



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PEDRO PAULO DOS SANTOS

**METABOLIZAÇÃO DO ÁCIDO P-CUMÁRICO PELAS LINHAGENS
INDUSTRIAIS GDB248 E LAMAP2480 DA LEVEDURA *DEKKERA*
*BRUXELLENSIS***

Recife-PE

2024

PEDRO PAULO DOS SANTOS

**METABOLIZAÇÃO DO ÁCIDO P-CUMÁRICO PELAS LINHAGENS
INDUSTRIAIS GDB248 E LAMAP2480 DA LEVEDURA *DEKKERA*
*BRUXELLENSIS***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade
Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Biotecnologia.

Orientador (a): Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior

Coorientador (a): Prof. Dr. Rafael Barros de Souza

Recife-PE

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Santos, Pedro Paulo dos.

Metabolização do ácido p-cumárico pelas linhagens industriais GDB248 e LAMAP2480 da levedura *Dekkera bruxellensis* / Pedro Paulo dos Santos. - Recife, 2024.

81p.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Recife, 2024.

Orientação: Marcos Antonio de Moraes Junior.

Coorientação: Rafael Barros de Souza.

1. Caldo de cana; 2. Fermentação; 3. Metabolismo do nitrogênio; 4. Rendimento etanólico; 5. Vinho. I. Moraes Junior, Marcos Antonio de - Orientador. II. Souza, Rafael Barros de - Coorientador. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

CDD 660.6

PEDRO PAULO DOS SANTOS

**METABOLIZAÇÃO DO ÁCIDO P-CUMÁRICO PELAS LINHAGENS
INDUSTRIAIS GDB248 E LAMAP2480 DA LEVEDURA *DEKKERA*
*BRUXELLENSIS***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade
Federal de Pernambuco, Centro de
Biociências, como requisito para a
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia. Área de concentração:
Bioquímica e Biologia Molecular
Aplicada

Aprovado em: 31/07/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Jorge Luíz Silveira Sonogo
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof.^a Dr.^a Sandra Regina Ceccato Antonini
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu pai Paulo Roberto dos Santos por ter me apoiado sempre, emocionalmente ou financeiramente. Muito dessa conquista é por ele e em honra a ele, que sempre zelou de perto pela minha segurança e bem-estar enquanto em vida.

À minha mãe Ana Lúcia de Oliveira, por me acompanhar e incentivar a cada passo, sendo um suporte muito necessário para todas as dificuldades que surgiram.

Ao meu orientador Prof. Marcos Antonio de Moraes, por ter me aceitado como seu aluno de mestrado, por ter acreditado que eu seria capaz de realizar não só o mestrado como desenvolver um projeto de pesquisa no exterior. Isso me fez acreditar mais em mim e no meu potencial. Obrigado por todo apoio e conhecimento passado.

Agradeço a todos colegas de turma e do LGM (Laboratório de Genética de Microrganismos) e LABENZ (Laboratório de enzimologia) da UFPE de Recife, em especial à Angélica Silva que me auxiliou nas metodologias enzimáticas que de alguma forma contribuiu nessa jornada.

Sou muito grato à Profa. María Angelica Ganga, por ter me recebido no LAMAP (Laboratório de Microbiologia Aplicada), Universidad de Santiago, Chile.

À pós-doutoranda Camilla Gonzalez-Poblete por ter me orientado nos experimentos, à técnica Estefania Meza, e aos alunos de iniciação científica Nachla Torres e Lucas Avilés e de doutorado Patrick Morales, por terem me ajudado em tudo que precisei e por serem por muitas vezes meu ponto de apoio no intercâmbio realizado na USACH, são memórias e momentos que jamais esquecerei.

Meus agradecimentos aos órgãos que contribuíram financeiramente na realização desse projeto, em especial à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de PE (FACEPE) pela concessão da bolsa de mestrado, e ao Programa Universitário de Biotecnologia das Nações Unidas para a América Latina e o Caribe (UNU-BIOLAC) pelo suporte e pela oportunidade do intercâmbio.

EPÍGRAFE

“A educação é um ato de amor,
por isso, um ato de coragem.”

Paulo Freire

RESUMO

A levedura *Dekkera bruxellensis* tem sido estudada pelo nosso grupo de pesquisa pela importância que tem em diferentes processos industriais. Se representa uma ameaça de contaminação na produção de vinhos, é indispensável na produção de cervejas do estilo Lambic na Bélgica. Nas vinícolas, essa levedura se notabiliza pela produção de moléculas que conferem sensações sensoriais ruins, os chamados *off-flavours*. Uma dessas moléculas é o 4-etilfenol (4-EF) que é produto da metabolização do ácido p-cumárico (ApC), um tipo de ácido cinâmico presente no mosto de uva. A produção desta molécula foi estudada a partir de duas linhagens de *D. bruxellensis*: uma proveniente de vinícolas do Chile e outra da produção de etanol combustível no Nordeste do Brasil. Dois tipos de substratos sintéticos que simulam o mosto de uva e o caldo de cana foram utilizados. E finalmente, duas fontes de nitrogênio foram testadas. O amônio foi usado como referência ao mesmo tempo em que o nitrato representou uma característica industrialmente vantajosa sobre a *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados mostraram que a linhagem de vinho é capaz de utilizar nitrato tão bem quanto a linhagem de etanol em cultivo com limitação de oxigênio. Interessante notar que a linhagem de vinho foi mais sensível ao ApC do que a linhagem de etanol. As duas leveduras apresentaram padrões similares de consumo de substratos do meio e produção de produtos de fermentação. Em geral, a produção de etanol foi mais baixa em nitrato do que em amônio, para ambas as linhagens. Os maiores valores de consumo de açúcar foram observados em meio com amônio e sem ApC, em contrapartida os menores foram observados em meio com nitrato e com ApC. O tipo de substrato não influenciou na fisiologia da levedura. As duas linhagens apresentaram mesma capacidade de consumir ApC, mas diferentes atividades metabólicas para produzir 4-vinilfenol (4-VF) e 4-EF. Esta última molécula foi mais produzida pela linhagem de vinho. Os cálculos de distribuição molar pela via de degradação do ApC indicaram que outros produtos são formados além do 4-EF. Os resultados deste trabalho mostram pela primeira vez o metabolismo desta levedura em função de presença de ApC no mosto e pode trazer importante repercussão para o processo industrial de produção de vinho.

Palavras-chave: Caldo de cana; Fermentação; Metabolismo do nitrogênio; Rendimento etanólico; Vinho

ABSTRACT

The yeast *Dekkera bruxellensis* has been studied by our research group due to its importance in different industrial processes. If it represents a threat of contamination in wine production, it is essential in the production of Lambic-style beers in Belgium. In wineries, this yeast is notable for producing molecules that give bad sensory sensations, known as off-flavours. One of these molecules is 4-ethylphenol (4-EF), which is the product of the metabolization of p-coumaric acid (ApC), a type of cinnamic acid present in grape must. The production of this molecule was studied from two strains of *D. bruxellensis*: one from wineries in Chile and the other from fuel ethanol production in Northeast Brazil. Two types of synthetic substrates that simulate grape must and sugarcane juice were used. And finally, two nitrogen sources were tested. Ammonium was used as a reference while nitrate represents an industrially advantageous characteristic of this yeast over *Saccharomyces cerevisiae*. The results showed that the wine strain is capable of utilizing nitrate as well as the ethanol strain in oxygen-limited cultivation. Interestingly, the wine strain was more sensitive to ApC than the ethanol strain. The two yeasts showed similar patterns of consumption of substrates from the medium and production of fermentation products. In general, ethanol production was lower in nitrate than in ammonium for both strains. The highest values of sugar consumption were observed in medium with ammonium and without ApC, while the lowest were observed in medium with nitrate and with ApC. The type of substrate did not influence yeast physiology. the two strains showed the same capacity to consume ApC, but different metabolic activities to produce 4-vinylphenol (4-VF) and 4-EF. This last molecule was most produced by the wine strain. Calculations of molar distribution through the ApC degradation pathway indicated that other products are formed in addition to 4-EF. The results of this work show for the first time the metabolism of this yeast as a function of the presence of ApC in must and may have important repercussions for the industrial wine production process.

Keywords: Ethanol yield; Fermentation; Nitrogen metabolism; Sugarcane juice; Wine

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diferentes tipos de morfologia celular de <i>Dekkera bruxellensis</i> ..	16
Figura 2 – A. Equipamento para cultivo (TECAN); B. Microplaca 96 poços .	30
Figura 3 – Crescimento das linhagens GDB248 e LAMAP2480 de <i>D. bruxellensis</i> sob restrição de oxigênio.....	33
Figura 4 – Concentração e densidade de <i>Dekkera bruxellensis</i> em 40h de fermentação em caldo de cana e mosto de uva, com amônio ou nitrato, com e sem ApC.....	37
Figura 5 – Densidade celular de <i>Dekkera bruxellensis</i> após 40h de fermentação em diferentes meios e condições	38
Figura 6 – Produção e rendimento de etanol das linhagens de <i>Dekkera bruxellensis</i> em meios sintéticos com ou sem ácido p-cumárico e amônio.....	48
Figura 7 – Produção e rendimento de etanol das linhagens de <i>Dekkera bruxellensis</i> em meios sintéticos com ou sem ácido p-cumárico e nitrato	49
Figura 8 – Distribuição do carbono durante a fermentação de caldo de cana ou mosto de uva com amônio ou nitrato e ácido p-cumárico por <i>Dekkera bruxellensis</i> GDB 248 e LAMAP 2480. Valores baseados nos dados das Tabelas 3 e 15, exceto CO ₂ , calculado estequiometricamente	51
Figura 9 – Metabolização do ácido p-cumárico pelas linhagens GDB 248 e LAMAP 2480 de <i>Dekkera bruxellensis</i> em meio sintético com glicose e amônio ou nitrato. Valores médios de mosto sintético de cana e uva.....	55
Figura 10 – Distribuição das moléculas de ApC e derivados no metabolismo de <i>Dekkera bruxellensis</i> : GDB 248 com amônio e nitrato; LAMAP 2480 com amônio e nitrato	56
Figura 11 – Correlação entre as variáveis a partir de sistema de agrupamento	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de duração da fase lag e da velocidade de crescimento das linhagens GDB248 e LAMAP2480 em mosto sintético de cana de açúcar e de uva	34
Tabela 2 – Dados produzidos por CLAE dados brutos	39
Tabela 3 – Dados produzidos por CLAE dados brutos convertidos à mmol/L	40
Tabela 4 – Consumo de glicose pela levedura <i>D. bruxellensis</i> contendo NH ₄ nos meios	42
Tabela 5 – Consumo de glicose pela levedura <i>D. bruxellensis</i> contendo NO ₃ nos mostos	42
Tabela 6 – Consumo de glicose por tipo de fonte de nitrogênio	43
Tabela 7 – Consumo de glicose entre linhagens de <i>D. bruxellensis</i>	44
Tabela 8 – Consumo de glicose com ou sem presença de ApC	44
Tabela 9 – Consumo de NH ₄ por <i>D. bruxellensis</i>	45
Tabela 10 – Consumo de NO ₃ por <i>D. bruxellensis</i>	45
Tabela 11 – Diferença no consumo pelo tipo de fonte de nitrogênio utilizada	46
Tabela 12 – Diferença do consumo de nitrogênio em função do mosto utilizado	46
Tabela 13 – Diferença do consumo de nitrogênio em função da presença de ApC	47
Tabela 14 – Balanço de carbono das linhagens sem presença de ApC nos mostos	48
Tabela 15 – Balanço de carbono das linhagens com presença de ApC nos mostos	50
Tabela 16 – Balanço de carbono das linhagens de <i>Dekkera bruxellensis</i> sem presença de ApC nos mostos	58
Tabela 17 – Balanço de carbono das linhagens de <i>Dekkera bruxellensis</i> com presença de ApC nos mostos	59
Tabela 18 – Produção de 4-vinilfenol e 4-etilfenol	60
Tabela 19 – Proporção de conversão de ApC a seus derivados 4-VP e 4-EP	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	- Adenosina trifosfato
ApC	-Ácido p-cumárico
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
NO ₃	- Nitrato
GLI	- Glicose
NH ₄	- Amônio
ml	- Mililitro
mM	- Milimolar
μL	- Microlitro
ppm	- Partes por milhão
YPD	- Yeast Peptone Dextrose
YNB	- Yeast Nitrogen Base

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	13
2.1.	Objetivo Geral.....	13
2.2.	Objetivos Específicos.....	13
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1.	<i>Dekkera bruxellensis</i>	14
3.1.1.	Ecologia da levedura <i>Dekkera bruxellensis</i>	16
3.1.2.	<i>Dekkera bruxellensis</i> como microrganismo contaminante dos processos fermentativos industriais e Metabolismo de ácido hidroxicinâmicos e seus derivados	17
3.2.	Fisiologia da levedura <i>Dekkera bruxellensis</i>	21
3.2.1.	Metabolismo de assimilação de fontes de carbono	22
3.2.2.	Metabolismo de assimilação de fontes de nitrogênio	24
3.3.	Considerações finais.....	26
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1.	Linhagens e Meios De Cultura.....	27
4.2.	Ensaio de Crescimento em Multileitor de Placas	28
4.3.	Condições experimentais.....	29
4.4.	Determinação da produção de metabólitos extracelulares (CLAE)	30
5.	RESULTADOS	31
5.1.	Perfil de crescimento das leveduras em diferentes fontes de nitrogênio e na presença de ácido p-cumárico sob restrição de oxigênio	31
5.2.	Crescimento de <i>Dekkera Bruxellensis</i> GDB248 e LAMAP2480 com utilização de ácido P-cumário em condições de fermentação	35
5.3.	Análise do consumo de açúcar.....	40
5.4.	Análise do consumo da fonte de nitrogênio	43
5.5.	Análise da atividade fermentativa das linhagens de <i>D. Bruxellensis</i>	46
5.6.	Distribuição do carbono no metabolismo central de <i>D. Bruxellensis</i>	48
5.7.	Metabolização do ácido P-cumário pelas células de <i>D. Bruxellensis</i>	52
5.8.	Análise de correlação entre as variáveis de teste.....	55
5.9.	Balanco de carbono e sua distribuição pelo metabolismo central	56
5.10.	Produção de 4-vinilfenol e 4-etilfenol	59

6.	DISCUSSÃO	61
7.	CONCLUSÕES	67
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO

A levedura *Dekkera bruxellensis* tem ganhado crescente reconhecimento no campo científico e tecnológico devido às suas diversas adaptações metabólicas desenvolvidas ao longo do tempo, que permitem sua sobrevivência em ambientes industriais. Dentre essas adaptações destaca-se o fato de assimilar nitrato como fonte de nitrogênio e ser classificada levedura *Crabtree positiva*. Essas características tornam um microrganismo com potenciais aplicações, especialmente na fermentação de cervejas belgas do tipo Lambic, onde sua presença contribui positivamente no sabor característico desse estilo de cerveja.

No entanto, apesar de diversas características relevantes, *Dekkera* é considerada principal contaminante tanto na produção de bioetanol quanto na indústria vinícola. No primeiro caso, sua presença ocasiona significativas perdas econômicas devida redução do rendimento volumétrico de etanol. No segundo caso é responsável pela degradação de características sensoriais dos vinhos, ocasionando perdas econômicas substanciais para as indústrias. A contaminação nos vinhos está associada à sua capacidade de converter ácidos hidroxicinâmicos em fenóis voláteis, que afeta negativamente cerca de 30% de vinhos tintos em escala global.

Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo analisar a influência do ácido p-cumárico e comparar o estudo do metabolismo desse composto e sua influência nas células da levedura, utilizando duas linhagens de *Dekkera bruxellensis*, uma sendo adaptada ao etanol (GDB248) e outra sendo adaptada ao vinho (LAMAP2480). Portanto, para tal foram realizados cultivos, onde as leveduras cresceram em mosto sintético de cana-de-açúcar, simulando etanol, e em mosto sintético de uva, simulando vinho. Utilizando nitrato ou amônio como fonte de nitrogênio. Os resultados fornecem dados do crescimento e metabolismo fermentativo da célula, metabólitos produzidos e consumidos, além de fornecer dados de consumo de carbono, consumo diferencial de açúcares e como a presença de ácidos hidroxicinâmicos como o ácido p-cumárico (ApC) podem afetar a conversão de fenóis voláteis como 4-vinilfenol e 4-etilfenol, e se há interferência na capacidade fermentativa da levedura.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a influência da presença do ácido p-cumárico no metabolismo de linhagens de *Dekkera bruxellensis* adaptadas à fermentação de bioetanol e vinho.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a distribuição de carbono no metabolismo central das linhagens GDB 248 e LAMAP 2480;
- Comparar o metabolismo de ácidos hidroxicinâmicos (ApC) entre as linhagens de GDB 248 e LAMAP 2480;
- Determinar o perfil de consumo de fontes de nitrogênio entre as linhagens de GDB 248 e LAMAP 2480.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DEKKERA BRUXELLENSIS

Brettanomyces bruxellensis também conhecida por *Dekkera bruxellensis* é uma espécie de levedura do grupo dos hemiascomicetos pertencente à família *Saccharomycetaceae*. Essa espécie foi inicialmente isolada por Claussen a partir de cervejas britânicas no ano de 1904 e apenas em 1921 teve seu nome de gênero *Brettanomyces* sugerido, contudo apenas em 1964 Van Der Walt encontrou ascósporos e descreveu o gênero *Dekkera* como teleomorfo. No entanto, seu sequenciamento genômico parcial ocorreu em 2007, tendo apenas em 2012 duas linhagens AWRI1499 e CBS2499 sequenciadas. O termo *Brettanomyces* deriva de ‘fungo britânico da cerveja’ (grego: ‘brettano’ vêm de cerveja britânica’, ‘myces’ significa fungo). Este gênero recebeu ambos termos *Dekkera* e *Brettanomyces* de forma alternativa, *Dekkera* teleomorfo forma sexuada ou esporulada capaz de produzir ascósporos, enquanto sua forma anamórfica assexuada é comumente chamada de *Brettanomyces*. No entanto podem ser considerados sinônimos (KUFFERATH E LAER, 1921; VAN DER WALT, 1964; WOOLFIT et al., 2007; SMITH et al., 2011; PISKUR et al., 2012).

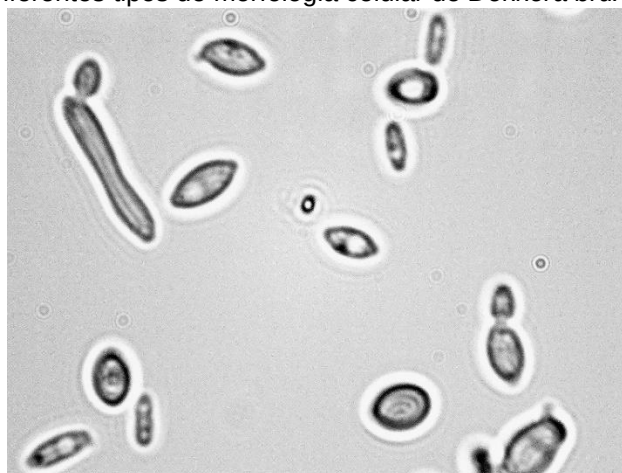
Encontrada a partir da fermentação espontânea de cervejas belga do tipo Lambic, a presença dessa levedura tem impacto positivo no sabor peculiar do ácido acético. Além de ser responsável pelo perfil aromático de vinhos como o chateau de beaucastel, da França. Também encontrada na produção de sidra, kombucha, quefir e na fermentação do etanol combustível tanto no nordeste brasileiro como nos Estados Unidos, Canadá e Suécia (CHATONNET et al., 1992; SHINOHARA et al., 2000; COCOLIN et al., 2003; DEQUIN et al., 2003; DUFOUR et al., 2003; LIBERAL et al., 2007; ROZPEŁDOWSKA et al., 2011; SCHIFFERDECKER et al., 2014; CRAUWELS et al., 2015; TRAN et al., 2020; LYNCH et al., 2021).

Durante muito tempo, essa levedura foi considerada prejudicial aos vinhos, sendo apontada como a principal causa de deterioração e perdas econômicas significativas na indústria de vinicultura. Isso ocorre porque, além de produzir os chamados *off-flavours*, que geram sabores indesejados, ocorre redução da produção volumétrica de etanol quando *D. bruxellensis* está presente

em altas populações e competindo pelos mesmos substratos que *S. cerevisiae* (DE BARROS PITA et al.,2011; LEITE et al.,2013).

Atualmente, contém cinco espécies do gênero que são descritas na literatura: *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anomala*, *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardenensis* e *Brettanomyces nanus*. Podendo apresentar variação genética entre diferentes linhagens. Apresenta variável morfologia celular (Figura 1), podendo ser comumente encontrada em formas ovais, elipsoidal, esférica, cilíndrica, alongada e de tamanho menor, se comparada com *Saccharomyces cerevisiae*, levedura padrão em processos fermentativos (VAN DER WALT, 1964; HELLBORG E PISKUR 2009; HULIN et al., 2014).

Figura 1. Diferentes tipos de morfologia celular de *Dekkera bruxellensis*.



Fonte: <https://wineserver.ucdavis.edu/industryinfo/enology/winemicrobiology/yeast-mold/Dekkera-bruxellensis>

A levedura *Dekkera bruxellensis* tem despertado crescente interesse no meio industrial devido ao seu metabolismo fermentativo adaptativo e reflexo das diversas habilidades fisiológicas que favorecem seu êxito. Por exemplo, em sua capacidade de fermentar mesmo que em altas concentrações de glicose em meio aeróbico. Classificada como levedura *Crabtree positiva*, ou seja, produz etanol mesmo que em condições aeróbicas, bem como *petite positiva*, no qual é capaz de sobreviver sem DNA mitocondrial e se reproduzir sem mitocôndria, podendo dominar particularmente ambientes severos. Ademais, outra habilidade pertencente aos gêneros *Brettanomyces/Dekkera* é o efeito *Custer*, que temporariamente inibe a fermentação alcoólica na ausência de oxigênio, podendo ser ocasionado pelo estresse redutivo (PROCHÁZKA et al.,2010;

ROZPEDOWSKA et al.,2011 GALAFASSI et al.,2013, MALFEITO-FERREIRA,2018).

Outra característica interessante é a capacidade dessa levedura reproduzir-se em aerobiose ou anaerobiose, sendo considerada anaeróbia facultativa. Uma vez que as condições sejam aeróbicas e o excesso de açúcares no meio se faça presente o efeito *Crabtree* é ativado, permitindo a rápida assimilação de glicose e, portanto, a produção de etanol, inibindo o crescimento de microrganismos competitivos. Esse efeito inclui-se em uma tática de “fazer-acumular-consumir” utilizada por microrganismos, o resultado fisiológico desse efeito é a preferência pela fermentação ao invés da respiração, ou seja, ao serem cultivados em aerobiose, podem consumir o etanol produzido no processo de respiração após o esgotamento de glicose no meio. Além disso, esse efeito fornece mais ATP comparado ao metabolismo em aerobiose, devido à quebra eficiente da glicose através da via glicolítica (DE DEKEN et al.,1966; ROZPEDOWSKA et al.,2011; DE BARROS PITA et al.,2013; LEITE et al.,2013; PARENTE et al.,2018; PEÑA-MORENO et al.,2019).

