

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

KAROL CRISTIANNE SILVA RIBEIRO

**INVESTIGAÇÃO DA CAPACIDADE DE TOLERÂNCIA A AGENTES DE
ESTRESSE INDUSTRIAL NA LEVEDURA CONTAMINANTE *DEKKERA*
*BRUXELLENSIS***

Recife

2019

KAROL CRISTIANNE SILVA RIBEIRO

**INVESTIGAÇÃO DA CAPACIDADE DE TOLERÂNCIA A AGENTES DE
ESTRESSE INDUSTRIAL NA LEVEDURA CONTAMINANTE *DEKKERA*
*BRUXELLENSIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Will de Barros Pita

Co-orientador: Prof. Marcos Antonio de Moraes Junior

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Ribeiro, Karol Cristianne Silva

Investigação da capacidade de tolerância a agentes de estresse industrial na levedura contaminante *Dekkera bruxellensis* / Karol Cristianne Silva Ribeiro - 2019.

75 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Will de Barros Pita

Coorientador: Marcos Antonio de Moraes Junior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2019.

Inclui referências

1. Leveduras 2. *Dekkera bruxellensis* 3. Etanol
I. Pita, Will de Barros (orient.) II. Moraes Junior, Marcos Antonio de (coorient.) III. Título

579.562

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-110

KAROL CRISTIANNE SILVA RIBEIRO

**INVESTIGAÇÃO DA CAPACIDADE DE TOLERÂNCIA A AGENTES DE
ESTRESSE INDUSTRIAL NA LEVEDURA CONTAMINANTE *DEKKERA
BRUXELLENSIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 31/01/2018

BANCA EXAMINADORA

Dr. Will de Barros Pita

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dra. Ester Ribeiro de Andrade

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dra. Carolina Elsztein

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

A Deus, por todas as bênçãos que Ele tem me concedido.
Aos meus pais e minhas irmãs, pelo cuidado, afeição e apoio.

Aos meus amigos que sempre
torceram por mim,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda capacidade intelectual e amor incondicional.

Aos meus pais, Nelson e Cássia, por toda dedicação, incluindo todas as idas e vindas para a federal independente da hora e situação, por todo amor e cuidado, minha gratidão e amor.

A minha irmã Natália e minha sobrinha Nataly, por todas as orações, encorajamento e filminhos descontraídos.

A Thiago, meu esposo e companheiro de vida, por todo suporte técnico, emocional, por sempre acreditar no meu sucesso e deixar meu dia a dia mais leve e feliz. Amo você.

Aos meus orientadores, Dr. Will Pita e Dr. Marcos Morais, por terem me recebido de braços abertos para o começo de uma carreira acadêmica, por todos os conhecimentos passados, pelos puxões de orelha, pela paciência e dedicação a este trabalho. Muito obrigada por tudo.

As minhas amigas e companheiras para a vida toda; Jackeline e Mariana, pelo incentivo, apoio, risadas e sushis, muito obrigada por tudo Nenis, grupo penicilina sempre.

Aos colegas de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFPE pela convivência e aprendizado, em especial; Camilinha, por toda atenção e amizade sincera.

Aos amigos do LGM, Maíse, Irina, Rayssa, Thiago, Walter, Felipe, Paula, Allyson; por acompanharem diariamente meu desenvolvimento acadêmico e por todas as descontrações.

A FACEPE, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que torceram por mim.

RESUMO

A levedura *Dekkera bruxellensis* é considerada o principal microrganismo contaminante na produção de bebidas alcoólicas e biocombustíveis. A disponibilidade de informações relacionadas aos principais componentes do metabolismo dessa levedura pode ser fundamental para entender como esse micro-organismo é capaz de exibir um alto desempenho competitivo nesses ambientes industriais. Diversas condições de estresse aos quais as células de levedura são expostas induzem mecanismos de resposta capazes de garantir a sobrevivência das células, mesmo em condições normalmente desfavoráveis. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo investigar a capacidade de *D. bruxellensis* em resistir aos principais tipos de estresse encontrados no ambiente industrial. Além disso, comparamos o desempenho da adaptação ao estresse dessa levedura com o apresentado pelo microrganismo padrão da fermentação industrial, *Saccharomyces cerevisiae*. Para isso, as linhagens industriais *D. bruxellensis* GDB 248 e *S. cerevisiae* JP1, como referência, foram submetidas a diversos agentes estressores, afim de verificar a influência no crescimento dessas leveduras. Nossos resultados indicam que, para a maioria dos agentes testados, a levedura *D. bruxellensis* apresentou tolerância similar ou maior à verificada em *S. cerevisiae*. Nossos dados reforçam a visão de que *D. bruxellensis* apresenta potencial biotecnológico, desde que o seu metabolismo seja bem compreendido. Nesse sentido, o presente estudo representa um passo importante para entender o comportamento da levedura *D. bruxellensis* frente às condições industriais.

Palavras-chave: Adaptação industrial. Etanol. Resposta a estresse.

ABSTRACT

The yeast *Dekkera bruxellensis* is considered the major contaminant microorganism in the production of alcoholic beverages and biofuels. The availability of information related to the main components of its metabolism is fundamental to understand how this yeast is able to exhibit a high competitive performance in these industrial environments. Various stressful conditions to which yeast cells are exposed induce response mechanisms capable of ensuring cell survival even under normally unfavorable conditions. Therefore, the present work aims to investigate the ability of *D. bruxellensis* to resist to the major stressful agents present in the industrial environment. Moreover, we compared its adaptive performance with the observed for *Saccharomyces cerevisiae*, the main fermentative microorganism. Therefore, industrial strains *D. bruxellensis* GDB 248 and *S. cerevisiae* JP1, as reference, were submitted to several stressors in order to determine their influence on the metabolism of both yeasts. Our results indicate that, for most of the agents tested, the *D. bruxellensis* yeast showed similar or greater tolerance than *S. cerevisiae*. Our data reinforce the view that *D. bruxellensis* presents biotechnological potential, as long as its metabolism is well understood. In this sense, the present study represents an important step to understand the behavior of *D. bruxellensis* yeast against industrial conditions.

Keywords: Industrial adaptation. Ethanol. Response to stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Células da linhagem industrial <i>Dekkera bruxellensis</i> GDB 248 em meio YNB. Fonte: Autor	15
Figura 2 -	Visão geral esquemática da relação filogenética de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> com outras espécies de fermento	16
Figura 3 -	Formação de etilfenóis a partir de seus precursores hidroxicinâmicos. Fonte: (BERBEGAL C. et al., 2018)	19
Figura 4 -	Reações bioquímicas da via glicolítica em célula de levedura. Fonte: Zamora (2009)	25
Figura 5 -	Cinética de crescimento aeróbio de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 em diferentes concentrações de (A) sacarose e (B) glicerol, em 48 horas de cultivo. 5 g L ⁻¹ (quadrado vermelho); 10 g L ⁻¹ (triângulo laranja); 20 g L ⁻¹ (cruz azul); 250 g L ⁻¹ (losango amarelo); 300 g L ⁻¹ (quadrado azul); 350 g L ⁻¹ (triângulo verde)	42
Figura 6 -	(A) Cinética de crescimento aeróbio de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 e (B) <i>S. cerevisiae</i> JP1 em diferentes concentrações de nitrogênio a partir do sulfato de amônio. Condições: 75 mM de nitrogênio (círculo laranja); 7,5 mM de nitrogênio (círculo azul); 2,5 mM de nitrogênio (quadrado vermelho)	45
Figura 7 -	(A) <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 em diferentes concentrações de nitrogênio a partir do cloreto de amônio e (B) nitrato de sódio. Condições: 75 mM de nitrogênio (Cloreto de amônio/ Nitrato - losango vermelho); 67,5 mM de nitrogênio (Cloreto de amônio/ Nitrato - losango cinza escuro); 45 mM de nitrogênio (Cloreto de amônio/ Nitrato - triângulo amarelo); 22,5 mM de nitrogênio (Cloreto de amônio/ Nitrato - asterisco verde claro); 7,5 mM de nitrogênio (Cloreto de amônio/ Nitrato - círculo azul)	45
Figura 8 -	(A) Cinética de crescimento aeróbio de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 em diferentes faixas de pH em 48 horas de cultivo. Referência (círculo laranja); pH 2,0 (círculo rosa); pH 2,5 (losango verde); pH 5,0 (quadrado vermelho); pH 7,0 (triângulo azul). (B) Valores de D.O. _{600nm} com 48 horas de cultivo em função do pH	47

Figura 9 -	<p>(A) Cinética de crescimento aeróbio de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 e (B) <i>S. cerevisiae</i> JP1, em meios com diferentes concentrações de ácido acético sem ajuste de pH e (C) Cinética de crescimento aeróbio de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 e (D) <i>S. cerevisiae</i> JP1, em meios com diferentes concentrações de ácido acético com ajuste de pH para 3,5. Condições: Referência (bola laranja); 1 g L⁻¹ de acetato (losango azul escuro); 2 g L⁻¹ de acetato (cruz verde escuro); 3 g L⁻¹ de acetato (xis laranja escuro); 4 g L⁻¹ de acetato (losango azul claro); 5 g L⁻¹ de acetato (bola vermelha); 6 g L⁻¹ de acetato (triângulo roxo) e 7 g L⁻¹ de acetato (asterisco amarelo)</p>	49
Figura 10 -	<p>Valores de D.O._{600nm} em função da concentração de ácido acético (g/L) em <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 (quadrado azul claro) e <i>S. cerevisiae</i> JP1 (triângulo verde); (A) sem ajuste de pH, (B) com ajuste de pH para 3,5</p>	50
Figura 11 -	<p>(A) Cinética de crescimento aeróbio de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 e (B) <i>S. cerevisiae</i> JP1, em meios com diferentes concentrações de ácido láctico sem ajuste de pH e (C) Cinética de crescimento aeróbio de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 e (D) <i>S. cerevisiae</i> JP1, em meios com diferentes concentrações de ácido láctico com ajuste de pH para 3,5. Referência (círculo laranja); 1 g L⁻¹ de ácido láctico (losango roxo); 2 g L⁻¹ de ácido láctico (cruz azul escuro); 3 g L⁻¹ de ácido láctico (losango azul claro); 4 g L⁻¹ de ácido láctico (triângulo verde escuro); 5 g L⁻¹ de ácido láctico (círculo vermelho); 6 g L⁻¹ de ácido láctico (círculo vermelho); 7 g L⁻¹ de ácido láctico (asterisco azul claro); 8 g L⁻¹ de ácido láctico (xis verde claro); 9 g L⁻¹ de ácido láctico (losango bege claro); 10 g L⁻¹ de ácido láctico (quadrado vermelho escuro)</p>	51
Figura 12 -	<p>Valores de D.O._{600nm} final em relação a concentração de ácido láctico (g/L) em <i>D. bruxellensis</i> GDB248 (quadrado azul claro) e <i>S. cerevisiae</i> JP1 (triângulo verde); (A) sem ajuste de pH e (B) com ajuste de pH para 3,5</p>	52
Figura 13 -	<p>(A) Cinética de crescimento aeróbio de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 e (B) <i>S. cerevisiae</i> JP1 em peróxido de hidrogênio (mmolar) com 48 horas de cultivo. Condições: Referência (círculo amarelo); 1 mM de</p>	

	H ₂ O ₂ (quadrado azul); 2 mM de H ₂ O ₂ (triângulo verde); 3 mM de H ₂ O ₂ (triângulo vermelho)	54
Figura 14 -	(A) Cinética de crescimento aeróbio de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 e (B) <i>S. cerevisiae</i> JP1 em etanol com 48 horas de cultivo. Concentrações de etanol: Referência (círculo amarelo); 2% de etanol (losango verde); 4% de etanol (triângulo vermelho); 6% de etanol (quadrado azul); 8% de etanol (asterisco fechado lilás)	56
Figura 15 -	(A) valores de D.O. _{600nm} final de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 e (B) <i>S. cerevisiae</i> JP1 em crescimento aeróbio com sacarose (círculo azul) e glicose (triângulo verde), 24 horas de cultivo, em diferentes temperaturas	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração dos diferentes compostos testados nos ensaios de crescimento aeróbicos com <i>D. bruxellensis</i> e <i>S. cerevisiae</i>	40
------------	---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivo geral.....	14
1.1.2 Objetivos específicos.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 <i>DEKKERA BRUXELLENSIS</i>	15
2.1.1 Aspectos gerais.....	15
2.1.2 <i>Dekkera bruxellensis</i> em ambientes industriais.....	17
2.1.3 <i>Dekkera bruxellensis</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : dinâmica populacional em substratos industriais	20
2.1.4 Características fisiológicas.....	22
2.1.5 Aspectos genéticos.....	26
2.2 FERMENTAÇÃO	29
2.2.1 Produção de etanol por fermentação alcoólica	29
2.2.2 Fatores de estresse no processo fermentativo	30
2.2.3 Resposta geral ao estresse celular	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 LINHAGENS E MEIOS DE CULTURA	39
3.2 ENSAIOS DE CRESCIMENTO EM AEROBIOSE	39
3.3 TESTE DE VIABILIDADE	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 IMPACTO DE AGENTES ESTRESSORES NO CRESCIMENTO CELULAR ...	41
4.1.1 Estresse osmótico e por escassez de nutrientes	41
4.1.1.1 Fontes de carbono	41
4.1.1.2 Fontes de nitrogênio	44
4.1.2 Estresse por ácidos inorgânicos.....	46
4.1.3 Estresse por ácidos orgânicos	47
4.1.4 Estresse oxidativo	53
4.1.5 Estresse etanólico.....	55
4.1.6 Estresse térmico	57
5 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

A levedura *Dekkera bruxellensis* é constantemente referida como o principal contaminante dos processos de fermentação alcoólica industrial, principalmente na região Nordeste do Brasil. Na produção de bioetanol, o papel de contaminante desempenhado por *D. bruxellensis* é alcançado pela competição com *Saccharomyces cerevisiae* pelo substrato industrial, no qual ela consome o açúcar presente no meio e produz etanol pela via fermentativa. Apesar de produzir etanol, o principal problema encontrado nesses casos é a baixa produtividade (produção/tempo) de *D. bruxellensis* comparado a *S. cerevisiae*, decorrente de uma assimilação mais lenta de açúcares e/ou um maior desvio do carbono disponível para a produção de biomassa celular e outros metabólitos.

Vários estudos investigam a permanência dessa levedura em condições industriais, muitas vezes inóspitas, podendo ser relacionada a (i) uma maior afinidade por um substrato limitante ou ainda a (ii) uma maior tolerância a estresses ambientais. No primeiro grupo de hipóteses, a assimilação de nitrato, uma fonte de nitrogênio presente no caldo de cana e não assimilada por *S. cerevisiae*, já foi apontada como um potencial fator de adaptação para *D. bruxellensis*. Nesse caso, o uso de nitrato permite que células dessa levedura continuem crescendo em um ambiente no qual já não existem mais fontes de nitrogênio assimiláveis por *S. cerevisiae*. Por outro lado, no segundo grupo de hipóteses, o conhecimento atual ainda é limitado e merece atenção, uma vez que linhagens que exibem traços fisiogenômicos mais favoráveis devem apresentar maior adaptabilidade aos diferentes estresses industriais. Nesse contexto, o processo de fermentação alcoólica industrial é caracterizado por uma série de condições de estresse aos quais as células de levedura são expostas, desde (i) condições de hiperosmolaridade, (ii) estresse térmico, (iii) etanólico; (iv) estresse ácido, (v) estresse oxidativo, além de (vi) escassez nutricional.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade de tolerância e adaptação de *D. bruxellensis* a diferentes agentes estressores presentes no ambiente industrial, em comparação com *S. cerevisiae*, a fim de ampliar o entendimento acerca do alto desempenho adaptativo apresentado por *D. bruxellensis* nos substratos industriais. Os resultados gerados podem contribuir para uma melhor avaliação do estabelecimento e manutenção dessa levedura nos substratos industriais, permitindo a elaboração de estratégias de aproveitamento desse micro-organismo, minimizando os prejuízos causados em eventos de contaminação industrial.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Investigar a capacidade de resistência e adaptação a agentes estressores industriais no metabolismo da levedura *D. bruxellensis*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar o impacto dos principais tipos de estresse industrial (osmótico, ácido, oxidativo, etanólico e térmico) no crescimento da levedura *D. bruxellensis* GDB 248.
- Verificar o nível de tolerância e adaptação de *D. bruxellensis* GDB 248 a estes agentes em comparação com a levedura padrão *S. cerevisiae* JP1.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *DEKKERA BRUXELLENSIS*

2.1.1 Aspectos gerais

A levedura *Dekkera bruxellensis* faz parte do grupo dos hemiascomicetos e da família Saccharomycetaceae. Suas células possuem aspecto polimórfico, variando de acordo com a linhagem, meio de cultura e com o tipo de estresse do meio as quais podem ser submetidas. Além disso, as células podem se apresentar esferoidais a elipsoidais e muitas vezes ogivais, podendo exibir também células cilíndricas e alongadas, com variação de dois a sete μm de tamanho (Figura 1) (KURTZMAN et al., 2011). Sua forma teleomórfica, produtora de ascósporos, é classificada no gênero *Dekkera*, enquanto que sua forma anamórfica, destacada por contaminar a produção de vinho, se enquadra no gênero *Brettanomyces* (do grego, *Brettano*: cerveja e *Myces*: fungo). Este gênero foi mencionado pela primeira vez em 1904, em bebidas britânicas por Niels Hjelte Claussen, na cervejaria Carlsberg, responsável por realizar fermentações secundárias e desenvolver os sabores únicos das melhores cervejas inglesas da época (CLAUSSEN, 1904; VAN DER WALT, 1984; SANGORRIN et al., 2013).



Figura 1. Células da linhagem industrial *Dekkera bruxellensis* GDB 248 em meio YNB. Fonte: Autor.

O gênero *Dekkera* foi validado após a verificação da conexão entre os gêneros *Brettanomyces* (anamorfo) e *Dekkera* (teleomorfo) e suas espécies, com base em investigações

de genes responsáveis por codificar a subunidade menor do RNA ribossomal. Apenas cinco espécies são reconhecidas deste grupo: *D. bruxellensis*, *D. anomala*, *B. custersianus*, *B. nanus* e *B. nardensis* e dentre as cinco, *D. anomala* e *D. bruxellensis* são teleomorfos (Figura 2) (MITRAKUL, 1999; KURTZMAN et al., 2011; ROZPEDOWSKA et al., 2011; SCHIFFERDECKER et al., 2014). O termo *Brettanomyces/Dekkera* tem sido usado indistintamente como sinônimos. Curiosamente, a distinção entre *Dekkera* e *Brettanomyces* ainda é pouco clara, especialmente porque as técnicas atuais de detecção de DNA molecular não foram capazes de detectar diferenças sistemáticas entre os estados de anamorfos e teleomorfos (OELOFSE et al., 2008). De acordo com o novo Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas (o Código de Melbourne) que propõem que as espécies de fungos devem receber apenas um único nome válido, o termo *Brettanomyces* ficou sendo prioritária em relação a *Dekkera* (HIBBETT e TAYLOR, 2013; STEENSELS et al., 2015). Apesar disso, a utilização do nome do gênero *Dekkera* ainda é bastante difundida e será adotada no presente trabalho.

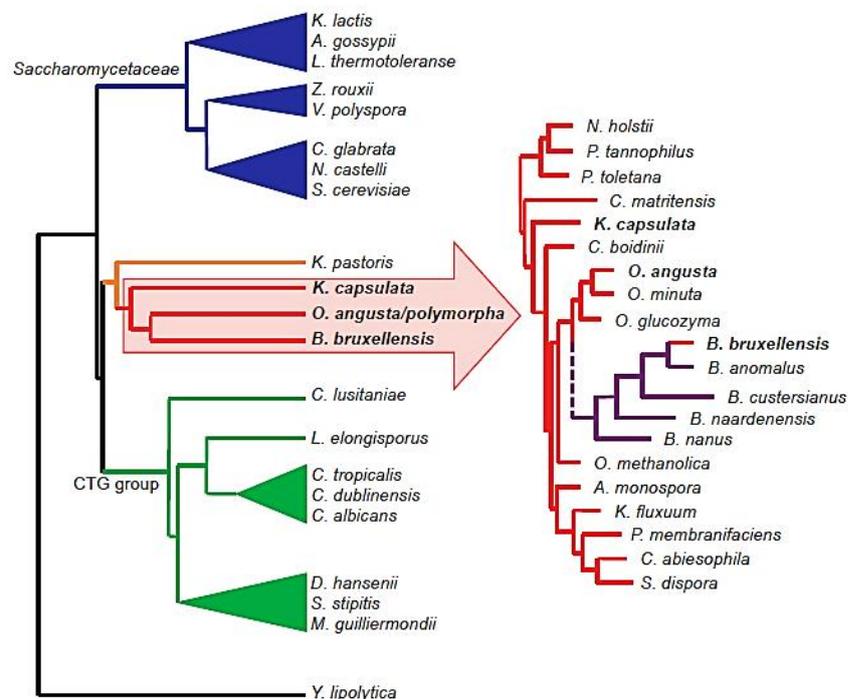


Figura 2. Visão geral esquemática da relação filogenética de *Brettanomyces bruxellensis* com outras espécies de fermento. (CURTIN et al., 2012; PIŠKUR et al., 2012; MORALES et al., 2013; RAVIN et al., 2013)

Em relação aos nichos ou habitats, leveduras do grupo *Brettanomyces* são encontradas em bagas de uva, vinho, cerveja, produtos lácteos, cidra, azeitonas, sendo o mais comum em barris de envelhecimento de vinhos tintos e até em destilarias do Brasil, em processos de

fermentação alcoólica industrial (RENOUF et al., 2006; CURTIN et al., 2015). Dados revelam que na produção de álcool combustível, isolados dessa espécie tem a habilidade de produzir etanol com bons rendimentos, próximos aos vistos por *S. cerevisiae*, sendo a segunda levedura mais detectada nesse ambiente fermentativo (PASSOTH et al., 2007; DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; DE BARROS PITA et al., 2011; SILVA et al., 2016).

