



**UA Ig**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Dissertação em Mestrado de Biologia Molecular e Microbiana

**Produção de um agente de controlo  
biológico recorrendo a subprodutos da  
indústria agro-alimentar**

Cristiana do Couto Pereira Maia

Março de 2011



**UAIG**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Maria Emília Lima Costa

Doutora Carla Nunes

Março 2011

“There is grandeur in this view of life, with its several powers,  
having been originally breathed into a few forms or into one; and that, whilst  
this planet has gone cycling on according to the fixed  
law of gravity, from so simple a beginning endless forms  
most beautiful and most wonderful have been, and are being, evolved”

Charles Darwin

**À minha mãe**

# Agradecimentos

Às minhas orientadoras por me terem aceite como orientanda e pelo apoio prestado, dúvidas esclarecidas e conhecimento transmitido ao longo de todo o trabalho.

À Teresa, por todo o apoio dado durante a realização do trabalho experimental, pela boa disposição e bons momentos passados no laboratório.

Ao engenheiro Martins, que já não se encontra entre nós, pelo incansável esforço e ajuda na filtração do licor.

Às minhas colegas de laboratório que entretanto se tornaram amigas.

Aos meus amigos, antigos e mais recentes, pelos bons momentos, confiança e apoio.

À Liliana, principal encorajadora da minha vinda para cá, pela amizade de sempre.

Aos meus pais, sem eles não seria possível tudo o que alcancei até agora.

# Resumo

Este trabalho incidiu na produção de um agente de controlo biológico usando como meio de cultura subprodutos da indústria agro-alimentar.

O combate às perdas pós-colheita é feito maioritariamente com recurso a fungicidas sintéticos, no entanto, a preocupação crescente relacionada com o uso destes produtos, quer a nível ambiental, quer de saúde, levou ao desenvolvimento de métodos alternativos no combate a estas perdas. O controlo biológico, mediante o uso de microrganismos antagonistas é um dos métodos que tem levado a resultados promissores.

O microrganismo estudado como potencial agente de controlo biológico foi a levedura PBC-2 e os subprodutos usados foram o licor de laranja e extracto de alfarroba.

Foi feita a optimização do processo de extracção do licor com o objectivo de se obter um produto final compatível com o uso deste subproduto como fonte de carbono no meio de cultura.

Foram realizados ensaios em Erlenmeyer para testar a capacidade da levedura PBC-2 em usar os açúcares contidos no licor de laranja e numa mistura de licor de laranja e extracto de alfarroba como fonte de carbono. Foram testadas variadas concentrações de açúcares no licor (12,5, 25,0, 37,5 e 50,0 g/L) e variados rácios na mistura de licor e extracto de alfarroba.

Verificou-se a capacidade da levedura em usar os açúcares como fonte de carbono, obtendo-se uma maior produção de biomassa com a concentração de açúcares mais elevada (50 g/L). No que diz respeito aos ensaios com a mistura de subprodutos, o rácio mais favorável para a produção de biomassa foi o de 12,5 g/L de extracto de alfarroba e 37,5 g/L de licor de laranja.

Nos ensaios realizados em reactor biológico, foram testadas duas concentrações de açúcar, presentes no licor de laranja, diferentes, 50 e 70 g/L e ainda o efeito do vector n-dodecano. A concentração mais eficaz foi a de 50 g/L, tendo-se verificado ainda, que a adição do vector n-dodecano permite uma maior produção de biomassa.

Foram realizados ensaios de eficácia em peras e maçãs. Os melhores resultados foram obtidos em maçãs, onde o efeito da levedura antagonista permitiu obter uma redução significativa de 47 e 54% nos parâmetros estudados de incidência e severidade, respectivamente.

# Abstract

This work was based on the production of a biocontrol agent using industrial by-products.

The battle against postharvest losses is mostly done with the use of synthetic fungicides, however, the growing concern regarding the use of these products led to the development of alternative methods to combat those losses. Biological control using antagonistic microorganisms is one of the methods with promising results.

The microorganism studied as a potential biocontrol agent was the yeast PBC-2 and the by-products used were orange liquor and carob extract.

The optimization of the extraction of orange liquor was conducted to achieve a final product consistent with its use as carbon source in fermentation medium.

In order to evaluate the yeast PBC-2 ability of using sugars in orange liquor and in the mixture of liquor and carob extract as carbon source, studies were carried out in shake flasks. Different conditions were studied. In the case of the studies using only orange liquor as carbon source, four different concentrations of sugars were tested (12.5, 25.0, 37.5 and 50.0 g/L), while in the studies of the mixture three different ratios were tested. The ability of the yeast PBC-2 to use the sugars in the liquor as carbon source was confirmed and the higher biomass production was achieved with the higher sugar concentration used (50.0 g/L). Regarding the studies using the mixture of by-products, the most favorable ratio for biomass production was 12.5 g/L of carob extract/37.5 g/L orange liquor.

Assays were conducted in a mechanically stirred tank reactor. Two different sugar concentrations were studied, 50.0 and 70.0 g/L and also the effect of n-dodecane.

The most favorable concentration for production of the biocontrol agent was 50.0 g/L. The addition of n-dodecane favored biomass production.

Efficacy assays in pears and apples showed better results in apples, promoting significant reduction in terms of incidence, 47%, and severity, 54%.

# Lista de abreviaturas

**ACB** – Agente de controlo biológico

**YPD** – Yeast extract, peptone, dextrose

**PDA** – Potato dextrose agar

**NYDA** – Nutrient broth, yeast extract, dextrose, agar

**DO** – Densidade óptica

**DP** - Desvio padrão

**EPA** – Environmental Protection Agency

**EUA** – Estados Unidos da América

**FDA** – Food and Drug Administration

**HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência

**LBG** – Locust Bean Gum

**ufc** – Unidades formadoras de colónias

**UV** – Ultravioleta

**$\mu\text{g}$**  – Taxa específica de crescimento

**$P_{\text{máx}}$**  – Produtividade máxima

**$X_{\text{máx}}$**  – Biomassa máxima

**rpm** – Rotações por minuto

**$k_L a$**  – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio

# Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I. INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>XI</b> |
| <b>1. PERDAS PÓS-COLHEITA</b> .....                                  | <b>1</b>  |
| <b>2. SISTEMAS ALTERNATIVOS AOS FUNGICIDAS DE PÓS-COLHEITA</b> ..... | <b>2</b>  |
| <b>3. CONTROLO BIOLÓGICO</b> .....                                   | <b>4</b>  |
| <b>3.1. Microrganismos antagonistas</b> .....                        | <b>4</b>  |
| <b>3.2. Desenvolvimento de um agente de controlo biológico</b> ..... | <b>5</b>  |
| 3.2.1. Selecção do ACB.....  | 5         |
| 3.2.2. Modos de acção .....  | 6         |
| 3.2.3. Formulação e comercialização .....                            | 8         |
| <b>4. PRODUÇÃO DE UM AGENTE DE CONTROLO BIOLÓGICO</b> .....          | <b>9</b>  |
| <b>4.1. Factores que afectam o crescimento</b> .....                 | <b>9</b>  |
| <b>4.2. Meios de cultura</b> .....                                   | <b>9</b>  |
| 4.2.1. Uso de subprodutos como meios de cultura .....                | 10        |
| 4.2.1.1. Licor de laranja.....                                       | 11        |
| 4.2.1.2. Extracto de alfarroba .....                                 | 11        |
| <b>4.3. Reactores biológicos</b> .....                               | <b>12</b> |
| 4.3.1. Transferência de massa de oxigénio .....                      | 13        |
| 4.3.1.1. Mecanismo de transferência de oxigénio .....                | 14        |
| 4.3.1.2. Vectores de Oxigénio .....                                  | 16        |
| 4.3.1.3. Modo de acção dos vectores de oxigénio .....                | 16        |
| <b>II. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                                  | <b>18</b> |
| <b>1. MATERIAL</b> .....   | <b>18</b> |
| <b>1.1. Microrganismos</b> .....                                     | <b>18</b> |
| 1.1.1. Antagonista.....  | 18        |
| 1.1.2. Patogénio .....   | 18        |
| <b>1.2. Material vegetal</b> .....                                   | <b>18</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.3. Meios de Cultura .....</b>  | <b>18</b> |
| 1.3.1. Meios de cultura comerciais .....  | 18        |
| 1.3.1.1. Nutrient Yeast Dextrose Agar (NYDA) _____                                  | 19        |
| 1.3.1.2. Potato Dextrose Agar (PDA) _____   | 19        |
| 1.3.1.3. Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) _____                                 | 19        |
| 1.3.2. Subprodutos da indústria agro-alimentar como meios de cultura .....          | 19        |
| 1.3.2.1. Licor de laranja + extracto de levedura _____                              | 19        |
| 1.3.2.2. Extracto de alfarroba + extracto de levedura _____                         | 19        |
| <b>1.4. Solução tampão.....</b>   | <b>20</b> |
| <br>  |           |
| <b>2. MÉTODOS.....</b>  | <b>20</b> |
| <br>  |           |
| <b>2.1. Preparação dos meios de cultura .....</b>                                   | <b>20</b> |
| 2.1.1. Meios de cultura comerciais .....  | 20        |
| 2.1.2. Licor de laranja.....  | 20        |
| 2.1.2.1. Primeiro processo _____  | 20        |
| 2.1.2.2. Segundo processo _____   | 21        |
| 2.1.3. Extracto de alfarroba .....  | 22        |
| <br>  |           |
| <b>2.2. Determinação do crescimento celular .....</b>                               | <b>22</b> |
| 2.2.1. Contagem de células viáveis.....   | 23        |
| 2.2.2. Espectrofotometria .....   | 23        |
| 2.2.3. Determinação da biomassa .....   | 23        |
| <br>  |           |
| <b>2.3. Métodos Analíticos .....</b>  | <b>24</b> |
| 2.3.1. Quantificação de açúcares .....  | 24        |
| 2.3.2. Monitorização do pH.....   | 24        |
| 2.3.3. Determinação da transferência de massa de oxigénio .....                     | 24        |
| <br>  |           |
| <b>2.4. Preparação do pré-inóculo.....</b>  | <b>25</b> |
| <br>  |           |
| <b>2.5. Ensaio de Crescimento .....</b>   | <b>25</b> |
| 2.5.1. Ensaio em escala laboratorial realizados em Erlenmeyer .....                 | 25        |
| 2.5.1.1. Diferentes concentrações de glucose _____                                  | 25        |
| 2.5.1.2. Diferentes concentrações de açúcares no licor de laranja _____             | 26        |
| 2.5.1.3. Diferentes rácios de licor de laranja e extracto de alfarroba _____        | 26        |
| 2.5.2. Ensaio realizados em Reactor Biológico.....                                  | 27        |
| 2.5.2.1. Diferentes concentrações de açúcares no licor de laranja _____             | 27        |
| 2.5.2.2. Efeito do vector de O <sub>2</sub> n-dodecano _____                        | 28        |
| <br>  |           |
| <b>2.6. Avaliação da capacidade antagónica da levedura PBC-2 .....</b>              | <b>28</b> |
| 2.6.1. Preparação do microrganismo patogénico ( <i>Penicillium expansum</i> ) ..... | 29        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.6.2. Preparação do microrganismo antagonista .....   | 29        |
| 2.6.3. Ensaio de eficácia .....  | 29        |
| <b>2.7. Dinâmica populacional.....</b>   | <b>30</b> |
| <b>2.8. Análise Estatística.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>III . RESULTADOS .....</b>  | <b>32</b> |
| <b>1. ENSAIOS DE CRESCIMENTO EM ERLLENMEYER DA LEVEDURA <i>METSCHNIKOWIA</i> SP. PBC-2.....</b>  | <b>32</b> |
| 1.1. Efeito de diferentes concentrações de glucose na produção do agente de controlo biológico. ....   | 32        |
| 1.2. Efeito de diferentes concentrações de açúcar no licor de laranja na produção do agente de controlo biológico .....                              | 34        |
| 1.3. Efeito de diferentes rácios de licor de laranja e extracto de alfarroba na produção do agente de controlo biológico .....                       | 38        |
| <b>2. ENSAIOS DE CRESCIMENTO EM REACTOR BIOLÓGICO, USANDO LICOR DE LARANJA COMO FONTE DE CARBONO, DA LEVEDURA <i>METSCHNIKOWIA</i> SP. PBC-2....</b> | <b>40</b> |
| 2.1. Ensaio realizado com diferentes concentrações de açúcar.....  | 40        |
| 2.2. Efeito do vector n-dodecano em fermentação realizada com uma concentração de açúcares de 50 g/L.....  | 42        |
| <b>3. ENSAIOS DE EFICÁCIA E DINAMICA POPULACIONAL .....</b>  | <b>44</b> |
| 3.1. Ensaio em peras .....   | 45        |
| 3.2. Ensaio em maçãs .....   | 47        |
| <b>IV . DISCUSSÃO.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>V . CONCLUSÕES.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>VI . PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO .....</b>  | <b>59</b> |
| <b>VII . BIBLIOGRAFIA .....</b>  | <b>60</b> |

# Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.1:</b> Perfis de crescimento da levedura <i>Metschnikowia</i> sp. PBC-2 a 25 °C com agitação de 150 rpm, usando glucose e extracto de levedura como fontes de carbono e azoto, respectivamente, expressos em densidade óptica (A), peso seco (B) e log ufc/mL (C) e variação do pH (D) ao longo do tempo.....   | 32 |
| <b>Figura 1.2:</b> Perfis de consumo de glucose pela levedura <i>Metschnikowia</i> sp. PBC-2 ao longo do tempo.....   | 33 |
| <b>Figura 1.3:</b> Perfis de crescimento da levedura <i>Metschnikowia</i> sp. PBC-2 a 25 °C com agitação de 150 rpm, usando licor de laranja e extracto de levedura como fontes de carbono e azoto, respectivamente, expressos em densidade óptica (A), peso seco (B) e log ufc/mL (C) e variação do pH (D) ao longo do tempo.....  | 35 |
| <b>Figura 1.4:</b> Perfis de consumo de sacarose, glucose e frutose ao longo da fermentação. Os gráficos A, B, C e D representam respectivamente as concentrações 12,5 g/L, 25 g/L, 37,5 g/L e 50 g/L.....  | 36 |
| <b>Figura 1.5:</b> Perfis de consumo dos açúcares totais para as 4 concentrações testadas ao longo do tempo.....  | 37 |
| <b>Figura 1.6:</b> Perfis de crescimento da levedura <i>Metschnikowia</i> sp. PBC-2, a 20°C com agitação de 150 rpm, usando licor de laranja e extracto de alfarroba como fontes de carbono e extractos de levedura como fonte de azoto, expressos em densidade óptica (A), peso seco (B) e log ufc/mL (C) e variação do pH (D) ao longo do tempo.....  | 38 |
| <b>Figura 1.7:</b> Perfis de consumo de açúcares presentes no licor de laranja e extracto de alfarroba ao longo do tempo. Os gráficos A, B e C correspondem aos rácios 25 g/L de licor de laranja + 25 g/L de extracto de alfarroba, 37,5 g/L de licor de laranja + 12,5 de extracto de alfarroba e 12,5 de licor de laranja + 37,5 de extracto de alfarroba, respectivamente. O gráfico D corresponde aos açúcares totais de todos os rácios testados..... | 39 |
| <b>Figura 2.1:</b> Perfis de crescimento em reactor biológico da levedura <i>Metschnikowia</i> sp. PBC-2 para uma concentração de açúcares de 50 g/L, expressos em Peso seco (losangos) e log ufc/mL (triângulos), variação do pH (asterisco), concentração de O <sub>2</sub> (quadrados) e consumo de açúcares (círculos) ao longo do tempo.....   | 41 |
| <b>Figura 2.2:</b> Perfis de crescimento em reactor biológico da levedura <i>Metschnikowia</i> sp. (PBC-2) para uma concentração de açúcares de 70 g/L, expressos em Peso seco (losangos) e log ufc/mL (triângulos), variação do pH (asterisco), concentração de O <sub>2</sub> (quadrados) e consumo de açúcares (círculos) ao longo do tempo.....   | 41 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 2.3:</b> Perfis de crescimento em reactor biológico da levedura <i>Metschnikowia</i> sp. PBC-2 para uma concentração de açúcares de 50 g/L, com adição do vector n-dodecano a 1%, expressos em Peso seco (losangos) e log ufc/mL (triângulos), variação do pH (asterisco), concentração de O <sub>2</sub> (quadrados) e consumo de açúcares (círculos) ao longo do tempo de uma fermentação da levedura PBC-2 realizada em reactor biológico.....   | 43 |
| <b>Figura 3.1:</b> Peras cv. ‘Rocha’ após 7 dias a 20±1°C. <b>A:</b> sem aplicação de <i>Metschnikowia</i> sp. PBC-2, <b>B:</b> com aplicação de <i>Metschnikowia</i> sp. PBC-2.....  | 45 |
| <b>Figura 3.2:</b> Incidência de <i>P. expansum</i> em peras cv. ‘Rocha’ sem a presença da levedura PBC-2 (controlo) e com a presença da levedura <i>Metschnikowia</i> sp. PBC-2 produzida em meio licor de laranja + extracto de levedura, com uma concentração de açúcares de 50 g/L. O gráfico <b>A</b> refere-se às incidências registadas após 2 dias e o gráfico <b>B</b> após 7 dias a 20±1°C. Barras com letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05). As linhas verticais correspondem a ± DP.....   | 45 |
| <b>Figura 3.3:</b> Severidade de <i>P. expansum</i> em peras cv. ‘Rocha’ sem a presença da levedura PBC-2 (controlo) e com a presença da levedura <i>Metschnikowia</i> sp. PBC-2 produzida em meio licor de laranja + extracto de levedura, com uma concentração de açúcares de 50 g/L. O gráfico <b>A</b> refere-se à severidade registada após 2 dias e o gráfico <b>B</b> após 7 dias a 20±1°C. Barras com letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05). As linhas verticais correspondem a ± DP.....  | 46 |
| <b>Figura 3.4:</b> Maçãs cv. ‘Golden Delicious’ após 7 dias a 20±1°C. <b>A:</b> sem aplicação da levedura <i>Metschnikowia</i> sp.PBC-2, <b>B:</b> com aplicação da levedura <i>Metschnikowia</i> sp.PBC-2.....   | 47 |
| <b>Fig 3.5:</b> Incidência ( <b>A</b> ) e severidade ( <b>B</b> ) de <i>P. expansum</i> após 7 dias a 20±1°C em maçãs cv ‘Golden Delicious’ sem a presença da levedura <i>Metschnikowia</i> sp. PBC-2 (controlo) e com a presença da levedura <i>Metschnikowia</i> sp. PBC-2 produzida em meio licor de laranja + extracto de levedura, com uma concentração de açúcares de 50 g/L. O gráfico <b>A</b> refere-se às incidências registadas após 2 dias e o gráfico <b>B</b> após 7 dias a 20±1°C. Barras com letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05). As linhas verticais correspondem a ± DP..... | 47 |

# Índice de tabelas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.1:</b> Taxa específica de crescimento, rendimento à biomassa, produtividade máxima, biomassa máxima ufc/mL máximo da levedura <i>Metschnikowia</i> sp .PBC-2 crescida em Erlenmeyer em meio com diferentes concentrações de glucose e extracto de levedura a 10 g/L, a 25°C com agitação de 150 rpm.....   | 34 |
| <b>Tabela 1.2:</b> Taxa específica de crescimento, rendimento à biomassa, produtividade máxima, biomassa máxima e ufc/mL máximo da levedura <i>Metschnikowia</i> sp. PBC-2 crescida em Erlenmeyer em licor de laranja com diferentes concentrações de açúcares e extracto de levedura a 10 g/L, a 25°C com agitação de 150 rpm.....  | 37 |
| <b>Tabela 1.3:</b> Taxa específica de crescimento, rendimento à biomassa, produtividade máxima, biomassa máxima e ufc/mL máximo da levedura <i>Metschnikowia</i> sp. PBC-2 crescida em Erlenmeyer, usando como fonte de carbono diferentes rácios de licor de laranja e extracto de alfarroba com uma concentração final de açúcares de 50 g/L e extracto de levedura a 10 g/L, a 25°C com agitação de 150 rpm.....                      | 40 |
| <b>Tabela 2.1:</b> $K_{La}$ inicial, taxa respiratória, taxa específica de crescimento, rendimento à biomassa, produtividade máxima, biomassa máxima e ufc/mL máximo da levedura <i>Metschnikowia</i> sp. PBC-2 crescida em reactor biológico com licor de laranja a diferentes concentrações de açúcares e extracto de levedura a 10 g/L e com adição do vector n-dodecano, a 25°C com agitação de 300 rpm e arejamento de 150 L/h..... | 44 |

# Objectivos

Este trabalho tem como objectivo principal a produção de um agente de controlo biológico usando como fonte de carbono subprodutos da indústria agro-alimentar com o intuito de baixar o custo de produção final.

Dentro deste tema principal, as metas a alcançar foram:

- A optimização do processo de extracção do licor de laranja a partir da matéria-prima fornecida; da fonte de carbono comparativamente com as fontes comerciais, neste caso a glucose, e da mistura de subprodutos (licor de laranja e extracto de alfarroba).
- Avaliar, em ensaios realizados em reactor biológico, qual a melhor concentração de açúcares para a produção do agente de controlo biológico;
- Avaliar a influencia do vector de oxigénio n-dodecano na produção do agente de controlo biológico;
- Verificar a capacidade antagonista da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2 em peras e maçãs.