Dekkera ainda se destaca em produzir etanol de segunda geração sob condições aeróbicas, sendo capaz de fermentar celobiose sob restrição de oxigênio. Essa levedura tem capacidade de aproveitar resíduos agroindustriais como bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de sorgo sacarino, resíduos que normalmente seriam descartados, atuando na geração da matriz energética e no desenvolvimento da indústria de biocombustíveis. O bioetanol é um candidato alternativo para geração de energia renovável e fabricação sustentável de combustíveis (DE SOUZA LIBERAL et al.,2007; LEITE et al.,2013; REIS et al.,2016; ZABED et al.,2016; PARENTE et al.,2018; RUANGRIT et al.,2021).

3.1.1. ECOLOGIA DA LEVEDURA *DEKKERA BRUXELLENSIS*

Encontrada em ambientes industriais fermentativos, como em bagas de uva, cidra, produtos lácteos, cervejarias, vinícolas e destilarias. Sendo comumente encontradas em barris de envelhecimento de vinhos tintos, sua presença nesses ambientes se dá pela sua capacidade de assimilar uma gama

de fontes de carbono, incluindo açúcares fermentáveis (CURTIN et al.,2015; DA SILVA et al.,2016).

Embora compartilhem de mesma família *Saccharomycetaceae*, e de mesmo gênero *hemiascomycetae* as leveduras *Dekkera bruxellensis* e *Saccharomyces cerevisiae*, divergiram de um ancestral comum há cerca de 200 milhões de anos, mas, ainda assim compartilham de características fermentativas similares que contribuem na produtividade etanólica de alto rendimento. Ambas as leveduras possuem características em comum, tais como anaerobiose facultativa, efeito *Crabtree positivo*, capacidade de produzir e acumular altos níveis de etanol e crescer em ambientes ácidos (PROCHÁZKA et al., 2010; ROZPEŁDOWSKA et al., 2011; GALAFASSI et al., 2011; PIŠKUR et al., 2012; ECHEVERRIGARAY et al., 2013).

Suas células se reproduzem assexuadamente por brotamento, pela formação de um broto que separa da célula-mãe após a mitose (ALBERTS et al.,1997).

Uma característica relevante na ecologia da levedura é sua capacidade de sobreviver e reproduzir em ambientes com níveis relativamente altos de etanol. Enquanto muitas leveduras são inibidas por concentrações alcoólicas acima de 4-6%, *Dekkera* demonstra-se capaz de tolerar elevadas concentrações de etanol, o que torna comum sua presença em fermentações secundárias e envelhecimento de bebidas alcoólicas, como vinhos e cervejas (TRIYANI et al.,2023; XAVIER et al.,2023).

3.1.2 *Dekkera bruxellensis* como microrganismo contaminante dos processos fermentativos industriais e o Metabolismo de ácido hidroxicinâmicos e seus derivados

Em processos fermentativos, a presença de *Dekkera bruxellensis* é controversa e nem sempre desejada. Pois, ao mesmo tempo em que é encontrada sendo um componente essencial na contribuição do realce de ácido acético nas cervejas belga do tipo Lambic, de modo oposto tem sido descrita como principal causa de deterioração de vinhos e da indústria de vinicultura em todo o mundo sendo responsável por perdas econômicas estimadas em cerca de 1,4 milhões de dólares em todo o mundo. Isso é resultado da produção de

off-flavours ou aromas desagradáveis descritos fenóis voláteis como 4-vinilfenol (4-VF), 4-etilfenol (4-EF) e 4-etilguaicol (4-EG), produzidos por ácidos hidroxicinâmicos, como ácido p-cumárico, caféico e ácido ferúlico que naturalmente são encontrados nas cascas das uvas. Tais odores retratam a característica “*Brett*”, onde são comumente relatados em literatura como “curral”, “medicinal”, “cavalo molhado”, “suor de cavalo” (CHATONNET et al.,1992; BOULTON et al.,1996; SHINOHARA et al.,2000; COCOLIN et al., 2003; DE SOUZA et al.,2007; FUGELSANG & EDWARDS, 2007; BENITO et al.,2009; ROZPEĐOWSKA et al.,2011; SCHIFFERDECKER et al.,2014; MALFEITO-FERREIRA,2018).

Os fenóis voláteis têm sua origem no mosto fermentativo, onde o precursor mais relevante dos ácidos hidroxicinâmicos (HCA) de fenóis voláteis nos vinhos é o ácido p-cumárico (ApC). *Dekkera bruxellensis* é capaz de converter ApC, esse processo é possível a partir da ação sequencial de duas enzimas importantes: cinamato descarboxilase (CD), através de uma descarboxilase de ácido fenólico (PAD) que converte esses ácidos hidroxicinâmicos em vinilfenóis como o 4-vinilfenol (4VP) e em seguida são reduzidos utilizando um vinilfenol redutase (VR), que reduz esses compostos a derivados etílicos como 4-etilfenol (4EP). A atividade de CD é comumente encontrada em linhagens de *S. cerevisiae*, mas não atividade de VR, que se configura como específica para *Dekkera/Brettanomyces*. Essa transformação permite *Dekkera* metabolizar ácido em aromas desagradáveis e se destacar entre outras leveduras pela sua habilidade de converter ácidos hidroxicinâmicos em derivados etílicos (VANBENEDEN et al.,2008; GANGA et al.,2011; SCHIFFERDECKER et al., 2014; ABRAMOVIC et al.,2015; STEENSELS et al.,2015; VALDETARA et al., 2017; BERBEGAL et al., 2018).

A origem dos compostos fenólicos e enzimas envolvidos na conversão do ácido hidroxicinâmico foi relatada a partir de um estudo de Godoy et al., (2009). Foram isoladas as enzimas descarboxilase de p-cumarato (CD) e redutase de vinilfenol (VR). Onde evidenciou-se que o gene PAD que está presente tanto nas espécies *Dekkera* e *Saccharomyces*, é responsável pela atividade da cumarato descarboxilase. Contudo, a sequência do gene PAD em *Dekkera* se assemelha

mais à descarboxilase bacteriana de ácido fenólico do que ao gene PAD1 de *S. cerevisiae*. Um trabalho de SILVA et al., (2018) avaliou a produção de 4-EF em mostos de cana-de-açúcar por linhagens de *D. bruxellensis* em condições semelhantes às da indústria de bioetanol. Ainda, um estudo mostrou que 4-EF pode ser produzido em mostos de cana-de-açúcar por linhagens de *D. bruxellensis*, a produção desse composto pode ter impacto negativo na fermentação do etanol combustível (CURTIN et al.,2015; DA SILVA et al.,2019).

O efeito do 4-EF na eficiência fermentativa pode ser explicado pela ação desse composto sobre as células de levedura, afetando o crescimento e estado fisiológico, consequentemente, interferindo na produção de etanol. É possível que o 4-EF cause desvio no consumo de açúcar para manter as células e minimizar o estresse. Dessa forma, observa-se consumo mais lento de açúcar, menor produção de etanol e eficiência fermentativa. Ainda, estudos relatam que a taxa de produção 4-EF é dependente da linhagem de levedura (BAI et al.,2008; BARATA et al.,2008).

A levedura *Dekkera bruxellensis*, também apresenta um efeito positivo na taxa de crescimento quando cultivada na presença de ácido p-cumárico na concentração de 100mg/L. Além disso, Godoy et al. (2009) mostraram que quando ácidos hidroxicinâmicos são adicionados ao meio de cultura, a taxa de crescimento de *D. bruxellensis* é melhorada e também aumentam significativamente as atividades de ácido fenólico descarboxilase (PAD) e vinil fenol redutase (VR) e, portanto, a produção de 4-EF. Essa conversão de ApC em 4-EF fornece energia necessária para manter suas atividades metabólicas diante de estresse induzido por sulfito, que se caracteriza como um dos métodos de controle de contaminação mais comumente utilizados. A conversão de HCA em fenóis voláteis facilita a sobrevivência da levedura sob o estresse por sulfito (SUÁREZ et al., 2007; GODOY et al.,2008; SCHIFFERDECKER et al., 2014; BLOMQVIST & PASSOTH, 2015; CORONADO et al.,2015; AGNOLUCCI et al., 2017; AVRAMOVA et al., 2019; MALFEITO-FERREIRA, 2018; CHANDRA et al.,2023).

Devido sua atuação como contaminante e consequentemente seus efeitos indesejáveis à qualidade do vinho, é de extrema importância a eliminação de *D. bruxellensis* em processos fermentativos. Porém, é uma árdua missão em razão de sua tolerância a condições inóspitas, altos níveis de etanol e viabilidade de nutrientes. Em relação ao vinho, estratégia utilizada para controlar o crescimento de *D. bruxellensis* no vinho ocorre após a fermentação é o acréscimo de dióxido de enxofre ou sulfito, que atua como agente redutor e antioxidante, no entanto tolerância ou resistência a esse composto pode ser resultado da antropização e adaptação da levedura aos ambientes industriais (LIBERAL et al.,2007; DIVOL et al.,2012; SERPAGGI et al.,2012; REIS et al., 2013; GALLONE et al.,2016; GARCÍA-RÍOS & GUILLAMÒN,2019; KAEWKOD et al.,2019; G-POBLETE et al.,2020).

O metabolismo de ácidos hidroxicinâmicos em *B. bruxellensis* é importante na vinificação. Normalmente, a produção de fenóis voláteis está relacionada à tolerância da levedura à compostos fenólicos tóxicos, relacionando a efeitos antimicrobianos do ácido p-cumárico para aumento da fase Lag e diminuição da taxa de crescimento. A atividade das enzimas de fato, aumenta na presença de ApC em *B. bruxellensis*. Assim é compreensível que a levedura converta o ApC tóxico em compostos etílicos menos tóxicos para própria sobrevivência (GODOY et al.,2008; HARRIS et al.,2009;2010).

Algumas linhagens de *Dekkera* conseguem equilibrar suas funções metabólicas ao converter ácidos hidroxicinâmicos em vinilfenóis e utilizar a enzima VR para oxidar NADH em NAD⁺, reduzindo os vinilfenóis em etilfenóis. Leveduras não *Saccharomyces*, não apenas *D. bruxellensis*, mas também leveduras como *Dekkera anomala*, *Candida halophila*, *Candida mannitoformans*, *Candida versatilis*, *Candida wickerhamii*, *Candida cantarelli*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia guilliermondii* e bactérias lácticas, como *Lactobacillus plantarum* são conhecidos por produzir 4-EF em produtos relacionados com o vinho (DIAS et al. 2003a; BARATA et al. 2006; ŠUČUR et al.,2016; SANTAMARIA et al., 2018).

Leveduras *Dekkera* isoladas do vinho são conhecidas por produzirem 4-EF especialmente na fase estacionária de crescimento, quando o processo fermentativo do mosto de uva já acabou e o vinho com pouco açúcar é deixado para maturar. A produção de 4-EF pode ser necessária para equilibrar o balanço

NAD⁺/NADH ao oxidar o NADH em NAD⁺ e permitir a obtenção energética para seu crescimento celular (ŠUĆUR et al.,2016; MILHEIRO et al.,2017).

Indústrias da produção de bioetanol da região Nordeste do Brasil, destacam a levedura como um dos principais contaminantes da fermentação alcoólica. A contaminação nesse sentido ocorre pela competição por substratos industriais, floculação ou filamentação da levedura à produção de biofilmes, ácidos orgânicos e fenóis voláteis e pode ocorrer em tanques de fermentação, barris de envelhecimento e instalações de produção. Nesse contexto, em razão de alta adaptabilidade e habilidade de assimilar nitrato como fonte de nitrogênio, a linhagem GDB 248 de *Dekkera bruxellensis* confere maior sobrevivência no ambiente industrial, principalmente após o esgotamento de fontes primárias de nitrogênio, que suportam o crescimento celular (LIBERAL et al., 2007; DE BARROS PITA et al., 2011; BASSO et al.,2014; BASSI et al.,2018).

A presença de inibidores, tais como compostos fenólicos, tem efeitos adversos que podem reduzir a conversão de açúcares fermentáveis, ou representa impacto no crescimento e metabolismo das células de levedura, a capacidade de descarboxilar ácidos hidroxicinâmicos em compostos menos tóxicos poderia promover crescimento da levedura. Ainda, foi indicado que o ácido ferúlico tem um efeito inibitório mais essencial sobre *S. cerevisiae* do que o ácido p-cumárico (CORONADO et al.,2015; RICHARD et al.,2015; LIU et al., 2019; GU et al., 2019).

3.2. FISILOGIA DA LEVEDURA *DEKKERA BRUXELLENSIS*

Compreender a regulação do metabolismo de fontes de nitrogênio e carbono é crucial para otimização industrial e aplicações em bioprocessos. Tais nutrientes exercem funções essenciais para a levedura, como para seu crescimento, metabolismo e função celular. Desse modo, entender o perfil fermentativo representa avanço adaptativo no meio industrial, seja na produção de etanol combustível ou no mosto de uva ou malte para produção de vinhos ou cervejas, pois a disponibilidade de nutrientes essenciais pode afetar consideravelmente o crescimento e metabolismo microbiano nos processos

biotecnológicos, alterando rendimento e eficiência de processos influenciados pela falta ou concentração desses no meio (MOKTADUZZAMAN et al.,2015).

3.2.1. Metabolismo de assimilação de fontes de carbono

Durante seu metabolismo, a levedura converte carbono em energia por meio da fermentação ou respiração celular. O carbono além de fonte de energia é componente estrutural de outras moléculas, sendo utilizado na síntese de ácidos nucleicos, lipídios, proteínas e carboidratos vitais. Por meio do metabolismo do carbono a levedura pode se favorecer de diversos açúcares, ocorrendo metabolismo pela via glicolítica ou glicólise consistindo na quebra de moléculas menores, onde uma molécula de hexose é degradada à duas trioses de piruvato. Essas moléculas tornam-se fonte energética e atuam na síntese de outras moléculas (GALAFASSI et al.,2011; CRAUWELS et al.,2015; DA SILVA et al.,2019; CIBRARIO et al.,2020).

Em razão disso, *Dekkera* demonstra-se hábil em assimilar uma variedade de fontes de carbono (C), incluindo glicose, frutose, galactose, sacarose, maltose e etanol. Dentre essas, destaca-se sacarose, sendo encontrada no caldo de cana-de-açúcar para produção de bioetanol. Estudo de Leite et al. (2013) mostrou que independentemente do meio (sintético ou complexo) a linhagem GDB248 cresce mais rápido em sacarose do que em glicose. Além disso, estudo aponta que *Dekkera* é capaz de fermentar etanol a partir de celobiose, um dissacarídeo composto por ligação β -1,4 entre duas moléculas de glicose (CONTERNO et al.,2006; LEITE et al.,2012; CRAUWELS et al.,2015; REIS et al.,2016).

O metabolismo aeróbio dos açúcares é energeticamente mais favorável do que a fermentação anaeróbica. Apenas quando o metabolismo respiratório é prejudicado, os organismos usam seu metabolismo fermentativo, a exemplo de quando o oxigênio diminui. O fato de fermentar sob condições aeróbicas depende da capacidade de realizar fermentação alcoólica (ROZPEDOWSKA et al.,2011; PEÑA-MORENO et al.,2019; TELES et al.,2023).

Esse fenótipo está relacionado à saturação da capacidade celular em reoxidar NADH resultante da glicólise, pois ocorre desvio parcial da glicose para

fermentação e assim inclui-se em uma tática de “fazer-acumular-consumir” utilizada por microrganismos, que ao serem cultivados em aerobiose, podem consumir o etanol produzido no processo de respiração após o esgotamento de glicose no meio. Além disso, esse efeito fornece mais ATP comparado ao metabolismo em aerobiose devido à quebra eficiente da glicose por vias glicolíticas. No cenário industrial, representa uma característica relevante, pois aumenta a capacidade fermentativa da célula (DE DEKEN et al.,1966; PROCHÁZKA et al.,2010; ROZPEDOWSKA et al.,2011).

Em paralelo, além de produzir etanol sob condições aeróbicas outra característica da levedura é o efeito *custer*, que na falta de oxigênio atua inibindo a via glicolítica e consequentemente fermentação devido a redução da reoxidação do NADH e disponibilidade de NAD⁺ ocasionando um desequilíbrio redox, esse equilíbrio está ligado a relação NAD/NADH. Embora a assimilação de nitrato não seja encontrada em todas as linhagens, pois depende do fornecimento de NADPH para ser convertido em nitrito por nitrato redutase (NR) e depois em amônio por nitrito redutase (NiR). Outra habilidade é a alta produção de ácido acético sob aerobiose, que induz fatores redox reduzidos, nesse caso a demanda por NADPH para assimilação de nitrato explica a produção de acetato em anaerobiose demonstrando um perfil acetogênico da levedura (DE BARROS PITA et al.,2011; BLOMQVIST et al.,2012; GALAFASSI et al.,2013; LEITE et al.,2013; BORNEMAN et al.,2014; TELES et al.,2019,2023).

Já é bem elucidado o fato de que a glicose atua como uma fonte preferencial de carbono para a levedura. Dessa forma, exerce grande influência na assimilação de qualquer outra fonte de carbono no mosto fermentativo induzindo o mecanismo regulador da repressão catabólica da glicose (CGR), mecanismo ocorrido pelo acúmulo intracelular de glicose-6-fosfato, e frutose 1,6-bifosfato sendo rapidamente metabolizada pela via glicolítica e sendo convertida à etanol. Logo, mecanismos reguladores centrais como da glicose e do nitrogênio parecem ser menos rigorosos em *B. bruxellensis* em comparação com *S. cerevisiae* (PAUTASSO et al.,2016; PEETERS et al.,2017; DA SILVA et al.,2017,2019).

3.2.2. Metabolismo de assimilação de fontes de nitrogênio

Responsável pela síntese de novas proteínas e pelo crescimento celular, o nitrogênio é componente essencial de aminoácidos e nucleotídeos, blocos de construção de proteínas e ácidos nucleicos. Esse componente desempenha papel essencial na regulação do metabolismo de leveduras, podendo influenciar na expressão gênica. Em relação as fontes de nitrogênio (N), as mais utilizadas pela levedura incluem amônio, prolina, arginina e nitrato. Como fonte de nitrogênio, o nitrato desempenha importante papel para expressão de genes envolvidos na produção de enzimas, onde no metabolismo atua como fonte única de nitrogênio ou co-consumido com amônia, seja em meio aeróbico ou anaeróbico. Essa estratégia pode conferir avanço quanto a adaptabilidade dessa levedura ao meio nos processos industriais (DE BARROS PITA et al.,2011; PEREIRA et al.,2012; REIS et al., 2014; PEETERS et al.,2017).

Em razão de sua adaptabilidade, o metabolismo de *Dekkera* apresenta um cluster de genes envolvidos na assimilação de nitrato, fonte de nitrogênio frequentemente encontrada no caldo de cana. Sua presença no meio promove uso de acetato como substrato, melhorando eficiência e rendimento da produção de etanol, podendo potencializar a capacidade fermentativa sob restrição de oxigênio, ou quando associado à amônia. Contudo, aumenta os processos de produção volumétrica de etanol com base na cana-de-açúcar. Embora apresente perfil anaeróbio facultativo, estudo recente revelou que a assimilação anaeróbica de nitrato impõe estresse oxidativo as células da levedura, segundo dados proteômicos (WOOLFIT et al.,2007; DE BARROS PITA et al.,2011; GALAFASSI et al.,2013; PEÑA-MORENO et al.,2019,2021).

Além de produzir etanol sob condições aeróbicas, *D. bruxellensis* produz ácido acético a partir da glicose e uma pequena quantia de glicerol, ainda que em condições aeróbicas. A produção de ácido acético durante a fermentação alcoólica aeróbica induz fatores redox reduzidos, o que resulta na modificação de condição aeróbica para condições limitantes de oxigênio ocasionado pelo estresse redutivo podendo inibir o crescimento em razão do desequilíbrio redox (PROCHÁZKA et al.,2010; ROZPĘDOWSKA et al.,2011; GALAFASSI et al.,2013; LEITE et al.,2013).

Nesse sentido, a produção de biomassa e acetato por *D. bruxellensis*, em detrimento da produção de etanol, pode ser considerada como desvio energético, uma vez que reduz a disponibilidade de glicose para a via

fermentativa, reduzindo o rendimento em etanol (DE BARROS PITA et al, 2013; LEITE et al, 2013).

A utilização de fontes preferenciais de nitrogênio é decorrente de mecanismos regulatórios que selecionam tais fontes em detrimento de fontes não-preferenciais. Essa abordagem é base do mecanismo de Repressão Catabólica do Nitrogênio (NCR) e como permite a regulação do uso adequado dessas fontes, que ao estarem presentes no meio, transduzem um sinal, que logo ativa o sistema NCR que regula negativamente a expressão de genes componentes do metabolismo de fontes de nitrogênio não preferenciais. A capacidade de utilizar nitrato como fonte única pode impactar os processos de etanol à base de cana-de-açúcar (DE BARROS PITA et al.,2011; LJUNGDAHL & DAIGNAN- FORNIER, 2012; GALAFASSI et al.,2013; CAJUEIRO et al.,2017).

A assimilação do nitrato, no entanto não ocorre diretamente, pois, envolve uma série de etapas metabólicas. Primeiro, é transportado para as células através de um transportador de nitrato codificado pelo gene YNT1, posteriormente convertido à amônio por duas reduções catalisadas respectivamente por nitrato redutase codificada pelo gene YNT1 e por nitrito redutase codificada pelo gene YNI1, para que possa ser assimilado da subsequente conversão de nitrito em fonte de nitrogênio preferencial amônia. Além disso, a disponibilidade de nitrato pode afetar tanto em vias metabólicas específicas, como a via regulatória TOR que está relacionada à indução do crescimento celular, bem como na produção de enzimas relacionadas à fermentação de carboidratos (celobiase) ou degradação de compostos fenólicos. (HELLIWELL et al.,1998; SIVERIO et al., 2002; WOOLFIT et al.,2007; GODOY et al.,2008 G-POBLETE et al.,2020).

Com isso, tais características representam importância, visto que são fatores que estão diretamente ligados à indução do crescimento celular e que representam claramente um potencial de aplicação da levedura, resultado de suas adaptações fisiológicas. Recentemente, estudos evidenciaram que o crescimento da levedura em nitrato é similar à taxa de crescimento em amônio, quando não há oxigênio no meio, dados afirmam que o nitrato pode ser fonte preferencial sob condições de crescimento anaeróbio. Desse modo, a assimilação de nitrato representa um importante fator adaptativo em processos de fermentação industrial (CONTERNO et al., 2006; CRAUWELS et al.,2015; DE

BARROS PITA et al., 2011,2013,2019; GALAFASSI et al., 2013; PEÑA-MORENO et al.,2019).