2.1.2 *Dekkera bruxellensis* em ambientes industriais

Detectada especialmente no cenário industrial e apresentando muitas vezes um papel confuso e ambíguo, principalmente na indústria alimentícia, a levedura *B/D. bruxellensis* tem sido por muito tempo foco de investigações (TOIT et al., 2005; AGNOLUCCI et al., 2010; SERPAGGI et al., 2012; UUSITALO et al., 2017). Em alguns processos industriais, como na produção de cerveja Belga Lambic e Americana Coolship Ale, seu perfil aromatizante é considerado crucial e vantajoso, enquanto que na produção de vinho, os compostos produzidos conferem aromas e sabores desagradáveis e prejudiciais ao produto final (WEDRAL et al., 2010; SERRA et al., 2018). Muitas das pesquisas também relataram essa espécie em destilarias de álcool dos Estados Unidos e Canadá, onde a matéria-prima é o milho (ABBOTT et al., 2005), e ainda na Europa, onde o substrato é a beterraba (DE MINIAC, 1989). Embora *B/D. bruxellensis* seja considerada uma espécie contaminante industrial, seu papel nas fermentações é muitas vezes incerto, como citado acima (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007).

No que diz respeito ao ambiente cervejeiro, a presença de vários gêneros de leveduras e bactérias é imprescindível na obtenção de sabores únicos e complexos (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014; BASSO R et al., 2016). A produção da cerveja Lambic belga, é caracterizada por um tempo de fermentação muito longo, resultando em uma bebida de sabor rico e complexo por ser fermentada espontaneamente por um inóculo natural resultante de uma rica flora bacteriana e fúngica que perdura durante as longas fermentações (STEENSELS E VERSTREPEN, 2014). Enquanto a maior parte da fermentação alcoólica é realizada por *S. cerevisiae*, após fases posteriores (4 a 8 meses), quando a maioria dos oligossacarídeos curtos como maltose e maltotriose estão praticamente esgotados, há uma sobreposição gradual da população de *B/D. bruxellensis* a população de *S. cerevisiae*, perdurando até o final da maturação, causando mudanças drásticas no perfil sensorial da bebida. A atividade de esterases, β -glucosidases, α -glucosidases, produzidas durante o processo, resulta em uma bebida bem característica (VERACHTERT, 1992; BOKULICH et al., 2012; SCHIFFERDECKER et al., 2014; BLOMQUIST E PASSOTH 2015; COLOMER et al., 2019). Vários estudos

comprovam que ambas leveduras citadas, são encontradas em praticamente todas as fermentações entre lotes consecutivos, sugerindo a presença de um microbioma distinto, estável e favorável, presentes em todos os constituintes do processo; máquinas, barris, tanques e outras superfícies da cervejaria (STEENSELS et al., 2015).

Assim como na produção de cerveja, na produção de vinho, outros organismos como fungos, bactérias ou leveduras selvagens podem também contaminar as fermentações proporcionar sabores inesperados. Algumas linhagens de *B/D. bruxellensis*, como exemplo da cepa CBS 2499, são bem tolerantes ao processo, podendo estar presentes em peles de uva, serem introduzidas por insetos ou até mesmo detectadas nas instalações da própria vinícola (FUGELSANG; EDWARDS, 2007; PIŠKUR et al., 2012). Embora *B/D. bruxellensis* possa ser identificada em qualquer estágio do processo de vinificação, e nos já citados acima, ela é tipicamente isolada no final da fermentação alcoólica, antes do início da fermentação maloláctica espontânea (baixa concentração de açúcar e alta concentração de etanol) e/ou durante o armazenamento nos barris de madeira durante o envelhecimento devido à dificuldade de limpeza e desinfecção (RENOUF et al., 2007; OELOFSE et al., 2008; CECCHINI et al., 2013; GARIJO P. et al., 2015).

Ao contrário da produção cervejeira, as linhagens de *B/D. bruxellensis* detêm geralmente a base molecular para produzir as maiores quantidades de compostos que são prejudiciais a qualidade organoléptica do vinho (odores desagradáveis, aspecto turvo e até formação de filme e névoa), incluindo algumas classes de fenóis voláteis; majoritariamente 4-etilfenol (4-EP) e o 4-etilguaiacol (4-EG). Esses compostos derivam da bioconversão sequencial de ácidos hidroxicinâmicos específicos (ferúlico, p-cumárico), ambos presentes no mosto. Na primeira etapa, duas importantes enzimas, a cinamato descarboxilase (*CD*), transforma os ácidos hidroxicinâmicos em vinilfenóis e em seguida a vinilfenol redutase (*VPR*), os reduz a derivados etílicos, possibilitando as leveduras metabolizarem os ácidos em aromas anormais (Figura 3) (SCHIFFERDECKER et al., 2014; VALDETARA et al., 2017; BERBEGAL et al., 2018).

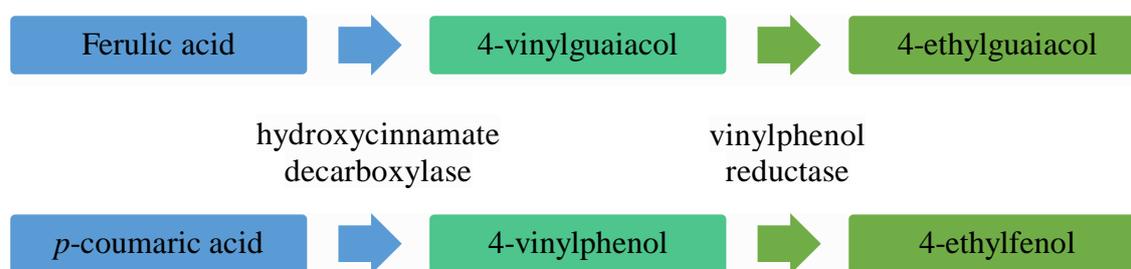


Figura 3. Formação de etilfenóis a partir de seus precursores hidroxicinâmicos (BERBEGAL C. et al., 2018).

Embora a combinação das várias condições de estresse presentes na produção do vinho previna a proliferação da maioria dos contaminantes, as espécies de *Brettanomyces* são muito tolerantes às diversas circunstâncias, e, por isso, numerosas abordagens têm sido usadas para contrabalancear a proliferação microbiana no vinho e reduzir o impacto sensorial dos fenóis voláteis. A adição de quitosana (inibe a proliferação celular e previne a formação de etilfenóis), o uso de carvão ativado, filtração (reduz o número de células por separação física) ou ainda a utilização do dióxido de enxofre (SO₂ - previne a formação e oxidação de etilfenóis), comumente empregado para estabilizar o produto final, são alguns dos compostos recomendados que aumentam a sustentabilidade na produção (GERBAUX et al., 2002; BARATA et al., 2008; CURTIN et al., 2013; AGNOLUCCI et al., 2014; DUARTE et al. 2017; FELIPE-RIBEIRO et al., 2017/2018; BERBEGAL et al., 2018). Por fim, ainda é desconhecido se a capacidade de *B/D. bruxellensis* em deteriorar o vinho está relacionada somente com sua habilidade em produzir esses compostos fenólicos ou de outro modo, associada a uma resposta metabólica as condições estressantes submetidas (HARRIS et al., 2009).

Outro nicho interessante do qual *B/D. bruxellensis* é frequentemente isolada, são os locais de produção de bioetanol. Esse biocombustível tem sido apontado como o mais consumido no mundo, cooperando consideravelmente para a redução do consumo de combustíveis fósseis, da poluição ambiental e do aquecimento global. Pode ser produzido a partir de diversos tipos de matérias-primas, como a sacarose, amido, biomassa lignocelulósica e algas através do processo de fermentação por microorganismos (NIGAM P.; SINGH A., 2011; MOHD AZHAR et al., 2017). Nessa ocasião, a presença de *B/D. bruxellensis* é questionada em dois aspectos; o primeiro, ligado a quedas na produtividade do etanol, sendo identificada como contaminante (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; DE BARROS PITA et al., 2011) e o segundo, sendo fornecida como fermentadora para o processo, devido à sua tolerância a baixos

pH, altas concentrações de etanol, osmólitos e altas temperaturas, metabolismo eficiente em condições de limitação de nutrientes e estresses em geral. Ainda, *B/D. bruxellensis* é capaz de consumir os açúcares pentoses liberados durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, se mostrando bem adaptada às condições inóspitas do processo, além de ser capaz de produzir etanol, possibilitando seu aproveitamento em futuras aplicações industriais (LIBERAL et al., 2007; PASSOTH et al., 2007; BECKNER et al., 2011; DE BARROS PITA et al., 2013; LEITE et al., 2013).

Uma alternativa energética atraente e que vem ganhando uma maior atenção na última década é a produção de etanol de segunda geração. A busca de biocombustíveis sustentáveis e renovados, a partir da biomassa lignocelulósica é um avanço para a produção de formas variadas de energia. Nessa ocasião, é frequente que os meios de cultura contenham misturas de hexoses, pentoses e dissacarídeos. Dados comprovam que algumas linhagens de *D. bruxellensis*, em destaque a linhagem GDB 248, pode crescer e produzir etanol a partir da celobiose como fonte de carbono sob limitação de oxigênio, sendo uma vantagem metabólica importante no que diz respeito aos substratos lignocelulósicos, além dessa biomassa ser naturalmente abundante e acessível durante todo o ano (BLOMQVIST et al., 2010; REIS et al., 2014; RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017).

Assim, enquanto espécies de *Brettanomyces* são raramente utilizadas como culturas iniciais em fermentações de alimentos e sua erradicação ainda é um tópico comum nas pesquisas de vinhos, seu potencial biotecnológico se torna mais aparente, com um número crescente de estudos que visam identificar perfis com os melhores parâmetros fermentativos (DE BARROS PITA et al., 2011, 2013; LEITE et al., 2013; STEENSELS et al., 2015)

2.1.3 *Dekkera bruxellensis* e *Saccharomyces cerevisiae*: dinâmica populacional em substratos industriais

Por ser utilizada na produção de etanol, indústrias farmacêuticas, de panificação e de bebidas, *S. cerevisiae* é a espécie de levedura mais estudada desde milhares de anos. Como organismo modelo em estudos de bioquímica, genética e biologia celular de seres eucariotos, seu conhecimento biológico é bem desenvolvido (OSTERGAARD et al., 2000; ZAKRAJSEK et al., 2011). A capacidade de se proliferar em condições aeróbicas e anaeróbicas, acumular altas concentrações de etanol, além do seu perfil de sabor agradável e a ausência de produção de toxinas, faz com que ela seja a levedura ideal para a indústria biotecnológica, sendo

considerada de fácil manutenção e manipulação em laboratório (QUEROL, 2003; BOKULICH et al., 2014; STEENSELS; VERSTREPEN, 2014).

Dessa forma, linhagens de *S. cerevisiae* selvagens são capazes de sobreviver e dominar dornas de fermentação alcoólica, que são considerados ambientes inóspitos. Isso pode ser evidenciado durante a reciclagem de células, a pressão seletiva (evolução adaptativa) que as células sofrem, induz o aparecimento de características favoráveis para o processo fermentativo (BASSO et al., 2008). No entanto, em certas condições ou para certos processos específicos de fermentação, os limites fisiológicos desta espécie restringem a sua aplicabilidade. Portanto, existe atualmente um forte interesse em *leveduras* não-*Saccharomyces* (ou não convencionais) com características peculiares capazes de substituir ou acompanhar *S. cerevisiae* em fermentações industriais específicas (STEENSELS et al., 2015). Mais de 2500 espécies de leveduras foram relatadas no processo fermentativo, sendo poucas tolerantes a esse ambiente, nomeadamente, *Zygosaccharomyces rouxii* (osmotolerância), *Kluyveromyces marxianus* (termotolerância), *D. bruxellensis* (tolerância ao etanol), *Pichia kudriavzevii* (tolerância a derivados de furano) e *Z. bailii* (tolerância ao ácido acético) (TAYLOR et al., 2012; DOROTA et al., 2015; STEWART GG, 2017).

A maioria desses microrganismos evoluíram separadamente de *S. cerevisiae* e desenvolveram mecanismos novos e exclusivos para superar condições ambientais severas (SOUCIET et al., 2009; DUJON, 2010). Em especial, *D. bruxellensis*, separou-se de *Saccharomyces cerevisiae* há mais de 200 milhões de anos, seguindo uma evolução paralela. Apesar disso, é constantemente isolada de nichos similares, como: cerveja, vinho e produção de bioetanol. Ambas as leveduras possuem traços fisiológicos semelhantes, adquiridos de formas independentes, tais como (1) anaerobiose facultativa, (2) efeito *Crabtree* positivo, (3) e a capacidade de produzir e acumular altos níveis de etanol e de crescer em ambientes ácidos (PROCHÁZKA et al., 2010; ROZPEĐOWSKA et al., 2011; GALAFASSI et al., 2011; PIŠKUR et al., 2012; ECHEVERRIGARAY et al., 2013). Muitas dessas características foram adquiridas por aumento da expressão de genes que codificam transportadores e enzimas associadas ao metabolismo de nitrogênio, como também, acréscimo em lipídios, oxidoredutases e um metabolismo energético mais eficiente e complexo, contrastando em alguns aspectos com *S. cerevisiae* (WIJSMAN et al., 1984; TIUKOVA et al., 2013).

Na prática, um fator importante é a dinâmica populacional dessas leveduras durante o processo de fermentação alcoólica, amplificada nas reciclagens de biomassa (SILVA-FILHO et al. 2005; BASSO et al., 2008). Um exemplo real dessa atividade, foi verificado em várias destilarias do Nordeste do Brasil, em um trabalho do nosso grupo de pesquisa, onde cepas de *D. bruxellensis* mesmo apresentando uma maior eficácia em converter os açúcares (principalmente a sacarose) a biomassa (constituindo até 70% da população de células), durante os ciclos celulares sob anaerobiose, não ocasionou danos notáveis a eficiência global da fermentação, além de não interferir na viabilidade de *S. cerevisiae* (PEREIRA et al., 2012).

A interação com outros microrganismos é outro importante aspecto competitivo entre *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae*. As bactérias lácticas, por exemplo, constituem um dos principais grupos de contaminantes em fermentações de leveduras industriais, destacando *Lactobacillus fermentum*, *L. brevis* e *L. vini*, isoladas e identificadas na produção de etanol (SKINNER et al., 2004; BECKNER et al., 2011; SIEUWERTS, S. et al., 2018). Altas taxas de crescimento, tolerância a baixo pH e alta temperatura, e resistência a altas concentrações de etanol (pela formação de flocos que reduzem a superfície exposta ao etanol) permitem que essas bactérias compitam diretamente com leveduras pelo substrato industrial e produzam ácidos orgânicos, principalmente o láctico. No processo industrial com recirculação celular, *L. vini* parece estar associada a *D. bruxellensis*, não estando clara ainda qual a interação específica entre essas duas espécies (PASSOTH et al., 2007; LUCENA et al., 2010; BLOMQUIST, 2011; DE SOUZA et al., 2012). Essas observações podem auxiliar no entendimento do estabelecimento e manutenção de *D. bruxellensis* no ambiente industrial, além de sua competição com *S. cerevisiae* (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; CURTIN et al., 2012; DE BARROS PITA et al., 2011, 2013; GALAFASSI et al., 2013).

Assim, os efeitos que levam ao estabelecimento de *D. bruxellensis* em um processo industrial e o que isso de fato interfere na produção de etanol, são multivariados e dependem em grande parte da capacidade de assimilar os diferentes nutrientes presentes no meio, como é caso do nitrato, que será melhor relatado no próximo tópico, como também outros componentes nutricionais que afetam diretamente o metabolismo celular da levedura.

2.1.4 Características fisiológicas

A diversidade de espécies de leveduras em determinados nichos é definida principalmente pela sua capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono, exibindo grande especialização para cada habitat. Apesar de muitas linhagens de *Brettanomyces/Dekkera*

ocuparem nichos semelhantes aos de *S. cerevisiae*, sua fisiologia geral e características fenotípicas apresentam diferenças interessantes, sendo uma candidata promissora para a produção de etanol. Em geral, as linhagens de *D. bruxellensis* assimilam uma grande variedade de fontes de carbono e nitrogênio, tais como, glicose, frutose, sacarose, amônio, aminoácidos; além da capacidade de consumir nutrientes alternativos, incluindo alguns não utilizados por *S. cerevisiae* como: celobiose (dissacarídeo presente em substratos de bioetanol de segunda geração), dextrinas (presentes como açúcares residuais após a fermentação principal da cerveja), arabinose (pentoses presentes no hidrolisado hemicelulósico) e nitrato (CONTERNO et al., 2006; ROZPEĐOWSKA et al., 2011; PISKUR, et al. 2012; DE BARROS PITA et al., 2011; CRAUWELS et al., 2015; SILVA, 2017). Dentre essas fontes mencionadas; glicose, frutose e sacarose são as que apresentam grande relevância industrial por fazerem parte da composição de meios industriais como o caldo-de-cana e o melão.

A glicose, fonte preferencial de carbono e energia, é rapidamente assimilada pela via glicolítica e preferencialmente fermentada a etanol, em *S. cerevisiae* (WINDE et al., 1997; LEITE et al., 2013; SILVA, 2017). Esta preferência por assimilar e metabolizar essa fonte de carbono, reprimindo o uso de outras fontes presentes no meio, se dá por um fenômeno conhecido como repressão catabólica exercida pela glicose, fenômeno compartilhado com *D. bruxellensis*, mas que parece ser uma característica linhagem específica. Foi sugerido que uma maior afinidade pela glicose em *D. bruxellensis* sob limitação de carbono (possivelmente codificando um transportador de glicose de alta afinidade) pode parcialmente explicar seu sucesso nas fermentações de bioetanol (WINDE et al., 1997; PITA, 2009; LEITE et al., 2013; SILVA, 2017). Por outro lado, no caldo de cana-de-açúcar, a sacarose é o principal açúcar encontrado. Esse dissacarídeo deve ser hidrolisado em glicose e frutose para a subsequente utilização pela glicólise e via fermentativa (BADOTTI et al., 2008). Enquanto as células de *S. cerevisiae* hidrolisam a maior parte da sacarose no meio extracelular originando glicose e frutose, em *D. bruxellensis*, a utilização eficiente desse açúcar depende da expressão de um transportador de sacarose de alta eficiência (para o qual não existem homólogos em *S. cerevisiae*) para o interior das células, com provável gasto de energia, sendo a atividade da invertase fundamentalmente intracelular e pode ser a chave para a alta competitividade desta levedura em fermentações à base de sacarose (DE BARROS PITA et al., 2011; TIUKOVA et al., 2013; LEITE et al., 2013).

No ambiente de fermentação industrial, uma das características mais marcantes para uma levedura ser considerada uma boa produtora de etanol é a sua alta capacidade fermentativa. Nesse contexto, leveduras que possuem traços fisiológicos favoráveis, em geral, apresentam o

chamado efeito *Crabtree* (ROZPEDOWSKA et al., 2011). O efeito *Crabtree* é definido como a capacidade de realizar a fermentação mesmo em presença de oxigênio (FIECHTER et al., 1981). Esta capacidade é “chave” para conferir a *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* uma estratégia de sobrevivência denominada “fazer-acumular-consumir”, caracterizada por um rápido consumo de açúcares, alta capacidade em produzir e acumular etanol e excelente tolerância a este composto em condições aeróbicas. Em resumo, as leveduras produzem o etanol para evitar o crescimento de microorganismos concorrentes e em seguida metabolizam-no pela via respiratória quando a glicose é esgotada, resultando em um melhor desempenho competitivo frente a outras espécies (ROZPEDOWSKA et al., 2011; CURTIN et al., 2015; LEITE et al., 2016).

Apesar de ser considerada *Crabtree* positiva, análises fisiológicas de espécies do gênero *Dekkera*, mostram que estas leveduras possuem baixa capacidade fermentativa quando comparada a *S. cerevisiae*, sucedendo em uma menor produtividade e rendimento industrial (ARAÚJO, 2005). Uma menor produtividade e rendimentos em ambiente industrial pode estar relacionada à limitações na assimilação de açúcares. O uso desses açúcares fermentáveis presentes no meio, se dá através da fermentação alcoólica, na qual toda a energia proveniente da fermentação é produzida ao nível do substrato, com saldo de 2 moles de ATP por mol de glicose consumida. A energia fornecida por essas reações de oxidação parcial é utilizada para o crescimento dos microorganismos através da via respiratória com produção de aproximadamente 30 moles de ATP por mol de glicose, utilizado nas vias anabólicas dependentes de energia nas células e a oxidação anaeróbia dos açúcares para formação de etanol e dióxido de carbono (LIMA et al., 2001). A principal rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica ou ciclo de Krebs/respiração é a via glicolítica, na qual uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são produzidas, envolvendo onze reações químicas e liberação de ATP, sendo o destino do piruvato determinado pelas características genéticas e condições de crescimento do micro-organismo, como ilustrado na Figura 3 (RETTORI; VOLPE, 2000; GUERRA, 2011; HAGMAN, 2013).

