



TAÍS TEIXEIRA DAS NEVES

**YEASTS AS BIOCONTROL AGENTS OF *Aspergillus* spp
PRODUCERS OF OCHRATOXIN “A” IN COFFE: FROM
GROWTH TO TRANSCRIPTION OF OTA BIOSYNTHETIC
GENES**

LAVRAS – MG

2021

TAÍS TEIXEIRA DAS NEVES

**YEASTS AS BIOCONTROL AGENTS OF *Aspergillus* spp PRODUCERS OF
OCHRATOXIN “A” IN COFFE: FROM GROWTH TO TRANSCRIPTION OF
OTA BIOSYNTHETIC GENES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

Prof.^a Dr.^a. Cristina Ferreira Silva e Batista - UFLA

Orientadora

Prof. Dr. Luís Roberto Batista - UFLA

Co-orientador

LAVRAS – MG

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Neves, Taís Teixeira das.

Yeasts as biocontrol agents of *Aspergillus* spp producers of ochratoxin “A” in coffe: from growth to transcription of OTA biosynthetic genes / Taís Teixeira das Neves. - 2021.

124 p.: il.

Orientador(a): Cristina Ferreira Silva e Batista.

Coorientador(a): Luís Roberto Batista.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Leveduras no biocontrole. 2. Meio de cultura a base de café.
3. Fungos ocratoxigênicos. I. Batista, Cristina Ferreira Silva e. II. Batista, Luis Roberto. III. Título.

TAÍS TEIXEIRA DAS NEVES

**YEASTS AS BIOCONTROL AGENTS OF *Aspergillus* spp PRODUCERS OF
OCHRATOXIN “A” IN COFFE: FROM GROWTH TO TRANSCRIPTION OF
OTA BIOSYNTHETIC GENES**

**LEVEDURAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE DE *Aspergillus* spp
PRODUTORES DE OCRATOXINA “A” NO CAFÉ: DO CRESCIMENTO A
TRANSCRIÇÃO DE GENES BIOSINTÉTICOS DE OTA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, área de área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

Aprovada em 18 de junho de 2021.

Prof. Dr. Antônio Chalfun Júnior	UFLA
Prof ^a . Dr ^a . Cíntia Lacerda Ramos	UFVJM
Prof. Dr. Eustáquio de Souza Dias	UFLA
Dr. Harllen Sandro Alves Silva	EMBRAPA



Prof.^a Dr.^a Cristina Ferreira Silva e Batista - UFLA

Orientadora

Prof. Dr. Luís Roberto Batista - UFLA

Co-orientador

LAVRAS – MG

2021

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola - Departamento de Biologia, pela oportunidade de cursar o doutorado e desenvolver esta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pela concessão da bolsa de doutorado, sem a qual seria impossível me manter estudando em outro Estado.

À minha orientadora, Profa Cristina, por ter aceitado me orientar e acreditar em meu potencial desde o início, mesmo sem me conhecer direito. Por todo apoio e suporte, pelas preocupações e, por todo conhecimento compartilhado. Exemplo de ser humano, de profissional, comprometida, uma orientadora que realmente orienta.

Aos servidores docentes, técnicos e terceirizados vinculados ao PPGMA, pela receptividade e por todo suporte.

Aos meus colegas tanto do doutorado quanto do mestrado da turma de 2018.1, e os agregados de outros semestres, pelo companheirismo e pelas trocas de experiências. Em especial a Karen, Vivian, Danilo, Débora, Juliete, Fabi e Clara.

Aos meus colegas do Nemaí, por todo aprendizado e por todos os desafios superados juntos.

Às pós-doutorandas do PPGMA pela disponibilidade em auxiliar sempre que surgiam dúvidas durante execução dos experimentos e pelas trocas de experiências.

Aos membros das bancas de “Projeto de Tese”, “Qualificação” e “Defesa de Tese” por terem aceito o convite e contribuírem para melhoria dessa pesquisa.

A Imaculada, Fred e família que me acolheram quando cheguei em Lavras. Aos colegas que tive a oportunidade de compartilhar moradia, em especial a Mariane, minha fiel escudeira, desde 2019, com quem divido, principalmente nesse ano de pandemia, todas as angústias, preocupações, abraços e alegrias também (Taís, vamos pedir um lanche? rsrs).

A Aline e Trinca (Thiago), meus amigos de Lavras, que sonharam junto comigo, sempre me fazendo acreditar que eu era especial e que eu poderia alcançar muito mais coisas.... Vocês acreditaram tanto que hoje somos colegas de trabalho. Agora sou também uma cidadã lavrense (rsrsrs) e assim que a pandemia acabar vamos “aglomerar” novamente.

À minha família, minha base, em especial minha Mainha, por todo apoio, por ser meu sustento, por não me deixar esquecer da minha essência, das minhas origens. Tudo que faço é por vocês e para vocês. Minhas irmãs, meus sobrinhos, primos, cunhados, tios, avós (*in memorian*), demais parentes e agregados da FAMÍLIA TEIXEIRA, essa vitória é nossa!

À todos que de forma direta e indireta contribuíram para a concretização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena

Acreditar no sonho que se tem

Ou que os seus planos nunca vão dar certo

Ou que você nunca vai ser alguém

CONFIE EM SI MESMO

Quem acredita sempre alcança!”

Renato Russo

RESUMO

O Brasil é o maior produtor e exportador de café no *ranking* mundial e o Estado de Minas Gerais é responsável por mais de 50% dessa produção. A microbiota dos frutos e grãos de café é bastante diversificada, porém uma maior preocupação se deve a presença de fungos filamentosos, do gênero *Aspergillus*, produtores de micotoxinas, sendo a ocratoxina A a mais importante nesta cultura. O controle biológico utilizando microrganismos antagonistas é uma alternativa, uma vez que poderá reduzir o uso de defensivos agrícolas que provocam vários danos ambientais e de saúde pública, como intoxicação dos agricultores. Além disso, compreender os mecanismos que os microrganismos antagonistas empregam para controlar a produção de toxinas pelos fungos toxigênicos, assim como as melhores condições para tal atuação é de fundamental importância para o manejo adequado, garantindo a produção mais segura de grãos de café atendendo às exigências do mercado mundial. Diante do exposto acima o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a eficiência antagonista de cepas de leveduras sobre o crescimento de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, relatados como produtores de ocratoxina A no café, assim como a expressão de genes envolvidos na biossíntese desta micotoxina quando em co-cultivo fungo-levedura. Para isso foram utilizadas 18 cepas de leveduras, depositadas na Coleção de Culturas de Microbiologia Agrícola (CCMA) do Departamento de Biologia e 3 cepas de fungos filamentosos ocratoxigênicos pertencentes à coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciências dos Alimentos (CCDCA), da Universidade Federal de Lavras. O mecanismo de controle biológico foi avaliado em meio de cultura a base de café verde. Produção de compostos orgânicos voláteis (VOCs) foi avaliada por cromatografia gasosa - GC-MS, a OTA foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC e a expressão dos genes da biossíntese desta micotoxina foi avaliada. Como resultados, foi possível identificar a levedura *S. cerevisiae* CCMA0159 como promissora para o biocontrole de fungos ocratoxigênicos, com produção de VOCs com ação fungicida, assim como verificar que a ação antagonista ocorre também a nível transcricional, com redução da expressão de todos os genes biossintéticos de OTA, inclusive *hal* e *p450*.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico. Micotoxinas. Expressão gênica. Fungos.

ABSTRACT

Brazil is the largest producer and exporter of coffee in the world ranking and the State of Minas Gerais is responsible for more than 50% of this production. The microbiota of coffee fruits and beans is very diverse, but a greater concern is due to the presence of filamentous fungi, of the genus *Aspergillus*, producers of mycotoxins, with ochratoxin A being the most important in this culture. Biological control using antagonistic microorganisms is an alternative, as it can reduce the use of fungicides that cause various environmental and public health damages, such as poisoning farmers. In addition, understanding the mechanisms that antagonistic microorganisms employ to control the production of toxins by toxigenic fungi, as well as the best conditions for such action, is of fundamental importance for proper management, ensuring the safer production of coffee beans meeting the requirements of the world market. Given the above, the general aim of this study was to evaluate the antagonist efficiency of yeast strains on the growth of filamentous fungi of the genus *Aspergillus*, reported as producers of ochratoxin A in coffee, as well as the expression of genes involved in the biosynthesis of this mycotoxin when in fungus-yeast co-cultivation. For this, eighteen yeast strains that are deposited in the Collection of Cultures of Agricultural Microbiology (CCMA) of the Department of Biology and three strains of ochratoxigenic filamentous fungi belonging to the collection of Culture of Microorganisms of the Department of Food Sciences (CCDCA) of the Federal University of Lavras. The biological control mechanism was evaluated in green coffee-based culture medium. Production of volatile organic compounds (VOCs) was evaluated by gas chromatography - GC-MS, OTA was quantified by high performance liquid chromatography - HPLC and the expression of the genes of the biosynthesis of this mycotoxin was evaluated. As a result, it was possible to identify the yeast *S. cerevisiae* CCMA0159 as promising for the biocontrol of ochratoxigenic fungi, with the production of VOCs with fungicidal action, as well as verifying that the antagonist action also occurs at the transcriptional level, with reduced expression of all OTA biosynthetic genes, including *hal* and *p450*.

Keywords: Biological control. Mycotoxins. Gene expression. Fungi.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE -----	10
1 INTRODUÇÃO -----	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO -----	13
2.1 A cultura cafeeira e importância econômica -----	13
2.2 Micotoxinas -----	14
2.2.1 Ocratoxina A -----	16
2.2.2 Biossíntese de OTA -----	19
2.3 Controle biológico -----	21
2.4 Transcriptômica: análise da expressão gênica -----	34
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	36
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS -----	44
ARTIGO 1 - Behavior of sensitive and resistant <i>Aspergillus</i> strains to microbial control: OTA control strategy in postharvest coffee -----	44
ARTIGO 2 - Simulation of coffee beans contamination by <i>Aspergillus</i> species under different environmental conditions and the biocontrol effect by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -----	69
ARTIGO 3 - Inibição do crescimento de <i>Aspergillus</i> spp. e produção de OTA em cafés conilon e arábica por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -----	107

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O café é uma grande *commodity* agrícola, vital para a balança comercial em vários países em desenvolvimento, destacando-se Brasil, Colômbia, México e Vietnã (OIC, 2020). No Brasil, o café ocupa a quarta posição no ranking das culturas agrícolas com maior participação no valor da produção agrícola nacional, atrás da soja, cana-de-açúcar e milho (IBGE, 2019). O Brasil é o maior produtor de café do mundo. Os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Rondônia, Paraná, Rio de Janeiro, Goiás, Mato Grosso e Amazonas respondem por 99,6% da produção nacional de café (Anuário Brasileiro de Café, 2018). Segundo dados da Organização Internacional do Café – (OIC, 2020), estima-se que o consumo mundial do café no ano cafeeiro 2019/2020 foi de 167,81 milhões de sacas.

Assim como em outras culturas, os frutos e grãos de café estão suscetíveis à contaminação por microrganismos durante as diferentes fases de desenvolvimento, colheita, preparação, transporte e armazenamento (BATISTA et al., 2003). Alguns microrganismos podem estragar os frutos, causar defeitos nos grãos e produzir toxinas (TANIWAKI et al., 2014). A ocratoxina A (OTA) é a micotoxina que mais tem sido estudada nesta cultura agrícola, pois apresenta propriedades tóxicas para humanos e animais. A OTA é produzida no café principalmente por espécies do gênero *Aspergillus* da seção *Circumdati*: *A. ochraceus* (BATISTA et al., 2003; 2009; REZENDE et al., 2013), *A. westerdijkiae* e *A. steynii* (LEONG et al., 2007; NOONIN et al., 2008) e seção *Nigri* como *A. carbonarius* e *A. niger* (TANIWAKI et al., 2003).

Uma vez que a OTA pode ser detectada no produto final, o que representa riscos para saúde humana e animal, o controle de fungos ocratoxigênicos em campo e/ou durante o armazenamento é a melhor estratégia para evitar a contaminação por OTA em produtos alimentícios. De acordo com Gil-Serna et al (2011) produtos químicos têm sido comumente utilizados para reduzir a proliferação de fungos e a consequente produção de micotoxinas no campo. Porém fungicidas químicos causam impactos negativos no ambiente e efeito nocivo à saúde humana. Por este motivo, métodos alternativos são necessários para reduzir a utilização destes produtos.

O controle biológico utilizando microrganismos antagonistas tem sido relatado como uma boa alternativa para reduzir a aplicação de produtos químicos e de resíduos

presentes em produtos alimentares (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018). Dentre os diversos tipos de microrganismos que podem ser aplicados como agentes de biocontrole, as leveduras são adequadas para controle biológico devido à sua capacidade de rápida colonização da superfície vegetal, mantendo a viabilidade por longos períodos de tempo sob diferentes condições ambientais, além de prevenir a deterioração dos alimentos durante o armazenamento pela competição com o agente patogênico por espaço e nutrientes (PIMENTA et al., 2009). Alguns autores relataram que diferentes microrganismos conseguem degradar, por meio de enzimas proteolíticas, ou adsorver e desintoxicar a OTA, por vias desconhecidas (PÉTERI et al., 2007; ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

Genes relacionados com a biossíntese de OTA em diferentes espécies de *Aspergillus* foram relatados na literatura: *pks* em *A. carbonarius* (GALLO et al., 2014), *A. ochraceus* (O'CALLAGHAN; CADDICK; DOBSON, 2003) e *A. westerdijkiae* (BACHA et al., 2009), *AcOTAnrps* (GALLO et al., 2012) e *AcOTAhah* (Ferrara et al., 2016) em *A. carbonarius*. Os resultados obtidos no trabalho de Gil-Serna et al. (2018) confirmaram que os genes biossintéticos da OTA estão organizados em clusters nos genomas fúngicos. O efeito antagonista sobre a expressão de genes biossintéticos da OTA foi relatado por Gil-Serna et al. (2011) que observaram a redução do nível de expressão dos genes *pks* e *p450* de *A. westerdijkiae* na presença da levedura *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. Dessa forma observamos que a ação de agentes de controle biológico pode interferir na expressão de genes biossintéticos de OTA, afetando a produção desta micotoxina a níveis extracelulares.

A transcriptômica, análise global da expressão gênica em nível do RNA, é um elemento-chave na genômica funcional e contribuirá muito para compreensão da função dos genes na era pós-genômica (BHADAURIA et al., 2007). O transcriptoma é reflexo direto da expressão gênica e avalia o conjunto de transcritos de um organismo em determinada situação celular. Medindo a quantidade de RNA celular, é possível determinar até que ponto um gene específico está sendo expresso.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo geral avaliar a eficiência antagonista de cepas de leveduras sobre o crescimento de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, relatados como produtores de ocratoxina A no café, assim como a expressão

dos genes *pks*, *nrps*, *b-zip*, *p450* e *hal*, envolvidos na biossíntese desta micotoxina quando em co-cultivo fungo-levedura. Com os seguintes objetivos específicos:

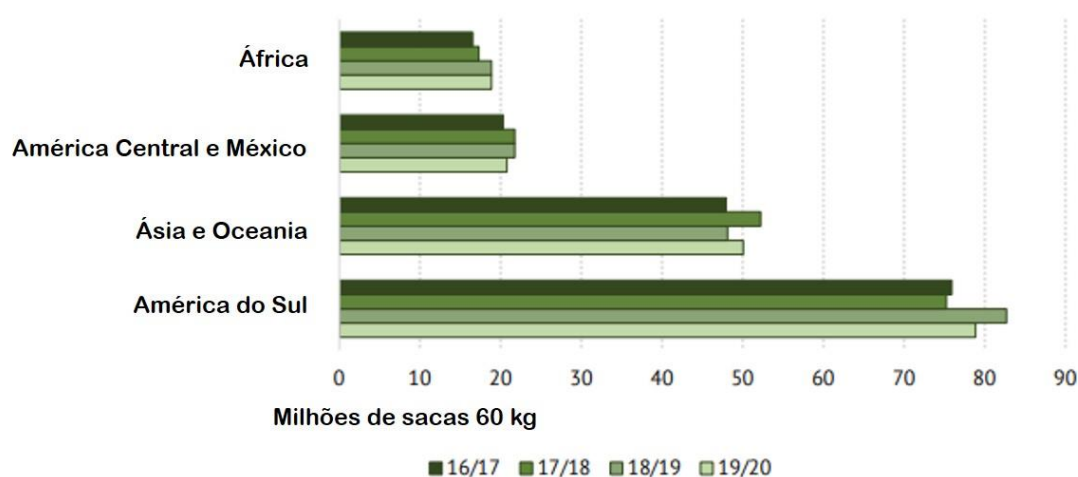
- ✓ Verificar o antagonismo de cepas de leveduras no desenvolvimento de fungos ocratoxigênicos em meio sintético de café verde.
- ✓ Investigar os motivos pelo qual *A. carbonarius* é mais resistente ao controle biológico que *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*.
- ✓ Determinar as melhores condições de atividade de água e temperatura para inibição da produção de OTA.
- ✓ Avaliar a expressão dos genes biossintéticos de OTA, codificadores das proteínas PKS, NRPS, bZIP, P450 e HAL nos fungos ocratoxigênicos durante a produção de OTA e quando a produção for reduzida em co-cultivo fungo- levedura.
- ✓ Comparar o crescimento e produção de OTA por fungos ocratoxigênicos em meio de cultivo a base de variedades diferentes de café verde (arábica e conilon), assim como a eficiência do agente de controle biológico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura cafeeira e importância econômica

O Brasil ocupa o primeiro lugar na produção e o terceiro no consumo de café no *ranking* mundial. Mesmo com queda da produção global na safra 2019/2020, a América do Sul é a região responsável pela maior produção do café (Figura 1). A produção do Brasil corresponde a 28,9% do consumo mundial, enquanto que o Vietnã produz 22%, já a Colômbia contribui com 10,7%. A produção mundial de café no ano cafeeiro de 2019/20 foi estimada em 168,55 milhões de sacas, 1,6% abaixo do volume produzido em 2018/19 (OIC, nov/2020).

Figura 1 - Produção de café por ano-safra.



Fonte: OIC, nov/2020.

O principal produtor de café no Brasil é o Estado de Minas Gerais, seguido pelo Espírito Santo, São Paulo, Bahia e Rondônia (Anuário Brasileiro de café, 2018). O café arábica é a espécie mais cultivada no Brasil e no mundo, representando aproximadamente 77% da colheita brasileira na safra de 2020, enquanto o café conilon ou robusta correspondeu a cerca de 23 % do total.

Silva et al. (2000) relataram a diversidade microbiana presente na superfície do café cereja e no grão de café na região Sul do estado de Minas Gerais, em que, um total de 626 isolados foram identificados ao nível de gênero, sendo 43,8% bactérias, 40,1% fungos filamentosos e 16,1% leveduras. Com relação ao beneficiamento de café processado pelo método natural, Silva; Batista e Schwan (2008) verificaram que a

população de fungos filamentosos em café cereja aumenta lentamente durante a fermentação e secagem, atingindo maior contagem no 20º dia e durante o armazenamento dos grãos verdes o tipo de embalagem influencia na contagem dos fungos, sendo observada a prevalência de espécies do gênero *Aspergillus*.

O cafeeiro pode ser atacado por diferentes patógenos, tais como fungos, bactérias e nematoides (KIMATI et al., 1997). As doenças fúngicas são consideradas as mais importantes, uma vez que os fungos encontram-se associados as folhas, raízes, frutos e grãos do café durante todo o ciclo produtivo, e sob determinadas condições podem ocasionar perda da qualidade dos frutos e grãos, produzindo odores e sabores desagradáveis, assim como a produção de compostos metabólitos tóxicos (micotoxinas), comprometendo a segurança do produto final (CHALFOUN; PARIZZI, 2008). Batista et al. (2009) avaliando grãos de café processados por métodos secos e úmidos, verificaram a presença de *Aspergillus* da seção *Circumdati*, produtores de ocratoxina A com prevalência de *A. ochraceus* e observaram ainda que as frações “bóia” e “varrição” apresentaram maiores níveis de exposição ao risco de contaminação por fungos toxigênicos.

2.2 Micotoxinas

O termo micotoxina (do grego *Mykes* = fungos e do latim *Toxicum* = veneno/toxina) significa, portanto, toxinas produzidas por fungos (DOS SANTOS et al., 2014). As micotoxinas são um grupo estruturalmente diverso de compostos de baixo peso molecular, produzidos pelo metabolismo secundário de alguns fungos filamentosos, que possuem efeitos adversos para humanos, animais e plantas. Atualmente, mais de 300 micotoxinas são conhecidas, e a atenção científica é focada principalmente naquelas que possuem efeito carcinogênico e/ou tóxico (ZAIN, 2011; YANG et al., 2014).

Os fungos toxigênicos produzem um ou mais metabólitos secundários tóxicos, e uma mesma micotoxina pode ser produzida por vários fungos diferentes. Como exemplos de micotoxinas de grande interesse em saúde pública e agroeconômico estão as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona e fumonisinas. Essas toxinas respondem por milhões de dólares anualmente em perdas em todo o mundo em saúde humana, animal e produtos agrícolas (ZAIN, 2011). O tipo e a quantidade de micotoxinas que um fungo produz, depende dos parâmetros ecológicos e de processamento de um produto particular (BATISTA; CHALFOUN, 2007).

Os principais gêneros de fungos produtores de micotoxinas são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (PICÒ, 2016). Espécies destes gêneros podem infectar culturas agrícolas durante o crescimento, colheita, armazenamento ou processamento (YANG et al., 2014). O crescimento de fungos não está necessariamente associado com a formação de micotoxinas. Entretanto, por causa da estabilidade das micotoxinas, elas podem permanecer no produto final mesmo quando os fungos não estiverem mais presentes (FERNÁNDEZ-CRUZ; MANSILLA; TADEO, 2010).

A biossíntese de metabólitos secundários formados por policetídeos e peptídeos ocorre pela atuação de enzimas multimodulares denominadas policetídeos sintases (PKS) e peptídeos não ribossomais sintases (NRPS), respectivamente (GALLO et al., 2014). Um número grande de metabólitos de PKS e NRPS derivados de fungos possui propriedades micotóxicas, como aflatoxinas, ocratoxina A (OTA), fumonisina e patulina, entre as mais importantes (GALLO; FERRARA; PERRONE, 2013).

Uma PKS fúngica típica é composta por três domínios principais: β -ketosintetase (KS), aciltransferase (AT) e proteína transportadora de acil (ACP). O domínio KS liga uma unidade extensora de malonil-CoA a uma molécula iniciadora de acetil-CoA; o domínio AT auxilia no carregamento do substrato correto na enzima e o domínio ACP é responsável por facilitar o movimento de substratos e produtos entre os diferentes locais ativos dentro da enzima (GALLO; FERRARA; PERRONE, 2013). Além disso, domínios opcionais podem estar presentes incluindo desidratase (DH), enoil redutase (ER), cetorredutase (KR) e tioesterase (TE). A presença ou ausência de domínios opcionais em uma PKS está relacionada com o tipo de policetídeo formado (BACHA et al., 2009).

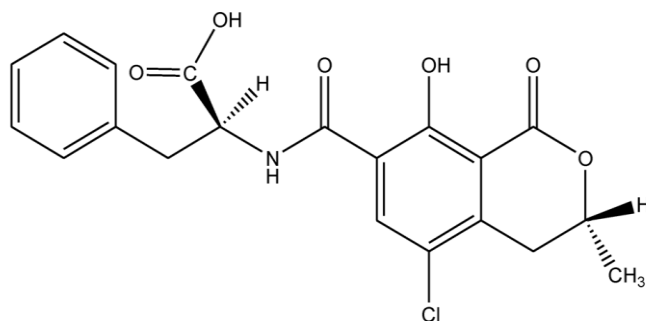
As NRPS fúngicas são enzimas multifuncionais compostas de módulos enzimáticos usados para alongar a cadeia de aminoácidos. Os módulos são divididos em domínios catalíticos. O domínio adenilato (A) é responsável pela ativação do aminoácido; a propagação da cadeia peptídica em crescimento ocorre por meio da atuação do domínio de tioração ou da proteína transportadora peptídica (T ou PCP) e o domínio de condensação (C) atua na condensação dos aminoácidos. Uma quarta unidade catalítica essencial da NRPS é o domínio da tioesterase (TE), que está localizado no módulo de terminação e catalisa a liberação de peptídeos por hidrólise ou macrociclização (STRIEKER; TANOVIĆ; MARAHIEL, 2010).

Os genes que codificam PKS e NRPS estão entre os mais encontrados em genomas microbianos, contribuindo para uma vasta diversidade de metabólitos secundários produzidos por muitas espécies e, quando a participação de ambos é necessária para a biossíntese de um metabólito, eles estão frequentemente localizados em um mesmo cluster gênico (GALLO et al., 2014).

2.2.1 Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário fúngico, descoberta em 1965, isolada de uma cepa sul-africana de *Aspergillus ochraceus* e relatada como sendo um metabólito tóxico para animais (VAN DER MERWE et al., 1965). A OTA consiste em um pentacetídeo derivado da família de di-hidrocurmarinas acoplado à β-fenilalanina por uma ligação amida. Seu nome químico é: L-fenilalanina-N-[(5-cloro-3,4-di-hidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirano-7-il) carbonil] - (R) - isocumarina (EL KHOURY; ATOUI, 2010). Na figura 2 está representada a estrutura química da OTA.

Figura 2 - Estrutura química da ocratoxina A.



Fonte: El Khoury; Atoui (2010).

A OTA é um ácido orgânico fraco, sendo que a presença de uma molécula de cloro na sua estrutura é responsável por seu caráter tóxico (PEREIRA; SANTOS, 2015). Além disso, a OTA pode resistir a três horas de esterilização a vapor com alta pressão de 121 °C e, mesmo a 250 °C, sua destruição não é completa. Algumas propriedades físico-químicas desta molécula são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da OTA.

Massa molar	403,8 g.mol ⁻¹
pKa	7,1
Cor	Cristalina, variando de incolor a branca
Fluorescência sob luz UV	Verde – em meio ácido Azul – em meio alcalino
Solubilidade em pH ácido e neutro	-Solúvel em solventes orgânicos polares -Ligeiramente solúvel em água -Insolúvel em éter de petróleo e hidrocarbonetos saturados
Solubilidade em pH alcalino	Solúvel em solução aquosa de bicarbonato de sódio e soluções alcalinas em geral.
Ponto de fusão	90 °C quando cristalizada

Microrganismos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são relatados como produtores de OTA (Pitt, 2000). *P. verrucosum* e *P. nordicum* são as espécies mais importantes do gênero *Penicillium* quando se trata da produção desta micotoxina, em regiões temperadas e de clima frio (GALLO; FERRARA; PERRONE, 2017).

Do gênero *Aspergillus*, várias espécies são descritas como produtores de OTA e pertencem às seções: *Circumdati*, *Nigri* e *Flavi*. Da seção *Circumdati*, *Aspergillus ochraceus* era descrito como o principal produtor de OTA. Entretanto, estudos moleculares de Frisvad et al. (2004) revelaram duas outras espécies produtoras de OTA que antes eram classificadas como *A. ochraceus*, sendo elas *A. westerdijkiae* e *A. steynii* e são as mais importantes do gênero na produção desta micotoxina em regiões tropicais. Outros membros como *A. auricomus*, *A. elegans*, *A. insulicola*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum* e *A. sulphureus* foram descritos por Batista et al. (2003). Com relação à seção *Nigri*, Battilani et al. (2003) relataram produção de OTA por *A. carbonarius* e *A. niger aggregate*. E da seção *Flavi*, *A. alliaceus* foi relatado como produtor de OTA (BAYMAN et al., 2002).