3.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento sobre a fisiologia da levedura *Dekkera bruxellensis* ainda é algo muito limitado, havendo pouca informação e literatura disponível. Do ponto de vista metabólico, a maioria dos artigos utilizando nitrato como fonte de nitrogênio são do nosso grupo de pesquisa utilizando a linhagem GDB248. No contexto da fermentação alcoólica industrial, mostramos que a presença dessa fonte de nitrogênio confere não apenas alta adaptabilidade da levedura, mas também aumenta sua capacidade fermentativa. No entanto, há lacunas importantes que não foram preenchidas a respeito da fisiologia de assimilação desse nutriente por outras linhagens, nem o efeito dessa fonte de nitrogênio em outros contextos industriais, como por exemplo assimilação de ApC pela linhagem GDB248 isolada de bioetanol. Ainda, não há estudos em literatura que tenham mostrado o efeito de fontes de nitrogênio (NO_3 e NH_4) em mosto de uva e mosto de cana a partir de comparações das linhagens de *D. bruxellensis*.

No presente estudo, utilizamos a linhagem LAMAP2480 isolada da produção de vinho no Chile, bem como uma condição de substrato que simula o mosto de uva. A elucidação desse conhecimento é de suma importância para o desenvolvimento tecnológico da fermentação alcoólica de vinhos, cervejas e etanol combustível.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. LINHAGENS E MEIOS DE CULTURA

Para a realização do trabalho foram utilizadas duas linhagens de *Brettanomyces bruxellensis*, a linhagem GDB 248, linhagem brasileira isolada a partir de bioetanol, obtida a partir da coleção do Laboratório de Genética de microrganismos (LGM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e a linhagem LAMAP 2480 chilena isolada a partir de vinho Cabernet Sauvignon e obtida a partir da coleção do Laboratório de Biotecnologia e Microbiologia Aplicada (LAMAP) da Universidade de Santiago do Chile (USACH), gentilmente cedida pela Profa. Maria Angélica Ganga. As células foram mantidas e pré-cultivadas em placas de Petri meio sólido Yeast Peptone Dextrose (YPD) contendo (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 2% glicose e ágar 2%). Os pré-inóculos foram realizados em meio sintético adaptado em Yeast Nitrogen Base (YNB) contendo aminoácidos (6,7g/L) suplementado com 20g/L de glicose, sendo as células cultivadas em tubos de vidro em 10mL de volume final, agitação de 160 rpm em agitador orbital tipo shaker por 48 horas e cerca de 30°C.

Para a quantificação de leveduras e realização dos inóculos, foi utilizada a técnica de contagem pela câmara de Neubauer, onde a partir da contagem e aplicação do fator de diluição 10x foi possível realizar o inóculo posteriormente. Para a preparação dos mostos (meios de cultivo), realizada em capela de fluxo laminar, os reagentes foram pesados e diluídos em um litro de água destilada em frasco e posteriormente transferido para outro frasco estéril autoclavado e esterilizado por filtração à vácuo por uma bomba, auxiliado pelo uso de membranas de 0,45 µm e posteriormente uma segunda filtração usando membranas de 0,22 µm. Os cultivos aeróbios foram realizados em frascos de 200mL, com 100mL de volume final incubados à 30°C com agitação. Para as condições em que se inclui ácido p-cumárico, o composto foi preparado para uma solução stock, onde pesou-se 0,164g e diluiu-se em 10ml de etanol absoluto 99,5% P.A, filtrou-se e reservou em uma garrafa envolvido por papel alumínio. Para cada meio de cultivo de 100ml onde inclui-se ApC foi adicionado 609,76 µl (100ppm). O inóculo se deu em duas condições, em mosto de uva sintético adaptado contendo em sua composição (1,6 g/L de YNB sem sulfato de amônio

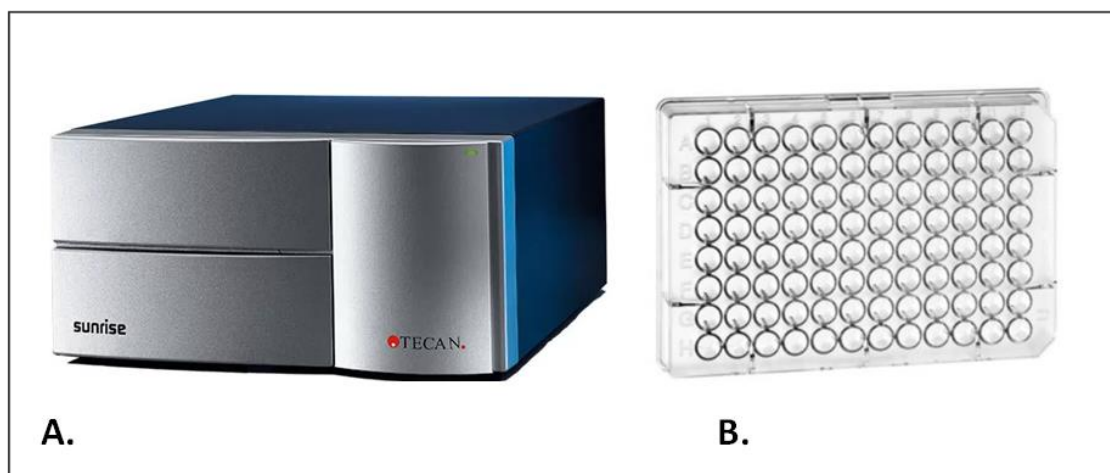
e aminoácidos (açúcares redutores: 77,5 g/L de glicose e 77,5 g/L de frutose; ácidos orgânicos: 5 g/L de ácido cítrico málico, 3 g/L de ácido cítrico; sais minerais: 0,25 g/L de sulfato de magnésio, 0,75 g/L de potássio fosfato, sulfato de manganês 4 mg/L; e dependendo do meio 6,43 g/L de nitrato de sódio ou 5 g/L de sulfato de amônio com pH ajustado para 3,3), e em mosto de caldo de cana sintético adaptado, contendo (1,6 g/L de YNB sem sulfato de amônio e aminoácidos, 155 g/L de sacarose e suplementação mineral preparada com minerais em a forma de sais na proporção 0,4 g/L de cloreto de amônio (NH_4Cl); 0,179 g/L Monopotássico Fosfato (KH_2PO_4), 1,5 g/L de cloreto de potássio (KCl), 0,244 g/L de cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,260 g/L de sulfato de magnésio di-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 7 mg/L de cloreto de alumínio (AlCl_3), 2 mg/L de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 12 mg/L de sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 12 mg /L de sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e 44 mg/L de sulfato de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) tendo seu pH ajustado para 5,4 (DE SOUZA et al., 2015; CORONADO et al., 2015).

4.2. ENSAIOS DE CRESCIMENTO EM MULTILEITOR DE PLACAS (TECAN)

Os cultivos foram realizados no equipamento multileitor de placas TECAN em microplacas com as mesmas condições realizadas nos experimentos em frascos. As células foram cultivadas em meio YNB contendo aminoácidos (6,7g/L) suplementado com 20g/L de glicose, e crescidas em tubos de vidro em 10mL, agitação de 160 rpm em agitador orbital shaker por 48 horas e 30°C. Posteriormente após crescimento, foi realizada quantificação de leveduras pelo câmara de Neubauer sendo utilizada da marca improved bright-line 0,100mm modelo 7301-1B com concentração inicial de 1×10^6 para inóculo de 200µL em cada poço de cada meio respectivo em mosto de uva e mosto de caldo de cana com sua fonte de nitrogênio: amônio ou nitrato, e contendo ou não a presença de ApC, utilizando 30°C, agitação continua e foram realizadas leituras no período de 4h em 4h durante cinco dias. Todos os crescimentos foram realizados em triplicata biológica e controle negativo contendo apenas o meio de cultivo. As velocidades específicas de crescimento foram realizadas a partir da linearização

de $\ln(x)$, determinação da fase exponencial, regressão linear, enquanto que a inclinação da reta apontou a velocidade específica de crescimento.

Figura 2: A. equipamento para cultivo (TECAN); B. microplaca de 96 poços



Fonte: A - <https://rchisto.com.br/produtos/leituras-de-microplacas/sunrise/> B - <https://shop.gbo.com/pt/brazil/products/bioscience/imunologia-hla/96-well-elisa-microplates/650061.html>

4.3. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Análises para identificar o perfil comportamental dos cultivos celulares foram realizadas a partir das duas linhagens: LAMAP 2480 e GDB248, onde foram avaliadas cada uma em mosto de uva com nitrato (NO_3) e mosto de uva com amônia (NH_4), mosto de cana com nitrato (NO_3) e mosto de cana com amônia (NH_4), com e sem a adição de ácido p-cumárico (100 ppm) em cada um dos meios. As leveduras foram incubadas à 30°C com agitação constante 160 RPM durante 72 horas, onde foram realizados dois inóculos, um iniciando às 9h e outro às 17h. Durante esse período, foram coletadas amostras de cada uma das condições para avaliar o perfil cinético de crescimento através da contagem de leveduras, realizadas durante toda a semana do experimento, sempre às 9h e 17h. Além das alíquotas retiradas para contagem de células, também foram retiradas alíquotas das amostras no volume de 2ml de cada condição de cultivo, essas foram filtradas, processadas e armazenadas em freezer à -20°C para posterior análise determinada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.4. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS EXTRACELULARES (CLAE)

Para a determinação das amostras por CLAE foi determinado o tempo de 40h de cultivo celular para todas as condições de cultivo. Para análise dos ácidos orgânicos, utilizou-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Shimadzu com coluna Aminex HPX 87-H+ com fase móvel H₂SO₄ 0,005 mol. L⁻¹; fluxo de 0,6 mL.min⁻¹; temperatura do forno de 50°C e detector de índice de refração 35°C, com objetivo de avaliar o consumo de carbono e produção de metabólitos extracelulares (etanol, glicerol e acetato) (LEITE et al., 2013; PARENTE et al 2018; PEÑA-MORENO et al., 2019; TELES et al.,2022).

Ainda, foi possível agrupar e padronizar os dados brutos através da análise de clusterização, onde a partir de agrupamentos alcança percentual de média e a razão, e agrupa os dados a partir das condições que mais se assimilam, ocorrendo relação dos parâmetros. O padrão de cores relacionado na escala, representa quão mais escuro ou mais claro, onde quão mais escuro e afastado do ponto 0 significa o afastamento pra cima da média, quanto quão mais claro e afastado do ponto 0 pra baixo, significa o afastamento pra baixo da média. Dessa maneira, o programa compara as condições submetidas e a partir de valores similares realiza agrupamento.

Os parâmetros de agrupamento ocorreram a partir dos parâmetros: tipo de linhagem de levedura (GDB248 ou LAMAP2480), tipo da fonte de nitrogênio (amônio ou nitrato), tipo de substrato (mosto de cana ou mosto de uva), presença ou ausência de ApC, consumo de nitrogênio, consumo de ApC, produção de 4-vinilfenol, produção de 4-etilfenol, produção de acetato, consumo de malato, consumo de citrato, consumo de açúcar, produção de etanol, produção de glicerol, produção de malato e produção de citrato.

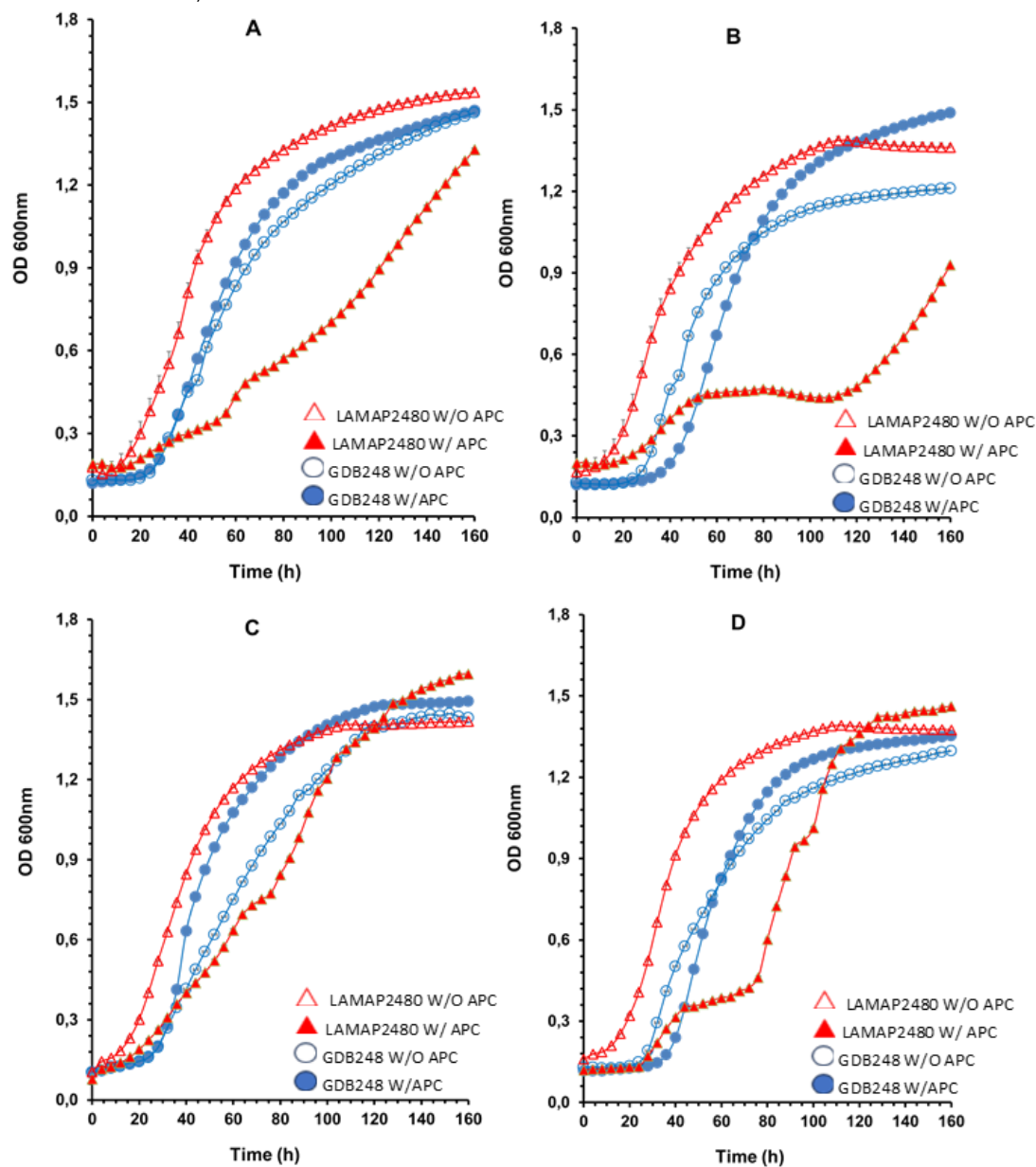
5. RESULTADOS

5.1. PERFIL DE CRESCIMENTO DAS LEVEDURAS EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO E NA PRESENÇA DE ÁCIDO P-CUMÁRICO SOB RESTRIÇÃO DE OXIGÊNIO

Foram comparados o perfil de crescimento das linhagens GDB248 proveniente da produção de etanol combustível e da linhagem LAMAP2480 proveniente da produção de vinho em meio mineral contendo glicose como fonte de carbono, amônio ou nitrato como fonte de nitrogênio e na ausência ou presença de ácido p-cumárico (ApC) (Figura 3). Para esses experimentos foram formulados dois meios de cultura: um simulando o caldo de cana utilizado na produção de etanol e outro simulando o mosto de uva para produção de vinho. Desta forma, as linhagens foram cultivadas tanto no meio onde foram originadas quanto no meio da outra linhagem.

Na condição de mosto de cana utilizando amônio foi observada uma fase lag de 20h para a linhagem GDB248, seguida de crescimento exponencial (Log) com velocidade média $0,05 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 1). Esses parâmetros são tidos como de referência para esta levedura nessas condições de cultivo. Numa comparação direta, a linhagem LAMAP2480 apresentou a mesma velocidade de crescimento com redução de 2,5x na duração da fase lag (Figura 3a; Tabela 1). A presença de ApC promoveu aumento na velocidade de crescimento da linhagem GDB248, mantendo a duração da fase lag (Figura 3a; Tabela 1). Por outro lado, diminuiu pela metade a velocidade de crescimento e aumentou em 33% a duração da fase lag para a linhagem GDB248. Já no mosto de uva utilizando amônio, observou-se fase lag de 20h para a linhagem GDB248, com crescimento exponencial de velocidade média $0,06 \text{ h}^{-1}$ comparando diretamente com LAMAP2480 atingiu fase lag 8h e velocidade média de crescimento de $0,05 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 1). Assim, embora as duas linhagens apresentem velocidade média similar, LAMAP2480 alcança sua fase lag mais rapidamente (Figura 3b; Tabela 1).

Figura 3- Crescimento das linhagens GDB248 e LAMAP2480 de *Dekkera bruxellensis* sob restrição de oxigênio. **A.** Mosto de cana com amônio; **B.** Mosto de uva com amônio; **C.** Mosto de cana com nitrato; **D.** Mosto de uva com nitrato.



Fonte: O Autor (2024)

Na condição de mosto de cana utilizando nitrato foi observada uma fase lag de 20h para a linhagem GDB248, seguida de crescimento exponencial (Log) com velocidade média $0,03 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 1). Numa comparação direta, a linhagem LAMAP2480 apresentou velocidade média de crescimento $0,04 \text{ h}^{-1}$ e redução da fase lag para 8h. A presença de ApC promoveu queda na velocidade de crescimento da linhagem LAMAP2480 (Figura 3c; Tabela 1). Ainda, na ausência

de ApC, observa-se aumento da velocidade de crescimento e diminuição da fase lag. Para o mosto de uva utilizando nitrato, nota-se fase lag de 20h para GDB248, com crescimento exponencial de velocidade média $0,08 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 1). Comparando diretamente com a linhagem LAMAP2480, observou-se fase lag de 8h e velocidade de crescimento $0,06 \text{ h}^{-1}$ (Figura 3d; Tabela 1). A presença de ApC nos mostos de uva não apresentou diferença para linhagem GDB248. No entanto, para linhagem LAMAP2480 observou-se breve redução da velocidade de crescimento exponencial na presença de ApC.

Tabela 1- Valores de duração da fase lag e da velocidade de crescimento das linhagens GDB248 e LAMAP2480 em mosto sintético de cana de açúcar e de uva.

Linhagem	Tipo de N	ApC	Mosto de cana		Mosto de uva	
			lag (h)	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	lag (h)	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$
GDB 248	NH4	-	20	0,05	20	0,06
GDB 248	NH4	+	20	0,07	20	0,05
GDB 248	NO3	-	20	0,03	20	0,08
GDB 248	NO3	+	20	0,09	28	0,08
LAMAP 2480	NH4	-	8	0,05	8	0,05
LAMAP 2480	NH4	+	16	0,02	16	0,03
LAMAP 2480	NO3	-	8	0,04	8	0,06
LAMAP 2480	NO3	+	8	0,03	24	0,05

Fonte: O Autor (2024)

A partir da comparação direta entre mostos sem utilização de ApC, observa-se que a linhagem GDB248 alcança a fase lag de 20h igualmente para todos os mostos independente da fonte de nitrogênio utilizada. Porém, a velocidade do crescimento exponencial é maior em mosto de uva utilizando nitrato $0,08 \text{ h}^{-1}$ ao mesmo tempo que utilizando amônio atinge $0,06 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 1). Ao comparar os mostos de cana, observa-se uma inversão da preferência da fonte de nitrogênio para os parâmetros de velocidade de crescimento exponencial, onde utilizando amônio a linhagem GDB248 alcança $0,05 \text{ h}^{-1}$, ao ponto que utilizando nitrato chega à $0,03 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 1).

Ainda, avaliando em comparação direta entre mostos sem utilização de ApC, para a linhagem LAMAP2480 notou-se que independentemente do mosto

utilizado e da fonte de nitrogênio, todas as condições alcançaram fase lag em 8h. Porém, velocidade de crescimento exponencial foi maior em mosto de uva utilizando nitrato $0,06 \text{ h}^{-1}$, utilizando amônio teve crescimento similar atingindo $0,05 \text{ h}^{-1}$. Ao comparar em relação ao mosto de cana, maior crescimento é observado utilizando amônio $0,05 \text{ h}^{-1}$ sendo que com nitrato alcança crescimento exponencial de $0,04 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 1).

Em mosto de cana, independente da presença de ApC e da fonte de nitrogênio utilizada, a linhagem GDB248 alcança fase lag no tempo de 20h, e maior velocidade de crescimento exponencial $0,09 \text{ h}^{-1}$ utilizando nitrato e sob a presença de ApC, em contrapartida menor taxa de crescimento exponencial é vista também utilizando nitrato, no entanto sem a presença de ApC. Utilizando amônio, o mesmo padrão se repete. Dessa forma, pode-se afirmar que a presença de ApC suporta maiores taxas de crescimento para a linhagem GDB248 (Tabela 1).

A linhagem LAMAP2480 atinge sua fase lag em 8h. Exceto para a condição em que assimila amônio sob a presença de ApC, onde dobra e atinge sua fase lag em 16h e ainda assim alcança a menor taxa de crescimento exponencial dentre todas as condições para a linhagem $0,02 \text{ h}^{-1}$ no mesmo tempo que maior crescimento é visto utilizando amônio $0,05 \text{ h}^{-1}$. De forma geral, LAMAP2480 apresenta maior crescimento sem a presença de ApC tanto em amônio quanto em nitrato como fonte de nitrogênio (Tabela 1). No entanto, em mostos de uva, observa-se que a linhagem GDB248 assimilando amônio e na presença de ApC apresenta crescimento similar a condição que na ausência desse composto. Ainda é visto que, utilizando nitrato na presença de ApC a levedura atinge sua fase lag apenas em 28h, totalizando 8 horas a mais que as outras condições, sendo que independente da presença de ApC alcança crescimento de $0,08 \text{ h}^{-1}$.

O comportamento da linhagem LAMAP2480 não apresenta um padrão, exceto pelo fato de alcançar sua fase lag de 8h, e alcançar similar taxa de crescimento independente da fonte de nitrogênio utilizada, porém, sem a presença de ApC. Maior fase lag observada é assimilando nitrato, sob a presença de ApC, onde a linhagem alcança sua fase lag apenas em 24h, resultando em 8h à mais que utilizando amônio na mesma condição (Tabela 1; figura 3a).