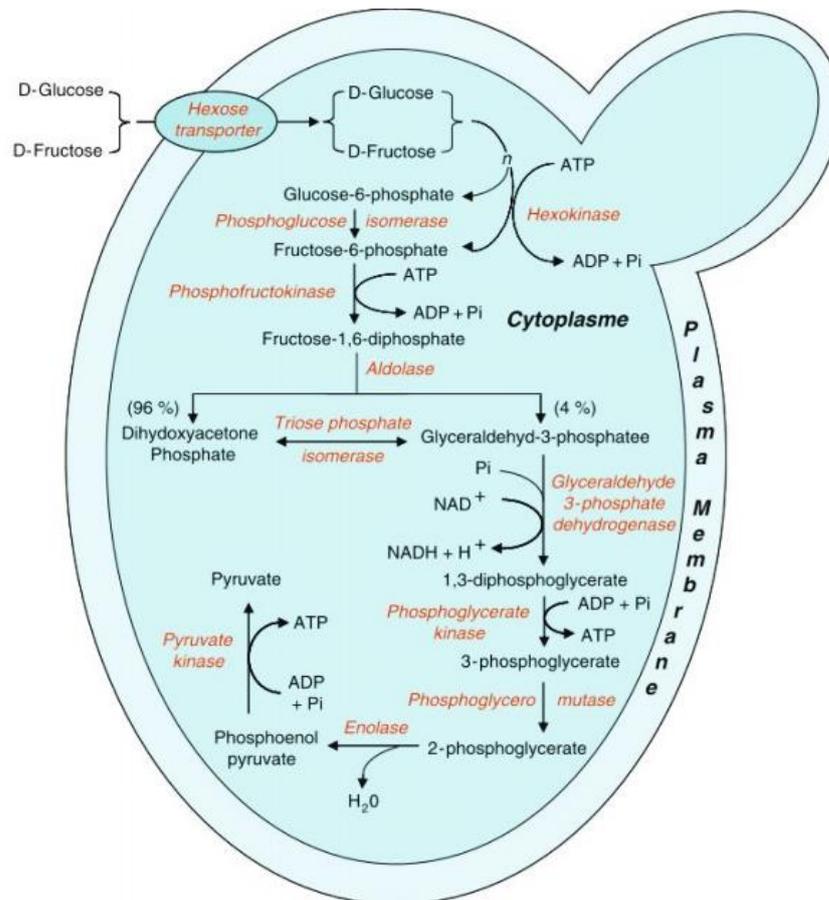


Figura 4. Reações bioquímicas da via glicolítica em célula de levedura. **Fonte:** Zamora (2009).

Ao fim dos processos metabólicos, utilizando fontes de carbono, a produção de energia e de constituintes celulares só será possível com a formação de acetil-CoA mitocondrial e citosólico. Entretanto, em *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* em crescimento aeróbio, o metabolismo fermentativo pode acontecer simultâneo à respiração quando a concentração de glicose estiver acima de um valor chamado concentração crítica (acima de 5 mM), estabelecendo o chamado metabolismo respiro-fermentativo.

Assim como o carbono, o nitrogênio é um elemento essencial ao desenvolvimento das leveduras, sendo decisivo na implantação de um organismo em um nicho específico. Várias fontes, tais como amônia, prolina, arginina e nitrato, podem ser utilizadas por *D. bruxellensis* (CONTERNO et al., 2006; GORDARD et al., 2007). Dentre as diferenças metabólicas entre *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* destaca-se a capacidade desta última de assimilar nitrato e nitrito como fontes de nitrogênio, como também de co-consumí-lo com outras fontes, podendo fornecer uma vantagem em fermentações de bioetanol onde a quantidade relativa de nitrato pode ser elevada (DE BARROS PITA et al., 2011). Essa característica é inclusive, utilizada na taxonomia bioquímica do gênero (BARNETT et al., 2002). Em células de *D. bruxellensis*,

a via de assimilação de nitrato é composta por um transportador de alta afinidade (*YNT1*) e duas enzimas redutases, a nitrato (*YNR1*) e nitrito redutase (*YNI1*). A dupla redução da molécula de nitrato resulta em amônia e re-oxidação de 4 moléculas de NAD(P)H (SIVERIO, 2002). Esta habilidade foi mostrada como sendo um importante fator de adaptação de *D. bruxellensis* ao ambiente industrial, apesar do metabolismo de nitrato requerer energia e, portanto, causar menor crescimento celular e produção de etanol, em condições limitadas de oxigênio (DE BARROS PITA et al., 2011/2013; GALAFASSI et al., 2013).

Outro aspecto fisiológico interessante é que células de *D. bruxellensis* parecem ter uma estratégia adicional para superar outros micro-organismos. Além do etanol, elas também são capazes de produzir, acumular e depois consumir altas concentrações de ácido acético (como subproduto da assimilação de glicose e etanol como fontes de carbono) em condições aeróbicas e suportar o ambiente de baixo pH resultante (BLOMQVIST et al., 2010; DIEN; MATSUDA, 2003). Em leveduras, o ácido acético pode ser produzido a partir da oxidação do acetaldeído, a partir do piruvato, produto final da glicólise. Quando produzido em altas concentrações, pode interferir no crescimento e na capacidade fermentativa das células de *D. bruxellensis* (YAHARA et al., 2007). Blomqvist e colaboradores (2011), utilizando cultivos contínuos e com limitação de oxigênio (5% de oxigênio dissolvido), observaram que as células de *D. bruxellensis*, produziram quantidades inferiores a 1 grama de ácido acético por litro, o que é insuficiente para afetar o crescimento e desenvolvimento das leveduras *D. bruxellensis* ou *S. cerevisiae* nos processos de fermentação industrial.

Em resumo, as diferentes vias e fatores relacionados ao metabolismo das fontes de carbono, bem como da utilização das diversas fontes de nitrogênio, refletem vantagens adaptativas a *D. bruxellensis* em diferentes nichos ecológicos. Embora muitos estudos retratem o gênero *Dekkera*, ainda há uma escassez de dados que o caracterizem, na tentativa de identificar perfis que favoreçam a alta adaptação desta levedura ao ambiente industrial.

2.1.5 Aspectos genéticos

As primeiras informações acerca do genoma de *B/D. bruxellensis* foram obtidas em 2007 por Woolfit e colaboradores, através do sequenciamento de uma cepa contaminante de vinho CBS2499. Em estudos posteriores, a mesma cepa foi reanalisada e subsequentemente re-sequenciada para uma maior cobertura (HELLBORG E PISKUR, 2009; PISKUR et al., 2012), resultando na descoberta de 7.340 genes, 2.606 sequências codificadoras de proteínas, sendo apenas 277 não ortólogas a *S. cerevisiae*, mas ortólogas a outras espécies da família

Saccharomycetaceae, por exemplo, *Candida albicans*, *Hansenula polymorpha* e *Pichia pastoris*. Sequências de DNA ribossomal também foram relatadas em quase totalidade (18S, 5.8S 25S e 5S) (WOOLFIT et al., 2007; CRAUWELS et al., 2015). A partir desse genoma outras quatro linhagens de vinho também foram sequenciadas, sendo três australianas AWRI1499, AWRI1608, AWRI1613 e uma chilena LAMAP2480.

As espécies de *Brettanomyces/Dekkera* apresentam uma diversidade maior entre as cepas do que *S. cerevisiae*, tanto no número de cromossomos quanto na ploidia, revelando que embora a maioria de suas cepas compartilhem características gerais semelhantes, o conteúdo genético pode variar significativamente. (CURTIN et al., 2012; PIŠKUR et al., 2012; BORNEMAN et al., 2014; VALDES et al., 2014). O genoma de *B/D bruxellensis* possui um tamanho bastante variável na faixa de 13 Mb (SIURKUS, 2004). Embora a configuração geral dos cromossomos esteja geralmente bem preservada entre as populações, em linhagens industriais de fermentação de caldo de cana o número de cromossomos parece variar de 4 a 6 cromossomos e tamanhos de 0,67 e 5,7 Mb, sugerindo que as espécies de *B/D* podem empregar variações freqüentes na estrutura dos cromossomos para aumentar sua variabilidade e competitividade (FISCHER et al., 2000; LIBERAL, 2010).

Além das variações citogenéticas, outras alterações estão correlacionadas com o habitat do qual são isoladas. Linhagens de vinho por exemplo, apresentam cerca de 20 genes envolvidos no metabolismo de carbono e nitrogênio que não foram encontrados em cepas de cerveja. Experimentos recentes de evolução co-cultivando leveduras *Brettanomyces* e bactérias do ácido láctico e acético, através de várias gerações na produção de cervejas Lambic, demonstraram que a exposição a essas bactérias pode levar a rearranjos genômicos em diversas leveduras não convencionais, a exemplo dos genomas de *B. bruxellensis* e *B. anomalus*, que apresentaram maior reconfiguração, ligando a estrutura molecular com respostas de adaptação aos diferentes ambientes (CRAUWELS et al., 2014; ZHOU N. et al., 2018).

Analisando o contexto molecular para possíveis vantagens no desenvolvimento de um estilo de vida fermentativo, em *S. cerevisiae*, um evento evolutivo de inteira duplicação do seu genoma, com conseqüente duplicação de genes envolvidos na glicólise e um evento de perda de um elemento cis-regulatório associado a genes que codificam proteínas ribossômicas mitocondriais correlacionadas com a respiração e crescimento rápido, conferiram a capacidade de reprimir a respiração e, assim, acumular etanol sob condições aeróbicas (WOLFE; SHIELDS, 1997; IHMELS et al., 2005; ROZPEDOWSKA et al., 2011). Em *D. bruxellensis*, entretanto, esse elemento também foi perdido apenas em genes envolvidos na respiração. Mesmo que as espécies de *D. bruxellensis* não tenham sofrido um evento de inteira duplicação

do genoma, a análise comparativa das sequências *B/D bruxelensis* revelou algumas propriedades genômicas interessantes que poderiam estar ligadas ao seu comportamento e nichos ecológicos. Certas cepas, por exemplo, possuem genomas triploides, enquanto outras possuem genomas diploides com rearranjos cromossômicos; inserções, deleções e duplicações (PIŠKUR et al., 2012; CURTIN et al., 2012; BORNEMAN et al., 2014; CRAUWELS et al., 2014).

Além disso, a análise do conteúdo gênico de *B/D de bruxelensis*, revelou um relativo enriquecimento de importantes genes responsáveis por atividades enzimáticas e uma maior sobrevivência aos diferentes habitats, entre eles: genes que codificam proteínas de membrana plasmática envolvidas no crescimento da parede celular, adesão e crescimento (*FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *HKR1*) vistos como favoráveis para a adaptação ao vinho ou cerveja em barris de carvalho, mediando a adesão das leveduras à parede interna do barril, impedindo que sejam levadas durante o processo de lavagem de alta pressão (JOSEPH et al., 2007, VERSTREPEN et al., 2003b; VERSTREPEN; KLIS, 2006 CHRISTIAENS et al., 2012). Além desses, também foram relatados o enriquecimento de transportadores, conferindo adaptação a ambientes escassos de nutrientes, como um transportador de glicose de alta afinidade; genes envolvidos na assimilação de nitrato como única fonte de nitrogênio (ortólogos a *Hansenula polymorpha*); genes que compreendem o metabolismo de fontes alternativas de carbono e sua captação (gene *LAC4*, ortólogo em *Kluyveromyces lactis* codificador da enzima β -galactosidase); enzimas oxidoreductases (ligadas a sobrevivência em condições anaeróbicas, como também capacidade de produzir acetato em condições aeróbicas); genes do complexo I da cadeia respiratória e genes implicados no metabolismo de lipídeos. (NARDI et al., 2010; CURTIN et al., 2012b; PIŠKUR et al., 2012; TIUKOVA et al., 2013; BORNEMAN et al., 2014; CRAUWELS et al., 2014/ 2015).

Embora *D. bruxellensis* seja uma espécie de levedura de interesse tanto para a indústria quanto para a pesquisa básica, as ferramentas de biologia molecular para a manipulação desta levedura ainda não estão bem desenvolvidas. Cepas geneticamente modificadas ainda precisam ser aplicadas à produção de etanol, para descobertas promissoras no campo biotecnológico.

2.2 FERMENTAÇÃO

2.2.1 Produção de etanol por fermentação alcoólica

A utilização do bioetanol (álcool etílico ou quimicamente C_2H_5OH ou EtOH) no Brasil foi iniciada em 1925, sendo extremamente significativa para a economia, por ser menos tóxico, facilmente biodegradável e produzir menos poluentes atmosféricos. É o biocombustível alternativo mais utilizado no setor de transporte, oferecendo várias vantagens em relação à gasolina; como limites mais amplos de inflamabilidade, maiores velocidades de chama e aumento do aquecimento da vaporização (BALAT, M.; BALAT, H. 2009). A produção de etanol pelos Estados Unidos e pelo Brasil contribui para 85% da produção mundial de etanol (STANISZEWSKI, M. et al., 2007; DEMIRBAS, A. 2009; MOHD AZHAR, S. et al.2017).

Uma gama de matérias-primas pode ser utilizada para tal fim (sacarose, amido, biomassa lignocelulósica e algas), mas a cana-de-açúcar no Brasil é a principal empregada para a produção do etanol de primeira geração, ricas em sacarose e amido (NIGAM et al., 2011). As leveduras desempenham um papel essencial neste processo, não só *S. cerevisiae* é empregada como fermentadora exclusiva, leveduras híbridas, recombinantes e tipos selvagens são utilizadas (DIEN B. et al., 2003). O processo envolve basicamente três etapas fundamentais, que dependem do tipo da matéria-prima fornecida: (1) obtenção de solução que contém açúcares fermentáveis, (2) conversão de açúcares em etanol por fermentação das leveduras e (3) separação e purificação de etanol (BEHERA S. et al., 2010).

Os processos de fermentação industrial são classificados de acordo com os tipos de alimentação das dornas e o desenvolvimento da fermentação em processos contínuos e descontínuos (batelada). Processos descontínuos são os interruptos, denominados de batelada simples ou alimentada. Na batelada simples, a fermentação só se inicia após o preenchimento do mosto com o fermento, ou seja, o processo é realizado em sistema fechado com alta concentração de substrato sendo fornecido logo no início do processo sem adição ou remoção do meio, terminando com alta concentração do produto. Seu uso é restrito para fermentações laboratoriais e farmacêuticas, por obter baixa produtividade e requerer custos de mão-de-obra intensivos e altos, tornando-se inacessível para grandes produções, como é o caso da indústria alcooleira. Já na batelada alimentada, mistura-se o substrato ao fermento conforme a dorna vai sendo abastecida, sem remoção do meio. Trata-se de um método mais produtivo que a batelada simples, com maior oxigênio dissolvido no meio, menor tempo de fermentação e menor efeito

tóxico dos componentes do meio em comparação com outros tipos de fermentação. No entanto, a produtividade de etanol em batelada alimentada é limitada pela taxa de alimentação e concentração de massa celular (CHENG, N. et al., 2009; HADIYANTO, H. et al., 2013; THATOI, H. et al., 2014)

Nos cultivos contínuos, a fermentação é realizada adicionando constantemente substratos, caldo de cana e melão e nutrientes em um biorreator contendo microrganismos ativos. Esta suspensão representa cerca de 25 a 30% do volume total da fermentação, e este processo é realizado nos tanques com capacidade de 300 a 3000 m³. O volume de cultura deve ser constante e os produtos de fermentação são retirados continuamente. (PIŠKUR et al., 2006; BASSO et al., 2011). As vantagens do sistema contínuo são a maior produtividade, menores volumes de biorreatores e menos investimentos e custos operacionais (SANCHEZ, O.; CARDONA, C. 2008; JAIN, A.; CHAURASIA, S. 2014). Todo o processo, no entanto, é propício a maior contaminação, por ser realizado a céu aberto, sem etapas de esterilização do meio. Na indústria alcooleira, em geral, alguns ambientes, tais como o caldo de cana-de-açúcar, água de lavagem e vinhaça, podem favorecer o crescimento e propagação de diversas leveduras selvagens, fato este que pode explicar a entrada da levedura *D. bruxellensis* no processo fermentativo industrial (DA SILVA et al., 2016).

Ao fim da etapa anterior, as células de levedura precisam ser recuperadas para reciclagem, assim como o etanol, para ser usado como combustível. A técnica de imobilizar as células é frequentemente aplicada no processo fermentativo, resultando em uma maior densidade celular por volume de reator. Dentre os diversos tipos de imobilização, a adsorção é o mais comum. O uso de interações de natureza química ou física (forças de Van der Waals, ligações iônicas, pontes de hidrogênio ou interações covalentes), fazem com as células fiquem retidas na superfície do material; não afetando as células, podendo ser reutilizadas em fermentações posteriores, além de ser uma tecnologia simples e barata (WYMAN, C. 1996; BAI, F. et al., 2008; DUARTE, J. te al., 2013).

2.2.2 Fatores de estresse no processo fermentativo

Existem vários fatores que influenciam a produção de bioetanol. A presença de alguns tipos de estresse (ambientais ou mesmo decorrentes do próprio metabolismo da levedura) varia nos diferentes processos de produção, seja ele, de cachaça, vinho ou etanol combustível. A tolerância à múltiplos agentes estressores é o requisito mais desejado para as leveduras fermentadoras (RANDEZ-GIL; SANZ; PRIETO, 1999; ÇAKAR et al., 2005; BAI et al., 2008;

BASSO et al., 2008). O processo em si, é administrado por uma série de estratégias para se alcançar o produto desejado. Assim que o caldo é adicionado às leveduras, as mesmas entram em um estágio de adaptação e começam a se multiplicar, entretanto, na maioria dos casos, as condições para tal não são sempre as ideais para o fermentador; a natureza química dos nutrientes, altas temperaturas, estresse hiperosmótico causado por altas concentrações de solutos, e estresse oxidativo devido à aerobiose, são alguns exemplos (SMART, 2007; VAN VOORST et al., 2006; TOFIGHI et al., 2014).

À medida que há uma progressão da fermentação, esses microrganismos são expostos à anaerobiose; aumento da concentração de acetaldeído e etanol; acidificação e restrição nutricional, ocasionando quedas no crescimento, além de excessiva formação de espuma, intensa floculação e incapacidade de fermentar todo o açúcar do mosto. Diante disso, é essencial para um bom rendimento e produtividade, uma levedura que tolere inúmeros inibidores ou outras condições estressantes sem reduzir a eficiência na produção em larga escala (SMART, 2007; VAN VOORST et al., 2006; TOFIGHI et al., 2014).

Inicialmente o aumento na concentração de açúcar até certo nível faz com que a taxa de fermentação aumente. Geralmente, as células de levedura são expostas a um substrato altamente concentrado de açúcares e sais, tais como cálcio, potássio e magnésio, proveniente do melão, sofrendo um possível estresse osmótico. Esse excesso de açúcar no meio, causa uma taxa de fermentação estável que incapacita a absorção dos açúcares pelas células microbianas (BASSO, et al., 2011; TAO et al., 2012; PAIS et al., 2013; ZABED H. et al., 2014). O estresse osmótico, assim como outros estresses, causa rápida perda dos filamentos de actina da célula-mãe, perda de polaridade e parada no ciclo celular, além da prevista perda de água e encolhimento da célula. Quantidades crescentes de melão no meio também ocasionam uma elevação da pressão osmótica e uma diminuição concomitante da viabilidade, crescimento e desempenho fermentativo. Além de provocar desidratação por perda de água citoplasmática, pode agir em sinergismo com o etanol que está sendo produzido, aumentando sua toxicidade (SIDERIUS, 2002; NOVELLO, 2015).

Mecanismos fisiológicos, tais como o aumento da síntese de glicerol e trealose (dissacarídeo de glicose, que se acumula no citoplasma, contribuindo para a latência celular e a resistência ao estresse hídrico), redução na quantidade de carboidratos de reserva, entre outros, são ativados com o intuito das células se adaptarem, e retornarem a crescer (VANDERMERWE e VANVUUREN 2003; WOJDA, 2003). Assim como a elevada concentração de solutos acarreta preocupações, o declínio nas concentrações de carbono e nitrogênio, em conjunto com

o aumento da temperatura (35-45 °C) e concentração de etanol (mais de 15%), com o passar do tempo, influenciam negativamente a produção de etanol. Embora muitos estudos tenham *S. cerevisiae* como modelo na investigação de várias características fisiológicas e moleculares, *D. bruxellensis*, assim como, *Zygosaccharomyces rouxii* foram identificadas como altamente osmotolerantes (KINCLOVÁ et al., 2001; MARTORELL et al., 2007; LEANDRO et al., 2011; ZEMANČÍKOV J. et al., 2018).

A termotolerância é uma característica altamente desejável nos processos fermentativos. Em altas temperaturas os custos de resfriamento diminuem, como também o risco de contaminação, já que os meios não são esterilizados. Geralmente, *S. cerevisiae* apresenta tolerância de 25-37 °C com uma boa produção de etanol, sendo 30 °C a temperatura ótima de crescimento (NONKLANG et al., 2008; ABDEL-BANAT et al., 2010). A temperatura não age nas células isoladamente, quando *S. cerevisiae* é exposta a elevadas temperaturas ou baixos pH em sinergismo com altas concentrações de etanol, a maquinaria genética e metabólica da levedura é profundamente afetada, induzindo importantes proteínas que integram a membrana plasmática celular, a ATPase e a Hsp 30 (CURRAN; KHALAWAN, 1994). Muitas das modificações após a levedura sofrer um choque térmico são idênticas às causadas pela exposição a estresse etanólico devido ao sinergismo, fazendo com que o etanol seja mais severo sob altas temperaturas. Nos processos que se utilizam de hidrólise enzimática, os cuidados são maiores já que as enzimas são sensíveis à alta temperatura, podendo desnaturar sua estrutura terciária e conseqüentemente inativá-las, sendo necessário a regulação da temperatura durante todo o processo de fermentação. (ALDIGUIER et al., 2004; MONACO, 2007; JENSEN et al., 2009). Por ser termotolerante, *Kluyveromyces marxianus* vem sendo utilizada em vários estudos de produção de etanol de segunda geração (MORENO et al., 2013; GABARDO et al., 2014). Algumas linhagens desta levedura são consideradas excelentes produtoras de etanol, pois conseguem metabolizar vários tipos de açúcares, incluindo glicose, manose, galactose, xilose e arabinose (RODRUSSAMEE et al., 2011; SIGNORI et al., 2014; CASTRO, C.; ROBERTO, I. 2014).

