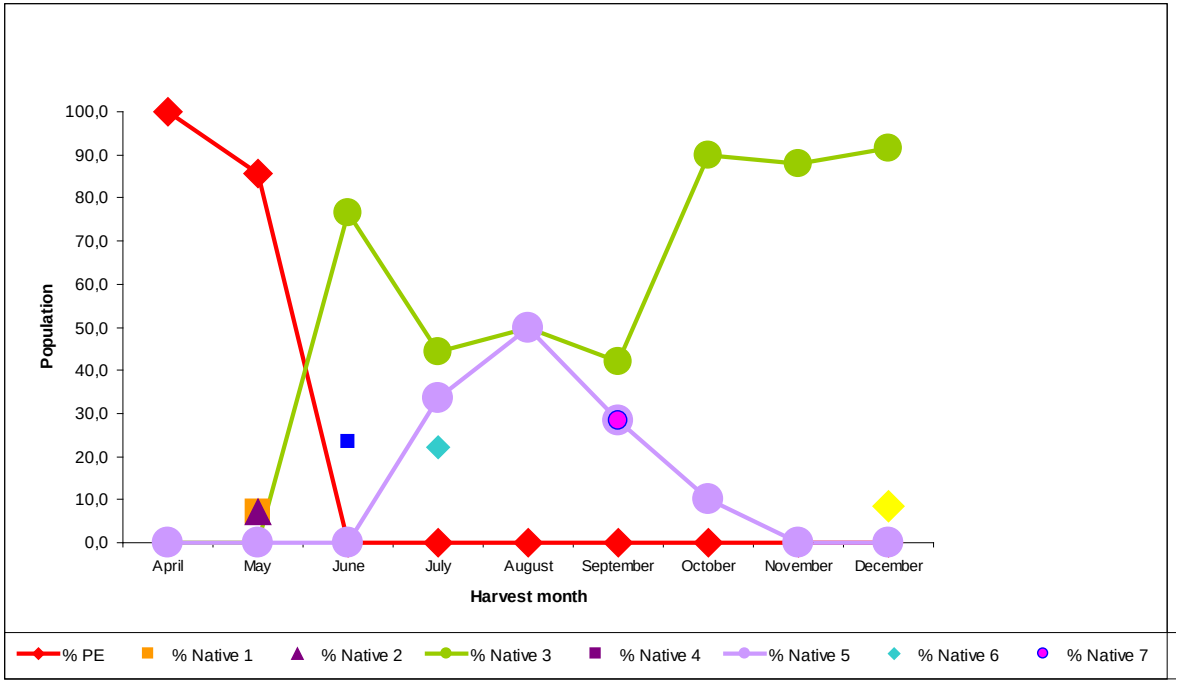
Porque essa levedura levou 60 dias para dominar o processo?

Como ela consegui dominar por 60 dias o processo?

Porque a Nativa 5 só aparece no final da safra

A Nativa 5 conseguiria eliminar a Nativa 2?

Porque as leveduras 3 e 4 aparecem em uma única coleta e são eliminadas do processo ?