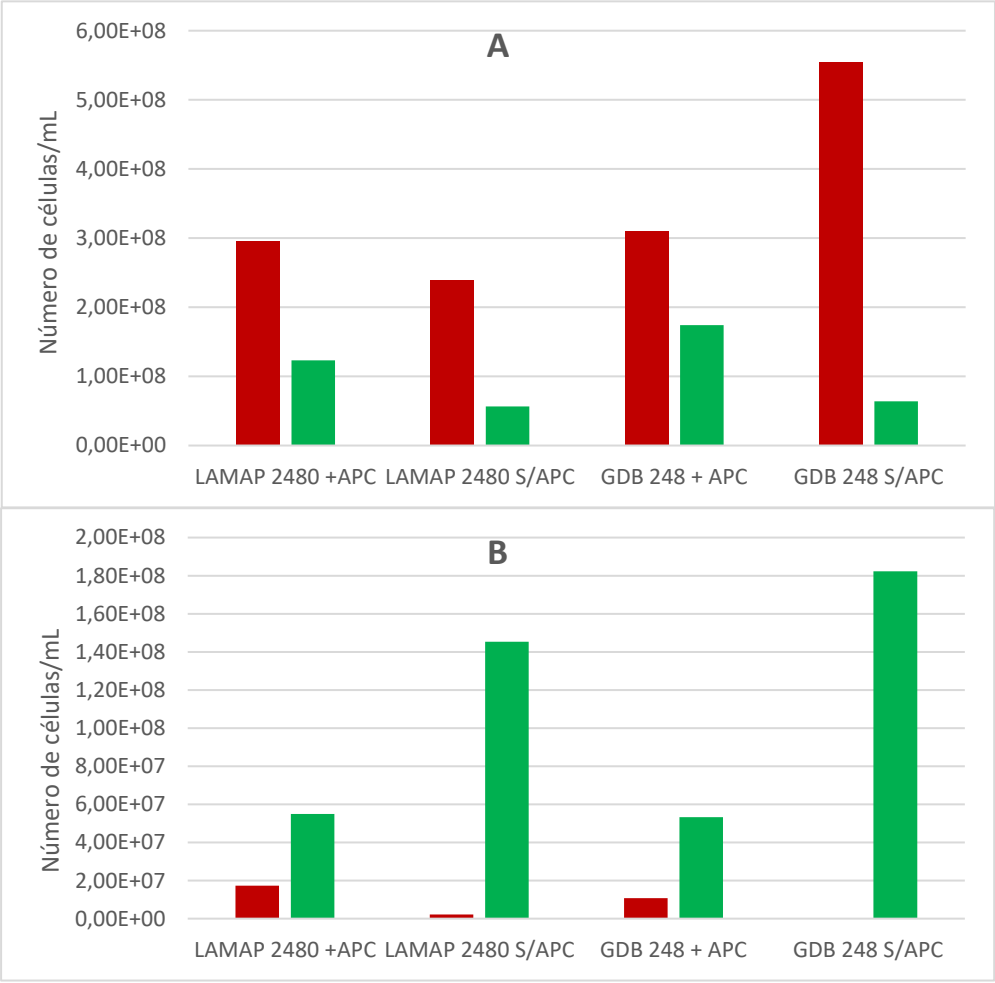
5.2. CRESCIMENTO DE *DEKKERA BRUXELLENSIS* GDB248 E LAMAP2480 COM UTILIZAÇÃO DE ÁCIDO P-CUMÁRICO EM CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

De modo geral, a maior produção de biomassa durante a fermentação foi observada para as duas linhagens em meio de cultura simulando mosto de uva contendo amônio (Figura 4A), com destaque para a linhagem GDB 248 nesse meio sem ApC (Figura 4A). Nesse contexto, a presença de ApC afetou de forma negativa mais a GDB 248 do que a LAMAP 2480. Por outro lado, a presença de ApC diminuiu a formação de biomassa no meio simulando caldo de cana de maneira semelhante para as duas linhagens (Figura 4A). A presença de nitrato como fonte de nitrogênio impediu o crescimento celular das duas linhagens no meio simulando mosto de uva contendo nitrato, independente da presença de ApC (Figura 4B). Já no meio caldo de cana com nitrato, o crescimento celular das linhagens foi maior na ausência de ApC (Figura 4B).

Em linhas gerais, a formação de biomassa pela linhagem GDB 248 (Figura 5A) foi maior do que para a linhagem LAMAP 2480 (Figura 5B), mas o perfil de resposta às diferentes condições de cultivo foi praticamente igual. Isso indica que as duas linhagens apresentam um comportamento metabólico semelhante, embora tenham sido isoladas de contexto industriais bem diferentes. A linhagem LAMAP 2480 também foi capaz de utilizar nitrato como fonte de nitrogênio em condições de fermentação, mas apenas em meio sintético simulando caldo de cana. Por outro lado, a presença de nitrato impede o crescimento das duas linhagens em meio sintético simulando mosto de uva. É possível que isto esteja relacionado a presença do ácido cítrico e málico no mosto de uva. A repercussão industrial desse achado pode ser relevante na medida em que a adição de nitrato ao mosto de uva para produção de vinho possa controlar ou eliminar a indesejável presença de *Dekkera*, desde que isso não venha a alterar a qualidade do vinho.

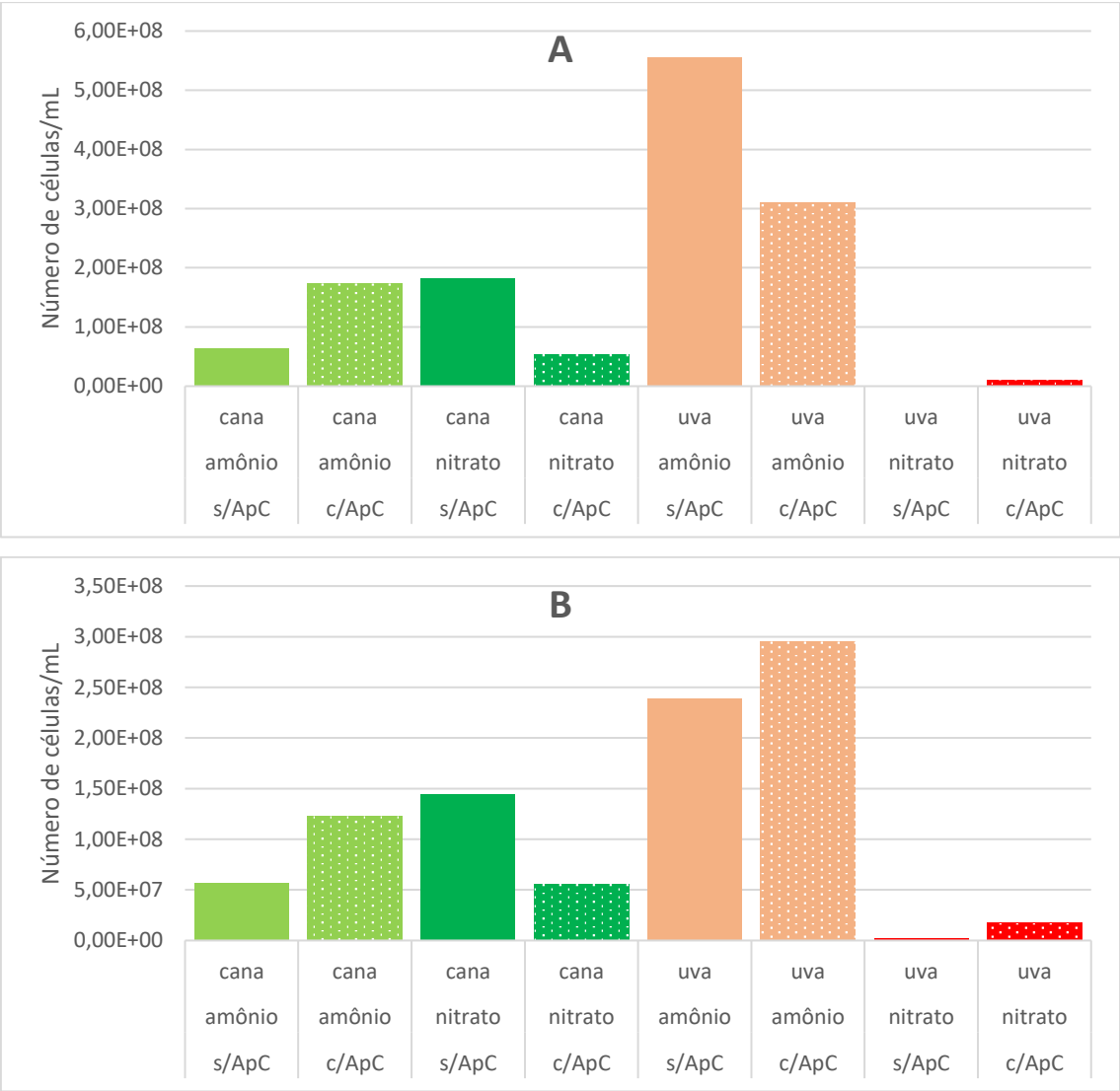
Amostras do sobrenadante foram analisadas para se determinar os padrões de consumo de nutrientes e formação de produtos durante a fermentação nas diferentes condições (Tabelas 2 e 3) para se entender o perfil fisiológico das duas linhagens de levedura. Para facilitar a análise, esses dados serão tratados separadamente com tabelas individualizadas.

Figura 4- Concentração das células de *Dekkera bruxellensis* no tempo 40h de fermentação nos meios sintéticos de caldo de cana (colunas em verde) e de mosto de uva (colunas em vermelho) contendo amônio (A) ou nitrato (B) com fonte de nitrogênio na ausência ou presença de ácido p-cumárico.



Fonte: O Autor (2024)

Figura 5- Densidade das células das linhagens GDB 248 **(A)** e LAMAP 2840 **(B)** de *Dekkera bruxellensis* no tempo 40h de fermentação nos meios sintéticos simulando caldo de cana (colunas em verde) ou mosto de uva (colunas em vermelho) com amônio (claro) ou nitrato (escuro) na ausência (coluna cheia) ou presença (coluna pontilhada) de ApC.



Fonte: O Autor (2024)

Tabela 2 – Perfil fisiológico das linhagens GDB 248 e LAMAP 2480 de *Dekkera bruxellensis* em experimentos de fermentação por 40h de meios minerais simulando caldo de cana e mosto de uva em duas fontes de nitrogênio e na presença de ácido p-cumárico.

Linhagem	S	N	ApC	Metabólitos consumidos						Metabólitos produzidos						
				NH ₄	NO ₃	Açúcar	AML	ACT	ApC	Etanol	Glicerol	AAC	AML	ACT	4-VF	4-EF
				g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	mg/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	mg/L	mg/L
GDB 248	Cana	NH ₄	-	2,46	n.a.	140,95	n.a.	n.a.	n.a.	54,03	0,90	0,30	4,90	2,90	n.a.	n.a.
	Cana	NH ₄	+	3,07	n.a.	124,60	n.a.	n.a.	99,90	47,76	0,85	0,40	4,80	2,90	0,10	3,70
	Uva	NH ₄	-	2,40	n.a.	170,35	2,23	0,60	n.a.	65,30	0,82	0,90	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Uva	NH ₄	+	3,02	n.a.	167,90	1,33	0,80	99,85	64,36	0,90	0,50	n.a.	n.a.	24,20	3,70
LAMAP 2480	Cana	NH ₄	-	2,27	n.a.	134,50	n.a.	n.a.	n.a.	55,30	0,45	0,30	4,90	2,90	n.a.	n.a.
	Cana	NH ₄	+	2,75	n.a.	104,00	n.a.	n.a.	99,80	44,96	0,45	0,50	4,53	2,90	36,85	9,00
	Uva	NH ₄	-	2,21	n.a.	162,40	1,65	0,60	n.a.	54,23	0,40	0,40	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Uva	NH ₄		2,87	n.a.	167,00	1,80	0,80	99,70	52,65	0,50	0,45	n.a.	n.a.	97,45	3,80
GDB 248	Cana	NO ₃	-	n.a.	2,27	163,70	n.a.	n.a.	n.a.	36,83	0,30	n.a.	4,70	0,00	n.a.	n.a.
	Cana	NO ₃	+	n.a.	1,91	162,95	n.a.	n.a.	99,80	28,48	0,00	0,95	4,85	0,00	38,45	22,74
	Uva	NO ₃	-	n.a.	1,78	117,89	1,60	0,85	n.a.	44,47	0,25	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Uva	NO ₃	+	n.a.	2,08	114,46	1,55	0,90	99,80	45,73	0,00	n.a.	n.a.	n.a.	33,40	3,05
LAMAP 2480	Cana	NO ₃	-	n.a.	1,59	165,05	n.a.	n.a.	n.a.	38,63	0,30	n.a.	4,65	0,00	n.a.	n.a.
	Cana	NO ₃	+	n.a.	2,69	160,25	n.a.	n.a.	99,50	44,75	0,00	n.a.	4,80	0,00	64,20	8,75
	Uva	NO ₃	-	n.a.	2,27	107,80	1,50	0,80	n.a.	32,02	0,25	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Uva	NO ₃	+	n.a.	2,14	167,95	1,55	0,80	99,30	50,31	0,00	n.a.	n.a.	n.a.	47,20	3,00

Fonte: O Autor (2024). S: substrato; Cana: simulado sintético de caldo de cana; Uva: simulado sintético de suco de uva; ApC: ácido p-cumárico; NH₄: amônio; NO₃: nitrato; AML: ácido málico; ACT: ácido cítrico; AAC: ácido acético; 4-VF: 4-vinilfenol; 4-EF: 4-etilfenol; na: não aplicável.

Tabela 3 – Resultados convertidos para valores molares do perfil fermentativo apresentado na Tabela 2.

Linhagem	S	N	ApC	Metabólitos consumidos						Metabólitos produzidos						
				NH ₄	NO ₃	Açúcar	AML	ACT	ApC	Etanol	Glicerol	AAC	AML	ACT	4-VF	4-EF
				mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	μmol/L							
GDB 248	Cana	NH ₄	-	18,61	n.a.	783,06	n.a.	n.a.	n.a.	117,46	9,77	5,00	36,55	15,09	n.a.	n.a.
	Cana	NH ₄	+	23,23	n.a.	692,22	n.a.	n.a.	609,00	103,83	9,23	6,67	35,80	15,09	133,17	30,29
	Uva	NH ₄	-	18,16	n.a.	946,39	16,63	3,12	n.a.	141,96	8,90	15,00	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Uva	NH ₄	+	22,87	n.a.	932,78	9,92	4,16	608,69	139,92	9,77	8,33	n.a.	n.a.	161,14	30,29
LAMAP 2480	Cana	NH ₄	-	17,21	n.a.	747,22	n.a.	n.a.	n.a.	80,06	4,89	5,00	36,55	15,09	n.a.	n.a.
	Cana	NH ₄	+	20,82	n.a.	577,78	n.a.	n.a.	608,39	61,90	4,89	8,33	33,79	15,09	245,37	73,67
	Uva	NH ₄	-	16,74	n.a.	902,22	12,31	3,12	n.a.	96,67	4,34	6,67	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Uva			21,72	n.a.	927,78	13,42	4,16	607,78	99,40	5,43	7,50	n.a.	n.a.	432,59	71,11
GDB 248	Cana	NO ₃	-	n.a.	26,71	909,44	n.a.	n.a.	n.a.	163,70	3,26	0,00	35,05	0,00	n.a.	n.a.
	Cana	NO ₃	+	n.a.	22,51	905,28	n.a.	n.a.	608,39	162,95	0,00	0,00	36,17	0,00	256,03	31,02
	Uva	NO ₃	-	n.a.	20,96	654,94	11,93	4,42	n.a.	117,89	2,71	0,00	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Uva	NO ₃	+	n.a.	24,43	635,89	11,56	4,68	608,46	114,46	0,00	0,00	n.a.	n.a.	222,40	24,97
LAMAP 2480	Cana	NO ₃	-	n.a.	18,70	916,94	n.a.	n.a.	n.a.	95,25	3,26	0,00	34,68	0,00	n.a.	n.a.
	Cana	NO ₃	+	n.a.	31,67	890,28	n.a.	n.a.	606,56	87,65	0,00	0,00	35,80	0,00	427,49	71,63
	Uva	NO ₃	-	n.a.	26,74	598,89	11,19	4,16	n.a.	62,71	2,71	0,00	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Uva	NO ₃	+	n.a.	25,13	933,06	11,56	4,16	607,80	98,54	0,00	0,00	n.a.	n.a.	314,29	64,56

Fonte: O Autor (2024).

Em linhas gerais, não foi observada diferença no consumo de glicose quando em meio contendo amônio (814 mmol/L $\pm$ 135) ou nitrato (806 mmol/L $\pm$ 147) considerando a linhagem celular, o tipo de substrato e a presença de ApC. Também não foi observada diferença significativa entre o consumo de amônio (20 mmol/L $\pm$ 2,6) e de nitrato (24,6 mmol/L $\pm$ 4). Ou seja, na condição de fermentação, a levedura *D. bruxellensis* assimila as duas fontes de nitrogênio com igual eficiência pelas permeases Mep1 (para amônio) e Ynt1 (para nitrato). Especificamente para o meio simulando mosto de uva, o consumo de ácido málico em meio com amônio (13 mmol/L $\pm$ 2,8) foi semelhante ao do meio com nitrato (11,6 mmol/L $\pm$ 0,3). Da mesma forma, o consumo de ácido cítrico em meio com amônio (3,6 mmol/L $\pm$ 0,6) foi semelhante ao do meio com nitrato (4,4 mmol/L $\pm$ 0,3). Da mesma maneira, não houve diferença no consumo de ApC nos meios com amônio (609 mmol/L $\pm$ 0,5) e no meio com nitrato (608 mmol/L $\pm$ 0,9).

5.3. ANÁLISE DO CONSUMO DE AÇÚCAR

A Tabela 4 resume os dados de consumo de glicose durante a fermentação em amônio como fonte de nitrogênio. Esse consumo foi semelhante no mosto de caldo de cana sem ApC para GDB 248 (783 mmol/L) e LAMAP 2480 (747 mmol/L). Por outro lado, a presença de ApC aumentou o consumo de glicose pela GDB 248 para 692 mmol/L e diminui o consumo de glicose pela LAMAP 2480 para 578 mmol/L. Em mosto de uva, o consumo de glicose tanto pela GDB248 (946 mmol/L) quanto pela LAMAP 2480 (902 mmol/L) foi consideravelmente maior do que em mosto de cana. Esse consumo se manteve alto mesmo na presença de ApC para GDB248 (933 mmol/L) e para LAMAP 2480 (928 mmol/L). Portanto, o mosto de uva estimula o consumo de glicose pelas células da levedura.

A Tabela 5 resume os dados de consumo de glicose durante a fermentação em nitrato como fonte de nitrogênio. Esse consumo foi semelhante no mosto de caldo de cana sem ApC para GDB 248 (919 mmol/L) e LAMAP 2480 (917 mmol/L). Por outro lado, a presença de ApC aumentou o consumo de glicose pela GDB 248 para 905 mmol/L e diminui o consumo de glicose pela LAMAP 2480 para 890 mmol/L. Em mosto de uva, o consumo geral de glicose

foi quase a metade do que em meio de caldo de cana tanto pela GDB248 (529 mmol/L) quanto pela LAMAP 2480 (488 mmol/L). Esse consumo caiu ainda mais na presença de ApC para GDB248 (487 mmol/L), mas significativamente aumentou para LAMAP 2480 (766 mmol/L).

Tabela 4- Consumo de glicose pela levedura *Dekkera bruxellensis* em amônio.

Linhagem	Fonte n	Mosto	ApC	Média (mmol/L)
GDB248	NH ₄	CANA	(-)	783,1
GDB248	NH ₄	CANA	(+)	692,2
GDB248	NH ₄	UVA	(-)	946,4
GDB248	NH ₄	UVA	(+)	932,8
LAMAP2480	NH ₄	CANA	(-)	747,2
LAMAP2480	NH ₄	CANA	(+)	577,8
LAMAP2480	NH ₄	UVA	(-)	902,2
LAMAP2480	NH ₄	UVA	(+)	927,8

Fonte: O Autor (2024).

Tabela 5- Consumo de glicose pela levedura *Dekkera bruxellensis* em nitrato.

Linhagem	Fonte n	Mosto	ApC	Média (mmol/L)
GDB248	NO ₃	CANA	(-)	909,4
GDB248	NO ₃	CANA	(+)	905,3
GDB248	NO ₃	UVA	(-)	529,2
GDB248	NO ₃	UVA	(+)	486,9
LAMAP2480	NO ₃	CANA	(-)	916,9
LAMAP2480	NO ₃	CANA	(+)	890,3
LAMAP2480	NO ₃	UVA	(-)	487,8
LAMAP2480	NO ₃	UVA	(+)	766,4

Fonte: O Autor (2024).

Dessa forma, ao comparar todos os mostos contendo amônio (NH₄) obteve-se uma média de 813,7 mg/L $\pm$ 135,4, ao mesmo tempo com nitrato (NO₃) alcançou uma média de consumo de 736,5 $\pm$ 200,9. Assim, pode-se concluir que não houve diferença no consumo de glicose pelo tipo de fonte de nitrogênio do meio. A levedura GDB248 avaliada em todos os meios contendo NH₄, obtém uma média de 838,6 $\pm$ 122,5, já em NO₃ consome cerca de 707,7 $\pm$ 231,2. Em relação a outra linhagem de levedura LAMAP2480, ao ser cultivada

em NH₄, apresenta média de consumo para todas as condições nessa mesma fonte de nitrogênio de $788,8 \pm 161,7$, quando a fonte de nitrogênio é NO₃, a média de consumo para as condições submetidas é $765,3 \pm 196,3$. Dessa forma, foi possível constatar que não houve diferença no consumo de glicose entre as duas linhagens de *Dekkera bruxellensis*, independentemente da fonte de nitrogênio utilizada (Tabela 6). Embora as diferenças, pode-se avaliar que há uma tendência de que o consumo de glicose pela linhagem LAMAP 2480 não sofra interferência da fonte de nitrogênio, em oposição a linhagem GDB 248 apresenta queda do consumo de glicose pelo consumo de nitrato (Tabela 6).

Tabela 6- Hierarquização do consumo de glicose pelas linhagens de *Dekkera bruxellensis* em função da fonte de nitrogênio no meio.

Fonte de n	Linhagem	Média (mmol/L)	Desvio Padrão
NH ₄	GDB248	838,6	122,5
NH ₄	LAMAP2480	788,8	161,7
NO ₃	LAMAP2480	765,3	196,3
NO ₃	GDB248	707,7	231,2

Fonte: O Autor (2024).