A aeração é outro fator importante para se produzir o etanol. O oxigênio molecular é relativamente não-reativo e inofensivo em seu estado fundamental e é necessário para a síntese de ácidos graxos insaturados e esteróis, mas pode sofrer uma redução parcial formando uma série de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH[•]) altamente reativo, gerados como subprodutos do metabolismo celular. A célula de levedura é continuamente exposta ao oxigênio, onde ele

tipicamente se esgota nas primeiras 12 horas de fermentação que continua em condições anaeróbicas. ROS são agentes tóxicos que podem prejudicar uma variedade de componentes celulares, resultando em peroxidação lipídica, oxidação protéica e danos genéticos através da modificação do DNA. Além disso, parece ter papel direto no envelhecimento celular, levando em conta a vida útil durante os ciclos das fermentações (WEINBERGER M. et al., 2010; MILISAV I. et al., 2012; SEMCHYSHYN H.; LOZINSKA L. 2012; CALABRESE E. 2015; TORELLI N. et al., 2015).

Com o andamento do processo, as altas concentrações de etanol nas dornas, podem causar efeitos prejudiciais na estrutura celular, vias e atividades metabólicas, no transporte de glicose para o interior da célula e consequente parada na produção, devido o decaimento da viabilidade (PETROV,1990; BUTTKE, 1994; ALEXANDRE; CHARPENTIER, 1998). A princípio, o etanol efetua ligação com os grupos polares dos fosfolipídios de membrana, provocando desidratação celular por diminuir a quantidade de água presente nesta estrutura. Essa interação também aumenta a permeabilidade e fluidez da membrana, promovendo a dissipação do seu potencial eletroquímico e subsequente acidificação intracelular (PATRA et al., 2006; MA e LIU, 2010a; VANEGAS et al., 2012; PASCHOS et al., 2015). O etanol estimula ainda a formação espécies reativas de oxigênio que causam danos ao DNA (HONG et al., 2010; KAHR et al., 2011; SASANO, 2012a), lipídios e proteínas (AUESUKAREE et al., 2009; ANDERSON et al., 2012). Ele também inativa enzimas importantes, como a hexoquinase e piruvato quinase, pela mudança conformacional da estrutura destas proteínas (HONG et al., 2010; DOĞAN et al., 2014; PASCHOS et al., 2015). *S. cerevisiae* é destaque em relação a tolerância ao etanol. No entanto, várias outras espécies como, *D. bruxellensis*, *Pichia kudriavzevii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspora delbrueckii* e *Wickerhamomyces anomala*, possuem características fermentativas promissoras e níveis semelhantes de resistência ao produto (GALAFASSI et al., 2011; ZHA et al., 2013; MUKHERJEE et al., 2014; RUYTERS et al., 2015).

As células de leveduras também são submetidas a estresse ácido, tanto pela exposição a ácidos orgânicos fracos, quanto a ácidos inorgânicos fortes. A utilização de antissépticos como o ácido sulfúrico na lavagem das células para uma nova fermentação, tem se mostrado um eficiente controlador de contaminações (SILVA FILHO et al., 2005; LUCENA et al., 2015). Este procedimento, ainda que vise reduzir ao máximo as bactérias contaminantes, provoca danos celulares e um depósito de minerais. Em *S. cerevisiae*, ocasiona uma diminuição de dissacarídeos não redutores intracelulares, como trealose, deixando as células inviáveis

(FERREIRA et al., 1999). A presença de ácidos orgânicos no meio como; ácido ascórbico, benzoico e acético, também interfere no equilíbrio $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ na cinética das enzimas, no estado de ionização das cadeias laterais de aminoácidos, e em último caso, ocasiona morte celular (VEINE et al., 1998; ORIJ et al., 2009; ALMEIDA, 2014).

Os ácidos láctico e acético são os mais encontrados no processo fermentativo, sendo produzidos por bactérias lácticas contaminantes e em pequenas quantidades por leveduras, respectivamente. Ambos geram maior inibição quanto menor for o pH do meio, devido a uma maior concentração da forma não dissociada dos mesmos. A capacidade de atravessar a membrana plasmática por difusão gerando o próton H^+ e o ânion correspondente, acarreta no aumento da produção de radicais livres em aerobiose, induzindo não só ao estresse ácido, mas também ao estresse oxidativo, danificando ácidos nucleicos, proteínas e outras moléculas importantes (PIPER et al., 2001; FOLCH-MALLOL et al., 2004; GRAVES et al., 2006; ALMEIDA, 2014).

Ainda, a permeabilidade de alguns nutrientes essenciais às células é influenciada pela concentração de H^+ no caldo de fermentação (ZABED et al., 2014). Variações no pH do mosto ao longo dos ciclos de produção industrial de etanol, ocorrem devido ao tratamento ácido empregado com o intuito de diminuir a contaminação por bactérias. Em geral, o pH do meio afeta a contaminação bacteriana, o crescimento da levedura, a taxa de fermentação e a formação de subprodutos. Quando o pH é inferior a 4,0, o crescimento muitas vezes é inibido, há extensão de fase *lag* e redução na produção de etanol (LIMTONG et al., 2000; CANTARELLA et al., 2004; DORTA et al., 2005). O pH também interfere no estado de ionização das cadeias laterais de aminoácidos básicos ou ácidos, alterando estrutura, solubilidade e atividade protéica, causando a desnaturação de proteínas e consequente perda de funções e morte celular (ORIJ et al., 2009; ALMEIDA, 2014). Ácidos orgânicos quando não dissociados tem a capacidade de atravessar a membrana plasmática por difusão. No citoplasma, por sua vez, eles se dissociam gerando o próton H^+ e o ânion correspondente. O acúmulo de ânion no citoplasma pode acarretar no aumento da produção de radicais livres, induzindo ao estresse oxidativo em aerobiose (PIPER et al., 2001).

2.2.3 Resposta geral ao estresse celular

Os organismos vivos estão expostos a modificações de seu habitat natural. Todas as unidades estruturais e funcionais dos organismos possuem a capacidade de induzir respostas

celulares que modificam a expressão gênica diante de situações desfavoráveis, permitindo que as leveduras se adaptem e sobrevivam sob as novas condições (GASCH et al., 2000; TAGKOPOULOS et al., 2008 ; MITCHELL et al., 2009; GIBNEY et al., 2013). A capacidade de se adaptar a tais mudanças é determinada por diferentes mecanismos de regulação, que incluem sensores ambientais e vias de transdução de sinais, que em conjunto são designados como resposta a estresse. Várias proteínas são essenciais a esse mecanismo geral, se ligando a a sequências específicas (designadas de promotores) do DNA de células eucarióticas, permitindo a transcrição e tradução de proteínas importantes, sendo designadas de fatores de transcrição (ESTRUCH, 2000). Os fatores Msn2/Msn4, principais atuantes nos sistemas de transdução de sinais, encontrados não só em *S. cerevisiae*, como também em *D. bruxellensis*, podem modular a expressão de mais de 200 genes em resposta a estímulos nocivos e estão diretamente relacionados aos níveis de AMP cíclico (cAMP) e proteína quinase A (PKA). Mediante estresse, os níveis intracelulares de cAMP e a atividade da proteína quinase diminuem em sequência, o que ativa a fosforilação e o transporte dos fatores para o núcleo, onde farão o controle da síntese de genes de estresse em seus promotores (ESTRUCH, 2000; NICHOLLS et al., 2004; BLEOANCA et al., 2013).

Em geral, a resposta ao estresse pode ocorrer em três fases: inicialmente, as mudanças imediatas na célula ocorrem como consequência direta da exposição ao estresse e dano; em seguida, processos de defesa são disparados, funções celulares específicas, controle e reparação de proteínas, estabilização e reparo de DNA e cromatina, estabilização e reparo de membranas celulares, remoção de proteínas danificadas e alguns aspectos do metabolismo; e por fim, as células se adaptam e tornam a crescer (HOHMANN; MAGER, 1997; KÜLTZ, 2005; LUCENA, 2012). Neste contexto, a ideia de uma resposta geral a estresse, surge como um sistema que regula a expressão coordenada de muitos genes de estresse por meio de um elemento *cis* comum em seus promotores. Em *S. cerevisiae*, esse elemento de resposta transcricional ao estresse, ou STRE (*Stress Transcriptional Response Elements*) são motivos presentes nas sequências promotoras dos genes que respondem aos estímulos induzidos pelos agentes causadores de estresse celular (ESTRUCH, 2000). Estes mediam a expressão de um número de genes dentro do mecanismo de resposta geral ao estresse (MARTINEZ-PASTOR et al., 1996). Os STREs correspondem a cópias simples ou múltiplas da sequência de nucleotídeos CCCCT/AGGGG que servem como local de ligação dos fatores de transcrição Msn2p ou Msn4p, ativados por estresses diversos (choque térmico, osmótico, oxidativo ou mesmo, em situações de carência de nutrientes). Genes *TPS1/2* (codificam enzimas para síntese de trealose)

e *GPD1* (codifica uma enzima necessária para síntese de glicerol), são exemplos de genes regulados pelo STRE (RUIS; SCHÜLLER, 1995; TOONE; JONES, 1998; BLEOANCA et al., 2013; ZHENG et al., 2013; WANG et al., 2014).

Outro elemento de transcrição ativado pelo estresse é o elemento de choque térmico, ou HSE (*Heat Shock Element*), que são reconhecidos e ligados por proteínas de choque térmico (HSPs), a exemplo, o fator de transcrição Hsf1 (*heat shock fator protein 1*) ativado pelas altas temperaturas em conjunto com estresse etanólico, é fosforilado e levado ao núcleo, desencadeando a transcrição de genes cuja sequência promotora apresenta o elemento de choque térmico. Muitos destes fatores estão presentes na ausência de estresse, no entanto, na presença dos mesmos os genes que as codificam têm sua expressão aumentada e em muitos casos, contribuem para a tolerância celular em associação com o mecanismo de resposta geral ao estresse (ESTRUCH, 2000; ARAKI et al., 2009; NOGUCHI et al., 2011). A tolerância ao choque térmico severo está fortemente ligada ao metabolismo aeróbio e ao estresse oxidativo. Enquanto a temperatura elevada representa o primeiro impulso durante o choque térmico, como descrito acima, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) corresponde ao principal impulso secundário. *S. cerevisiae* responde ao estresse oxidativo usando vários mecanismos celulares que garantem a sobrevivência da célula após a exposição a agentes oxidantes. Dentre estes, sistemas de defesa que desintoxicam ROS, reduzem sua taxa de produção e reparam os danos causados por eles, são exemplares. (LUSHCHAK V. et al 2010; MORANO K. et al., 2012). Respostas enzimáticas (thioredoxinas, glutaredoxinas, catalases, superóxido dismutases) e não enzimáticas (glutathione, D- eritrocircídica e trealose) são outros exemplos para superar o estresse oxidativo (BLAGOSKLONNY M. 2011).

No caso de estresse osmótico, o mecanismo de síntese, ativa a via *high osmolarity glycerol* (HOG), uma via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que após acionada aumenta a expressão de genes que codificam as enzimas necessárias para a produção de glicerol em células de *D. bruxellensis*, superando a repressão mediada pela glicose (SAXENA A.; SITARAMAN R. 2016). Células de levedura não só induzem a síntese do glicerol, mas também o acumulam por possuírem transportadores específicos presentes nas suas membranas. Os transportadores Stl, não só medeiam a absorção ativa de glicerol, mas em leveduras que não são capazes de utilizar o glicerol como fonte de carbono, eles também estão envolvidos na regulação do pH intracelular (DUSKOVA et al. 2015b). Um trabalho realizado por Zeman'c'íkov' J. et al, (2018), com duas linhagens de *D. bruxellensis* oriundas da produção de vinho (CBS 2499; CBS 2796), confirmou que em *D. bruxellensis* assim como *S. cerevisiae* e

muitas outras espécies de leveduras, à indução da síntese e acumulação de glicerol sob estresse osmótico. A análise também revelou que o genoma de *D. bruxellensis* contém duas cópias de genes STL.

Por outro lado, quando as leveduras são submetidas ao estresse por etanol, elas conseguem desenvolver várias respostas moleculares para reparar os danos e proteger as estruturas celulares dos efeitos induzidos pelo etanol, a fim de reestabelecer a homeostase intracelular, e incluem a regulação da expressão gênica, remodelamento de estruturas celulares e síntese de metabólitos (YU et al., 2012; LI et al., 2012). As principais respostas da levedura *S. cerevisiae* ao estresse por etanol envolvem as proteínas do choque térmico (HSPs), bem como as chaperonas SSA e APJI, que são altamente expressas nesta condição de estresse. As HSPs pertencem à classe das chaperonas, enzimas que atuam auxiliando o enovelamento proteico, assegurando assim a conformação funcional das proteínas após os processos de desnaturação provocados pelo etanol. (MCCLELLAN et al., 2007; GONG et al., 2009; NICOLAOU et al., 2010; BLEOANCA et al., 2013). A resposta a ácidos orgânicos fracos também inclui diversos mecanismos que amenizam os efeitos negativos sobre o metabolismo celular. Os mecanismos de transformação química dos mesmos, extrusão de prótons, redução da permeabilidade de membrana plasmática, modulação da expressão gênica e possivelmente reestruturação de componentes da parede celular, são alguns exemplos (PIPER et al., 2001; SCHÜLLER et al., 2004; KAWAHATA et al., 2006; MIRA et al., 2010). Linhagens industriais de leveduras são geralmente resistentes a esse tipo de estresse, porém, mesmo assim, ele pode afetar a produção de biomassa desses organismos em aerobiose (CARRASCO et al., 2001).

Leveduras tais como as espécies pertencentes ao gênero *Brettanomyces/Dekkera* são capazes de sobreviver em boa parte das condições de estresse. Este potencial de sobrevivência se deve a mecanismos únicos de resposta a estresse que permitem que essas células sobrevivam por um período maior de tempo do que *S. cerevisiae* (NARDI et al., 2010). Em *D. bruxellensis*, pouco é conhecido acerca dos mecanismos envolvidos nos processos de resposta e adaptação às condições de estresse promovidas pelo ambiente industrial da fermentação alcoólica. Alguns genes e proteínas foram identificados e relacionados com sua capacidade de sobreviver em ambiente industrial. Esses genes são responsáveis pelo transporte da glicose, metabolismo do carbono, crescimento anaeróbico, características fermentativas, assimilação do nitrato e resposta ao estresse osmótico (NARDI et al., 2010; BRÁS, 2015; DE BARROS PITA et al., 2013a; LEITE., et al 2016). Sendo assim, do rol de leveduras que se destacam industrialmente, dentre elas *D. bruxellensis* se mostra altamente competitiva, devido a sua vasta adaptabilidade e

diversidade intraespecífica aos diferentes ambientes fermentativos e numerosos estresses, representando um modelo promissor para aplicações biotecnológicas (BLOMQUIST e PASSOTH, 2015).

Com base nos relatos acima, mais estudos relacionados a influência de fatores de estresse em *D. bruxellensis* são necessários para entender o seu potencial de aplicação industrial, bem como otimizar o processo de fermentação. Desta forma, os dados gerados no presente trabalho, podem contribuir no entendimento de como *D. bruxellensis* se estabelece e se mantém no ambiente de produção de bioetanol, sendo considerada a primeira levedura com características fisiológicas suficientes para competir com *S. cerevisiae* pelo substrato de produção a álcool combustível.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS E MEIOS DE CULTURA

Para as análises fisiológicas, foram utilizadas as linhagens industriais de *D. bruxellensis* GDB 248 (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007) e *S. cerevisiae* JP1. A manutenção das células foi realizada através de repiques em placas de Petri em meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona bacteriológica e 2% de ágar) mantendo as colônias de células frescas (LEITE et al., 2013). Para os pré-inóculos, as células foram inoculadas em frascos de 50 mL contendo meio sintético YNB (1,7 g L⁻¹ sem aminoácidos e sem sulfato de amônio) suplementado com glicose (20 g L⁻¹) e sulfato de amônio (5 g L⁻¹) a 30 °C /160 rpm por 24h com pH variando entre 4,0 a 5,0 (meio referência para os ensaios de crescimento). Para a determinação da influência de agentes estressores no metabolismo da levedura, as células foram cultivadas em meios específicos, variando as concentrações dos agentes estressores e o pH (Tabela 1).

3.2 ENSAIOS DE CRESCIMENTO EM AEROBIOSE

A fim de selecionar condições limitantes de crescimento celular, as linhagens foram submetidas a ensaios aeróbicos nos meios específicos. Após um pré-cultivo de 24 horas em meio referência, relatado no tópico acima, as células foram coletadas por centrifugação (10000 rpm/5 min), lavadas com solução salina estéril (9 g L⁻¹) para remoção de traços do meio de cultura e ressuspensas em solução salina para concentração inicial de 0,02 unidade de absorbância a 600 nm. Após essa etapa, o inóculo foi realizado em frascos de 50 mL nos meios específicos e conduzidos à estufa agitadora (Shaker refrigerada SL - 223), com agitação contínua a 150 rpm, sob a temperatura de 30 °C. Em intervalos de duas e quatro horas, coletas e leituras de OD₆₀₀ foram realizadas, até completar as 48 horas de cultivo. A fase de crescimento exponencial foi determinada a partir da porção linear da curva de crescimento no gráfico relacionando à densidade celular como $\ln(D.O._{600nm})$ com o tempo (horas) de incubação. A velocidade específica máxima de crescimento (μ , h⁻¹) foi calculada como a inclinação da linha reta através da realização de uma regressão linear. Todos os experimentos foram realizados em duplicata biológica sendo a cepa de referência *S. cerevisiae* JP1. Os dados foram analisados com o auxílio do programa Microsoft Excel® 2016.

Tabela 1. Concentração dos diferentes compostos testados nos ensaios de crescimento aeróbico com *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae*. *Com ajuste de pH (3,5) e sem ajuste.

Compostos		Concentrações													
Escassez de nitrogênio (mM)	Sulfato de amônio	2,5					7,5					75			
	Cloreto de amônio	7,5	22,5				45	67,5				75			
	Nitrato de sódio	7,5	22,5				45	67,5				75			
Escassez de carbono e estresse osmótico (g L ⁻¹)	Sacarose	5	10	20			250			300			350		
	Glicerol	5	10	20			250			300			350		
Estresse por ácidos orgânicos (g L ⁻¹)	Ácido acético *	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
	Ácido láctico *	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
Estresse etanólico	Etanol (%)	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20				
Estresse por ácido inorgânico	H ₂ SO ₄ - pH	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5
Estresse oxidativo	H ₂ O ₂ (mM)	0,5	1	1,5		2	2,5		3	3,5		4			
Estresse térmico	(°C)	30	32	34	36	38	40	42	44						

3.3 TESTE DE VIABILIDADE

A fim de verificar as células viáveis, *D. bruxellensis* GDB 248 e *S. cerevisiae* JP1 foram pré-cultivadas em meio YNB (como mencionado acima) por 24h. Após isso, as células foram inoculadas em meios contendo os agentes estressores descritos na Tabela 1. No início (tempo 0h) e no final (tempo 48h) de cada cultivo, um volume de 100 µL foi coletado de cada cultura para realização de uma diluição seriada (100 µL de amostra/900 µL de solução salina). 100 µL da diluição final foi adicionado em placas de Petri contendo YPD semeado com alça de drigalski, com posterior incubação em 30 °C por 48h. A contagem de colônias foi dada em UFC/mL, através da multiplicação dos números de colônias pelo fator de diluição específico. Os testes foram realizados em duplicata biológica, e as médias foram calculadas para cada condição de cultivo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IMPACTO DE AGENTES ESTRESSORES NO CRESCIMENTO CELULAR

4.1.1 Estresse osmótico e por escassez de nutrientes

4.1.1.1 Fontes de carbono

Para avaliar a osmotolerância de uma cepa industrial de *D. bruxellensis* GDB 248 e sua capacidade de sobreviver a condições hiperosmóticas e hipoosmóticas a partir de fontes distintas de carbono, realizamos ensaios de crescimento aeróbio, alterando concentrações de sacarose e glicerol (utilizado como um controle para estresse osmótico), focando em concentrações abaixo da utilizada em meio referência (20 g L^{-1}) e submetendo as células em altas concentrações para mimetizar os processos industriais, acima de 200 g L^{-1} . Os perfis de crescimento em baixas e altas concentrações de sacarose e glicerol foram similares, porém, contrastantes com a D.O. $_{600\text{nm}}$ final obtida em cada ensaio (Figuras 5 A, 5 B).

Nos meios suplementados com sacarose (Figuras 5 A), a adaptação das células foi superior, exibindo curta fase lag e maiores crescimentos em valores de densidade óptica em relação aos cultivos em glicerol nas mesmas condições (Figura 5 B). Destacando os cultivos com 5 e 10 g L^{-1} de ambas as fontes, as células foram afetadas com a redução de carbono no meio, diminuindo a fase *log* e precocemente estacionando o crescimento, visto pelos valores de densidade óptica reduzidos para ambas as concentrações. Em valores percentuais, comparando os números de D.O. $_{600\text{nm}}$ obtidos no cultivo com 20 g L^{-1} (concentração de meio referência), essa redução foi de 32% em sacarose e de 41% em glicerol, nas concentrações de 5 e 10 g L^{-1} .

No presente trabalho, a utilização do glicerol como única fonte de carbono, reduziu o crescimento celular em 10 vezes em relação aos valores obtidos em sacarose, nas mesmas concentrações. Isso pode ser explicado por existir uma enorme variabilidade entre as leveduras no que diz respeito à sua eficiência na utilização de glicerol como única fonte de carbono e energia. Enquanto determinadas espécies apresentam taxas de crescimento com glicerol comparáveis àquelas alcançadas com glicose como fonte de carbono; outros são virtualmente incapazes de utilizar o glicerol, especialmente em meio laboratorial sem a presença de suplementos; como aminoácidos e nucleobases (KURTZMAN et al., 2010; KLEIN et al., 2016).