# I . Introdução

## 1. Perdas pós-colheita

Os frutos e vegetais são produtos susceptíveis de sofrerem ataques de vários agentes patogénicos durante a fase de pós-colheita devido à sua composição (são ricos em água e nutrientes) e devido ao facto de perderem a sua resistência intrínseca quando são colhidos (Droby *et al.*, 1992). Estes ataques vão resultar em perdas pós-colheita que por sua vez se traduzem em perdas monetárias, sendo estas um factor de extrema importância para as indústrias Agrícola e Alimentar.

As perdas pós-colheita podem ser definidas como quaisquer mudanças na disponibilidade, valor nutricional, salubridade ou qualidade que impeçam o produto de ser consumido. Podem ocorrer durante todo o processo, que vai desde a colheita até à comercialização e surgem devido a variados factores. Estes factores podem ser divididos em 4 grupos principais. Os danos de natureza infecciosa ocorrem devido a doenças capazes de causar putrefacção por elas mesmas, ou por doenças que são capazes de penetrar o fruto pelos tractos naturais ou lenticelas. Danos de natureza fisiológica são causados por fenómenos de senescência que vão afectar a integridade do fruto, deixando-o deste modo mais susceptível. Os danos de natureza fisiopatológica aparecem como resultado do impacto de acções externas na fisiologia do fruto, de que são exemplo a exposição do fruto a temperaturas extremas e o efeito de certos gases no fruto, como é o caso do excesso de CO<sub>2</sub> e da falta de O<sub>2</sub>. E finalmente, existem os danos de natureza traumática ou tóxica que incluem fitotoxicidades e feridas (Álvaro e Berdié, 2004).

O aparecimento de novos fungicidas e o melhoramento das tecnologias de armazenamento nas décadas de 60 e 70 permitiram aumentar o tempo de conservação e prateleira dos produtos, no entanto, apesar de todo o avanço tecnológico, as perdas pós-colheita continuam a ser bastante significativas. Nos países em vias de desenvolvimento são elevadas, chegando a ultrapassar os 50%, e devem-se à falta de instalações adequadas e ao mau manuseamento dos produtos. Nos EUA, embora mais baixas, as perdas podem variar entre 5 a 20% ; (El-Gaouth, 1997; Janisiewicz e Korsten, 2002).

Os agentes causadores destas perdas variam de acordo com o organismo que infectam. *Penicillium digitatum* Sacc. causador da podridão verde e *Penicillium italicum* Wehmer causador da podridão azul são os microrganismos patogénicos mais comuns e

causadores de maiores perdas pós-colheita em citrinos (Eckert e Eaks, 1989). No que diz respeito a prunóideas, a podridão castanha, provocada por várias espécies do género *Monilinia* é a doença de pós-colheita mais importante em todo o mundo (De Cal e Melgrejo, 2000), enquanto que em pomóideas as doenças mais relevantes são o bolor azul causado por *Penicillium expansum* Link e o bolor cinzento causado por *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fr. (Rosenberger, 2002)

## **2. Sistemas alternativos aos fungicidas de pós-colheita**

O uso de fungicidas é o método mais utilizado no combate aos microrganismos causadores das perdas pós-colheita, no entanto existem riscos associados à utilização deste tipo de produtos, tanto a nível ambiental como de saúde, passando pelo aparecimento de resistências por parte de alguns microrganismos patogénicos (Droby *et al.*, 1992). Os fungicidas sintéticos representam aproximadamente 15% das vendas de químicos usados na agricultura (Fravel, 2005). Para contrariar esta tendência estão a ser desenvolvidos métodos não convencionais. Estes métodos alternativos podem ser divididos em 3 categorias: químicos, físicos e biológicos.

No grupo das alternativas químicas, podemos encontrar o uso de substâncias desinfectantes. O dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) é um forte oxidante e desinfectante. Os seus mecanismos de actuação não são conhecidos, no entanto parecem variar de acordo com os microrganismos (EPA, 1999). Este produto apenas elimina contaminantes por contacto, não de forma sistémica, sendo que deste modo não elimina patogénios que se encontram na parte interna do fruto, ou infecções activas (Mari *et al.*, 2003). Outro produto usado é o ácido peroxiacético (PAA). É um forte agente oxidante formado por peróxido de hidrogénio e ácido acético decompondo-se em produtos não tóxicos. É um composto que apresenta boa solubilidade em água e mantém-se estável na presença de matéria orgânica (Sargent *et al.*, 2000). O ozono é outra alternativa viável. É usado para desinfectar água de consumo desde 1893 (Rice *et al.*, 1981). É um potente oxidante, sendo 1,5 vezes mais eficaz que o cloro, abrangendo um espectro mais amplo de microrganismos. Em 2001 a FDA aprovou o uso de ozono como aditivo no tratamento, armazenamento e processamento de alimentos (Sapers, 2006).

Outros compostos anti-fúngicos de origem animal ou vegetal são também usados para o controlo das perdas pós-colheita. Entre eles encontram-se extractos de plantas. O potencial destes compostos é extensamente reconhecido. Ark e Thompson (1959)

demonstraram o potencial fungicida de extractos de alho contra *Monilinia fructicola* e mais recentemente Obagwu e Korsten (2003) comprovaram a eficácia destes mesmos extractos no controlo de *P. digitatum* e *P. italicum* em citrinos.

Óleos essenciais derivados de plantas são considerados não fitotóxicos e apresentam actividade biocida contra variados agentes patogénicos. Lopez- Reyes *et al.* testaram óleos essenciais extraídos de diversas plantas, entre as quais funcho, mangericão e lavanda, para controlar *Botrytis cinerea* e *P. expansum*, verificando a sua eficácia.

Os carbonatos e bicarbonatos são usados como aditivos alimentares no controlo de pH, modificação da textura e sabor (Corral *et al.*, 1988). Apresentam também a capacidade de controlar diversos organismos patogénicos de plantas. Sendo a maioria destas substâncias consideradas GRAS (generally recognized as safe) pela FDA, o seu uso para controlo das perdas pós-colheita encontra poucos obstáculos. A eficácia do carbonato de sódio e bicarbonato de sódio no combate à podridão verde causada por *P. digitatum* em citrinos é descrita por Smilanick *et al.* (1999) e Zhang *et al.* (2003).

O quitosano, um polímero de origem animal, apresenta também propriedades anti-fúngicas. Estimula a produção de quitinases (enzimas de defesa) por parte do hospedeiro, havendo a formação de estruturas de defesa (El-Ghaouth *et al.*, 1992). Apresenta também uma acção directa no agente patogénico provocando, por exemplo, a ruptura da membrana celular e alteração celular em diversos fungos (El-Ghaouth *et al.*, 2004).

No grupo dos métodos físicos a iluminação ultravioleta (UV-C) com comprimento de onda de 254 nm é uma alternativa a ter em consideração, tendo como grande vantagem o facto de não deixar resíduos no fruto. Esta estimula variados processos biológicos, entre os quais a respiração e biosíntese de flavonoides e fitoalexinas, funcionando assim como indutora de resistência em certos organismos patogénicos (Mari e Guizzardi, 1998). Tem também um efeito germicida directo. A inactivação dos organismos é feita através da absorção da iluminação que causa uma reacção fotoquímica que vai alterar certos componentes moleculares essenciais ao bom funcionamento celular (EPA, 1999). Tratamentos térmicos podem ser também uma alternativa aos fungicidas sintéticos. Controlo de perdas pós-colheita em citrinos por tratamento com água e ar quente foram relatados e a sua eficácia comprovada (Porat *et al.* 1999; Nunes *et al.* 2007a).

O uso de microrganismos antagonistas como alternativa biológica no combate às perdas pós-colheita, sendo a base deste trabalho, vai ser descrito pormenorizadamente no capítulo seguinte.

### 3. Controlo Biológico

Não existe nenhuma definição consensual sobre o controlo biológico havendo uma grande variedade de propostas apresentadas ao longo dos anos por diferentes autores. DeBach, em 1964, enunciou uma definição para controlo biológico como sendo *a acção de parasitas, predadores e patogénios para manter a densidade de outros organismos mais baixa do que ocorreria na sua ausência*. Outra definição proposta em 1988 por Nighan e Mukerji considera o controlo biológico como sendo *a manipulação directa ou indirecta, por parte do Homem, dos agentes vivos que de forma natural têm a capacidade de controlo. Esta manipulação provoca um aumento da sua capacidade de ataque sobre as doenças*. Mais recentemente, em 1997, Wilson definiu o controlo biológico de plantas como sendo *o controlo de uma doença em plantas usando um processo biológico natural ou o produto de um processo biológico natural*, incluindo assim também químicos “biológicos” libertados por organismos vivos ou extraídos de organismos vivos para além de incluir a resistência do hospedeiro, tanto constitutiva como induzida por elicitores.

O primeiro trabalho sobre controlo biológico em pós-colheita foi publicado em 1977 por Tronsmo e Dennis e incidia no uso de *Trichoderma* spp. como meio de controlar a podridão causada por *Botrytis* em morangos, no entanto, só em 1984, com a publicação de um artigo sobre o potencial do uso de uma estirpe de *Bacillus subtilis* para controlar o aparecimento de podridão castanha em pêsegos causada pelo fungo *Monilinia fructicola* (Pusey e Wilson, 1984) a devida importância foi dada ao controlo biológico.

O controlo biológico, como meio de diminuir as perdas pós-colheita, é um processo moroso que se inicia com a escolha do microrganismo antagonista e que termina com a aplicação prática deste, traduzida no desenvolvimento de formulações que poderão vir a ser registadas e comercializadas para uso generalizado.

#### 3.1. Microrganismos antagonistas

Ao longo dos tempos, várias espécies de bactérias e leveduras têm sido testadas como potenciais agentes de controlo biológico, no entanto, poucas chegam à fase final de todo o processo, isto é, a comercialização. Actualmente existem poucos produtos a serem comercializados, o Biosave, registado nos EUA, que tem como base a bactéria *Pseudomonas syringae* Van Hall, a formulação Shemer®, registada em Israel, que

utiliza a levedura *Metschnikowia fructicola* Kurtzman & Droby (Droby *et al.* 2009), o Boni-Protect® na Alemanha (*Aureobasidium pullulans*) e em Espanha os produtos Pantovital (*Pantoea agglomerans*) (Usall *et al.*, 2010) e Candifruit™ (*Candida sake*) encontram-se disponíveis. Outros produtos chegaram a ser comercializados mas já não se encontram disponíveis, como são exemplo o Aspire™ (*Candida oleophila*) e o YieldPlus (*Cryptococcus albidus*). Presentemente, as empresas Bionext e Leasaffre International encontram-se a desenvolver um produto baseado na levedura *Candida oleophila* e outra formulação baseada na levedura *Candida saitoana* está a ser desenvolvida pela empresa Neova Technologies (Droby *et al.*, 2009).

## **3.2. Desenvolvimento de um agente de controlo biológico**

O desenvolvimento de um agente de controlo biológico é um processo moroso e dispendioso que requer uma análise minuciosa do microrganismo em questão.

Para um microrganismo ser candidato a agente de controlo biológico deverá apresentar determinadas características enunciadas por Wilson e Wisniewski (1989). Deste modo o microrganismo antagonista ideal deverá ser: geneticamente estável, eficaz a baixas concentrações abrangendo um largo espectro de patogénios, pouco exigente em relação a requerimentos nutricionais, capaz de sobreviver em condições ambientais adversas, propicio a uma produção pouco dispendiosa, fácil de aplicar, resistente a pesticidas e compatível com as práticas de manuseamento e armazenamento no ambiente de pós-colheita e não produtor de metabolitos patogénicos que sejam tóxicos para pessoas e animais.

### **3.2.1. Selecção do Agente de Controlo Biológico**

O processo inicia-se com a procura do microrganismo. A superfície de frutos é uma notável fonte de microrganismos com potencial antagonista. As bactérias *Pantoea agglomerans* (Nunes *et al.*, 2002) e *Pseudomonas syringae* (Nunes *et al.*, 2007) e o fungo *Aureobasidium pullulans* estirpe ACH 1-1 (Mounir *et al.*, 2007) foram isolados da superfície de maçãs, uma nova estirpe da levedura *Metschnikowia fructicola* foi isolada da superfície de uvas em Israel (Kurtzman e Droby, 2001) e a estirpe PBC-1 de *Pantoea agglomerans* foi isolada da superfície de laranjas da variedade ‘Valencia late’ (Manso *et*

*al.*, 2009). Apesar de a superfície de frutos ser o local mais comum para a procura de agentes de controlo biológico de doenças de pós-colheita de frutos, estes podem ser também encontrados nas raízes de trigo e em pepinos como é o caso das bactérias *Pseudomonas fluorescens* P-35 e *Bacillus subtilis* B-3, respectivamente (Peighami-Ashnaei *et al.*, 2009). Este processo de *screening* poderá ser mais eficaz se for realizado em pomares não manipulados, onde as populações não estiveram em contacto com químicos sendo a variedade de potenciais antagonistas maior do que em locais onde foram usados pesticidas (Janisiewicz e Korsten, 2002).

Depois do microrganismo isolado, caracterizado, seleccionado, a sua eficácia deverá ser amplamente estudada a nível laboratorial e semi-comercial, sendo simuladas condições reais. Um importante pré-requisito para os ensaios de campo onde são simuladas as condições naturais é o estudo dos modos de acção do antagonista de maneira a permitir o desenvolvimento de técnicas para uma efectiva aplicação do microrganismo (Droby *et al.*, 1992).

### **3.2.2. Modos de acção**

O conhecimento dos mecanismos de acção dos microrganismos antagonistas é extremamente importante para estabelecer estratégias de controlo biológico eficazes. Esta informação é essencial para a optimização do método e tempo de aplicação do antagonista, desenvolvimento de formulações que melhorem a eficácia do antagonista, desenvolver uma base lógica para seleccionar antagonistas mais eficientes e registo do agente de controlo biológico para comercialização (Droby e Chalutz, 1994).

Variados modos de acção têm sido sugeridos para o controlo biológico, incluindo-se entre eles antibiose, parasitismo directo e produção de enzimas líticas, resistência induzida e competição por espaço e nutrientes (Janisiewicz *et al.*, 2000).

No caso das bactérias é sugerido que o seu modo de acção esteja relacionado, em parte, com a produção de antibióticos (Nunes *et al.*, 2009). *Bacillus subtilis* produz iturina, um potente antibiótico, activo contra vários agentes patogénicos e *Pseudomonas cepacia* produz um outro antibiótico, pirrolnitrina, controlando assim alguns patogénios de frutas e vegetais (Droby *et al.*, 1992). Este modo de acção poderá causar alguma controvérsia devido ao facto de se estar a introduzir um antibiótico no produto a ser tratado (Nunes *et al.*, 2009).

O parasitismo directo foi observado por Wisniewski *et al.*(1991). Verificaram que as células de *Pichia guillermondii* apresentavam a capacidade de se ligarem às hifas de *B. cinerea* e observaram posteriormente que as hifas se encontravam deformadas no local de ligação, tendo havido degradação da parede celular de *B. cinerea*. Da mesma maneira, em 1997, Piano *et al.* verificaram a ligação das células de *Metschnikowia pulcherrima* aos esporos e hifas de *B. cinerea*. Para além do parasitismo directo, a produção de enzimas líticas (proteases, quitinases e gluconases) por parte do microrganismo antagonista, ajudam na degradação da parede celular do fungo patogénico (Sharma *et al.*, 2009).

Outro modo de acção proposto é através de resistência induzida. Após a detecção de um agente patogénico ou dos seus metabolitos, as plantas preparam sistemas de defesa para se protegerem da infecção. Estas respostas incluem o reforço da parede celular por deposição de linhina, calose e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina; acumulação de fitoalexinas; síntese de inibidores de proteinases e enzimas líticas (El-Ghaouth *et al.*, 2004) O tratamento com *Aureobasidium pullulans* em feridas de maçãs leva à indução de resistência pela produção e aumento da actividade de  $\beta$ -1,3-glucanase, quitinase e peroxidase (Ippolito *et al.*, 2009) e a levedura *Candida oleophila* quando aplicada em feridas superficiais de toranja é capaz de elicitar resistência a *Penicillium digitatum* com a produção de etileno, biosíntese de fitoalexinas e acumulação das enzimas quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase (Droby *et al.*, 2002).

A competição por espaço e nutrientes é um importante mecanismo de controlo biológico em patogénios de plantas (Nunes *et al.*, 2001a). A maior parte dos agentes patogénicos de pós-colheita em fruta requerem nutrientes para a germinação e para o início do processo patogénico, assim sendo, a competição por espaço e nutrientes é um mecanismo de controlo biológico eficaz (Janisiewicz *et al.*, 2000). Estudos realizados em duas leveduras do género *Metschnikowia* demonstraram o seu potencial como antagonistas e o seu modo de acção como sendo competição por espaço e nutrientes. Piano *et al.* (1997) verificaram que a actividade antagonista de *M. pulcherrima* é altamente influenciada pela adição de determinados nutrientes e que a levedura coloniza rapidamente a superfície do fruto, suportando assim a hipótese de que a competição por nutrientes e espaço desempenha um papel importante na acção contra *B. cinerea*. Noutro estudo realizado com *M. pulcherrima* verificou-se que o seu potencial antagonista se deve à colonização da superfície do fruto (Karabulut *et al.*, 2004).

Note-se, no entanto, que os modos de acção não são exclusivos, podendo um agente de controlo biológico actuar usando mais que um modo de acção. Wisniewski *et al* (1991) propuseram que, na presença de um agente patogénico, a levedura antagonista produz enzimas líticas que poderão aumentar a capacidade de ligação da levedura às hifas do patogénio, havendo assim dois modos de acção a actuar em simultâneo.

### **3.2.3. Formulação e comercialização**

Depois de extensivamente testado, o potencial agente de controlo biológico para ser usado terá de ser formulado como um produto que poderá ser armazenado, distribuído e aplicado (Rodham *et al.*, 1999). A distribuição bem sucedida do agente de controlo biológico, o tempo de prateleira, a estabilidade e a eficácia em condições comerciais são factores dependentes da formulação (Kinay e Yildiz, 2008).

A formulação de agentes de controlo biológico apresenta alguns problemas. As células deverão ser mantidas numa forma estável durante longos períodos onde se encontram expostas a flutuações de temperatura à medida que o produto passa através da cadeia de distribuição. Outro obstáculo é o facto dos agentes estarem expostos a condições ambientais adversas, tais como actividade da água e luz ultravioleta, durante e após a aplicação, resultando assim numa redução da densidade populacional (Fravel, 1999).

O tipo de formulação desejada depende do uso pretendido. Diferentes formulações têm sido testadas para os mais diversos microrganismos. Formulações líquidas (Patiño-Vera *et al.*, 2005; Abadias *et al.*, 2003), liofilizadas (Abadias *et al.*, 2001) e granulares (Kinay e Yildiz, 2008) são alguns exemplos.

Antes de um produto ser comercializado é necessário fazer o seu registo. Nos EUA este processo é rápido e menos dispendioso comparativamente com o registo de fungicidas sintéticos, no entanto na Europa a situação é mais complexa sendo o registo mais difícil de obter, resultando assim em poucos produtos a serem comercializados actualmente (Droby *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2009). No entanto, de modo a proporcionar um enquadramento jurídico em toda a União Europeia, os agentes de controlo biológico foram especificamente contemplados na Directiva 91/414/EEC “Concerning the placement of plant protection products on the market”. Apesar destes esforços tem sido levantado um debate pelos produtores de agentes de controlo biológico por

considerarem a directiva baseada em regras referentes a produtos químicos (Fravel *et al.*, 1999).

Testes toxicológicos serão necessários para o registo, de maneira a estabelecer que o microrganismo, o processo de produção e formulação do microrganismo e o produto formulado não são tóxicos para o Homem (Fravel *et al.*, 1999).

## **4. Produção de um Agente de Controlo Biológico**

### **4.1. Factores que afectam o crescimento**

A produção de um agente de controlo biológico é um processo influenciado por inúmeras variáveis. Para este ser bem sucedido, esses factores deverão ser controlados e monitorizados de acordo com as características do organismo que está a ser produzido.

Os factores mais importantes, que afectam o crescimento de um microrganismo ao longo de uma fermentação são o pH, arejamento, agitação, temperatura e os constituintes de meio de cultura que deverão satisfazer as necessidades elementares para produção de biomassa e metabolitos (Lee *et al.*, 1999). Outro parâmetro importante é o inóculo, este deverá apresentar-se num estado activo de maneira a diminuir a duração da fase de latência, disponível em volume suficiente para fornecer um inóculo de tamanho adequado, livre de contaminações, mantendo as suas capacidades de formação de produtos (Abadias *et al.*, 2003; Stanbury *et al.*, 1995).

### **4.2. Meios de cultura**

A produção de agentes de biocontrolo pode ser efectuada recorrendo a dois métodos, fermentação sólida e fermentação líquida. O desenvolvimento de equipamentos e métodos na fermentação líquida a grande escala para produção de antibióticos, enzimas e ácidos orgânicos é um bom ponto de partida para a produção de agentes de controlo biológico (Fravel *et al.*, 1999).

Para um crescimento eficiente, os microrganismos requerem a presença de certos compostos no meio de cultura, como água, fonte de carbono, azoto e energia, minerais e vitaminas e, no caso de serem aérobicos, oxigénio.