O maior consumo de glicose foi observado em mosto de uva contendo amônio (927,3 mmol/L), seguido do mosto de cana contendo nitrato (905,5 mmol/L), mosto de cana contendo amônio (700 mmol/L) e mosto de uva contendo nitrato (568 mmol/L) (Tabela 7). A análise não aponta diferenças significativas entre o meio de mosto de uva com amônio e o meio de caldo de cana com nitrato. Isso indica que a assimilação de ácido málico e ácido cítrico presentes no mosto de uva sintético produz o mesmo efeito fisiológico no metabolismo central das leveduras que a assimilação de nitrato no meio de caldo de cana sintético.

O efeito do ApC sobre o consumo de glicose foi menos evidente, embora se possa observar uma tendência entre as condições (Tabela 8). Esse parâmetro parece ser mais afetado pela fonte de nitrogênio do que pelo ApC, e não há evidência de que a assimilação de nitrato potencialize qualquer efeito tóxico do ApC. O elevado valor de desvio padrão mostra também um efeito da linhagem da levedura (Tabela 6) como pela composição dos meios de cultura sintéticos

simulando caldo de cana ou mosto de uva (Tabela 7). Portanto, independente da levedura e da presença de ApC, as células cultivadas em amônio assimilam muito mais o açúcar em mosto de uva do que em mosto de cana quando não estão sob estresse pela presença de Apc.

Tabela 7- Hierarquização do consumo de glicose pelas linhagens de *Dekkera bruxellensis* em função da composição no meio

Fonte de n	Meio de cultivo	Média (Mg/L)	Desvio Padrão
NH4	MOSTO DE UVA	927,3	18,5
NO3	MOSTO DE CANA	905,5	11,2
NH4	MOSTO DE CANA	700,1	89,7
NO3	MOSTO DE UVA	567,6	134,0

Fonte: O Autor (2024).

Tabela 8- Hierarquização do consumo de glicose pelas linhagens de *Dekkera bruxellensis* em função da presença de ácido p-cumárico.

Fonte de n	ApC	Média (mmol/L)	Desvio Padrão
NH4	(-) ApC	844,7	94,8
NH4	(+) ApC	782,6	176,8
NO3	(+) ApC	762,2	193,8
NO3	(-) ApC	719,8	234,3

Fonte: O Autor (2024).

5.4. ANÁLISE DO CONSUMO DA FONTE DE NITROGÊNIO

A Tabela 10 resume os dados de consumo de amônio durante a fermentação. Como já apontado acima, o consumo de nitrato foi em média 25% maior do que o consumo de amônio, mas ainda dentro do desvio padrão (Tabela 9). Ao avaliar a diferença no consumo de nitrogênio pelo tipo de fonte de nitrogênio utilizada no meio de cultivo, evidenciou-se maior consumo 26 mmol/L ($\pm 5,4$) pela linhagem LAMAP2480 contendo nitrato no meio. GDB248 responde de forma similar atingindo cerca de 24 mmol/L ($\pm 2,5$). Nos meios contendo amônio como fonte de nitrogênio a levedura GDB248 consumiu 21 mmol/L ($\pm 2,7$), já a LAMAP2480 consumiu 19 mmol ($\pm 2,5$).

Percebe-se que não há grande variação na quantidade de amônio consumido ao longo de 40h de fermentação para todas as condições testadas, como já foi observado acima. Maior consumo dessa fonte de nitrogênio pela levedura GDB248 na condição de mosto de caldo de cana com a presença de ApC 23 mmol/L. Além disso, foi observado consumo similar de ApC pela LAMAP2480 na mesma condição na faixa de 21 mmol/L (Tabela 10). Já no mosto de uva, o maior consumo de nitrato de 23 mmol/L também ocorreu por GDB 248 na presença de ApC, seguido de LAMAP2480 na mesma condição (22 mmol/L) (Tabela 11). De modo geral, a média do consumo de amônio das duas linhagens foi de 20 mmol/L. As duas leveduras consomem amônio ou nitrato com a mesma eficiência

Tabela 9- Hierarquização do consumo de nitrogênio pelas linhagens de *Dekkera bruxellensis* em função da fonte de nitrogênio no meio.

Fonte de n	Linhagem	Média (Mg/L)	Desvio Padrão
NO3	LAMAP2480	25,6	5,4
NO3	GDB248	23,7	2,5
NH4	GDB248	20,7	2,7
NH4	LAMAP2480	19,1	2,5

Fonte: O Autor (2024).

Tabela 10- Consumo de amônio pela levedura *Dekkera bruxellensis*.

Linhagem	Fonte de N	Mosto	ApC	Média (mmol/L)
GDB248	NH4	Cana	(-)	18,61
GDB248	NH4	Cana	(+)	23,22
GDB248	NH4	Uva	(-)	18,15
GDB248	NH4	Uva	(+)	22,9
LAMAP2480	NH4	Cana	(-)	17,2
LAMAP2480	NH4	Cana	(+)	20,82
LAMAP2480	NH4	Uva	(-)	16,7
LAMAP2480	NH4	Uva	(+)	21,71

Fonte: O Autor (2024).

Tabela 11- Consumo de nitrato pela levedura *Dekkera bruxellensis*

Linhagem	Fonte de N	Mosto	ApC	Média (Mg/L)
GDB248	NO3	Cana	(-)	26,71
GDB248	NO3	Cana	(+)	22,50
GDB248	NO3	Uva	(-)	20,95
GDB248	NO3	Uva	(+)	24,42
LAMAP2480	NO3	Cana	(-)	18,70
LAMAP2480	NO3	Cana	(+)	31,66
LAMAP2480	NO3	Uva	(-)	26,74
LAMAP2480	NO3	Uva	(+)	25,12

Fonte: O Autor (2024).

A presença de ApC proporcionou o maior consumo de nitrato na faixa de 26 mmol/L. Como considerado acima, o consumo de nitrato foi sempre superior ao de amônio, independente da presença de ApC. Apenas que a presença de ApC no meio fez o consumo de amônio ser elevado ao patamar do consumo de nitrato. Novamente falando, deve-se considerar que esses valores não apresentam diferenças significativas e apenas mostram tendências entre as condições.

Tabela 12- Hierarquização do consumo de nitrogênio pelas linhagens de *Dekkera bruxellensis* em função da presença de ácido p-cumárico.

Fonte de n	ApC	Média (mmol/L)	Desvio Padrão
NO3	(+)	25,9	4,0
NO3	(-)	23,3	4,1
NH4	(+)	22,2	1,09
NH4	(-)	17,7	0,9

Fonte: O Autor (2024).

5.5. ANÁLISE DA ATIVIDADE FERMENTATIVA DAS LINHAGENS DE *DEKKERA BRUXELLENSIS*

A produção média de etanol nos meios contendo amônio foi de 54,8 g/L ($\pm 7,1$), sendo que no meio com nitrato foi de 40,1 g/L ($\pm 7,5$) (Tabela 2), isso corresponde a rendimentos médios de conversão de açúcar para etanol de 0,38 g/g ($\pm 0,04$) em amônio e de 0,29 g/g ($\pm 0,07$) em nitrato. Isso mostra que nesses meios sintéticos a conversão metabólica do açúcar para etanol ocorre com maior eficiência quando a célula metaboliza amônio como fonte de nitrogênio.

Considerando apenas os meios contendo amônio (Tabela 13), os resultados indicam que não há diferença na produção e no rendimento em etanol entre as duas linhagens (Figura 6A, D) e pela presença de ApC (Figura 6C, F). Embora não exista grande diferença, foi observado uma tendência para maior produção em mosto de uva em relação ao caldo de cana (Figura 6B). No entanto, o maior consumo de açúcar nesse meio fez com que o rendimento em etanol fosse levemente menor do que em caldo de cana (Figura 6E).

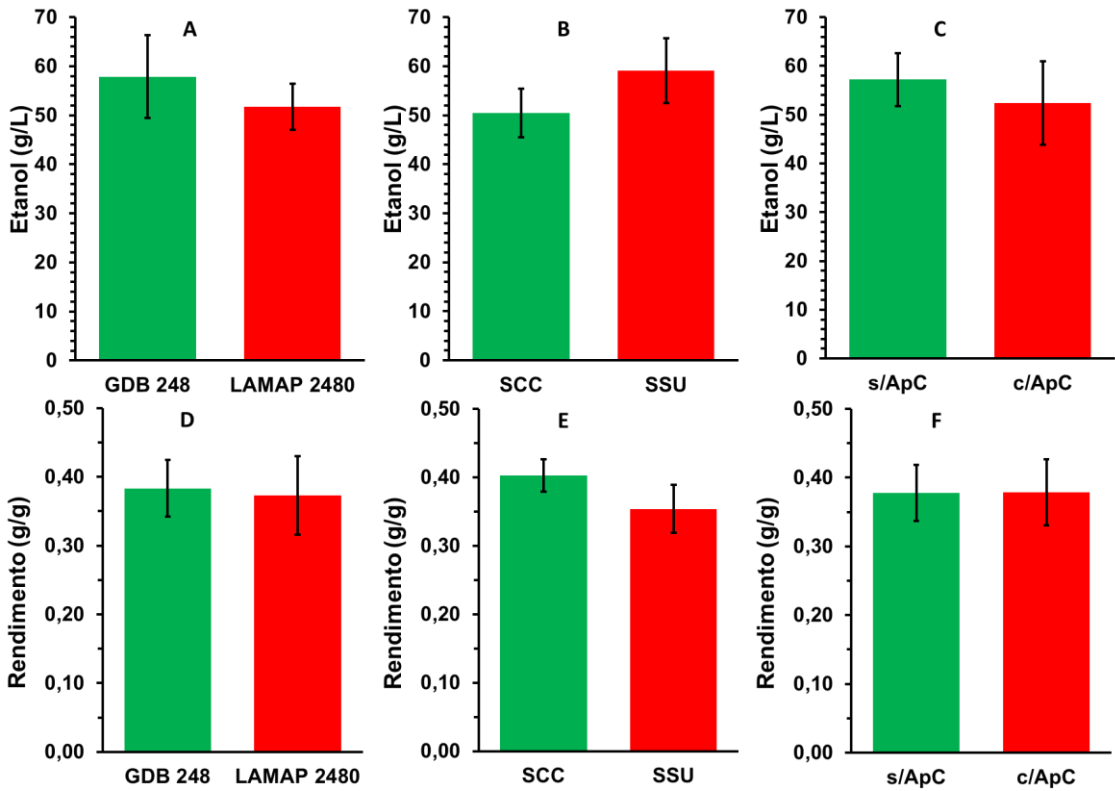
Já nos meios contendo nitrato (Tabela 14), os resultados indicam que não há diferença na produção e no rendimento em etanol entre as duas linhagens (Figura 7A, D) e pela presença de ApC (Figura 7C, F). Embora não exista diferença aparente, foi observado uma tendência para maior produção e rendimento em mosto de uva em relação ao caldo de cana (Figura 7B, D).

Tabela 13- Produção e rendimento de etanol pela levedura *Dekkera bruxellensis* em meio com amônio como fonte de nitrogênio.

Linhagem	Fonte de N	Mosto	ApC	Média (g/L)	Y _{etanol}
GDB248	NH ₄	Cana	(-)	54	0,383
GDB248	NH ₄	Cana	(+)	47,8	0,383
GDB248	NH ₄	Uva	(-)	65,3	0,383
GDB248	NH ₄	Uva	(+)	64,4	0,383
LAMAP2480	NH ₄	Cana	(-)	55,3	0,411
LAMAP2480	NH ₄	Cana	(+)	44,9	0,432
LAMAP2480	NH ₄	Uva	(-)	54,2	0,334
LAMAP2480	NH ₄	Uva	(+)	52,6	0,315

Fonte: O Autor (2024).

Figura 6- Dados de produção de etanol (A-C) e de rendimento em etanol (D-F) dos ensaios de fermentação comparando as linhagens de *Dekkera bruxellensis* (A, C), os meios sintéticos (B, E) e a ausência ou presença de ácido p-cumárico (ApC) (C, F) utilizando amônio como fonte de nitrogênio.



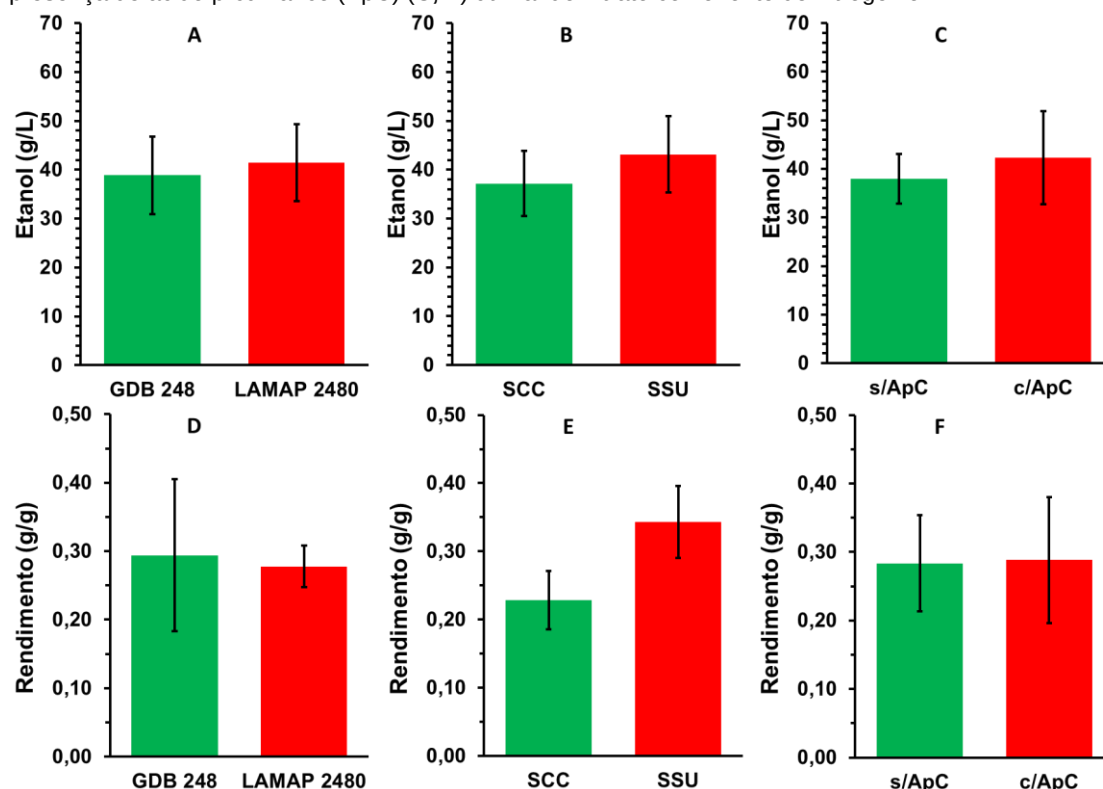
Fonte: O Autor (2024).

Tabela 14- Produção e rendimento de etanol pela levedura *Dekkera bruxellensis* em meio com nitrato como fonte de nitrogênio.

Linhagem	Fonte de N	Mosto	ApC	Média (g/L)	Y _{etanol}
GDB248	NO3	Cana	(-)	36,8	0,225
GDB248	NO3	Cana	(+)	28,5	0,175
GDB248	NO3	Uva	(-)	44,5	0,377
GDB248	NO3	Uva	(+)	45,7	0,399
LAMAP2480	NO3	Cana	(-)	38,6	0,234
LAMAP2480	NO3	Cana	(+)	44,8	0,279
LAMAP2480	NO3	Uva	(-)	32,0	0,297
LAMAP2480	NO3	Uva	(+)	50,3	0,300

Fonte: O Autor (2024).

Figura 7- Dados de produção de etanol (A-C) e de rendimento em etanol (D-F) dos ensaios de fermentação comparando as linhagens de *Dekkera bruxellensis* (A, C), os meios sintéticos (B, E) e a ausência ou presença de ácido p-cumárico (ApC) (C, F) utilizando nitrato como fonte de nitrogênio.



Fonte: O Autor (2024).

5.6. DISTRIBUIÇÃO DO CARBONO NO METABOLISMO CENTRAL DE *DEKKERA BRUXELLENSIS*

A partir dos dados molares de consumo dos nutrientes e formação dos produtos apresentados na Tabela 3, foi possível se calcular a distribuição do carbono pelo metabolismo central das células de levedura nas diferentes condições de cultivo (Tabela 15). De modo geral, a recuperação do carbono nas condições com amônio foi de 75% em média contra 56% nas condições com nitrato. Esse resultado já era esperado, já que a perda de carbono em meio com nitrato é sempre inferior ao de amônio para *D. bruxellensis*. Em média, o balanço de massa entre as duas linhagens foi semelhante em cerca de 74%. No entanto, a variação dentro dos dados da linhagem LAMAP 2480 foi muito alta devido à grande diferença de recuperação de carbono entre as fermentações com o caldo de cana e com o mosto de uva (Tabela 15). Isso se deu porque nessa condição houve grande consumo de carbono pelas células em meio de mosto de uva que

não foi convertido proporcionalmente em nenhum dos produtos de fermentação (Tabelas 3 e 15). O consumo de ApC do meio não influenciou no balanço de carbono de maneira significativa.

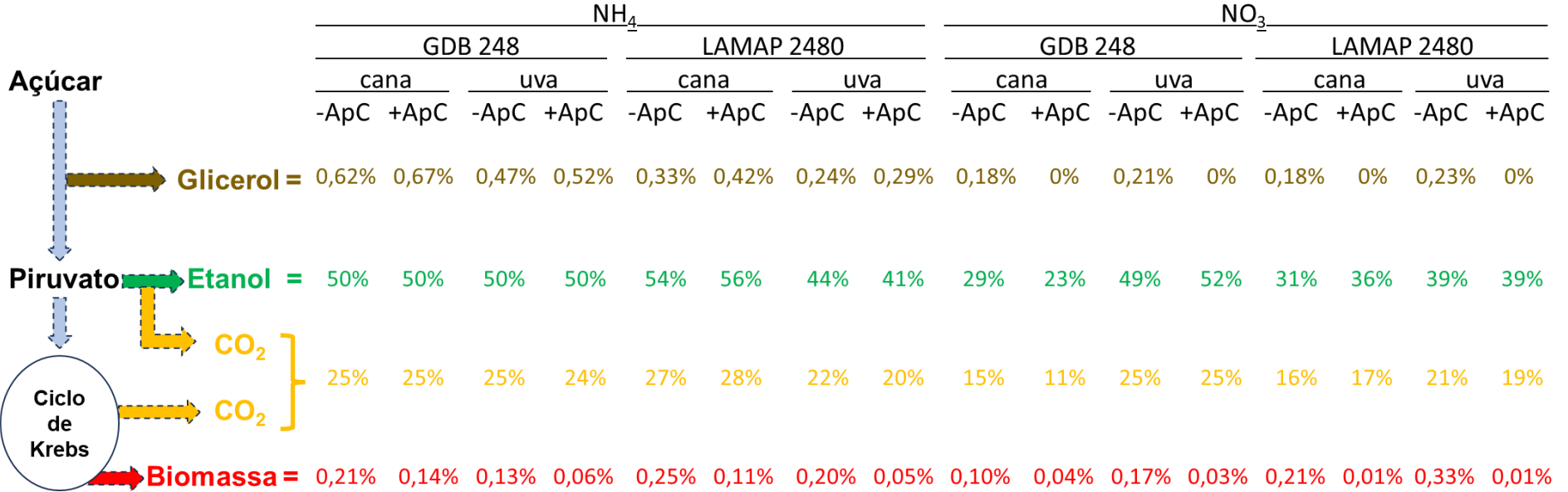
Os resultados calculados para as fermentações com nitrato foram contrastantes em relação ao amônio (Tabela 15). Em média, o balanço de massa entre as duas linhagens foi semelhante em cerca de 56%. No entanto, a variação dentro dos dados da linhagem GDB248 foi muito alta devido a grande diferença de recuperação de carbono entre as fermentações com o caldo de cana e com o mosto de uva (Tabela 15). Isso se deu porque nessa condição houve grande consumo de carbono pelas células em meio com caldo de cana que não foi convertido proporcionalmente em nenhum dos produtos de fermentação (Tabelas 3 e 15). Outro ponto relevante foi que a recuperação de carbono em meio de mosto de uva ($67\% \pm 9,8$) foi significativamente melhor em meio de caldo de cana ($45\% \pm 8,2$). O consumo de ApC do meio também não influenciou no balanço de carbono de maneira significativa. No entanto, não foi observada a produção de glicerol nos meios que continham ApC (Tabelas 2, 3 e 15).

Tabela 15 - Distribuição do carbono assimilado do açúcar pelo metabolismo central da levedura *Dekkera bruxellensis* para a produção de células e dos produtos de fermentação.

Linhagem	Fonte N	Mosto	ApC	mmol de carbono/L					Balanço (%)
				Açúcar	Biomassa	Etanol	Glicerol	CO ₂	
GDB 248	NH ₄	Cana	(-)	4698,3	10,0	2349,2	29,3	1194,3	76,3
GDB 248	NH ₄	Cana	(+)	4153,3	5,7	2076,7	27,7	1031,2	75,6
GDB 248	NH ₄	Uva	(-)	5678,3	7,2	2839,2	26,7	1404,9	75,3
GDB 248	NH ₄	Uva	(+)	5596,7	3,6	2798,3	29,3	1357,7	74,8
LAMAP 2480	NH ₄	Cana	(-)	4483,3	11,1	2404,4	14,7	1229,1	81,6
LAMAP 2480	NH ₄	Cana	(+)	3466,7	3,7	1954,7	14,7	957,5	84,5
LAMAP 2480	NH ₄	Uva	(-)	5413,3	10,6	2357,9	13,0	1203,3	66,2
LAMAP 2480	NH ₄	Uva	(+)	5566,7	2,9	2289,3	16,3	1110,0	61,4
GDB 248	NO ₃	Cana	(-)	5456,7	5,6	1601,2	9,8	804,4	44,4
GDB 248	NO ₃	Cana	(+)	5431,7	2,4	1238,1	0,0	606,7	34,0
GDB 248	NO ₃	Uva	(-)	3929,7	6,8	1933,3	8,1	971,2	74,3
GDB 248	NO ₃	Uva	(+)	3815,3	1,3	1988,1	0,0	954,2	77,2
LAMAP 2480	NO ₃	Cana	(-)	5501,7	11,5	1679,8	9,8	888,1	47,1
LAMAP 2480	NO ₃	Cana	(+)	5341,7	0,6	1945,8	0,0	928,7	53,8
LAMAP 2480	NO ₃	Uva	(-)	3593,3	11,9	1392,3	8,1	754,6	60,3
LAMAP 2480	NO ₃	Uva	(+)	5598,3	0,7	2187,5	0,0	1044,6	57,7

Fonte: O Autor (2024).