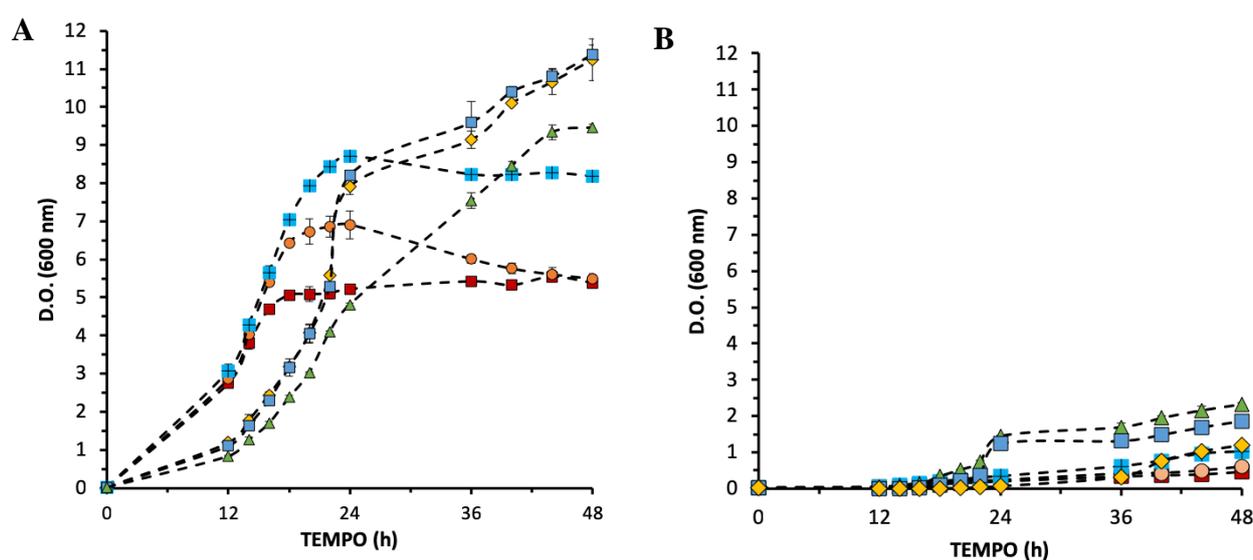


Figura 5. Cinética de crescimento aeróbio de *D. bruxellensis* GDB 248 em diferentes concentrações de (A) sacarose e (B) glicerol, em 48 horas de cultivo. 5 g L⁻¹ (Sacarose/ Glicerol - quadrado vermelho); 10 g L⁻¹ (Sacarose/ Glicerol - triângulo laranja); 20 g L⁻¹ (Sacarose/ Glicerol - cruz azul); 250 g L⁻¹ (Sacarose/ Glicerol - losango amarelo); 300 g L⁻¹ (Sacarose/ Glicerol - quadrado azul); 350 g L⁻¹ (Sacarose/ Glicerol - triângulo verde).

Lages e Lucas (1999), investigando a suplementação em meio mineral com 20 g L⁻¹ de glicerol (como única fonte de carbono) no crescimento da linhagem de *S. cerevisiae* IGC 3507, observaram crescimento lento (fase *lag* de aproximadamente três dias), com taxa de crescimento de $0,10 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$, assemelhando-se a dados encontrados no presente trabalho, na mesma concentração testada. Dados envolvendo concentrações menores que 20 g L⁻¹, tanto para glicerol quanto para sacarose como únicas fontes de carbono ainda são escassos na literatura, sendo os resultados apresentados de grande contribuição para a compreensão do comportamento da levedura *D. bruxellensis* GDB 248 em baixa disponibilidade de carbono.

As concentrações 250, 300 e 350 g L⁻¹ de sacarose proporcionaram os maiores valores de D.O._{600nm} final, com acréscimo de 39% nas concentrações de 250 e 300 g L⁻¹ em relação a referência (20 g L⁻¹ de sacarose). Curiosamente, variações entre 80 a 300 g L⁻¹ de sacarose não resultaram em alterações significativas nos valores de D.O._{600nm}, evidenciando que o excesso de açúcar no meio não altera o crescimento microbiano (PAIS et al., 2013; ZABED et al., 2014). Além disso, indica alta tolerância de *D. bruxellensis* à altas concentrações de açúcar no meio, mesmo necessitando de um tempo maior de adaptação. Um estudo fisiológico e genético, realizado por Ando et al. (2006) em meio rico YPD, testou a osmotolerância de *S. cerevisiae* BY₄₇₄₃ em sacarose e os possíveis genes envolvidos. Das concentrações testadas (0, 150, 300 e 450 g L⁻¹), apenas em 450 g L⁻¹ (D.O._{600nm} 0,2), houve um decaimento no crescimento, sendo uma concentração alta para reais condições industriais. Em relação aos aspectos genéticos, três genes (*HOG1*, *TPS1* e *GPDI*) foram identificados como envolvidos na resposta ao estresse osmótico causado por sacarose. Nesse contexto, encontramos similaridades de osmotolerância de *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae*, importante requisito no âmbito biotecnológico.

Assim como em sacarose, em glicerol, um dos maiores crescimentos também foi observado na concentração de 250 g L⁻¹, valor de D.O._{600nm} de 2,32, aumento de 129% em relação ao meio referência (20 g L⁻¹ de glicerol). Mesmo sendo observado aumento na densidade celular, mais glicerol no meio, proporcional maior tempo de adaptação para as células começarem a se multiplicar (cerca de 16, 18 e 24 horas, nas concentrações de 250, 300 e 350 g L⁻¹, respectivamente).

Em geral, *D. bruxellensis* GDB 248 se mostrou bem adaptada as condições submetidas, apresentado crescimentos reduzidos apenas mediante limitação de carbono. Por outro lado, apresentou elevadas D.O._{600nm}, por conseqüente elevação de carbono no meio, mesmo necessitando de um tempo maior para se adequar e superar um possível estresse osmótico. Mediante os estudos que abordam essas questões, a principal razão pela qual as células produzem e acumulam glicerol intracelularmente são suas propriedades protetoras contra o estresse, particularmente o hiperosmótico e térmico. Além disso, em algumas espécies de leveduras, como *S. cerevisiae* ou mesmo *D. bruxellensis*, a mudança da utilização de uma fonte fermentável para uma fonte respiratória de carbono requer uma reprogramação significativa da maquinaria celular, impossibilitando de utilizá-la eficientemente (PISKUR et al., 2006; ROBERTS; HUDSON, 2006; OLIVEIRA B. 2014; HOHMANN, 2015).

4.1.1.2 Fontes de nitrogênio

Fontes de nitrogênio no meio são importantes para o metabolismo das leveduras, crescimento e bons desempenhos em fermentações alcoólicas (GOBERT A. et al., 2017). Na presença de fontes nitrogenadas complexas, o esquema de assimilação de nitrogênio por *S. cerevisiae* é controlado pela repressão catabólica do nitrogênio (NCR). Esse mecanismo age da seguinte maneira: o amônio, uma das fontes preferidas de nitrogênio, quando presente no meio, reprime a expressão de vias metabólicas que utilizem outros compostos nitrogenados, ou seja, as fontes preferidas são utilizadas enquanto que as secundárias são reprimidas e degradadas (MAGASANIK E KAISER, 2002; BELTRAN et al., 2004). *D. bruxellensis* também possui a capacidade de assimilar diferentes fontes de nitrogênio, entre elas o amônio (fonte preferencial) e o nitrato (fonte secundária). Esta última representa um importante fator adaptativo frente a competição com *S. cerevisiae*.

Diante disso, realizamos ensaios de crescimento com *D. bruxellensis* GDB 248 e *S. cerevisiae* JP1 em meios suplementados com fontes preferenciais e pobres de nitrogênio, verificando a adaptabilidade das leveduras a diferentes compostos. Em meio contendo sulfato de amônio, ambas as leveduras apresentaram perfis de crescimento semelhantes, sendo possível constatar uma eficiência maior de *D. bruxellensis*, em relação a *S. cerevisiae*, visível nos valores de D.O._{600 nm} de cada concentração testada (Figuras 6 A, 6 B). Numericamente, essa melhor aptidão correspondeu a densidade óptica final de *D. bruxellensis* 2,25 vezes maior (D.O._{600nm} igual a 8,89) em relação ao obtido por *S. cerevisiae* JP1 (D.O._{600nm} igual a 3,95) nos meios suplementados com 75 mM de nitrogênio (concentração utilizada em meio referência), fato esse que pode estar relacionado com a disponibilidade de oxigênio no meio, uma vez que em condições aeróbicas, *D. bruxellensis* tende a direcionar o carbono para formação de biomassa, diferentemente de *S. cerevisiae*, que direciona maior parte do carbono para formação de etanol (LEITE et al., 2013). Outro aspecto observado, diz respeito à concentração mínima de nitrogênio necessária para sustentar o crescimento de *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae*. Nesse sentido, concentrações de 2,5 mM a 75 mM de nitrogênio foram capazes de sustentar o crescimento, com algumas peculiaridades.

No intuito de avaliar se a natureza da fonte de nitrogênio era capaz de alterar o crescimento de *D. bruxellensis*, nós realizamos ensaios variando a forma do sal na qual o nitrogênio era apresentado para as células. O sulfato de amônio foi utilizado como referência e foi devidamente substituído por (i) cloreto de amônio (Figura 7 A) e (ii) nitrato de sódio (Figura 7 B). A utilização do cloreto de amônio teve como objetivo avaliar o impacto da ausência de

enxofre no meio de crescimento, uma vez que as células precisam desse elemento para a produção de compostos sulfurados essenciais. A utilização do nitrato de sódio não somente impacta o fornecimento externo do enxofre como também substitui o amônio pelo nitrato, considerada uma fonte pobre de nitrogênio. Nesse sentido, nós observamos que quando o nitrogênio foi apresentado na forma de cloreto de amônio, houve pouca influência sobre o crescimento celular, o que indica que o aporte de enxofre contido no meio YNB parece ser suficiente para sustentar o metabolismo e crescimento celular (Figura 6 A).

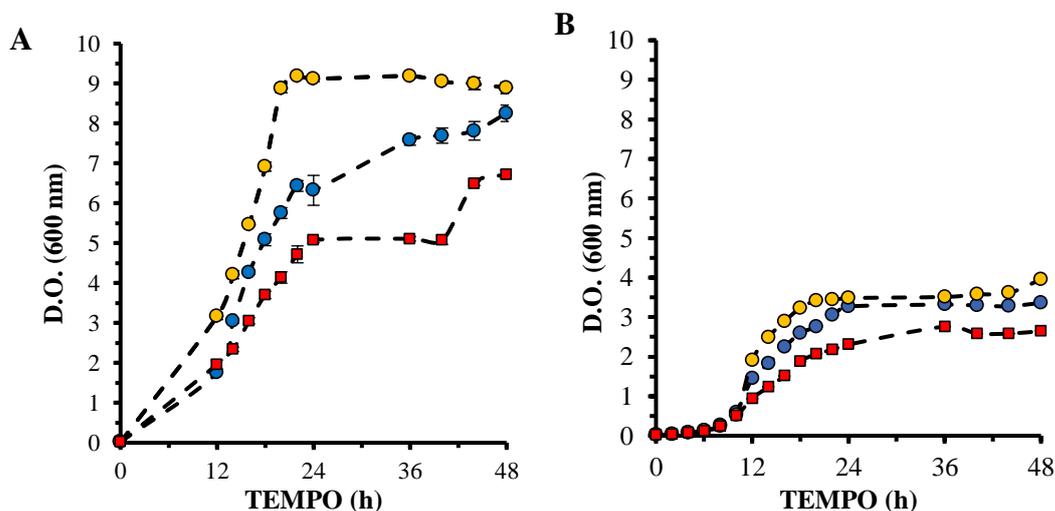


Figura 6. (A) Cinética de crescimento aeróbio de *D. bruxellensis* GDB 248 e (B) *S. cerevisiae* JP1 em diferentes concentrações de nitrogênio a partir do sulfato de amônio. Condições: 75 mM de nitrogênio (círculo laranja); 7,5 mM de nitrogênio (círculo azul); 2,5 mM de nitrogênio (quadrado vermelho).

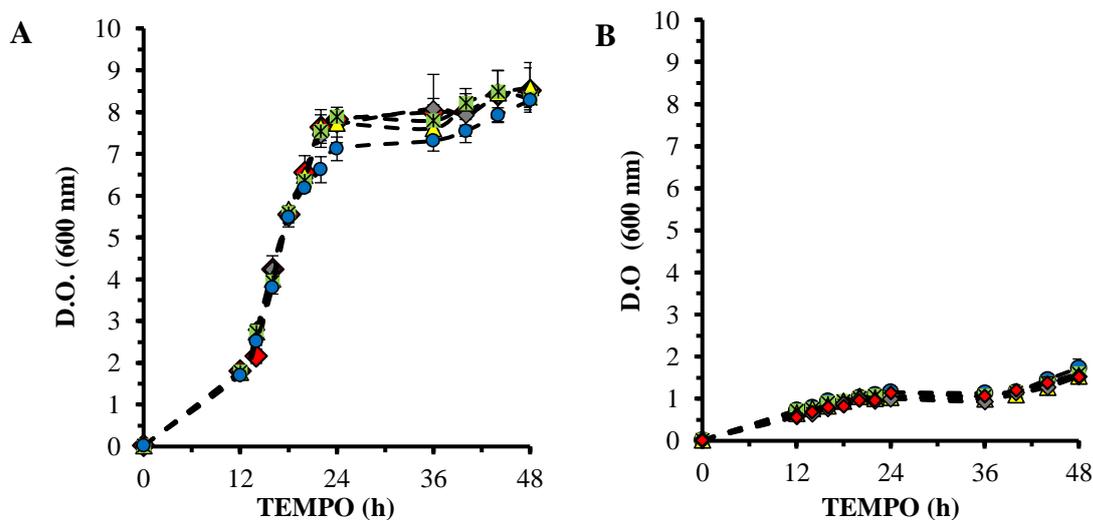


Figura 7. (A) *D. bruxellensis* GDB 248 em diferentes concentrações de nitrogênio a partir do cloreto de amônio e (B) nitrato de sódio. Condições: 75 mM de nitrogênio (Cloreto de amônio/ Nitrato - losango vermelho); 67,5 mM de nitrogênio (Cloreto de amônio/ Nitrato - losango cinza escuro); 45 mM de nitrogênio (Cloreto de amônio/ Nitrato - triângulo amarelo); 22,5 mM de nitrogênio (Cloreto de amônio/ Nitrato - asterisco verde claro); 7,5 mM de nitrogênio (Cloreto de amônio/ Nitrato - círculo azul).

Por outro lado, quando o sulfato de amônio foi substituído pelo nitrato de sódio, o crescimento celular foi bastante reduzido (Figura 7 B), cerca de 80% menor para todas as concentrações utilizadas, em comparação aos valores obtidos com os da referência e uma extensão de fase *lag* (Figura 7 B). Esta observação provavelmente ocorre devido à alta demanda energética para a assimilação dessa fonte de nitrogênio, que não só suporta um crescimento mais lento, como também promove um menor consumo de açúcar e produz menos etanol em comparação ao meio contendo amônio, como observado no trabalho de De Barros Pita et al. (2013b) em diferentes fontes de carbono e limitação de oxigênio.

4.1.2 Estresse por ácidos inorgânicos

As fermentações de etanol combustível não são realizadas sob condições assépticas, permitindo que leveduras e bactérias nativas permaneçam no tanque de fermentação, especialmente bactérias do gênero *Lactobacillus*, o que reduz o rendimento e pode levar a fermentações improdutivas. A utilização do tratamento ácido entre os ciclos do processo é uma prática comum (ácido sulfúrico diluído em água, ajustado para pH 2,0 – 2,5), e reduz o número de *Lactobacillus fermentum* de 10^7 a 10^4 CFU por ml, no entanto, as mudanças nos valores de pH também afetam significativamente a viabilidade da levedura, a taxa de fermentação e a formação de subprodutos (LUCENA et al., 2015; LOPES et al., 2016; COSTA et al., 2017).

A capacidade de crescer e tolerar ambientes com baixo pH também tem sido investigada para linhagens de *D. bruxellensis*. Sendo assim, células de *D. bruxellensis* GDB 248 foram inoculadas em meios com diferentes valores de pH, ajustados com ácido sulfúrico. As células de *D. bruxellensis* não resistiram aos meios com valores de pH 1,0 e 1,5. Como pode ser visto na Figura 7, em meio com pH ajustado para 2, mesmo não apresentando curva de crescimento, as células se mostraram viáveis (dados não mostrados), com D.O._{600nm} de $\cong 0,65$.

A partir do pH 2,5, foi possível observar um aumento considerável nos crescimentos (Figura 8 B), o que também é observado em outras linhagens de *D. bruxellensis* em meio com pH 2,5 (CONTERNO et al. 2006). A resistência à baixos valores de pH é bem estudada em *S. cerevisiae* (CHEN et al. 2009; LUCENA et al. 2012, 2015). Nessa levedura, as linhagens BY₄₇₄₁ (parental), o mutante *slt2Δ* (em meio YPD) e a linhagem industrial JP1 (meio YNB) não foram capazes de crescer em pH 2,0; efeito também relatado por Della-Bianca, (2014) e colaboradores, enquanto se analisava a hidrólise de sacarose em uma linhagem de *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D. Em pH 2,5 foi observada uma redução de 70% do crescimento da linhagem parental, enquanto que não houve crescimento na mutante. Nesse mesmo pH, a

linhagem industrial JP1, apresentou crescimento próximo ao observado em pH 6,0, reforçando a ideia de maior poder adaptativo de linhagens industriais.

Em um recente trabalho, Dong, et al. (2017) também encontrou resultados semelhantes ao analisar a viabilidade celular e degradação mitocondrial em células de *S. cerevisiae* sob diferentes níveis de pH, ajustados com HCl. No qual, não foi observado diferença significativa na sobrevivência celular com o pH da cultura entre 3,0 a 6,0, mas um declínio acentuado na viabilidade celular a níveis de pH extracelular de 2,0 – 2,5. Dessa forma, analisando a variância dos valores de pH na determinação do crescimento, pode-se dizer que *D. bruxellensis* GDB 248, no que diz respeito a crescimento em baixos valores de pH apresenta tolerância similar a *S. cerevisiae* JP1. No entanto, os mecanismos biológicos que levaram à adaptação da levedura *D. bruxellensis* GDB 248 a condições ácidas permanecem pouco conhecidos, e se esses mecanismos são semelhantes para a tolerância aos ácidos orgânicos ainda é algo a ser explorado.

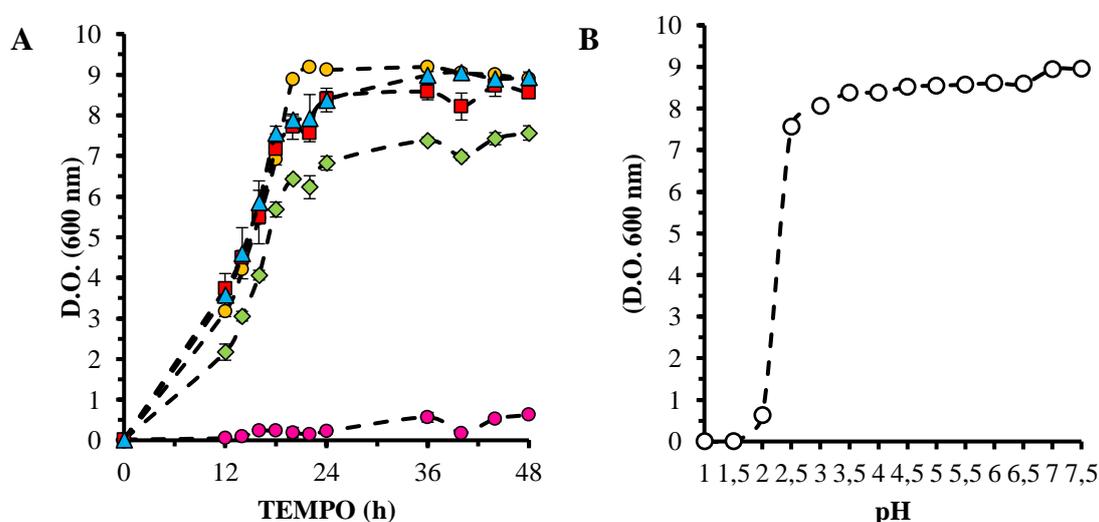


Figura 8. (A) Cinética de crescimento aeróbio de *D. bruxellensis* GDB 248 em diferentes faixas de pH em 48 horas de cultivo. Referência (círculo laranja); pH 2,0 (círculo rosa); pH 2,5 (losango verde); pH 5,0 (quadrado vermelho); pH 7,0 (triângulo azul). (B) Valores de D.O._{600 nm} com 48 horas de cultivo em função do pH.

4.1.3 Estresse por ácidos orgânicos

Apesar de as leveduras *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* suportarem baixos valores de pH influenciados pela adição de ácidos inorgânicos, a presença de ácidos orgânicos no meio industrial também é algo prejudicial. Em valores baixos de pH esses ácidos são tóxicos, pois a sua forma não dissociada difunde-se livremente no citoplasma da célula, onde se dissocia (devido ao pH mais elevado do citoplasma) e o acidifica (NARENDRANATH et al., 2001).

Além disso, a acumulação da forma aniônica do ácido após a dissociação também resulta em uma quantidade considerável de toxicidade (ABBOTT et al., 2008). Assim, as células empregam um sistema de efluxo de prótons para manter a homeostase intracelular, gastando ATP e conseqüentemente comprometendo o crescimento celular (ZHOU et al., 2011). Os ácidos orgânicos frequentemente encontrados em ambientes fermentativos são o láctico e o acético, que de certa forma atuam ocasionando estresse ácido e oxidativo nas células de leveduras.