A OTA tem sido detectada em algumas culturas e conseqüentemente nos produtos alimentícios, incluindo cereais como trigo, centeio e produtos a base de cereais como a cerveja (JØRGENSEN; JACOBSEN, 2002), arroz (NGUYEN et al., 2007), grãos de café verde e processado (BATISTA et al., 2003; 2009; PARDO et al., 2004; TANIWAKI et al., 2014), uva e seus derivados como vinho, suco de uva e uva passas (CHULZE; MAGNOLI; DALCERO, 2006; HOCKING et al., 2007), cacau e chocolate (SERRA-BONVEHÍ, 2004). Além dos produtos de origem vegetal, a exposição humana às

micotoxinas está relacionada ao consumo de produtos de origem animal, como carne leite e ovos contaminados (JI; FAN; ZHAO, 2016).

Os cereais são considerados como maior fonte de contaminação de OTA, correspondendo a 50% da ingestão humana desta micotoxina. O consumo de vinho atinge a segunda posição, representando cerca de 10% a 15% da ingestão total de OTA (EL KHOURY; ATOUI, 2010).

A OTA é conhecida por seu efeito nefrotóxico, carcinogênico, imunotóxico, genotóxico e teratogênico em células animais (WHO, 2001) e tem sido classificada pela Agência Internacional de Pesquisas sobre Câncer (IARC, 1993) como possível carcinogênico humano (grupo 2B). Nos últimos anos, a preocupação geral sobre os efeitos potenciais das micotoxinas na saúde humana e animal tem aumentado. Assim, autoridades de muitos países estabeleceram medidas para monitorar e controlar os níveis de micotoxinas em produtos alimentícios e ração animal.

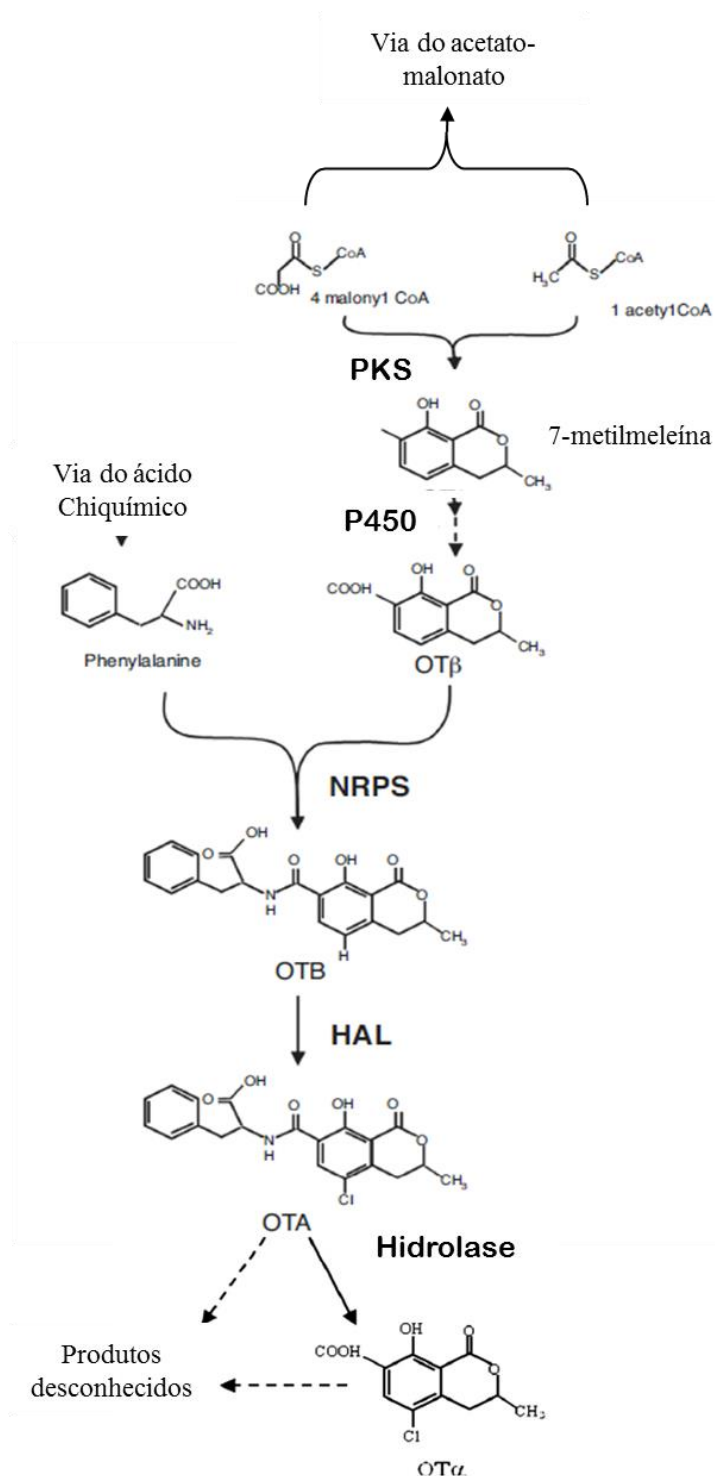
O Regulamento (CE) N° 466/2001, da Comissão Europeia, de 08 de março de 2001, que estabelece os níveis máximos para certos contaminantes em gêneros alimentícios foi alterado pelo Regulamento (CE) N° 472/2002, limitando a contaminação por OTA em cereais não processados até 5 µg/kg e para os produtos derivados de cereais, a contaminação por OTA foi fixada em 3 µg/kg. Este regulamento fixa também a contaminação das uvas secas até um limite de 10 µg / kg. Além disso, o regulamento (CE) N° 123/2005 inclui uma nova diretiva que limita a contaminação de OTA em sucos de uva e vinhos (vermelho, branco e rosé) até 2 µg/Kg. E para o café foi fixado um nível máximo para OTA de até 5 µg/kg em grãos torrados e 10 µg/kg em café solúvel.

No Brasil, a RDC N° 07, de 18 de fevereiro de 2011, revisada pela instrução normativa IN n° 88/2021, que dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos limita a contaminação por OTA em cereais e produtos de cereais, café torrado moído ou em grão e café solúvel em 10 µg/kg, suco de uva, polpa de uva, vinho e seus derivados em 2µg/L e para produtos de cacau e chocolate em 5µg/kg.

2.2.2 Biossíntese de OTA

A via biossintética da produção de OTA ainda não foi completamente elucidada. O modelo mais aceito é ilustrado abaixo (Figura 3).

Figura 3 - Esquema da via biossintética da OTA.



Fonte: Gallo et al (2014), Gallo; Ferrara; Perrone (2017), Wang et al (2018), com adaptações.

A molécula da ocratoxina A é composta por um grupo isocumarina, formado a partir da via do acetato-malonato que sintetiza entre outros os policetídeos, sendo necessária a atuação da enzima PKS e a L-fenilalanina que é derivada da via do ácido chiquímico unida por uma ligação amida, reação catalisada por uma NRPS (O'CALLAGHAN; CADDICK; DOBSON, 2003).

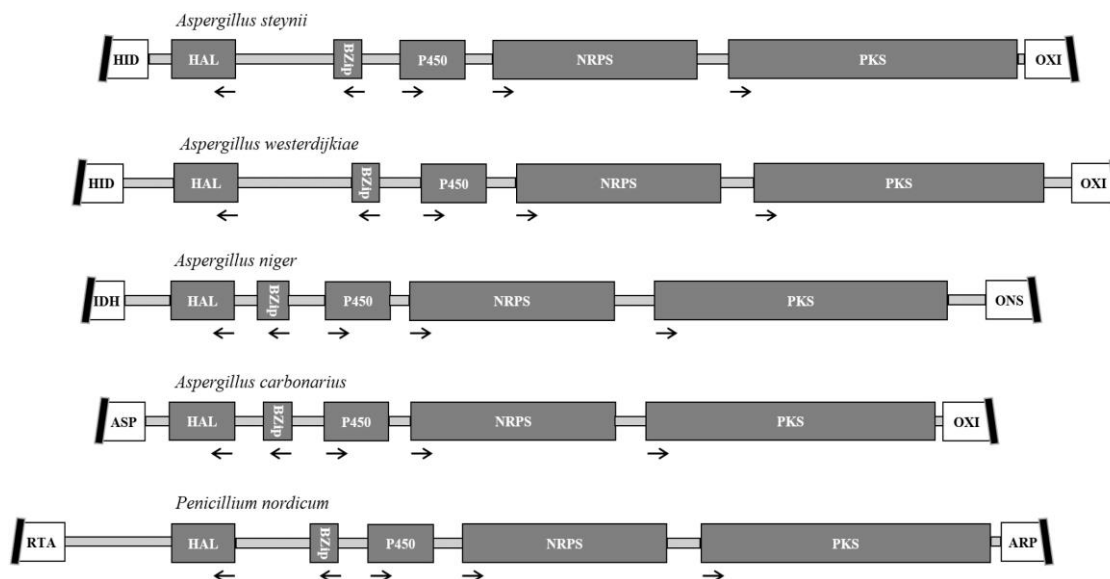
Alguns metabólitos relacionados à OTA também foram identificados em culturas de microrganismos produtores desta micotoxina, tais como o análogo desclorado ocratoxina B (OTB), o éster etílico ocratoxina C (OTC), o derivado isocumárico ocratoxina α (OT α) e seu análogo desclorado ocratoxina β (OT β) (EL KHOURY; ATOUI, 2010; GALLO et al., 2012).

De acordo com Harris et al. (2001) a cloração da OT β e da OTB pode dar origem à OTA e esta etapa é realizada por uma halogenase (HAL). E com relação a OT α , para Gallo et al. (2014) trata-se de um produto da hidrólise da OTA e não um composto intermediário, como sugerido pelas hipóteses anteriores.

Além dos genes *pks*, *nrps* e *hal*, são requeridos também os genes da citocromo P450 monooxigenase, responsável pela oxidação da 7-metilmeleína formando a OT β , e o fator de transcrição bZIP (WANG et al., 2018).

Sabe-se ainda que os genes envolvidos na biossíntese de micotoxinas são frequentemente agrupados para favorecer uma regulação mais eficiente. Alguns estudos, como o de Gil-Serna et al. (2018) relataram a existência de um cluster de genes (Figura 4) responsáveis pela biossíntese da OTA tanto em espécies do gênero *Aspergillus* quanto de *Penicillium*.

Figura 4 - Esquema da localização relativa dos genes codificadores HAL, bZIP, P450, NRPS e PKS em *A. steynii*, *A. westerdijkiae*, *A. niger*, *A. carbonarius* e *P. nordicum*.



Legenda: Os retângulos cinza escuro e cinza claro representam os genes e os espaçadores intergênicos, respectivamente. O tamanho de cada parte é proporcional ao comprimento da região genômica correspondente.

Fonte: Gil-Serna et al. (2018).

2.3 Controle biológico

O controle biológico é definido como a utilização intencional de microrganismos vivos não patogênicos, introduzidos ou residentes, para suprimir as atividades e populações de um ou mais patógenos de plantas (NEGA, 2014). Devido à ação do microrganismo na redução da doença, os agentes de controle biológico são denominados microrganismos antagonistas ao patógeno (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018).

O controle biológico se adequa ao conceito de agricultura sustentável, pois explora principalmente os ciclos naturais com reduzido impacto ambiental, além do fato do uso de microrganismos antagonistas provar ser uma das alternativas mais promissoras no controle de pragas para reduzir o uso de pesticidas (SPADARO; GULLINO, 2004). De acordo com Medeiros et al. (2012) o número de produtos de biocontrole disponíveis no mercado tem aumentado. Não tabela 2 estão apresentados os 53 produtos registrados no Brasil como biofungicidas.

Tabela 2. Biofungicidas registrados para o controle de doenças de plantas no Brasil.

Classe	Antagonista	Alvo (patógeno)	Produto	Empresa	Aplicação
Biofungicida e Biobactericida	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Meloidogyne incógnita</i> <i>Hemileia vastatrix</i> <i>Neofabraea perennans</i> <i>Alternaria porri</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Biobac	UPL do Brasil Indústria e Comércio de Insumos Agropecuários S.A. - Matriz Ituverava Bion Tech Inc.	Bandejas de mudas, pulverização foliar e/ou solo
Biofungicida e Biobactericida	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Xanthomonas vesicatoria</i> <i>Uncinula necator</i> <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> <i>Pseudomonas syringae</i> <i>Colletotrichum truncatum</i> <i>Hemileia vastatrix</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Colletotrichum acutatum</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Bio-imune	Vittia Fertilizantes e Biológicos S.A/ Biovalens S.A	Pulverização foliar

		<i>Phakopsora pachyrhizi</i> <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Alternaria solani</i>			
Biofungicida e Biobactericida	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Colletotrichum truncatum</i> <i>Hemileia vastatrix</i> <i>Xanthomonas vesicatoria</i> <i>Uncinula necator</i> <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> <i>Pseudomonas syringae</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Alternaria solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Phakopsora pachyrhizi</i> <i>Colletotrichum acutatum</i>	Multi-Attack	Vittia Fertilizantes e Biológicos S.A/ Biovalens S.A	Pulverização foliar

Biofungicida e Biobactericida	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i> <i>Streptomyces scabies</i> <i>Cryptosporiopsis perennans</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Alternaria dauci</i> <i>Alternaria porri</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Mycosphaerella fijiensis</i> <i>Sphaeroteca fuliginea</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Colletotrichum acutatum</i> <i>Xanthomonas vesicatoria</i> <i>Xanthomonas citri subsp. citri</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Serenade	Bayer S.A	Pulverização
Biofungicida	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Amitrix SC	COMDEAGRO	Pulverização

		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>			
Biofungicida	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus velezensis</i>	<i>Colletotrichum truncatum</i> <i>Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum</i> <i>Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Pythium aphanidermatum</i> <i>Pythium ultimum</i>	Ataplan	FMC Química do Brasil Ltda.	Pulverização terrestre em sulco de plantio e tratamento de semente
Biofungicida	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Bactel	DILLON BIOTECNOLOGIA LTDA	Pulverização
Biofungicida	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma asperellum</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	BF20.001	Ballagro Agro Tecnologia Ltda	Tratamento de sementes e pulverização foliar
Biofungicida	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Bio-Hulk	Vittia Fertilizantes e Biológicos S.A/ Biovalens S.A	Pulverização no sulco de plantio

Biofungicida e bionematicida	<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Meloidogyne incógnita</i> <i>Fusarium solani f. sp. glycines</i>	Bionema	BIOTROP	Tratamento de sementes
Biofungicida	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Cercospora kikuchii</i> <i>Septoria glycines</i> <i>Corynespora cassicola</i>	Bioup	BIOTROP	Pulverização foliar
Biofungicida	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Cercospora kikuchii</i> <i>Septoria glycines</i> <i>Corynespora cassicola</i>	BTP 005-19	BIOTROP	Pulverização foliar
Biofungicida	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Congregga	GÊNICA INOVAÇÃO BIOTECNOLOGICA S.A.	Pulverização
Biofungicida	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Fusarium solani f.sp. phaseoli</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Thielaviopsis paradoxa</i> <i>Pratylenchus zeae</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Daytona	KOPPERT	Pulverização no sulco de plantio e foliar
Biofungicida	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	DFCControl	SIMBIOSE Agrotecnologia biológica	Pulverização

Biofungicida	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Euschistus heros</i> <i>Deois flavopicta</i>	DuoControl	SIMBIOSE Agrotecnologia biológica	Pulverização
Biofungicida	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Botrytis squamosa</i> <i>Xanthomonas campestris pv. Campestris</i> <i>Phyllosticta citricarpa</i> <i>Cryptosporiopsis perennans</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Duravel	Basf	Pulverização
Biofungicida	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Uncinula necator</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Cryptosporiopsis perennans</i> <i>Sphaeroteca fuliginea</i> <i>Erysiphe polygoni</i> <i>Alternaria solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Eco-Shot	IHARABRAS S.A.	Aplicação foliar e imersão dos frutos na pós-colheita

		<i>Phyllosticta citricarpa</i>			
Biofungicida	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Macrophomina phaseolina</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Ecotrich WP	Ballagro Agro Tecnologia Ltda	Tratamento de sementes e aplicação foliar
Biofungicida	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Fx Protection	BIOMA INDÚSTRIA COMÉRCIO E DISTRIBUIÇÃO	Pulverização direta sobre o alvo
Biofungicida	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Gaia Bio	SIMBIOSE Agrotecnologia biológica	Tratamento de semente e pulverização no solo
Biofungicida	<i>Clonostachys rosea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Kamoi	Agrivalle	Pulverização foliar
Biobactericida e biofungicida	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Colletotrichum truncatum</i> <i>Hemileia vastatrix</i> <i>Xanthomonas vesicatoria</i> <i>Uncinula necator</i> <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> <i>Pseudomonas syringae</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Multi-Guard	Vittia Fertilizantes e Biológicos S.A/ Biovalens S.A	Pulverização foliar

		<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Alternaria solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Phakopsora pachyrhizi</i> <i>Colletotrichum acutatum</i>			
Biofungicida	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Fusarium solani f.sp. phaseoli</i>	Natucontrol	MEZFER	Aplicação no sulco de plantio
Biofungicida	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Fusarium solani f.sp. phaseoli</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Organic WP	LALLEMAND	Tratamento de sementes
Biofungicida	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Pardella	Ballagro Agro Tecnologia Ltda	Tratamento de sementes e aplicação foliar
Biofungicida	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Plant Protection	SIMBIOSE Agrotecnologia biológica	Tratamento de sementes e aplicação no solo
Biofungicida	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Predatox	Ballagro Agro Tecnologia Ltda.	Aplicação no solo

Biofungicida	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Fusarium solani f.sp. phaseoli</i>	Quality	LALLEMAND	Tratamento de sementes
Biofungicida	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Quartz SC	LALLEMAND	Pulverização no solo
Biofungicida	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Rizoderma	Ballagro Agro Tecnologia Ltda.	Aplicação no sulco de semeadura/foliar/solo
Biofungicida e bionematicida	<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Meloidogyne incógnita</i> <i>Fusarium solani f. sp. glycines</i>	Rudder	BIOTROP	Tratamento de sementes
Biofungicida	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Shocker	Agrivalle	Tratamento de sementes e pulverização foliar
Biofungicida	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Sphaeroteca macularis</i> <i>Uncinula necator</i> <i>Sphaerotheca fuliginea</i> <i>Botrytis cinérea</i> <i>Cryptosporiopsis perennans</i> <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Sonata	Bayer S.A.	Pulverização foliar

		<i>Alternaria porri</i> <i>Alternaria solani</i>			
Biofungicida	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Stimucontrol	SIMBIOSE	Tratamento de sementes e pulverização no solo
Biofungicida	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Stimucontrol Evolution	SIMBIOSE	Pulverização no solo
Biofungicida	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Tanus	Biota Innovations Ind/Ballagro	Tratamento de sementes e pulverização foliar
Biofungicida	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Fusarium solani f. sp. glycines</i>	Trichodermax EC	NOVOZYMES BIOAG	Pulverização foliar/solo
Biofungicida e bionematicida	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Fusarium solani f. sp. Glycines</i> <i>Pratylenchus zeae</i>	Trichodermil SC 1306	KOPPERT	Pulverização no sulco de plantio/foliar

		<i>Thielaviopsis paradoxa</i>			
Biofungicida	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Tricho-Guard	Vittia	Pulverização no sulco de plantio
Biofungicida e bionematicida	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Pratylenchus brachyurus</i>	Tricho-Turbo	Vittia	Tratamento de sementes e pulverização foliar/sulco de plantio
Biofungicida	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Tritter	Ballagro Agro Tecnologia Ltda.	Pulverização no sulco de plantio/foliar
Biofungicida	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Trychonyd FR 25	TZ Biotech Ltda	Pulverização pré e pós-emergência
Biofungicida	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Twixx	AGRIVALLE	Pulverização foliar
Biofungicida	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i>	Walker	KOPPERT	Pulverização foliar

Fonte: agrofit.agricultura.gov.br, acesso 27/05/2021.

A partir dos dados apresentados na tabela 2 é possível verificar a ausência de um produto registrado no Brasil que atua no controle biológico de espécies do gênero *Aspergillus*. Além disso, nenhum produto biológico registrado é a base de leveduras, sendo que estas possuem algumas vantagens sobre os fungos filamentosos, como crescimento mais rápido e fácil colonização do tecido vegetal, mantendo-se viáveis por longos períodos sob diferentes condições ambientais.

Os mecanismos de ação dos microrganismos antagonistas ainda são pouco compreendidos, porém, alguns têm sido descritos, incluindo antibiose, produção de enzimas líticas, parasitismo, resistência induzida e competição pela limitação de nutrientes e espaço (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002).

Em estudo realizado por Zhu et al. (2015), verificou-se o antagonismo de cinco cepas de leveduras (*Candida zemplinina*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* e *Metschikonia aff. fructicola*) sobre os fungos *A. carbonarius* e *A. ochraceus* produtores de OTA. De acordo com os autores a competição por espaço e nutrientes de fungos e leveduras ou a produção de metabólito(s) antifúngico(s) por levedura, quando em co-cultivo foram os possíveis mecanismos de controle biológico.

Ramos et al. (2010) relataram o controle biológico de fungos toxigênicos (*Aspergillus ochraceus*, *A. parasiticus* e *Penicillium roqueforti*), utilizando cepas de leveduras (*Pichia anomala* e *Debaryomyces hansenii*) que atuaram na redução da produção de esporos dos fungos. Segundo os autores a concentração celular inicial dos microrganismos antagonistas é um fator que interfere no controle, sendo que quando a concentração celular do antagonista é maior que a concentração de esporos fúngicos, maior será a inibição.

Um estudo de Souza et al. (2017) descreve o alto potencial de biocontrole dos fungos *A. carbonarius* e *A. ochraceus*, por cepas de leveduras das espécies *P. anomala* e *S. cerevisiae*, corroborando com a citação anterior de que a maior concentração celular das leveduras foi mais eficiente no biocontrole.

Gil-Serna et al. (2011) estudando os mecanismos de controle biológico na produção de OTA pelo fungo toxigênico *A. westerdijkiae* utilizando a levedura *Debaryomyces hansenii* CYC 1244 como antagonista, verificaram que o controle biológico da micotoxina ocorre a nível transcricional.

De acordo com Medeiros; Silva e Pascholati (2018) o controle biológico inclui ainda táticas de manejo para criar um ambiente favorável à atuação de antagonistas e à resistência da planta hospedeira. Nesse sentido o homem tem papel fundamental e pode alterar qualquer um dos fatores para favorecer o microrganismo antagonista.

2.4 Transcriptômica: análise da expressão gênica

As ciências ômicas (genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica) buscam entender o funcionamento celular dos organismos e suas alterações biológicas. A transcriptômica se ocupa no estudo das alterações dos transcritos de um organismo em uma determinada situação celular (CANUTOA et al., 2018).

A quantificação dos níveis de expressão gênica tornou-se um marco na maioria dos laboratórios de biologia molecular. Medindo a quantidade de RNA celular, é possível determinar até que ponto um gene específico está sendo expresso. A transcrição reversa combinada com a reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR) é um método poderoso para quantificar a expressão gênica (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

As análises quantitativas de RT-qPCR podem ser realizadas por dois métodos: quantificação absoluta e quantificação relativa. Na quantificação absoluta é determinado o número de cópias de entrada do transcrito de interesse, geralmente relacionando o sinal de PCR a uma curva padrão. Enquanto a quantificação relativa descreve a alteração na expressão do gene alvo em relação a algum grupo de referência, tal como um controle não tratado ou uma amostra no tempo zero (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Para a precisão da análise da transcrição gênica é necessária a amplificação do mRNA de um segundo gene “*housekeeping*” usado como referência. O gene *housekeeping* não deve ser regulado ou influenciado pelo procedimento experimental. Estudos de transcrição de genes usando PCR quantitativo em tempo real devem começar com a seleção de um gene de referência apropriado (RADONIC et al., 2004).

Alguns genes de referência foram investigados, incluindo β -actina (ACT β), β -2-microglobulina (β 2M), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), hipoxantina fosforribosiltransferase 1 (HPRT1), peptidilprolil isomerase A (PPIA), proteína ribossomal L4 (RPL4), a subunidade A do complexo succinato desidrogenase (SDHA), a proteína de ligação TATA box (TBP), o polipeptídeo da proteína zeta da ativação 5-mono-oxigenase tirosina 3-mono-oxigenase / triptofano (YWHAZ), α -tubulina (Tub),

porfobilinogênio desaminase (PBGD) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), (RADONIĆ et al., 2004; SANDERCOCK et al., 2017).

Alguns autores realizaram análise de expressão gênica com a técnica de RT-qPCR para verificar a expressão de genes responsáveis pela biossíntese de OTA. Utilizando como genes de referência o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH-F e G3PDH-R), O'Callaghan; Caddick; Dobson (2003), verificaram a expressão de *pks* em *A. ochraceus*. O gene de referência mais utilizado é o que codifica a β -tubulina, o qual foi relatado nos trabalhos de Bacha et al. (2009), no estudo da expressão de *aoks1* no *A. westerdijkiae* e *AcOTApks*, *AcOTAnrps* e *AcOTAhal* em *A. carbonarius* (FERRARA et al., 2016). Gil-Serna et al. (2018) relataram um protocolo de RT-qPCR para quantificação da expressão dos genes biossintéticos de OTA (*hal*, *bzip*, *p450*, *nrps*, *pks*) em *A. steynii*, *A. westerdijkiae*, *A. niger*, *A. carbonarius* e *P. nordicum*. Com relação ao estudo da influência do antagonismo na expressão de genes biossintéticos de OTA, Gil-Serna et al. (2011) usando a técnica de RT-qPCR verificaram a redução da expressão dos genes *pks* e *p450* em *A. westerdijkiae* quando em co-cultivo com a levedura *Debaryomyces hansenii*.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Leveduras são promissoras para o controle biológico de fungos ocratoxigênicos nas variedades de café, principalmente por estarem naturalmente associados aos frutos, mas com a vantagem de apresentarem crescimento mais rápido com relação ao fungo filamentosos, colonizando mais rapidamente o substrato. Porém, como visto nesta revisão, não temos no mercado brasileiro produtos de controle biológico para controle de fungos ocratoxigênicos e muito menos a base de leveduras, para utilização principalmente em pós-colheita onde os insumos químicos não devem ser utilizados. Este trabalho traz respostas importantes quanto a utilização de leveduras no controle biológico de fungos ocratoxigênicos no café, incluindo os possíveis mecanismos de ação utilizados pelas leveduras durante o biocontrole.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 1078-1099, 2010.

Anuário brasileiro do café 2018 / Cleonice de Carvalho... [et al.]. – Santa Cruz do Sul : Editora Gazeta Santa Cruz, 2018. 96 p. : il.

ANVISA — Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2011). **Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011**- Dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos.

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2021). **Instrução Normativa nº 88, de 26 de março de 2021**. Estabelece os Limites Máximos Tolerados (LMT) de Contaminantes em Alimentos. Disponível online: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-88-de-26-de-marco-de-2021-311655598> (acesso em 05 de junho de 2021).