Figura 8 - Distribuição do carbono do açúcar consumido durante a fermentação de meios sintéticos simulando caldo de cana ou mosto de uva contendo amônio ou nitrato como fonte de nitrogênio na ausência o ou presença de ácido p-cumárico (ApC) por células de *Dekkera bruxellensis* das linhagens GDB 248 e LAMAP 2480. Os valores foram calculados a partir dos dados experimentais apresentados nas Tabelas 3 e 15, com exceção do CO₂ que foi estequiometricamente calculado a partir da produção de etanol e de biomassa (Leite et al., 2013).



Fonte: O Autor (2024).

A partir dos resultados experimentais foi possível se estabelecer um mapa metabólico da distribuição do carbono dos açúcares no metabolismo central da levedura (Figura 8). Metade do carbono assimilado pelas células de GDB 248 foram convertidos a etanol nos meios com amônio, e um quarto desse carbono foi dissimilado na forma de CO_2 proveniente das reações de descarboxilação da via fermentativa e da via anabólica. Isso resultou no rendimento de etanol de 0,38 g/g (Tabela 13). Esses parâmetros fisiológicos foram iguais para esta linhagem em amônio, independentes do tipo de meio e da presença de ApC, sendo referida como condição de referência. Portanto, as diferenças observadas nos rendimentos para esta linhagem (Tabela 14) estão mais relacionados com a atividade fisiológica de consumo do açúcar do meio (Tabela 4) do que na atividade metabólica da via fermentativa. No entanto, o balanço de carbono indica que 25% do carbono consumido não foi estequiometricamente predito, e deve ter sido perdido por reações de descarboxilação não relacionadas a via fermentativa pela piruvato descarboxilase e nem pelas atividades descarboxilases mitocondriais que alimentam o ciclo de Krebs

Quando o amônio foi substituído pelo nitrato, houve uma queda na distribuição de carbono para a via fermentativa em meio de caldo de cana (Figura 8) e, conseqüentemente, no balanço de carbono (Tabela 15). Esses valores foram restaurados ao nível da condição de referência quando meio utilizado foi o mosto de uva (Tabelas 14 e 15, Figura 8). Do ponto de vista metabólico, pode-se supor que a metabolização dos ácidos cítrico e málico presentes no meio do mosto de uva parece restaurar o funcionamento do metabolismo central que foi alterado pela metabolização do nitrato.

Já a linhagem LAMAP 2480 apresentou um comportamento metabólico diferente da GDB 248, com variação na distribuição do carbono nas fermentações do meio de caldo de cana ou mosto de uva em amônio (Figura 8), com maior rendimento etanol e melhor balanço de carbono no meio de caldo de cana (Tabelas 13 e 15), mas independente da presença de ApC. Esses valores foram, inclusive, maiores do que os calculados para a condição de referência. Já em nitrato, os melhores valores foram obtidos em mosto de uva (Tabelas 14 e 15), não se aproximaram dos valores de referência.

Foi observado uma perda no balanço de carbono em todas as condições testadas, embora em diferentes intensidades (Tabela 15). Uma hipótese para explicar essa perda de carbono não estimado seria pelo desvio da glicose-6P produzida na entrada da via glicolítica pela via das pentose-fosfato (PPP). Esse carbono que entra pela PPP retorna para a via glicolítica na forma de frutose-6P e gliceraldeído-3P. No entanto, a reação da enzima 6-fosfogliconato desidrogenase no final da fase oxidativa da PPP produz uma descarboxilação que converte uma molécula C6 (6-fosfogliconato) em uma molécula C5 (xilulose-5P). Isso representa a perda de 17% do carbono (1 carbono pedido de seis carbonos da hexose) consumido de qualquer quantidade de hexose assimilada pela PPP. Nos casos dos ensaios com GDB 248 nos dois meios com amônio, GDB 248 no meio de mosto de uva e nitrato e de LAMAP 2480 em meio de caldo de cana e amônio, a metabolização de todo açúcar consumido pela PPP elevaria o balanço de carbono para valores superiores a 92%, o que pode ser considerado como dentro do esperado para análise de sistemas dinâmicos como ensaios em batelada simples, como foi o caso dos experimentos de fermentação deste trabalho.

5.7 METABOLIZAÇÃO DO ÁCIDO P-CUMÁRICO PELAS CÉLULAS DE *DEKKERA BRUXELLENSIS*

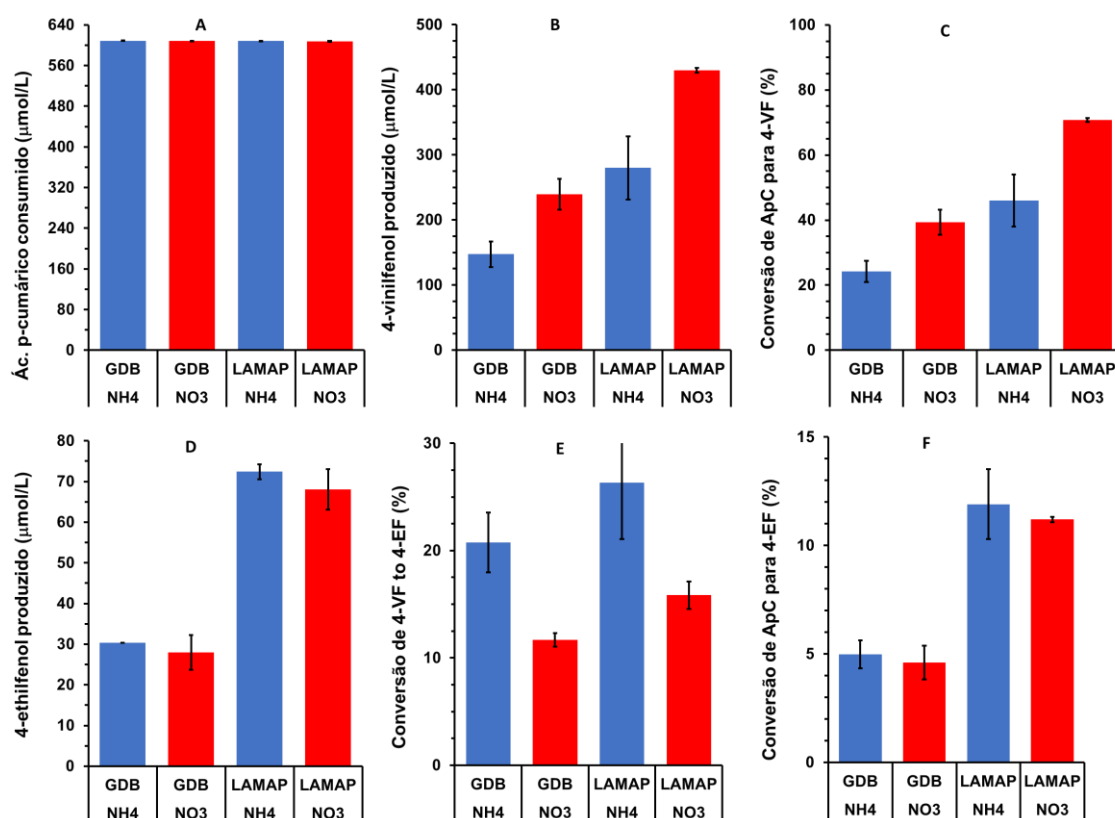
O metabolismo do ApC foi avaliado a partir de seu consumo no meio, da produção do intermediário 4-vinilfenol e de seu produto final 4-etilfenol (Figura 9). Não houve diferença no consumo de ApC entre todas as condições testadas (Figura 9A), indicando que a entrada dessa molécula nas células independe do tipo de linhagem e da constituição do meio de cultura. Um ponto importante é que quando os dados de cada meio foram combinados, não houve diferença significativa na metabolização do ApC entre o caldo de cana e o mosto de uva, indicando que a composição do meio não afetou o funcionamento desta via metabólica. No entanto, a variância entre os dois conjuntos de dados foi muito grande, o que significa que outros fatores estavam influenciando os resultados.

A primeira etapa do metabolismo do ApC consiste na sua descarboxilação a 4-vinilfenol (4-VF). A produção de 4-VF foi 63% maior pela linhagem GDB 248 em nitrato do que em amônio, para a linhagem LAMAP 2480

(Figura 9B) o aumento foi de 54%. Portanto, o consumo de nitrato induz a maior descarboxilação do ApC pelas células da levedura. Além disso, essa etapa metabólica foi 90% maior pela linhagem LAMAP 2480 do que pela GDB 248 em meio com amônio e 80% maior em meio com nitrato (Figura 9B). No entanto, em nenhuma das condições foi observada a conversão completa do ApC em 4-VF, com maior valor de 70% sendo observado para a combinação LAMAP 2480 e nitrato e o menor valor de 24% para GDB 248 em amônio (Figura 9C). Isso indica que a molécula de ApC que entrou nas células de levedura pode ter sido metabolizada por outra via metabólica.

Cada molécula de 4-VF produzida pode ser reduzida utilizando NADH para uma molécula de 4-EF. Os resultados mostraram que a linhagem GDB 248 produziu 29 $\mu\text{mol/L}$ de 4-EF, ao mesmo tempo a linhagem LAMAP 2480 produziu 70 $\mu\text{mol/L}$ de 4-EF, ou seja, mais do que o dobro (Figura 9D). Esses valores foram semelhantes entre os cultivos em amônio e nitrato. No entanto, levando em consideração a quantidade de 4-VF produzido em cada condição, e disponível para a via metabólica, foi possível calcular que apenas 21% a 26% do 4-VF produzido foi convertido a 4-EF pelas células de GDB 248 e LAMAP 2480, respectivamente, nos meios com amônio (Figura 9E). Essa conversão foi ainda mais baixa nos meios com nitrato, variando de 12% a 16% pelas células de GDB 248 e LAMAP 2480, respectivamente (Figura 9E). Portanto, a metabolização de nitrato como fonte de nitrogênio reduziu em média 60% da capacidade de metabolização de 4-VF a 4-EF. O cálculo de conversão mostrou que apenas 5% do ApC consumido foi convertido no produto 4-EF pela linhagem GDB 248, sendo que esse valor dobrou para a linhagem LAMAP 2480 (Figura 9F).

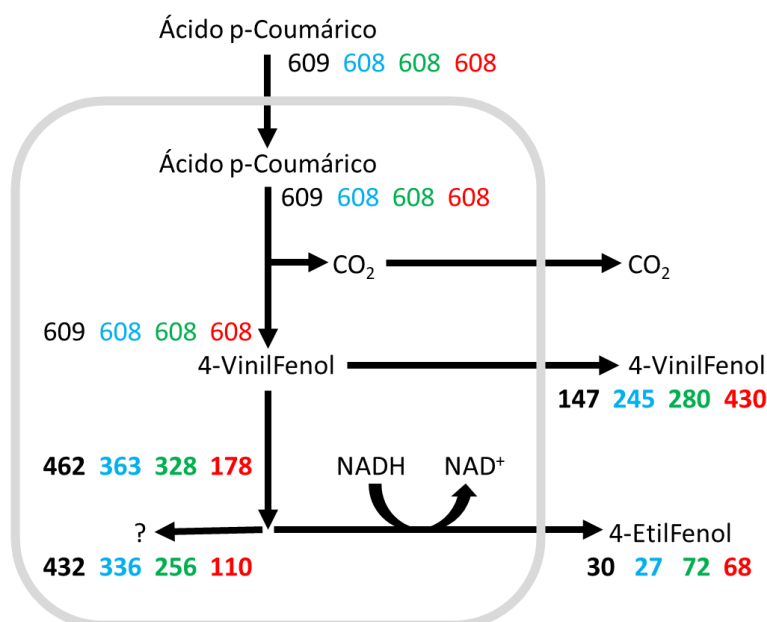
Figura 9- Metabolização do ácido p-cumárico pelas células das linhagens GDB 248 e LAMAP 2480 de *Dekkera bruxellensis* em meio sintético contendo glicose como fonte de carbono e amônio ou nitrato como fonte de nitrogênio. Os valores representam as médias dos experimentos combinando os resultados obtidos a partir do mosto sintético de cana de açúcar e mosto de uva.



Fonte: O Autor (2024).

Em seguida, a distribuição teórica das moléculas de ApC e seus derivados ao longo de sua via metabólica de degradação foi estimado (Figura 10). A linhagem LAMAP 2480 foi a que mais perdeu carbono na forma de 4-VF a partir do ApC. Além disso, foi a linhagem que melhor converteu a fração interna de 4-VF em 4-EF. Já a linhagem GDB 248, mais de 50% das moléculas de 4-VF foram convertidos a algum metabólito ainda desconhecido.

Figura 10- Diagrama de distribuição das moléculas de ApC e seus derivados no metabolismo do próprio ApC em *Dekkera bruxellensis* cultivadas nas seguintes condições; linhagem GDB 248 em amônio (valores em preto), GDB 248 em nitrato (valores em azul), LAMAP 2480 em amônio (valores em verde) e LAMAP 2480 em nitrato (valores em vermelho).

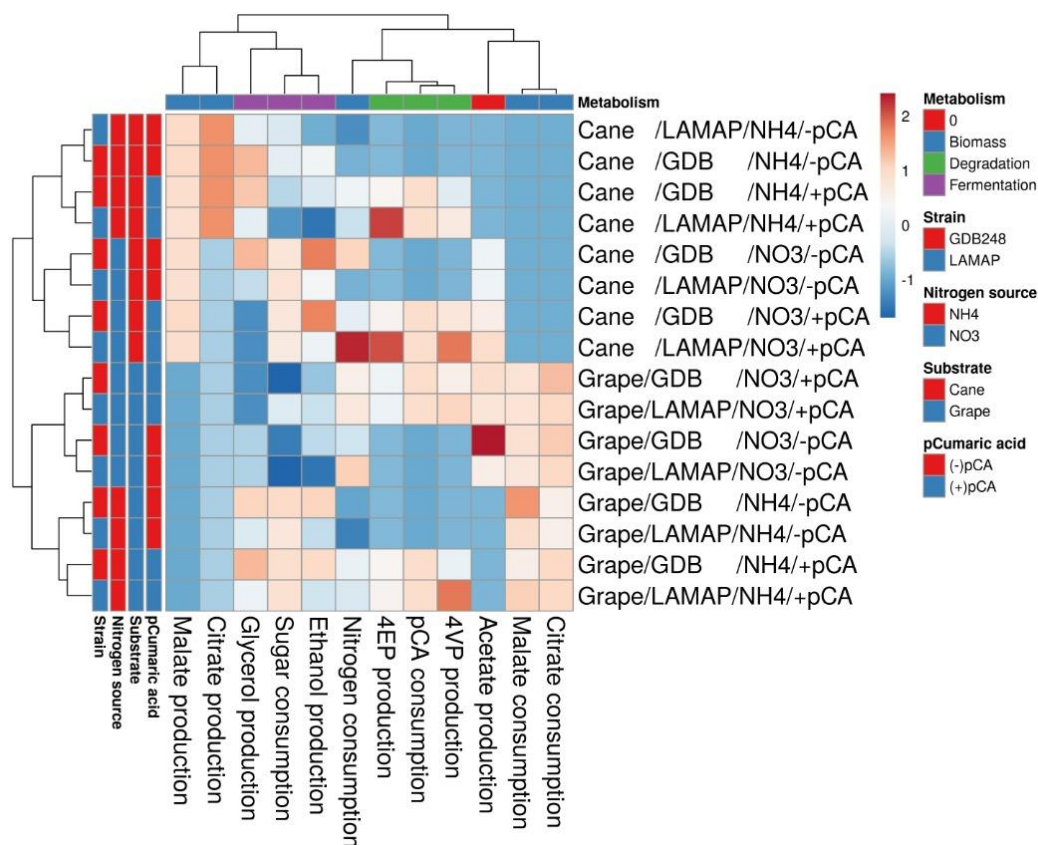


Fonte: O Autor (2024)

5.8. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS DE TESTE

A correlação entre as variáveis utilizadas neste trabalho foi analisada (Figura 11). Dois grandes grupos de resultados foram forçadamente separados pelo tipo de substrato que simularam o mosto do caldo de cana e o mosto de uva. Essa separação foi forçada porque no primeiro meio as células produziram os ácidos málico e cítrico, ao mesmo tempo que no segundo meio as células consumiram esses ácidos. No segundo nível de agrupamento, as condições foram separadas pelo tipo de fonte de nitrogênio; e no terceiro nível pela ausência ou presença de ácido p-cumárico (ApC). O tipo de linhagem não foi fator determinante na separação dos grupos. Isto significa dizer que as duas linhagens, embora provenientes de ambientes tão distintos, apresentam resposta metabólica similares. Pode-se afirmar, portanto, que a fonte de nitrogênio foi a variável mais importante na separação dos dados deste trabalho.

Figura 11- Correlação entre as variáveis a partir de sistema de agrupamento



Fonte: O Autor (2024).

5.9. BALANÇO DE CARBONO E SUA DISTRIBUIÇÃO PELO METABOLISMO CENTRAL

O balanço de carbono foi analisado em ambas as linhagens, com e sem a presença de ApC. A partir dos resultados observa-se que quando a linhagem GDB248 é cultivada em amônio e sem presença de ApC consome 5188,3 Mg/L de glicose, enquanto produz 8,61 Mg/L de células resultando em 2594,2 Mg/L de etanol, 305 Mg/L de glicerol e 1,29 Mg/L de CO₂. Com isso, recupera 2909 Mg/L e apresenta balanço de 56%.

Ao analisar a linhagem LAMAP2480 nas mesmas condições, em amônio e sem presença de ApC, é consumido 4948 Mg/L de glicose, produzindo 10,61 Mg/L de células, 2816 Mg/L de etanol, 150 Mg/L de glicerol, 1,4 Mg/L de CO₂. Assim, recuperando 2979 Mg/L e apresentando balanço de carbono de 60%. Dessa maneira, é possível analisar que embora a linhagem brasileira GDB248 consuma mais glicose, as maiores proporções de recuperação de carbono

ocorrem pela linhagem chilena LAMAP2480 para essas condições. Ainda, também é avistada maior produção de células, produção de etanol e CO₂, à medida que a linhagem GDB248 produz mais glicerol que a linhagem chilena (Tabela 14).

Tabela 16 - Balanço de carbono das linhagens de *Dekkera bruxellensis* sem presença de ApC nos mostos

Linhagem	Nitrogênio	Carbono consumido	Carbono recuperado					Balanço
		Glicose	X	EtOH	Glic.	CO ₂	Total	
GDB 248	NH ₄	5188	8,61	2594	305	1,29	2909	56%
	NO ₃	4693	6,18	1767	97,4	0,88	1872	40%
LAMAP 2480	NH ₄	4948	10,9	2816	150	1,4	2979	60%
	NO ₃	4548	11,7	1536	97,4	0,76	1646	36%

Fonte: O Autor (2024).

Ao avaliar o balanço de carbono para as duas linhagens de levedura utilizando nitrato como fonte de nitrogênio e sem a presença de ApC, é possível notar que a linhagem GDB248 consome mais glicose 4693 Mg/L, produz 6,18 Mg/L de células e produz 1767 Mg/L de etanol, 97,4 Mg/L de glicerol e 0,88 Mg/L de CO₂. Assim, recupera 1872 e apresenta balanço de 40%. Em relação à linhagem chilena LAMAP2480 utilizando nitrato sem a presença de ApC, nota-se um consumo menor de glicose 4548 Mg/L, uma maior produção de células 11,7 Mg/L, uma menor produção de etanol 1536 Mg/L, mesma taxa de produção de glicerol de 97,4 Mg/L, menor produção de CO₂ de 0,76 Mg/L. Dessa forma, observa-se uma baixa recuperação de carbono, onde recupera-se cerca de 1646 Mg/L e balanço de 36%. Portanto, a recuperação de carbono é menor em nitrato do que nas condições utilizando amônio como fonte de nitrogênio (Tabela 14).

Ainda, foi possível avaliar o balanço de carbono com a presença de ApC. A partir das análises, observou-se que utilizando amônio como fonte de nitrogênio, o maior consumo de glicose observado foi em GDB248, que consumiu cerca de 4875 Mg/L, produziu 4,68 Mg/L de células, enquanto produziu 3254 Mg/L de etanol, 310 Mg/L de glicerol e 1,62 Mg/L de CO₂. Assim, recuperou 3571Mg/L de carbono e obteve balanço de 0,73%. Comparando com a linhagem LAMAP2480 nas mesmas condições, notou-se menor consumo de glicose 4517

Mg/L, menor proporção de 3,3 mg/L células produzidas, menor produção de etanol 2203 Mg/L, menor produção de glicerol 168 mg/L, bem como menor produção de CO₂ 1,09 mg/L. Assim, a linhagem chilena recuperou menos carbono se comparada com a linhagem brasileira, apenas 2376 mg/L e balanço 0,53% (Tabela 15).

Tabela 17 - Balanço de carbono das linhagens de *Dekkera bruxellensis* com presença de ApC nos mostos

Linhagem	Nitrogênio	C consumido	C recuperado					Balanço (Rec./Cons.)
		Glicose	X	EtOH	Glic.	CO ₂	Total	
GDB 248	NH ₄	4875	4,68	3254	310	1,62	3571	0,73
	NO ₃	4624	1,82	3914	0	1,94	3918	0,85
LAMAP 2480	NH ₄	4517	3,3	2203	168	1,09	2376	0,53
	NO ₃	5470	0,64	2354	0	1,17	2355	0,43

Fonte: O Autor (2024).

Ao avaliar o balanço de carbono com a presença de ApC e utilizando nitrato como fonte de nitrogênio, foi observado maior consumo de glicose por LAMAP2480 que consumiu 5470 Mg/L, porém produziu baixa proporção de células de 0,64 Mg/L, 2354 Mg/L de etanol, 1,17 de CO₂, recuperando cerca de 2355Mg/L e balanço 0,43%. Para a linhagem brasileira, GDB248, foi observado um consumo menor de glicose 4624 Mg/L, enquanto produziu mais células 1,82 Mg/L, maior proporção de etanol 3914 Mg/L e também maior produção de CO₂ 1,94 Mg/L. Dessa forma, recuperou carbono em cerca de 3918Mg/L e balanço de 0,85%. Curiosamente, não foi avistada produção de glicerol para ambas as linhagens, utilizando nitrato como fonte de nitrogênio (Tabela 15).

A partir de comparações diretas, foi possível observar que maior recuperação de carbono ocorre com a presença de ApC. Exceto para condição em que LAMAP2480 assimila amônio utilizando ApC. Ainda, é possível observar que a menor proporção de carbono recuperado ocorre pela linhagem GDB248 assimilando nitrato, dentre todas as condições submetidas. O maior percentual de balanço de carbono ocorre pela linhagem GDB248 assimilando nitrato sob a presença de ApC.

5.10. PRODUÇÃO DE 4-VINILFENOL E 4-ETILFENOL

Para os meios contendo ácido p-cumárico, foi avaliado a produção de derivados do ácido p-cumárico como 4-vinilfenol e 4-etilfenol. A maior produção de 4-vinilfenol ocorreu na linhagem LAMAP2480 utilizando nitrato como fonte de nitrogênio, onde produziu-se $430,04 \text{ mg/L} \pm 3,60$. No qual desses, apenas $68,09 \text{ mg/L} \pm 4,99$ foram convertidos à 4-EF. Ainda utilizando a linhagem LAMAP2480, registrou-se em amônio $279,83 \text{ mg/L}$ $48,73$, onde, $72,39 \text{ mg/L} \pm 1,81$ foi convertido à 4-EF (Tabela 16).