Com o objetivo de analisar a influência desses compostos na fisiologia de *D. bruxellensis* GDB 248 e *S. cerevisiae* JP1, concentrações de 1 a 10 g L⁻¹ desses ácidos foram testadas, revelando perfis diferenciados e maiores valores de D.O._{600nm} quando os meios foram ajustados para pH 3,5 (Figuras 9 A, 9 B, 9 C e 9 D). O ácido acético é um potente inibidor da capacidade de crescimento e fermentação das leveduras, sendo facilmente produzido por bactérias contaminantes. Nos meios suplementados com esse ácido, *D. bruxellensis* mostrou-se sensível à crescente exposição, acarretando variações nas curvas de crescimento, denotadas pelas reduções de 25% de queda na biomassa final em meios com 1 g L⁻¹ (16,6 mM), 60% em 2 g L⁻¹ (33,3 mM) e 100% em 3 g L⁻¹ (49,9 mM), com base no meio referência (Figura 9 A). Como esperado, para superar o estresse, as células exibiram extensas fases *lag*, e lentas velocidades de crescimento, em torno de 0,1 h⁻¹.

S. cerevisiae JP1, além de apresentar declínios gradativos e menos acentuados nos perfis de crescimento do que *D. bruxellensis*, tolerou uma concentração de 7 g L⁻¹ do ácido, estagnando o crescimento somente quando submetida a 8 g L⁻¹ (99,9 mM de ácido acético no meio) (Figura 9 B). Esses dados obtidos estão de acordo com um estudo anterior de Thomas e colaboradores, (2002), que relatou uma maior tolerância de *S. cerevisiae* aos efeitos do ácido acético, apresentando inibição em 10 g L⁻¹ sem ajuste de pH. Um fenômeno semelhante foi observado por Swinnen, et al. (2014), ao investigar quatro linhagens de *S. cerevisiae*, no qual, ocorreu a ampliação da fase *lag* a medida que se aumentava a concentração de ácido no meio, perdurando 44 horas na exposição a 9 g L⁻¹ com pH ajustado para 4,5. Dados de análises transcriptômicas e metabolômicas, realizado por Dong, et al. (2017) em espécies de *S. cerevisiae* sob severo estresse com ácido acético (150 mM, pH 3,0), desvendaram vários danos que são acometidos as células, dentre eles: a acidificação intracelular na matriz citoplasmática e mitocondrial; a inibição da absorção de nutrientes, de permeases e transportadores; a redução da biossíntese de aminoácidos e do metabolismo de carboidratos; a desnaturação de grandes quantidades de proteínas e estruturas celulares e desajustes no

ciclo celular, são algumas irregularidades que explicam a redução no crescimento e a provável morte celular, sob a exposição ao ácido acético, dependendo do pH do meio.

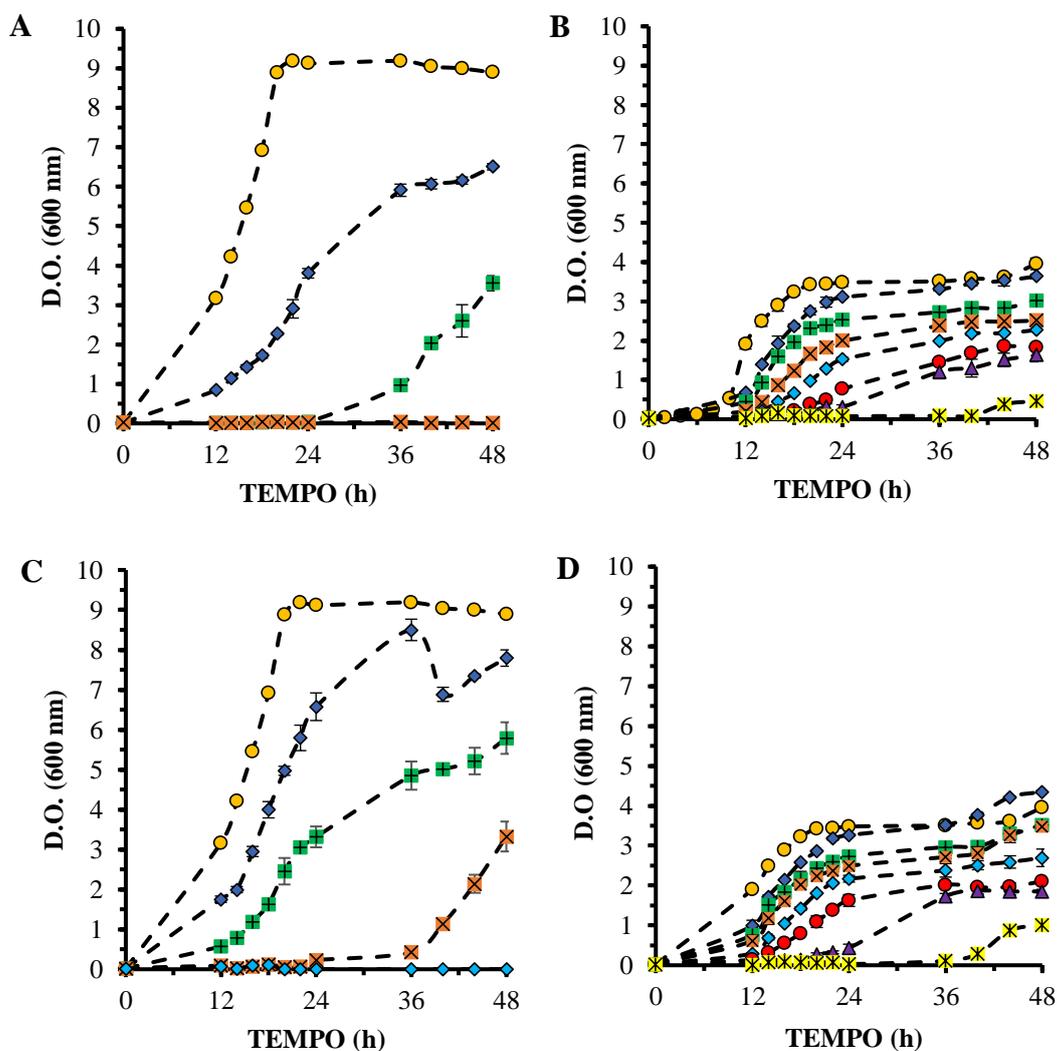


Figura 9. (A) Cinética de crescimento aeróbio de *D. bruxellensis* GDB 248 e (B) *S. cerevisiae* JP1, em meios com diferentes concentrações de ácido acético sem ajuste de pH e (C) Cinética de crescimento aeróbio de *D. bruxellensis* GDB 248 e (D) *S. cerevisiae* JP1, em meios com diferentes concentrações de ácido acético com ajuste de pH para 3,5. Condições: Referência (bola laranja); 1 g L⁻¹ de acetato (losango azul escuro); 2 g L⁻¹ de acetato (cruz verde escuro); 3 g L⁻¹ de acetato (xis laranja escuro); 4 g L⁻¹ de acetato (losango azul claro); 5 g L⁻¹ de acetato (bola vermelha); 6 g L⁻¹ de acetato (triângulo roxo) e 7 g L⁻¹ de acetato (asterisco amarelo).

Com o intuito de analisar a influência do pH inicial e consequente estado de dissociação dos ácidos sobre o metabolismo celular, o pH de cada condição foi ajustado para 3,5, abaixo do valor de pKa dos dois ácidos (Figuras 9 C, 9 D). Com o ajuste, uma menor proporção dos ácidos estará na forma não dissociada, capaz de entrar na célula. À vista disso, um aumento na D.O._{600nm} e redução de fase *lag* foi constatado para todas as concentrações e para ambas linhagens (Figuras 9 e 10). Em *D. bruxellensis*, esse acréscimo no crescimento é ainda mais

notório, já que a condição de 3 g L^{-1} , antes sem apresentar nenhum crescimento, passa a exibir valor de $D.O_{600\text{nm}}$ final de 3,32, semelhante a *S. cerevisiae*, sinalizando que o ajuste do pH é mais benéfico para *D. bruxellensis* do que para *S. cerevisiae*. Do mesmo modo, Thomas e colaboradores, (2002), utilizando uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* em meios ajustados para pH 4,5, e suplementados com ácido acético a concentração de 167 mM, antes inibitória para as células, passou a apresentar um crescimento 2,3x maior que na mesma condição sem ajuste, sugerindo que a toxicidade ácida é agravada no meio a um pH mais baixo. Essas informações deixam claro o quanto ainda é preciso desvendar os efeitos desse ácido na fisiologia e na genética da levedura *D. bruxellensis*, a fim de melhor entender a sua tolerância e desvendar as respostas celulares causadas por exposição a esse composto.

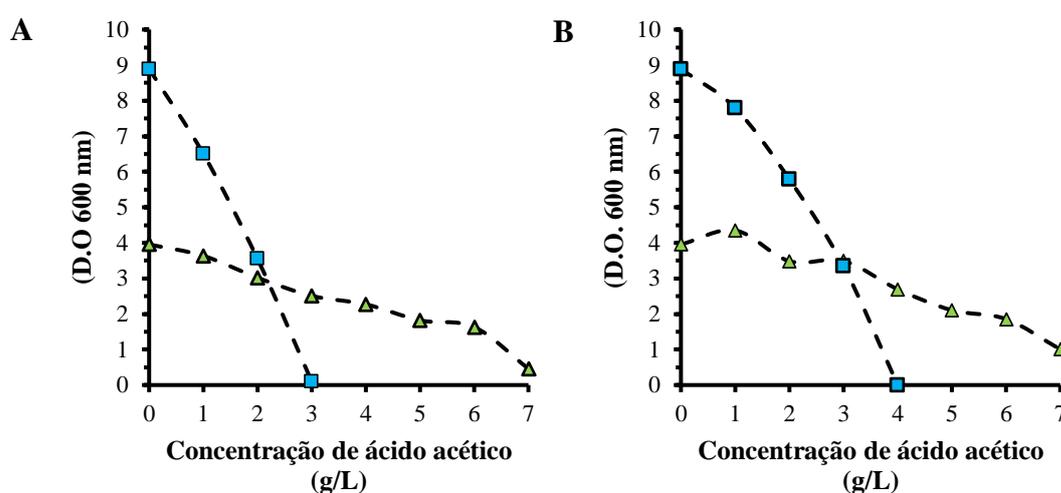


Figura 10. Valores de $D.O_{600\text{nm}}$ em função da concentração de ácido acético (g/L) em *D. bruxellensis* GDB 248 (quadrado azul claro) e *S. cerevisiae* JP1 (triângulo verde); (A) sem ajuste de pH, (B) com ajuste de pH para 3,5.

Diferentemente dos cultivos em ácido acético, nos meios com a presença de ácido láctico, *D. bruxellensis* apresentou maior tolerância do que *S. cerevisiae*, crescendo inclusive mais do que na condição referência, quando cultivada nas concentrações de 3 g L^{-1} a 7 g L^{-1} de ácido no meio. Tanto em *D. bruxellensis* quanto em *S. cerevisiae*, o aumento da fase lag foi associado com o aumento da concentração de ácido no meio, sendo *D. bruxellensis* menos afetada do que *S. cerevisiae*, visto que na concentração de 10 g L^{-1} seu crescimento caiu apenas 12%, enquanto *S. cerevisiae* apresentou redução de 72%, comparado ao meio controle (Figuras 11 A, 11 B e 12 A). Com diferenciada metodologia e utilizando as mesmas linhagens do presente estudo, dados de Fonseca (2017), confirmam um bom crescimento de *D. bruxellensis* na presença de ácido láctico até a concentração de 14 g L^{-1} , sendo apenas em 20 g L^{-1} a

concentração mínima inibitória para a levedura. Por outro lado, o crescimento de *S. cerevisiae* JP1 foram semelhantes ao meio referência, suportando 20 g L⁻¹ do ácido no trabalho citado, com mínimas alterações, sendo divergente ao encontrado nos resultados citados acima.

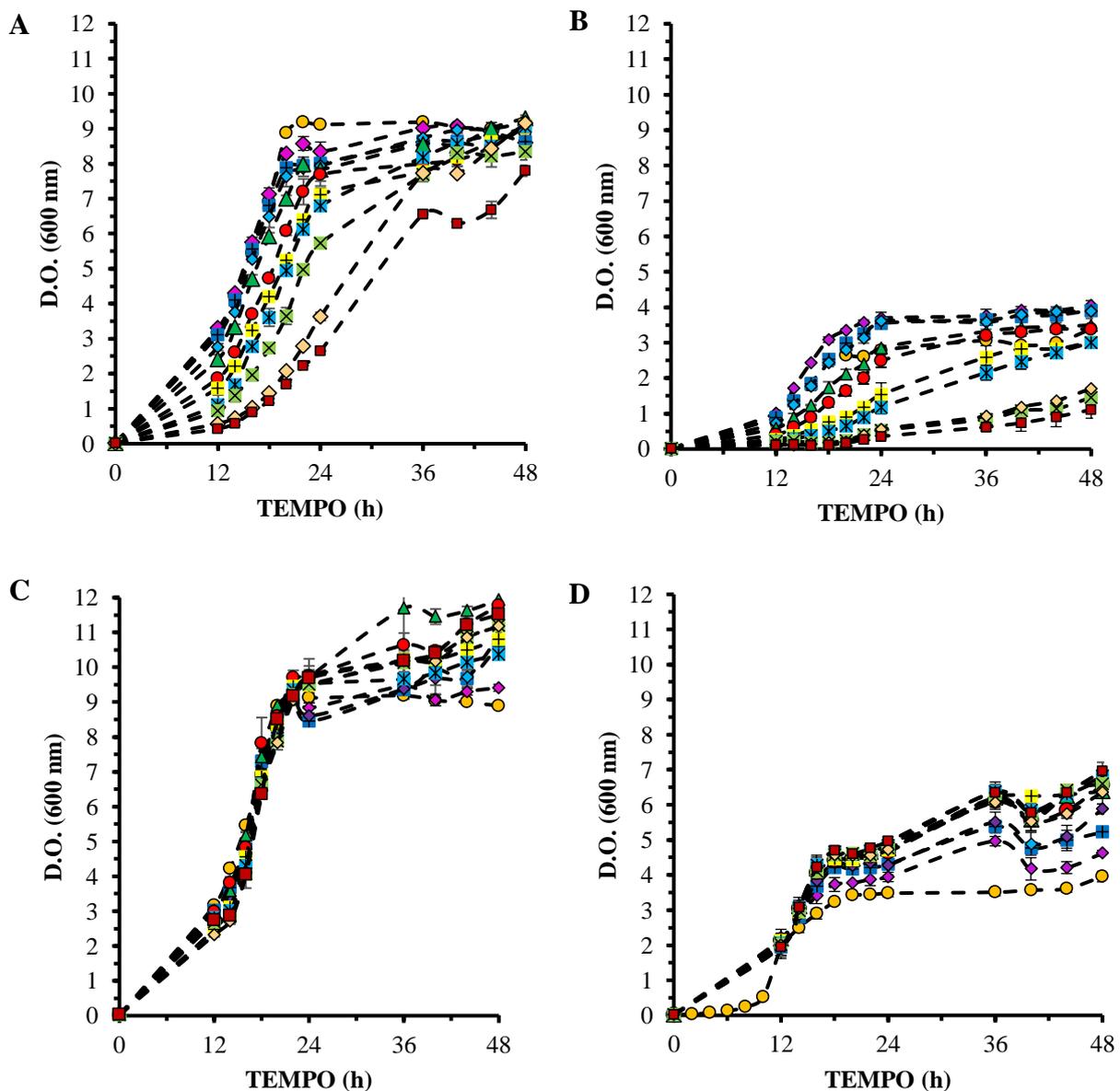


Figura 11. (A) Cinética de crescimento aeróbio de *D. bruxellensis* GDB 248 e (B) *S. cerevisiae* JP1, em meios com diferentes concentrações de ácido láctico sem ajuste de pH e (C) Cinética de crescimento aeróbio de *D. bruxellensis* GDB 248 e (D) *S. cerevisiae* JP1, em meios com diferentes concentrações de ácido láctico com ajuste de pH para 3,5. Referência (círculo laranja); 1 g L⁻¹ de ácido láctico (losango roxo); 2 g L⁻¹ de ácido láctico (cruz azul escuro); 3 g L⁻¹ de ácido láctico (losango azul claro); 4 g L⁻¹ de ácido láctico (triângulo verde escuro); 5 g L⁻¹ de ácido láctico (círculo vermelho); 6 g L⁻¹ de ácido láctico (círculo vermelho); 7 g L⁻¹ de ácido láctico (asterisco azul claro); 8 g L⁻¹ de ácido láctico (xis verde claro); 9 g L⁻¹ de ácido láctico (losango bege claro); 10 g L⁻¹ de ácido láctico (quadrado vermelho escuro).

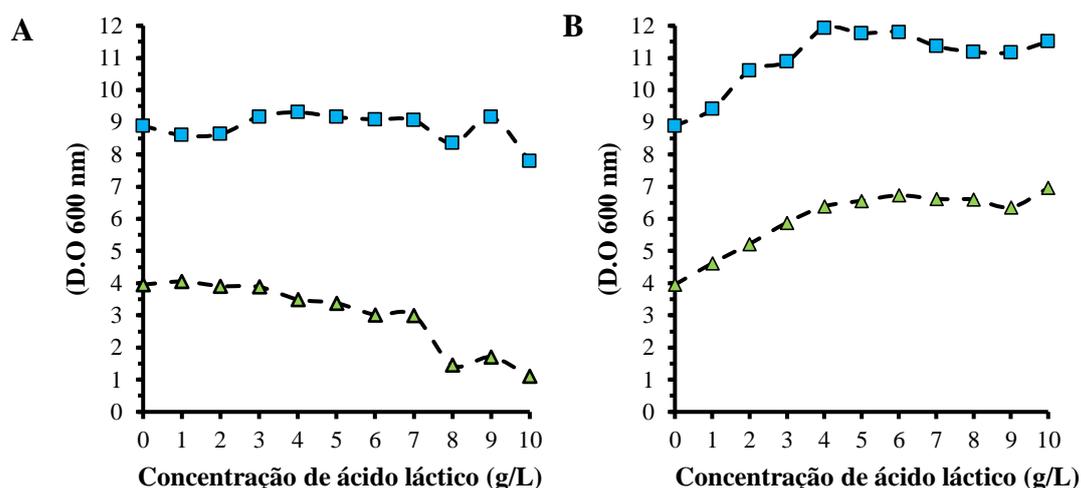


Figura 12. Valores de D.O._{600nm} final em relação a concentração de ácido láctico (g/L) em *D. bruxellensis* GDB248 (quadrado azul claro) e *S. cerevisiae* JP1 (triângulo verde); (A) sem ajuste de pH e (B) com ajuste de pH para 3,5.

Há evidências da presença de interações mutualísticas entre bactérias produtoras de ácido láctico e leveduras, em ambiente industrial, sendo algo que pode ser considerado, ao observar a melhor resposta de *S. cerevisiae* no cultivo com o ácido láctico. Essa interação pode ocorrer da seguinte maneira; bactérias tipo *Lactobacillus* produzem o ácido que subsequente é consumido por leveduras *S. cerevisiae* na presença de oxigênio, influenciando no seu crescimento; e as leveduras produzem fatores de crescimento estimulantes para as bactérias, a exemplo o CO₂. Fato esse, estabelecido em fermentações de alimentos, necessitando de um melhor entendimento em fermentações alcoólicas industriais (CHEIRSILP et al., 2003; SIEUWERTS S. et al., 2018).

Nos meios com pH ajustado para 3,5, a fase *lag* pareceu curta ou ausente, sem ligação com o aumento da concentração do ácido no meio (Figuras 11 C, 11 D). Tanto para *D. bruxellensis*, quanto para *S. cerevisiae*, os perfis foram semelhantes. Até a condição com 4 g L⁻¹, foi observado um crescimento gradativo e a partir de 5 g L⁻¹ o aumento do lactato não influenciou o aumento da biomassa final (Figura 12 B). Para *S. cerevisiae*, o ajuste do pH foi ainda mais favorável, em 10 g L⁻¹ por exemplo, a biomassa final aumentou aproximadamente 6x, comparando com a condição de 10 g L⁻¹ sem ajuste, e em *D. bruxellensis*, apenas 1,5x. Através de dados da literatura foi constatado que *S. cerevisiae* sofre um declínio em seu crescimento em 25 g L⁻¹ de ácido láctico no meio, enquanto *D. bruxellensis* em 16 g L⁻¹, em meios ajustados para pH 4,5. Assim como ocorreu nos meios com ácido acético, esses dados confirmam os efeitos positivos do ajuste do pH para um valor que minimize os efeitos do ácido no meio (NARENDRANATH et al., 2001; THOMAS et al., 2002).

Além do ajuste do pH proporcionar uma melhora no perfil de crescimento, outro fator pode ser levado em consideração já que os ensaios foram desenvolvidos em aerobiose. Em condições aeróbicas a levedura *S. cerevisiae* pode utilizar ácidos orgânicos (como ácido acético e ácido láctico) de cadeia curta, como fontes de carbono, envolvendo a indução de determinadas vias anabólicas, enzimas e mecanismos de transporte específicos quando a glicose no meio é insuficiente. Na presença de glicose, as leveduras são reprimidas de absorver os ânions desses ácidos, se difundindo para dentro das células devido ao maior pH intracelular e assim acidificando o citoplasma (THOMAS et al., 2002).

Apesar do ajuste de pH restaurar o crescimento em *D. bruxellensis* e diminuir a fase *lag*, nenhum efeito significativo foi observado nas velocidades de crescimento, uma vez que apresentaram poucas variações. Em contrapartida, o ajuste no pH foi responsável pelo aumento das taxas em *S. cerevisiae*, principalmente quando as células foram expostas as concentrações mais elevadas.