ARMESTO, C. et al. *Colletotrichum* on coffee trees in south of Minas Gerais-Brazil: physiological, molecular and pathogenic description. **Coffee Science**, v. 11, n. 4, p. 444-454, 2016.

ATOUI, A. et al. Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. **Molecular nutrition & food research**, v. 50, n. 6, p. 488-493, 2006.

BACHA, N. et al. *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene “aoks1” is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 1, p. 77-84, 2009.

BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food control**, v. 20, n. 9, p. 784-790, 2009.

BATISTA, L. R. et al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 293-300, 2003.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de Ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.) bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 3, p. 804-813, 2007.

BATTILANI, P. et al. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. **Journal of food protection**, v. 66, n. 4, p. 633-636, 2003.

BAYMAN, P. et al. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 5, p. 2326-2329, 2002.

BHADAURIA, V. et al. Fungal transcriptomics. **Microbiological research**, v. 162, n. 4, p. 285-298, 2007.

CANUTOA, G. A. B et al. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.

CHALFOUN, S. M.; PARIZZI, F. C. Fungos toxigênicos e micotoxinas no café, cap 14. *In*: BORÉM, Flávio Meira (Ed). **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA, v. 1, p. 511 - 543, 2008.

CHULZE, S. N.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. S5-S9, 2006.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2020). Boletim - acompanhamento da safra Brasileira. V.6 - SAFRA 2020 - N.3 – terceiro levantamento. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe> , acesso em: 31 de janeiro de 2021.

DE SOUZA, S. C. et al. Effects of temperature and incubation time on growth and ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in grain-based media. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 32, p. 1306-1314, 2016.

DOS SANTOS, M. C. et al. Micotoxinas e seu potencial como agentes de guerra. *Revista Virtual de Química*, v. 6, n. 3, p. 761-778, 2014.

EL KHOURY, A.; ATOUI, A. Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 461-493, 2010.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Regulation EC n° 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, 2001.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Regulation EC n° 472/2002 of 12 March 2002 amending Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, 2002.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Regulation EC n° 123/2005 of 26 January 2005 amending regulation EC n° 466/2001 as regards ochratoxin A. **Official Journal of the European Union** L25:3–5, 2005.

FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L.; MANSILLA, M. L.; TADEO, J. L. Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. **Journal of advanced research**, v. 1, n. 2, p. 113-122, 2010.

FERRARA, M. et al. Identification of a halogenase involved in the biosynthesis of ochratoxin A in *Aspergillus carbonarius*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 82, n. 18, p. 5631-5641, 2016.

FRISVAD, J. C. et al. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, v. 50, n. 1, p. 23-43, 2004.

GALLO, A. et al. Characterisation of a pks gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **International journal of food microbiology**, v. 129, n. 1, p. 8-15, 2009.

GALLO, A. et al. Identification and characterization of the polyketide synthase involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. **International journal of food microbiology**, v. 179, p. 10-17, 2014.

GALLO, A. et al. New insight into the ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 23, p. 8208-8218, 2012.

GALLO, A.; FERRARA, M.; PERRONE, G. Phylogenetic study of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of mycotoxins. **Toxins**, v. 5, n. 4, p. 717-742, 2013.

GALLO, A.; FERRARA, M.; PERRONE, G. Recent advances on the molecular aspects of ochratoxin A biosynthesis. **Current Opinion in Food Science**, v. 17, p. 49-56, 2017.

GIL-SERNA, J. et al. Description of an orthologous cluster of ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus* and *Penicillium* species. A comparative analysis. **International journal of food microbiology**, v. 268, p. 35-43, 2018.

GIL-SERNA, J. et al. Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. **International journal of food microbiology**, v. 151, n. 1, p. 113-118, 2011.

HARRIS, J. P.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 5, p. 709-716, 2001.

HOCKING, A. D. et al. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. **International journal of food microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 84-88, 2007.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2019. https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2019_v46_br_informativo.pdf (accessed 21 april 2021)

JANISIEWICZ, W. J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual review of phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 411-441, 2002.

Jl, C.; FAN, Y.; ZHAO, L. Review on biological degradation of mycotoxins. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 127-133, 2016.

JØRGENSEN, K.; JACOBSEN, J. S. Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye, 1992-99. **Food Additives & Contaminants**, v. 19, n. 12, p. 1184-1189, 2002.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997.

LEONG, S. L. et al. Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 301-306, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MEDEIROS, F. H. V.; SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas, cap. 17. *In*: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**, v. 1, 5ª edição, p. 261-274, 2018.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2009.

NEGA, A. Review on concepts in biological control of plant pathogens. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 4, n. 27, p. 33-54, 2014.

NGUYEN, M. T. et al. Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. **Food chemistry**, v. 105, n. 1, p. 42-47, 2007.

NOONIM, P. et al. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. **International journal of food microbiology**, v. 128, n. 2, p. 197-202, 2008.

O'CALLAGHAN, J.; CADDICK, M. X.; DOBSON, A. D. W. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. **Microbiology**, v. 149, n. 12, p. 3485-3491, 2003.

OIC. Organização Internacional do Café. Relatório sobre o mercado de café. Nov (2020).

OLIVEIRA, G. et al. Influence of temperature and water activity on Ochratoxin A production by *Aspergillus* strain in coffee south of Minas Gerais/Brazil. **LWT**, v. 102, p. 1-7, 2019.

PARDO, E. et al. Modelling of effects of water activity and temperature on germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on a green coffee-based medium. **International journal of food microbiology**, v. 98, n. 1, p. 1-9, 2005.

PARDO, E. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, v. 10, n. 1, p. 45-49, 2004.

PASSAMANI, F. R. F. et al. Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. **Journal of food protection**, v. 77, n. 11, p. 1947-1952, 2014.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N.; TANIWAKI, M. H. Coffee, mycotoxins and climate change. **Food research international**, v. 61, p. 1-15, 2014.

PEREIRA, K. C.; SANTOS, C. F. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. **Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 15, n. 4, 2015.

- PÉTERI, Z. et al. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. **Food microbiology**, v. 24, n. 3, p. 205-210, 2007.
- PICO, Y. Mycotoxins: Occurrence and Determination. **Encyclopedia of Food and Health**, 2016. 10.1016/B978-0-12-384947-2.00479-7, 2016.
- PIMENTA, R. S. et al. Utilization of yeasts in biological control programs. *In: Yeast biotechnology: diversity and applications*. Springer, Dordrecht, 2009. p. 199-214.
- PITT, J. I. Toxigenic fungi: Which are important? *Medical Mycology*, 38(SUPPL. 1), 17–22. <https://doi.org/10.1080/mmy.38.1.17.22>, 2000.
- RADONÍČ, A. et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 313, n. 4, p. 856-862, 2004.
- RAMOS, D. M. B et al. Inibição in vitro de fungos toxigênicos por *Pichia* sp. e *Debaryomyces* sp. isoladas de frutos de café (*Coffea arabica*). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, 2010.
- RODRIGUES M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**, 2ª ed., Campinas: São Paulo, 2009.
- SANDERCOCK, D. A. et al. Determination of stable reference genes for RT-qPCR expression data in mechanistic pain studies on pig dorsal root ganglia and spinal cord. **Research in veterinary science**, v. 114, p. 493-501, 2017.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101, 2008.
- SERRA BONVEHÍ, J. Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 20, p. 6347-6352, 2004.
- SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological control**, v. 50, n. 3, p. 205-221, 2009.
- SILVA, C. F. et al. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International journal of food microbiology**, v. 60, n. 2-3, p. 251-260, 2000.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 521-526, 2008.

SOUZA, M. L. et al. Use of wild yeasts as a biocontrol agent against toxigenic fungi and OTA production. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 39, n. 3, p. 349-358, 2017.

SPADARO, D.; GULLINO, M. L.. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. **International journal of food microbiology**, v. 91, n. 2, p. 185-194, 2004.

STRIEKER, M.; TANOVIĆ, A.; MARAHIEL, M. A. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. **Current opinion in structural biology**, v. 20, n. 2, p. 234-240, 2010.

TANIWAKI, M. H. et al. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. **Food research international**, v. 61, p. 161-166, 2014.

TANIWAKI, M. H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International journal of food microbiology**, v. 82, n. 2, p. 173-179, 2003.

TOLA, M.; KEBEDE, B. Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1191103, 2016.

VAN DER MERWE, K. J. et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, v. 205, n. 4976, p. 1112, 1965.

VARGA, J. et al. Molecular analysis of variability within the toxigenic *Aspergillus ochraceus* species. **Canadian journal of microbiology**, v. 46, n. 7, p. 593-599, 2000.

VAN DER MERWE, K. J. et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, v. 205, n. 4976, p. 1112, 1965.

WHO, World Health Organization. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Food & Agriculture Org., p. 281–416, 2001.

YANG, J. et al. Natural occurrence, analysis, and prevention of mycotoxins in fruits and their processed products. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, n. 1, p. 64-83, 2014.

WANG, Y. et al. A consensus ochratoxin A biosynthetic pathway: Insights from the genome sequence of *Aspergillus ochraceus* and a comparative genomic analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 84, n. 19, p. e01009-18, 2018.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129-144, 2011.

ZHU, C. et al. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in vitro and in vivo through antagonistic yeasts. **Food Control**, v. 50, p. 125-132, 2015.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Behavior of sensitive and resistant *Aspergillus* strains to microbial control: OTA control strategy in postharvest coffee

Submetido à revista Food Microbiology

Behavior of sensitive and resistant *Aspergillus* strains to microbial control: OTA control strategy in postharvest coffee

Taís Teixeira das Neves, Luís Roberto Batista, Cristina Ferreira Silva

Abstract

The use of yeast in the biological control of the growth of ochratoxin A-producing filamentous fungi in coffee is a promising alternative. However, the environmental conditions and composition of the substrate can influence the action of the biological control agent. In this sense, we tested the efficiency of different yeast strains on the biological control of ochratoxigenic fungi in coffee-based medium, simulating the coffee field production. Why or how different species of *Aspergillus* have different sensitivities to biological control it is still not known. In this study, we identified that *Aspergillus carbonarius* rapidly assimilated the carbon sources present in coffee, gaining an advantage over yeasts in substrate colonization. The yeast specie with the highest biocontrol efficiency was *Saccharomyces cerevisiae*, with inhibition on *A. carbonarius*, *A. westerdijkiae*, and *A. ochraceus* of 74.4, 100, and 80.9%, respectively. The inhibition strategies of *S. cerevisiae* on the growth of ochratoxigenic fungi were competition, production of volatile compounds with fungicidal action and alteration of the physicochemical properties of the substrate. The results of this study reinforce that yeasts have potential as biocontrol agents of fungi in the coffee postharvest period, even against *A. carbonarius*, which is more resistant to biological control by yeasts.

Keywords: Biological control, antagonism, mycotoxin, volatile compound

1 Introduction

Coffee is a major agricultural commodity, traded internationally, it is vital to the balance of trade in many developing countries, especially Brazil, Colombia Mexico and Vietnam. In Brazil, coffee is the fourth agricultural crop with the largest share in the value of national agricultural production, behind soybeans, sugarcane and corn (IBGE, 2019). Brazil is the largest coffee producer and exporter in the world, and the state of Minas Gerais is responsible for more than 50% of this production (CONAB, 2020).

Different pathogens can attack coffee plants such as fungi, bacteria, and nematodes (Kimati et al., 1997) but the most important are fungal diseases. This is because fungi are associated with coffee fruits and grains in the whole production cycle. Under certain environmental conditions, they cause loss of sensorial quality and compromise the safety of the final product (Chalfoun and Parizzi, 2008). This is because, some fungi can produce metabolites toxic to humans and animals, among which ochratoxin A (OTA) is the most recurrent in coffee crops. Several countries have established maximum concentration allowed for OTA in green coffee beans, i.e, influences in the exportation trade. The maximum tolerable limit of OTA in coffee beans was regulated in Brazil in 2011 (RDC N° 07/2011), since other countries had already established limits, such as the European Commission through regulation EC N° 123/2005.

Among the species reported to produce OTA in coffee are *Aspergillus ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. steynii*, *A. carbonarius*, and *A. niger* (Leong et al., 2007; Noonin et al., 2008; Batista et al., 2009; Taniwaki et al., 2014). These species are commonly found in regions located in the tropics or close to the tropics. In this sense, controlling the growth of OTA-producing fungi is necessary in all stages of fruit development, including harvesting, post-harvest, and even grain storage.

The field application of chemical inputs to prevent the development of these fungi and other diseases is still the most commonly used method. However, in some agricultural areas with higher temperature and humidity, fungi can develop in drying terraces (natural coffees), i.e., postharvest, at which time they cannot be controlled with chemical inputs due to their persistence in the final product. Therefore, safer and more effective strategies for fungal control in the postharvest period have been sought (Spadaro and Droby, 2016).

Biological control using antagonistic microorganisms selected from the coffee production environment is one of the most promising biocontrol alternatives that will help reduce environmental damage and improve public health (Spadaro and Gullino, 2004). In addition to filamentous fungi, there are diverse microbes on the surfaces of fruits and coffee beans, including bacteria and yeasts (Silva et al., 2000). Yeasts are promising microorganisms for the biological control of filamentous fungi (Souza et al., 2017, 2021) because they can rapidly colonize the plant surface, compete for space and nutrients, and not produce allergenic spores or toxins during inhibition (Pimenta et al., 2009; Tryfinopoulou et al., 2019).

Currently, there is no commercially available biological product for the control of OTA-producing *Aspergillus* in coffee. So is important to evaluate the efficiency of the promisor antagonistic yeasts in coffee-based medium with simulated field conditions as well as to investigate the resistance strategies employed by *A. carbonarius* compared to *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae* about yeast control.

2 Material and methods

2.1 Origin of strains of yeasts and filamentous fungi

Eighteen yeast strains isolated from coffee production areas were tested: *Candida guilliermondii* (CCMA 1296, 1297, 1298, 1308), *Candida krusei* (CCMA 1316), *Candida*

parapsilosis (CCMA 1292, 1304), *Meyerozyma caribbica* (CCMA 1294), *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMA 1305), *Saccharomyces cerevisiae* (CCMA 0159, 1299, 1302, 1306, 1313, 1315, 1317), and *Wickerhamomyces anomalus* (CCMA 1300, 1303). The isolates were deposited in the Collection of Cultures of Agricultural Microbiology (CCMA) of the Department of Biology of the Federal University of Lavras. *Aspergillus carbonarius* (CCDCA 10507), *A. ochraceus* (CCDCA 10490), and *A. westerdijkiae* (CCDCA 11469) are proven OTA producers that belonged to the Culture Collection of Microorganisms of the Department of Food Sciences (CCDCA), Federal University of Lavras.

2.1.1 Reactivation of microorganisms and inoculum preparation

The yeast strains preserved at -80 °C were reactivated in yeast extract peptone glucose (YEPG) medium, pH 3.5, composed of (g/L): yeast extract (10), peptone (20), glucose (10), and agar (15). The Petri dishes were incubated at 28 °C for 24 h. To reactivate the filamentous fungi preserved in paper discs at -80 °C, malt extract MEA (agar) medium containing (g/L) malt extract (20), bacteriological peptone (1), glucose (20), and agar (20) was used. The Petri dishes were incubated at 25 °C for 7 days.

After reactivation, one loopful of each yeast isolate was transferred to Eppendorf tubes containing 1 mL of YEPG broth and incubated at 28 °C for 24 h. A 10-fold serial dilution was performed to obtain concentrations of 4 and 7 log cells/mL. Cell counting was performed in a Neubauer chamber. To obtain the fungal isolates, a spore suspension was made by adding 10 mL of sterile distilled water containing 0.1% Tween 80 to the colonies and filtering them through sterile gauze. Spore counting was performed in a Neubauer chamber, and the final concentration was standardized to 5 log spores/mL.

2.2 Green coffee culture medium

To simulate the composition of the coffee fruits, inhibition tests were performed in coffee meal extract agar (CMEA) medium. CMEA was prepared as described by Oliveira et al. (2019), with modifications. Briefly, 175 g of ground (raw) green coffee was added to 500 mL of boiling sterile deionized water and boiled for 60 min. The liquid was cooled to room temperature, filtered through a clean cloth bag, adjusted to a volume of 1000 mL, and added to 20 g of agar.

2.3 *In vitro* assays

The cocultures (yeasts × filamentous fungi) were prepared by adding 100 µL of each yeast suspension to Petri dishes containing CMEA medium and spread using a Drigalski spatula. Next, 10 µL of the fungal spore suspension was inoculated in the center of the Petri dish. The positive control for the growth of each fungal isolate was prepared by inoculating the spore suspension at a single point of the Petri dish containing the CMEA medium without the presence of any yeast strain. The 18 yeast strains were tested against the three *Aspergillus* strains separately and in triplicate. The Petri dishes were incubated at 28 °C for 7 days.

2.3.1 Evaluation of vegetative growth of *Aspergillus*

The diameter of the cocultured fungal colonies was evaluated on the 2nd, 5th, and 7th days after inoculation using a pachymeter. The positive control was evaluated at the same sampling times. The percentage of growth inhibition was obtained considering the diameter of the positive control to be 100%:

$$\text{Equation 1} \quad \% \text{ inhibition} = \left(\frac{x-y}{x} \right) * 100$$

where x is the diameter of the positive control and y is the diameter of the colonies in coculture.

2.4 Chemical analyses

S. cerevisiae CCMA 0159 when in co-culture with *A. carbonarius*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* promoted change of the medium color. In order to understand the reasons of that, was evaluated the content of carbohydrates, organic acids and volatile compounds. The same culture condition described above was done except for using green coffee extract broth (CMEB) as substrate. Cultures and cocultures were inoculated in 125-mL Erlenmeyer flasks containing 20 mL of CMEB at 28 °C/100 rpm/72 h. All positive controls (yeasts and filamentous fungi alone) and negative control containing only CMEB, i.e. without any microorganism inoculation, were also prepared.

2.4.1 Carbohydrates and organic acid contents

Carbohydrates and organic acids were evaluated by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu, model LC-10Ai, Shimadzu Corp., Japan). A refractive index detector (RID-10Ai) was used for carbohydrates (Shim-pack SCR-101C column), and a UV–VIS detection system (SPD-10Ai) was used for organic acids (Shim-pack SCR 101-H column/7.9 mm × 30 cm). The concentration of each sample was determined using an analytical curve obtained by linear regression ($y = ax + b$, where y is the peak area and x is the compound concentration) for each standard. The analysis was performed in triplicate.

2.4.2 Volatile compounds

Volatile compounds were extracted by headspace (HS-SPME) from the samples. The samples were heated in a water bath (15 min/60 °C) to equilibrate the system. SPME

fibers of 50/30 μm (carboxen/poly(dimethylsiloxane)-DVB/CAR/PDMS) (Supelco Co., Bellefonte, PA, USA) were exposed to 60 °C for 30 min to make them absorb the volatile compounds. The compounds were analyzed in a Shimadzu QP2010 gas chromatograph (GC) equipped with mass spectrometry (MS) and a 20M Carbo-Wax silica capillary column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 mm). The operating conditions were as described by Ribeiro et al. (2017). The volatile compounds were identified by comparing the mass spectra with the NIST11 library.

2.5 Statistical analysis

For the Petri dish assays, a randomized block design was used with a 3 \times 18 \times 2 factorial arrangement, with three fungal isolates and 18 yeast strains in two different population concentrations (4 and 7 log CFU/mL). Each observation had three replicates. For the HPLC tests, a completely randomized design was used, with three replicates. The results were analyzed by analysis of variance and the Scott-Knott test at the 5% probability level with the statistical software R (R i386 3.3.3).

3 Results

It were evaluated the growth of the fungal isolates *A. westerdijkiae* CCDCA 11469, *A. ochraceus* CCDCA 10490, and *A. carbonarius* CCDCA 10507 in green coffee–based synthetic medium and the percentage of inhibition. The three isolates showed growth behavior different each other. After 2 days of culture (Figure 1A), the largest colony diameter was observed for *A. carbonarius* (19 mm), followed by *A. ochraceus* (9 mm), whereas *A. westerdijkiae* showed only the presence of some spores. *A. westerdijkiae* was a slower only until 2nd so, its growth was similar to *A. ochraceus*.

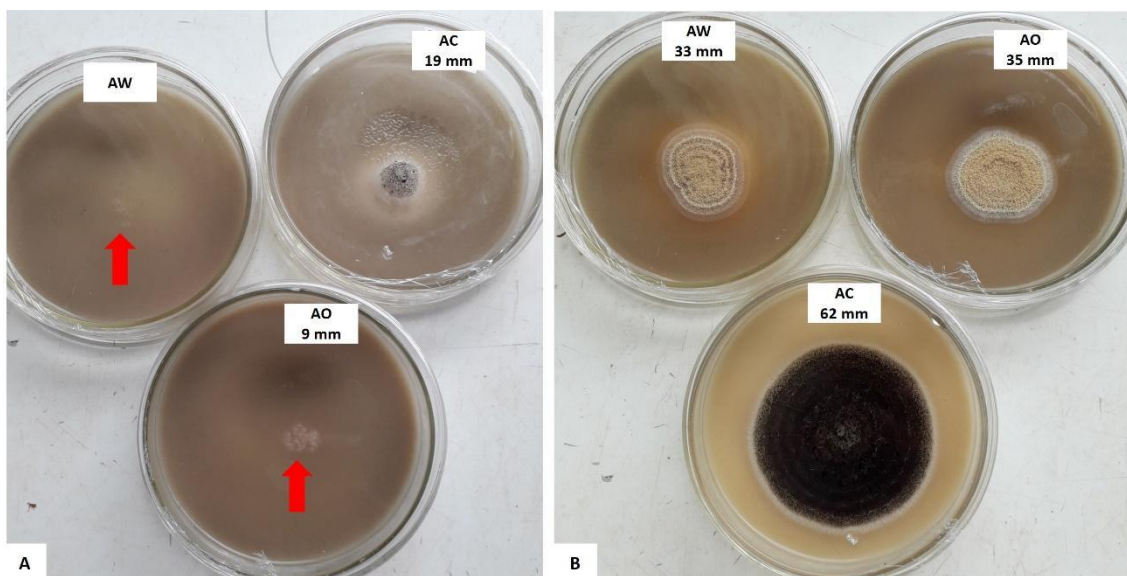


Figure 1. Growth evaluation of *A. westerdijkiae* CCDCA 11469 (AW), *A. carbonarius* CCDCA 10507 (AC), and *A. ochraceus* CCDCA 10490 (AO), without coculturing them with yeasts, after two different evaluation periods. **A)** 2nd day of culture. **B)** 7 days of culture. The red arrow indicates the position of the fungal colony.

At 7th day of culture (Figure 1B), *A. carbonarius* continuous showed the highest growth (62 mm), with colonies almost twice the size of those of *A. ochraceus* (35 mm) and *A. westerdijkiae* (33 mm). At that time, the cocultures showed an orange halo around the *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae* colonies.

When in coculture, mycelial growth varied over the evaluation time for each fungal strain (Figure 2), which was directly reflected in the percentage of inhibition. On the 2nd day, *A. ochraceus* (Figure 2A) and *A. westerdijkiae* (Figure 2B) showed similar inhibition patterns. In these cases, the growth of the filamentous fungi was slower than that of all yeast strains, which resulted in greater linearity (close to 100%). Starting at the 5th day of coculture, there was greater inhibition by the yeast strains at 7 log CFU/mL, reflected in the highest inhibition peaks (Figure 2, D5). The same behavior was observed on the 7th day of coculture, confirming that a higher concentration of yeasts is more efficient in inhibiting the growth of these fungal isolates.

Regarding *A. carbonarius* (Figure 2C), rapid growth of this isolate was observed, which made it less sensitive to the antagonistic action of yeast strains starting at the 2nd day of coculture. Of the 18 yeast strains tested, only *S. cerevisiae* CCMA 1313 (7 log CFU/mL) showed a significant antagonistic effect (approximately 100%) on *A. carbonarius* on day 2. From the 5th day onward, the antagonistic effect weakened, *A. carbonarius* grew rapidly, and the percentage of inhibition decreased significantly (<50% inhibition). The same behavior was observed at day 7. At that time, two other yeast strains were more effective in controlling *A. carbonarius*, S10 (*S. cerevisiae* CCMA 0159) and S18 (*W. anomalus* CCMA 1303).

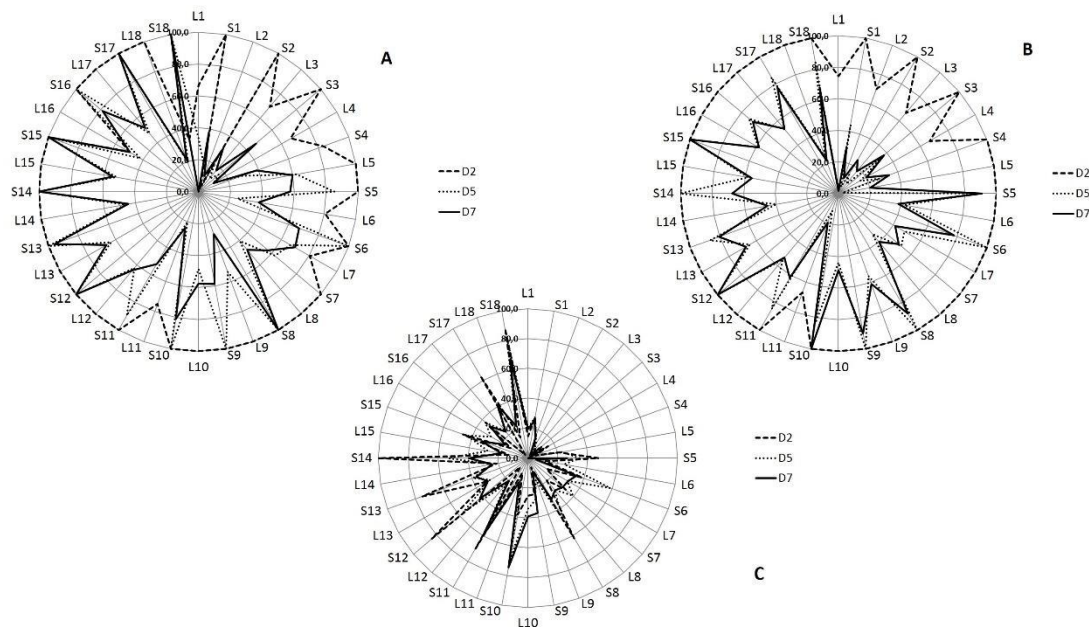


Figure 2. Percentage inhibition of (A) *A. ochraceus* CCDCA 10490, (B) *A. westerdijkiae* CCDCA 11469, and (C) *A. carbonarius* CCDCA 10507 in coculture with 18 different yeast strains at two concentrations: L – 4 log CFU/mL; S – 7 log CFU/mL. D2 - after 2 days; D5 - after 5 days; and D7 - after 7 days of culture.

The breakdown of the percentage of inhibition in each yeast-*Aspergillus* coculture at 4 and 7 log CFU/mL is in Table 1. The highest inhibition rates (highlighted), occurred in the cocultures of *S. cerevisiae* CCMA 0159 at 7 log CFU/mL with the three fungal isolates.

Table 1. Percentage inhibition growth of *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, and *A. westerdijkiae* by 18 yeast strains in coffee-based medium at 7th day.