Numa produção à escala industrial deverá ser usado um meio que preencha a maioria dos seguintes requisitos. Este deverá permitir a produção máxima de produto ou biomassa por grama de substrato usado e máxima concentração de produto ou biomassa; permitir uma taxa máxima de formação de produto; evitar a formação de produtos indesejados; ser de qualidade e estar disponível ao longo do ano; causar o mínimo de problemas durante a formulação e esterilização e a nível do arejamento, agitação, extracção, purificação e tratamento de resíduos (Stanbury *et al.*, 1994).

Os componentes de um meio de cultura representam 38 a 73% do custo total do processo fermentativo, sendo a fonte de carbono usualmente o componente mais dispendioso (Stanbury *et al.*, 1994).

Um parâmetro muito importante na produção de microrganismos para aplicação em controlo biológico é o desenvolvimento de um meio de cultura que permita uma produção máxima de biomassa a baixo custo (Costa *et al.* 2001). Este parâmetro é especialmente importante visto que em controlo biológico são usadas grandes quantidades do agente produzido e o seu custo deverá ser comparável ao dos pesticidas químicos (Visnovsky *et al.*, 2008).

#### **4.2.1. Uso de subprodutos como meios de cultura**

O maior apelo dos subprodutos resultantes da indústria agro-alimentar é o seu baixo custo, podendo estes ser adquiridos por pouco mais do custo do seu transporte. Em países onde a economia é baseada na agricultura, os resíduos resultantes desta prática são abundantes, sendo a sua eliminação dificultada pelo aumento dos custos e restrições no uso de aterros para certos produtos (Thomsen, 2005). Desta maneira, é vantajoso encontrar alternativas para o uso destes resíduos. Estes tendem a apresentar uma elevada composição em açúcares, sendo facilmente assimilados por microrganismos devido à sua natureza orgânica (Couto, 2008).

Vários subprodutos têm sido testados como meios de cultura para produção de microrganismos. Resíduos da indústria produtora de vinho (Bai *et al.*, 2007) e águas residuais e lamas industriais (Verma *et al.*, 2007) foram usados como meio de cultura para produzir o agente de controlo biológico *Trichoderma viridae* e resíduos de couve Chinesa foram utilizados como substrato na produção de 4 estirpes de leveduras (Choi *et al.*, 2002).

#### **4.2.1.1. Licor de laranja**

O processamento do sumo de laranja origina grandes quantidades de resíduos cítricos, aproximadamente 50% do peso do fruto, entre eles a polpa, as cascas e as sementes, sendo este conjunto designado de bagaço. (Giese *et al.*, 2008) que pode ser reutilizado na produção de ração animal. Este processo inclui uma prensagem dos resíduos após acerto do pH por adição de óxido de cálcio, com o objectivo de facilitar a degradação da pectina e aumentar a eficiência da remoção de água do bagaço de laranja (Roçafa Junior *et al.*, 2005). Esta prensagem vai originar o chamado licor que apresenta uma elevada concentração de hidratos de carbono entre eles frutose, glucose, sacarose e pectinas para além de celulose (Giese *et al.*, 2008). A concentração vai no entanto depender da quantidade de água adicionada no processo e da variedade da fruta que é processada. Este subproduto, devido ao seu teor em açúcares, levanta problemas ao nível da sua eliminação, apresentando uma CBO (Carência Bioquímica de Oxigénio) elevada. Assim sendo, será vantajoso encontrar alternativas para a sua utilização (Roçafa Junior *et al.*, 2005).

#### **4.2.1.2. Extracto de alfarroba**

A alfarrobeira (*Ceratonia siliqua* L.) é uma árvore nativa da região mediterrânica, pertencente à família *Leguminosae* e à sub-família *Caesalpinaceae* (Barracosa *et al.*, 2007; Turhan *et al.*, 2010).

A produção de alfarroba anual é aproximadamente 350000 t, sendo os maiores produtores e exportadores Espanha, Itália, Portugal, Marrocos, Grécia, Chipre e Turquia (Fletcher, 1997). Esta produção é economicamente importante para a região do Algarve, onde se encontram várias empresas de transformação, contribuindo para 14% da produção anual mundial (Barracosa *et al.*, 2007)

As sementes correspondem a 10% do peso do fruto, enquanto que os restantes 90% correspondem à polpa (Manso *et al.*, 2009). O uso da alfarroba é variado, sendo usada na produção de bebidas em variados países árabes e como substituta do cacau nos E.U.A. (Yousif e Alghzawi, 2000), no entanto, o produto proveniente da alfarroba mais usado ao nível da indústria alimentar é o LBG (Locust Bean Gum). Este é proveniente do endosperma da semente e é usado como um aditivo alimentar natural (E 410) (Barracosa *et al.*, 2007).

A sua composição química tem sido extensivamente estudada por variados autores, apresentando uma elevada concentração em açúcares, maioritariamente sacarose, possuindo assim características de edulcorante natural (Battle e Tous, 1997; Yousif e Alghzawi, 2000). A sua elevada percentagem em açúcares permitiu o seu uso como substrato para produção do agente de controlo biológico *Pantoea agglomerans* PBC-1. Este trabalho consistiu no uso de extractos aquosos de alfarroba, provenientes da vagem de alfarroba, posteriormente processados, como fonte de carbono no meio de cultura. O estudo permitiu obter uma elevada produção de biomassa, evidenciando assim o potencial deste produto como fonte de carbono na produção do agente de controlo biológico (Manso *et al.*, 2010). Pode também ser usada como fonte de carbono para produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* (Turhan *et al.*, 2010).

### **4.3. Reactores biológicos**

A principal função de um reactor biológico, ou fermentador, é a criação de um ambiente controlado para a produção de células animais, vegetais ou microrganismos, de maneira a se obter o produto desejado, quer este seja a produção de biomassa ou de metabolitos. Existem variados tipos de reactores biológicos, entre eles tanque agitado, leito fixo, leito fluidizado, coluna de bolhas e *air-lift*. Neste estudo em particular foi utilizado um reactor biológico mecanicamente agitado. Este tipo de reactor é extensivamente usado na indústria, muito estudado e aplicado em produções biológicas a partir de culturas microbianas (Lima-Costa e Raposo, 2007).

Um reactor biológico deverá apresentar determinadas características e a sua construção deverá obedecer certas condições: ser capaz de funcionar assepticamente; ter uma agitação e arejamento adequado; o consumo energético deverá ser o menor possível; apresentar um sistema de controlo de pH, temperatura e um local para realizar as amostragens; proporcionar o mínimo de perdas gasosas possível e ser facilmente manipulável durante as tarefas de amostragem, limpeza e manutenção (Stanbury, 1994). Durante o crescimento microbiano vai ser produzido calor, devido ao próprio metabolismo das células e à agitação mecânica. Se a temperatura não for a ideal para o processo pretendido, vai ter que ser removido ou adicionado calor ao sistema. À escala laboratorial, o calor produzido é geralmente pouco, sendo assim comum a adição de

calor através de banhos controlados termostaticamente, serpentinas e mangas ou camisas de aquecimento (Stanbury *et al.*, 1994).

O arejamento e agitação são dois factores de extrema importância durante o processo fermentativo. A principal função do arejamento é fornecer ao organismo submerso no meio de cultura o oxigénio necessário enquanto que a agitação tem como função a obtenção de uma suspensão uniforme de células por todo o meio de cultura (Stanbury *et al.*, 1994). O arejamento é feito por meio de dispersores de ar. Os dispersores mais utilizados são os dispersores poroso e em L. A agitação é feita, como o nome indica, com recurso a agitadores. Estes podem ser de variados tipos, dependendo da viscosidade do meio de cultura, do tipo de célula e da escala do reactor. Os agitadores podem ser classificados como axiais e radiais, ilustrando assim o fluxo de cada um. Um exemplo de um agitador radial, é a turbina de Rushton, usada neste trabalho. Esta turbina é recomendada para aplicações onde seja importante a combinação da dispersão de gás com a agitação intensa. Os agitadores em hélice promovem o movimento axial do fluido, não sendo apropriados para meios com elevada viscosidade (Lima-Costa e Raposo, 2007)

### **4.3.1. Transferência de massa de oxigénio**

A disponibilidade de oxigénio nos meios de cultivo utilizados para o crescimento de microrganismos é um factor determinante e poderá ter um papel decisivo no processo de *scale-up* em processos biológicos aeróbios.

A baixa solubilidade do O<sub>2</sub> em condições normais de fermentação obriga a um arejamento contínuo de maneira a satisfazer as necessidades das células.

A eficiência do arejamento depende da solubilização do O<sub>2</sub> e da sua taxa de difusão nos meios de cultura.

A transferência de massa de oxigénio, descrita e analisada através do coeficiente de transferência de massa, ou  $k_L a$ , é controlada pela solubilidade do O<sub>2</sub> nos meios de cultura e pela difusão e taxas de consumo, sendo influenciada por vários factores como as características geométricas e operacionais dos reactores, composição do meio, concentração e morfologia do microrganismo em questão. A transferência de massa pode ser otimizada através da redução do percurso da difusão de O<sub>2</sub> pelos microrganismos por redução da espessura do filme que envolve as bolhas de ar e as

células microbianas. Este fim poderia ser obtido pelo aumento da agitação, no entanto há que ter em conta a sensibilidade das células microbianas (Cascaval *et al.*, 2006).

Deste modo, foram estudados métodos alternativos para aumentar a transferência de massa de oxigénio, sendo os vectores do oxigénio um exemplo a ter em consideração.

#### 4.3.1.1. Mecanismo de transferência de oxigénio

Para cada fluido de ambos os lados de uma interface, a força motriz para a transferência de massa pode ser expressa em termos de uma diferença de concentração. Assim sendo, a taxa de transferência de massa para a interface é descrita pela seguinte equação:

$$N_A = k_a \Delta C_A = k_a (C_{A0} - C_{Ai})$$

Equação 1.1

Nesta equação:

$N_A$  – taxa de transferência de massa do componente A;

$k$  – coeficiente de transferência de massa;

$a$  – área disponível para a transferência de massa;

$C_{A0}$  – concentração do componente A fora da interface;

$C_{Ai}$  – concentração do componente A na interface.

As equações seguintes são obtidas a partir da equação 1.1 .

As equações 1.2 e 1.3 representam a taxa de transferência de massa do componente A através da camada limite gasosa e através da camada limite líquida, respectivamente.

$$N_{AG} = k_{Ga} (C_{AG} - C_{Agi})$$

Equação 1.2

$$N_{AL} = k_{La} (C_{Ahi} - C_{AL})$$

Equação 1.3

Em que  $k_G$  é o coeficiente de transferência de massa da fase gasosa e  $k_L$  o coeficiente de transferência de massa da fase líquida.

De um modo geral, o fluxo de massa entre um gás e a fase líquida pode ser descrito como:

$$N_A = K_L a (C^* - C_L)$$

Equação 1.4

Em que:

$K_L$  – coeficiente de transferência de massa global da fase líquida;

$a$  – área interfacial de contacto por unidade de volume disponível para a transferência de massa;

$C^*$  - concentração de saturação do componente a difundir no líquido em equilíbrio com a fase gasosa;

$C_L$  – concentração do componente dissolvido na meio.

O coeficiente de transferência de massa global da fase líquida,  $K_L$ , é definido por

$$1/K_L a = 1/mk_G a + 1/k_L a$$

Equação 1.5

Onde  $m$  é o factor de distribuição

Para gases pouco solúveis, como é o caso do oxigénio em água, “ $m$ ” é elevado e  $k_G$  é bastante superior a  $k_L$ , sendo que  $K_L \sim k_L$ , significando que a principal resistência à transferência de massa se encontra no filme de líquido e o respectivo coeficiente é aproximadamente igual ao coeficiente global de transferência.

Para medir experimentalmente valores de  $K_L a$  pode usar-se a seguinte equação

$$dC_L/dt = K_L a (C^* - C_L)$$

Equação 1.6

Onde  $K_L$  é o coeficiente de transferência de massa global da fase líquida, “a” é a área interfacial de contacto por unidade de volume disponível para a transferência de massa,  $C^*$  é a concentração de saturação de componente a difundir no líquido em equilíbrio com a fase gasosa e  $C_L$  é a concentração de gás dissolvido no meio ao longo do tempo (Doran, 1995).

#### **4.3.1.2. Vectores de Oxigénio**

A vantagem do uso de vectores de  $O_2$  em fermentações deve-se ao aumento da taxa de transferência de  $O_2$  sem haver a necessidade de um aumento energético (Jia *et al.*, 1997). Não apresentam, em geral, toxicidade para os microrganismos, podendo até servir como fonte adicional de carbono e energia.

Estes vectores são definidos como compostos que, quando adicionados ao meio de cultura são capazes de aumentar a solubilização do oxigénio comparativamente com a água (Silva *et al.*, 2008) para melhorar a transferência de oxigénio no meio de cultura.

Os principais vectores de oxigénio usados em biotecnologia são os hidrocarbonetos, perfluorocarbonetos e óleos usados também como agentes anti-espuma (Cascaval *et al.*, 2006).

Silva *et al.* (2010) realizaram ensaios de crescimento da alga *Cryptocodinium cohnii* com adição do vector n-dodecano a 1%. Os seus resultados evidenciam um aumento da produção de biomassa e da percentagem de oxigénio dissolvido no meio de cultura, quando é adicionado o vector. Outro estudo realizado revela um aumento do  $k_{LA}$  após a adição do vector n-dodecano e também um aumento na produção de biomassa de culturas de *Bacillus licheniformis* (Silva *et al.*, 2008)

#### **4.3.1.3. Modo de acção dos vectores de oxigénio**

Os vectores de oxigénio, ao serem adicionados ao meio de fermentação, vão originar 4 fases distintas: a fase gasosa (ar), a fase aquosa, a fase líquida orgânica e a fase sólida (biomassa), proporcionando assim a formação de novas áreas interfaciais entre as fases líquida e gasosa. Assim, a transferência de  $O_2$  poderá ser feita através de 5 vias diferentes. Pode ocorrer directamente para as células ou através do vector que poderá

estar, ou não, adsorvido à superfície das bolhas de ar. As células podem também se encontrar adsorvidas à superfície das bolhas ou do vector.

De todas os mecanismos existentes na literatura, o mais plausível será que a difusão de  $O_2$  do ar para as células microbianas ocorre através do vector e em seguida através da fase aquosa, assumindo que o vector está adsorvido à superfície das bolhas de ar (Cascaval *et al.*, 2006).

## **II . Material e Métodos**

### **1. Material**

#### **1.1. Microrganismos**

##### **1.1.1. Antagonista**

O microrganismo antagonista utilizado para este trabalho foi uma levedura do género *Metschnikowia* isolada da superfície de maçãs Bravo de Esmolfe pelo grupo de Patologia Pós-colheita e Controlo Biológico.

##### **1.1.2. Patogénio**

Foi utilizada uma estirpe de *Penicillium expansum*, pertencente ao grupo de Patologia Pós-Colheita e Controlo Biológico. A estirpe usada foi isolada a partir de maçãs podres após conservação frigorífica, e tem elevado poder patogénico em pomóideas.

#### **1.2. Material vegetal**

Para a realização dos ensaios de fruta usaram-se peras cv. ‘Rocha’ e maçãs cv. ‘Golden Delicious’ de pomares da região Oeste de Portugal. A fruta encontrava-se sã, não tendo recebido qualquer tratamento pós-colheita.

#### **1.3. Meios de Cultura**

##### **1.3.1. Meios de cultura comerciais**

Para a realização deste trabalho foram utilizados meios de cultura diferentes com funções distintas.

### **1.3.1.1. Nutrient Yeast Dextrose Agar (NYDA)**

Para a manutenção das culturas de levedura foi usado o meio NYDA com a seguinte constituição: caldo nutritivo 8 g/L; extracto de levedura 5 g/L; dextrose 10 g/L e agar 15 g/L. O pH do meio apresentava um valor de  $7\pm 0,2$  a 25° C.

### **1.3.1.2. Potato Dextrose Agar (PDA)**

O fungo *P. expansum* foi mantido e produzido em meio sólido PDA, apresentando o meio um valor de pH de  $5,6\pm 0,2$  a 25° C.

### **1.3.1.3. Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD)**

Os ensaios de crescimento da levedura foram efectuados em meio YPD com os seguintes constituintes: Extracto de levedura 10 g/L, peptona bacteriológica 20 g/L e dextrose 20 g/L. O meio apresentava um valor de pH de  $6,5\pm 0,2$  a 25° C.

## **1.3.2. Subprodutos da indústria agro-alimentar como meios de cultura**

Com o objectivo de minimizar os custos finais de produção de microrganismos, foi testado um subproduto e uma mistura de subprodutos da indústria agro-alimentar.

### **1.3.2.1. Licor de laranja + extracto de levedura**

Ao subproduto obtido a partir da prensagem dos resíduos resultantes do fabrico de sumo de laranja foi adicionado extracto de levedura a uma concentração 10 g/L.

### **1.3.2.2. Extracto de alfarroba + extracto de levedura**

Ao subproduto obtido a partir da alfarroba (vagem e outros resíduos) foi adicionado extracto de levedura a uma concentração de 10 g/L.

## **1.4. Solução tampão**

As diluições realizadas para cálculo das unidades formadoras de colónias (ufc's) foram feitas em tampão fosfato, de maneira a evitar problemas de osmose. Esta solução é composta por uma mistura de duas soluções, uma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (ácido) 0,2 M e outra de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (sal) 0,2 M, sendo que a solução final deverá apresentar uma molaridade de 0,05 e pH de 6,5. A solução tampão é preparada adicionando 70 mL da solução  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 30 mL da solução de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a 300 mL de água destilada.

## **2. Métodos**

### **2.1. Preparação dos meios de cultura**

#### **2.1.1. Meios de cultura comerciais**

Os meios de cultura comerciais foram preparados de acordo com as normas gerais de preparação de meios de cultura.

#### **2.1.2. Licor de laranja**

O processo de extracção do licor de laranja a partir da matéria-prima é moroso. O método utilizado inicialmente não era expedito e o produto obtido não era totalmente satisfatório, assim sendo, foi necessário otimizar o processo de extracção. De seguida vão ser descritos os dois métodos usados para a obter o licor de laranja.

##### **2.1.2.1. Primeiro processo**

Inicialmente foi realizada uma filtração grosseira do licor proveniente da fábrica. Essa filtração foi seguida de uma centrifugação (Hettich Zentrifugen, Universal 320) a 4500 rpm, durante 20 min. O sobrenadante foi retirado e filtrado com bomba de vácuo, usando filtros Whatman 1 e o pH do produto resultante deste processo foi acertado entre 5 e 6 com ácido cítrico a 1 M. Finalmente, o licor foi esterilizado por calor em autoclave (Uniclave 87), 121 °C durante 15 min, juntamente com o extracto de levedura,

verificando-se a formação de um precipitado, o qual não é compatível com algumas das análises que terão que ser realizadas posteriormente. De maneira a eliminar o precipitado, o meio foi novamente centrifugado (Beckman, Avanti J-14, Coulter) em frascos estéreis a uma velocidade de 7500 rpm durante 15 min (*Manso et al*, unpublished data). O meio resultante dessa centrifugação apresentava-se cristalino, no entanto, durante o ensaio realizado verificou-se o aparecimento de contaminações.

### **2.1.2.2. Segundo processo**

Este processo de extracção consiste na utilização de um filtro-prensa de placas e quadros (FT14 Plate and Frame Filter Press, Armfield) e de filtros (Beco) com diferentes porosidades. Este sistema de filtração tem capacidade para albergar 7 filtros, 200 mm x 200 mm, entre cada par de placas e quadros.

Esta optimização requereu várias tentativas de maneira a se encontrar os filtros mais indicados para a filtração do licor.

Inicialmente foram utilizados dois tipos de filtros com porosidades diferentes, K00 e KD7. Antes da filtração propriamente dita foi feita uma circulação de água quente pelo equipamento já montado, com o objectivo de abrir os poros para facilitar a passagem do licor, apresentando-se este, no final da filtração, com um aspecto cristalino. Este licor foi posteriormente filtrado com o auxílio de filtros 0,22 µm em bomba de vácuo (GAST) de maneira a fazer uma esterilização, no entanto verificou-se que os filtros colmatavam muito rapidamente, não sendo possível a esterilização através deste método.

Assim sendo, foi necessário arranjar outra estratégia e para isso foi feita uma tentativa de esterilização do sistema de filtração. O filtro-prensa foi esterilizado através da circulação de água quente (90-95 °C) durante 30 min, sendo que a temperatura da água à saída deveria ser de 85±1 °C. Durante a esterilização o tempo de passagem da água foi aumentado 10 min devido ao facto de à saída a água apresentar uma temperatura de 75 °C aproximadamente. Depois do processo concluído procedeu-se à filtração do licor com filtros sterile 40.

Para se verificar se a esterilização do sistema de filtração tinha sido bem sucedida, o licor foi plaqueado em meio NYDA a 25±1 °C de maneira a averiguar a existência de crescimento microbiano. Passadas 48 h verificou-se o aparecimento de colónias nas

placas que confirmaram a não eficácia do processo de esterilização, apesar de ter havido uma redução significativa, sendo então necessário retomar a esterilização por calor. Com o objectivo de minimizar a interferência do precipitado que se forma através da autoclavagem, o licor foi levado a esterilizar em frascos de 1000 mL e depois de autoclavado ficou a repousar para haver a deposição dos resíduos. Este método revelou-se eficaz visto que o licor usado para as fermentações se encontrava sem qualquer tipo de depósito.

