

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Departamento de Antibióticos
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Gilberto Henrique Teles Gomes Da Silva

Análise do metabolismo respiro-fermentativo do acetaldeído na levedura
Dekkera bruxellensis

Recife
2017

Gilberto Henrique Teles Gomes Da Silva

**Análise do metabolismo respiro-fermentativo do acetaldeído na levedura
*Dekkera bruxellensis***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como re-
quisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio de Mo-
rais Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Will de Barros Pita

**Recife
2017**

Silva, Gilberto Henrique Teles Gomes da

Análise do metabolismo respiro-fermentativo do acetaldeído na levedura *Dekkera bruxellensis* / Gilberto Henrique Teles Gomes da Silva. – Recife: O Autor, 2017.

66 f.: il., fig, tab.

Orientador: Marcos Antonio de Moraes Junior

Coorientador: Will de Barros Pita

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia, 2017.

Inclui referências

1. Álcool 2. Leveduras (fungos) 3. Estresse oxidativo I. Moraes Junior, Marcos Antonio de (orient.) II. Pitta, Will de Barros (coorient.) III. Título

662.6692

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-307

Gilberto Henrique Teles Gomes Da Silva

Análise do metabolismo respiro-fermentativo do acetaldeído na levedura *Dekkera bruxellensis*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

APROVADO EM :22/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior (Orientador)
Departamento de Genética – UFPE

Prof Dra. Márcia Vanusa da Silva
Universidade Federal de Pernambuco- UFPE
(Membro interno)

Prof Dra. Fernanda Cristina Bezerra Leite
Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE
(Membro externo)

Recife, 22 de Fevereiro de 2017

Agradecimentos

Aos meus dois Pais, meu Deus pela sustentação em todos os momentos da minha vida e I-bernon Gomes, meu maior incentivador nos estudos, sei que onde estiver estará feliz pelas minhas conquistas, sem o Senhor nada seria possível.

À família Teles, Guerra/Castor e Gouveia Gomes, em especial a minha mãe Luiza e namorada Luciana pelo amor e carinho em todos os momentos, sobretudo quando pensei que não conseguiria. Vocês são a força da minha vida. Amo vocês.

Aos meus Orientadores Marcos Morais e Will Pita por todo o conhecimento transmitido, confiança, entusiasmo para que as coisas deem certo e, sobretudo críticas que irão contribuir significativamente para minha vida profissional, muito obrigado!

As professoras Márcia Vanusa e Tereza Correia, pela oportunidade de realização do estágio á docência na disciplina por elas ministrada. Obrigado pelo apoio e conhecimento.

Ao pessoal do laboratório, que de alguma maneira contribuíram para realização dos experimentos da dissertação, em especial Jacke, Nathália, Irina e Maíse, principalmente pela ajuda psicológica, mesmo que loucas algumas vezes. Muito obrigado!

Aos meus verdadeiros amigos pelas palavras de apoio e descontração em todos os momentos.

Aos órgãos que contribuíram financeiramente com os materiais da dissertação, em especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por todo o suporte.

Agradeço, desde já, a banca de defesa, pelas contribuições concedidas para o trabalho.

Resumo

A levedura *Dekkera bruxellensis* é um micro-organismo muito adaptado aos processos de fermentação alcoólica industrial, sendo encontrada em indústrias que realizam a produção de cerveja, vinho e etanol combustível. Na maioria desses processos, incluindo a produção de bioetanol, *D. bruxellensis* é considerada uma levedura contaminante, pois compete com *Saccharomyces cerevisiae* pelos substratos industriais, ocasionando redução no rendimento e produtividade etanólica. Apesar disso, *D. bruxellensis* é capaz de produzir etanol, mesmo que em menor produtividade e, assim, apresenta potencial de uso industrial. Um dos problemas associados à baixa produtividade deve estar relacionado com o elevado fluxo metabólico para a produção de acetato citosólico a partir do acetaldeído, que desvia o carbono que seria utilizado para produção de etanol. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o metabolismo do acetaldeído como ponto de ramificação no metabolismo fermentativo de *D. bruxellensis*. Para isso, a atividade da enzima acetaldeído desidrogenase (AldH) foi bioquimicamente inibida pelo uso do composto disulfiram (DSF) em diferentes formulações do meio de cultivo. Os dados mostraram que *D. bruxellensis* é mais resistente ao DSF do que *S. cerevisiae*, sendo a concentração de 100 μ M inibitória para ambas as leveduras. A adição de acetato ao meio contendo glicose promoveu pequeno, porém significativo aumento no crescimento de *S. cerevisiae*, sendo moderadamente tóxico para *D. bruxellensis*. Juntamente com os dados de crescimento em galactose e glicerol, isso mostra que *D. bruxellensis* é capaz de exportar acetato da mitocôndria para o citoplasma na ausência de AldH. A adição dos agentes antioxidantes glutatona e N-acetilcisteína bloqueou completamente o efeito tóxico da adição de DSF, mostrando que o acúmulo de acetaldeído induz estresse oxidativo nas leveduras. Quando utilizado nos ensaios de fermentação, DSF promoveu aumento inicial do fluxo glicolítico com consequente aumento na produção de etanol e, paradoxalmente, de acetato.