Yeasts		<i>Ochratoxigenic fungi</i>		
Code	Species	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. westerdijkiae</i>	<i>A. carbonarius</i>
L1	<i>C. guilliermondii</i> CCMA 1296	0,0 dA	1,8 dA	19,5 cA
S1	<i>C. guilliermondii</i> CCMA 1296	37,5 cA	29,7 dA	25,4 cA
L2	<i>C. guilliermondii</i> CCMA 1297	10,5 dA	10,3 dA	14,3 cA
S2	<i>C. guilliermondii</i> CCMA 1297	31,0 dA	24,3 dA	4,8 cA
L3	<i>C. guilliermondii</i> CCMA 1298	17,2 dA	18,2 dA	2,2 cA
S3	<i>C. guilliermondii</i> CCMA 1298	47,0 cA	37,8 cA	10,2 cB
L4	<i>C. guilliermondii</i> CCMA 1308	10,7 dA	20,4 dA	11,1 cA
S4	<i>C. guilliermondii</i> CCMA 1308	38,7 cA	34,1 cA	1,6 cB
L5	<i>C. krusei</i> CCMA 1316	59,7 cA	20,5 dB	0,0 cB
S5	<i>C. krusei</i> CCMA 1316	57,4 cB	91,0 aA	26,4 cC
L6	<i>C. parapsilosis</i> CCMA 1292	38,2 cA	38,6 cA	5,4 cB
S6	<i>C. parapsilosis</i> CCMA 1292	67,1 bA	77,9 bA	34,5 bB
L7	<i>C. parapsilosis</i> CCMA 1304	69,8 bA	41,4 cB	30,9 bB
S7	<i>C. parapsilosis</i> CCMA 1304	57,3 cA	49,9 cA	30,4 bA
L8	<i>M. caribbica</i> CCMA 1294	47,7 cA	40,1 cA	28,3 bA
S8	<i>M. caribbica</i> CCMA 1294	100,0 aA	87,9 aA	31,8 bB
L9	<i>R. mucilginosa</i> CCMA 1305	28,4 dB	61,0 bA	9,6 cB
S9	<i>R. mucilginosa</i> CCMA 1305	58,8 cB	90,1 aA	37,4 bB
L10	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0159	57,6 cA	48,7 cA	39,2 bA
S10	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0159	80,9 bA	100,0 aA	74,4 aA
L11	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1299	24,3 dA	19,6 dA	17,0 cA
S11	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1299	52,3 cA	61,9 bA	59,6 aA
L12	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1302	64,4 bA	53,1 cA	19,8 cB
S12	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1302	100,0 aA	100,0 aA	41,6 bB
L13	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1306	66,6 bA	67,6 bA	30,9 bB
S13	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1306	96,0 aA	80,4 bA	36,8 bB
L14	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1313	44,6 cA	45,5 cA	24,4 cA
S14	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1313	100,0 aA	67,2 bB	39,5 bC
L15	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1315	54,6 cA	55,9 bA	18,1 cB
S15	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1315	100,0 aA	100,0 aA	33,0 bB
L16	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1317	49,7 cA	58,2 bA	17,6 cB
S16	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1317	78,5 bA	70,6 bA	32,8 bB
L17	<i>W. anomalus</i> CCMA 1300	52,1 cA	53,4 cA	22,9 cB
S17	<i>W. anomalus</i> CCMA 1300	100,0 aA	77,3 bA	40,7 bB
L18	<i>W. anomalus</i> CCMA 1303	21,5 dA	22,1 dA	23,0 cA
S18	<i>W. anomalus</i> CCMA 1303	100,0 aA	68,0 bB	67,3 aB

Scott-Knott test at the 5% probability level. Small letters evaluate the action of different yeasts for the same fungal isolate. Capital letters evaluate the action of the same yeast for the three fungal isolates. Different letters indicate statistical difference. Code: L – 4 log CFU/mL; S – 7 log CFU/mL

In some cocultures (S1, S3, S5, S6, S7, S10 e S18), the color of the culture medium changed from light brown to dark green, with an increase in pH from 5 to 8, as can be

seen in the example in Figure 3 (co-cultivation with strain S10 - *S. cerevisiae* CCMA 0159). The color change in the CMEA medium was faster and more intense for *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae*, which was observed from day 2 onward (Figure 3A) with yeast at 7 log CFU/mL and from day 5 onward (Figure 3B) in coculture with yeast at 4 log CFU/mL. In the cocultures with *A. carbonarius*, a change in color and pH was also observed but was only visible starting at the 5th day of culture.

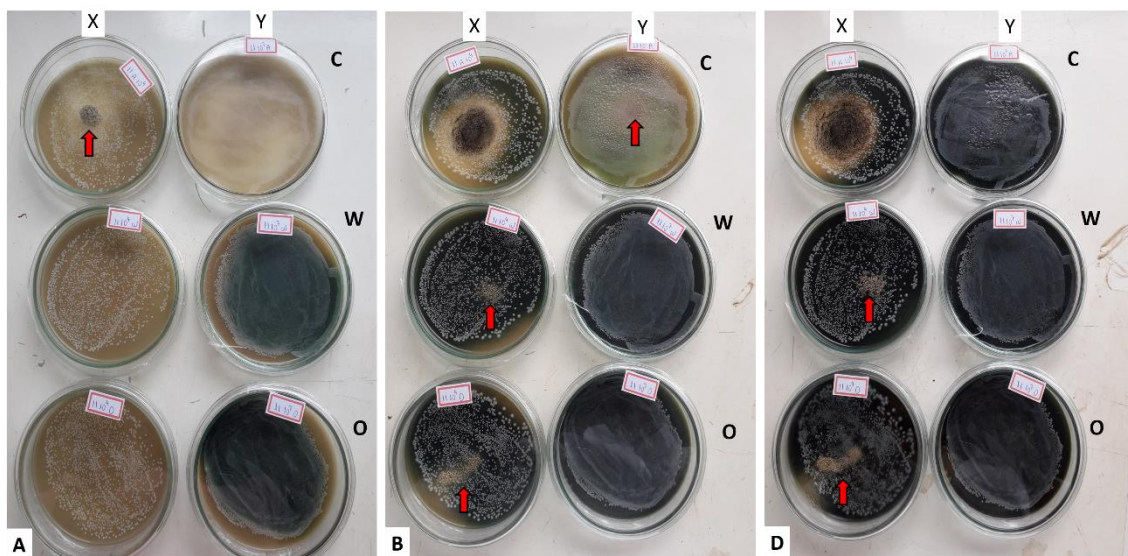


Figure 3. Evaluation of the antagonistic interaction of the yeast *S. cerevisiae* CCMA 0159 (X – 4 log CFU/mL; Y – 7 log CFU/mL) on: C - *A. carbonarius* CCDCA 10507; W - *A. westerdijkiae* CCDCA 11469; O - *A. ochraceus* CCDCA 10490. A) 2nd day of culture; B) 5th day of culture; D) 7th day of culture. The red arrow points to the fungal colony.

To understand what cause color change in the culture medium (filamentous fungus, yeast, or the interaction between them) and which metabolites (sugars, acids and volatile compounds) were being degraded or produced, tests were performed in liquid culture medium (CMEB). We detected that, in this medium, the presence of yeast cause the colour change (alone and coculture), producing some metabolites increasing the pH value results of the reaction with the compounds present in the coffee extract (Figure 4).

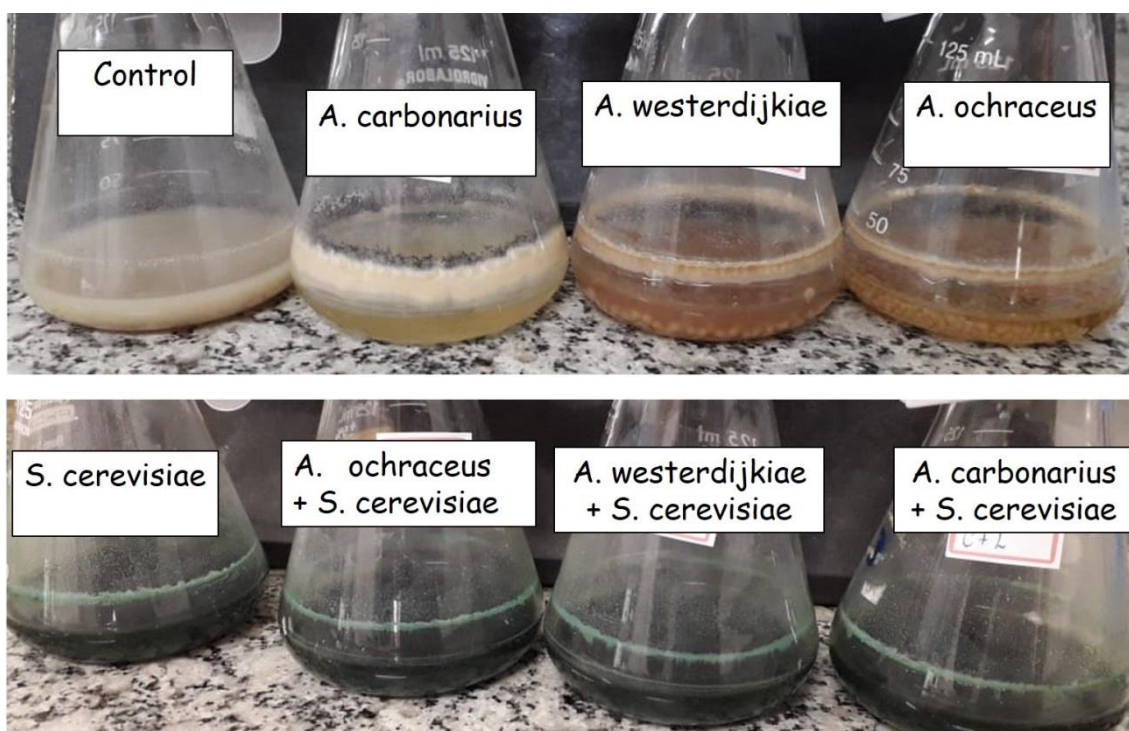


Figure 4. Culture of microorganisms in green coffee extract broth after 72 h. Control - green coffee extract without inoculation; Yeast - *S. cerevisiae* CCMA 0159.

The mean levels of organic acids and sugars detected during coculture of *Aspergillus* and *S. cerevisiae* CCMA 0159 in CMEB are given in Table 2. Of all organic acids, higher citric acid (11.09 g/L) content was observed in the control, followed by succinic acid (1.37 g/L) and malic acid (0.08 g/L). In contrast, in all cocultures, there was a reduction in citric acid content, especially in the presence of *A. carbonarius* (2.56 g/L), while an increase of malic acid was observed in the culture with *A. westerdijkiae* (0.65 g/L). In any condition succinic acid was not detected. The sugars detected in the CMEB were sucrose, glucose, fructose, and mannitol. Sucrose had the highest concentration (9.73 g/L), while mannitol had the lowest concentration (0.04 g/L). *A. carbonarius*, *S. cerevisiae*, and cocultures metabolized Sucrose and mannitol completely. In the culture of *A. carbonarius* or cocultures after 72 h glucose was not detected. In the culture with *A. westerdijkiae*, the concentration of fructose increased.

Table 2. Mean levels of organic acids and carbohydrates after 72 h of culture of yeast, fungi, and cocultures in green coffee extract broth.

	Negative control	AO	AW	AC	YEA	YEA +AO	YEA +AW	YEA +AC
Organic acids g/L								
Citric	11.09* ± 0.21**	7.44 ± 0.01	9.66 ± 0.01	2.56 ± 0.03	3.35 ± 0.08	3.58 ± 0.00	3.08 ± 0.00	3.23 ± 0.04
Malic	0.09 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.65 ± 0.01	0.03 ± 0.00	ND	0.07 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00
Succinic	1.37 ± 0.04	1.17 ± 0.14	ND	1.06 ± 0.01	ND	ND	ND	ND
Carbohydrates g/L								
Sucrose	9.73 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.02	ND	ND	ND	ND	ND
Glucose	0.22 ± 0.00	0.05 ± 0.05	0.18 ± 0.08	ND	0.71 ± 0.38	ND	ND	ND
Fructose	0.48 ± 0.01	0.02 ± 0.02	3.45 ± 0.04	0.86 ± 0.03	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.01	ND
Mannitol	0.04 ± 0.04	0.09 ± 0.09	0.15 ± 0.06	ND	ND	ND	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.01

* Mean of replicates of each treatment. ** Standard error (SD). ND - not detected.

Yea – *S. cerevisiae* CCMA 0159; AO – *A. ochraceus* CCDCA 10490; AW – *A. westerdijkiae* CCDCA 11469; AC – *A. carbonarius* CCDCA 10507.

The GC analysis identified 68 volatile compounds belonging to 10 chemical classes (Table 3). There were fewer compounds of the acid and alcohol classes and more ester compounds in all cultures and cocultures than the control. Only the Yea+AO treatment showed the presence of a compound of the lactone class and the absence of compounds of the alkane class. Only in the control and in the Yea+AC and AC treatment pyrrole compounds were observed, and aldehydes only in the Yea+AC treatment. The volatile compounds hexanoic acid and methyl salicylate were identified only in the treatments where the yeast was present (Yea, Yea+AO, Yea+AW, Yea+AC).

11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester	-	-	-	-	-	-	-
2-Ethylhexyl salicylate	-	-	-	-	-	-	-
2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	-	-	-	-	-	-	-
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	-	-	-	-	-	-	-
9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	-	-	-	-	-	-	-
9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	-	-	-	-	-	-	-
Hexadecanoic acid, ethyl ester	-	-	-	-	-	-	-
Hexadecanoic acid, methyl ester	-	-	-	-	-	-	-
Homosalate	-	-	-	-	-	-	-
Isopropyl palmitate	-	-	-	-	-	-	-
Linoleic acid ethyl ester	-	-	-	-	-	-	-
Methyl salicylate	-	-	-	-	-	-	-
Phenol (2)							
2-Methoxy-4-vinylphenol	-	-	-	-	-	-	-
Benzene, 4-ethenyl-1,2-dimethoxy-	-	-	-	-	-	-	-
Furane (3)							
5-Hydroxymethylfurfural	-	-	-	-	-	-	-
Benzofuran, 2,3-dihydro-	-	-	-	-	-	-	-
Furan, 2,2'-(1,2-ethenediyl)bis-, (E)-	-	-	-	-	-	-	-
Lactone (1)							
Butyrolactone	-	-	-	-	-	-	-
Pyrrole (1)							
Indole	-	-	-	-	-	-	-
Others (2)							
Caffeine	-	-	-	-	-	-	-
Squalene	-	-	-	-	-	-	-

Yea – *S. cerevisiae* CCMA 0159; AC – *A. carbonarius* CCDCA 10507; AO – *A. ochraceus* CCDCA 10490; AW – *A. westerdijkiae* CCDCA 11469; - Compound not detected; ■ Compound detected.

4 Discussion

In addition to the physiological factors of each strain, abiotic factors such as substrate or culture medium also affect the growth of filamentous fungi (Souza et al., 2016; Tryfinopoulou et al., 2019). Identifying such factors is important for controlling pathogens using antagonistic microorganisms. *A. carbonarius*, belonging to section *Nigri*, adapted more quickly to the CMEA medium, with faster growth since the initial days of evaluation than *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae*, which belong to section *Circumdati*. This may be related to the ability of *A. carbonarius* to use different carbon sources, metabolizing different types of sugars very quickly, as observed in the quantification of organic acids and sugars present in the medium after 72 h of culture. According to Frisvad et al. (2007), *Aspergillus* section *Nigri* are found in different environments around the world and are highly diversified and adaptable in terms of the carbon sources that they use for growth. In contrast, *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae* are the most nutritionally demanding and need a longer lag phase to adapt to the conditions of each environment/substrate.

Although phylogenetically similar, *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae* showed differences in initial growth. *A. westerdijkiae* had slower growth in the first days of culture, indicating that this microorganism needs slightly more time to adapt to the conditions of the medium and that this isolate has difficulty metabolizing any type of nutrient and has higher nutritional requirements.

Because it has accelerated growth, *A. carbonarius* is more difficult to control by yeasts, which necessitates the development biocontrol mechanisms other than competition, such as the production of antifungal metabolites. In turn, with the slower growth of *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae*, yeast can colonize the substrate more

quickly and initially inhibit the development of these filamentous fungi through competition for nutrients and space. In this study, we found that during growth, yeast consumed a large amount of organic acids present in the coffee medium, including the whole succinic acid, that resulted in an increase in the pH of the medium (data not shown), making it more alkaline, which probably caused the color change. Succinic acid produced by the fermenting yeast cells is the main contributor to the drop in pH (Jayaram et al., 2013). Filamentous fungi are generally acidophilic microorganisms that grow best at below pH values near 5, so these microorganisms were unable to develop in the higher-pH medium.

Yeasts growth in green coffee extract was able to produce some volatile metabolite, like hexanoic acid, recognized by their inhibition action over mycelial growth as well as spore germination of the filamentous fungi (Leyva et al., 2008), and other like methyl salicylate is typical plant compound producing to systemic resistance against pathogens. We can not explain if yeasts can use them to fungi inhibition or when in plant-association can help to gain resistance. The presence of the volatile compound like methyl salicylate in the cultures of *S. cerevisiae* CCMA 0159 and in the co-cultures can support this hypothesis, since Park et al. (2007) report this compound, as a mobile signal of the plant in the acquisition of systemic resistance acquired for defense against the attack of a pathogen, restricting its growth. In the case of this study it is believed that yeast was able to produce the compound, since the experiments were carried out with the culture medium and not with the plant in situ.

To ensure the efficiency of the mechanisms of antibiosis, competition, and induction of resistance in biological control, the initial concentration of the antagonist inoculum is a very important factor. Higher cellular concentration of the antagonist than to pathogen conferred a higher percentage of inhibition, being more efficient in the

control of ochratoxigenic fungi in a culture medium based on green coffee. In addition, the yeast strain influences the effectiveness of biological control.

For better efficiency of a biological control agent, it should have more than one mechanism of action. In this sense, *S. cerevisiae* CCMA 0159 was promising. Another requirement is that the antagonist agent must be inoculated before the arrival of the pathogen, so that a broad colonization of the substrate occurs, forming a protection that will prevent the establishment of the pathogen.

5 Conclusions

Yeasts are effective in controlling the growth of ochratoxigenic *Aspergillus* species, in a coffee-based medium. The highlighted strain was *S. cerevisiae* CCMA 0159, effective over all fungal isolates, including *A. carbonarius*. In addition, abiotic factors such as the composition of the medium, contact time of the microorganisms, pH and biotics, such as the higher cellular concentration of the antagonist increase the efficiency of biological control.

Acknowledgments

We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, for the scholarship to Taís Neves and Dra Suzana Evangelista for donating the coffee beans used in this study.

References

ANVISA — Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011- Dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos.

Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Silva, C. F., Cirillo, M., Varga, E. A., Schwan, R.

F., 2009. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food Control*, 20(9), 784–790.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.10.003>

Chalfoun, S. M., Parizzi, F. C., 2008. Fungos toxigênicos e micotoxinas no café,

cap 14. In: Borém, Flávio Meira (Ed). Pós-colheita do café. Lavras: UFLA, pp 511 - 543.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, 2020. Boletim -

acompanhamento da safra Brasileira. V.6 - SAFRA 2020 - N.3 – terceiro

levantamento. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe> (accessed 15 december 2020).

European Commission (EC). Regulation EC n° 123/2005 of 26 January 2005

amending regulation EC n° 466/2001 as regards ochratoxin A. Official

Journal of the European Union L25:3–5, 2005

Frisvad, J. C., Larsen, T. O., De Vries, R., Meijer, M., Houbraeken, J., Cabañes, F.

J., Ehrlich, K., & Samson, R. A., 2007. Secondary metabolite profiling,

growth profiles and other tools for species recognition and important

Aspergillus mycotoxins. In *Studies in Mycology*, 59, 31–37.

<https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.04>

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2019.

https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2019_v46_br_informativo.pdf (accessed 21 april 2021)

- Jayaram, V. B., Cuyvers, S., Lagrain, B., Verstrepen, K. J., Delcour, J. A., Courtin, C. M., 2013. Mapping of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites in fermenting wheat straight-dough reveals succinic acid as pH-determining factor. *Food Chemistry*, 136, 301–308. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.039>
- Kimati, H., Amorin, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A., Rezende, J. A. M., 1997. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres.
- Leong, S. L., Hien, L. T., An, T. V., Trang, N. T., Hocking, A. D., Scott, E. S., 2007. Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3), 301–306. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02189.x>
- Leyva, M. O., Vicedo, B., Finiti, I., Flors, V., Del Amo, G., Real, M. D., García-Agustin, P., González-Bosch, C., 2008. Preventive and post-infection control of *Botrytis cinerea* in tomato plants by hexanoic acid. *Plant Pathology*, 57, 1038–1046. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01891.x>
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., Samson, R. A., 2008. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.005>
- Oliveira, G., Evangelista, S. R., Passamani, F. R. F., Santiago, W. D., Cardoso, M. das G., Batista, L. R., 2019. Influence of temperature and water activity on

- Ochratoxin A production by *Aspergillus* strain in coffee south of Minas Gerais/Brazil. *Lwt*, *102*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.032>
- Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., Klessig, D. F., 2007. Methyl Salicylate Is a Critical. *Science*, *318*, 113–116. <https://doi.org/10.1126/science.1147113>
- Pimenta, R. S., Morais, P. B., Rosa, C. A., Corrêa, A., 2009. Utilization of Yeasts in Biological Control Programs. In: Satyanarayana, T., & Kunze, G. (Eds), *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, 199-214. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4_10
- Ribeiro, L. S., Miguel, M. G. P., Evangelista, S. R., Martins, P. M. M., van Mullem, J., Belizario Honorio, M., Schwan, R. F., 2017. Behavior of yeast inoculated during semi-dry coffee fermentation and the effect on chemical and sensorial properties of the final beverage. *Food Research International*, *92*, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.011>
- Silva, C. F., Schwan, R. F., Sousa Dias, E., Wheals, A. E., 2000. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, *60*(2–3), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00315-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00315-9)
- Souza, S. C., Pereira, V. M., Passamani, Fabiana, R. F., Cirillo, M. A., Cunha, R. L. da, Cardoso, M. das G., Santiago, W. D., Souza, S. M. C., Batista, L. R., 2016. Effects of temperature and incubation time on growth and ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in grain-

based media. *African Journal of Microbiology Research*, 10(32), 1306–1314.
<https://doi.org/10.5897/ajmr2016.7982>

Souza, M. L., Passamani, F. R. F., Ávila, C. L. da S., Batista, L. R., Schwan, R. F., & Silva, C. F., 2017. Uso de leveduras selvagens como agente de biocontrole contra fungos toxigênicos e produção de OTA. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 39(3), 349–358. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v39i3.32659>

Souza, M. L., Ribeiro L. S., Miguel, M. G. C. P., Batista, L. R., Schwan, R. F., Medeiros, F. H., Silva, C. F., 2021. Yeasts prevent ochratoxin A contamination in coffee by displacing *Aspergillus carbonarius*. *Biological Control*, 55, 1049-9644, <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104512>.

Spadaro, D., Droby, S., 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science and Technology*, 47, 39–49.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>

Spadaro, D., Gullino, M. L., 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 91(2), 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00380-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00380-5)

Taniwaki, M. H., Teixeira, A. A., Teixeira, A. R. R., Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., 2014. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. *Food Research International*, 61, 161–166.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.12.032>

Tryfinopoulou, P., Fengou, L., & Panagou, E. Z., 2019. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhotodorula mucilaginosa* on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius*. In *Lwt* (Vol. 105, pp. 66–78). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.0>

ARTIGO 2

**Simulation of coffee beans contamination by *Aspergillus* species under
different environmental conditions and the biocontrol effect by
*Saccharomyces cerevisiae***

Publicado na revista LWT – Food Technology

Simulation of coffee beans contamination by *Aspergillus* species under different environmental conditions and the biocontrol effect by *Saccharomyces cerevisiae*

Taís Teixeira das Neves, Rafaela Magalhães Brandão, Richard Bispo Barbosa, Maria das Graças Cardoso, Luis Roberto Batista, Cristina Ferreira Silva

Abstract

Temperature and water activity (a_w) are both responsible for the growth and production of ochratoxin A (OTA) by *Aspergillus* species in coffee. To prove this, we tested the effect of environmental factors combined with green coffee composition on the risk of OTA production as well as the efficiency of using *Saccharomyces cerevisiae* to control the growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. westerdijkiae*, and *A. carbonarius*, OTA production and biosynthetic genes expression regulation levels. The results showed a higher growth rate and OTA risk index (ORI) for the three fungal isolates at 21°C and 0.98 a_w . Temperature affected the growth of the isolates negatively. The ORI was influenced synergistically by a_w and antagonistically by temperature. The best condition for biological control by using *S. cerevisiae* CCMA 0159 was observed at 28 °C and 0.99 a_w . Temperature and a_w directly affected OTA production and biological control efficiency, but at different values. *A. carbonarius* CCDCA 10507 showed better growth and a greater risk of contamination in coffee. *S. cerevisiae* CCMA 0159 significantly reduced the risk of contamination by *Aspergillus* using substrate competition as strategies, acting on down regulation of OTA's biosynthetic gene expression, including *hal* and *p450*.

Keywords: Ochratoxigenic fungi, temperature, water activity, yeast, gene expression.

1 Introduction

Mycotoxins are secondary metabolites produced during a limited stage of the cell cycle, not necessary for fungal growth, but advantageous in competitive environments; therefore, they are related to survival (self-defense, inhibition of competing microorganisms, communication with the biotic environment, and differentiation effector) of the producer fungi (Zeilinger; García-Estrada & Martín, 2015). Among the mycotoxins of agricultural interest, ochratoxin A (OTA) is detected in foods, such as wheat, rye and beer (Jørgensen & Jacobsen, 2002), rice (Nguyen, Tozlovanu & Pfohl-Leszkwicz, 2007), green and processed coffee beans (Batista, Chalfoun, Prado, Schwan, & Wheals, 2003; Batista et al., 2009; Pardo, Marín, Ramos, & Sanchis, 2004; Taniwaki, Teixeira, Teixeira, Copetti, & Iamanaka, 2014), grape and its wine by-products, grape juice and raisin (Chulze, Magnoli, & Dalcerro, 2006; Hocking, Leong, Kazi, Emmett, & Scott, 2007), and cocoa and chocolate (Bonvehí, 2004), because these are cultures in which the harvesting process may lead to fungal development, especially at temperatures between 25–35 °C and 0.95–0.99 a_w and produces OTA at lower temperatures between 15–30 °C and 0.95–0.98 a_w (Magan, 2006; Medina, Akbar, Baazeem, Rodrigues, & Magan, 2007).

The continuing consumption of plant products contaminated by mycotoxins, in addition to animal product consumption, such as meat, milk, and contaminated eggs (Ji, Fan, & Zhao, 2016), increases the risk of harmful effects in humans. OTA causes toxicity to humans and especially animals, causing nephrotoxicity, immunotoxicity, genotoxicity, and teratogenicity in animal cells. Furthermore, OTA is classified by the Joint Expert Committee on Food Additives (FAO/WHO/JECFA) as a possible human carcinogen (group 2B), based on studies conducted on experimental animals (WHO, 2003).