Nas filtrações posteriores em filtro-prensa de placas e quadros foram utilizados filtros K00, KD7 e Sterile 40, sem a esterilização do sistema de filtração. A pressão foi sendo ajustada de acordo com os filtros que estavam a ser usados, sendo que para filtros com maior porosidade a pressão do sistema estava a 2 bar sendo diminuída à medida que a porosidade dos filtros diminuía.

### **2.1.3. Extracto de alfarroba**

O método de extracção da alfarroba já se encontra otimizado, sendo que para este passo do trabalho foi apenas necessário seguir o procedimento já descrito (Manso *et al.*, 2010).

As vagens de alfarroba fornecidas encontravam-se parcialmente processadas na forma de “kibble”. No laboratório foram à estufa a 50°C para secar de maneira ao processo de extracção dos açúcares ser mais eficiente. Depois de seca, a alfarroba foi moída até se obter uma farinha e posteriormente foi pesada para Erlenmeyers de 500 mL e a estes foi adicionada água até se obter uma concentração de 0,3% (p/v). Os Erlenmeyers foram a incubar a 25±1 °C com agitação de 150 rpm. O extracto assim obtido foi centrifugado (Beckman, Avanti J-14, Coulter) a 10000 rpm a uma temperatura de 4 °C durante 20 min e posteriormente foi feita uma filtração com bomba de vácuo utilizando filtros com uma porosidade de 0,45 µm.

## **2.2. Determinação do crescimento celular**

Com o objectivo de monitorizar e traçar a curva de crescimento da levedura antagonista foram realizadas várias análises que vão ser descritas de seguida.

### **2.2.1. Contagem de células cultiváveis**

O método utilizado foi o método Miles & Misra (1938). Este método consiste na inoculação em placa de uma gota com volume de 20  $\mu\text{L}$ . Foram feitas diluições seriadas das amostras em tubos de ensaio com tampão fosfato. Para obter diluições de 1:10 e 1:100, 500  $\mu\text{L}$  de amostra foram diluídos em 4,5 mL de tampão fosfato e 50  $\mu\text{L}$  de amostra foram diluídos em 5 mL de tampão fosfato, respectivamente. Entre cada diluição a suspensão foi homogeneizada. Posteriormente as diluições foram colocadas em placa com meio NYDA, a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  e a leitura das placas foi feita após 48 h. Para cada diluição foram colocadas 3 gotas de 20  $\mu\text{L}$ .

### **2.2.2. Espectrofotometria**

A espectrofotometria na gama do visível permite obter um parâmetro de densidade óptica que é indicador do crescimento celular. Neste caso, as amostras foram analisadas a um comprimento de onda de 590 nm. O aparelho (Thermo Electron Corporation, Genesys 10 vis) foi calibrado usando como branco uma amostra de meio. Sempre que foi necessário diluir a amostra, o meio de cultura utilizado como branco, também foi diluído.

Este método, contrariamente ao anterior, tem a desvantagem de não quantificar apenas as células viáveis, quantifica também fragmentos de células mortas, no entanto é um método simples cujos resultados são obtidos de imediato.

### **2.2.3. Determinação da biomassa**

Este parâmetro pode ser determinado através da biomassa fresca ou seca, dando apenas uma estimativa do número de células presentes na cultura.

Nos ensaios realizados em Erlenmeyer, 1,3 mL de amostra foram pipetados para eppendorfs de 1,5 mL previamente pesados. A amostra foi centrifugada (Eppendorf 5415 D) a 13200 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi retirado e congelado para uma posterior quantificação dos açúcares presentes no meio. Uma nova centrifugação foi feita, 30 segundos, para eliminar qualquer vestígio de meio que ainda se encontrasse no eppendorf. Finalmente os eppendorfs contendo as amostras foram pesados obtendo-

se assim o peso fresco das células. Para a determinação do peso seco, os eppendorfs foram a secar à estufa durante 48 h a  $60\pm 1$  °C e só depois pesados. Para cada Erlenmeyer as determinações dos pesos foram realizadas em duplicado.

Nos ensaios realizados em reactor biológico, as condições para a determinação destes parâmetros foram diferentes. Foram pipetados 2,5 mL de amostra para tubos de 15 mL. Todos os passos seguintes foram semelhantes aos anteriormente enunciados, à excepção das condições de centrifugação. As células foram centrifugadas a 4500 rpm durante 15 min.

## **2.3. Métodos Analíticos**

### **2.3.1. Quantificação de açúcares**

Para a quantificação de açúcares, recorreu-se ao método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O cromatógrafo usado (VWR Hitachi Elite LaChrom) é constituído por um detector (IR L-2490), uma bomba (L-2130), um forno (L-2300), um autoinjector (L-2200) e uma coluna (Purospher STAR NH<sub>2</sub>, Merck KGaA). O eluente (fase móvel) utilizado é constituído por 75% de acetonitrilo e 25% de água miliQ. Todas as amostras a serem analisadas foram centrifugadas como descrito anteriormente e filtradas com filtros de seringa de 25 mm e 0,2 µm de poro.

### **2.3.2. Monitorização do pH**

O pH dos meios de cultura e das soluções foi medido com um potenciómetro (Crison GLP 21 ou Crison Basic 2). Em todas as fermentações o pH foi ajustado a 5-6. Os ajustes de pH foram feitos com soluções ácidas e básicas de ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) 1 M e hidróxido de sódio (NaHO) 5 M.

### **2.3.3. Determinação da transferência de massa de oxigénio**

Antes de cada fermentação realizada em bioreactor foi determinado o  $K_{La}$ , ou coeficiente volumétrico de transferência de massa. Este coeficiente depende de vários

factores, entre eles o tipo de biorreactor, o tipo de meio e células e as condições de operação.

Neste trabalho, o  $K_{La}$  foi determinado através do método dinâmico. Este método consiste na desoxigenação total do meio com recurso a azoto na forma gasosa, seguida de arejamento que é acompanhado pelo registo do aumento da percentagem de  $O_2$  em intervalos periódicos.

## **2.4. Preparação do pré-inóculo**

A preparação do pré-inóculo consistiu na inoculação de colónias da levedura PBC-2 com 48 h, crescidas em placa de Petri contendo meio NYDA, a  $25 \pm 1$  °C, em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido YPD. Posteriormente, os frascos foram a incubar a  $25 \pm 1$  °C durante 24 h com uma agitação orbital de 150 rpm.

Com o objectivo de determinar a concentração do pré-inóculo, foi medida a absorvância. Esta correlação foi feita através de uma curva previamente realizada, que relaciona a densidade óptica em função das unidades formadoras de colónias.

## **2.5. Ensaios de Crescimento**

### **2.5.1. Ensaios em escala laboratorial realizados em Erlenmeyer**

#### **2.5.1.1. Diferentes concentrações de glucose**

Para a realização destes ensaios preliminares, o meio de cultura utilizado foi o meio líquido YPD. De modo a estudar o efeito da concentração de açúcares no crescimento e viabilidade da levedura, foram realizados ensaios com 5 concentrações de glucose diferentes (5, 10, 15, 20 e 40 g/L), em Erlenmeyers de 250 mL com um volume final de meio de 100 mL. Depois de feita a esterilização, os Erlenmeyers foram inoculados a uma concentração inicial de  $1 \times 10^5$  ufc/mL e foram a incubar a  $25 \pm 1$  °C com agitação orbital de 150 rpm. Foram recolhidas amostras no início da fermentação e passadas 12 h, a recolha foi feita a cada 3 h. Para cada amostra foram analisados os parâmetros descritos do ponto 2.2.1 ao ponto 2.3.3. O ensaio foi repetido 2 vezes e todos os ensaios

foram realizados em triplicado sendo a monitorização do pH feita num Erlenmeyer inoculado apenas para esse efeito.

### **2.5.1.2. Diferentes concentrações de açúcares no licor de laranja**

Para avaliar a eficácia do licor de laranja com o extracto de levedura como meio de crescimento e tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios realizados anteriormente, foram preparados ensaios com concentrações mais elevadas de açúcar, visto que, sendo o licor um excedente da indústria de transformação da laranja, é de interesse usar a maior quantidade de produto possível.

As condições e parâmetros estudados nestes ensaios foram semelhantes às descritas no ponto 2.5.1.1, exceptuando o volume final de meio que neste caso foi 150 mL. A fonte de carbono utilizada foi o licor de laranja a diferentes concentrações (12,5, 25,0, 37,5 e 50,0 g/L) e a fonte de azoto usada foi o extracto de levedura a 10 g/L. A esterilização dos componentes do meio foi feita em separado. Erlenmeyers contendo o extracto de levedura e frascos contendo o licor de laranja foram a esterilizar e só posteriormente foi feita a adição do licor de laranja aos Erlenmeyers em câmara de fluxo laminar (Faster BH-EN 2005).

### **2.5.1.3. Diferentes rácios de licor de laranja e extracto de alfarroba**

Nestes ensaios foi estudado o efeito da mistura de dois subprodutos da indústria agro-alimentar, sendo a concentração final de açúcares na mistura 50 g/L. Foram testados diferentes rácios, 25,0 g/L de licor de laranja + 25,0 g/L de extracto de alfarroba, 37,5 g/L de licor de laranja + 12,5 de extracto de alfarroba e 12,5 de licor de laranja + 37,5 de extracto de alfarroba.

As condições de crescimento e parâmetros analisados foram iguais às descritas nos dois ensaios anteriores, sendo o volume de meio utilizado 150 mL.

## **2.5.2. Ensaio realizados em Reactor Biológico**

### **2.5.2.1. Diferentes concentrações de açúcares no licor de laranja**

Tendo-se verificado que a estirpe de levedura estudada cresce a concentrações de açúcar elevadas, para os ensaios em reactor, foram estudadas duas concentrações altas, 50,0 g/L e 70,0 g/L.

Foi utilizado um bioreactor mecanicamente agitado (*BioBundle System, Applikon Biotechnology*) com um volume total de 3 L e um volume útil de 2,4 L. A agitação foi feita utilizando uma turbina de Rushton com seis lâminas e para o arejamento foi utilizado um dispersor em L. Com o objectivo de aliviar a pressão no interior do reactor foram usados dois condensadores.

Antes de cada esterilização foi feita a calibração das sondas de pH e O<sub>2</sub>. A sonda de O<sub>2</sub> foi também calibrada após a esterilização do sistema. A calibração foi feita depois do arrefecimento do reactor e da polarização da sonda, consistindo no arejamento do meio até à sua saturação, que é indicada pela estabilização da percentagem de O<sub>2</sub>. Foi registado o valor 100%. A sonda foi verificada depois da calibração. Esta verificação foi feita removendo todo o O<sub>2</sub> presente no meio através da adição de N<sub>2</sub> na sua forma gasosa. A monitorização da temperatura foi efectuada com uma sonda de temperatura e de maneira a manter a temperatura de fermentação estável foi utilizada uma manta de aquecimento.

Todas as variáveis foram monitorizadas e controladas através dos controladores *Bio Controller ADI 1010* e *Bio Console ADI 1025* e os dados adquiridos pelo software *BioXpert Lite, Applikon Biotechnology*.

A esterilização foi feita em autoclave a 121°C durante 20 min. O reactor foi autoclavado com o extracto de levedura e aproximadamente 300 mL de licor de laranja de maneira a que a extremidade das sondas ficasse submersa no meio. O restante licor de laranja foi esterilizado separadamente, devido à formação de precipitado e posteriormente foi adicionado com o auxílio de uma bomba peristáltica até se perfazer o volume de 2,4 L.

O reactor biológico foi inoculado com a levedura PBC-2 com a concentração inicial de  $1 \times 10^6$  ufc/mL.

As condições das fermentações para ambas as concentrações de açúcar foram iguais. Os ensaios foram executados a uma temperatura de  $25\pm 1$  °C, com uma agitação de 300 rpm e arejamento de 150 L/h.

Foram retiradas amostras no início da fermentação e, passadas 12 h, a cada 3 h. Os parâmetros estudados foram os mesmos que nos ensaios realizados em Erlenmeyer.

O anti-espuma foi adicionado antes da esterilização e ao longo da fermentação. Inicialmente foram acrescentados 1,5 mL ao meio e posteriormente, volumes inferiores, de acordo com a formação de espuma.

O ensaio com a concentração de açúcares de 50 g/L foi repetido 2 vezes.

### **2.5.2.2. Efeito do vector de O<sub>2</sub> n-dodecano**

Com o objectivo de melhorar a transferência de oxigénio dentro do reactor, visto este ser um parâmetro que influencia o crescimento das células, foi adicionado o vector de O<sub>2</sub> n-dodecano a uma fermentação usando o licor de laranja e extracto de levedura como meio de cultivo a uma concentração de 50 g/L e 10 g/L respectivamente.

O n-dodecano foi adicionado antes do meio ser esterilizado, a uma concentração de 1% (v/v).

Todas as condições e parâmetros estudados foram iguais aos mencionados no ponto 2.5.2.1.

O ensaio foi repetido 2 vezes.

## **2.6. Avaliação da capacidade antagónica da levedura PBC-2**

Estes ensaios tiveram como objectivo determinar a capacidade antagónica da levedura PBC-2 sobre *Penicillium expansum* em peras cv. 'Rocha' e maçãs cv. 'Golden Delicious'.

### **2.6.1. Preparação do microrganismo patogénico (*Penicillium expansum*)**

O agente patogénico *P. expansum* foi mantido em meio PDA a  $25\pm 1$  °C e repicado periodicamente. Foram retirados esporos de uma placa com 8 dias para tubos de ensaio com água destilada e Tween 80. Foram a agitar durante 3 minutos de maneira a uniformizar a suspensão. A contagem dos esporos foi feita com a ajuda de um hemacitómetro, recorrendo-se posteriormente à diluição da suspensão em água destilada contendo Tween 80 de modo a obter-se uma concentração de  $1 \times 10^4$  esporos/mL.

### **2.6.2. Preparação do microrganismo antagonista**

Foi realizada uma fermentação em bioreactor para produção de biomassa, usando o licor de laranja como meio de cultivo com uma concentração de 50,0 g/L em açúcares. A fermentação foi interrompida no fim da fase exponencial de crescimento das leveduras, quando estas se encontravam à concentração máxima.

O meio de cultura contendo a biomassa foi recolhido e centrifugado a uma velocidade de 7500 rpm, a 12°C durante 15 min. O sobrenadante foi rejeitado e as células foram ressuspendidas em tampão fosfato sendo centrifugadas de novo. O sobrenadante foi novamente rejeitado e o processo de ressuspensão das células foi repetido de maneira retirar todo o meio das células. A concentração da suspensão foi determinada através da inoculação em placa contendo meio NYDA. As placas foram incubadas a  $25\pm 1$  °C, tendo sido lidas após 24-48 h.

### **2.6.3. Ensaio de eficácia**

Para a realização destes ensaios foram preparadas suspensões de patogénio a uma concentração de  $1 \times 10^4$  esporos/mL e de antagonista a  $1 \times 10^7$  ufc/mL.

Os frutos, após terem sido retirados das câmaras frigoríficas, foram colocados em caixas de plástico, lavados e deixados a secar *overnight*. No dia seguinte, com o auxílio de uma agulha, foram feitas duas feridas por fruto com 2 mm de profundidade e 1 mm de diâmetro. Posteriormente foram mergulhados durante 30 s na suspensão contendo o

antagonista. Os frutos foram deixados a secar e depois mergulhados na suspensão contendo *P. expansum* durante 30 s.

Os frutos foram armazenados a  $1 \pm 0,5$  °C com humidade relativa de  $85 \pm 5\%$  durante aproximadamente 3 meses. Após este período, foram retirados das câmaras frigoríficas e armazenados a  $20 \pm 1$  °C. No caso das peras cv. 'Rocha', as leituras de severidade e incidência foram feitas após 2 e 7 dias, enquanto que as leituras das maçãs cv. 'Golden Delicious' foram feitas passados 7 dias.

Frutos inoculados apenas com *P. expansum* foram usados como controlo. Foram usados 40 frutos por replicado e 3 replicados por tratamento.

## **2.7. Dinâmica populacional**

Com o objectivo de estudar a sobrevivência do microrganismo antagonista nos frutos, foram realizados ensaios de dinâmica populacional.

Para a realização destes ensaios, os frutos foram preparados, como descrito no ponto 2.6.3., com a excepção do número de feridas, que neste caso foram 4 por fruto.

Os frutos foram banhados na suspensão de levedura conforme descrito anteriormente.

No caso das maçãs cv. 'Golden Delicious' foram retiradas 25 rodela de casca por fruto, com um diâmetro de 17 cm, com o auxílio de um saca-bocados estéril. As rodela foram colocadas em Erlenmeyers de 500 mL, contendo 100 mL de tampão fosfato estéril, e foram a agitar a uma velocidade de 150 rpm durante 20 min, posteriormente foram colocados num banho de ultrasons (P Selecta Ultrasons), com o objectivo de libertar os microrganismos da casca das maçãs.

No que diz respeito às peras cv. 'Rocha', foram retiradas 20 rodela por fruto, com um diâmetro de 13 cm. Foram colocadas em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de tampão fosfato estéril. As condições de agitação e do banho de ultra-sons foram iguais às utilizadas para os ensaios com maçãs.

Para ambos os frutos foram feitas diluições de cada solução contida nos Erlenmeyers, tendo sido plaqueadas em meio NYDA e incubadas a  $25 \pm 1$  °C durante 48 h, procedendo-se seguidamente à contagem das colónias em placa para o cálculo de ufc/cm<sup>2</sup>.

Foram realizadas 4 repetições com 4 frutos cada, tanto no caso das maçãs como das peras.

## **2.8. Análise Estatística**

Os ensaios foram feitos em triplicado e sujeitos a análise usando o software SPSS (SPSS Inc., versão 19 para Windows, Chicago, IL). Os resultados dos ensaios de crescimento da levedura PBC-2 foram submetidos a análise de variância e separação de médias usando o *Duncan's Multiple Range Test* ( $P < 0,05$ ).

Os resultados de incidência e severidade foram também submetidos a análise de variância. Os dados de incidência foram transformados sendo a análise efectuada ao valor do arco seno da raiz quadrada das proporções.

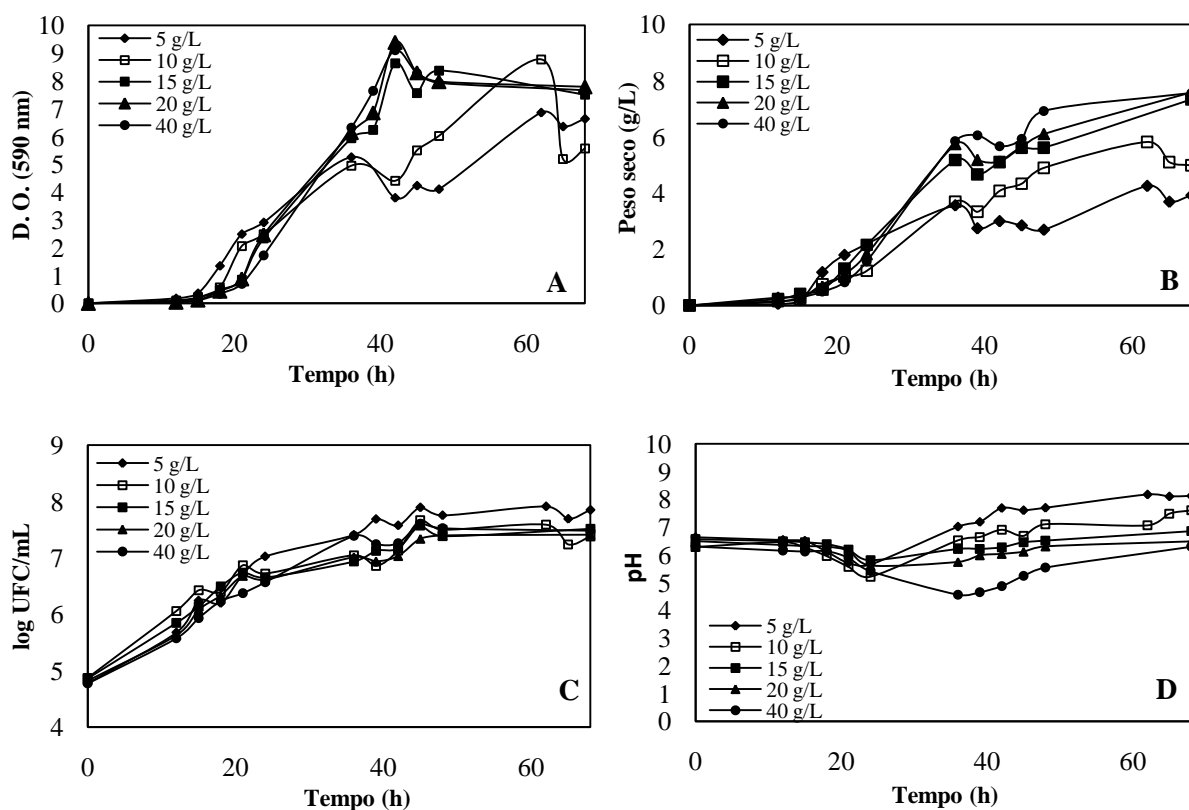
### III . Resultados

#### 1. Ensaios de crescimento em Erlenmeyer da levedura

##### *Metschnikowia* sp. PBC-2.

#### 1.1. Efeito de diferentes concentrações de glucose na produção do agente de controlo biológico.

Inicialmente foram realizados ensaios preliminares em Erlenmeyer. A fonte de carbono usada para o crescimento da levedura PBC-2 foi a glucose. Foram testadas diferentes concentrações deste açúcar, 5, 10, 15, 20 e 40 g/L como fonte de carbono. A fonte de azoto usada foi extracto de levedura a 10g/L. A fermentação decorreu durante 68 h.