Palavras-chave: Bioetanol. fermentação alcoólica. levedura contaminante. Acetaldeído.

Abstract

Dekkera bruxellensis is a microorganism highly related to industrial fermentation processes, especially in brewing, winemaking and fuel ethanol industries. In most of these processes, including the production of bioethanol, *D. bruxellensis* is considered a contaminant yeast, since it competes with *Saccharomyces cerevisiae* for the industrial substrates, resulting in low ethanol yield and productivity. Nevertheless, *D. bruxellensis* is able to produce ethanol, showing potential for industrial use. One of the problems associated with low productivity must be related to the high metabolic flux towards the production of cytosolic acetate from acetaldehyde, which deviates the carbon from ethanol fermentation. In this context, the present study aimed to study the metabolism of acetaldehyde as a branch point in the fermentative metabolism of *D. bruxellensis*. Therefore, the activity of the enzyme acetaldehyde dehydrogenase (AldH) was biochemically inhibited by the use of disulfiram compound (DSF) in different formulations of the culture medium. The data showed that *D. bruxellensis* is more resistant to DSF than *S. cerevisiae*, with an inhibitory concentration of 100 μ M for both yeasts. Addition of acetate to the medium containing glucose promoted a small but significant increase in *S. cerevisiae* growth, being somewhat toxic to *D. bruxellensis*. Together with the growth data on galactose and glycerol, this shows that *D. bruxellensis* is able to export acetate from the mitochondria to the cytoplasm in the absence of AldH. The addition of the antioxidant agents glutathione and N-acetylcysteine completely blocked the toxic effect of the addition of DSF, showing that the accumulation of acetaldehyde induces oxidative stress in the yeast. When used in the fermentation tests, DSF promoted initial increase in glycolytic flow with a consequent increase in the production of ethanol and, paradoxically, of acetate.

Keywords: Bioethanol. Alcoholic fermentation. Contaminant yeast. Acetaldehyde.

Lista de figuras

Página

Figura 1: Maiores exportadores de etanol combustível no mundo.	15
Figura 2: Esquema simplificado da fermentação alcoólica.	15
Figura 3: Células da levedura <i>Dekkera bruxellensis</i> .	16
Figura 4: Fases de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> .	21
Figura 5: Principais enzimas relacionadas ao metabolismo do acetaldeído.	22
Figura 6: Reação etanol-disulfiram caracterizada pelo bloqueio da enzima acetaldeído-desidrogenase e consequente acúmulo intracelular de acetaldeído.	24
Figura 7: Avaliação do potencial antioxidante da GSH em células de <i>S. cerevisiae</i> incubadas com H ₂ O ₂ .	30
Figura 8: Equipamento para cultivo em aerobiose (multileitor de placas).	31
Figura 9: Efeito do disulfiram em diferentes concentrações (0-100 µM) no crescimento das leveduras <i>D. bruxellensis</i> (painel A) e <i>S. cerevisiae</i> (painel B) após cultivo de 24 horas em meio YNB pH 5,5.	33
Figura 10: Efeito do disulfiram no crescimento das leveduras <i>D. bruxellensis</i> e <i>S. cerevisiae</i> após cultivo de 24 horas em meio YNB pH 5,5.	35
Figura 11: Efeito do disulfiram em diferentes concentrações (0-100 µM) no crescimento das leveduras <i>D. bruxellensis</i> e <i>S. cerevisiae</i> (com acetato)	37
Figura 12: Cinética da velocidade relativa e extensão da fase <i>lag</i> de crescimento das leveduras <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 e <i>S. cerevisiae</i> JP1.	41
Figura 13: Efeito dos agentes antioxidantes glutatona reduzida (GSH) e N-acetilcisteína (NAC) no crescimento da levedura <i>D. bruxellensis</i> GDB 248	46
Figura 14: Efeito de agentes antioxidantes no crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> JP1 incubada com DSF em diferentes concentrações.	47
Figura 15: Parâmetros fisiológicos de ensaio fermentativo da levedura <i>Dekkera bruxellensis</i> GDB 248 em meio YNB sem aminoácidos, com adição de glicose e sulfato de amônio.	50
Figura 16: Taxas específicas de consumo de glicose e produção de etanol e acetato da levedura <i>D. bruxellensis</i> .	51
Figura 17: Crescimento das leveduras <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 e <i>S. cerevisiae</i> JP1 com glicerol e galactose como fonte de carbono e 100 µM de DSF.	56