OTA is synthesized by some filamentous fungi species mainly belonging to the genus *Aspergillus* and *Penicillium* (Pitt, 2000). Especially for coffee culture, the presence of *Aspergillus* sp. has been previously documented in various studies; from the *Circumdati* section: *A. ochraceus* (Batista et al., 2003; Batista et al., 2009; Rezende et al., 2013; Silva, Batista, & Schwan, 2008b), *A. westerdijkiae*, and *A. steynii* (Leong et al., 2007; Noonim, Mahakarnchanakul, Nielsen, Frisvad, & Samson, 2008) and the *Nigri* section: *A. carbonarius* and *A. niger* (Batista et al., 2003; Batista et al., 2009; Silva et al., 2008b; Taniwaki et al., 2014). Although OTA's biosynthetic pathway has not been clarified, Gil-Serna et al. (2018) reported the existence of a genic cluster that requires *pks*, *nrps*, *hal*, *p450* and *b-zip* genes on this mycotoxin biosynthesis.

The fungi are associated with fruits and coffee beans during the entire production cycle (Souza et al., 2017); however, its growth is fostered during processing, mainly during the fermentation and drying stages, especially for natural coffee since the fruit is completely dry (Silva, Batista, Abreu, Dias, & Schwan, 2008a). During processing, there is a reduction in the fruit humidity (11–13%). Under special climatic conditions, such as temperature (20–30°C), a_w (> 0.85) and humidity (20%), the right conditions are set for the development of *Aspergillus* sp. and OTA production, which, strengthened by its plant susceptibility owing to cultivation methods and techniques, compromise the safety of the finished product (Paterson, Lima, & Taniwaki, 2014; Silva et al., 2008a; Souza et al., 2016). Temperature and water activity (a_w) are the main environmental factors that influence fungal development and mycotoxin production (Marroquín-Cardona, Johnson, Phillips, & Hayes, 2014). OTA levels higher than 5 µg/kg in Brazilian coffee have been previously reported by Batista et al. (2009), presenting it to be a risk to human health and a barrier for commercialization as the limit imposed by Brazilian legislation is 10 µg/kg for roasted and soluble coffee.

In this regard, ochratoxigenic fungi control in the field and/or during the storage stage is the best strategy to control OTA contamination. Synthetic products have been commonly used to reduce fungal proliferation and mycotoxin production; however, chemical fungicides cause environmental and human health effects (Gil-Serna, Vázquez, Sardiñas, González-Jaén, & Patiño, 2011) and can only be used during the pre-harvest stage. Therefore, alternative methods, such as biological control, are necessary to reduce the use of these products.

The use of antagonistic microorganisms for biological control has been previously documented in other studies as a good alternative to reduce the usage of chemical products and the presence of such residuals in food products (Medeiros, Silva, & Pascholati, 2018). In this regard, yeasts are more suitable for biological control usage owing to their ability to colonize the plant surface, to maintain their viability for a long time under different environmental conditions (Pimenta, Morais, Rosa, & Corrêa, 2009), and the absence of allergen spores or toxic metabolite production during its inhibitory action (Tryfinopoulou, Fengou, & Panagou, 2019). Silva, Schwan, Dias, & Wheals, (2000) reported the natural presence of yeasts in coffee fruits. Many genera present inhibitor potentials; however, *Saccharomyces cerevisiae* stands out as a promising antagonist, showing a wide range of activity (Liu, Sui, Wisniewski, Droby, & Liu, 2013) and is naturally present in coffee fruits. Furthermore, studies have indicated that some *S. cerevisiae* strains can help improve the quality of coffee flavor (Bressani, Martinez, Evangelista, Dias, & Schwan, 2018; Evangelista et al., 2014).

The efficiency of yeast as an antagonistic agent of toxigenic fungi in synthetic environments has already been documented in several studies. However, in vitro tests to select the antagonistic microorganisms are essential under controlled conditions using coffee extract culture medium since the fruits and beans naturally have antimicrobial

components, such as caffeine and chlorogenic acid (Chalfoun & Batista, 2006), which may interfere with the efficiency of the antagonistic agents.

Our group identified *S. cerevisiae* CCMA 0159 as a promising yeast to act in ochratoxigenic fungi control by using a conventional medium (Souza et al., 2017). Nevertheless, the in vitro selection of an antagonistic agent under conditions similar to the field is fundamental for the success of the microbial biocontrol process, being the objective of this study. In this regard, the effect of environmental factors together with the green coffee-based culture medium on the i) growth and OTA production of *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* and *A. carbonarius* ii) *S. cerevisiae* CCMA 0159 efficiency on the growth control of ochratoxigenic fungi and OTA production iii) explore the effect of *S. cerevisiae* CCMA 0159 on OTA biosynthetic gene expression regulation.

2 Material and methods

2.1 Microorganisms

The *Saccharomyces cerevisiae* strain CCMA 0159, reported as a potential biocontrol agent for ochratoxigenic fungi (Souza et al., 2017), was isolated from fruits and natural coffee beans (Silva et al., 2008a), and belongs to the Culture Collection of Agricultural Microbiology (CCMA) of the Biology Department of the Federal University of Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brazil. The *Aspergillus carbonarius* CCDCA 10507, *A. ochraceus* CCDCA 10490, and *A. westerdijkiae* CCDCA 11469 strains, certified as OTA producers, are deposited in the Culture Collection of Microorganisms of the Food Science Department (WDCM 1081), Federal University of Lavras.

The yeast strain conserved at -80°C was reactivated in yeast extract peptone glucose (YEPG) medium, pH 3.5, and composition (g/L): yeast extract (10), peptone (20), glucose (10), and agar (15). The plates were incubated at 28°C for 24 h. For the

reactivation of the filamentous fungi maintained in paper discs at -80°C , the Malt Extract Agar medium (MEA) was used, composition (g/L): malt extract (20), bacterial peptone (1), glucose (20), and agar (20). The plates were incubated at 25°C for 7 days.

The inoculum preparation was performed as described previously by Souza et al. (2017). Briefly, a suspension of the reactivated yeast culture was transferred to Eppendorf tubes containing 1 mL of YEPG broth and incubated at 28°C for 24 h. Then, a serial decimal dilution was performed in a Neubauer chamber. For the fungal isolate, spore suspensions were obtained from the growth in the MEA medium for 7 days at 25°C , added to 10 mL of sterile distilled water containing 0.1% Tween 80, and filtered through sterile gauze to remove hyphae. Spore counting was also performed in the Neubauer chamber, and the final concentration was standardized at 10^5 spores/mL.

2.2 Green coffee-based culture medium

The coffee meal extract agar (CMEA) was prepared according to the methodology described by Oliveira et al. (2019), with modifications. Briefly, 175 g of ground green coffee beans (raw) was added to 500 mL of sterile deionized water and boiled for 60 min. Then, the liquid was cooled at room temperature and filtered using clean cotton fabric. The volume was adjusted to 1.000 mL, and then 20 g of agar was added. The initial water activity of the CMEA medium was 0.99, adjusted to 0.91, 0.92, 0.95, and 0.98, using different concentrations of glycerol (Table 1). The a_w values were verified using AquaLab CX-2 (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA).

Table 1. Glycerol volume used to adjust to the desired a_w at the green coffee-based culture medium (CMEA)

a_w	Green coffee extract (mL)	Agar (g)	Glycerol (mL)	Final volume (mL)
0.91	240	6	60	300
0.92	390	10	110	500
0.95	500	12	100	600
0.98	470	10	30	500
0.99	300	6	0	300

2.3 Central composite rotational design (CCRD)

CCRD was performed with two independent variables: temperature (X1) and a_w (X2) with a factorial design of 2^2 , resulting in 11 runs, with four factorial points, four axial points, and one central point (carried out in triplicate). The dependent variables were colonial fungal growth and OTA production. The temperature range and a_w were defined based on previous studies (Oliveira et al., 2019; Souza et al., 2016). The independent variables were defined into five levels (-1.41, -1, 0, +1, and +1.41) with respective decodified values as presented in Table 2. The values obtained for the independent variables were analyzed using Design-Expert 11 Software (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, EUA).

Table 2. Values of the independent variables that were used on the rotational central composite design

Independent Variables	Code	Levels				
		-1.41	-1	0	+1	+1.41
Temperature (°C)	X1	18	21	28	35	38
Water activity (a_w)	X2	0.91	0.92	0.95	0.98	0.99

2.3.1 *In vitro* assays

For each antagonism assay (co-cultivation of yeast + fungi), it was also performed as a control assay (only fungal cultivation). For the antagonistic assays, 100 µL of the yeast suspension was spread on the surface of the plate containing the CMEA medium. Subsequently, Petri dishes were centrally spot inoculated with 10 µL of the fungal spore suspension (10^5 spores/mL). In the control test (no yeast inoculation), only 10 µL of the fungal spore suspension was centrally inoculated into the Petri dishes (10^5 spores). The plates were incubated under specific conditions for each assay for 10 days.

2.3.2 *Fungal growth assessment at different temperature and a_w conditions and under the antagonist presence*

The diameter of the fungal colonies in the control and antagonism assays were measured on the 2nd, 5th, 7th, and 10th days of cultivation using a pachymeter. Fungal colony diameters were plotted against time, a linear regression was applied to obtain the line equation and the slope value, which represents the growth rate (Gil-Serna et al., 2014).

The percentage of inhibition of the growth rate was obtained considering the fungal growth rate in the control assay as 100%, according to equation 1.

$$\% \text{ inhibition} = \left[\frac{\text{growth rate (control)} - \text{growth rate(cocultivation)}}{\text{growth rate (control)}} \right] * 100$$

Equation 1

2.3.3 OTA quantification

OTA quantification in the different assays proceeded as described by Passamani et al. (2014). Three plugs were removed from the center, middle, and edge of each colony on the 10th day of growth in the CMEA medium and placed in test tubes with a cap, and then 1 mL of pure methanol was added. The tubes were homogenized vigorously for 5 s and kept at 25°C for 60 min. The extracts were filtered in polytetrafluoroethylene membranes (0.22 µm; Millipore Corp., Billerica, MA) and analyzed in an HPLC system equipped with a fluorescence detector RF-10 AXL (λ_{exc} 330 nm; λ_{em} 460 nm) using a Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6. 250 mm, 5 µm) column.

OTA concentration in the samples was determined using an analytical curve obtained through linear regression ($y = ax+b$, where y is the peak area and x is the OTA concentration). The calculation defined the peak area versus the concentration of the respective standard solution. The detection limit (DL) and the quantification limit (QL) were estimated using the parameters obtained from the analytical curve and calculated following $DL = 3 SD/m$ e $QL = 10 SD/m$ (in which SD is the standard deviation and m is the slope of the linear regression). All the samples and standard OTA solutions were evaluated in triplicate.

2.3.4 OTA risk index calculation

The OTA production was evaluated concerning the OTA risk index (ORI), suggested by Gil-Serna et al. (2014), which relates the fungal growth with the production of OTA in vitro at the end of the experiment (10 days of incubation). The ORI was calculated according to equation 2.

$$ORI = \log[OTA \text{ concentration } (ng/mm^2) * \text{ fungal colony surface } (mm^2) + 1]$$

Equation 2

This index indicates the predicted risk of OTA contamination due to changes in environmental conditions. The higher the ORI value, the greater the risk of OTA contamination. The percentage of ORI reduction was obtained considering the ORI from the control assay as 100% according to equation 3.

$$\% ORI \text{ reduction} = \left[\frac{ORI (\text{control}) - ORI (\text{cocultivation})}{ORI (\text{control})} \right] * 100$$

Equation 3

2.4 Total RNA extraction, cDNA synthesis and genic expression analysis

After 10 days of growth under 22 °C and 0.98 a_w , *A. westerdijkiae* and *A. carbonarius* (control and co-cultivation) mycelium were transferred to eppendorf tubes and froze until RNA extraction. Total RNA was extracted using E.Z.N.A.® - Kit - Total RNA Extraction - Omega Bio-Tek, following the manufacturer's recommendation. To guarantee the full removal of DNA, treatment with DNase was made. To do that, it was used RNase-Free DNase I Set, Omega - BioTek. The quality of RNA was analyzed through agarose (1% w/v) gel electrophoresis and RNA concentration has been determined using a NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific™, EUA) spectrophotometer. Later, to synthesize 20 ul of cDNA, it was used 1 ug of total RNA and reverse transcriptase enzyme Kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription - Applied Biosystem). Relative quantification of *pks*, *nrps*, *b-zip*, *hal* e *p450* gene expression was made using RT-PCR protocols and the primers (Table 5) according to Gil-Serna et al (2018) for *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae*. RT-PCR tests were made with a Rotor-Gene Q (Qiagen, Hombrechtikon, ZH, Suíça) system. Reaction final volume (15 µl) was made by 7,5 µl master mix Rotor-Gene SYBR® Green (Qiagen, Stockach Konstanz, Alemanha), 1,5 µl direct primer (10 µM), 1,5 µl reverse primer (10 µM), 1,5 µl cDNA and 3 µl DEPC

water. It was made a negative control for each gene through the replacement of cDNA samples by water (1,5 µl). RT-PCR tests were analyzed using the program according to the following conditions: 95 °C per 5 min, 40 cycles at 95 °C per 5 s and 55 °C per 10 s. All the reactions were realized in duplicates. The relative quantification was evaluated through the standard curve obtained for each gene. It was calculated with the help of a linear equation, which was capable of relating medium Ct (threshold cycle) and the control cDNA log concentration, in each dilution, according to the methodology proposed by Dos Santos (2012). The results were concluded using the reference of the β -tubulin gene.

Table 5. Primers used in the real-time RT-PCR for each gene of the OTA biosynthetic pathway in each fungal isolate.

<i>A. westerdijkiae</i> , sense 5'- 3'	<i>A. carbonarius</i> , sense 5'- 3'
btub	btub
Btub_wesF CCGAGTTGACCCAGCAGATGT	Btub_carF GGACGAGATGGAGTTCCTGA
Btub_wesR GACCTCCTTCATGGAGACCTTA	Btub_carR CCTCTTGCTCAAGGACCTCCT
halwest	halcar
HAL_wesF2 AGGAGGGAGAGGATGGGTTC	HAL_carF GCCAGTAGAGGGACAGCCAT
HAL_wesR2 GCTCTTGCTGAAGGCGACAG	HAL_carR GCTGGAGGTGGTGGTTGAGA
bZIPwest	bZIPcar
BZip_wesF GCTCAACAGCACAGTTCGAGT	BZip_carF CTCGACGGTTCGAGCCTTCT
BZip_wesR GCGACATGGTAGTTGACTGAGA	BZip_carR GCATTGCTCTAGCTGCTCGA
p450west	p450car
P450_wesF CCAGAGAATCTGTCCGACTGA	P450_carF CCATCGTCTCCAGAGAATCAGT
P450_wesR CCTCGAGATCCGTCCATCGTT	P450_carR GGTCTCGTCGTGATGAATCAAG
nrpswest	nrpscar
NRPS_wesF GCTTGCTGACAAGCCGATGAC	NRPS_carF CGGTAGAAAGACTGCAGTCCAT
NRPS_wesR GGTCGTCAGTCGCTCATCCA	NRPS_carR CGTCGGAATCCATTGCGCTGA
pkswest	Pkscar
PKS_wesF GCAGATATCAGACAAGGCATCT	PKS_carF GGGATCGTACGATCTGGTGAT
PKS_wesR GCACGTAAGATGCGCTAGAGT	PKS_carR GGGAACACATGAGGTCAGGCT

Font: Gil-Serna et al (2018)

2.5 Statistical Analysis

The percentage of inhibition of fungal growth on the different assays was submitted to analysis of variance (ANOVA) and the Scott-Knott test at a level of 5% probability, using the statistical program R studio (R i386 3.3.3). The Pareto charts from the CCRD were created using Statistic Release 7.1, Stat. Soft. Inc., USA software. The results of genic expression were analyzed using ANOVA and T-test to compare media. Charts were made using GraphPad Prism 5.0 (Graphpad Inc.) software.

3 Results

The effect of temperature and a_w on the growth rate of the fungal isolates *A. westerdijkiae* CCDCA 11469, *A. ochraceus* CCDCA 10490, and *A. carbonarius* CCDCA 10507 and the OTA risk index (ORI) were assessed using the CCRD. The growth rate of the isolates varied from 0–10.17 mm/day (Table 3). *A. westerdijkiae* CCDCA 11469 showed the highest growth of 10.17 mm/day, followed by *A. carbonarius* CCDCA 10507 with 9.88 mm/day at 21°C and 0.98 a_w (run 3).

Table 3. Growth rate of each isolate fungal in coffee extract culture and its respective OTA risk index (ORI) assessed by CCRD.

Run	Variables		Growth rate (mm/day)			OTA (ng/g)			ORI		
	X1	X2	AW	AO	AC	AW	AO	AC	AW	AO	AC
1	-1(21)	-1(0.92)	4.61	4.41	2.88	2.91	ND	369.95	2.04	0.00	3.95
2	1(35)	-1(0.92)	1.50	1.58	2.61	2.41	ND	4.65	1.48	0.00	2.09
3	-1(21)	1(0.98)	10.17	6.73	9.88	4.29	4.52	2581.54	2.55	2.43	5.36
4	1(35)	1(0.98)	0.00	1.85	4.5	ND	ND	137.47	0.00	0.00	3.75
5	-1.41(18)	0(0.95)	4.38	3.97	5.05	2.63	2.30	518.46	1.98	1.89	4.33
6	1.41(38)	0(0.95)	0.00	0.00	1.17	ND	ND	104.26	0.00	0.00	3.02
7	0(28)	-1.41(0.91)	4.50	5.82	6.73	2.16	ND	24.29	1.88	0.00	3.12
8	0(28)	1.41(0.99)	5.11	4.64	7.64	3.57	4.25	1053.91	2.25	2.30	4.93
9	0(28)	0(0.95)	9.17	8.78	9.61	2.54	3.31	187.69	2.34	2.38	4.20
10	0(28)	0(0.95)	9.18	8.79	9.61	2.54	3.31	187.69	2.34	2.40	4.23
11	0(28)	0(0.95)	9.17	8.81	9.61	2.54	3.31	187.69	2.33	2.41	4.22

X1 – temperature, X2 – water activity (a_w), AW - *A. westerdijkiae* CCDCA 11469, AO - *A. ochraceus* CCDCA 10490 and AC - *A. carbonarius* CCDCA 10507, ND - not detected.

The growth rate of *A. ochraceus* CCDCA 10490 was the lowest compared to that of the other isolates, reaching a peak value of 8.79 mm/day at 28 °C and 0.95 a_w (average of the central point). At 38 °C (run 6), there was no *A. ochraceus* CCDCA 10490 growth. Similarly, *A. westerdijkiae* CCDCA 11469 did not grow at 35 °C and 38 °C and 0.98 a_w (runs 4 and 6).

The OTA concentration varied from 0–2.581,54 ng/g (Table 3). *A. ochraceus* CCDCA 10490 and *A. westerdijkiae* CCDCA 11469 showed an OTA peak production of 4.52 and 4.29 ng/g respectively, whereas *A. carbonarius* CCDCA 10507 reached up to a concentration of 2.581,54 ng/g at 21°C and 0.98 a_w (run 3). *A. ochraceus* CCDCA 10490 and *A. westerdijkiae* CCDCA 11469 produced lower concentrations of OTA than *A. carbonarius* CCDCA 10507 under all the conditions evaluated. Furthermore, *A. ochraceus* CCDCA 10490 did not produce OTA at $a_w \leq 0.92$ and temperatures ≥ 35 °C.

The ORI values varied from 0–5.36 (Table 3). *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae* presented a lower risk of contamination with a maximum ORI value of ≤ 2.55 (run 3), whereas *A. carbonarius* presented a higher risk of contamination, reaching up to an ORI higher than 5.36 (run 3). Considering $a_w \leq 0.92$ and temperatures higher than 35 °C *A. ochraceus* did not present a risk of contamination.

3.1 Growth rate of the control assay

The estimated effects of temperature and a_w were statistically significant ($p \leq 0.05$), and antagonistic or synergistic effects can be observed on the Pareto cart (Figure 1). The temperature caused more antagonistic effects in the three fungal isolates than the a_w . That is, the higher the temperature, the lower the fungal growth. The a_w also presented significant antagonistic effects on *A. ochraceus* CCDCA 10490 and *A. westerdijkiae* CCDCA 11469. In contrast, for *A. carbonarius* CCDCA 10507, the effect of the a_w was

synergetic. The interaction between temperature and a_w was significantly antagonistic only for *A. westerdijkiae* CCDCA 11469, indicating that the combination of temperature and a_w interferes with the growth of this isolate.

The model fit was assessed using the determination coefficient (R^2). For *A. ochraceus*, the resulting regression equation indicated $R^2=0.97$, *A. westerdijkiae* presented $R^2=0.94$, and *A. carbonarius* obtained $R^2=0.93$. These results suggest that the model adequately fitted the quadratic experimental data, explaining 97, 94, and 93% of the variability in the response to *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, and *A. carbonarius*, respectively. The experimental results were modeled with a second-order polynomial equation to explain the dependence of fungal growth on the two factors analyzed (temperature and a_w). The F test was utilized to verify the statistical significance of the model. Furthermore, the p-values indicate significant regressions ($p \leq 0.05$). Table 4 indicates the mathematical model, the coefficient of determination R^2 , and the statistical parameters of each predicted model.

Table 4. Predicted models to the mycelial growth and ORI of the evaluated isolate *Aspergillus*.

Fungi	Predicted Model	R^2	F-value	p-value
<i>A. ochraceus</i>	$X = 8.79 - 1.67T - 0.11a_w - 3.39T^2 - 1.77a_w^2 - 0.51T*a_w$	0.97	32.67	0.0008
	$Y = 2.4 - 0.64T + 0.71a_w - 0.84T^2 - 0.73a_w^2 - 0.61T*a_w$	0.96	29.96	0.0010
<i>A. westerdijkiae</i>	$X = 9.17 - 2.43T + 0.61a_w - 3.35T^2 - 2.04a_w^2 + 0.61T*a_w$	0.94	16.20	0.0042
	$Y = 2.34 - 0.74T - 0.06a_w - 0.68T^2 - 0.14a_w^2 - 0.50T*a_w$	0.96	28.09	0.0011
<i>A. carbonarius</i>	$X = 9.61 - 1.39T + 1.27a_w - 3.29T^2 - 1.26a_w^2 + 1.28T*a_w$	0.93	13.27	0.0065
	$Y = 4.22 - 0.66T + 0.70a_w - 0.29T^2 - 0.11a_w^2 - 0.06T*a_w$	0.95	21.72	0.0021

X – growth rate on the control-assay (mm/day), Y – ORI, T – Temperature ($^{\circ}\text{C}$), a_w – water activity. p-value ≤ 0.05 , statistically significant.

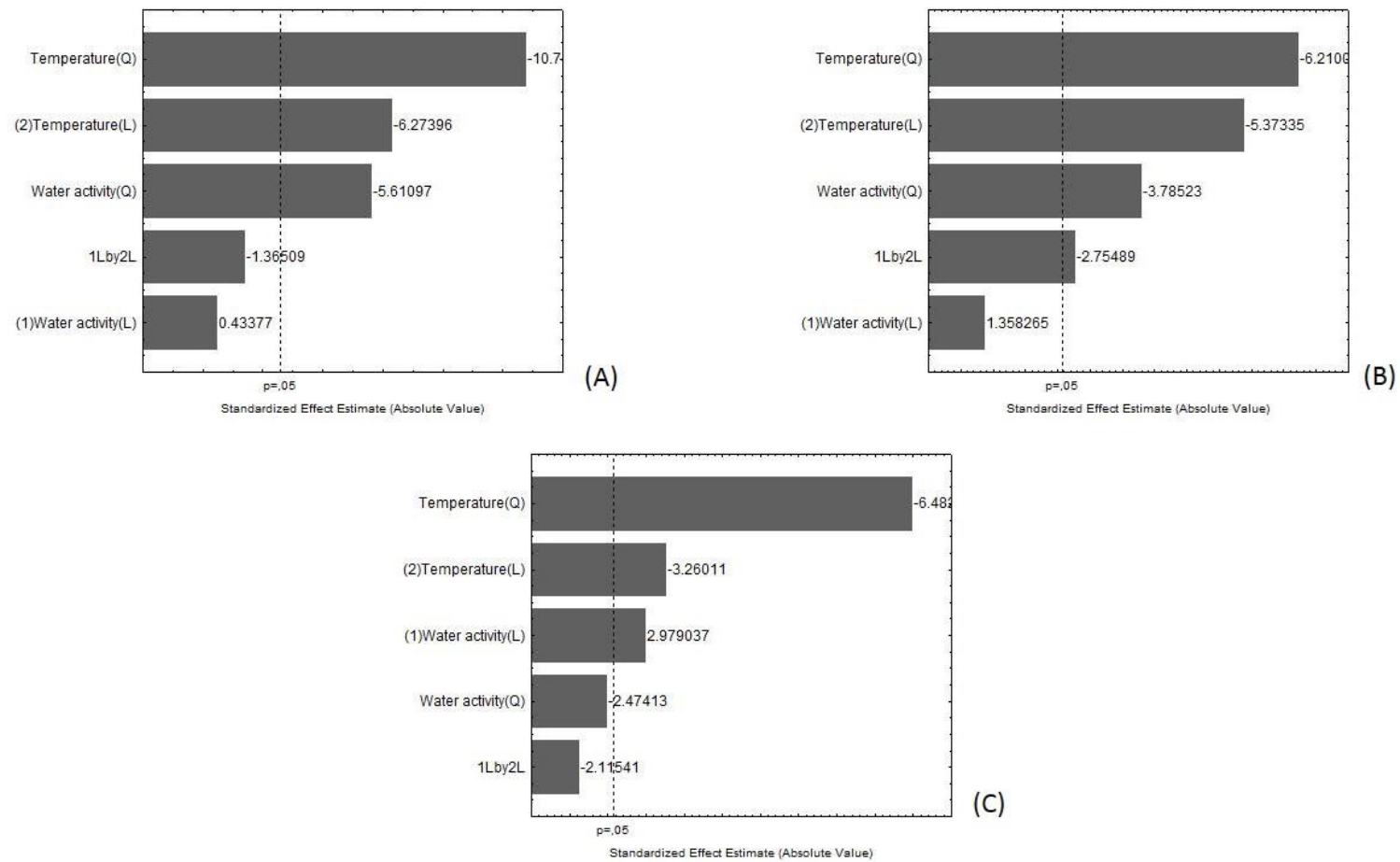
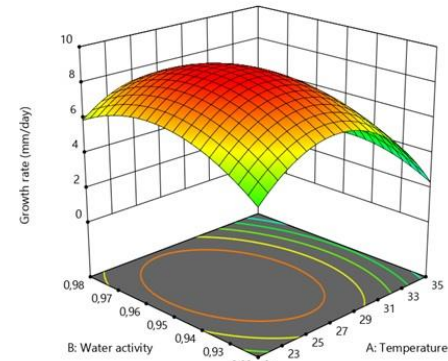


Figure 1. Pareto Chart illustrating the effects of temperature, water activity and its interactions on the mycelial growth rate of A) *A. ochraceus* CCDCA 10490, B) *A. westerdijkiae* CCDCA 11469 and C) *A. carbonarius* CCDCA 10507. Negative values indicates antagonism and positive values indicates synergy. Dotted line, significant at 5% probability.

The prediction of optimal conditions for a higher growth rate of each fungal isolate was experimentally determined using response surface methodology (RSM). The three-dimensional graphics of the response surface were plotted with the interaction of independent variables (temperature and a_w) on the predicted response Y (growth rate). The RSM (Figure 2) defined the pattern for the growth rate. The predicted optimal conditions for a higher growth rate of *A. ochraceus* (9 mm/day) was 26°C and a_w 0.95, whereas for *A. westerdijkiae* (9.83 mm/day) and *A. carbonarius* (10.28 mm/day), they were 25°C, a_w 0.96, and 0.97, respectively.