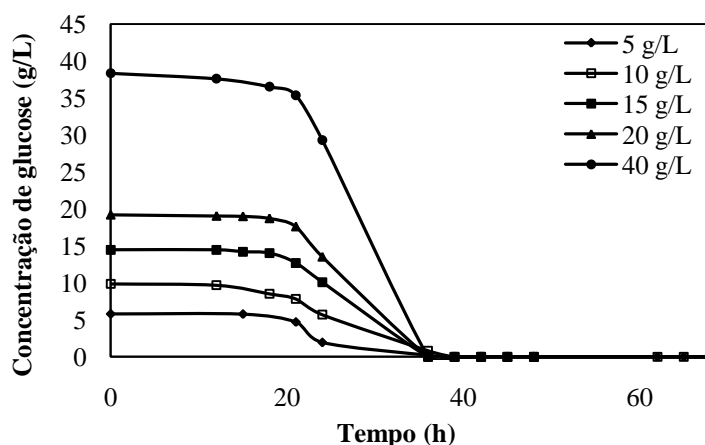
**Fig 1.1:** Perfis de crescimento da levedura *Metschnikowia* sp.PBC-2 a 25 °C com agitação de 150 rpm, usando glucose e extracto de levedura como fontes de carbono e azoto, respectivamente, expressos em densidade óptica (A), peso seco (B) e log ufc/mL (C) e variação do pH (D) ao longo do tempo.

Analisando os resultados verifica-se que todas as concentrações de glucose testadas e a fonte de azoto escolhida são favoráveis ao crescimento do microrganismo. Nos perfis de

crescimento correspondentes ao peso seco e à densidade óptica verifica-se que o crescimento celular é mais acentuado quando são utilizadas concentrações de glucose mais elevadas (15, 20 e 40 g/L), atingindo ao fim de 68 h a mesma biomassa expressa em peso seco. No que diz respeito às curvas de crescimento expressas em ufc/mL, há uma maior quantidade de células viáveis quando se usa a menor concentração de glucose. As concentrações máximas em ufc/mL para 5, 10, 15, 20 e 40 g/L glucose são  $8,2 \times 10^7$ ,  $4,7 \times 10^7$ ,  $3,7 \times 10^7$ ,  $2,6 \times 10^7$  e  $3,3 \times 10^7$  ufc/mL respectivamente (Tabela 1.1).

No gráfico correspondente ao pH observa-se um decréscimo a partir das 18-21 h, que corresponde à fase exponencial. A diminuição mais acentuada verifica-se na fermentação com uma concentração de glucose de 40 g/L, enquanto que as concentrações de 15 e 20 g/L apresentam as menores variações de pH ao longo das 68 h de fermentação.

A quantificação de açúcares, neste caso apenas a glucose, ao longo do tempo foi realizada por HPLC e está representada na figura 1.2.



**Fig 1.2:** Perfis de consumo de glucose pela levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2 ao longo do tempo.

Analisando os perfis de consumo de glucose acima representados, verifica-se um maior consumo deste açúcar a partir das 21 h de fermentação, coincidindo com a fase exponencial de crescimento da levedura. Às 36 h observa-se um consumo total da glucose em todas as concentrações testadas.

**Tabela 1.1:** Taxa específica de crescimento, rendimento à biomassa, produtividade máxima, biomassa máxima ufc/mL máximo da levedura *Metschnikowia* sp .PBC-2 crescida em Erlenmeyer em meio com diferentes concentrações de glucose e extracto de levedura a 10 g/L, a 25°C com agitação de 150 rpm.

|               | $\mu\text{g (h}^{-1}\text{)}$ | $Y_{x/s}$ (g/g) | $P_{\text{máx}}$ (g/Lh) | $X_{\text{máx}}$ (g/L) | $X_{\text{máx}}$ (ufc/mL) |
|---------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|
| <b>5 g/L</b>  | 0,057±0,005a                  | 0,676±0,07a     | 0,069±0,006a            | 4,384±0,307a           | 8,2×10 <sup>7</sup> a     |
| <b>10 g/L</b> | 0,088±0,011b                  | 0,470±0,064bc   | 0,094±0,005b            | 5,821±0,311b           | 4,7×10 <sup>7</sup> b     |
| <b>15 g/L</b> | 0,088±0,018b                  | 0,507±0,03b     | 0,108±0,008c            | 7,333±0,556c           | 3,7×10 <sup>7</sup> b     |
| <b>20 g/L</b> | 0,117±0,016c                  | 0,395±0,017c    | 0,112±0,005c            | 7,590±0,320c           | 2,6×10 <sup>7</sup> b     |
| <b>40 g/L</b> | 0,136±0,015c                  | 0,198±0,008d    | 0,111±0,006c            | 7,564±0,424c           | 3,3×10 <sup>7</sup> b     |

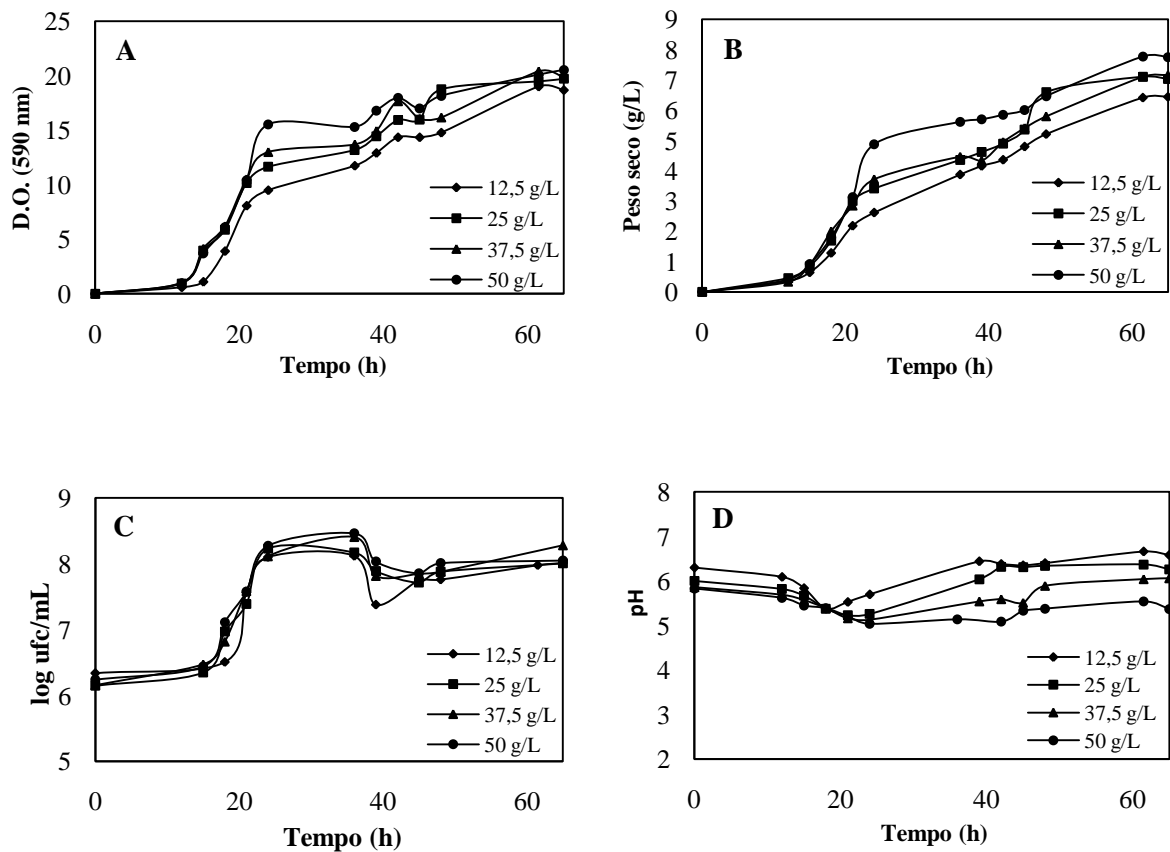
Os valores apresentados são médias ± desvio padrão de 3 replicados. Valores nas mesmas colunas, seguidos das mesmas letras não são estatisticamente diferentes segundo o *Duncan's Multiple Range Test* ( $P < 0,005$ ).

Os dados relativos à taxa específica de crescimento ( $\mu\text{g}$ ) indicam que as concentrações mais elevadas apresentam os melhores resultados no que diz respeito a este parâmetro, no entanto, é nestas concentrações que se encontram rendimentos à biomassa mais baixos. Os valores de produtividade e biomassa máximos revelam-se superiores nos ensaios realizados com concentrações mais elevadas de glucose.

## **1.2. Efeito de diferentes concentrações de açúcar no licor de laranja na produção do agente de controlo biológico**

O estudo da capacidade da levedura *Metschnikowia* sp. (PBC-2) usar o licor de laranja como fonte de carbono foi realizado inicialmente em Erlenmeyer e foram testadas 4 concentrações diferentes de açúcar, 12,5, 25,0, 37,5 e 50,0 g/L.

Os perfis de crescimento da levedura usando como meio de cultura licor de laranja e extracto de levedura a 10 g/L vão ser apresentados de seguida.

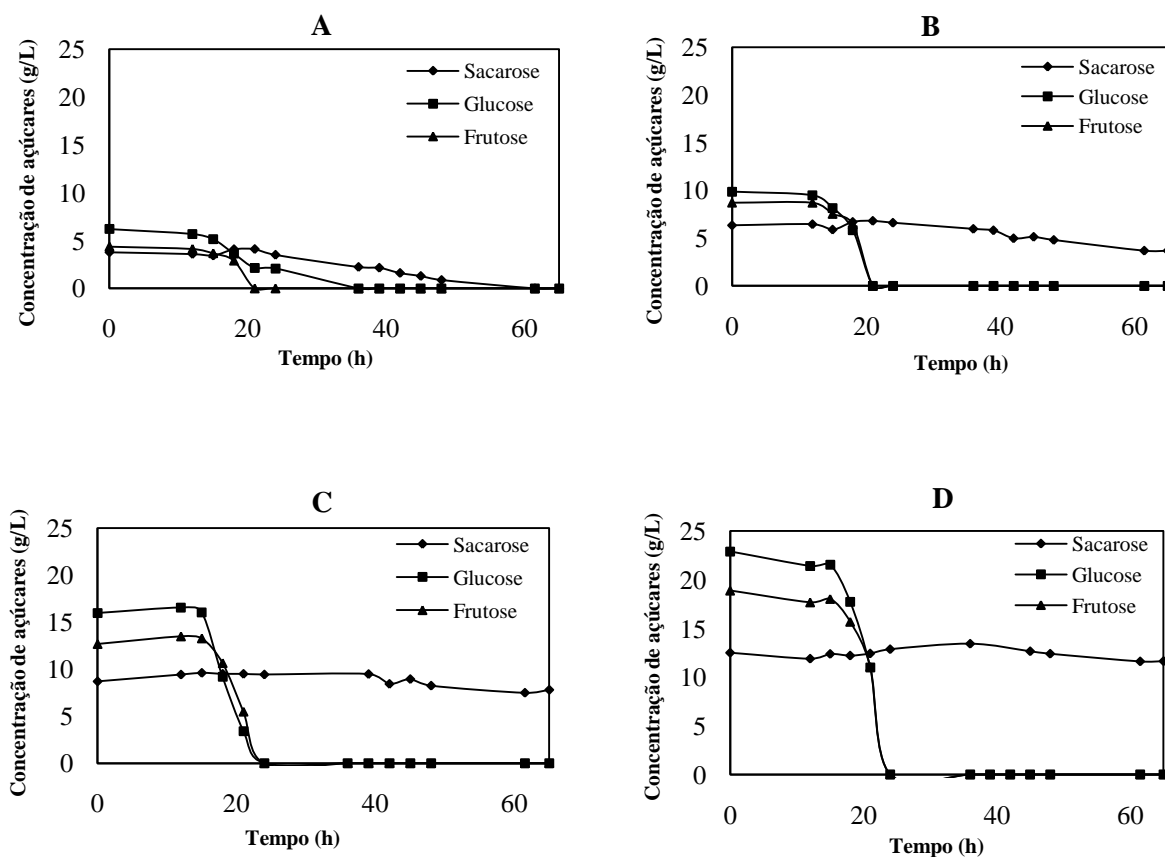


**Fig 1.3:** Perfis de crescimento da levedura *Metschnikowia* sp.PBC-2 a 25 °C com agitação de 150 rpm, usando licor de laranja e extracto de levedura como fontes de carbono e azoto, respectivamente, expressos em densidade óptica (A), peso seco (B) e log ufc/mL (C) e variação do pH (D) ao longo do tempo.

Observando a figura 1.3 pode verificar-se que o uso de licor de laranja como fonte de carbono é viável, tendo em conta o crescimento da levedura nas respectivas concentrações de licor usadas. Analisando os gráficos correspondentes às leituras de densidade óptica, peso seco e log ufc/mL é notória a capacidade de crescimento do microrganismo quando são usadas elevadas concentrações dos açúcares presentes no licor. Pode observar-se uma maior fase de latência no crescimento a 5 g/L, sendo que o maior crescimento se verifica à concentração de 50 g/L. As concentrações máximas expressas em ufc/mL ocorrem às 36 h de fermentação.

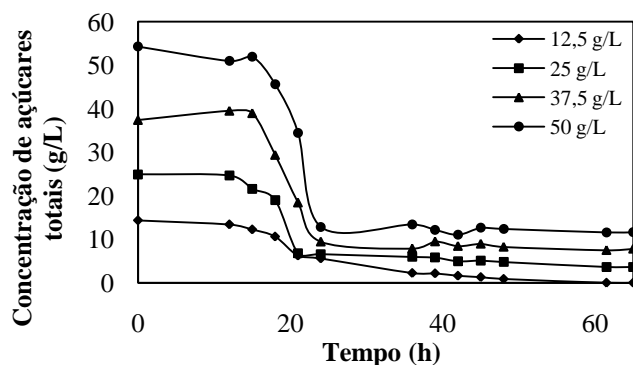
No gráfico correspondente à monitorização do pH verifica-se o perfil característico ao longo de uma fermentação. O pH decresce a partir das 12 h de fermentação até às 21 h, com excepção para a concentração de 5 g/L onde os valores começam a aumentar às 18 h.

O licor de laranja apresenta maioritariamente na sua composição 3 tipos de açúcares que podem ser consumidos pela levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2. De seguida vão ser apresentados os perfis de consumo de glucose, frutose e sacarose.



**Fig 1.4:** Perfis de consumo de sacarose, glucose e frutose ao longo da fermentação. Os gráficos A, B, C e D representam respectivamente as concentrações 12,5 g/L, 25,0 g/L, 37,5 g/L e 50,0 g/L.

Observando a figura acima representada pode verificar-se que há consumo total dos açúcares apenas à concentração mais baixa. Nos restantes casos há o consumo total de glucose e frutose, verificando-se assim a preferência deste microrganismo para estes açúcares.



**Fig 1.5:** Perfis de consumo dos açúcares totais para as 4 concentrações testadas ao longo do tempo.

Os perfis de consumo de açúcares totais evidencia o facto de não existir um consumo total dos açúcares disponíveis ao longo do tempo, com a excepção da concentração 12,5 g/L, onde ao fim de 48 h de fermentação existem apenas vestígios de sacarose com uma concentração de 0,87 g/L.

**Tabela 1.2:** Taxa específica de crescimento, rendimento à biomassa, produtividade máxima, biomassa máxima e ufc/mL máximo da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2 crescida em Erlenmeyer em licor de laranja com diferentes concentrações de açúcares e extracto de levedura a 10 g/L, a 25°C com agitação de 150 rpm.

|                 | $\mu\text{g (h}^{-1}\text{)}$ | $Y_{x/s}$ (g/g) | $P_{\text{máx}}$ (g/Lh) | $X_{\text{máx}}$ (g/L) | $X_{\text{máx}}$ (ufc/mL) |
|-----------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|
| <b>12,5 g/L</b> | 0,159±0,028a                  | 0,449±0,015a    | 0,103±0,053a            | 6,539±0,204a           | 1,3×10 <sup>8</sup> a     |
| <b>25 g/L</b>   | 0,219±0,047b                  | 0,331±0,014b    | 0,121±0,012ab           | 7,539±0,601b           | 1,7×10 <sup>8</sup> ab    |
| <b>37,5 g/L</b> | 0,156±0,022a                  | 0,242±0,007c    | 0,114±0,009ab           | 7,231±0,335ab          | 2,5×10 <sup>8</sup> bc    |
| <b>50 g/L</b>   | 0,185±0,015b                  | 0,182±0,08d     | 0,124±0,01b             | 7,872±0,424b           | 2,9×10 <sup>8</sup> c     |

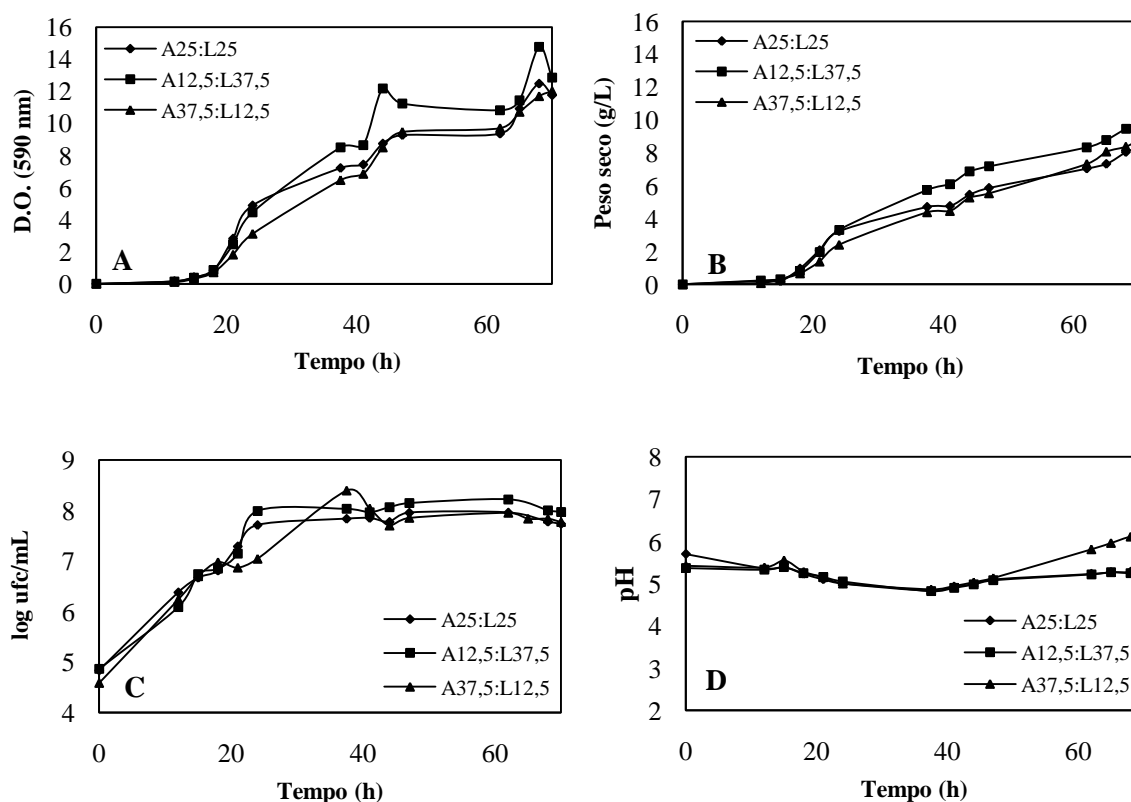
Os valores apresentados são médias ± desvio padrão de 3 replicados. Valores nas mesmas colunas, seguidos das mesmas letras não são estatisticamente diferentes segundo o *Duncan's Multiple Range Test* ( $P < 0,005$ ).

Uma análise global dos parâmetros acima apresentados indica que os resultados mais favoráveis se observam à concentração de 50 g/L. Existem no entanto excepções. Os resultados correspondentes ao rendimento à biomassa são significativamente diferentes nas 4 concentrações testadas, sendo o maior rendimento obtido para a concentração de açúcar mais baixa.

### 1.3. Efeito de diferentes rácios de licor de laranja e extracto de alfarroba na produção do agente de controlo biológico

Nestes ensaios, foram testados rácios de licor de laranja e alfarroba, para estudar o efeito da mistura no crescimento da levedura PBC-2. Foram testados 3 rácios diferentes, 25,0 g/L de licor de laranja + 25,0 g/L de extracto de alfarroba, 37,5 g/L de licor de laranja + 12,5 g/L de extracto de alfarroba e 12,5 g/L de licor de laranja + 37,5 g/L de extracto de alfarroba.

De seguida são apresentados os perfis de crescimento e a variação de pH ao longo do tempo dos 3 diferentes rácios testados.