Tabela 18 - Produção de 4-vinilfenol e 4-etilfenol

(+) ApC	Linhagem	4-VP	SD	4-EP	SD
NH4	GDB248	147,16	19,77	30,28	0
NO3	GDB248	239,21	23,77	27,99	4,28
NH4	LAMAP2480	279,83	48,73	72,39	1,81
NO3	LAMAP2480	430,04	3,60	68,09	4,99

Fonte: O Autor (2024).

Em relação à linhagem GDB248, foi observada maior produção de 4-vinilfenol utilizando nitrato como fonte de nitrogênio, sendo produzido $239,21 \text{ mg/L} \pm 23,77$. No entanto, apenas $27,99 \text{ mg/L} \pm 4,28$ chega até 4-etilfenol. Utilizando amônio como fonte de nitrogênio, a levedura responde produzindo $147 \text{ mg/L} \pm 19,77$. Porém, $30,28 \text{ mg/L} \pm 0,0$ é convertido à 4-EF (Tabela 16).

Também foram avaliadas as porcentagens de conversão de ApC à 4-vinilfenol, bem como de 4-vinilfenol à 4-etilfenol. A partir dos resultados dessa análise, foi possível notar que a linhagem LAMAP2480 possui mais aptidão em converter o ácido p-cumárico à 4-vinilfenol. A maior proporção de conversão observada é em LAMAP2480 utilizando nitrato como fonte de nitrogênio, onde é convertido cerca de $70,73\% \pm 0,59$. Seguida da conversão de LAMAP2480 em meio contendo amônio, onde alcançou $46,02\% \pm 8,01$.

O primeiro passo é a descarboxilação do ácido p-cumárico, que através de uma enzima chamada cumarato descarboxilase remove o grupo carboxila do ácido, produzindo então 4-vinilfenol. A linhagem GDB248 também converte ácido p-cumárico à 4-vinilfenol, no entanto, não na mesma eficiência que

LAMAP2480. Maior conversão observada ocorre utilizando nitrato como fonte de nitrogênio, onde foi convertido 39,34 % $\pm$ 3,91. Já em meio contendo amônio observou-se conversão de 24,20 % $\pm$ 3,25. Portanto, pode se concluir que a linhagem LAMAP2480 demonstra mais aptidão ao converter o ácido p-cumárico à 4-vinilfenol do que GDB248 (Tabela 17).

Tabela 19 - Proporção de conversão de ApC a seus derivados 4-VP e 4-EP

(+) ApC	Linhagem	4VP > 4P (%)	SD	Yg	APC > 4VP (%)	SD
NH4	GDB248	20,77	2,79	0,060	24,20	3,25
NO3	GDB248	11,67	0,63	0,035	39,34	3,91
NH4	LAMAP2480	26,32	5,23	0	46,02	8,01
NO3	LAMAP2480	15,83	1,29	0	70,73	0,59

Fonte: O Autor (2024).

O 4-vinilfenol é reduzido à 4-EF através da enzima chamada vinilfenol redutase, que incorpora átomos de hidrogênio ao 4-vinilfenol, o que resulta na formação de 4-etilfenol. Desse modo, a maior porcentagem da redução de 4-vinilfenol à 4-EF é observada em LAMAP2480 utilizando amônio como fonte de nitrogênio, alcançando percentual de 26,32 % $\pm$ 5,23. Enquanto ainda utilizando amônio, a linhagem GDB248 responde de forma semelhante, resultando em um percentual de 20,77% $\pm$ 2,79. As menores proporções de redução de 4-vinilfenol à 4-EF alcançadas foram utilizando nitrato como fonte de nitrogênio. GDB248 obteve percentual de 11,6 % $\pm$ 0,63 de conversão à 4-etilfenol, em contrapartida LAMAP2480 também utilizando nitrato, alcançou 15,83 % $\pm$ 1,29 (Tabela 17).

6. DISCUSSÃO

Embora a metabolização do ácido p-cumárico (ApC) a 4-etilfenol (4-EF) pelas células de *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces bruxellensis*) represente grande ameaça a indústria vinícolas, a grande maioria dos estudos tem se dedicado à detecção da levedura ou da molécula nas amostras de vinho e poucos se dedicam a estudar esse metabolismo. Portanto, o presente trabalho representa o primeiro estudo nesse sentido. A molécula de 4-EF é classificada no grupo das moléculas que causam sabores desagradáveis aos vinhos (chamados de *off-flavours*) e sua presença pode arruinar lotes inteiros da indústria vinícola, causando perdas econômicas gigantescas. Daí um conjunto grande de esforços para se tentar eliminar a presença de *D. bruxellensis* desses processos industriais. Lima et al. (2019) relataram valores médios de ApC 134 µg/L e 66 µg/L em vinhos monovarietais Cabernet Sauvignon Syrah foi de aproximadamente 66 µg/L, respectivamente. A presença de *D. bruxellensis* metabolizando o ApC a 4-EF poderia representar a deteriorização da produção vinícola.

O gênero *Dekkera* se destaca por ser uma das poucas espécies de levedura capaz de converter ácidos hidroxicinâmicos como o ApC em compostos como 4-vinilfenol (4-VF) e 4-EF. Os estudos de Cibrario et al. (2020) e Lleixa et al. (2021) mostram que a produção desses fenóis voláteis é uma característica intrínseca da espécie *D. bruxellensis*. A metabolização do ApC impõe gasto energético e se torna uma estratégia viável apenas quando há necessidade de reduzir a toxicidade do ApC ou manter o equilíbrio do balanço redox. A enzima cumarato descarboxilase (CD) realiza a descarboxilação do ApC a 4-VF e a vinilfenol redutase (VFR) reduz o 4-VF a 4-EF com a oxidação de NADH a NAD⁺. Portanto, a produção de 4-EF associada ao crescimento microbiano também ajudaria no equilíbrio redox das células para a manutenção do balanço NAD⁺/NADH. Esses ácidos são normalmente encontrados como grupos agliconas na superfície de cascas de frutas e são liberados por enzimas da família das glucanases durante a maceração dessas frutas, como por exemplo durante a maceração da uva pela indústria vinícola. No entanto, tem sido relatado que a concentração de ácidos hidroxicinâmicos no mosto de fermentação alcoólica é maior do que encontrada em vinhos (CORONADO ET

AL.,2015; ŠUĆUR ET AL.,2016; MILHEIRO ET AL.,2017). Nesse contexto, duas linhagens de levedura foram analisadas. A linhagem LAMAP 2480 é proveniente de processos vinícola no Chile e, portanto, adaptada tanto ao substrato de mosto de uva quanto a presença de ApC. Também foi utilizada a linhagem GDB 248 que é proveniente de processo industrial para a produção de etanol combustível e, portanto, adaptada ao substrato caldo de cana e a substratos sem ApC. Desta forma, testamos um modelo adaptado e outro não adaptado para estudar a metabolização do ApC nos mostos. Outro ponto relevante foi a variação da fonte de nitrogênio utilizada. O amônio representa a referência para essa variável, enquanto que o nitrato representa uma fonte de nitrogênio utilizado apenas por *D. bruxellensis* e algumas outras leveduras. A presença de nitrato no caldo de cana representa uma vantagem adaptativa desta levedura em processos fermentativos industriais (DE BARROS PITA ET AL., 2011), enquanto que sua metabolização durante cultivos aeróbios causa problemas fisiológicos para as células, como a indução de estresse oxidativo (XAVIER ET AL., 2022). Esse efeito é diminuído quando a disponibilidade de oxigênio no meio de cultura é diminuída (PEÑA-MORENO ET AL., 2019, 2021). Desta forma, o efeito da presença de ApC foi avaliada no contexto em que o metabolismo da fonte de nitrogênio variou, sem que o efeito negativo do estresse oxidativo pudesse atrapalhar a análise metabólica.

Poucas leveduras são capazes de assimilar nitrato como fonte de nitrogênio, sendo algumas leveduras de interesse industrial como *Hansenula polymorpha*, *Pichia anomala* e *Arxula adenivorans* capazes de realizar esse feito (BÖER et al., 2009; PASSOTH et al., 2006). A levedura *D. bruxellensis* é capaz de utilizar amônia, prolina e arginina como fontes preferenciais (CONTERNO ET AL., 2006) e nitrato como fonte secundária (PITA ET AL., 2011). A capacidade de assimilar nitrato pode suprimir o efeito *Custer* e proporcionalmente aumentar a produção de etanol (BLOMQVIST ET AL.,2012; DE BARROS PITA ET AL. 2011; DE BARROS PITA ET AL. 2013; GALAFASSI ET AL.,2013; PEREIRA ET AL. 2012, 2014). Essa característica é mais evidenciada na ausência de oxigênio, na qual o nitrato no meio promove aumento da taxa de crescimento da linhagem de levedura GDB248, favorecendo a produção de etanol sob restrição de oxigênio (PEÑA-MORENO ET AL., 2019).

Isso configura como uma vantagem adaptativa para o contexto industrial, visto que essa fonte é incapaz de ser assimilada por *Saccharomyces cerevisiae*.

A capacidade de utilização de nitrato como única fonte de nitrogênio prece ser restrita a um conjunto de linhagens de *D. Bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica industrial do Brasil, já que os isolados de processos industriais da Europa não parecer ter essa capacidade. (TIUKOVA ET AL 2013; GALAFASSI ET AL., 2013). Foi muito interessante mostrar que a linhagem LAMAP 2480 foi capaz de assimilar essa fonte de nitrogênio, já que foi isolada da fermentação de vinhos no Chile. Na condição testada de restrição de oxigênio, as duas leveduras apresentaram valores de velocidade de crescimento muito semelhantes de $0,03 \text{ h}^{-1}$ para GDB 248 e $0,04 \text{ h}^{-1}$ para LAMAP 2480. No entanto, as duas leveduras diferiram na extensão da fase lag, que foi de 20 h para GDB 248 e de 8 h para LAMAP 2480. Dessa forma, para essa condição de cultivo a LAMAP2480 utiliza melhor o nitrato, alcança maior taxa de crescimento e redução da fase lag. A partir desses resultados, foi possível uma análise comparativa entre a linhagem de etanol combustível e a linhagem de vinho nas duas fontes de nitrogênio.

Conforme Leite et al. (2013), a linhagem GDB248 cresce mais rápido em sacarose do que em glicose, com a produção de etanol se iniciando tão logo as células são expostas a altas concentrações desses açúcares. Essa levedura, além de metabolizar glicose e açúcares fermentáveis, possui habilidade de metabolizar açúcares de cadeia menores (COLOMER et al., 2019). De acordo com estudo de Barata et al., (2008), na presença de glicose e frutose o crescimento dessa levedura é bastante semelhante. No presente estudo, foram simulados os meios de caldo de cana de açúcar que contem sacarose como fonte de carbono e o mosto de uva que contém uma mistura de glicose e frutose. Em *D. bruxellensis*, a assimilação da sacarose se faz pelo transporte do dissacarídeo para o interior das células seguida pela hidrólise intracelular pela invertase, diferente da hidrólise extracelular que ocorre em *S. cerevisiae* (LEITE ET AL., 2013). Para efeito dos cálculos metabólicos, consideramos os valores em equivalente glicose. Os resultados indicam que já é possível detectar produção de 4-EF a partir de 0,2g/L da fonte de carbono no meio e esta produção está associada ao crescimento celular como o próprio etanol. Também

mostramos que a linhagem LAMAP2480 isolada de vinhos Cabernet Sauvignon do Chile e mais adaptada ao ácido p-cumárico produz mais 4-EF do a linhagem GDB 248 isolada da produção de etanol combustível na região Nordeste do Brasil. Silva et al. (2018) mostraram que as linhagens CCA077 e CCA155 de *D. bruxellensis* provenientes de caldo de cana e no melaço também produzem 4-EF sob condições das indústrias brasileiras de etanol combustível. Estudo de Di Toro et al. (2015) Biodiversidade intraespecífica e 'potencial de deterioração' de *Brettanomyces bruxellensis* em vinhos da Apúlia, nesse estudo o autor relatou que todas as cepas dessa espécie produziram 4-EF na faixa de 1.410 mg/L e 1.900 mg/L após sete dias de incubação. Nosso estudo, mostrou menores taxas no período de coleta de 40h, onde foi avaliado o perfil de conversão de ApC.

Segundo Curtin et al. (2013), a limitação de oxigênio estimula a produção de 4-etilfenol. Desse modo, quanto maior for a disponibilidade de substrato para consumo, maior a produção de 4-EF. Nesse sentido, as linhagens GDB 248 e LAMAP2480 consumiram mais glicose em mosto de uva que em mosto de caldo de cana na presença de amônio como fonte de nitrogênio. Por outro lado, o consumo do açúcar é maior em meio de caldo de cana na presença de nitrato como fonte de nitrogênio. De certa forma, esses resultados contrariam aqueles apresentados por Silva et al (2019) que mostram que as linhagens de vinho consomem menos açúcar do que as linhagens de cana. Essa premissa não parece ser geral e depende da constituição do meio de cultivo.

Ao comparar diretamente o crescimento das linhagens em mosto de uva do nosso estudo, observou-se que em meio contendo nitrato e sem a presença de ApC, GDB248 alcança fase lag em 20 horas e atinge velocidade de crescimento $0,08 \text{ h}^{-1}$, sendo a condição mais relevante para essa linhagem. A presença de ácido p-cumárico resulta no atraso em 8 horas para alcançar a fase lag nessa mesma condição, sendo que a linhagem LAMAP2480 tarda em 24 horas para alcançar fase lag. No entanto, alcança fase lag 8h tanto em nitrato quanto em amônio tendo similares taxas de velocidade de crescimento. Coronado et al. (2015) mostraram que a presença de ApC vinhos autênticos e sintéticos diminuiu a velocidade de crescimento da levedura *B. anomalus*

Em crescimento aeróbico as células das duas linhagens foram maiores na ausência de ApC. O mosto de uva com a presença de nitrato impediu o crescimento das duas linhagens GDB248 e LAMAP2480, o que pode estar relacionado à presença de ácido cítrico e málico na composição do mosto de uva. Ainda, esse achado pode repercutir no contexto industrial pela relevância em que na medida da adição de nitrato ao mosto de uva para produção de vinho, possa controlar ou eliminar a presença de *Dekkera*. Normalmente é adicionado sulfito (SO_2) no meio para tentar conter contaminação por essa levedura, o estudo do controle de contaminação é de grande importância na vinificação, considerando reduzi o uso de sulfito, pois a levedura tem se adaptado cada vez mais e demonstrado resistência (BASSI ET AL., 2015). Gonzales-Poblete et al. (2020) relatou que 14 das 15 linhagens de *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* isoladas de diferentes regiões vinícolas do Chile foram capazes de produzir 4-vinilfenol e que essa produção parece afetar negativamente o efeito inibitório do sulfito para algumas dessas linhagens, tornando sem efeito a utilização desse biocida no mosto de fermentação.

A presença de ácidos hidroxicinâmicos no meio de cultura reduz a taxa de crescimento de *D. bruxellensis* concomitante é modificada ao aumento da atividade das enzimas CD e VFR (GODOY ET AL., 2009). Também foi observado que a presença de etanol no meio induz maior atividade da enzima CD e, conseqüentemente, maior metabolização do ácido p-cumárico pela levedura (GANGA ET AL., 2011; COVRE ET AL., 2023). No entanto, esse fenômeno não foi observado no presente estudo, nas duas leveduras testadas e nas condições de cultivo (tabela 2). A maior produção de 4-VF foi observada na condição da linhagem GDB 248 em meio com nitrato (Tabelas 2 e 3). No entanto, o cálculo de distribuição de carbono mostrou que menos carbono proveniente do ApC foi convertido a 4-EF. O que se observou foi uma baixa taxa de conversão do ApC a 4-EF em todas as condições testadas, o que sugere que a metabolização de maior parte do ApC se deu por uma via alternativa. Konzock et al. (2023) relataram que o ApC é majoritariamente metabolizado para o ácido 4-hidroxibenzóico (4HBA) na levedura *Yarrowia lipolytica*. Portanto, a produção de 4HBA representa importante para a metabolização de ApC. Nosso estudo utilizando duas linhagens de *Dekkera bruxellensis* mostra resultados que

possivelmente em meios alternativos que simulam meios industriais, como mosto de uva (vinho) e mosto de caldo de cana (etanol), a quantidade de moléculas de ácido p-cumárico não foram totalmente convertidas a ApC. A produção de 4HBA por *D. bruxellensis* deve ser investigada. A diminuição da concentração de ApC no caldo de cana não é atribuído somente à produção de 4-VF, assim, existem caminhos alternativos para conversão do ApC do que a formação de 4-EF (KHEIR et al.,2013; KONZOCK et al.,2023). Deve-se considerar também que a conversão molar de ApC a 4-EF difere entre diferentes linhagens de *D. bruxellensis*, o que se atribuiu à diversidade genética interespecífica da levedura (GOMES ET AL.,2012). Gonzales-Poblete et al. (2017) mostrou que linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* podem converter ApC a 4-EF de forma tão eficiente quanto a linhagem LAMAP 2480, e no presente estudo mostramos que a linhagem LAMAP 2480 apresenta maior potencial metabólico de converter ApC a 4-EF do que a GDB 248.

Silva et al. (2018) observou que mostos de cana apresentam maior concentração de ácido do que mostos de vinho, o que está de acordo com o nosso estudo que mostra maior dificuldade de conversão do ApC em mosto de cana que em mosto de vinho. Nesse estudo foi detectado o pico de 9,5 mg/L de 4-EF, o que representa 91% do ácido ApC. A produção de 4-EF foi maior no mosto de caldo do que no mosto de melaço pelas linhagens CCA059 e CCA155. Esse valor foi semelhante ao observado por Sturm et al., (2015), mas superiores ao observado no presente estudo, que ficou em torno de 10%. Isto indica que a metabolização de ApC a 4-EF deve variar bastante pela combinação linhagem e composição do meio.

7. CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que a linhagem LAMAP2480 isolada de vinhos é capaz de assimilar nitrato tão bem quanto a linhagem isolada do bioetanol GDB248. Ainda, LAMAP2480 demonstrou mais sensibilidade ao ApC do que GDB248. De modo geral, utilizando nitrato a produção de etanol foi mais baixa do que em amônio, em ambas as linhagens. Esse trabalho também evidenciou que o tipo da fonte de nitrogênio foi a variável mais importante no agrupamento dos dados. Os maiores valores de consumo de açúcar observados foram em meio contendo amônio sem a presença de ApC e os menores em meio contendo nitrato e com ApC. Ainda, ambas linhagens apresentaram capacidade de consumir ApC, no entanto, resultaram em diferentes atividades metabólicas para produzir 4-vinilfenol (4-VF) e 4-etilfenol (4-EF). A linhagem de vinho produziu mais 4-EF que a linhagem de etanol. Portanto, os resultados deste trabalho mostram pela primeira vez o metabolismo desta levedura em função de presença de ApC no mosto e contribuem para uma melhor compreensão de aspectos fisiológicos da levedura *Dekkera bruxellensis*, oferecendo estratégias para controlar a contaminação, e sendo de suma importância para aplicações tecnológicas no contexto industrial de vinhos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, D. A.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Growth rates of Dekkera/Brettanomyces yeasts hinder their ability to compete with Saccharomyces cerevisiae in batch corn mash fermentations. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 66, p. 641-647, 2005.

ABRAMOVIC, H. Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acid Derivatives: A Focus on Biochemistry, Physicochemical Parameters, Reactive Species, and Biomolecular Interactions. In **Coffee in Health and Disease Prevention**; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015; pp. 843–852.

AGNOLUCCI, M., TIRELLI, A., COCOLIN, L., & TOFFANIN, A. (2017). *Brettanomyces bruxellensis* yeasts: Impact on wine and winemaking. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 33(10), 180. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2345-z>

ALBERTS, Bruce et al. Biologia molecular da célula. 3.ª edição. **Editora Artmed, Porto**, 1997.

ALSTON, J. M., ARVIK, T., HART, J., & LAPSLEY, J. T. (2021). Brettanomics I: The cost of Brettanomyces in California wine production. **Journal of Wine Economics**, 16(1), 4–31. <https://doi.org/10.1017/jwe.2020.20>

ALVES JR, S. L. et al. Bioprospecting Enzymes for 2G Ethanol through Metagenomics. Ethanol as a green alternative fuel: insight and perspectives, 1st edn. **Nova Science Publishers**, Hauppauge, NY, p. 179-201, 2019.

ANITHA TS, Palanivelu P (2013) Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of Aspergillus parasiticus. **Protein Expr Purif** 88:214-220.

AVRAMOVA, M., GRBIN, P., BORNEMAN, A., ALBERTIN, W., MASNEUF-POMARÈDE, I., & VARELA, C. (2019). Competition experiments between *Brettanomyces bruxellensis* strains reveal specific adaptation to sulfur dioxide and complex interactions at intraspecies level. **FEMS Yeast Research**, 19(3), 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsy r/foz010>

BADOTTI, Fernanda et al. Switching the mode of sucrose utilization by Saccharomyces cerevisiae. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2008.

BAI, Yaohui et al. Microbial degradation and metabolic pathway of pyridine by a Paracoccus sp. strain BW001. **Biodegradation**, v. 19, p. 915-926, 2008.

BARAMPOUTI, E. M., Christofi, A., Malamis, D., & Mai, S. (2021). A sustainable approach to valorize potato peel waste towards biofuel production. **Biomass**

Conversion and Biorefinery, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01811-4>

BARATA, A., NOBRE, A., CORREIA, P., MALFEITO-FERREIRA, M., & LOUREIRO, V. (2006). Growth and 4-ethylphenol production by the yeast *Pichia guilliermondii* in grape juices. **American Journal of Enology and Viticulture**, 57(2), 133–138. <https://doi.org/10.5344/ajev.2006.57.2.133>

BARATA A, PAGLIARA D, PICCININNO T, ET AL., O efeito do açúcar concentração e temperatura no crescimento e produção de fenol volátil por *Dekkera bruxellensis* em vinho. Res. de Levedura **FEMS** 2008;**8**:1097–102.

BENITO S, PALOMERO F, MORATA A, CALDERÓN F, SUAREZ-LEPE JÁ (2009) Factors affecting the hydroxycinnamate decarboxylase/vinylphenol reductase activity of *Dekkera/Brettanomyces*: application for *Dekkera/Brettanomyces* control in red wine making. **J Food Sci** 74:M15–M22

BASSI AP, PARALUPPI AL, REIS VR, CECCATO-ANTONINI SR (2015) Potassium metabisulphite as a potential biocide against *Dekkera bruxellensis* in fuel ethanol fermentations. **Lett Appl Microbiol**. 60: 248-58.