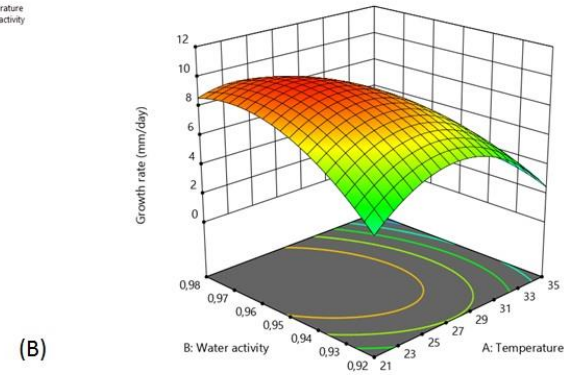
Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Growth rate (mm/day)
0 0,81

X1 = A: Temperature
X2 = B: Water activity



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Growth rate (mm/day)
0 10,17

X1 = A: Temperature
X2 = B: Water activity



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Growth rate (mm/day)
1,17 0,88

X1 = A: Temperature
X2 = B: Water activity

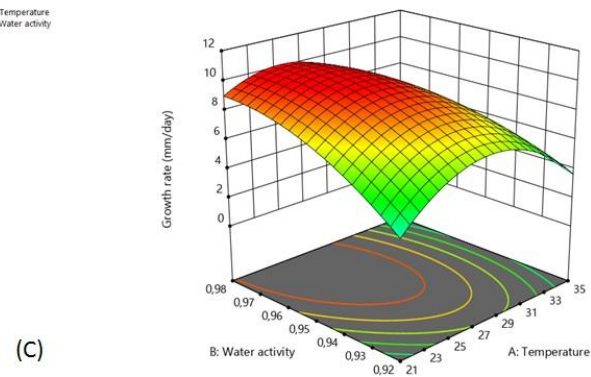


Figure 2. Effect of the temperature and a_w on the mycelial growth of A) *A. ochraceus* CCDCA 10490, B) *A. westerdijkiae* CCDCA 11469 and C) *A. carbonarius* CCDCA 10507. Response surface for growth rate during Central Composite Rotational Design (CCRD).

3.2 Effects of temperature and water activity on the OTA risk index (ORI) on the control assay

The ORI related fungal growth to OTA in vitro production at the end of the experiment (10 days incubation) at each temperature and a_w condition. This index indicates the risk of OTA contamination due to changes in environmental conditions. The higher the ORI value, the higher the risk of OTA contamination.

The estimated effects can be observed on the Pareto chart (Figure 3), where the factors T and a_w were statistically significant ($p \leq 0.05$) as well as the type of effect (antagonistic or synergistic). The factor that affected ORI was the a_w for *A. ochraceus* and *A. carbonarius*. The main effect of a_w was synergetic, whereas the temperature was antagonistic. For *A. westerdijkiae*, the temperature was the main factor that affected the ORI values, providing antagonistic effects. The interaction between temperature and a_w had an antagonistic effect on the ORI for *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae*.

The model fit was assessed using the determination coefficient (R^2). The resulting regression equation indicated an $R^2=0.96$ for *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae*, whereas *A. carbonarius* obtained an $R^2=0.95$, indicating a proper fit to the quadratic experimental data, explaining 96% of the variability in the response to *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae*, and 95% to *A. carbonarius*. Throughout the results obtained, the mathematical models were designed (Table 4) to explain the ORI dependency on temperature and a_w . The prediction of optimal conditions for higher risk of contamination of each fungal isolate was experimentally determined using the RSM (Figure 4). The prediction of the optimal conditions to higher ORI for *A. ochraceus* (2.87) was 24°C and a_w 0.97, whereas for *A. westerdijkiae* (2.69) and *A. carbonarius* (5.11) were 22°C and a_w 0.98, respectively.

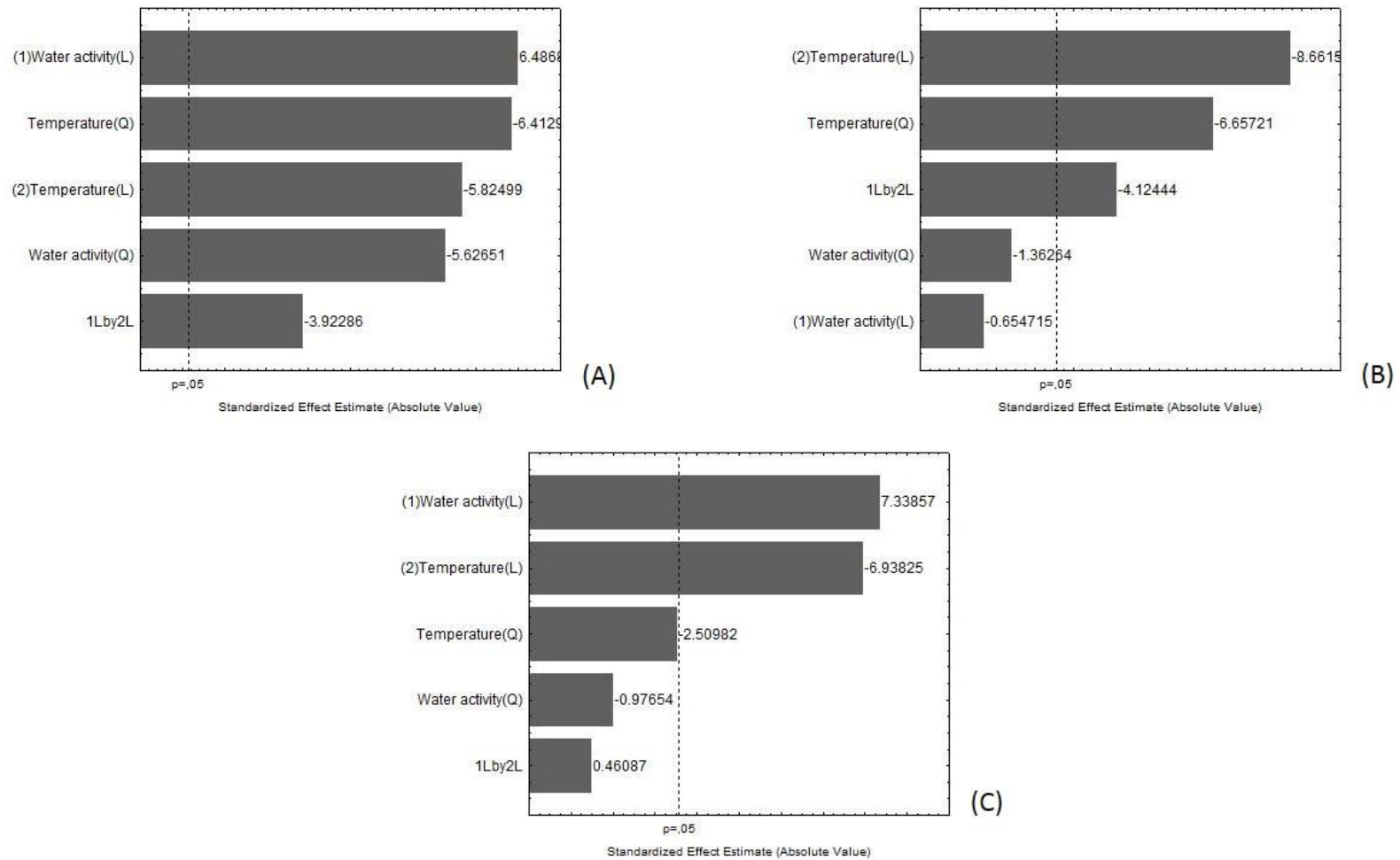
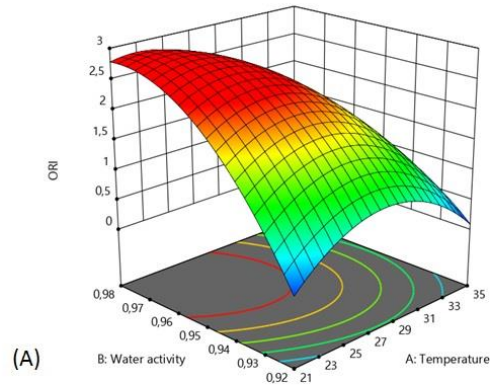


Figure 3. Pareto chart illustrating the effects of temperature, water activity and its interactions on the OTA risk index (ORI) of A) *A. ochraceus* CCDCA 10490, B) *A. westerdijkiae* CCDCA 11469 and C) *A. carbonarius* CCDCA 10507. Negative values indicates antagonism and positive values indicates synergy. Dotted line, significant at 5% probability.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

ORI
0 2.43

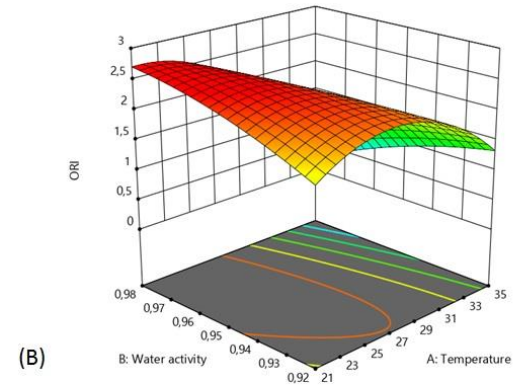
X1 = A: Temperature
X2 = B: Water activity



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

ORI
0 2.55

X1 = A: Temperature
X2 = B: Water activity



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

ORI
2.09 5.36

X1 = A: Temperature
X2 = B: Water activity

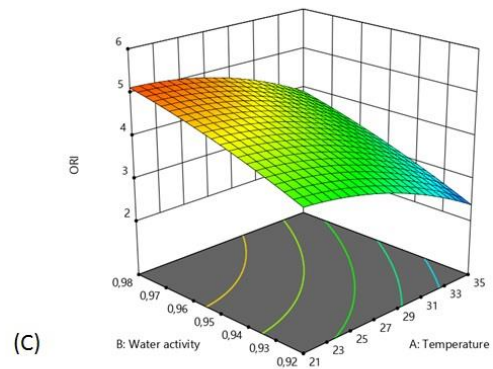


Figure 4. Influences of temperature and a_w on ORI of A) *A. ochraceus* CCDCA 10490, B) *A. westerdijkiae* CCDCA 11469 and C) *A. carbonarius* CCDCA 10507. Response surface for ORI during Central Composite Rotational Design (CCRD).

However, for food, the ideal environmental conditions are those that provide a lower ORI. In this case, for *A. ochraceus* (0.08) and *A. carbonarius* (2.38) a_w 0.92 and 0.98 for *A. westerdijkiae* (0.23) at 35 °C.

3.3 Fungal growth and ORI calculation using *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0159

The fungal growth and ORI calculation on the antagonism assay using *S. cerevisiae* CCMA 0159, were evaluated only under conditions where there was growth and OTA production for the three isolates simultaneously on CCRD. The percentage of growth inhibition rate is shown in Figure 5. The inhibition of *A. ochraceus* varied from 73–80 %, without presenting any significant differences ($p > 0.05$). The highest inhibition rates were found for *A. westerdijkiae* (76 %) and *A. carbonarius* (97 %) at 28 °C and 0.99 a_w .

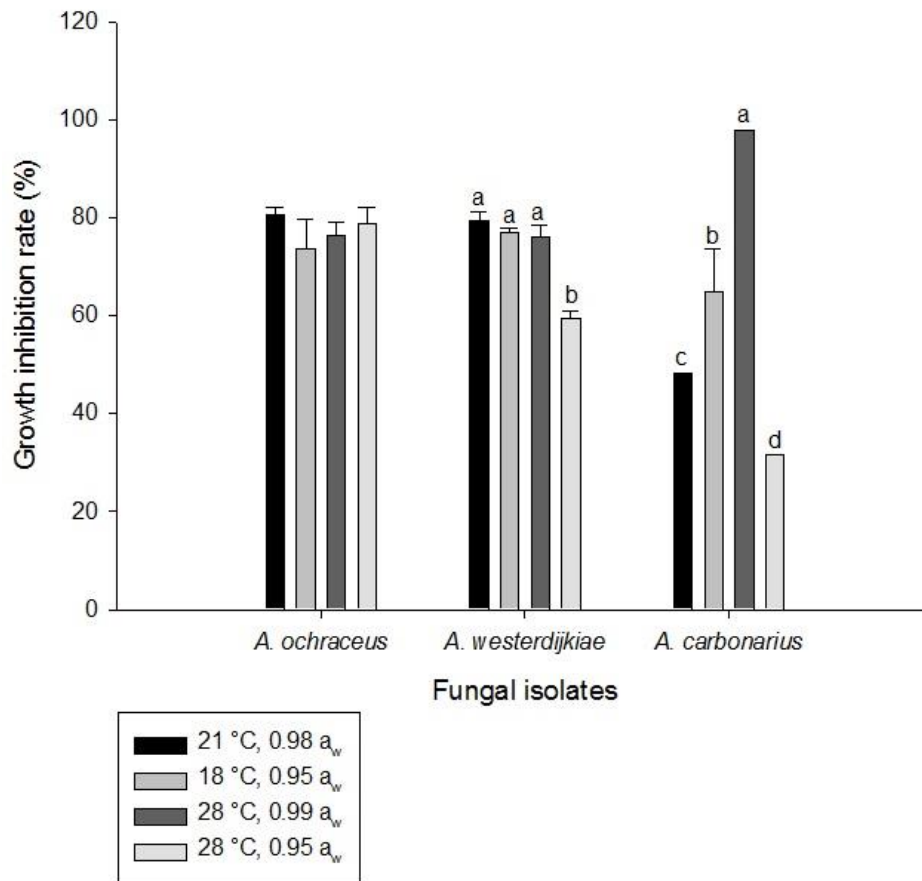


Figure 5. Impacts of *S. cerevisiae* CCMA0159 as an antagonistic agent on the inhibition growing index of *A. ochraceus* CCDCA 10490, *A. westerdijkiae* CCDCA 11469 and *A. carbonarius* CCDCA 10507 under different conditions of a_w and temperature. The data are illustrated as the average of three values (repetitions) obtained from each isolate and the correspondent standard error (vertical line). Different letters indicate the statistical differences at 5% of probability as for Scott-Knott test.

The risk of contamination by *A. ochraceus* was not identified in either of the tested conditions and for *A. westerdijkiae* at the conditions of 28°C and 0.95 and 0.99 a_w . *A. carbonarius* provided lower contamination risk (1.39) under the conditions of 28°C, 0.99 a_w . The ORI reduction percentage of fungal isolates by the yeast is illustrated in Figure 6.

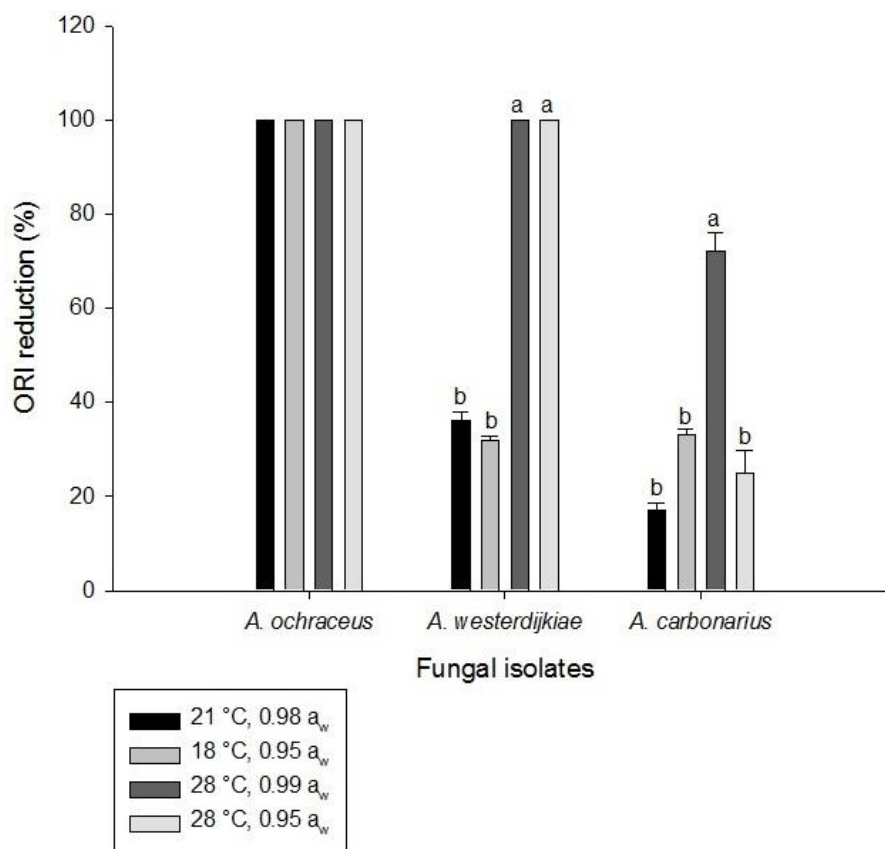


Figure 6. Impacts of *S. cerevisiae* CCMA 0159 usage for fungi ORI reduction *A. ochraceus* CCDCA 10490, *A. westerdijkiae* CCDCA 11469 and *A. carbonarius* CCDCA 10507 under different temperature and a_w conditions. The data are represented as an average of the three values (repetitions) obtained from each isolate and the standard error (vertical line). Different letters indicate statistical differences at a 5% probability level as for Scott-Knott test.

In the antagonism assay at 28°C and a_w 0.99, the yeast reduced the mycelial growth of the three fungal isolates, and a change in the culture medium was also noticed, shifting from light brown to dark green, with a consequent change in the pH levels from 5.0–8.0, respectively (Figure 7). The isolate control assay of *A. ochraceus* CCDCA 10490 and *A. westerdijkiae* CCDCA 11469, presented a transparent halo around the colony, indicating metabolites production, possibly related to the degradation of the compounds contained in the green coffee culture medium. This was not observed during the co-cultivation, indicating the physiological change in these isolates in the presence of *S. cerevisiae* CCMA 0159 yeast, excreting different metabolites.

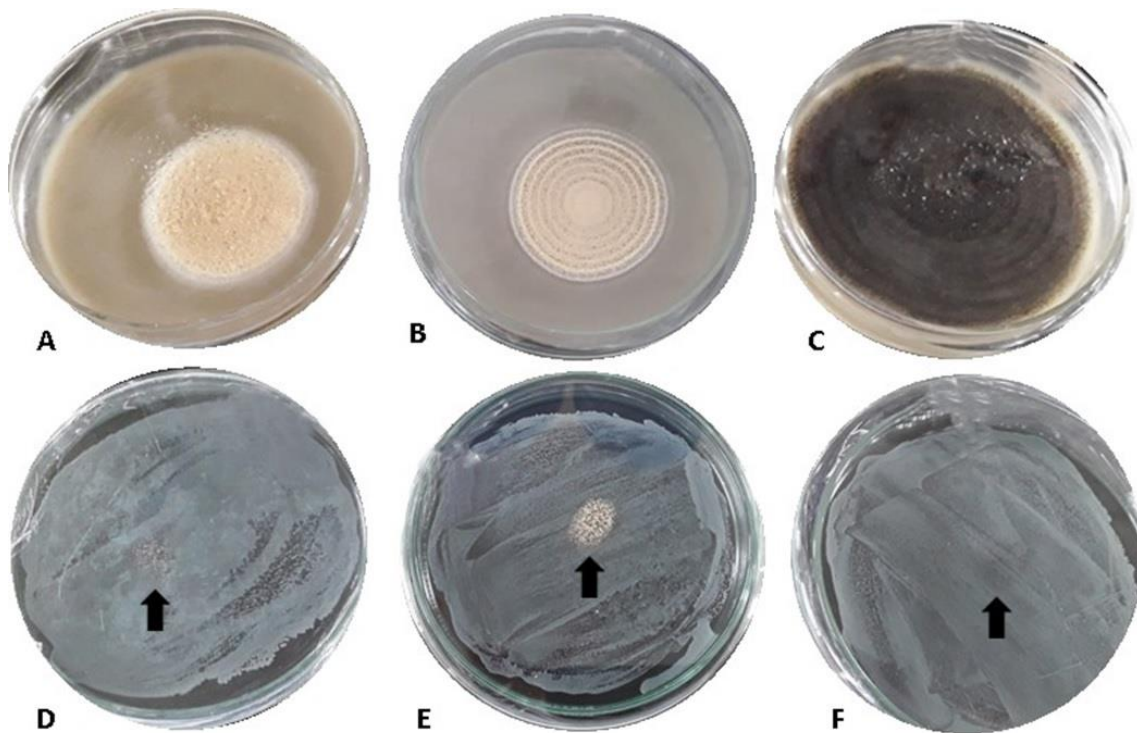


Figure 7. Filamentous fungi growth under temperature at 28°C and a_w 0.99 conditions. Control: A) *A. ochraceus* CCDCA 10490 (47 mm), B) *A. westerdijkiae* CCDCA 11469 (49 mm), C) *A. carbonarius* CCDCA 10507 (80 mm). Co-cultivation: D) CCMA 0159 + *A. ochraceus* CCDCA 10490 (8.7 mm), E) CCMA 0159 + *A. westerdijkiae* CCDCA 11469 (9.3 mm), F) CCMA 0159 + *A. carbonarius* CCDCA 10507 (7.7 mm). The arrows indicate the fungal colony location.

3.4 Genic expression analysis

Genic expression results are presented in figure 8. All genes in the OTA metabolic pathway by *A. carbonarius* and *A. westerdijkiae* were less expressed during co-cultivation with *S. cerevisiae* CCMA 0159 when compared to control (only the fungal isolate). Regarding the control, the *pks*, *nrps* and *b-zip* genes were more expressed in *A. westerdijkiae*, whereas the *hal* and *p450* genes were more expressed in *A. carbonarius*. The reduction in gene expression varied from 12 to 73 times for *A. westerdijkiae* and from 4 to 6 times for *A. carbonarius*. The smallest reduction was found for the expression of the *b-zip* gene and the highest for the *pks* gene, in the two fungal isolates.

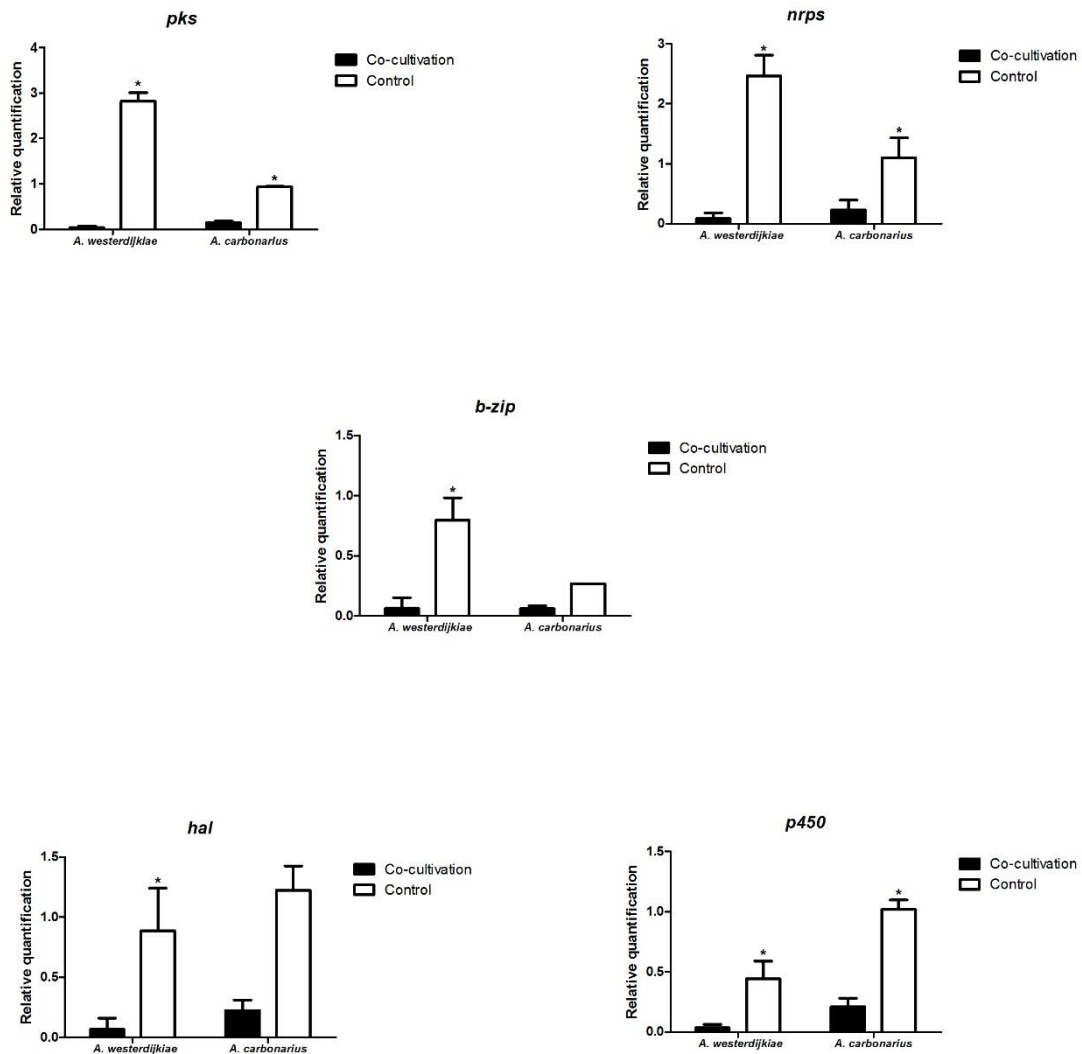


Figure 8. Expression profile of the *pks*, *nrps*, *b-zip*, *hal* and *p450* genes, during biological control. Quantification was measured by qPCR, 10 days after the incubation period. Asterisks indicate significant difference between control and co-cultivation by the T test, with $p < 0.05$. The value corresponds to the average of three biological replicates and two technical replicates. Vertical line refers to the standard error of the mean for each sample. β -tubulin expression was used to normalize each sample.

4 Discussion

Filamentous fungal growth and ochratoxin A production are influenced by ecophysiological aspects such as a_w and temperature (Gil-Serna et al., 2014; Oliveira et al., 2019; Pardo, Ramos, Sanchis, & Marín, 2005), substrates or growing medium (Souza et al., 2016; Tryfinopoulou et al., 2019), toxigenic fungal strains (Kouadio et al., 2007;

Souza et al., 2017), and antagonistic microorganisms (Armando et al., 2013; Tryfinopoulou, Chourdaki, Nychas, & Panagou, 2020; Zhu, Shi, Jiang, & Liu, 2015).

Genetically, mycotoxin production is equivalently adjusted to the fungal development genes, or in response to stress factors (abiotic and biotic) (Keller, 2019). In this regard, higher or lower levels of specific secondary metabolite production may alter fungal development, survival, and communication with other organisms. Therefore, it is necessary to understand the factors that contribute to fungal development, especially when they are pathogenic and mycotoxigenic.

For the abiotic elements, temperature and a_w exerted an influence on *A. westerdijikiae*, *A. ochraceus*, and *A. carbonarius* growth in a coffee-based culture medium, as has already been published by Gil-Serna et al. (2014), Pardo et al. (2005), and Oliveira et al. (2019). However, besides evaluating the abiotic elements separately, for food safety, it is essential to evaluate the interaction between these elements since they operate simultaneously during fungal development. Also, in this work, we verified that the production of OTA and the efficiency of the antagonist agent are also influenced by these abiotic factors. In this sense, climatic changes, mainly during the coffee harvesting and drying period, can increase the risk of contamination by OTA, and influence the development of the biological control agent, in this case of *S. cerevisiae* CCMA 0159.