4.1.4 Estresse oxidativo

Devido à sua facilidade de uso, incluindo solubilidade em água e estabilidade relativa, o peróxido de hidrogênio é o mais utilizado como modelo de condição de estresse oxidativo. É uma molécula ubíqua formada como um subproduto da respiração aeróbia, após a exposição a diversos fatores biológicos e ambientais. Vários estudos apoiam um papel duplo do H₂O₂ nos sistemas biológicos. Seus efeitos podem ser considerados benéficos ou nocivos, dependendo não apenas da sua concentração, mas também do estado fisiológico que a célula se encontra. Em altas concentrações causa estresse, com dano oxidativo às estruturas celulares, como; lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, levando potencialmente à morte celular; enquanto que em baixas concentrações, participa como molécula de sinalização na regulação de muitos processos biológicos. Sistemas enzimáticos, incluindo catalases, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, participam das defesas primárias que funcionam para neutralizar esse composto (GIBSON et al., 2008; LUDOVICO P, BURHANS W. 2014; SEMCHYSHYN, 2014; BLEIER L. et al., 2015). Ensaando o efeito do estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em *D. bruxellensis* GDB 248 e *S. cerevisiae* JP1, foram observados perfis de tolerância distintos em crescimento em frascos agitados e maior tolerância de *D. bruxellensis* GDB 248 em teste de viabilidade.

Meios contendo até 2 mmolar de H_2O_2 em cultivos com *S. cerevisiae*, resultaram em redução de 8% no crescimento. Em *D. bruxellensis*, acréscimos de 1 e 2 mmolar de H_2O_2 resultaram em queda na biomassa final de 12% e 37%, respectivamente. Em ambas as leveduras foi observada extensa fase *lag*; em *S. cerevisiae*, nas concentrações de 1 e 2 mmolar de H_2O_2 , a fase *lag* perdurou 12 e 24 horas, respectivamente; em *D. bruxellensis*, um tempo maior foi necessário, iniciando o crescimento com 24 horas e 36 horas de cultivo, respectivamente. No entanto, na concentração de 3 mmolar, ambas as leveduras apresentaram redução de praticamente 100% nos crescimentos em 48 horas de cultivo, sendo entre 2 e 3 mmolar a concentração que inibe o crescimento das leveduras (Figuras 13 A, 13 B).

Corroborando com nossos resultados, o estudo de Vázquez, J. et al., 2017, induziu a 2 mM de H_2O_2 células de *S. cerevisiae* em diferentes estágios de crescimento: fase inicial exponencial (6 h), estacionária inicial (16 h) e estacionária tardia (30 h). Quando o estresse foi aplicado, o crescimento celular foi altamente afetado, apresentando uma fase *lag* mais longa, maior tempo de geração e menor concentração final de células. Curiosamente, o efeito do estresse sobre as células foi maior nas fases inicial exponencial (6 h) e estacionária (16 h) do que na fase exponencial tardia (30 h), o que é pertinente com nossos achados, sendo explicado esse crescimento tardio, como um período de preparação, até se desenvolver mecanismos de defesa para resistir aos oxidantes.

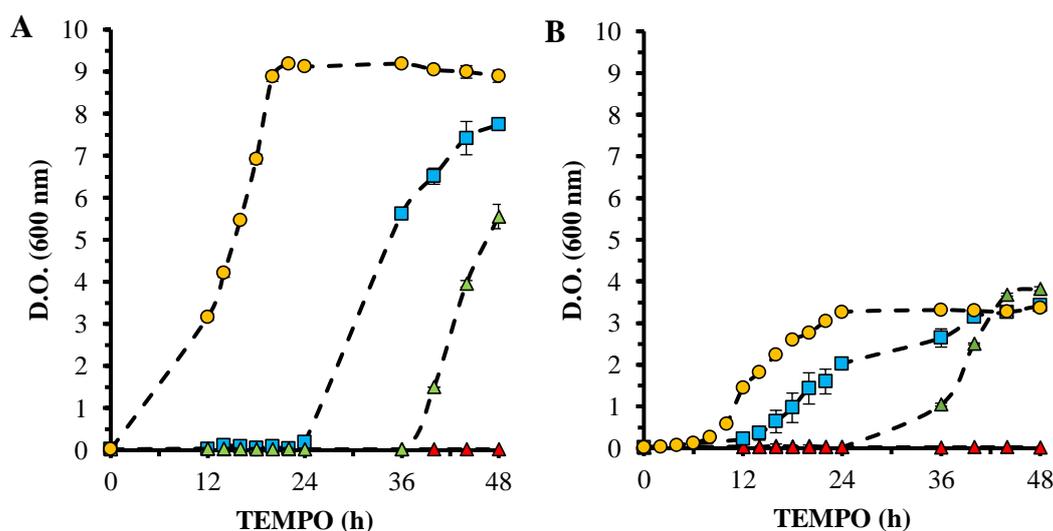


Figura 13. (A) Cinética de crescimento aeróbico de *D. bruxellensis* GDB 248 e (B) *S. cerevisiae* JP1 em peróxido de hidrogênio (mmolar) com 48 horas de cultivo. Condições: Referência (círculo amarelo); 1 mM de H_2O_2 (quadrado azul); 2 mM de H_2O_2 (triângulo verde); 3 mM de H_2O_2 (triângulo vermelho).

Para verificar se as células ainda estavam viáveis na concentração de 3 mmolar, foram realizados experimentos de viabilidade celular. *D. bruxellensis* foi a linhagem mais resistente,

tolerando até 6 mmolar de H₂O₂, mesmo sem aparentar crescimento no cultivo em frasco na mesma condição. Por outro lado, a concentração de 4 mmolar foi letal as células de *S. cerevisiae*. A sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio também foi determinada por Spenser J. et al. (2014) em experimento de viabilidade com *S. cerevisiae* NCYC 2592 utilizando placas com meios YPD e YNB. Concentrações de 0 - 5 mM de H₂O₂ foram testadas aerobicamente. Em YPD, as células foram inibidas em 5 mM, já em YNB, a sensibilidade aumentou em 2,5 mM, além de extensa fase *lag*, corroborando com nossos dados em meio YNB.

O estresse oxidativo induzido pela produção de radicais livres como consequência do metabolismo celular é uma realidade nos processos industriais pelas células serem reutilizadas durante várias fermentações subsequentes, com exposição ao oxigênio do ambiente. De acordo com os resultados descritos, a concentração de 1 mmolar já é considerada prejudicial não só para as células em si, como também para o processo de produção de bioetanol em geral, que requer maior produção em menor tempo, levando em consideração que o estresse oxidativo pode ocasionar redução na viabilidade, acumulação de glicerol e diminuição na produção do biocombustível.

4.1.5 Estresse etanólico

Muitos estudos relatam a alta toxicidade do etanol durante sua produção nos processos fermentativos, sendo um dos fatores decisivos para a viabilidade celular, a taxa de crescimento e a taxa de fermentação, acarretando efeitos ainda mais danosos em conjunto com outros estresses presentes no meio. Visando analisar a toxicidade do etanol na fisiologia de *D. bruxellensis* GDB 248 e *S. cerevisiae* JP1, concentrações que variaram de 2% a 20% (v/v) foram testadas, com objetivo de determinar a concentração mínima inibitória de crescimento (CMI).

De acordo com os dados obtidos, as linhagens apresentaram extensa fase *lag*, proporcional ao aumento da concentração de etanol no meio, conforme a figura 14. Em 2% de etanol a D.O._{600nm} final de *D. bruxellensis* foi levemente maior quando comparada ao meio referência (0% de etanol), enquanto que nas concentrações 4% e 6%, as quedas no crescimento foram de aproximadamente 38% e 89%, respectivamente, quando comparado ao meio referência (Figura 14). Em *S. cerevisiae*, o declínio nos crescimentos foi proporcional ao aumento da concentração, no entanto, os valores de D.O._{600nm} não se distanciaram muito como os de *D. bruxellensis* (Figuras 14 A, 14 B). Nossas observações explicam essas quedas no crescimento, em decorrência do potencial tóxico do etanol na integridade das células, alterando estruturas mitocondrias, reduzindo os níveis de ATP; favorecendo a geração de acetaldeído e

espécies reativas de oxigênio (ROS), afetando severamente a fisiologia das células em vários níveis (CONTERNO, et al., 2006; YANG, et al., 2012 ; MA, et al., 2013; BÜCKER, et al., 2014).

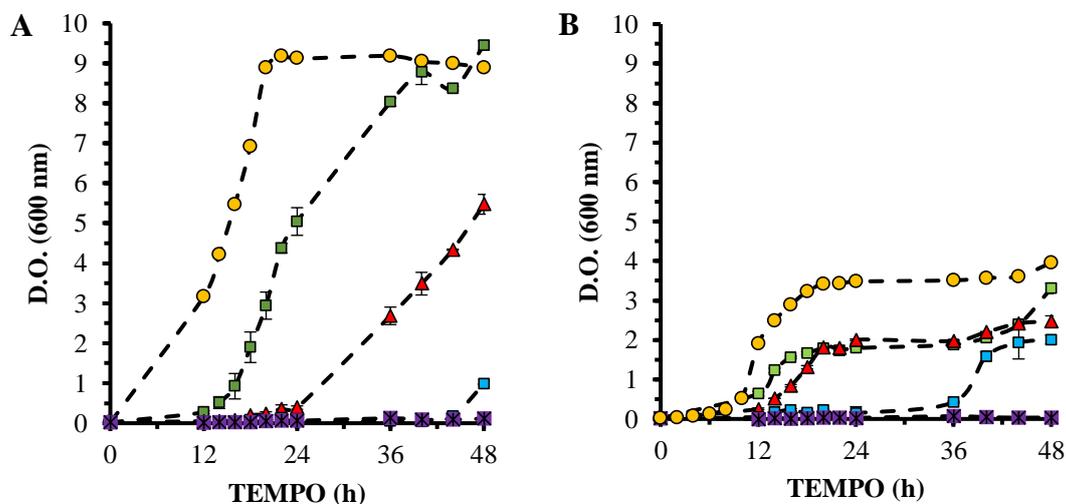


Figura 14. (A) Cinética de crescimento aeróbio de *D. bruxellensis* GDB 248 e (B) *S. cerevisiae* JP1 em etanol com 48 horas de cultivo. Concentrações de etanol: Referência (círculo amarelo); 2% de etanol (losango verde); 4% de etanol (triângulo vermelho); 6% de etanol (quadrado azul); 8% de etanol (asterisco fechado lilás).

Em ambas as espécies de leveduras, a concentração de 8% de etanol foi suficiente para inibir o crescimento, ou pelo menos não permitir que uma curva de crescimento característica fosse formada. Para verificar se as células ainda estavam vivas, testes de viabilidade foram realizados ampliando as concentrações de etanol, até se chegar na concentração letal as leveduras. Em *D. bruxellensis*, a concentração letal foi realmente no cultivo em 8% (v/v) de etanol, já em *S. cerevisiae*, quando submetida a 14% (v/v). Dados semelhantes foram relatados em um estudo feito por Mukherjee et al. (2017), utilizando placas com meio YPD e concentrações de etanol de 5% - 15% em 82 linhagens de leveduras, dentre elas, *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*. A linhagem de *S. cerevisiae* além de ter sido mais tolerante do que *D. bruxellensis*, sobressaiu todas as espécies testadas, suportando aproximadamente 13-14% de etanol. Outras espécies dentro do gênero *Brettanomyces*, como *B. anomala* e *B. naardenensis* não cresceram em mais de 12% de etanol. Ainda nessa direção, o trabalho de Bassi et al. (2013), também verificou que a adição de 13% de etanol ao tratamento com ácido HCl (pH 2,0), não causou efeito prejudicial sobre a linhagem industrial, *S. cerevisiae* PE – 2, entretanto, foi suficiente para controlar o crescimento de leveduras *Dekkera bruxellensis*.

Mesmo apresentando uma menor resistência ao etanol em comparação a linhagem industrial de *S. cerevisiae* JP1, pode-se dizer que *D. bruxellensis* GDB248 é uma linhagem

sobrevivente ao processo de produção de biocombustível, por serem submetidas industrialmente concentrações em torno de 6% (v/v) de etanol, corroborando com esses resultados e dados de Pereira et al. (2012).

4.1.6 Estresse térmico

Rotineiramente, as temperaturas utilizadas para o crescimento de leveduras variam entre 25 e 30 °C (BELLOCH et al., 2008). Em temperaturas de crescimento abaixo ou acima do ideal, leveduras *S. cerevisiae* ativam mecanismos de proteção transcricional e fisiológica, associados a mudanças extensas na fosforilação de proteínas; regulação do ciclo celular e morfogênese; reorganização do citoesqueleto; processamento e regulação de ribossomos; regulados diferencialmente sob estresse térmico (KANSHIN, E. et al., 2015). Em relação a produção de etanol, a temperatura pode passar de 30 °C e alcançar 35 °C, causando respostas diferenciadas nas células de levedura. Dessa forma, linhagens de *D. bruxellensis* GDB 248 e *S. cerevisiae* JP1 foram submetidas ao crescimento em temperaturas que variaram dos 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 aos 44 °C, diversificando as fontes de carbono em sacarose e glicose. Os perfis de crescimento de ambas leveduras apresentaram similaridades, porém, nas elevadas temperaturas a tolerância se diferiu.

Analisando o crescimento, em 38 °C, *D. bruxellensis* apresentou D.O._{600nm} final semelhante a temperatura de 30 °C (temperatura utilizada em todos os ensaios anteriores), demonstrando uma boa tolerância as variações de temperatura. Em 40 °C entretanto, observou-se queda de aproximadamente 32% no crescimento, diferente de *S. cerevisiae*, que a partir dos 38 °C já foi possível visualizar queda de 19% na D.O._{600nm} em 40 °C de 50%, refletindo maior sensibilidade em relação a *D. bruxellensis* (Figura 15 A, B). As mudanças de temperatura podem afetar uma variedade de processos celulares, incluindo taxa de tradução de proteínas, fluidez da membrana, estabilidade do RNA, atividade de enzimas, circunstâncias que podem ter elevado o impacto no crescimento das leveduras aqui testadas, como também acarretar reduções nos rendimentos etanólicos no processo de fermentação industrial e na qualidade dos subprodutos (SALVADO et al., 2011; LEE et al., 2012).

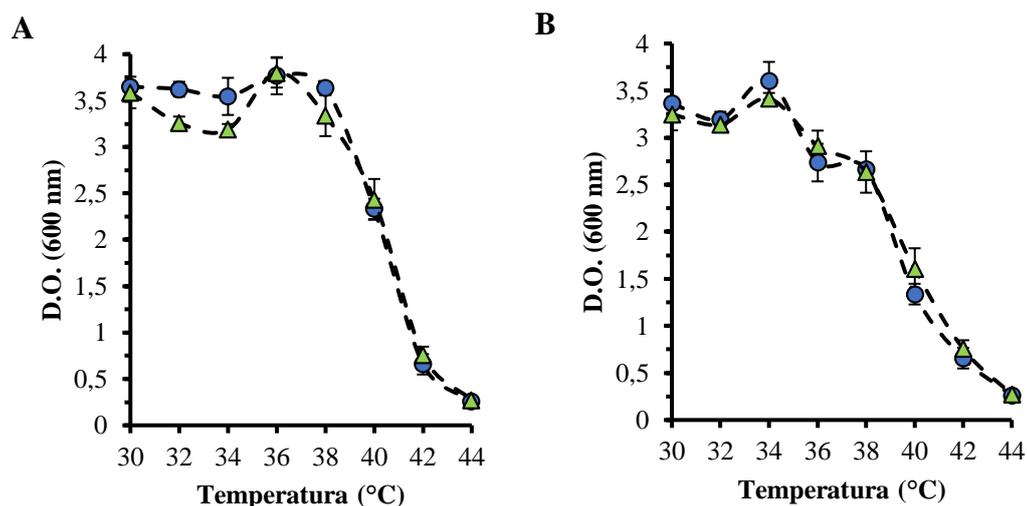


Figura 15. (A) valores de D.O._{600nm} final de *D. bruxellensis* GDB 248 e (B) *S. cerevisiae* JP1 em crescimento aeróbio com sacarose (círculo azul) e glicose (triângulo verde), 24 horas de cultivo, em diferentes temperaturas.

Análises de Blomqvist et al. (2010), a partir da uma linhagem de *D. bruxellensis* CBS11269, demonstrou uma boa flexibilidade e resistência a variações de temperatura (25 °C a 37 °C), mesmo em diferentes valores de pH, confirmando a robustez de linhagens de *D. bruxellensis* a variações no ambiente. Bassi et al. (2011), também testou diversas temperaturas (30, 33, 36, 39 e 42 °C) em cultivos com três linhagens de *D. bruxellensis*: CCA059; CCA077 e CCA155 e *S. cerevisiae* PE-02, em placas de petri com meio YPED. Dentre as temperaturas testadas todas as linhagens cresceram em 39 °C, sendo 42 °C a temperatura limitante para as cepas de *D. bruxellensis* no estudo. Mesmo utilizando metodologias diferentes, os dados apresentados corroboram com os resultados apresentados nesse trabalho. Desta forma, a permanência e a sobrevivência de *D. bruxellensis* no ambiente industrial podem ser apoiadas em relação as temperaturas as quais são submetidas no meio. Entretanto, outros estudos indicam, que o rendimento, a produtividade e o crescimento em etanol são apenas influenciados marginalmente pela temperatura, os efeitos mais graves, são oriundos da junção com outros estresses no meio (BLOMQVIST et al., 2010; BRANDAM et al., 2008; YAKOBSON, 2009).

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se dizer em geral, que a levedura *D. bruxellensis* GDB 248 se mostrou bem adaptada à altas concentrações de sacarose e glicerol, indicando alta tolerância à estresse osmótico, similar à descrita anteriormente para *S. cerevisiae*. Em relação a disponibilidade de nitrogênio, a substituição do enxofre presente no sulfato de amônio pelo cloro presente no cloreto de amônio não influenciou o crescimento celular, o que

indica que o aporte de enxofre contido no meio YNB parece ser suficiente para sustentar o metabolismo e crescimento celular. No que diz respeito ao estresse causado por ácidos inorgânicos, *D. bruxellensis* GDB 248 apresentou tolerância similar a *S. cerevisiae*, já na presença de ácidos orgânicos, em ácido acético, *S. cerevisiae* JP1 foi mais resistente do que *D. bruxellensis* GDB 248, uma vez que conseguiu crescer em concentrações elevadas, sendo o ajuste do pH para 3,5, um alívio na toxicidade do ácido, resultando em melhora significativa do crescimento de *D. bruxellensis* GDB 248 em relação a *S. cerevisiae* JP1. Em ácido láctico, no entanto, *D. bruxellensis* GDB 248 apresentou maior resistência do que *S. cerevisiae* JP1, conseguindo crescer em altas concentrações do ácido. O ajuste do pH, mais que em ácido acético, restaurou o nível de crescimento em ambas as leveduras para valores comparáveis ao meio de referência. Se tratando dos estresses oxidativo e térmico, *D. bruxellensis* GDB 248 foi mais resistente do que *S. cerevisiae* JP1, o que não pode se dizer em relação ao estresse etanólico onde o cenário foi invertido. Todos esses dados indicam que *D. bruxellensis* GDB 248 é capaz de sobreviver de forma similar a linhagens de *S. cerevisiae* no contexto industrial, o que pode justificar sua alta adaptação ao ambiente de fermentação alcoólica.

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se dizer que a alta adaptabilidade de *D. bruxellensis* GDB 248 pode estar relacionada à sua grande capacidade de tolerar os agentes estressores encontrados nos substratos e ambientes industriais. Além disso, sua ampla diversidade intraespecífica e habilidades metabólicas diferenciadas, tornam essa espécie um modelo promissor para vários processos industriais futuros, como por exemplo, a produção de etanol de segunda geração. Mecanismos multivariados e diversos genes envolvidos nesse potencial de sobrevivência, destacando a utilização de diferentes vias e fatores relacionados ao metabolismo das fontes de carbono, a capacidade de assimilar diversas fontes de nitrogênio, incluindo o nitrato, boas características fermentativas e mecanismos de resposta ao estresse osmótico, podem justificar sua vantajosa competitividade frente a *S. cerevisiae* JP1, estando no rol de leveduras que se destacam industrialmente

REFERÊNCIAS

ABBOTT, D.A. et al. Growth rates of *Dekkera/ Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batsh com mash fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 66, p.641-647; 2005.

ABDEL-BANAT B. et al. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast. **Appl Microbiol Biot.** 85: 861–7. 2010.

AFANAS'EV I. Signaling and damaging functions of free radicals in aging-free radical theory, hormesis, and TOR. **Aging Dis.**;1(2):75–88, 2010.

AGUILAR USCANGA, M. et al. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 2, p. 157-162, 2003.

AGNOLUCCI M. et al. Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. **Int J Food Microbiol.** 143:76–80, 2010.

AGNOLUCCI M. et al. Impact of sulphur dioxide on the viability, culturability, and volatile phenol production of *Dekkera bruxellensis* in wine. **Ann Microbiol.** 64:653–659. 2014.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresour. Technol.**, 101, pp. 4851-4861, 2010.

ANDO A. et al. Identification and classification of genes required for tolerance to high-sucrose stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae*, **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 249–267, 2006.

ARAKI, Y. et al. Ethanol stress stimulates the Ca²⁺ mediated calcineurin/Crz1 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, p. 1–6, 2009.

ARAÚJO P. et al. Informação sobre algumas leveduras contaminantes da fermentação alcoólica industrial isoladas no nordeste de Brasil. In: XV Simpósio de Nacional de Bioprocessos, Recife, 2005.

BAI, F.W. et al. Ethanol fermentation technologies from sugarand starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.

BANAT IM. et al. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. **World J Microb Biot**;8:259–63.1992.

BARATA A. et al. The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. **FEMS Yeast Res**; 8:1097–102. 2008.