**Fig 1.6:** Perfis de crescimento da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2, a 20°C com agitação de 150 rpm, usando licor de laranja e extracto de alfarroba como fontes de carbono e extractos de levedura como fonte de azoto, expressos em densidade óptica (A), peso seco (B) e log ufc/mL (C) e variação do pH (D) ao longo do tempo.

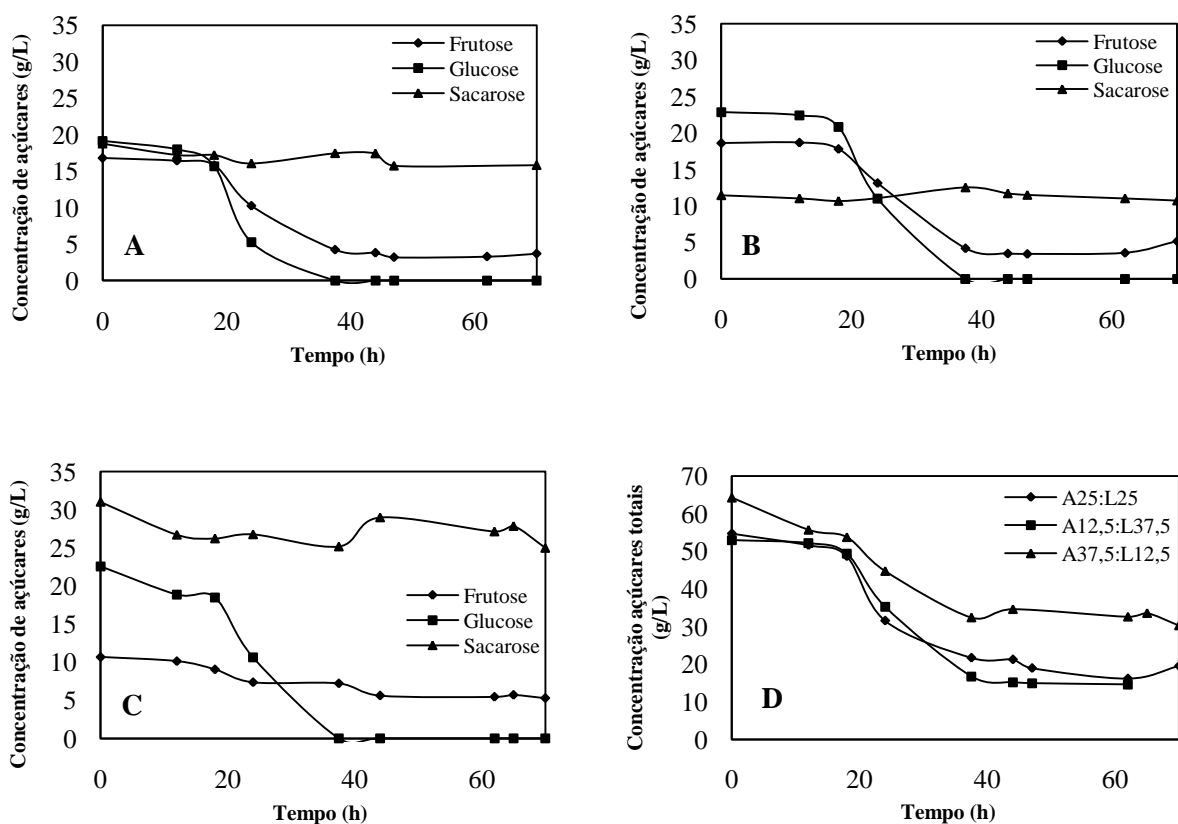
Analisando os gráficos correspondentes à densidade óptica e ao peso seco verifica-se que a fase de latência é semelhante para os 3 rácios testados, no entanto, observa-se que

o rácio 37,5 g/L de licor de laranja e 12,5 de extracto de alfarroba é mais favorável ao crescimento celular.

No que diz respeito às células viáveis, para os rácios 25,0 g/L de alfarroba+25,0 g/L de licor de laranja e 12,5 g/L de alfarroba+37,5 g/L de licor de laranja testados a concentração máxima é atingida às 62 h, sendo de  $9,1 \times 10^7$  e  $1,7 \times 10^8$  ufc/mL respectivamente, enquanto que para o rácio 37,5 g/L de alfarroba+12,5 g/L de licor de laranja, a concentração máxima foi atingida às 37,5 h sendo de  $3,4 \times 10^8$  ufc/mL.

Observando o gráfico correspondente ao pH é visível uma maior variação deste parâmetro ao longo do tempo para o rácio 37,5 g/L de alfarroba+12,5 g/L de licor de laranja. O decréscimo do pH ocorre durante a fase exponencial de crescimento celular, como seria o esperado.

Nos perfis de consumo de açúcares abaixo apresentados na figura 1.7 constata-se que a frutose e a glucose são os açúcares consumidos enquanto que a sacarose se mantém constante ao longo do tempo, não sendo consumida nestas condições pelo microrganismo.



**Fig 1.7:** Perfis de consumo de açúcares presentes no licor de laranja e extracto de alfarroba ao longo do tempo. Os gráficos A, B e C correspondem aos rácios 25,0 g/L de licor de laranja + 25,0 g/L de extracto

de alfarroba, 37,5 g/L de licor de laranja + 12,5 de extracto de alfarroba e 12,5 de licor de laranja + 37,5 de extracto de alfarroba, respectivamente. O gráfico D corresponde aos açúcares totais de todos os rácios testados.

**Tabela 1.3:** Taxa específica de crescimento, rendimento à biomassa, produtividade máxima, biomassa máxima e ufc/mL máximo da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2 crescida em Erlenmeyer, usando como fonte de carbono diferentes rácios de licor de laranja e extracto de alfarroba com uma concentração final de açúcares de 50 g/L e extracto de levedura a 10 g/L, a 25°C com agitação de 150 rpm.

|                        | $\mu\text{g (h}^{-1}\text{)}$ | $Y_{x/s}$ (g/g) | $P_{\text{máx}}$ (g/Lh) | $X_{\text{máx}}$ (g/L) | $X_{\text{máx}}$ (ufc/mL) |
|------------------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|
| <b>A25:L25 g/L</b>     | 0,209±0,012a                  | 0,244±0,015a    | 0,123±0,007a            | 8,590±0,524a           | 9,1×10 <sup>7</sup> a     |
| <b>A12,5:L37,5 g/L</b> | 0,236±0,046a                  | 0,262±0,004a    | 0,138±0,002b            | 9,692±0,154b           | 1,7×10 <sup>8</sup> ab    |
| <b>A37,5:L12,5 g/L</b> | 0,240±0,055a                  | 0,259±0,011a    | 0,126±0,005a            | 8,821±0,364a           | 3,4×10 <sup>8</sup> b     |

Os valores apresentados são médias ± desvio padrão de 3 replicados. Valores nas mesmas colunas, seguidos das mesmas letras não são estatisticamente diferentes segundo o *Duncan's Multiple Range Test* ( $P < 0,005$ ).

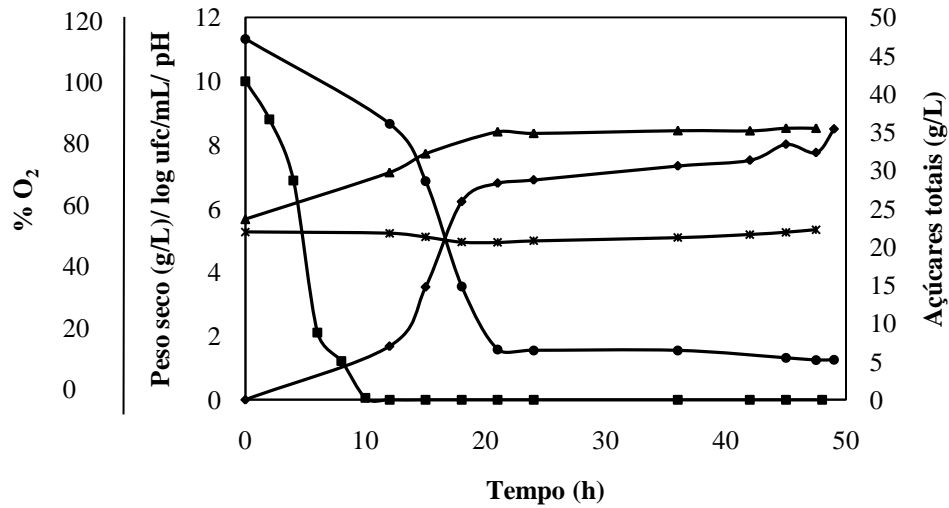
Nos dados apresentados na tabela 1.3 relativos à taxa específica de crescimento e rendimento à biomassa não se verificam diferenças significativas para os diferentes rácios testados, no entanto para os outros parâmetros estudados, o rácio 12,5 g/L de extracto de alfarroba + 37,5 g/L de licor de laranja apresenta resultados estatisticamente superiores.

## **2. Ensaio de crescimento em reactor biológico, usando licor de laranja como fonte de carbono, da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2.**

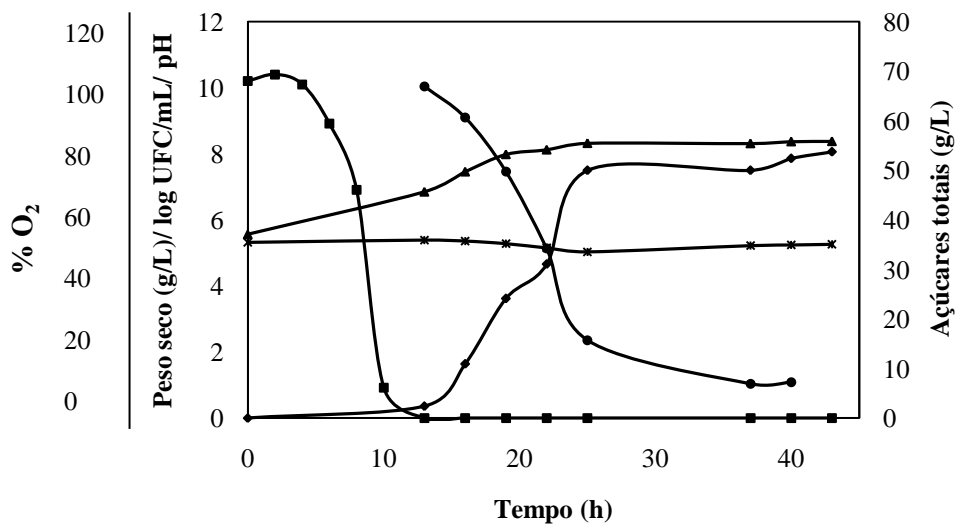
### **2.1. Ensaio realizados com diferentes concentrações de açúcar.**

Foram escolhidas elevadas concentrações de açúcares, 50 e 70 g/L, presentes no licor de laranja para o *scale-up* do processo de produção, visto que nos ensaios anteriormente realizados em Erlenmeyer se obteve um bom crescimento às concentrações mais elevadas. Os ensaios foram realizados em reactor biológico mecanicamente agitado de 3

L, equipado com uma turbina de Rushton e com um dispersor em L. os resultados estão apresentados nas figuras 2.1 e 2.2.



**Fig 2.1:** Perfis de crescimento em reactor biológico da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2 para uma concentração de açúcares de 50 g/L, expressos em peso seco (losangos) e log ufc/mL (triângulos), variação do pH (asterisco), concentração de O<sub>2</sub> (quadrados) e consumo de açúcares (círculos) ao longo do tempo.



**Fig 2.2:** Perfis de crescimento em reactor biológico da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2 para uma concentração de açúcares de 70 g/L, expressos em peso seco (losangos) e log ufc/mL (triângulos),

variação do pH (asterisco), concentração de O<sub>2</sub> (quadrados) e consumo de açúcares (círculos) ao longo do tempo.

Analisando os parâmetros apresentados no gráfico da figura 2.1 verifica-se um crescimento exponencial até às 18 h de fermentação, sendo este resultado evidenciado pelas curvas de crescimento expressas em peso seco e log ufc/mL. Observa-se também que é durante a fase exponencial de crescimento celular que existe um maior consumo de açúcares, sendo que a partir das 21 h o consumo de açúcares pára, mantendo-se constante até ao fim da fermentação. A variação do pH é mínima.

O oxigénio diminui ao longo do tempo como resultado da respiração celular, e embora esteja sempre presente no meio de cultura torna-se indetectável ao fim de apenas 10 h de fermentação, pelo facto de a taxa de consumo de oxigénio ser superior à taxa de transferência.

A figura 2.2, relativa ao ensaio com 70 g/L de fonte de carbono, comparativamente com o gráfico analisado anteriormente, apresenta uma maior fase de latência e uma fase exponencial que dura até às 25 h de fermentação. Apesar de ter uma fase exponencial mais longa, no final, a biomassa, expressa em peso seco, é superior na concentração de 50 g/L, tal como as células cultiváveis, tendo estas uma concentração de  $3,4 \times 10^8$  e  $2,4 \times 10^8$  ufc/mL para as concentrações 50 e 70 g/L, respectivamente. O consumo de açúcares mais activo ocorre durante a fase exponencial de crescimento, observando-se uma estagnação às 36 h. Tal como nos ensaios realizados em Erlenmeyer, observa-se que a sacarose não é consumida. Tal como se verifica no ensaio com 50 g/L a variação de pH é pouco significativa. O consumo de oxigénio ocorre durante as primeiras horas de fermentação, sendo totalmente consumido ao fim de 13 h.

## **2.2. Efeito do vector n-dodecano em fermentação realizada com uma concentração de açúcares de 50 g/L**

Com o objectivo de testar o efeito do vector n-dodecano na capacidade de crescimento celular, foram realizados ensaios em reactor biológico. Tendo em conta os resultados das fermentações anteriores a concentração de açúcares escolhida foi de 50 g/L. Todas as condições foram semelhantes às dos ensaios realizados anteriormente com a excepção da adição do vector.

O gráfico 2.3 apresenta os parâmetros estudados.

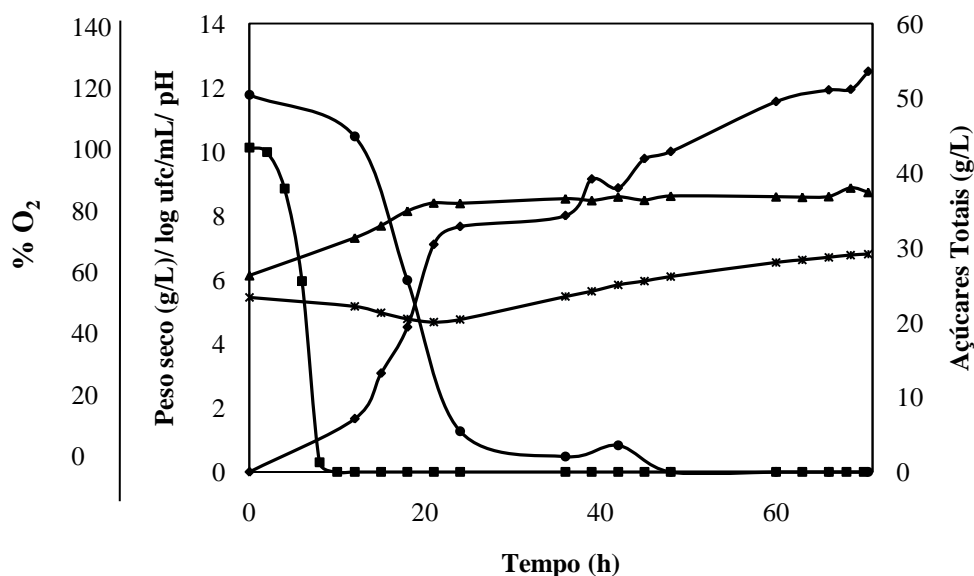


Fig 2.3: Perfis de crescimento em reactor biológico da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2 para uma concentração de açúcares de 50 g/L, com adição do vector n-dodecano a 1%, expressos em Peso seco (losangos) e log ufc/mL (triângulos), variação do pH (asterisco), concentração de O<sub>2</sub> (quadrados) e consumo de açúcares (círculos) ao longo do tempo.

Analisando os parâmetros de crescimento celular expressos em peso seco e log ufc/mL verifica-se que a fase exponencial decorre até às 21 h de fermentação, sendo acompanhada pelo consumo de açúcares, que se esgotam totalmente às 48 h, contrariamente ao que se verifica nas outras fermentações realizadas.

No que diz respeito à concentração expressa em unidades formadoras de colónias, o valor máximo,  $7,3 \times 10^8$  ufc/mL é registado às 68,5 h. Os valores de peso seco são superiores aos dos restantes ensaios realizados em reactor biológico, sendo a concentração máxima de 12,5 g/L atingida no final da fermentação.

O consumo de oxigénio, tal como se verifica nos ensaios de crescimento anteriormente analisados, ocorre durante as primeiras horas da fermentação e está totalmente esgotado ao fim de 10 h.

Relativamente ao pH, verifica-se uma maior variação ao longo do tempo, comparativamente com as fermentações realizadas sem a adição do vector n-dodecano.

**Tabela 2.1:**  $K_{La}$  inicial, taxa respiratória, taxa específica de crescimento, rendimento à biomassa, produtividade máxima, biomassa máxima e ufc/mL máximo da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2 crescida em reactor biológico com licor de laranja a diferentes concentrações de açúcares e extracto de levedura a 10 g/L e com adição do vector n-dodecano, a 25°C com agitação de 300 rpm e arejamento de 150 L/h.

|   | $K_{La}$ inicial<br>( $h^{-1}$ ) | Taxa<br>respiratória<br>( $\mu\text{mol}/\text{min.L}$ ) | $\mu\text{g}$ ( $h^{-1}$ ) | $Y_{x/s}$ (g/g) | $P_{\text{máx}}$ (g/Lh) | $X_{\text{máx}}$ (g/L) | $X_{\text{máx}}$<br>(ufc/mL) |
|---|----------------------------------|--|----------------------------|-----------------|-------------------------|------------------------|------------------------------|
| <b>50 g/L</b>                           | 15,264                           | 6,495  | 0,218                      | 0,202           | 0,173                   | 8,500                  | $3,4 \times 10^8$            |
| <b>70 g/L</b>                           | 13,974                           | 4,771  | 0,160                      | 0,128*          | 0,22                    | 8,060                  | $2,8 \times 10^8$            |
| <b>50 g/L</b><br>+<br><b>n-dodecano</b> | 13,776                           | 8,214  | 0,158                      | 0,248           | 0,177                   | 12,500                 | $7,3 \times 10^8$            |

\* Para o cálculo do rendimento foi considerada uma concentração inicial de 70 g/L de substrato.

Com a adição do vector n-dodecano verifica-se um aumento da taxa respiratória, rendimento à biomassa e biomassa máxima. Para a concentração de 70 g/L o único parâmetro que é superior é a produtividade máxima, enquanto que na concentração de 50 g/L se obtém a maior  $\mu\text{g}$ .

### 3. Ensaios de eficácia

Depois de ser avaliada a capacidade da levedura PBC-2 em usar o licor de laranja e o extracto de alfarroba como fonte de carbono e de terem sido encontradas as melhores condições para o seu crescimento foram realizados ensaios de eficácia em condições semi-comerciais, para testar a capacidade antagonista do microrganismo relativamente ao agente patogénico *P. expansum*. Os ensaios foram realizados em maçãs cv. ‘Golden Delicious’ e peras cv. ‘Rocha’.

Depois de terem estado a 4°C durante aproximadamente 3 meses, os frutos foram colocados em câmaras a 20 °C e os resultados de severidade e incidência foram lidos após 2 e 7 dias no caso das peras e 7 dias no caso das maçãs.

Os frutos foram observados individualmente e foram contabilizadas as feridas que apresentavam podridão e a qual o seu diâmetro.

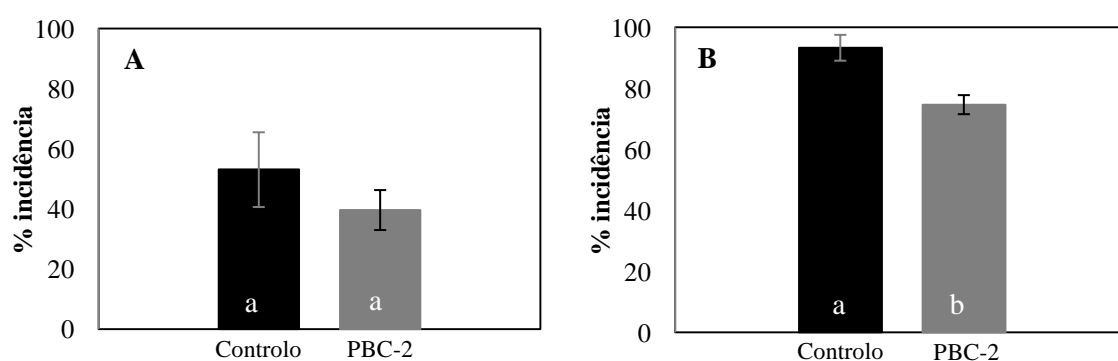
Foram também realizados ensaios de dinâmica populacional com o intuito de verificar a capacidade do agente de controlo biológico de aderir à superfície dos frutos. A

população inicial de células viáveis à superfície dos frutos é de  $2,4 \times 10^3$  e  $3 \times 10^3$  ufc/cm<sup>2</sup> para maçãs e peras respectivamente.

### 3.1. Ensaio em peras



**Fig 3.1:** Peras cv. ‘Rocha’ após 7 dias a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . **A:** sem aplicação de *Metschnikowia* sp. PBC-2, **B:** com aplicação de *Metschnikowia* sp. PBC-2.