Considering the fungal growth, the temperature had an inverse effect on fungal development in the control assay (no interaction with other microorganisms); that is, the higher the temperature, the lower the fungal growth. This result may be related to the physiological characteristics of this specific microorganism group, which are mesophilic, and have optimal growth ranging from 25–35°C. However, each species has its

peculiarities. For example, *A. carbonarius* has black spores adapted to high solar incidence because of the presence of melanin, and therefore, withstands higher temperatures than *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae*. The binomial interaction $T (> 35^{\circ}\text{C}) \times a_w (0.98)$ exerted a negative effect on *A. westerdijkiae* growth, which generally does not grow at temperatures above 37°C (Frisvad, Frank, Houbraken, Kuijpers, & Samson, 2004; Visagie et al., 2014). However, in this study, it was observed that the a_w affected the borderline temperature rate for growth. Although they are phylogenetically and morphologically close, *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae* exhibit different behaviors with regard to the binomial interaction $T \times a_w$.

In this study, it was observed that the foretold conditions for higher contamination risk were different from the optimal growing conditions. Overall, the ORI was higher when temperatures were lower and a_w was higher than those required for growth. The ORI is defined as an index that evaluates the risk of a microorganism to grow and produce OTA under certain conditions. Different species can produce similar OTA quantities under the same environmental conditions. However, if they present different growths, the species with the highest growth will present a higher risk of contamination. In contrast, some species may grow and not produce the toxin. For this reason, Gil-Serna et al. (2014) stated that fungal growth is not a good indicator of OTA production.

A. carbonarius CCDCA 10507 presented the highest contamination risk compared to *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae*. An adaptive characteristic was observed by Frisvad et al. (2007) and also during this study (data not shown), reinforcing the idea that *A. carbonarius* can assimilate different carbon sources as other species of *Aspergillus* from the *Nigri* section, which is not observed for *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae*.

The *S. cerevisiae* CCMA 0159 antagonistic activity was effective on OTA production, reaching up to a high inhibition growth rate of the evaluated fungi,

consequently acting on ORI reduction. Among the fungal strains, *A. carbonarius* CCDCA 10507 was the least inhibited, whereas *A. ochraceus* CCDCA 10490 was strongly inhibited, a result that was also reported by Zhu et al. (2015) and Souza et al. (2017). *A. carbonarius* has a fast and similar growth as the yeast, which is needed to develop a strategy to inhibit fungi apart from the nutrient competition. *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae* have slower growth; thus, inhibition may occur faster owing to the lack of nutrients. Although there are no reports on the inhibition of *A. westerdijkiae* by *S. cerevisiae*, the isolate exhibited behavior similar to that of *A. ochraceus*, which may be related to the fact that it is a phylogenetically related species.

At 28 °C and 0.99 a_w , yeast exhibited optimal growth. With faster growth compared to the filamentous fungi, *S. cerevisiae* consumed the nutrients present in the substrate more quickly, and the competition inhibited fungal growth. Furthermore, the antagonistic effect of *S. cerevisiae* against the fungal isolate in the coffee-based culture medium may also be related to the interaction between the yeast and the substrate, which caused a color change with an increase in the pH of the extracellular medium, leading to a physiological disorder in the fungal cells that interferes on OTA's growth and production. In general, fungi are acidophilic microorganisms with an ideal pH below 5.

In this work, we verified that the condition with the highest ORI is at 22 °C and 0.98 a_w , for *A. carbonarius* and *A. westerdijkiae*. The expression of the OTA biosynthetic genes was evaluated in this condition. During co-cultivation, in addition to reducing extracellular OTA levels, *S. cerevisiae* CCMA 0159 was able to interfere in the down regulation expression of all genes related to OTA biosynthesis, by *A. carbonarius* and *A. westerdijkiae*. The *pks* and *nrps* genes are required for the production of OTA (Wang et al., 2016), however, the greater expression of these genes in *A. westerdijkiae*, compared to *A. carbonarius*, observed in this study, may not be directly related to the production of

OTA, but with the production of other metabolites. According to Gallo et al. (2014), the *pks* and *nrps* genes are among the most commonly found in microbial genomes, contributing to a wide diversity of secondary metabolites. As microorganisms can produce different secondary metabolites classes, including polyketides and non-ribosomal peptides, the first proteins expressed in the biosynthetic pathways are PKS and NRPS, however, the resulting end products are dependent on a series of additional custom enzymes (He et al., 2018).

It is also suggested that the greater expression of the *hal* and *p450* genes is related to the high levels of OTA produced by *A. carbonarius*. Even during co-cultivation, with the reduction of the expression of these genes, the expressed level was sufficient to synthesize OTA. According to Wang et al. (2018), *p450*, the cytochrome P450 monooxygenase gene and responsible for the oxidation of 7-methylmellein, capable of forming OT β is required in the OTA biosynthetic pathway. Another very important gene is *hal*, which encodes the enzyme halogenase, responsible for adding a chlorine molecule to the OT β or OTB intermediates, originating OTA (Harris & Mantle, 2001). Knowing that the toxic character of OTA is due to the presence of a chlorine molecule in its structure, inhibiting the expression of the *hal* gene may be a key factor in controlling the production of OTA by filamentous fungi.

Until now, there has been no mention of the use of *S. cerevisiae* for the inhibition of toxigenic fungi in a coffee-based culture medium. However, the use of different *S. cerevisiae* strains as initial cultures for the fermentation process through coffee drying was reported by Evangelista et al. (2014) and Bressani et al. (2018), improving the quality of coffee flavor. Therefore, it is suggested that *S. cerevisiae* strains act not only to improve the quality of coffee flavor but also to inhibit ochratoxigenic fungi.

5 Conclusions

The risk of OTA contamination and the efficiency of the biological control agent on fruits and coffee grains are affected by the environmental conditions of temperature and a_w . *A. carbonarius* CCDCA 10507 presented the best growth with a higher rate of coffee contamination risk and, consequently, more resistance to the biological control by *S. cerevisiae* CCMA 0159. However, it should be noted that *S. cerevisiae* CCMA 0159 significantly reduced the contamination risk by *Aspergillus*, acting on the reduction of OTA biosynthetic genes expression, mostly *hal* and *p450* genes.

Acknowledgments

We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001 for the scholarship provided to Taís Neves and Talita Khouri and Clara Resende for helping us with translation services.

References

- Armando, M. R., Dogi, C. A., Poloni, V., Rosa, C. A. R., Dalcerro, A. M., & Cavaglieri, L. R. (2013). In vitro study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. *International Journal of Food Microbiology*, *161*(3), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.016>
- Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Prado, G., Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2003). Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology*, *85*(3), 293–300. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00539-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00539-1)
- Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Silva, C. F., Cirillo, M., Varga, E. A., & Schwan, R. F. (2009). Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food Control*, *20*(9), 784–790. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.10.003>

- Bonvehí, J. S. (2004). Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6347–6352.
<https://doi.org/10.1021/jf040153w>
- Bressani, A. P. P., Martinez, S. J., Evangelista, S. R., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2018). Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods. In *LWT - Food Science and Technology* (Vol. 92, pp. 212–219). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.029>
- Chalfoun, S., & Batista, L. (2006). Ochratoxin-A incidence in different coffee (*Coffea arabica* L.) berry fractions. *Coffee Science*, 28–35.
<http://www.cabdirect.org/abstracts/20093194026.html>
- Chulze, S. N., Magnoli, C. E., & Dalcerro, A. M. (2006). Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. *International Journal of Food Microbiology*, 111.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.02.006>
- dos Santos, S. L., Freitas, L. M., Lobo, F. P., Rodrigues-Luiz, G. F., Mendes, T. A. de O., Oliveira, A. C. S., Andrade, L. O., Chiari, É., Gazzinelli, R. T., Teixeira, S. M. R., Fujiwara, R. T., & Bartholomeu, D. C. (2012). The MASP Family of *Trypanosoma cruzi*: Changes in Gene Expression and Antigenic Profile during the Acute Phase of Experimental Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001779>
- Evangelista, S. R., Silva, C. F., Miguel, M. G. P. da C., Cordeiro, C. de S., Pinheiro, A. C. M., Duarte, W. F., & Schwan, R. F. (2014). Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. In *Food Research International* (Vol. 61, pp. 183–195).
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.033>
- Frisvad, J.C., Frank, J.M., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., & Samson, R.A. (2004). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. In *Studies in Mycology* (Vol. 50, pp. 23–43).
- Frisvad, J. C., Larsen, T. O., De Vries, R., Meijer, M., Houbraken, J., Cabañes, F. J., Ehrlich, K., & Samson, R. A. (2007). Secondary metabolite profiling, growth

- profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. In *Studies in Mycology* (Vol. 59, pp. 31–37).
<https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.04>
- Gallo, A., Knox, B. P., Bruno, K. S., Solfrizzo, M., Baker, S. E., & Perrone, G. (2014). Identification and characterization of the polyketide synthase involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *International Journal of Food Microbiology*, *179*, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.013>
- Gil-Serna, Jéssica, Patiño, B., Cortés, L., González-Jaén, M. T., & Vázquez, C. (2011). Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. *International Journal of Food Microbiology*, *151*(1), 113–118.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.012>
- Gil-Serna, Jessica, Vázquez, C., García Sandino, F., Márquez Valle, A., González-Jaén, M. T., & Patiño, B. (2014). Evaluation of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* in green-coffee based medium under different environmental conditions. *Food Research International*, *61*, 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.058>
- Harris, J. P., & Mantle, P. G. (2001). Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, *58*(5), 709–716. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00316-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00316-8)
- He, Y., Wang, B., Chen, W., Cox, R. J., He, J., & Chen, F. (2018). Recent advances in reconstructing microbial secondary metabolites biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Biotechnology Advances*, *36*(3), 739–783.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.001>
- Hocking, A. D., Leong, S. lin L., Kazi, B. A., Emmett, R. W., & Scott, E. S. (2007). Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. *International Journal of Food Microbiology*, *119*(1–2), 84–88.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.031>
- Ji, C., Fan, Y., & Zhao, L. (2016). Review on biological degradation of mycotoxins. *Animal Nutrition*, *2*(3), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.07.003>

- Jørgensen, K., & Jacobsen, J. S. (2002). Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye, 1992-99. *Food Additives and Contaminants*, *19*(12), 1184–1189. <https://doi.org/10.1080/0265203021000012376>
- Keller, N. P. (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(3), 167–180. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>
- Kouadio, A. I., Lebrihi, A., Agbo, G. N. z., Mathieu, F., Pfohl-Leszkowiz, A., & Dosso, M. B. (2007). Influence de l'interaction de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance et la production de l'ochratoxine A par *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus ochraceus* sur un milieu de base café. *Canadian Journal of Microbiology*, *53*(7), 852–859. <https://doi.org/10.1139/W06-143>
- Leong, S. L., Hien, L. T., An, T. V., Trang, N. T., Hocking, A. D., & Scott, E. S. (2007). Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. *Letters in Applied Microbiology*, *45*(3), 301–306. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02189.x>
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, *167*(2), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>
- Magan, N. (2006). Mycotoxin contamination of food in Europe: Early detection and prevention strategies. *Mycopathologia*, *162*(3), 245–253. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0057-2>
- Marroquín-Cardona, A. G., Johnson, N. M., Phillips, T. D., & Hayes, A. W. (2014). Mycotoxins in a changing global environment - A review. *Food and Chemical Toxicology*, *69*, 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.025>
- Medeiros, F.H.S., Silva, J.C.P., & Pascholati, S.F. (2018). Controle biológico de doenças de plantas. In: Amorin, L., Rezende, J.A.M., Bergamin-Filho, A. (Eds), *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos* (pp. 261-274).
- Medina, A., Akbar, A., Baazeem, A., Rodriguez, A., & Magan, N. (2017). Climate

- change, food security and mycotoxins: Do we know enough? *Fungal Biology Reviews*, 31(3), 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.04.002>
- Nguyen, M. T., Tozlovanu, M., Tran, T. L., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2007). Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry*, 105(1), 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.040>
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2008). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.005>
- Oliveira, G., Evangelista, S. R., Passamani, F. R. F., Santiago, W. D., Cardoso, M. das G., & Batista, L. R. (2019). Influence of temperature and water activity on Ochratoxin A production by *Aspergillus* strain in coffee south of Minas Gerais/Brazil. *Lwt*, 102(December 2018), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.032>
- Pardo, E., Marín, S., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2004). Occurrence of Ochratoxigenic Fungi and Ochratoxin A in Green Coffee from Different Origins. *Food Science and Technology International*, 10(1), 45–49. <https://doi.org/10.1177/1082013204041509>
- Pardo, E., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2005). Modelling of effects of water activity and temperature on germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on a green coffee-based medium. *International Journal of Food Microbiology*, 98(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.003>
- Passamani, F. R. F., Hernandes, T., Lopes, N. A., Bastos, S. C., Santiago, W. D., Cardoso, M. D. G., & Batista, L. R. (2014). Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin a by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. *Journal of Food Protection*, 77(11), 1947–1952. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-495>
- Paterson, R.R.M., Lima, N., & Taniwaki, M.H. (2014). Coffee, mycotoxins and climate

- change. *Food Res. Int.* 61, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.037>
- Pimenta, R. S., Morais, P. B., Rosa, C. A., & Corrêa, A. (2009). Utilization of Yeasts in Biological Control Programs. In: Satyanarayana, T., & Kunze, G. (Eds), *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (pp. 199-214)
- Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi: Which are important? *Medical Mycology*, 38(SUPPL. 1), 17–22. <https://doi.org/10.1080/mmy.38.1.17.22>
- Rezende, E. de F., Borges, J. G., Cirillo, M. Â., Prado, G., Paiva, L. C., & Batista, L. R. (2013). Ochratoxigenic fungi associated with green coffee beans (*Coffea arabica* L.) in conventional and organic cultivation in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 377–384. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200006>
- Silva, C. F., Schwan, R. F., Dias, E. S., & Wheals, A. E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2–3), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00315-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00315-9)
- Silva, C. F., Batista, L. R., Abreu, L. M., Dias, E. S., & Schwan, R.F. (2008a). Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiol.* 25, 951–957. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.07.003>
- Silva, C. F. Batista, L. R., & Schwan, R. F. (2008b). Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 521–526. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000300022>
- Souza, S. C. , Pereira V. M, Passamani, F. R. F., Cirillo, M. A., Cunha, R. L., Cardoso, M. G., Santiago, W. D., Souza, S. M. C., & Batista, L. R. (2016). Effects of temperature and incubation time on growth and ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in grain-based media. *African J. Microbiol. Res.* 10, 1306–1314. <https://doi.org/10.5897/ajmr2016.7982>
- Souza, M. L., Passamani, F. R. F., Ávila, C. L. da S., Batista, L. R., Schwan, R. F., & Silva, C. F. (2017). Uso de leveduras selvagens como agente de biocontrole contra

fungos toxigênicos e produção de OTA. *Acta Sci. - Agron.* 39, 349–358.
<https://doi.org/10.4025/actasciagron.v39i3.32659>

- Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Teixeira, A.A., & Iamanaka, B.T. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 173–179. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00310-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00310-0)
- Tryfinopoulou, P., Fengou, L., & Panagou, E. Z. (2019). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhododorus mucilaginosa* on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius*. In *Lwt* (Vol. 105, pp. 66–78).
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.050>
- Tryfinopoulou, P., Chourdaki, A., Nychas, G. J. E., & Panagou, E. Z. (2020). Competitive yeast action against *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production. *International Journal of Food Microbiology*, 317(April 2019).
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108460>
- Visagie, C.M., Varga, J., Houbraken, J., Meijer, M., Kocsubé, S., Yilmaz, N., Fotedar, R., Seifert, K.A., Frisvad, J.C., & Samson, R.A., 2014. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Stud. Mycol.*
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.001>
- Wang, Y., Wang, L., Liu, F., Wang, Q., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhao, Y., & Liu, Y. (2016). Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. *Toxins*, 8(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/toxins8030083>
- Wang, Y., Wang, L., Wu, F., Liu, F., Wang, Q., Zhang, X., Selvaraj, N., & Zhao, Y. (2018). A Consensus Ochratoxin A Biosynthetic Pathway: Insights from the Genome Sequence of *Aspergillus ochraceus* and a Comparative Genomic Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19), 1–15.
- WHO, World Health Organization (2003). Safety evaluation of certain mycotoxin in food. Rome, 2001. p. 281–416. WHO Food Additives Series 47 and FAO Food and Nutrition Paper 74. Prepared by the Fifty-fifth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.
- Zeilinger S., García-Estrada C., & Martín J.F. (2015). Fungal Secondary Metabolites in

the “OMICS” Era. In: Zeilinger S., Martín J.F., & García-Estrada C. (Eds), *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites* (pp. 1-12). New York: Springer.

Zhu, C., Shi, J., Jiang, C., & Liu, Y. (2015). Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in vitro and in vivo through antagonistic yeasts. *Food Control*, 50, 125–132.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.042>

ARTIGO 3

**Inibição do crescimento de *Aspergillus* spp. e produção de OTA em
cafés conilon e arábica por *Saccharomyces cerevisiae***

A ser submetido à revista Food Control

Inibição do crescimento de *Aspergillus* spp. e produção de OTA em cafés conilon e arábica por *Saccharomyces cerevisiae*

Taís Teixeira das Neves, Débora Mara de Jesus Cassimiro, Juliete Gomes de Lara de Souza, Rosane Freitas Schwan, Luis Roberto Batista, Cristina Ferreira Silva

Resumo

Saccharomyces cerevisiae CCMA 0159 é relatada como promissora para biocontrole de fungos produtores de ocratoxina A - OTA, no café. *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são as espécies mais consumidas no mundo, sendo cultivadas em regiões tropicais e subtropicais, apresentando características físico-químicas e sensoriais diferentes. Diante disso, este trabalho objetivou comparar o crescimento e produção de OTA por *Aspergillus carbonarius*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* no café arábica e conilon, assim como a eficiência de *S. cerevisiae* CCMA 0159 no biocontrole dos fungos ocratoxigênicos, em ambas variedades de café. *A. carbonarius* teve maior taxa de crescimento e produção de OTA em ambas variedades, com destaque para o café conilon. Contrariamente, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* apresentaram menor crescimento e produção de OTA. *S. cerevisiae* foi eficiente no biocontrole dos isolados fúngicos, inclusive inibiu mais de 80% do crescimento de *A. carbonarius* em ambas variedades de café. Dentre os mecanismos de ação do agente de controle biológico, destaca-se a competição e produção de compostos orgânicos voláteis. Os resultados deste estudo confirmam o grande potencial de *S. cerevisiae* CCMA 0159 como agente de biocontrole para aplicação em países produtores de café nas regiões tropicais.

Palavras-chave: Fungo ocratoxigênico, levedura, *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, biocontrole.

1 Introdução

O café é uma grande *commodity* agrícola importante para a economia brasileira. Apesar da suscetibilidade do cafeeiro é susceptível a patógenos, maior é a preocupação quanto a presença de fungos filamentosos, naturalmente presentes nos frutos e grãos de café durante todo o ciclo produtivo (Batista et al., 2003; 2009; Silva et al., 2008). Esses microrganismos, como algumas espécies de *Aspergillus*, sob determinadas condições ambientais podem produzir metabólitos tóxicos, especialmente ocratoxina A (OTA).

Diversos países importadores têm estabelecido limites máximos toleráveis de OTA nos grãos de café. Desta forma, os países exportadores devem ter manejos culturais de modo a controlar a incidência de fungos ocratoxigênicos no campo e/ou durante a estocagem. Reduzir o crescimento dos fungos ocratoxigênicos pode ajudar na redução do grau de contaminação por OTA. Nesse sentido, o controle biológico por microrganismos antagonistas é uma alternativa ao uso de defensivos químicos, não permitidos na pós-colheita, devido ao risco de persistência de resíduos e prejuízo à saúde do consumidor, além do acúmulo no ambiente (Spadaro & Droby, 2016).

As leveduras são microrganismos promissores para o biocontrole de fungos ocratoxigênicos, especialmente por não produzirem toxinas, colonizarem a superfície do tecido vegetal rapidamente e estarem naturalmente associadas aos frutos de café (Pimenta et al., 2009, Silva et al., 2000). Os mecanismos mais empregados pelas leveduras no controle de fungos filamentosos são competição e produção de compostos antifúngicos (Zhu et al., 2015; Souza et al., 2017; 2021). Neves et al. (2021) observaram que compostos presentes no café podem interferir no metabolismo da levedura, conseqüentemente no mecanismo de ação durante o biocontrole e sendo cafés com características químicas diferentes, o efeito antagônico pode ser diferente.

Duas espécies do gênero *Coffea*, *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café conilon e robusta) são responsáveis por quase todo o café consumido no mundo (Ferrão et al., 2017). Apesar de algumas semelhanças físico-químicas, o café produzido é bem diferente sensorialmente. *Coffea arabica* apresenta bebida de aroma marcante e sabor adocicado, enquanto *Coffea canephora* possui bebida mais neutra e amargor mais pronunciado, maior teor de cafeína e sólidos solúveis (Souza et al., 2004).

Com relação às condições geográficas e climáticas, o café arábica cresce em regiões entre 600 - 2000 m de altitude com temperatura média entre 18 e 22,5 °C, sendo cultivado em regiões subtropicais onde estações chuvosas e secas são bem definidas e regiões equatoriais com chuvas frequentes, enquanto o café conilon e robusta cresce a altitudes menores que 600 m (ao nível do mar) com média de temperatura entre 22 e 26 °C, geralmente em regiões tropicais úmidas (Paterson et al., 2014). De acordo com essas características, o café robusta é produzido principalmente no Vietnã, Indonésia e Costa do Marfim, enquanto o café arábica tem como principal produtor o Brasil, seguido por Colômbia, México, Etiópia e Guatemala (Ashihara, 2015).

O Brasil é o maior produtor de café no ranking mundial, correspondendo a 28,9% do consumo mundial (OIC, nov/2020). O café arábica é a espécie mais cultivada no Brasil e no mundo, representando aproximadamente 77% da colheita brasileira na safra de 2019/2020, enquanto o café conilon ou robusta correspondeu a cerca de 23%. Apesar de representar uma parcela menor em termos de produção, o café conilon é mais rústico e apresenta vantagens sobre o arábica, sendo mais resistente a pragas e doenças, tolerância às temperaturas mais altas e falta de água (CONAB, 2020).

Em trabalhos prévios (Souza et al., 2017; 2021; Neves et al., 2021), a cepa de levedura *S. cerevisiae* CCMA 0159, foi selecionada como promissora para biocontrole de fungos ocratoxigênicos, inclusive em meio de cultivo a base de café verde. Porém, estudos comparando a eficiência de leveduras no biocontrole de fungos ocratoxigênicos nas variedades arábica e conilon são ainda escassos. Diante disso, este trabalho objetivou: 1) avaliar o risco de contaminação de OTA por *A. ochraceus* CCDCA 10490, *A. westerdijkiae* CCDCA 11469 e *A. carbonarius* CCDCA 10507 em meio de cultivo a base de café verde arábica e conilon; 2) avaliar a eficiência de *S. cerevisiae* CCMA 0159 no controle do crescimento e produção de OTA por fungos ocratoxigênicos no café arábica e conilon; 3) identificar os mecanismos de ação da levedura sobre as cepas de fungos no biocontrole.

2 Material e métodos

2.1 Origem dos microrganismos

Os fungos filamentosos utilizados neste trabalho foram *Aspergillus carbonarius* CCDCA 10507, *A. ochraceus* CCDCA 10490 e *A. westerdijkiae* CCDCA 11469 que

pertencem à coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciências dos Alimentos (CCDCA), da Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil. O agente antagonista selecionado após testes iniciais (Neves et al., 2021) foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0159 pertencente à Coleção de Culturas de Microbiologia Agrícola (CCMA) do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1.1 Preparo do inóculo

S. cerevisiae foi reativada em meio Yeast Extract Peptone Glucose (YEPG) (g/L: extrato de levedura (10), peptona (20), glucose (10) e ágar (15)), pH 3,5 à 28 °C/24h. Após este período, uma alçada da cultura foi transferida para tubo do tipo eppendorf contendo 1 mL de caldo YEPG e incubado a 28 °C/24h. Em seguida, diluições decimais seriadas foram realizadas até obter 7 log UFC/mL. A contagem das células foi realizada na câmara de Neubauer.

Para os isolados fúngicos, após a reativação em meio Ágar Extrato de Malte (MEA) [(g/L): extrato de malte (20), peptona bacteriológica (1), glicose (20) e ágar (20)], incubado a 25°C/7 dias, suspensão de esporos foi obtida, adicionando sobre as colônias 10 mL de água destilada estéril contendo 0,1% de Tween 80 e filtrando através de gaze estéril. A contagem de esporos foi realizada em câmara de Neubauer e a concentração final foi padronizada em 5 log esporos/mL.

2.1.2 Co-cultivo

Os testes de antagonismo foram realizados por co-cultivos em meio ágar extrato de farinha de café - CMEA, preparado como descrito por Neves et al. (2021), para as variedades arábica e conilon, onde 100 µL da suspensão de células de levedura foram espalhados. Em seguida, inoculou-se 10 µL da suspensão de esporos fúngicos no centro da placa. O controle positivo para o crescimento de cada isolado fúngico consistiu do inóculo dos esporos em meio CMEA sem a inoculação de levedura. As placas foram incubadas a 28 °C/10 dias. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2 Avaliação da inibição do crescimento

O diâmetro de cada colônia fúngica (controle e em co-cultivo) foi medido no 2º, 5º, 7º e 10º dia após montagem do ensaio, com um paquímetro. A taxa de crescimento foi determinada considerando o diâmetro das colônias plotadas em função do tempo, e aplicada regressão linear como descrito por Gil-Serna et al. (2014).

A porcentagem de inibição do crescimento foi obtida considerando a taxa de crescimento do controle positivo como 100%, de acordo com a equação 1.

$$\text{Equação 1} \quad \% \text{ inibição} = \left(\frac{x-y}{x} \right) * 100$$

Onde: x é a taxa do crescimento do controle positivo e y, a taxa de crescimento das colônias em co-cultivo.

2.3 Quantificação de OTA

Para extração da OTA, seguiu-se protocolo descrito por Passamani et al (2014). O teor de OTA presente nos extratos foi quantificado em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a duas bombas de alta pressão (modelo SPD-M20A), degaseificador DGU 20A3, interface Detector de fluorescência CBM-20A, auto-injetor SIL-10AF e RF-10 Ax1 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Foi utilizada a coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 17h; Agilent Technologies, Palo Alto, CA), conectada a um pacote de pré-coluna Zorbax Eclipse XDBC18 (4,6 x 12,5 mm, 17h; Agilent). As condições cromatográficas para o comprimento de onda foram de 332 nm para excitação e 476 nm para emissão. O fluxo utilizado ao longo da análise foi igual a 0,8 ml/min, e o volume injetado das amostras e do padrão foi de 20 µL. A eluição foi realizada utilizando um sistema isocrático de 35:35:29:1 (metanol - acetonitrila - água - ácido acético). O tempo médio de retenção para a determinação da OTA foi de 11 ± 0,1 min.