Lista de tabelas

Páginas

Tabela 1: Velocidades específicas de crescimento (μ) das leveduras *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* cultivadas em meios com glicose e glicose e acetato com disulfiram em diferentes concentrações (0-100 μ M). 34

Tabela 2: Velocidades específicas de crescimento (μ) das leveduras *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* cultivadas em meio sintético (pH 5,5) com disulfiram em diferentes concentrações (0-100 μ M) e agentes antioxidantes. 48

Tabela 3: Parâmetros fermentativos de *Dekkera bruxellensis* GDB 248 em meio YNB sem aminoácidos , glicose e sulfato de amônio com DSF em duas concentrações testes (45 μ M e 60 μ M) após cultivo de 24h. 53

Lista de abreviaturas e siglas

ATP	Adenosina trifosfato
ASC	Ascorbato
Adh	Álcool-desidrogenase
Aldh	Acetaldeído-desidrogenase
CTBT	7-chlorotetrazolo [5,1-c] benzo [1,2,4] triazin
Cu	Cobre
CYS	Cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DDC	Dietilditiocarbamato
DSF	Disulfiram
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GPXs	Glutationa peroxidases
HO	Radical hidroxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Mn	Manganês
Mb	Mega bases
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NDI1	NADH desidrogenase interna
NAC	N-acetilcisteína
μM	Micromolar

O ₂ ⁻	Ânions superóxidos
Pdc	Piruvato-descarboxilase
Phe-Pdc	Fenilpiruvato descarboxilase
PHGPXs	Hidroperóxidos fosfolipídeos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotação por minuto
SDH	Succinato desidrogenase
Sod	Superóxido dismutase
Zn	Zinco
TRX	Peroxirredoxinas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
YPD	<i>Yeast peptone dextrose</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
MIC	Concentração inibitória mínima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	14
2.2	A LEVEDURA <i>DEKKERA BRUXELLENSIS</i>	16
2.2.1	Ecologia da espécie	16
2.2.2	Aspectos fisiológicos de <i>Dekkera bruxellensis</i>	17
2.2.2.1	Efeito Custer e produção de ácido acético em células de <i>Dekkera bruxellensis</i>	17
2.3	<i>DEKKERA BRUXELLENSIS</i> COMO MICRO-ORGANISMO CONTAMINANTE DOS PROCESSOS INDUSTRIAIS	18
2.4	CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DA LEVEDURA <i>DEKKERA BRUXELLENSIS</i>	19
2.5	METABOLISMO CENTRAL DO CARBONO EM LEVEDURAS	20
2.5.1	Aspectos bioquímicos da metabolização da glicose	22
2.6	DISULFIRAM	23
2.7	ESTRESSE OXIDATIVO	25
2.7.1	Mecanismos de defesa contra as ros	27
2.7.1.1	Superóxido dismutase	27
2.7.1.2	Catalases.....	27
2.7.1.3	Peroxidasas.....	28
2.7.1.4	Moléculas com capacidade antioxidante.....	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	LINHAGENS E MEIOS DE CULTIVO	30
3.2	ENSAIOS DE CRESCIMENTO EM MULTILEITOR DE PLACAS	31
3.3	ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO	31
3.4	QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS EXTRACELULARES	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	CRESCIMENTO AERÓBICO DE <i>DEKKERA BRUXELLENSIS</i> GDB 248 COM A UTILIZAÇÃO DO DISULFIRAM	32
4.2	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE AGENTES ANTIOXIDANTES NO CRESCIMENTO DE <i>DEKKERA BRUXELLENSIS</i> E <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	42
4.2.1	Glutathione reduzida	42
4.2.2	N-acetilcisteína.....	44
4.3	ANÁLISE DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO	49
4.3.1	Avaliação do crescimento de <i>D. bruxellensis</i> e <i>S. cerevisiae</i> em glicerol e galactose como fonte de carbono na presença de DSF	54
5	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

A levedura *Dekkera bruxellensis* possui longo histórico de participação em processos industriais. De fato, esta levedura foi isolada inicialmente da produção de cervejas inglesas. Apesar desta associação, *D. bruxellensis* é geralmente considerada uma levedura com potencial de causar prejuízos aos processos fermentativos, ocasionando perdas econômicas, particularmente nas indústrias de vinho e cerveja. Apesar de parecer contraditório, o uso industrial de *D. bruxellensis* consiste no fato de que eliminar esta espécie do ambiente é um trabalho complexo, que em princípio pode interferir no metabolismo fermentativo da levedura *Sacharomyces cerevisiae*, levando a perdas econômicas. Assim, aproveitar o seu potencial de produção de etanol, em detrimento à sua eliminação do processo, é uma estratégia que deve ser melhor explorada. Para isso, é necessário entender os principais aspectos do seu metabolismo, na busca pelos melhores perfis de produção de metabólitos de interesse industrial.