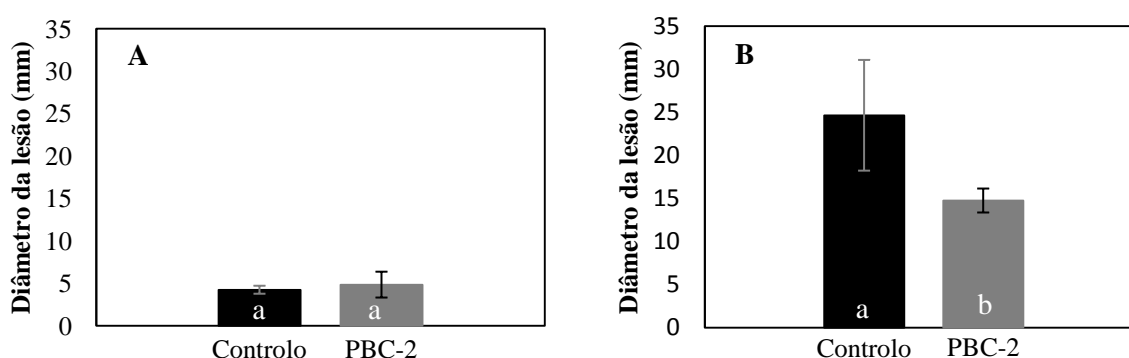


**Fig 3.2:** Incidência de *P. expansum* em peras cv. ‘Rocha’ sem a presença da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2 (controlo) e com a presença da levedura PBC-2 produzida em meio licor de laranja + extracto de levedura, com uma concentração de açúcares de 50 g/L. O gráfico **A** refere-se às incidências registadas após 2 dias e o gráfico **B** após 7 dias a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Barras com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). As linhas verticais correspondem a  $\pm$  DP.

Ao fim de 2 dias a 20°C a incidência nos frutos não tratados é de 53,1%, enquanto que nos frutos tratados com a levedura PBC-2 é de 39,7%. Estes resultados não são significativamente diferentes, logo não se pode considerar que existe uma redução satisfatória no número de feridas que apresentam podridão.

Os resultados obtidos após 7 dias a 20°C são significativamente diferentes, no entanto a redução da incidência continua a não ser satisfatória. As incidências são de 93,3 e 74,7% para os frutos sem e com tratamento, respectivamente.

De seguida vão ser apresentados os dados obtidos no estudo da severidade.



**Fig 3.3:** Severidade de *P. expansum* em peras cv. 'Rocha' sem a presença da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2 (controlo) e com a presença da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2 produzida em meio licor de laranja + extracto de levedura, com uma concentração de açúcares de 50 g/L. O gráfico **A** refere-se à severidade registada após 2 dias e o gráfico **B** após 7 dias a 20±1°C. Barras com letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05). As linhas verticais correspondem a ± DP.

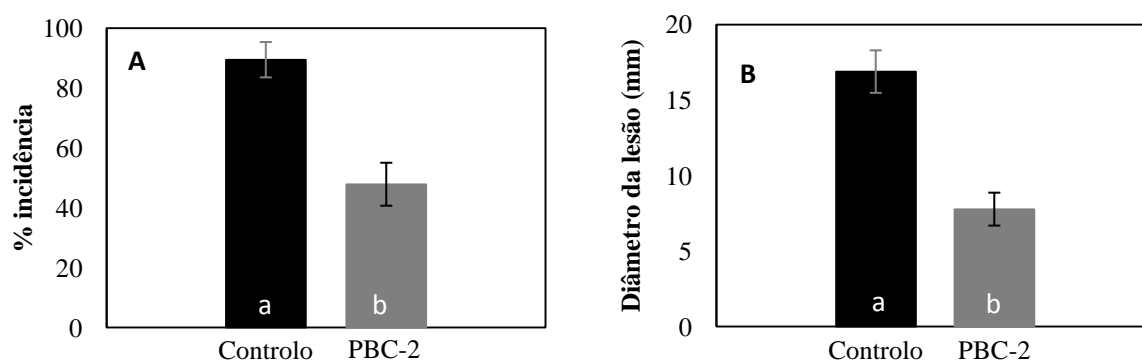
Após 2 dias a 20 °C não se observa uma redução da severidade nos frutos tratados, chegando até a ser mais elevada, não sendo no entanto um aumento significativo. A severidade é de 4,2 e 4,8 mm para o controlo e o tratamento, respectivamente.

Após 7 dias, verifica-se uma redução com diferenças significativas. Apesar desta redução, os resultados continuam a não ser satisfatórios, sendo de 24,6 e 14,7 mm para o controlo e o tratamento, respectivamente.

### 3.2. Ensaio em maçãs



**Fig 3.4:** Maçãs cv. ‘Golden Delicious’ após 7 dias a  $20\pm 1^\circ\text{C}$ . **A:** sem aplicação da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2, **B:** com aplicação da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2.



**Fig 3.5:** Incidência (**A**) e severidade (**B**) de *P. expansum* após 7 dias a  $20\pm 1^\circ\text{C}$  em maçãs cv ‘Golden Delicious’ sem a presença da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2 (controlo) e com a presença da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2 produzida em meio licor de laranja + extracto de levedura, com uma concentração de açúcares de 50 g/L. O gráfico **A** refere-se às incidências registadas após 2 dias e o gráfico **B** após 7 dias a  $20\pm 1^\circ\text{C}$ . Barras com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). As linhas verticais correspondem a  $\pm$  DP.

Observando a figura 3.5 onde se encontram os resultados de incidência e severidade do patogénio *P. expansum* verifica-se uma redução significativa destes parâmetros no tratamento com a agente de controlo biológico comparativamente com controlo após 7 dias a 20°C. Relativamente à incidência verifica-se uma redução de 46,5% nos frutos tratados, enquanto que a severidade apresenta uma redução de 54%.

## IV . Discussão

O uso da levedura *Metschnikowia* sp. (PBC-2) como agente de controlo biológico requer uma optimização das condições de crescimento, visto que, a nível industrial é importante a produção de células com uma elevada densidade populacional e viabilidade a baixos custos. A levedura utilizada neste trabalho pertence ao género *Metschnikowia*, existindo actualmente duas espécies deste mesmo género a ser estudadas e utilizadas como agentes de controlo biológico, *M. pulcherrima* e *M. fructicola*. Este estudo teve como objectivo a optimização das condições de crescimento da levedura PBC-2.

Foram realizados estudos preliminares em Erlenmeyer com o intuito de monitorizar o crescimento deste microrganismo para diferentes concentrações de açúcar. O açúcar escolhido para realizar estes ensaios foi a glucose, sendo considerado a principal fonte de carbono usada por todos os microrganismos devido ao seu baixo peso molecular, consumo rápido e conservação da energia celular (Abadias *et al.*, 2003). A fonte de azoto seleccionada foi o extracto de levedura. Este nutriente é considerado um bom substrato para diversos microrganismos, possuindo aminoácidos, péptidos, vitaminas e hidratos de carbono, sendo assim capaz de promover um rápido crescimento em leveduras (Peppler, 1982). Para além disso, o extracto de levedura apresenta características de tampão, podendo assim contribuir para uma elevada concentração de células viáveis (Spadaro *et al.*, 2010).

Os ensaios de crescimento foram realizados com 5 concentrações de glucose diferentes, 5, 10, 15, 20 e 40 g/L e extracto de levedura a 10 g/L.

Os perfis de crescimento da levedura em estudo revelam fases de latência semelhantes para as concentrações testadas, no entanto à concentração de 5 g/L o crescimento é mais acentuado no início da fase exponencial. Apesar deste facto, quando se observa a figura 1.1 correspondente ao peso seco, verifica-se que esta não é a concentração de açúcar mais apropriada, chegando mesmo a ser a que apresenta uma menor concentração em biomassa no final da fermentação. As concentrações de açúcar que se revelaram mais apropriadas para o crescimento do microrganismo são as de 15, 20 e 40 g/L.

Os perfis de variação do pH revelam um decréscimo até às 24 h de fermentação para as concentrações 5, 10 15 e 20 g/L, no entanto para a concentração mais elevada o decréscimo ocorre até às 36 horas de fermentação. O crescimento activo de microrganismos e consequente respiração conduz a uma acidificação do meio de cultura

através da secreção de ácidos orgânicos e dióxido de carbono (Abadias *et al.*, 2003, Spadaro *et al.*, 2010). Com uma diminuição da taxa respiratória durante a fase estacionária, a produção de dióxido de carbono diminui, aumentando assim o pH (Abadias *et al.*, 2003). Estes factos evidenciam um crescimento mais activo da levedura à concentração de 40 g/L, explicando assim os bons resultados obtidos em termos de biomassa.

No que diz respeito ao consumo de açúcares, a glucose é totalmente consumida às 36 h para todas as concentrações testadas, no entanto existe um intervalo de tempo onde não foram feitas análises a este consumo, sendo então provável que o consumo total dos açúcares para as concentrações mais baixas tenha ocorrido antes.

Relativamente aos parâmetros cinéticos estudados, os ensaios com concentrações de açúcar mais elevadas apresentam melhores resultados em termos de  $\mu_g$ ,  $P_{m\acute{a}x}$  e  $X_{m\acute{a}x}$ , verificando-se no entanto uma tendência para a diminuição do rendimento com o aumento da concentração de açúcares. Estes resultados relativos ao rendimento estão de acordo com os de Manso *et al.* (2009), onde foram testadas diferentes concentrações de sacarose no crescimento da bactéria *Pantoea agglomerans*, verificando-se um maior rendimento à biomassa para a concentração mais baixa testada.

A produção de um agente de controlo biológico implica o desenvolvimento de um meio de cultura barato que permita uma elevada produção de células viáveis, pois os meios de cultura representam uma elevada percentagem do custo total de produção de um microrganismo a nível industrial.

Neste trabalho foi estudada a capacidade da levedura PBC-2 utilizar os açúcares presentes no licor de laranja.

Foram realizados ensaios em Erlenmeyer com diferentes concentrações de açúcares presentes no licor de laranja e extracto de levedura a 10 g/L. As concentrações de açúcar estudadas foram 12,5; 25,0; 37,5 e 50,0 g/L.

As curvas de crescimento da figura 1.3 revelam valores superiores expressos em densidade óptica e peso seco comparativamente com os obtidos nos ensaios realizados com meio comercial YPD.

A fase de latência, observando os perfis de crescimento expressos em D.O. é semelhante para as concentrações de 25,0, 37,5 e 50,0 g/L de açúcar e dura 12 h, no entanto para a concentração de 12,5 g/L é mais longa, com uma duração de 15 h. Em termos de biomassa máxima, os melhores resultados são obtidos à concentração de açúcares mais elevada testada, sendo o seu valor de 7,9 g/L.

Comparando novamente com os ensaios realizados com glucose como fonte de carbono, a população de células viáveis é superior quando se usa o licor de laranja como constituinte do meio de cultura, sendo os valores máximos registados às 36 h de fermentação, com excepção para a concentração de 25,0 g/L onde o crescimento máximo se verifica às 61,5 h. O valor máximo alcançado em termos de ufc/mL corresponde a  $2,9 \times 10^8$  e é obtido à concentração máxima testada.

Os perfis de consumo de açúcares revelam um consumo total de glucose e frutose ao fim de 24 h de fermentação para as concentrações de 37,5 e 50,0 g/L, ao fim de 21 h para a concentração 25,0 g/L e no caso da concentração mais baixa estudada, dá-se primeiro o consumo total de glucose às 21 h, a frutose esgota-se ao fim de 36 h e a sacarose apenas no final da fermentação é totalmente consumida.

Observando os gráficos B, C e D da figura 1.4 verifica-se que a concentração de sacarose se mantém praticamente estável ao longo do tempo. Estes resultados podem ser explicados pelo chamado efeito Crabtree. Este efeito foi extensivamente estudado na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Postma *et al.*, 1989), e sendo a levedura PBC-2 pertencente ao género *Metschnikowia*, e sendo este género, por sua vez, filogeneticamente próximo de *S. cerevisiae* (Kurtzman e Droby, 2001), poder-se-á inferir que ambas apresentam sensibilidade a elevadas concentrações de glucose.

O efeito Crabtree descreve o fenómeno em que o crescimento pela via respiratória é inibido ou reprimido. Células sensíveis à glucose, mesmo na presença de oxigénio optam pelo processo fermentativo em detrimento da respiração.

Na presença de elevadas concentrações de glucose, a levedura *S. cerevisiae* produz etanol aerobicamente quando deveria estar a produzir biomassa (Al-mhanna, 2010). Pensa-se que supressão da respiração pela glucose em *S. cerevisiae* se deve à repressão da síntese de enzimas respiratórias e/ou à inactivação de enzimas respiratórias e à inactivação do transporte de açúcares (van der Brink, 2009). Estes dados poderão explicar de alguma maneira os resultados obtidos neste ensaio. As elevadas concentrações de glucose poderão inibir os transportadores de sacarose. O crescimento celular mais activo ocorre enquanto ainda existe glucose e frutose sendo posteriormente menor quando se inicia a via fermentativa, continuando no entanto a haver crescimento devido ao consumo de etanol.

Em trabalhos futuros, esta repressão poderá ser ultrapassada realizando fermentações em fed-batch, onde vão ser adicionadas concentrações controladas de fonte de carbono ao longo do tempo.

Os parâmetros cinéticos testados indicam que as concentrações mais adequadas para o crescimento da levedura são as de 25 e 50 g/L, não existindo entre estas diferenças significativas. No entanto, e como já se verificou para os ensaios com glucose, o rendimento diminui com o aumento da concentração de açúcar. Este resultado deve-se ao facto de nem toda a fonte de carbono ter sido transformada em biomassa, existindo ainda açúcar no final da fermentação.

Foram realizados estudos para testar uma mistura de subprodutos da indústria agro-alimentar. Para além do licor de laranja estudado nos ensaios anteriormente analisados, foi usado extracto de alfarroba. Este excedente da indústria agro-alimentar foi anteriormente testado como fonte de carbono na produção do agente de controlo biológico *P. agglomerans* (Manso *et al.*, 2010).

Foram testados 3 rácios, 25,0 g/L de licor de laranja + 25,0 g/L de extracto de alfarroba, 37,5 g/L de licor de laranja + 12,5 de extracto de alfarroba e 12,5 de licor de laranja + 37,5 de extracto de alfarroba.

Os resultados obtidos indicam que o rácio mais favorável à produção de biomassa é o de 12,5 g/L de alfarroba + 37,5 g/L, apresentando para este parâmetro uma concentração de 9,7 g/L no final da fermentação. Estes resultados indicam que uma maior concentração de licor de laranja é favorável ao crescimento da levedura, sendo no entanto a adição do extracto de alfarroba um factor positivo, visto que, comparativamente com os resultados dos ensaios realizados apenas com licor de laranja a uma concentração de açúcares de 50 g/L, os resultados obtidos em termos de biomassa máxima são superiores.

Analisando os perfis de consumo de açúcares, verifica-se, tal como nos ensaios com licor de laranja, que a sacarose se mantém constante ao longo do tempo de fermentação, salvo algumas pequenas oscilações, no entanto, neste caso, a frutose também não é totalmente consumida. Verifica-se que após toda a glucose ter sido consumida, a frutose mantém-se constante. Pode novamente atribuir-se estes resultados ao anteriormente descrito efeito Crabtree.

Relativamente aos parâmetros cinéticos estudados, não existem diferenças significativas entre os diferentes rácios testados para  $\mu_g$  e  $Y_{x/s}$ , verificando-se no entanto uma maior produtividade para o rácio 12,5 g/L de alfarroba + 37,5 g/L. Estes dados vêm reforçar a ideia de que este rácio é o mais favorável ao crescimento da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2.

O *scale-up* do processo de produção do agente de controlo biológico foi realizado em reaktor biológico usando licor de laranja como fonte de carbono e extracto de levedura a 10 g/L. Tendo em conta os bons resultados obtidos em Erlenmeyer com uma concentração de açúcares de 50 g/L e sendo este produto um excedente da indústria agro-alimentar é de interesse usar as maiores quantidades possíveis, pois a sua elevada concentração em açúcares levanta problemas ao nível da sua eliminação.

Foram testadas duas concentrações de açúcar para os ensaios de fermentação, 50 e 70 g/L. Em ambos os ensaios verifica-se um elevado consumo de oxigénio durante as primeiras horas de fermentação. Normalmente, em culturas batch, a concentração de oxigénio diminui especialmente durante a fase exponencial de crescimento, e quando o microrganismo alcança a fase estacionária ou a fase de declínio do crescimento, sendo a necessidade de oxigénio menor, a sua concentração aumenta (Manso *et al.*, 2009). Neste caso em particular, isso não se verifica, observando-se um consumo acentuado durante a fase de latência e durante a fase exponencial já não se detecta oxigénio no meio de cultura até ao final da fermentação.

O consumo de açúcares ocorre durante a fase exponencial de crescimento, estando de acordo com os dados obtidos em Erlenmeyer, onde a sacarose não é consumida, mantendo-se constante ao longo da fermentação.

Verifica-se uma diferença entre as duas concentrações testadas em termos de células viáveis. A concentração é superior para a fermentação com 50 g/L, sendo de  $3,4 \times 10^8$  ufc/mL, enquanto que para 70 g/L, a concentração é de  $2,8 \times 10^8$  ufc/mL. O mesmo se verifica quando se analisam os dados de concentração expresso em peso seco, sendo  $X_{máx}$  de 8,5 e 8,1 g/L para as concentrações de 50 e 70 g/L respectivamente.

Nos ensaios anteriormente analisados verifica-se um elevado consumo de oxigénio durante a fase inicial da fermentação. Para impedir que o oxigénio se torne um factor limitante durante a fermentação, poder-se-á aumentar o fluxo de oxigénio e/ou a velocidade de agitação, no entanto, estas alterações poderão causar uma grande turbulência no meio de cultura, danificando assim as células (Manso *et al.*, 2009). Uma alternativa a estas opções para o aumento do coeficiente de transferência de massa,  $k_L a$ , e conseqüente aumento da concentração de oxigénio no meio, é a utilização de um vector de oxigénio.

Com esse objectivo foi realizada uma fermentação com licor de laranja com uma concentração de açúcares de 50 g/L, extracto de levedura a 10 g/L, adicionando o vector de oxigénio n-dodecano a 1%.

Esta fermentação permitiu obter uma maior concentração de biomassa expressa em peso seco, comparativamente com as duas fermentações realizadas anteriormente sem a adição do vector (Tabela 2.1). Relativamente às células viáveis, existe também um aumento, sendo a concentração máxima de  $7,3 \times 10^8$  ufc/mL atingida às 68,5 h.

Tal como nos outros ensaios, o consumo de oxigénio é bastante elevado nas primeiras horas de fermentação, no entanto, a variação do pH é mais acentuada na fermentação com a adição do vector, sendo um indicador indirecto de uma maior taxa respiratória, sendo esse resultado comprovado pelo próprio cálculo da taxa respiratória no início da fermentação (Tabela 2.1).

Analisando os cálculos de  $k_{La}$  apresentados na tabela 2.1 para as 3 fermentações em reactor biológico, verifica-se que o vector n-dodecano não teve um efeito positivo na transferência de massa, pelo que o aumento da biomassa não poderá ser atribuída a uma maior facilidade de difusão do oxigénio no meio de cultura, mas sim a uma maior solubilidade do oxigénio no meio devido à presença do hidrocarboneto n-dodecano, revelando assim um novo efeito dos vectores de oxigénio na produção de microrganismos.

Contrariamente ao que se verifica em todos os outros ensaios realizados, existe um consumo total dos açúcares às 48 h de fermentação e a partir das 24 h existe uma quantidade de açúcar inferior a 5 g/L. Este facto evidencia um metabolismo respiratório e de síntese de biomassa mais activo do que na ausência do vector de oxigénio, conduzindo a maiores valores de biomassa, produtividade e rendimento. Este facto torna relevante a aplicação deste vector de oxigénio na produção em reactor biológico do agente de controlo biológico.