A quantidade de OTA nas amostras foi determinada utilizando uma curva analítica obtida por regressão linear ($y = ax+b$, em que y é a área do pico e x é a concentração da OTA). O cálculo definiu a área do pico *versus* a concentração da respectiva solução padrão. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram estimados através de parâmetros obtidos pela curva analítica e calculados de acordo com: LD = 3 DP/m e LQ = 10 DP/m (onde DP é o desvio padrão e m é o coeficiente angular da

regressão linear). Todas as amostras foram analisadas em duplicata, e as soluções padrão de OTA foram avaliadas em triplicata.

2.4 Avaliação dos compostos orgânicos voláteis - VOCs

Como estratégia de inibição pelas leveduras, a produção dos VOCs foi analisada nos co-cultivos e controles positivos (descritos no item 2.1). Nesta etapa utilizou-se o caldo extrato de farinha de café verde - CMEB (Neves et al., 2021), para as variedades arábica e conilon. Os cultivos foram montados em frascos de erlenmeyer, contendo 20 mL do meio CMEB e incubados em shaker a 28 °C, 100 rpm por 51 horas. Controle positivo para a levedura e negativo contendo apenas extrato de café verde, sem adição de nenhum microrganismo, também foram preparados. Amostras foram retiradas e avaliadas nos tempos 24 e 51 h.

Compostos voláteis foram extraídos por headspace (HS-SPME) das amostras. As amostras foram aquecidas em banho-maria (15 min / 60 °C) para equilíbrio do sistema. A fibra de SPME de 50/30 µm (carboxeno/poli (dimetilsiloxano) – DVB/CAR/PDMS) (Supelco Co., Bellefonte, PA, EUA), foi exposta por 30 min, 60 °C para absorção dos compostos voláteis. Os compostos foram analisados usando um cromatógrafo a gás (GC) modelo Shimadzu QP2010 equipado com espectrometria de massa (MS) e uma coluna sílica capillary Carbo-Wax 20M (30m×0.25mm x 0.25 mm). As condições de operação foram performadas como descrito por Ribeiro et al (2017). Os compostos voláteis foram identificados pela comparação do espectro de massa com a biblioteca NIST11.

2.5 Análises estatísticas

Todo o desenho experimental foi realizado por delineamento inteiramente casualizado (DIC) com o arranjo fatorial 3x2x2, sendo três isolados fúngicos, dois tipos de café (arábica e conilon), ausência e presença de levedura. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, usando o programa estatístico R (R i386 3.3.3). Os gráficos foram construídos no software GraphPad Prism 5.0 (Graphad Inc.) e no Heatmapper (on line).

3 Resultados e discussão

Para o ensaio controle, no café arábica, a taxa de crescimento dos isolados fúngicos variou de 4,07 a 6,81 mm/dia (Figura 1) sendo a maior taxa observada para A.

carbonarius e a menor para *A. ochraceus*. A mesma tendência foi observada para o café conilon com maior taxa de crescimento para *A. carbonarius* (7.60 mm/dia) e menor para *A. ochraceus* (3,26 mm/dia). Contrariamente a *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* que apresentaram maior taxa de crescimento no café arábica, verificou-se que *A. carbonarius* teve maior taxa de crescimento no café conilon.

Durante o co-cultivo, ou seja, com influência do crescimento leveduriforme, no café arábica, o maior crescimento fúngico ocorreu para *A. carbonarius* (3,36 mm/dia) e menor para *A. westerdijkiae* (2,14 mm/dia). No café conilon, a maior taxa de crescimento foi também para *A. carbonarius* (3,67 mm/dia) enquanto a menor foi para *A. ochraceus* (1,46 mm/dia). Nesse sentido, verificamos inibição, em mais de 40% do crescimento fúngico quando em co-cultivo com *S. cerevisiae* para ambas variedades de café, com destaque para o café conilon.

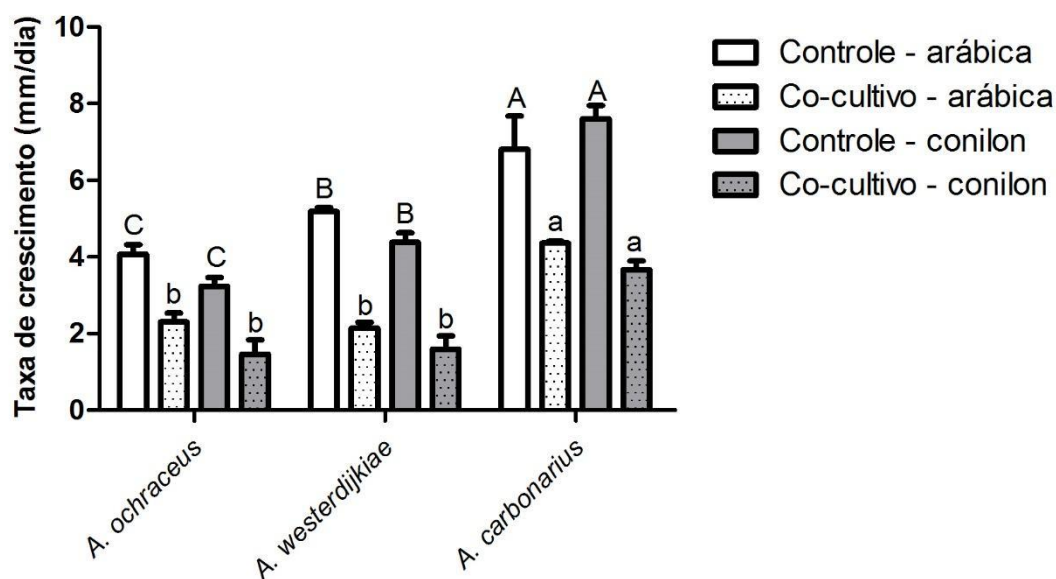


Figura 1. Taxa de crescimento de *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* e *A. carbonarius*, isolados e em co-cultivo com *S. cerevisiae*, nos meios de café arábica e conilon. Letras maiúsculas avaliam a taxa de crescimento dos isolados fúngicos (controle) em cada tipo de café. Letras minúsculas avaliam a taxa de crescimento dos isolados fúngicos quando em co-cultivo para cada tipo de café. Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

O efeito simples dos fatores espécie fúngica, presença da levedura, tipo de café, e a interação fungo x levedura influenciaram de forma significativa ($p < 0.05$) na taxa de crescimento dos fungos ocratoxigênicos (Tabela 1). *A. carbonarius* foi o fungo com maior

taxa de crescimento tanto no café arábica quanto no café conilon. Na presença da levedura, todos os isolados fúngicos tiveram menor taxa de crescimento quando comparados ao controle. O café arábica foi mais susceptível a contaminação pelos fungos ocratoxigênicos.

Tabela 1. Efeito dos fatores espécie fúngica, levedura e variedade de café na taxa de crescimento dos fungos ocratoxigênicos.

Quadro da Análise de Variância – ANOVA					
Fatores	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Fungo	2	54.61841	27.3092	75.2878	0*
Levedura	1	62.12067	62.12067	171.2584	0*
Café	1	2.12674	2.12674	5.8631	0.0234*
Fungo*Levedura	2	3.39727	1.69864	4.6829	0.0192*
Fungo*Café	2	1.35201	0.676	1.8636	0.1769
Levedura*Café	1	0.37007	0.37007	1.0202	0.3225
Fungo*Levedura*Café	2	1.32474	0.66237	1.8261	0.1827
Resíduo	24	8.70553	0.36273	-	-
Total	35	134.01543	-	-	-

*Significativo a 5% de probabilidade

Além das exigências nutricionais e fatores fisiológicos de cada espécie microbiana, o substrato é também um fator de interferência no crescimento fúngico. Isto pôde ser observado claramente neste estudo. *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* têm maior crescimento no meio com extrato de café arábica, enquanto *A. carbonarius*, contrariamente cresceu mais (cerca de 1.12 vezes) no meio com café conilon. Em estudo comparando a incidência de fungos ocratoxigênicos em duas variedades de café na Tailândia, Noonim et al. (2008) identificaram maior crescimento de *Aspergillus* sp. seção *Circumdati* no café Arábica e seção *Nigri* no café Robusta. O café conilon/robusta é cultivado em regiões com temperaturas médias mais altas (22 e 26 °C), com maior incidência de raios solares, e a presença de melanina em *A. carbonarius* (seção *Nigri*) pode ser um fator que contribui para o sucesso de seu crescimento nessa variedade de café. Em contrapartida, o café arábica é cultivado em regiões com temperaturas médias mais baixas (18 e 22.5 °C) que favorecem o crescimento de *Aspergillus* da seção *Circumdati*. Na temperatura de 21 °C, Neves et al. (2021) observaram maior crescimento de *A. westerdijkiae* comparado a *A. carbonarius*, no café arábica.

Opostamente, quanto à eficiência da ação de *S. cerevisiae* CCMA 0159 como bioagente de controle, foi maior (1.10 vezes) quando cultivados no meio à base de café conilon, independentemente da espécie fúngica. O café conilon possui maior teor de

caféina e ácido clorogênico quando comparado ao café arábica (Babova et al., 2016). A caféina juntamente com o ácido clorogênico são relatados como antimicrobianos naturais (Chalfoun & Batista, 2006; Akbar et al., 2020) podendo dessa forma reduzir o crescimento de patógenos e/ou potencializar a eficiência do agente de controle biológico.

A análise de OTA revelou que *A. carbonarius* produziu maior quantidade de OTA nas duas variedades de café (Tabela 2), com destaque para o café conilon (1134,8 ng/g), quando ausente *S. cerevisiae* CCMA 0159, correspondendo a mais de 80 vezes a quantidade de OTA produzida por *A. ochraceus* (14,82 ng/g) e *A. westerdijkiae* (10,40 ng/g). *A. carbonarius* produziu menor teor de OTA no café arábica (723,74 ng/g) comparado ao café conilon, porém, esse valor foi equivalente a mais de 60 vezes da produção de OTA por *A. ochraceus* (10,44 ng/g) e *A. westerdijkiae* (12,58 ng/g). Para ambas variedades de café, todas as espécies fúngicas produziram teores de OTA acima do limite tolerável para Brasil (10 ug/Kg) e EU (5 ug/Kg). Em outro estudo Neves et al. (2021) também relataram produção de OTA por *A. carbonarius* acima do limite tolerável pela legislação em meio a base de café arábica. Nesse sentido é importante intensificar o controle desses fungos ocratoxigênicos nos cafés brasileiros

Tabela 2. Teor de OTA produzida pelos fungos filamentosos isolados e em co-cultivo com *S. cerevisiae*, redução da quantidade de OTA pela levedura em cada espécie de café e limites toleráveis de OTA no Brasil e União Européia (EU).

Tratamentos	Arábica		Conilon		Limite tolerável OTA	
	OTA (ng/g)	Redução OTA (%)	OTA (ng/g)	Redução OTA (%)	Brasil (ug/Kg)	EU (ug/Kg)
Grãos de café torrado	-	-	-	-	10	5
AO	10,44	-	14,82	-	-	-
AW	12,58	-	10,40	-	-	-
AC	723,74	-	1134,8	-	-	-
AO+SC	9,47	9,3	5,58	62,3	-	-
AW+SC	11,36	9,7	8,22	20,9	-	-
AC+SC	122,49	83,1	217,38	80,8	-	-

AO - *A. ochraceus*; AW - *A. westerdijkiae*; AC - *A. carbonarius*; SC - *S. cerevisiae*

A ação de *S. cerevisiae* CCMA 0159 contribuiu para redução dos teores de OTA (Tabela 2) independente da espécie de café e de fungo. A maior porcentagem de redução da OTA ocorreu nos co-cultivos com *A. carbonarius* (83.1 % no arábica e 80.8 % no conilon). Para *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* a maior redução de OTA ocorreu quando

cultivados em extrato de café conilon (62.3 e 20.9 %, respectivamente), alcançando níveis de OTA (<10 ng/g) toleráveis para café no Brasil.

Embora não haja relatos na literatura sobre essas diferenças da eficiência do agente de controle biológico nas diferentes variedades de café, é já conhecido que o café conilon é mais resistente a pragas e doenças (Dos Santos et al., 2021) e que *A. carbonarius*, tem mecanismos de maior resistência ao biocontrole (Neves et al., 2021). *A. carbonarius* tem seu crescimento e produção de OTA favorecidos pela ausência de outros microrganismos concorrentes que são mais sensíveis às propriedades físico-químicas do café conilon. A boa notícia é que a presença desta cepa de *S.cerevisiae* potencializou a ação antifúngica, inclusive contra *A. carbonarius*, possivelmente com a produção de compostos antifúngicos como os VOCs.

Foram identificados 103 compostos orgânicos voláteis pertencentes a 10 classes químicas (Figura 2). O maior número de VOCs foi identificado na classe álcool, seguida por ácido e éster. Com 51 h de cultivo onde *S. cerevisiae* CCMA 0159 estava presente (SC, AC+SC, AO+SC e AW+SC), tanto nos meios com extrato de café arábica quanto de conilon, houve redução na produção de compostos ácidos e aumento de álcool, éster e fenol. VOCs como 1-Butanol, 3-methyl (álcool) e Methyl salicylate (éster), foram detectados exclusivamente nesses cultivos.

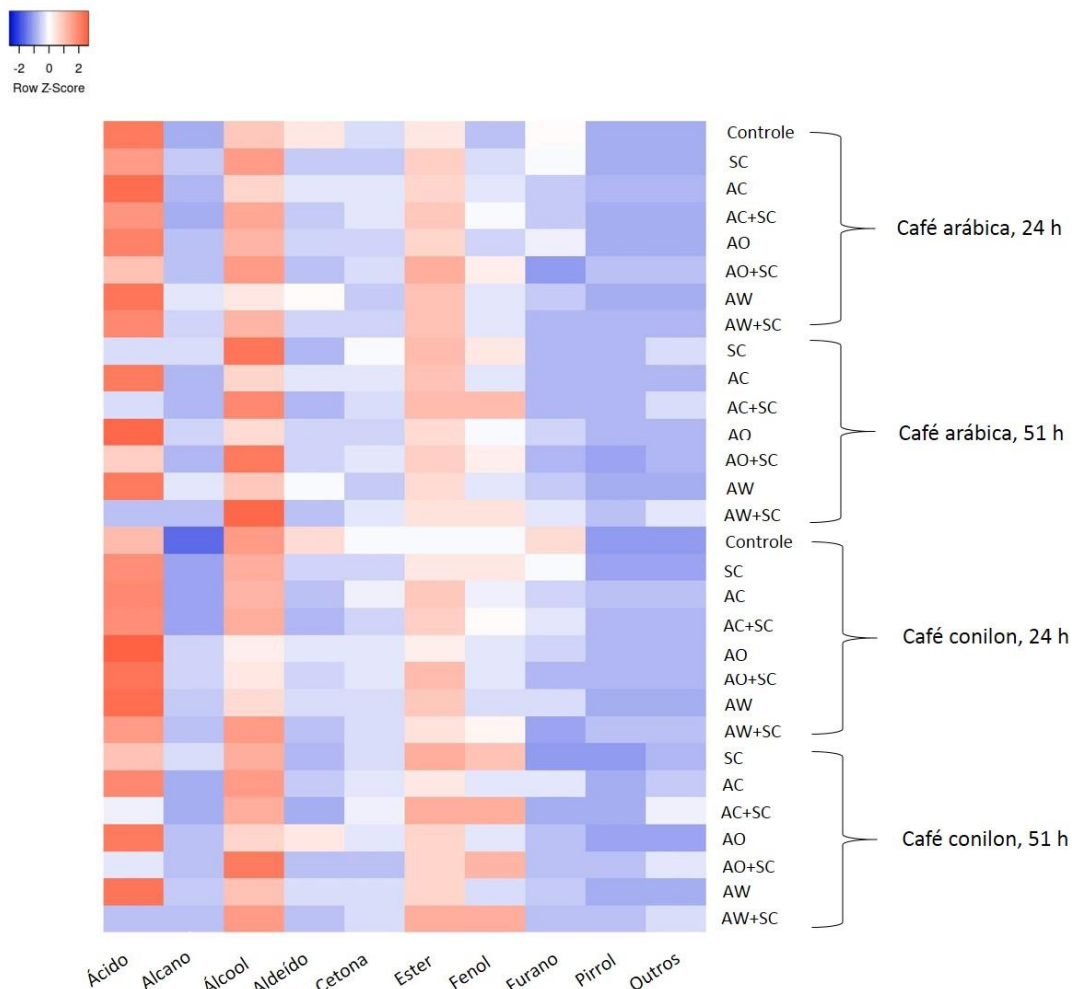


Figura 2. Quantidade de compostos voláteis, por classe química, em cada tratamento, identificados por GC-MS, após 24 e 51 h. Controle – extrato de café sem inoculação de microrganismos; SC – *S. cerevisiae* CCMA 0159; AC – *A. carbonarius* CCDCA 10507; AO – *A. ochraceus* CCDCA 10490; *A. westerdijkiae* CCDCA 11469.

A composição do meio de cultura interfere não somente na taxa de crescimento e produção de OTA (Souza et al., 2016; Tryfinopoulou et al., 2019), mas também na produção de VOCs. Por exemplo, em meio ágar extrato de malte (MEA), Souza et al. (2021) identificaram produção de alguns VOCs pelas leveduras, diferentes daqueles encontrados no presente estudo, como 2-methyl-1-butanol e ethyl acetate que atuaram na inibição do crescimento de *A. carbonarius* e *A. ochraceus*. Além disso, o tempo de cultivo também interfere na alteração das propriedades físico-químicas do substrato. Além disso, neste trabalho observamos que entre 48 e 51 h, nos cultivos onde *S. cerevisiae* estava presente, tanto no café arábica quanto no conilon houve alteração do pH mudando de

ácido (pH 5) para alcalino (pH 8) (dados não mostrados), com mudança de coloração do meio de cultivo, como mostrado no exemplo da Figura 3.

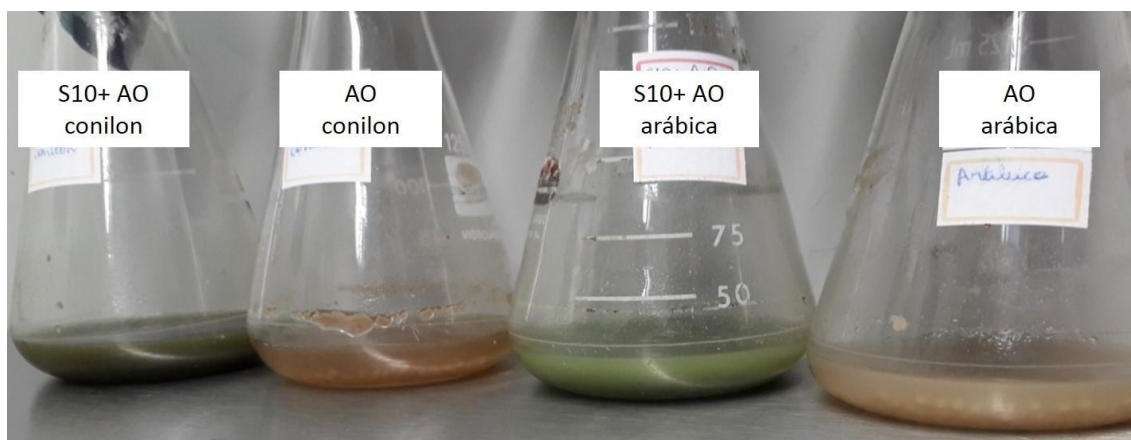


Figura 3. Cultivo dos microrganismos em extrato de café verde (CMEB), tanto em café arábica quanto em café conilon, após 51 h. S10 – *S. cerevisiae* CCMA 0159; AO – *A. ochraceus*.

O aumento do pH no meio de cultivo pode estar diretamente relacionado com a redução na produção de VOCs da classe dos ácidos durante o crescimento da levedura. Esse fator contribuiu para a inibição do crescimento dos isolados fúngicos, durante o co-cultivo uma vez que fungos filamentosos têm crescimento ótimo na faixa de pH 5.0 - 6.0 (Abubakar et al., 2013), inclusive *A. carbonarius* cresce melhor em pH < 6.0 (Passamani et al., 2014). Além disso, a produção dos compostos 1-Butanol-3-methyl e Methyl salicylate pela levedura, está relacionada com atividade fungicida, uma vez que o primeiro é relatado por apresentar propriedades antifúngicas contra *A. carbonarius* e *A. ochraceus* (Souza et al., 2021) e o segundo é descrito como sinal móvel da planta na aquisição de resistência sistêmica adquirida para defesa contra patógenos (Park et al., 2007). O composto volátil methyl salicylate é também encontrado no chá verde, responsável por contribuir com aroma de menta, e está presente na forma livre e de glicosídeos, sendo que durante a fermentação do chá verde por leveduras, pode ocorrer hidrólise do glicosídeo precursor aumentando os níveis de methyl salicylate (Wang et al., 2020). *S. cerevisiae* pode ter contribuído para a produção de methyl salicylate a partir da hidrólise do glicosídeo precursor presente no extrato de café, o que contribuiu para inibição do crescimento fúngico.

4 Conclusão

A. ochraceus, *A. westerdijkiae* e *A. carbonarius* apresentam potencial de crescimento e produção de OTA diferente em café arábica e conilon. A eficiência de controle de *S. cerevisiae* CCMA 0159 sobre as três espécies de fungos foi confirmada também para café conilon, inclusive para *A. carbonarius* que é mais resistente ao biocontrole. Assim, esta cepa tem grande potencial de aplicação para biocontrole em países produtores de café nas regiões tropicais.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Referências

- Abubakar A., Suberu H. A., Bello I. M., Abdulkadir R., Daudu O. A., & Lateef A. A. (2013). Effect of pH on Mycelial Growth and Sporulation of *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Plant Sciences*. 1(4), 64-67. doi: 10.11648/j.jps.20130104.13
- Akbar, A., Medina, A., & Magan, N. (2020). Resilience of *Aspergillus westerdijkiae* Strains to Interacting Climate-Related Abiotic Factors: Effects on Growth and Ochratoxin A Production on Coffee-Based Medium and in Stored Coffee. *Microorganisms*.8(9):1268. doi:10.3390/microorganisms8091268.
- Ashihara, H. (2015). Plant Biochemistry: Trigonelline Biosynthesis in *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. In *Coffee in Health and Disease Prevention* (pp. 19–28). <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00003-6>
- Babova, O., Occhipinti, A., & Maffei, M. E. (2016). Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. *Phytochemistry*, 123, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.01.016>
- Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Prado, G., Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2003). Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 85(3), 293–300. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00539-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00539-1)
- Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Silva, C. F., Cirillo, M., Varga, E. A., & Schwan, R. F. (2009). Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by

- dry and wet methods. *Food Control*, 20(9), 784–790.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.10.003>
- Chalfoun, S., & Batista, L. (2006). Ochratoxin-A incidence in different coffee (*Coffea arabica* L.) berry fractions. *Coffee Science*, 28–35.
<http://www.cabdirect.org/abstracts/20093194026.html>
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2020). Boletim - acompanhamento da safra Brasileira. V.6 - SAFRA 2020 - N.3 – terceiro levantamento. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cafes>, acesso em: 31 de janeiro de 2021.
- Dos Santos, D. G., Coelho, C. C. S., Ferreira, A. B. R., Freitas-Silva O. (2021). Brazilian Coffee Production and the Future Microbiome and Mycotoxin Profile Considering the Climate Change Scenario. *Microorganisms*. 16;9(4):858. doi: 10.3390/microorganisms9040858.
- Ferrão, R., Fonseca, A. F. A., Ferrão, M. A. G., & Muner, L. H. (2017). *Café conilon* (2^a).
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., García Sandino, F., Márquez Valle, A., González-Jaén, M. T., & Patiño, B. (2014). Evaluation of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijckiae* in green-coffee based medium under different environmental conditions. *Food Research International*, 61, 127–131.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.058>
- Neves, T. T. das, Brandão, R. M., Barbosa, R. B., Cardoso, M. das G., Batista, L. R., & Silva, C. F. (2021). Simulation of coffee beans contamination by *Aspergillus* species under different environmental conditions and the biocontrol effect by *Saccharomyces cerevisiae*. *Lwt*, 148(November 2020), 111610. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111610>
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2008). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 197–202.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.005>
- OIC. Organização Internacional do Café. Relatório sobre o mercado de café. Nov (2020).
- Park, S.-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., & Klessig, D. F. (2007). Methyl Salicylate Is a Critical. *Science*, 318, 113–116.
<https://doi.org/10.1126/science.1147113>

- Passamani, F. R. F., Hernandez, T., Lopes, N. A., Bastos, S. C., Santiago, W. D., Cardoso, M. D. G., & Batista, L. R. (2014). Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin a by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. *Journal of Food Protection*, 77(11), 1947–1952. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-495>
- Paterson, R. R. M., Lima, N., & Taniwaki, M. H. (2014). Coffee, mycotoxins and climate change. *Food Research International*, 61, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.037>
- Pimenta, R. S., Morais, P. B., Rosa, C. A., & Corrêa Jr, A. (2009). Utilization of Yeasts in Biological Control Programs. In *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (pp. 199–214). <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4>
- Ribeiro, L. S., Miguel, M. G. P., Evangelista, S. R., Martins, P. M. M., van Mullem, J., Belizario Honorio, M., & Shwan, R. F. (2017). Behavior of yeast inoculated during semi-dry coffee fermentation and the effect on chemical and sensorial properties of the final beverage. *Food Research International*, 92, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.011>
- Silva, C. F., Schwan, R. F., Sousa Dias, E., & Wheals, A. E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2–3), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00315-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00315-9)
- Silva, C. F., Batista, L. R., & Schwan, R. F. (2008). Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 521–526. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000300022>
- Souza, F. F., Santos, J. C. F., Costa, J. N. M., & Santos, M. M. Dos. (2004). Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia. *Embrapa Rondônia. Documentos*, 93, 21. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/54346/1/Doc93-cafe.pdf>
- Souza, S. C., Pereira, V. M., Passamani, Fabiana, R. F., Cirillo, M. A., Cunha, R. L. da, Cardoso, M. das G., Santiago, W. D., Souza, S. M. C., & Batista, L. R. (2016). Effects of temperature and incubation time on growth and ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in grain-based media. *African Journal of Microbiology Research*, 10(32), 1306–1314. <https://doi.org/10.5897/ajmr2016.7982>
- Souza, M. L., Passamani, F. R. F., Ávila, C. L. da S., Batista, L. R., Schwan, R. F., & Silva, C. F. (2017). Uso de leveduras selvagens como agente de biocontrole

- contra fungos toxigênicos e produção de OTA. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 39(3), 349–358. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v39i3.32659>
- Souza, M. L., Ribeiro L. S., Miguel, M. G. C. P., Batista, L. R., Schwan, R. F., Medeiros, F. H., & Silva, C. F. (2021). Yeasts prevent ochratoxin A contamination in coffee by displacing *Aspergillus carbonarius*. *Biological Control*, 55, 104512. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104512>.
- Spadaro, D., & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science and Technology*, 47, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>
- Tryfinopoulou, P., Fengou, L., & Panagou, E. Z. (2019). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula mucilaginosa* on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius*. In *Lwt* (Vol. 105, pp. 66–78). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.050>
- Wang, R., Sun, J., Lassabliere, B., Yu, B., & Liu, S. Q. (2020). Fermentation characteristics of four non-*Saccharomyces* yeasts in green tea slurry. *Food Microbiology*, 92(July). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103609>
- Zhu, C., Shi, J., Jiang, C., & Liu, Y. (2015). Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in vitro and in vivo through antagonistic yeasts. *Food Control*, 50, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.042>