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

BERTRAND E, Vandenberghe LPS, Soccol CR, Sigoillot JC and Faulds C (2016) First generation bioethanol. In: Soccol CR, Brar SK, Faulds C, Ramos LP (eds) Green fuels technology. Switzerland: **Springer International Publishing** 175–212.

BLOMQVIST, J. et al. Fermentation of lignocellulosic hydrolysate by the alternative industrial ethanol yeast *Dekkera bruxellensis*. **Letters in applied microbiology**, v. 53, n. 1, p. 73-78, 2011.

BLOMQVIST, J.; PASSOTH, V. *Dekkera bruxellensis*-spoilage yeast with biotechnological potential, and a model for yeast evolution, physiology and competitiveness. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 4, p. 1-9, 2015.

BÖER, Erik et al. Characterization and expression analysis of a gene cluster for nitrate assimilation from the yeast *Arxula adeninivorans*. **Yeast**, v. 26, n. 2, p. 83-93, 2009.

BOULTON, R. B., SINGLETON, V. L., BISSON, L. F., & KUNKEE, R. E. (1996). **Principles and practices of winemaking**. Springer US.

BORNEMAN AR, ZEPPEL R, CHAMBERS PJ, CURTIN CD. Insights sobre a paisagem genômica de *Dekkera bruxellensis*: genômica comparativa revela variações na ploidia e potencial de utilização de nutrientes entre isolados de vinho. **PLoS Genet**. 2014;10(2): e1004161.

BUŠIĆ, Arijana et al. Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 289-311, 2018.

CABALLERO, Antonio; RAMOS, Juan Luis. Enhancing ethanol yields through D-xylose and L-arabinose co-fermentation after construction of a novel high efficient L-arabinose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Microbiology**, v. 163, n. 4, p. 442-452, 2017.

CAJUEIRO DBB, PARENTE DC, LEITE FCB, DE MORAIS MA JR, DE BARROS PITA W (2017) Glutamine: a major player in nitrogen catabolite repression in the yeast *Dekkera bruxellensis*. **Antonie Van Leeuwenhoek** 110:1157–1168. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0888-5>

CHANDRA, Mahesh et al. Role of p-Coumaric Acid and Micronutrients in Sulfur Dioxide Tolerance in *Brettanomyces bruxellensis*. **Beverages**, v. 9, n. 3, p. 69, 2023.

CHATONNET, Pascal et al. The origin of ethylphenols in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 60, n. 2, p. 165-178, 1992.

CHENG, J.J. & TIMILSINA, G.R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. **Renewable Energy** 36(12), 3541-3549. 2011.

CIANI, M.; MACCARELLI, F.; FATICHENTI, F. Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 419-422, 2003.

CIBRARIO, Alice et al. *Brettanomyces bruxellensis* phenotypic diversity, tolerance to wine stress and wine spoilage ability. **Food microbiology**, v. 87, p. 103379, 2020.

COCOLIN, L. et al. Direct detection and identification of *Brettanomyces bruxellensis* and *Brettanomyces anomalus* in wine by molecular methods. In: **23rd International specialised symposium on yeast interactions between yeast and other organism**. 2003.

CODATO, Carolina B. et al. Ethanol production from *Dekkera bruxellensis* in synthetic media with pentose. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, p. 11-17, 2018.

COLOMER, Marc Serra; FUNCH, Birgitte; FORSTER, Jochen. The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 30-35, 2019.

CONTERNO, Lorenza et al. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, n. 2, p. 139-147, 2006.

CORONADO, P. et al. Comparison of the behaviour of *Brettanomyces bruxellensis* strain LAMAP L2480 growing in authentic and synthetic wines. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 107, p. 1217-1223, 2015.

COVRE, Elizabete Aparecida. Efeito do 4-etilfenol sobre o crescimento e capacidade fermentativa da linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. 2019.

CRAUWELS, Sam et al. *Brettanomyces bruxellensis*, essential contributor in spontaneous beer fermentations providing novel opportunities for the brewing industry. **BrewingScience**, v. 68, n. 9, p. 110-121, 2015.

CRAUWELS, Sam et al. Comparative phenomics and targeted use of genomics reveals variation in carbon and nitrogen assimilation among different *Brettanomyces bruxellensis* strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 21, p. 9123-9134, 2015.

CRÉPIN L, et al. Management of multiple nitrogen sources during wine fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**. 1;83(5):e02617-16, 2017.

CURTIN, C.; VARELA, C.; BORNEMAN, A. Harnessing improved understanding of *Brettanomyces bruxellensis* biology to mitigate the risk of wine spoilage. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 21, p. 680-692, 2015.

DA COSTA NOGUEIRA, Cleitiane et al. Enhancing enzymatic hydrolysis of green coconut fiber—Pretreatment assisted by tween 80 and water effect on the post-washing. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 734-740, 2018.

n, Jackeline Maria et al. Biological diversity of carbon assimilation among isolates of the yeast *Dekkera bruxellensis* from wine and fuel-ethanol industrial processes. **FEMS yeast research**, v. 19, n. 3, p. foz022, 2019.

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 ARAUJO GUILHERME, Alexandre et al. Ethanol production from sugarcane bagasse: Use of different fermentation strategies to enhance an environmental-friendly process. **Journal of environmental management**, v. 234, p. 44-51, 2019.

DE BARROS PITA, Will et al. O potencial biotecnológico da levedura *Dekkera bruxellensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 7, p. 1-9, 2019.

DE BARROS PITA, Will et al. The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. **Yeast**, v. 30, n. 3, p. 111-117, 2013.

DE BARROS PITA, W; LEITE, F.C.B; SOUZA LIBERAL, A.T; SIMÕES, D.A; MORAIS JUNIOR, M. A. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.100, p.99 – 107, 2011.

DEQUIN, SYLVIE et al. Wine yeasts. **Yeasts in Food**, p. 389-412, 2003.

DE DEKEN, R. H. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. **Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 149-156, 1966.

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

DE SOUZA LIBERAL, A. T. et al. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 538-547, 2007.

DIAS, L., DIAS, S., SANCHO, T., STENDER, H., QUEROL, A., MALFEITO-FERREIRA, M., & LOUREIRO, V. (2003). Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. **Food Microbiology**, 20(5), 567–574. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00152-1](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00152-1)

DIAS, L., PEREIRA-DA-SILVA, S., TAVARES, M., MALFEITO-FERREIRA, M., & LOUREIRO, V. (2003). Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. **Food Microbiology**, 20(4), 377–384. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00023-6](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00023-6)

DI TORO, Maria Rosaria et al. Intraspecific biodiversity and ‘spoilage potential’ of *Brettanomyces bruxellensis* in Apulian wines. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 102-108, 2015.

DIVOL B, du Toit M, Duckitt E. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. **Appl Microbiol Biotechnol** 2012; 95:601–13.

DUFOUR, J.-P.; MALCORPS, P. H.; SILCOCK, P. Control of ester synthesis during brewery fermentation. **Brewing yeast fermentation performance**, p. 213-233, 2003.

ECHEVERRIGARAY, Sergio et al. Identification and characterization of non-saccharomyces spoilage yeasts isolated from Brazilian wines. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 1019-1027, 2013.

FUGELSANG, K. C; EDWARD, C. G. **Wine microbiology. Practical applications and procedures**. 2 ed. New York: The Chapman & Hall Enology Library, 1997. 393 p.

GALAFASSI, Silvia et al. Dekkera/Brettanomyces yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1079-1088, 2011.

GALAFASSI, Silvia et al. Utilization of nitrate abolishes the “Custers effect” in Dekkera bruxellensis and determines a different pattern of fermentation products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 3-4, p. 297-303, 2013.

GALLONE, Brigida et al. Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. **Cell**, v. 166, n. 6, p. 1397-1410. e16, 2016.

GANGA MA, SALINAS F, RAVANAL C, ET AL. Ácido cinâmico, etanol e interação da temperatura na atividade da cumarato descarboxilase e a expressão relativa do gene cd putativo em *D. bruxellensis*. **Electron J Biotechnol** 2011; **14**:8.

GARCÍA-RÍOS, E., & GUILLAMÓN, J. M. (2019). Sulfur dioxide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*: Beyond SSU1. **Microbial Cell**, 6(12), 527–530. <https://doi.org/10.15698/mic2019.12.69>

GERMANO S, Pandey A, Osaku CA et al. (2003) Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzym Microb Technol** 32:246- 251

GODOY, Liliana et al. Purification and characterization of a p-coumarate decarboxylase and a vinylphenol reductase from *Brettanomyces bruxellensis*. **International journal of food microbiology**, v. 127, n. 1-2, p. 6-11, 2008

GODOY, Liliana et al. Comparative transcriptome assembly and genome-guided profiling for *Brettanomyces bruxellensis* LAMAP2480 during p-coumaric acid stress. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 34304, 2016.

GOLDEMBERG, José. Sugarcane ethanol: strategies to a successful program in Brazil. In: Advanced biofuels and bioproducts. **Springer**, New York, NY, 2013. p. 13-20.

GOMES, Joana Lousada. Caracterização da conversão metabólica de ácidos fenólicos em fenóis voláteis por *Brettanomyces/Dekkera*. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica Portuguesa (Portugal).

G-POBLETE, Camila et al. Biodiversity among *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from different wine regions of Chile: key factors revealed about its tolerance to sulphite. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, p. 557, 2020.

HARRIS V, FORD CM, JIRANEK V, GRBIN PR (2009) Dekkera and Brettanomyces growth and utilisation of hydroxycinnamic acids in synthetic media. **Appl Microbiol Biotechnol** 81:1117–1127

HARRIS V, JIRANEK V, FORD C, GRBIN P (2010) Inhibitory effect of hydroxycinnamic acids on *Dekkera* spp. **Appl Microbiol Biotech** 86:721–729

HELLIWELL, Stephen B. et al. TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 148, n. 1, p. 99-112, 1998.

HELLBORG, Linda; PIŠKUR, Jure. Yeast diversity in the brewing industry. In: **Beer in health and disease prevention**. Academic Press, 2009. p. 77-88.

HOU, Xiaoru. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 94, n. 1, p. 205-214, 2012.

HSIAO, Nai-Wan et al. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 89-94, 2014.

HULIN, M. et al. Rapid identification of the genus *Dekkera*/Brettanomyces, the *Dekkera* subgroup and all individual species. **International journal of food microbiology**, v. 187, p. 7-14, 2014.

KAEWKOD, T., BOVONSOMBUT, S., & TRAGOOLPUA, Y. (2019). Efficacy of kombucha obtained from green, oolong and black teas on inhibition of pathogenic bacteria, antioxidation, and toxicity on colorectal cancer cell line. **Microorganisms**, 7(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120700>

LJUNGDAHL, Per O.; DAIGNAN-FORNIER, Bertrand. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 190, n. 3, p. 885-929, 2012.

JACOBUS AP, Gross J, Evans JH, Ceccato-Antonini SR and Gombert AK (2021) *Saccharomyces cerevisiae* strains used industrially for bioethanol production. **Essays Biochem** PMID: 34156078.

KEMSAWASD, Varongsiri et al. Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, p. 10191-10207, 2015.

KONZOCK, Oliver et al. Cinnamic acid and p-coumaric acid are metabolized to 4-hydroxybenzoic acid by *Yarrowia lipolytica*. **AMB Express**, v. 13, n. 1, p. 84, 2023.

KHEIR, Joyce et al. Impact of volatile phenols and their precursors on wine quality and control measures of *Brettanomyces*/*Dekkera* yeasts. **European Food Research and Technology**, v. 237, p. 655-671, 2013.

KUFFERATH, H.; VAN LAER, M. H. Études sur les levures du Lambic. **Bull Soc Chim Belgique**, v. 30, p. 270-276, 1921.

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

LEITÁZKA, E; POLÁKOVÁ, S; PIŠKUR, J; SULO, P. Mitochondrial genome from the facultative anaerobe and petite positive yeast *Dekkera bruxellensis* contains the NADH dehydrogenase subunit genes. **FEMS yeast research**, v. 10, n. 5, p. 545-557, 2010.

LIU, Dongyang et al. Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. **Microbial cell factories**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2012.

LIMA, Adriana Nunes de. Survival, metabolism and production of volatile phenols by *Dekkera bruxellensis* in monovarietal wines. 2019.

LLEIXÀ, Jessica et al. Genetic and phenotypic diversity of *Brettanomyces bruxellensis* isolates from ageing wines. **Food Bioscience**, v. 40, p. 100900, 2021.

LYNCH, K. M., WILKINSON, S., DAENEN, L., & ARENDT, E. K. (2021). An update on water kefir: Microbiology, composition and production. **International Journal of Food Microbiology**, 345, e109128. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>.

MALFEITO-FERREIRA, M. (2018). Two decades of “horse sweat” taint and *brettanomyces* yeasts in wine: Where do we stand now? **Beverages**, 4, 32. <https://doi.org/10.3390/beverages4020032>

MAZAHERI, D., & Pirouzi, A. (2022). Valorization of *Zymomonas mobilis* for bioethanol production from potato peel: fermentation process optimization. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 12(8), 3389–3398. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00834-7>

MILHEIRO, J. et al. 4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol and 4-ethylcatechol in red wines: microbial formation, prevention, remediation and overview of analytical approaches. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2017. doi:10.1080/10408398.2017.1408563.

MISHRA SS, Ray RC, Rosell CM (2017) Microbial enzymes in food applications: history of progress. In: **Microbial enzyme technology in food applications**. CRC Press, Boca Raton, pp 17–32

MOKTADUZZAMAN, M; GALAFASSI, S; VIGENTINI, I; FOSCHINO, R; CORTE, L; CARDI-NALI, G; PIŠKUR, COMPAGNO, C. Strain-dependent tolerance to acetic acid in *Dekkera bruxellensis*. **Ann Microbiol**. doi: 10.1007/s13213-015-1115-0. 2015

PARISUTHAM, Vinuselvi et al. Intracellular cellobiose metabolism and its applications in lignocellulose-based biorefineries. **Bioresource technology**, v. 239, p. 496-506, 2017.

PARENTE, Denise Castro et al. On the catabolism of amino acids in the yeast *Dekkera bruxellensis* and the implications for industrial fermentation processes. **Yeast**, v. 35, n. 3, p. 299-309, 2018.

PASSOTH, Volkmar et al. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 1, p. 3-13, 2006.

PAUTASSO, Constanza et al. Identification of novel transcriptional regulators of PKA subunits in *Saccharomyces cerevisiae* by quantitative promoter-reporter screening. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 5, p. fow046, 2016.

PEETERS, Ken et al. Fructose-1, 6-bisphosphate couples glycolytic flux to activation of Ras. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2017.

PEÑA-MORENO, Irina Charlot et al. Nitrate boosts anaerobic ethanol production in an acetate-dependent manner in the yeast *Dekkera bruxellensis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 2, p. 209-220, 2019.

PEÑA-MORENO, Irina Charlot et al. Comparative proteomic analyses reveal the metabolic aspects and biotechnological potential of nitrate assimilation in the yeast *Dekkera bruxellensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 1585-1600, 2021.

PEREIRA, Luciana Filgueira et al. The physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 3, p. 529-539, 2012.

PEREIRA, Luciana Filgueira et al. The fermentation of sugarcane molasses by *Dekkera bruxellensis* and the mobilization of reserve carbohydrates. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 3, p. 481-489, 2014.

PICCOLO, Chiara; BEZZO, Fabrizio. A techno-economic comparison between two technologies for bioethanol production from lignocellulose. **Biomass and bioenergy**, v. 33, n. 3, p. 478-491, 2009.

PIŠKUR, Jure et al. The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. **International journal of food microbiology**, v. 157, n. 2, p. 202-209, 2012.

PROCHÁZKA, E., POLÁKOVÁ, S., PIŠKUR, J., & SULO, P. (2010). Mitochondrial genome from the facultative anaerobe and petite-positive yeast *Dekkera bruxellensis* contains the NADH dehydrogenase subunit genes. **FEMS Yeast Research**, 10(5). <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00644.x>

RECH, Fernanda Roberta et al. Fermentation of hexoses and pentoses from sugarcane bagasse hydrolysates into ethanol by *Spathaspora hagerdaliae*. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 42, n. 1, p. 83-92, 2019.

REIS, ALEXANDRE LIBANIO SILVA et al., Second-generation ethanol from sugarcane and sweet sorghum bagasses using the yeast *Dekkera bruxellensis*. **Industrial Crops and Products**, v. 92, p. 255-262, 2016.

REIS, ALEXANDRE LIBANIO SILVA et al., Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2014.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, B., Coelho, E., Gullón, B., Yáñez, R., & Domingues, L. (2023). Potato peels waste as a sustainable source for biotechnological production of biofuels: Process optimization. **Waste Management**, 155(October 2022), 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2022.11.007>

RODRUSSAMEE, Nadchanok; SATTAYAWAT, Pachara; YAMADA, Mamoru. Highly efficient conversion of xylose to ethanol without glucose repression by newly isolated thermotolerant *Spathaspora passalidarum* CMUWF1–2. **BMC microbiology**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2018.

ROZPEĐOWSKA, Elżbieta et al. Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. **Nature communications**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2011.

ROZPEĐOWSKA, E., HELLBORG, L., ISHCHUK, O. P., ORHAN, F., GALAFASSI, S., MERICO, A., WOOLFIT, M., COMPAGNO, C., & PIŠKUR, J. (2011). Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. **Nature Communications**, 2(1), 302. <https://doi.org/10.1038/ncomm.s1305>

RUANGRIT, Khomsan et al. Environmental-friendly pretreatment and process optimization of macroalgal biomass for effective ethanol production as an alternative fuel using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, p. 101919, 2021.

RÜCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. Sabouraudia: **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 20, n. 3, p. 233-244, 1982.

SABOTIC J, Kos J (2012) Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. **Appl Microbiol Biotechnol** 93:1351-1375.

SANTAMARIA L, REVERÓN I, FELIPE FL, LAS RIVAS B, MUÑOZ R (2018) Ethylphenol formation by *Lactobacillus plantarum*: identification of the enzyme involved in the reduction of vinylphenols. **Appl Environ Microbiol** 84:e01064-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01064-18>

SANTOS, RENATA O. et al. *Candida queirozia* sp. nov., a cellobiose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Atlantic Rain Forest. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 3, p. 635-642, 2011.

SARAN S, Isar J, Saxena RK (2007) A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. **J Biochem Biophys Methods** 70:697-699

SAVITHA S, Sadhasivam S, Swaminathan K et al. (2011) Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **J Taiwan Inst Chem Eng** 42:298-304.

SCALCINATI, Gionata et al. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient aerobic xylose consumption. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 5, p. 582-597, 2012.

SERPAGGI, V.; Remize, F.; Recorbet, G.; Gaudot-Dumas, E.; Sequeira-Le Grand, A.; Alexandre, H. Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. **Food Microbiol.** 2012, 30, 438–447, doi:10.1016/j.fm.2011.12.020

SIVARIO, J.M. Assimilation of nitrate by yeasts. **FEMS Microbiology Review**, v. 26, n. 3, p. 277–284, 2002.

SCHIFFERDECKER, Anna Judith et al. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. **Yeast**, v. 31, n. 9, p. 323-332, 2014.

SCHIFFERDECKER, Anna Judith et al. Alcohol dehydrogenase gene ADH3 activates glucose alcoholic fermentation in genetically engineered *Dekkera bruxellensis* yeast. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, p. 3219-3231, 2016.

SILVA, Lincon Felipe Lima et al. Volatile phenols are produced by strains of *Dekkera bruxellensis* under Brazilian fuel ethanol industry-like conditions. **FEMS microbiology letters**, v. 365, n. 21, p. fny228, 2018.

SINGHAL P, Nigam V, Vidyarthi A (2012) Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. **Int J Adv Biotechnol Res** 3(3):653–669

SHINOHARA, Takashi; KUBODERA, Shinsi; YANAGIDA, Fujitoshi. Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 1, p. 90-97, 2000.

SMITH, Maudy Th. *Dekkera van der Walt* (1964). In: **The Yeasts**. Elsevier, 2011. p. 373-377

SRIVASTAVA, Neha et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, 2018.

STEENSELS, Jan et al. Brettanomyces yeasts—From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. **International journal of food microbiology**, v. 206, p. 24-38, 2015.

SUÁREZ R, SUÁREZ-LEPE JA, MORATA A, CALDERÓN F. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. **Food Chem** 2007;**102**(1):10-21.

ŠUĆUR, S.; ČADEŽ, N.; KOŠMERL, T. Volatile phenols in wine: Control measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts. **Acta Agriculturae**, v. 107, n. 2, p. 453-472, 2016.

STURM, María Elena et al. Relation between coumarate decarboxylase and vinylphenol reductase activity with regard to the production of volatile phenols by native *Dekkera bruxellensis* strains under 'wine-like' conditions. **International journal of food microbiology**, v. 206, p. 51-55, 2015.

TAVANO, Olga Luisa et al. Biotechnological applications of proteases in food technology. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 17, n. 2, p. 412-436, 2018.

TELES, Gilberto Henrique et al. The Metabolism of Respiring Carbon Sources by *Dekkera bruxellensis* and Its Relation with the Production of Acetate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-23, 2023.

TIUKOVA, Ievgeniia A. et al. Transcriptome of the alternative ethanol production strain *Dekkera bruxellensis* CBS 11270 in sugar limited, low oxygen cultivation. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e58455, 2013.

TRAN, T., GRANDVALET, C., VERDIER, F., MARTIN, A., ALEXANDRE, H., & TOURDOT-MARÉCHAL, R. (2020). Microbial dynamics between yeasts and acetic acid bacteria in Kombucha: Impacts on the chemical composition of the beverage. **Foods**, **9**(7), 963. <https://doi.org/10.3390/foods9070963>

TRIYANI, A.; FACHRUL, M. F.; MINARTI, A. Potential Utilization of Sugarcane Bagasse as Raw Material for Bioethanol Production. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2023. p. 012003.

WOOLFIT, Megan et al. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis*. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 4, p. 721-733, 2007.

VALDETARA, Federica 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**, v. 8, p. 290002, 2017.

VANBENEDEN, N.; GILS, F.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F.R. Formation of 4-Vinyl and 4-Ethyl Derivatives from Hydroxycinnamic Acids: Occurrence of Volatile Phenolic Flavour Compounds in Beer and Distribution of Pad1-Activity among Brewing Yeasts. **Food Chem**. 2008, 107, 221–230.

VAN DER WALT, J. P. Dekkera, a new genus of the Saccharomycetaceae. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 30, p. 273-280, 1964.

XAVIER GIACOMINI, Rafaela et al. MONITORING OF MYCOTOXINS AND PESTICIDES IN WINEMAKING. **Journal of Viticulture & Enology/Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 38, n. 1, 2023.