Para serem aceites comercialmente uma das condições que os microrganismos antagonistas necessitam cumprir é serem eficazes em condições onde se simulam as condições comerciais. Maçãs cv. 'Golden Delicious' e peras cv. 'Rocha' foram feridas e posteriormente inoculadas, inicialmente com o agente antagonista PBC-2 e só depois com o agente patogénico *P. expansum*. Após aproximadamente 3 meses a  $1 \pm 0,5$  °C os frutos foram retirados das câmaras e colocados a  $20 \pm 0,5$  °C. Os ensaios realizados em peras, contrariamente aos efectuados em maçãs, não apresentaram resultados satisfatórios. Após 2 dias a 20 °C, a incidência em peras tratadas com o agente de controlo biológico é de 40%, enquanto que a incidência no controlo ronda os 53%, não se verificando assim uma protecção significativa dos frutos com o uso do agente de controlo biológico. Em termos de severidade a aplicação do microrganismo não

promoveu nenhuma redução, chegando mesmo a ser superior, apesar de os resultados não serem estatisticamente diferentes entre o controlo e o tratamento com o agente de controlo biológico. Após 7 dias, os resultados são mais positivos. A incidência apresenta uma redução de 20% enquanto que a severidade é reduzida em 40% quando comparadas com o controlo. Ambos os resultados apresentam diferenças significativas. Os resultados obtidos nos ensaios de maçãs revelaram-se bastante mais positivos. As reduções em termos de incidência e severidade foram superiores, 47% e 54% respectivamente. Os resultados pouco satisfatórios nos ensaios com peras pode dever-se ao facto de a concentração do microrganismo antagonista na suspensão onde foram mergulhados os frutos ser de  $5 \times 10^6$  ufc/mL, abaixo do valor recomendado para peras, que é  $5 \times 10^7$  ufc/mL. Estudos realizados com a levedura *Candida sake* indicam que a actividade deste antagonista é dependente da concentração utilizada. Realizaram ensaios de eficácia usando concentrações diferentes de levedura, verificando que a sua capacidade antagonista é significativamente diferente entre as concentrações de  $2 \times 10^6$  e  $2 \times 10^7$  ufc/mL, sendo esta última a que permitiu melhores resultados (Nunes *et al.*, 2001b). A disparidade de resultados verificada entre os frutos utilizados também poderá ter sido influenciada pelo seu estado de maturação das peras, que era mais avançado (dados não apresentados) visto que frutos mais maduros apresentam uma elevada concentração de açúcares associados ao processo de senescência, promovendo assim o ataque de variados patógenos, como é o caso de *P. expansum* (Spadaro *et al.*, 2002). O uso de uma elevada concentração de açúcares para a produção do agente de controlo biológico poderá ter contribuído para os resultados pouco positivos. Apesar de a levedura em questão apresentar um bom crescimento a elevadas concentrações desta fonte de carbono, o meio utilizado poderá influenciar a sua capacidade antagonista, visto que estudos realizados com o mesmo microrganismo, mas tendo sido produzidos com menor concentração de açúcares, apresentam resultados consideravelmente melhores (Comunicação pessoal). Alguns dos componentes existentes no licor de laranja poderão ter sido também a causa dos resultados obtidos. Estudos realizados por Piano *et al.* (1997) indicam que a capacidade antagonista de *Metschnikowia* é influenciada pela adição de certos nutrientes.

Os ensaios de dinâmica populacional demonstram a capacidade que as células apresentam para aderirem à superfície do fruto numa concentração de  $2,4 \times 10^3$  e  $3 \times 10^3$  ufc/cm<sup>2</sup> para maçãs e peras respectivamente. Os resultados correspondentes aos ensaios de dinâmica em maçãs estão abaixo daqueles obtidos por Nunes *et al.* (2002), no estudo

realizado com a bactéria *P. agglomerans*, onde a concentração do microrganismo aderido aos frutos é de aproximadamente  $1 \times 10^4$  ufc/cm<sup>2</sup>. No caso das peras, o resultado é superior ao obtido por Nunes *et al.* (2001c), que é de aproximadamente  $7 \times 10^2$  ufc/cm<sup>2</sup>. Este resultado positivo na dinâmica populacional do ensaio e peras, não foi, no entanto suficiente para se obter um resultado favorável nos ensaios de eficácia realizados com este fruto.

## V . Conclusões

A produção de um agente de controlo biológico requer um estudo extensivo de todos os passos ao longo do processo. A escolha de um meio de cultura adequado ao crescimento do microrganismo que se pretende produzir, aliado ao baixo custo do mesmo, são factores a ter em conta quando se inicia o processo de produção.

Para este trabalho foram utilizados dois subprodutos da indústria alimentar, o licor de laranja, subproduto da indústria produtora de sumos, e um subproduto da indústria alfarroba. O processo de extracção do licor de laranja foi optimizado, tendo-se obtido no final um produto com potencial para uso com meio de cultura.

Foram feitos estudos em Erlenmeyer para verificar a capacidade da levedura PBC-2 em usar os açúcares contidos nestes subprodutos como fonte de carbono.

Ensaio preliminares em Erlenmeyer usando como fonte de carbono a glucose, permitiram avaliar a capacidade da levedura de crescer a elevadas concentrações deste açúcar, sendo que, neste caso, a concentração mais elevada testada foi de 40 g/L.

Posteriormente, e tendo em conta os resultados obtidos no ensaio realizado anteriormente, foi feito o estudo de crescimento da levedura em meio com licor de laranja e extracto de levedura. Verificou-se que esta cresce com elevadas concentrações de açúcares contidas neste subproduto, sendo que a maior produção de biomassa se observa quando a concentração de açúcares é de 50 g/L.

Os estudos realizados com mistura de subprodutos (licor de laranja e alfarroba) permitiram concluir que a mistura com um rácio de 12,5 g/L de alfarroba + 37,5 g/L de licor de laranja é mais propícia à produção da levedura PBC-2, permitindo a obtenção de uma maior quantidade de biomassa.

Os ensaios de produção da levedura PBC-2 em reactor biológico com licor de laranja com concentrações de açúcares de 50 e 70 g/L revelaram que existe uma maior produção de biomassa na fermentação com 50 g/L.

A adição do vector n-dodecano a 1% ao meio com licor de laranja não influenciou positivamente os valores de  $k_{La}$ , no entanto, em termos de biomassa, demonstrou uma melhoria comparativamente com a fermentação realizada nas mesmas condições mas sem a adição do vector, sendo de 12,5 g/L, representando uma aumento de 4 g/L em relação à fermentação sem a adição do vector.

Este trabalho permitiu concluir que esta levedura é sensível a elevadas concentrações de glucose, sendo o seu crescimento inibido devido a este facto.

O potencial antagonista da levedura *Metschnikowia* sp. PBC-2 em pomoideas tem sido estudado ao longo de várias campanhas e está comprovado por inúmeros ensaios realizados anteriormente a este estudo. No entanto, neste trabalho, os resultados obtidos não foram satisfatórios. Para isso poderão ter contribuído as condições em que o estudo decorreu, tanto a nível da concentração de açúcares utilizada (50 g/L no licor de laranja) como ao nível do estado de maturação da fruta utilizada.

## VI . Perspectivas de trabalho futuro

Os resultados obtidos neste estudo são promissores, no entanto podem ser melhorados e complementados.

Devido ao efeito inibidor da glucose a elevadas concentrações, poderão ser realizadas fermentações em cultura *fed-batch*, com adição de meio de cultura ao longo do tempo de maneira a permitir o controlo da concentração de glucose durante toda a fermentação, de maneira a ser possível a obtenção de maiores quantidades de biomassa, visto que este é um dos factores com mais importância no que diz respeito à produção de agentes de controlo biológico à escala industria.

O facto de o uso do licor de laranja e do extracto de levedura como constituintes do meio de cultura se ter revelado bastante eficiente comparativamente com o meio comercial YPD é um bom indicador da vantagem do uso de subprodutos como fonte de carbono. Desta maneira, poderá ser interessante a procura de outros subprodutos onde se obtenham resultados semelhantes ou melhores aos que foram alcançados neste trabalho.

## VII . Bibliografía

- Abadias, M., Benabarre, A., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I. (2001) Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*. **65**:173-182.
- Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I. (2003) Optimization of growth conditions of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in a lab-scale fermenter. *Journal of Applied Microbiology*. **95**:301-309.
- Abadias, M., Usall, J., Teixidó, N., Viñas, I. (2003) Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. *Biological Control*. **93**:436-442.
- Al-mhanna, M. N. M. (2010) Observation of Crabtree effect and diauxic behavior of yeast by using absorption. *Chemical Engineering Transactions*. **21**:1465-1470.
- Álvaro, A. H., Berdié, J. M. (2004) Frutus. Manual de reconocimiento de alteraciones de la fruta de pepita en postcosecha. Editorial Milenio, Lleida, p.10.
- Ark, P. A., Thompson, J. P. (1959) Control of certain diseases of plants with antibiotics from garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Disease Reporter*. **43**:276.
- Bai, Z., Jin, B., Li, Y., Chen, J., Li, Z. (2008) Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *Journal of Environmental Sciences*. **20**:353-358.
- Barracosa, P., Osório, J., Cravador, A. (2007) Evaluation of fruit and seed diversity and characterization of carob (*Ceratonia siliqua* L.) cultivars in Algarve region. *Scientia Horticulturae*. **114**:250-257.
- Cascaval, D., Galaction, A. I., Folescu, E., Turnea, M. (2006) Comparative study on the effects of n-dodecane addition on oxygen transfer in stirred bioreactors for simulated, bacterial and yeasts broths. *Biochemical Engineering Journal*. **31**:56-66.
- Choi, M. H., Ji, G. E., Koh, K. H., Ryu, Y. W., Jo, D. H., Park, Y. H. (2002) Use of waste Chinese cabbage as a substrate for yeast biomass production. *Bioresourse Technology*. **83**: 251-253.
- Couto, S. R. (2008) Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. *Biotechnology Journal*. **3**:859-870.
- Corral, L. G., Post, L. S., Monteville, T. J. (1988) Antimicrobial activity of sodium bicarbonate. *Journal of Food Science*. **53**:981-998.

- Costa, E., Teixidó, N., Atarés, E., Viñas, I. (2001) Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**:367-371.
  
- De Cal, A., Melgarejo, P. (2000) Momificado de los frutales de hueso (*Monilia* spp.) In: Montesinos, E., Melgarejo, P., Cambra, M. A., Pinochet, J. (Eds) Enfermedades de los frutales de pepita y de hueso, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Barcelona, México, pp: 66-67.
  
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. L., Wisniewski, M. E. (1992) Biological control of postharvest diseases: A promising alternative to the use of synthetic fungicides. *Phytoparasitica.* **20**:149-153.
  
- Droby, S., Chalutz, E. (1994) Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. In: Wilson, C. L., Wisniewsky, M. E. (Eds), Biological Control of Postharvest Diseases, Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, pp. 63-75.
  
- Droby, S., Wisniewsky, M., Macarasin, D., Wilson., C. (2009) Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology.* **53**:137-145.
  
- Eckerts, J. W., Eaks, I. L. (1989) Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. In: Reuter, W., Calavan, E. C., Carman, G. E. (Eds), The Citrus Industry, vol. 5. Uni. Calif. Press, Berkeley, USA, pp. 179-260.
  
- El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., Asselin, A. (1992) Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Postharvest Pathology and Mycotoxins.* **82**:398-402.
  
- El-Ghaouth, A., Wilson, C., Wisniewski, M. (2004) Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases of fruits and vegetables. In: Naqvi, S. A. M. H. (Ed.) Diseases of fruits and vegetables, vol. 2. Kluwer Academy Publishers, Netherlands, pp. 511-535.
  
- Fletcher, R. (1997) Carob agroforestry in Portugal and Spain. *The Australian New Crops Newsletter.* Issue No. 7.
  
- Fravel, D. R. (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Ver. Phytopathol.* **43**:337-359.
  
- Fravel, D. R., Rhodes, D. J., Larkin, R. P. (1999) Production and commercialization of biocontrol products. In: Albajes R., Gullino, M. L., Van Lenteren, J. C., Elad, Y. (Eds), Integrated Pest and disease management in greenhouse crops. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 365-376.
  
- Giese, E. C., Dekker, R. F. H., Barbosa, A. M. (2008) Orange bagasse as substrate for the production of pectinase and laccase by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in submerged and solid state fermentation. *BioResources.* **3(2)**:335-345.

- Ippolito, A., El Gaouth, A., Wilson, C. L., Wisniewski, M. (2000) Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology*. **19**:265-272.
- Janisiewicz, W. J. (1988) Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. *Postharvest Pathology and Mycotoxins*. **78**:194-198.
- Janisiewicz, W. J., Korsten, L. (2002) Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**:411-441.
- Janisiewicz, W. J., Tworkoski, T. J., Sharer, C. (2000) Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Biological Control*. **90**:1196-1200.
- Jia, S., Wang, M., Kahar, P., Park, Y., Okabe, M. (1997) Enhancement of yeast fermentation by addition of oxygen vectors in air-lift bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. **84(2)**: 176-178.
- Karabulut, O. A., Tezcan, H., Daus, A., Cohen, L., Weiss, B., Droby, S. (2004) Control of preharvest and postharvest of fruit rot in strawberry by *Metschnikowia fructicola*. *Biocontrol Science and Technology*. **14(5)**: 513-521.
- Kinay, P., Yildiz, M. (2008) The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruits. *Biological Control*. **45**:433-440.
- Kurtzman, C. P., Droby, S. (2001) *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Systematic and Applied Microbiology*. **24**:395-399.
- Lee, I. Y., Kim, M. K., Lee, J. H., Seo, W. T., Jung, J. K., Lee, H. W., Park, Y. H. (1999) Influence of agitation speed on production of curdlan by *Agrobacterium* species. *Bioprocess Engineering*. **20**:283-287.
- Lima-Costa, M. E., Raposo, S. (2007) Reactores para cultura de células vegetais. In: Fonseca, M. M., Teixeira, J. A. (eds) *Reactores Biológicos - Fundamentos e Aplicações*. Lidel
- Lopes-Reyes, J. G., Spadaro, D., Gullino, M. L., Garibaldi, A. (2010) Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples *in vivo*. *Flavour and Fragrance Journal*. **25**:171-177.
- Manso, T., Nunes, C., Raposo, S., Lima-Costa, M. E. (2010) Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* PBC-1 in a stirred tank reactor by batch and fed-batch cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**:725-735.

- Manso, T., Nunes, C., Raposo, S., Lima-Costa, M. E. (2010) Carob pulp as raw material for production of the biocontrol agent *P. agglomerans* PBC-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*
  
- Mari, M., Bertolini, P., Pratella, G. C. (2003) Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *Journal of Applied Microbiology.* **94**:761-766.
  
- Mari, M., Guizzard, M. (1998) The postharvest phase: Emerging technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica.* **26(1)**:59-66.
  
- Mounir, R., Durieux, A., Bodo, E., Allard, C., Simom, J. P., Achbani, E. H., El-Jaafari, S., Douira, A., Jijakli, M. H. (2007) Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. *Biotechnol. Lett.* **29**:553-559.
  
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Miró, M., Viñas, I. (2001a) Nutritional enhancement of biocontrol activity of *Candida sake* (CPA-1) against *Penicillium expansum* on apples and pears. *European Journal of Plant Pathology.* **107**:543-551.
  
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Viñas, I. (2001b) Improvement of *Candida sake* biocontrol activity against post-harvest decay by the addition of ammonium molybdate. *Journal of Applied Microbiology.* **92**:927-935
  
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Viñas, I. (2001c) Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *International Journal of Food Microbiology.* **70**:53-61.
  
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Fons, E., Viñas, I. (2002) Post-harvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden Delicious apples. *Journal of Applied Microbiology.* **92**:247-255.
  
- Nunes, C., García, J. M., Manso, T., Torres, R., Olmo, M., Usall, J. (2007) Effects of postharvest curing treatment on quality of citrus fruit. *Vegetable Crops and Research Bulletin.* **66**:213-220.
  
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Abadias, M., Viñas, I. (2007) Pré-harvest application of a combined treatment of *Candida sake* (CPA-1) and *Pseudomonas syringae* (CPA-5) to control postharvest decay of pome fruits. *Bulletin OILB.* **30(6)**:397-400.
  
- Nunes, C. A., Manso, T., Lima-Costa, M. E. (2009) Postharvest biological control of citrus fruit. *Tree and Forestry Science and Biotechnology.* **3(2)**:116-126

- Obagwu, J., Korsten, L. (2003) Control of citrus green and blue mold with garlic extracts. *European Journal of Plant Pathology*. **109**:221-225.
  
- Palou, L., Smilanick, J. L., Crisosto, C. H. (2009) Evaluation of food additives as alternative or complementary chemicals to conventional fungicides for the control of major postharvest diseases of stone fruit. *Journal of Food Protection*. **72(5)**:1037-1046.
  
- Patiño-Vera, M., Jiménez, B., Balderas, K., Ortiz, M., Carrillo, A., Galindo, E. (2005) Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potencial biocontrol agent of mango anthracnose. *Journal of Applied Microbiology*. **99**:540-550.
  
- Peighami-Ashnaei, S., Sharifi-Tehrani, A., Ahmadzadeh M., Behboudi, K. (2009) Interaction of different media on production and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* P-35 and *Bacillus subtilis* B-3 against grey mold of apple. *Journal of Plant Pathology*. **91(1)**:65-70.
  
- Peppler, H. J. (1982) Yeast extracts. In: Rose, A. H. (ed) *Fermented Foods*. Academic Press, London, UK. pp 293-312.
  
- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q., Gullino, M. L. (1997) Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biology and Technology*. **11**:131-140.
  
- Porat, R., Daus, A., Weiss, B., Cohen, L., Fallik, E., Droby, S. (2000) Reduction of postharvest decay in organic citrus fruit by a short hot water brushing treatment. *Postharvest Biology and Technology*. **18**:151-157.
  
- Pusey, P. L., Wilson, C. L. (1984) Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease*. **68**:753-756.
  
- Rice, R. G., Robson, C. M., Miller, G. W., Hill, A. G. (1981) Uses of ozone in drinking water treatment. *Journal of American Water Works Association*. **73**:3-16.
  
- Roçafa Junior, H., Padovan, F. C., Faria, J. B. (2005) Obtenção de uma bebida fermento-destilada a partir do “licor” de laranja. *Alim. Nutr.* **16(4)**:321-325.
  
- Rodham, D. K., Wang, Y., Cantwell, J. B., Winn, P. D., Foundling, J. (1999) Formulating microbial biocontrol agents. *Pesticide Science*. **55**:340-3.
  
- Rosenberguer, D. A. (2002) Enfermedades de postcosecha. In: Jones A. L., Aldwinckle, H. S. (eds) *Plagas y enfermedades del manzano y del peral*. Mundi-Prensa, pp 53-55.
  
- Sapers, M. G. (2006) Washing and sanitizing treatments for fruits and vegetables. In: Sapers, M. G., Gorny, J. R., Yousef, A. E. (eds) *Microbiology of fruits and vegetables*, CRC Press, p 391.

- Sargent, S. A., Ritenour, M. A., Brecht, J. K. (2000) Handling, colling and sanitation techniques for maintaining postharvest quality. Institute od food and agricultural sciences. HS719.
  
- Sharma, R. R., Singh, D., Singh, R. (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*. **50**:205-221.
  
- Silva, T. L., Mendes, A., Mendes, R. L., Calado, V., Alves, S. S., Vasconcelos J. M. T., Reis, A. (2006) Effect of n-dodecane on *Cryptococcus albidus* fermentations and DHA production. *J. Ind. Microbio. Biotechnol.* **33**:408-416.
  
- Silva, T.L., Reis, A., Roseiro, J. C., Hewitt, C. J. (2008) Physiological effects of the addition of n-dodecane as na oxygen vector during steady-state *Bacillus licheniformis* thermophillic fermentations perturbed by a starvation period or a glucose pulse. *Biochemical Engineering Journal*. **42**:208-216.
  
- Smilanick, J. L., Margosan, D. A., Mlikota, F., Usall, J., and Michael, I. F. (1999) Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Disease*. **83**:139-145.
  
- Spadaro, D., Vola, R., Piano, S., Gullino, M. L. (2002) Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology*. **24**:123-134.
  
- Spadaro., D, Ciavorella, A., Dianpeng, Z., Garibaldi, A., Gullino, M. L. (2010) Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. *Can. J. Microbiol.* **56**:128-137.
  
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., Hall, S. J. (1995) Media for industrial fermentations. In: Stanbury, P. F., Whitaker, A., Hall, S. J. (Eds) Principles of fermentation technology, 2nd ed. Pergamon Press, Oxford, pp 93–121.
  
- Trosno, A., Dennis, C. (1977) The use of Trichoderma species to control strawberry fruit rots. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. **83**:449-455.
  
- Thomsen, M. H. (2005) Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**:598-606.
  
- Turhan, I., Bialka, K. L., Demirci, A., Karhan, M. (2010) Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. **101**:5290-5296.
  
- Usall, J., Teixidó, N., Abadias, M., Torres, R., Cañamas, T., Viñas, I. (2010) Improving formulation of biocontrol agents manipulating production process. In:

Prusky, D., Gullino, M. L. (Eds) Postharvest Pathology. Plant Pathology in the 21st century. Vol 2. Springer Science + Business Media, pp 149-170.

•Van der Brink, J. Energetic limits to metabolic flexibility: responses of *Saccharomyces cerevisiae* to glucose-galactose transition. *Microbiology*. **155**:1340:1350.

•Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., Valero, J. R. (2007) Industrial wastewaters and dewatered sludge: rich nutrient source for production and formulation of biocontrol agent, *Trichoderma viride*. *World J Microbiol Biotechnol*. **23**:1695-1703.

•Visnovsky, G. A., Smalley, D. J., O'Callaghan, M., Jackson, T. A. (2008) Influence of culture medium composition, dissolved oxygen concentration and harvesting time on the production of *Serratia entomophila*, a microbial control agent of the New Zealand grass grub. *Biocontrol Science and Technology*. **18(1)**:88-100.

•Wilson, C. L. (1997) Biological control and plant disease – a new paradigm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **19**:158-159.

•Wilson, C. L., Wisniewski, M. E. (1989) Biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*. **27**:425-441

•Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, N., Wilson, C., Chalutz, E. (1991) Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guillermondii*. I. Characterization of the attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **39**:245-258

•Yousif, A. K., Alghzawi, H. M. (2000) Processing and characterization of carob powder. *Food Chemistry*. **69**:283-287.

•Zhang, J., Swingle, P. (2003) Control of green mold on florida citrus fruit using bicarbonate salts. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* **116**:375-378.

## **VIII . Anexos**