Abril – PE2

Maio – 85,6% de PE2 + Nativa 1 + Nativa 2

Junho – Nativa 3 (76,5%) e Nativa 4

Julho – 44% da Nativa 3 + Nativa 5 e Nativa 6

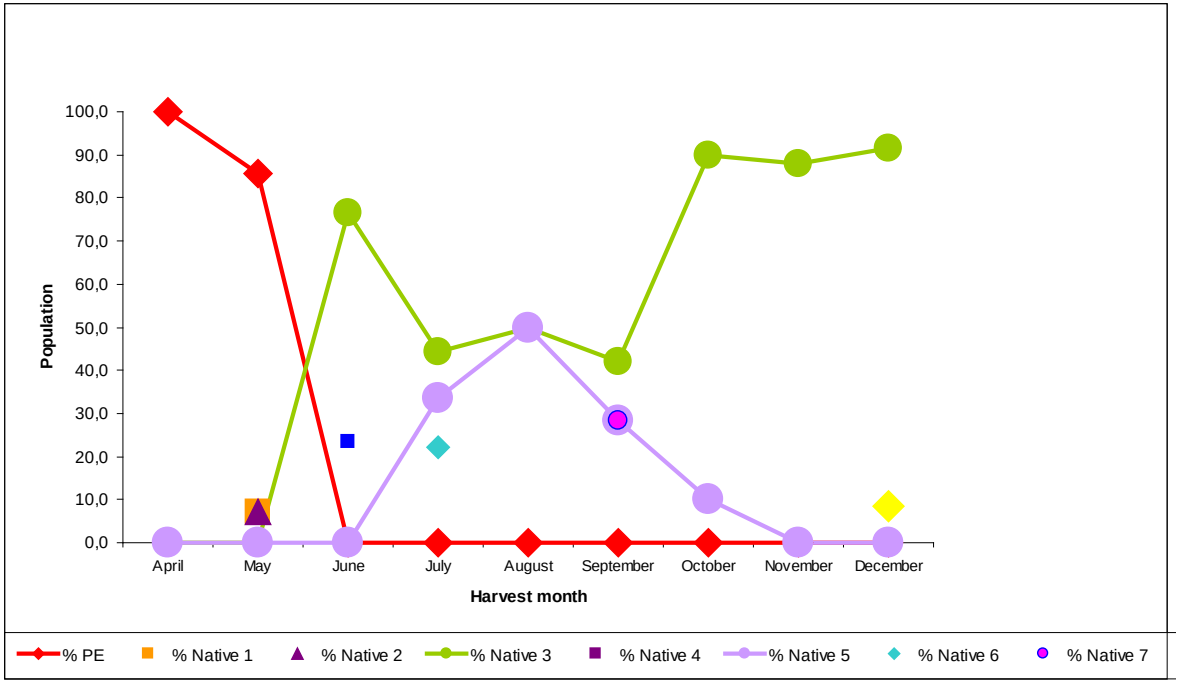
Agosto - Nativa 3 (50%) e Nativa 5 (50%)

Setembro – Nativa 3 (35%) + Nativa 5 (15%) e Nativa 7

Outubro – Nativa 3 (90%) + Nativa 5

Novembro – Nativa 3 (88%) e Nativa 5

Dezembro – Nativa 3 (91,6%) e Nativa 8



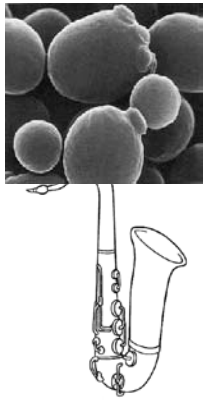
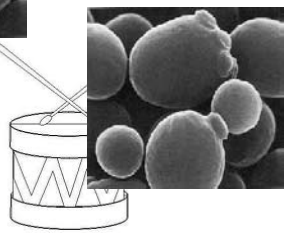
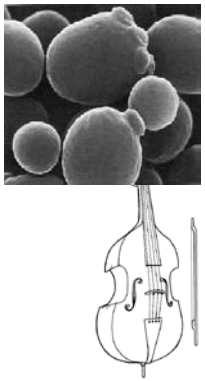
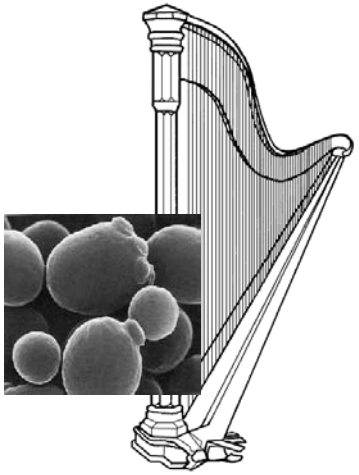
Porque a Nativa 3 não estava presente no 60 dias de safra?

Será a Nativa 3 a responsável pela eliminação da PE2?

Porque durante um período ela não dominou o processo (Nativa 5 + Nativa 3)

Porque em nenhum momento ela foi capaz de dominar as dornas com 100% da população?

Considerações finais

A dorna deve ser observado como um ecossistema dinâmico

a) Opera em média 200 dias/safra;
b) Recebe um matéria prima não padronizada;
c) Recebe uma carga microbiana, contendo leveduras, as quais podem dominar, de forma rápida o processo.