BARNETT, J.A. et al. Characteristics and Identification. Cambridge: Cambridge University Press, **Yeasts** 1002p, 2002.

BASSO, L.C. et al. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H.V. (Ed.). Processo de produção de álcool: controle e monitoramento. 2 ed. Piracicaba: **FERMENTEC/FEALQ/ESALq-USP**, cap. 4, p.38-85, 1996.

BASSO, R.F. et al. Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? **Food Research International**, vol. 86, Issue undefined, 2016.

BALAT, M.; BALAT. H. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. **Appl. Energy**, 86, pp. 2273-2282, 2009.

BECKNER, M. et al. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Lett. Appl. Microbiol.** 53, 387–394. 2011.

BERBEGAL, C. et al. Starter cultures as biocontrol strategy to prevent *Brettanomyces bruxellensis* proliferation in wine. **Appl Microbiol Biotechnol**, 102: 569, 2018.

BOKULICH N.A. et al. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. **P Natl Acad Sci USA**; 111: E139–48. 2014.

BOKULICH, N.A. et al. Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. **PLoS ONE** 7 e35507.2012.

BLAGOSKLONNY MV. Hormesis does not make sense except in the light of TOR-driven aging. **Aging** (Albany NY).;3(11):1051–1062, 2011.

BLEIER L. ET al. Generator-specific targets of mitochondrial reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med.** 78:1–10, 2015.

BLEOANCA, I. et al. Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, p. 697-705, 2013.

BLOMQVIST, J. et al. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1487-1497, 2010.

BLOMQVIST, J. *Dekkera bruxellensis* - a competitive yeast for ethanol production from conventional and non-conventional substrates. Uppsala: Swedish University of **Agricultural Sciences**, 59p, 2011.

BLOMQVIST, J. et al. Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic conditions. **Yeast**. 29: 265-274, 2012.

BRANDAM C. B. et al. Effect of temperature on *Brettanomyces bruxellensis*: metabolic and kinetic aspects. **Canadian journal of microbiology**, v.54, n. 1, p. 11-18, 2008.

BRÁS S. Molecular techniques for the detection of *Dekkera bruxellensis* in wine and the genetic basis of relevant physiological characteristics: a review, 2015.

CALABRESE E. Hormesis within a mechanistic context. *Homeopathy*.104(2):90–96. 2015.

CANTARELLA M. et al. Effect of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. **Biotechnol Prog**; 20:200–6. 2004.

CECCHINI F. et al. Dot blot and PCR for *Brettanomyces bruxellensis* detection in red wine. **Food Control**. 34, 40–46.2013.

CONTERNO L. et al. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **American journal of enology and viticulture**, v. 57, n. 2, p. 139, 2006.

CURTIN CD. et al. Denovo assembly and analysis of the heterozygous triploid genome of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* AWRI1499. **Plos One** .2012.

CURTIN CD. et al. Impact of Australian *Dekkera bruxellensis* strains grown under oxygen-limited conditions on model wine composition and aroma. **Food Microbiol**; 36:241–7. 2013.

CURTIN CD. et al. Harnessing improved understanding of *Brettanomyces bruxellensis* biology to mitigate the risk of wine spoilage. *Aust J Grape Wine Res* 21:680–692.2015.

CHATONNET, P. et al. The influence of *Dekkera/ Brettanomyces* sp; yeasts na lactic acid bacteria on the ethyphenol contente of red wines. **American Journal of Enology an Viticulture**, Davis, v.46, p 463- 468, 1995.

CHANDEL, A. et al. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. **Biotechnol. Mol. Biol. Rev.**, 2, pp. 14-32, 2007.

CHEN R.; THORNER J. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim Biophys Acta**. 177398):1311-40. Review, 2007.

CHENG, N. Production of ethanol by fed-batch fermentation. **Pertanika J. Sci. Technol.**, 17, pp. 399-408, 2009.

CLAUSSEN N.H. Eine Methode zur Anwendung von Hansens Reinzuchtsystem bei der Herstellung von englischen gelagerten Biersorten. **Wochenschr. Brau.** pp. 370-383, 1904.

CRAUWELS, S. et al. Comparative phenomics and targeted use of genomics reveals variation in carbon and nitrogen assimilation among different *Brettanomyces bruxellensis* strains. **Appl Microbiol Biotechnol**. 99 (12):9123–9134, 2015.

CHEN, A. et al. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to stress-free acidification. **J. Microbiol**. pp 1–8, 2009.

DARAN-LAPUJADE, P. et al. Chemostat-based micro-array analysis in baker's yeast. **Advances in Microbial Physiology**, v. 54, p. 257-311, 414-417, 2008.

DA SILVA. T. et al. Distribution of in a sugarcane-based fuel ethanol fermentation plant. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 4. P. 354-358, 2016.

DE BARROS PITA, W. et al. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie van Leeuwenhoek (Gedrukt)**. v.100, p.99 – 107, 2011.

DE BARROS PITA, W. et al. The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. 113: 629-640, 2012.

DE BARROS PITA, W. et al. Physiology and gene expression profiles of *Dekkera bruxellensis* in response to carbon and nitrogen availability. **Antonie van Leeuwenhoek** 104: 855. 2013a.

DE BARROS PITA, W. et al. The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. **Yeast**. 30: 111-117, 2013b.

DE MINIAC, M. Contamination des fermentations alcooliques industrielles par les levures du genre: *Brettanomyces*. **Industries alimentaires et agricoles**, v. 106, n. 7-8, p. 559-563, 1989.

DEMIRBAS, A. Biofuels securing the planet's future energy needs. **Energy Convers. Manag.**, 50, pp. 2239-2249, 2009.

DE SOUZA R. et al. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. **J Ind Microbiol Biotechnol**; 39: 1645–50.2012.

DE SOUZA LIBERAL A. et al. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **J Appl Microbiol**; 102:538–47.2007.

DONG, Y. et al. et al. RNA-Seq-based transcriptomic and metabolomic analysis reveal stress responses and programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Sci. Rep.** 7, 42659, 2017.

DORTA, C. et al. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, p. 177-182, 2006.

DUARTE, J. et al. Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. **AMB Express**, 3, p. 31, 2013.

DUJON B. Yeast evolutionary genomics. **Nat Rev Genet**; 11:512–24. 2010.

ECHEVERRIGARAY S. et al. Identification and characterization of *non-saccharomyces* spoilage yeasts isolated from Brazilian wines. **World J Microb Biot**; 29: 1019–27.2013.

ESTRUCH, F. Stress- controlled transcription factor, stress- induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMs Microbiology**, Amsterdam, v.24, p.469-486, 2000.

FILIFE-RIBEIRO, L. et al. Reducing the negative sensory impact of volatile phenols in red wine with different chitosans: effect of structure on efficiency. **Food Chem**, 242, pp. 591-600, 2018.

FILIFE-RIBEIRO, L. Reduction of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wine by activated carbons with different physicochemical characteristics: impact on wine quality. **Food Chem**, 229, pp. 242-251, 2017.

FERREIRA, L.V. et al. Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** vol.19 n.1 22-32, 1999.

FUCHS B.; MYLONAKIS E. Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. **Eukaryot Cell**. Nov; 8(11):1616-25. Review, 2009.

FUGELSANG K.C., EDWARDS G.E. Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures (second edition), **Springer**, Berlin, 2007.

GALAFASSI S. et al. *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, p. 1-10, 2011.

GALAFASSI S. et al. Utilization of nitrate abolishes the 'Custers effect' in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products. **Journal Ind Microbiol Biotechnol** 40(3–4): 297–303, 2013.

GARIJO, P. et al. Analysis of grapes and the first stages of the vinification process in wine contamination with *Brettanomyces bruxellensis*. **Eur Food Res Technol**, 240:525, 2015.

GODARD, P. et al. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 8, p. 3065, 2007.

HADIYANTO, H. Batch and fed-batch fermentation System on ethanol production from whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Int. J. Renew. Energy Dev.**, 2, pp. 127-131, 2013.

HARRIS V. et al. Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera and Brettanomyces* yeast. **Appl Microbiol Biot**; 81:1117–27.2009.

HOHMANN, S.; MAGER, W.H. Yeast stress responses. New York: **Springer**, 252p 1997.

JAIN, A.; CHAURASIA, S. Bioethanol production in membrane bioreactor (MBR) System: a review. **Int. J. Environ. Res. Dev.**, 4, pp. 387-394, 2014.

JEFFRIES, T.; JIN, S. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. **Adv. Appl. Microbiol.**, 47, pp. 221-268, 2000.

KANSHIN, E. et al. Phosphoproteome dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* under heat shock and cold stress. **Molecular systems biology**.;11(6):813, 2015.

KINCLOVA O. et al. The *Zygosaccharomyces rouxii* strain CBS732 contains only one copy of the HOG1 and the SOD2 genes. **J Biotechnol**; 88:151–8. 2001.

KOURKOUTAS Y. et al. High temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on deligni R ed cellulosic material. **Bioresource Technol**; 82: 177–81. 2002.

LAOPAIBOON, L. et al. Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 23, pp. 1497-1501, 2007.

LAGES F. et al. Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim Biophys Acta**.10;1322(1), p.8-18.1997.

LEITE, F.C.B. et al. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. **FEMS Yeast Research** 13: 34-43, 2013.

LEITE, F. C. et al. High intracellular trehalase activity prevents the storage of trehalose in the yeast. **Letters in Applied Microbiology**, v. 63, p. 210-214, 2016.

LEANDRO MJ. et al. The osmotolerant fructophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii* employs two plasmamembrane fructose uptake systems belonging to a new family of yeast sugar transporters. **Microbiology**; 157:601–8. 2011.

LEVIN D.E. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev.** Jun; 69(2); 262-9. 2005.

LIBERAL, A.T. et al. Identification of the yeast *Dekkera bruxellensis* as major contaminant in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.538 – 547, 2007.

LIMA U. Biotecnologia industrial. Processos fermentativos e enzimáticos. Vol. 1, SP, Editora Blucher LTDA, 2001.

LIMTONG S. et al. Effect of acetic acid on growth and ethanol fermentation of xylose fermenting yeast and *Saccharomyces cerevisiae*. **Kasetsart J (Natural Sci)**; 34:64–73.2000.

LIMTONG S. et al. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technol**; 98:3367–74. 2007.

LUCENA B.T. et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiol**; 10:298. 2010.

LUCENA, B.T. et al. Genome Sequences of the Ethanol-Tolerant *Lactobacillus vini* Strains LMG 23202T and JP7.8.9. **Journal of Bacteriology** (Print), v.194, p.3018 – 3018, 2012.

LUCENA, R.M. et al. Participation of CWI, HOG and Calcineurin pathways in the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to low pH by inorganic acid. **Journal of Applied Microbiology**. 113: 629-640, 2012.

LUCENA, R.M. et al. Transcriptomic response of *Saccharomyces cerevisiae* for its adaptation to sulphuric acid-induced stress. **Antonie van Leeuwenhoek** 108: 1147, 2015.

LUDOVICO P, BURHANS WC. Reactive oxygen species, ageing and the hormesis police. **FEMS Yeast Res.** 14(1):33–39. 2014.

LUSHCHAK VI. Oxidative stress in yeast. **Biochemistry** (Moscow), 75(3):281–296, 2010.

MARTORELL P. et al. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. **Int J Food Microbiol**; 114:234–42.2007.

MELO H.F. et al. Análise fisiológica e molecular da resposta ao estresse de *Saccharomyces cerevisiae* imposta por forte ácido inorgânico com implicação em fermentações industriais. **Journal of Applied Microbiology**, 109: 116-127, 2010.

MILISAV I. et al. Adaptive response, evidence of cross-resistance and its potential clinical use. **Int J Mol Sci.**;13(9):10771–10806. 2012.

MITRAKUL, C. et al. Discrimination of *Dekkera/Brettanomyces* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. **Food Microbiol**, v. 16, p. 3-14,1999.

MOHD AZHAR, S. et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, vol.10, Issue undefined, 2017.

MOKTADUZZAMAN, M. et al. Strain-dependent tolerance to acetic acid in *Dekkera bruxellensis*. **Ann Microbiol**. 66: 351. 2016.

MONACO M. Efeito protetor do magnésio no choque térmico e estresse pelo etanol em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, **Universidade de São Paulo**, 67p, 2007.

MORANO K. et al. The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics.**;190(4):1157-1195, 2012.

MORALES L. et al. Complete DNA sequence of *Kuraishia capsulata* illustrates novel genomic features among budding yeasts (*Saccharomycotina*). **Genome Biol Evol**, 5:2524-2539.

MUKHERJEE V. et al. Phenotypic evaluation of natural and industrial *Saccharomyces* yeasts for different traits desirable in industrial bioethanol production. **Appl Microbiol Biot**; 98:9483– 98.2014.

NARDI T. et al. Adaptation of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces bruxellensis* to winemaking conditions: a comparative study of stress genes expression. **Applied microbiology and biotechnology**, p. 1-13, 2010.

NIGAM P., SINGH A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Prog. Energy Combust. Sci.**, 37, pp. 52-68, 2011.

NOGUCHI, C. et al. Association of Constitutive Hyperphosphorylation of Hsf1p with a Defective Ethanol Stress Response in *Saccharomyces cerevisiae* Sake Yeast Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 385–392, 2011.

NONKLANG S. et al. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3–1042. **Appl Environ Microb**; 74:7514–21. 2008.

OELOFSE A. et al. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. *S Afr J Enol Vitic*; 29:128–44.2008.

OLIVEIRA B. et al. Enhanced Enzymatic Activity of Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase from the Cryophilic *Saccharomyces kudriavzevii*. Virolle M-J, ed. **PLoS ONE**.;9(1):e87290. 2014.

ORIJ R. et al. Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, n. 10, p. 933-944, 2011.

PAIS TM. et al. Comparative polygenic analysis of maximal ethanol accumulation capacity and tolerance to high ethanol levels of cell proliferation in yeast. **PLoS Genet**; 9:e1003548.2013.

PASSOTH V. et al. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. **Appl Environ Microb**; 73:4354–6.2007.

PEREIRA, F.B. et al. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. **Biotechnol Lett**. v. 34. p. 45-53, 2012.

PIPER, P.W. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 134, n. 2-3, p. 121-127, 1995.

PISKUR J. et al. The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. **Int J Food Microbiol.** 2012 Jul 2;157(2):202-9, 2012.

POSTMA, E. et al. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 55, n. 2, p. 468, 1989.

PULIGUNDLA P. et al. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. **J Ind Microbiol Biotechnol**; 38: 1133–44.2011.

PROCHAZKA E, et al. Mitochondrial genome from the facultative anaerobe and petite-positive yeast *Dekkera bruxellensis* contains the NADH dehydrogenase subunit genes. **FEMS Yeast Res**; 10:545–57. 2010.

PRONK, J. T. et al. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 12, n. 16, p. 1607-1633, 1996.

QUEROL A. Adaptive evolution of wine yeast. **Int J Food Microbiol**; 86:3–10.2003.

RASTOGI, M., SHRIVASTAVA, S. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Vol.80, Issue undefined, 2017.

RAVIN N. et al. Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL₁. **BMC Genomics**, 14: 837, 2013.

REIS ALS. et al. Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain. **SpringerPlus**; 3:38–8, 2014.

RENOUF V. et al. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. **J Appl Microbiol** 100:1208–1219.2006.

RENOUF V. et al. Survival of wine microorganisms in the bottle during storage. **Am J Enol Viticult**; 58:379–86.2007.

RODRIGUES-POUSADA et al. The Yap family and its role in stress response. **Yeast**. 27(5):245-58. Review. 2010.

ROZPEDOWSKA, E. et al. Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. **Nature Communications**, v. 2, p. 302, 2011.

RUIS, H.; SCHULLER, C. Stress signaling in yeast. **Bioessays**, v.17, n.11, p. 959-965,1995.

RUYTERS S. et al. Assessing the potential of wild yeasts for bioethanol production. **J Ind Microbiol Biot**; 42:39–48.2015.

SANGORRÍN, M. P. et al. Molecular and physiological comparison of spoilage wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 4, p. 1066–1074, 2013.

SANCHEZ, O.; CARDONA, C. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresour. Technol.**, 99, pp. 5270-5295, 2008.

SEMCHYSHYN HM, LOZINSKA LM. Fructose protects baker’s yeast against peroxide stress: potential role of catalase and superoxide dismutase. **FEMS Yeast Res.** 12(7):761–773. 2012.

SEMCHYSHYN H. Hormetic concentrations of hydrogen peroxide but not ethanol induce cross-adaptation to different stresses in budding yeast. **Int J Microbiol.** 2014.

SERRA C. et al. The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. **Current Opinion in Biotechnology**. Volume 56, Issue undefined, April 2019.

SERPAGGI V, Characterization of the “Viable but non culturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. **Food Microbiol** 30:438–447.2012.

SCHEFFERS, W. Stimulation of fermentation in yeasts by acetoin and oxygen. **Nature**, v. 210, p. 533-534, 1966.

SIEUWERTS, S. et al. Mutually stimulating interactions between lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in sourdough fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, Vol. 90, 2018.

SIVERIO, J. M. Assimilation of nitrate by yeasts. **FEMS Microbiology reviews**, v. 26, n. 3, p. 277-284, 2002.

SOUZA, R.B. et al. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. In press.

SCHIFFERDECKER, A. J. et al. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. **Yeast**, v. 31, n. 9, p. 323–332, 2014.

SPENCER J. et al. Tolerance of pentose utilising yeast to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. **BMC Research Notes**.7:151, 2014.

SRICHUWONG, S. et al. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. **Biomass- Bioenergy**, 33, pp. 890-898, 2009.

STANISZEWSKI, M. et al. Ethanol production from whey in bioreactor with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product – Kinetic model predictions. **J. Food Eng.**, 82, pp. 618-625, 2007.

STEENSELS, J. et al. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. **Annu. Rev. Microbiol.** 68, 61–80.2014.

STEWART G.G. Non-*Saccharomyces* (and Bacteria) yeasts that produce ethanol. In: **Brewing and Distilling Yeasts**. The Yeast Handbook. Springer, Cham. 2017.

SOUCIET J-L, et al. Comparative genomics of protoploid *Saccharomycetaceae*. **Genome Res**; 19:1696–709.2009.

SKINNER KA, LEATHERS TD. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 31: 401-408, 2004.

SWINNEN S. et al. The fraction of cells that resume growth after acetic acid addition is a strain-dependent parameter of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 4 4, p. 642–653, 2014.

TAO X. et al. A novel strategy to construct yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity fermentation. **PLoS One**; 7:e31235.2012.

TAYLOR MP, et al. Understanding physiological responses to pre-treatment inhibitors in ethanologenic fermentations. **Biotechnol J**; 7:1169– 81.2012.

TIUKOVA IA, et al. Transcriptome of the alternative ethanol production strain *Dekkera bruxellensis* CBS 11270 in sugar limited, low oxygen cultivation. **Plos One**; 8:58455.201.

TORELLI N. et al. RTG1- and RTG2-dependent retrograde signaling controls mitochondrial activity and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Free Radic Biol Med.**;81: 30–37, 2015.

THATOI, H. et al. Bioethanol production from tuber crops using fermentation technology: a review. *Int. J. Sustain. Energy*, pp. 1-26, 2014.

THOMAS, K. C. et al. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 4, p. 1616-1623, 2002.

UUSITALO S. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for identification and discrimination of beverage spoilage yeasts using patterned substrates and gold nanoparticles. **J. Food Eng.** 212 47–54, 2017.

WATANABE, T. et al. Selection of stress-tolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash to ethanol. **Bioresource Technol**; 101:9710–4.2010.

VALDETARA, F. et al. A Response surface methodology approach to investigate the effect of sulfur dioxide, pH, and ethanol on *DbCD* and *DbVPR* Gene Expression and on the Volatile Phenol Production in *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* CBS2499. **Frontiers in Microbiology**, 8, 1727, 2017.

VAN DER WALT J.P. *Dekkera*, new genus of Saccharomycetaceae. **Anton Van Lee J M S**; 30:273–80, 1964.

VÁZQUEZ, J. et al. Melatonin Reduces Oxidative Stress Damage Induced by Hydrogen Peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. **Frontiers in Microbiology**, 8, 2017.

VEAL E. et al. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cell* 26: 1–14. 2007.

VERACHTERT, H. Lambic and gueuze brewing: mixed cultures in action. **COMETT Course on Microbial Contaminants**, Helsinki, pp. 243–262.1992.

WEDRAL, D. et al. The challenge of *Brettanomyces* in wine. **LWT Food Sci. Technol.** 1474–1479.2010.

WEINBERGER M. et al. Growth signaling promotes chronological aging in budding yeast by inducing superoxide anions that inhibit quiescence. **Aging** (Albany NY). 2(10):709–726; 2010.

WIJSMAN, M. R. et al. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 50, n. 2, p. 183-192, 1984.

WOOLFIT, M. et al. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 4, p. 721, 2007.

WYMAN, C. Ethanol production from lignocellulosic biomass: overview. **Taylor and Francis Group**, Washington, pp. 1-18, 1996.

YAHARA, G. A. et al. Modeling of yeast *Brettanomyces bruxellensis* growth at different acetic acid concentrations under aerobic and anaerobic conditions. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 30, n. 6, p. 389-395, 2007.

ZABED, H. et al. Bioethanol production from fermentable sugar juice. **Sci. World J.**, pp. 1-11, 2014.

ZEMANČÍKOVÁ J. et al. Osmotolerance of *Dekkera bruxellensis* and the role of two Stl glycerol–proton symporters, **FEMS Microbiology Letters**, vol. 365, 2018.

ZHOU, N. et al. Genome dynamics and evolution in yeasts: a long-term yeast-bacteria competition experiment. **PLOS ONE**, 13, pp. 1-16, 2018.

ZHA Y, et al. *Pichia anomala* 29X: a resistant strain for lignocellulosic biomass hydrolysate fermentation. **FEMS Yeast Res**; 13:609–17.2013.