O presente trabalho teve como objetivo o estudo do metabolismo do acetaldeído, utilizando o disulfiram, composto que inibe a atividade da enzima acetaldeído desidrogenase, proteína essencial para a produção de ácido acético citosólico nas leveduras. *D. bruxellensis* possui grande tendência em produzir ácido acético e essa característica é um dos fatores que fazem com que a levedura diminua a sua produção de etanol. Portanto, foi realizada uma análise cinética do metabolismo fermentativo da levedura, bem como a identificação de fatores fisiológicos importantes relacionados ao crescimento do micro-organismo sob condições de estresse ocasionado pelo disulfiram. A utilização do disulfiram como inibidor do crescimento de micro-organismos já foi relatada em alguns trabalhos na literatura e, no presente estudo, além da influência do composto no crescimento, foi utilizado antioxidantes hidrofílicos como aliviadores do efeito tóxico ocasionado pelo inibidor. Adicionalmente, o seu papel como depletor de acetato citosólico foi utilizado como potencial para o aumento da eficiência fermentativa da levedura *D. bruxellensis* cultivada em meio mineral.

A grande capacidade de *D. bruxellensis* em produzir ácido acético, associado ao bloqueio metabólico da produção citosólica do composto, ajudou a identificar a levedura como um micro-organismo capaz de exportar o acetato mitocondrial, mecanismo ausente na levedura *S. cerevisiae*, mas presente em outros micro-organismos. Desta forma, os dados gerados a partir do presente estudo podem contribuir no entendimento de novas características no metabolismo de *D. bruxellensis*, principalmente no que diz respeito à produção de compostos de interesse industrial, como o acetato e o etanol.

1.1 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Investigar o metabolismo do acetaldeído, ponto de ramificação da via fermentativa, na levedura *D. bruxellensis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a cinética de crescimento da levedura *Dekkera bruxellensis* sob inibição da enzima acetaldeído desidrogenase causada pelo composto disulfiram. .
- Avaliar a capacidade de antioxidantes em abolir o efeito inibitório do disulfiram em células de *Dekkera bruxellensis*.
- Analisar a influência do disulfiram no metabolismo do acetaldeído e na produção de metabólitos de interesse industrial pela levedura *D. bruxellensis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação do açúcar em etanol é uma das mais antigas reações mediadas por micro-organismos (BARNETT, 1998). Achados arqueológicos demonstram que os povos do Neolítico utilizavam técnicas de fermentação para produzir bebidas alcoólicas há pelo menos 9.000 anos (MCGOVERN et al, 2004). Evidências históricas na produção de cerveja também foram encontradas no Irã e Egito (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011) e as tradições de cerveja na Europa foram espalhadas por germânicos e tribos celtas há 3000 anos a.C (BARNETT, 1998). A fermentação alcoólica foi realizada em escala artesanal até a revolução industrial no século 19, quando foi transformada em um processo de fabricação industrial (BARNETT, 2000).

A busca por fontes alternativas de energia tem despertado interesse no etanol como biocombustível renovável (CHENG & TIMILSINA, 2011; TILMAN et al, 2009). O etanol permanece como um dos principais produtos biotecnológicos no mercado mundial, onde, 68% da produção é utilizada como combustível (CASPETA; BUIJS; NIELSEN, 2013). Somente em 2013, a exportação do biocombustível pelo Brasil foi de 2.917 milhões de litros, superando Estados Unidos, França, Paquistão e Guatemala (Figura 1) (BERNARDES, 2014). A produção de etanol é realizada através da fermentação por micro-organismos, com destaque para a levedura *S. cerevisiae* (PACHECO, 2010)..



Figura 1: Maiores exportadores de etanol combustível no mundo. (Milhões de litros/ano). **Fonte:** Bernardes, 2014.

S. cerevisiae é o principal micro-organismo fermentador e como anaeróbico facultativo, esta levedura possui a habilidade de realizar suas funções metabólicas tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Em condições de oxigenação, o açúcar é convertido em biomassa, CO_2 e água, e, na ausência de oxigênio, a maior parte é convertida em etanol e CO_2 , processo no qual caracteriza a fermentação alcoólica (Figura 2) (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Entretanto, essa levedura possui características metabólicas importantes para indústria, pois fermenta mesmo em condições de aerobiose, uma característica chamada de *Crab-tree* positivo, possui bom rendimento fermentativo e resistência aos elevados teores alcoólicos do processo. É importante salientar que linhagens com distintas habilidades fermentativas também podem ser identificadas e isoladas em processos industriais (SILVA-FILHO et al, 2005a; SILVA-FILHO et al, 2005b).

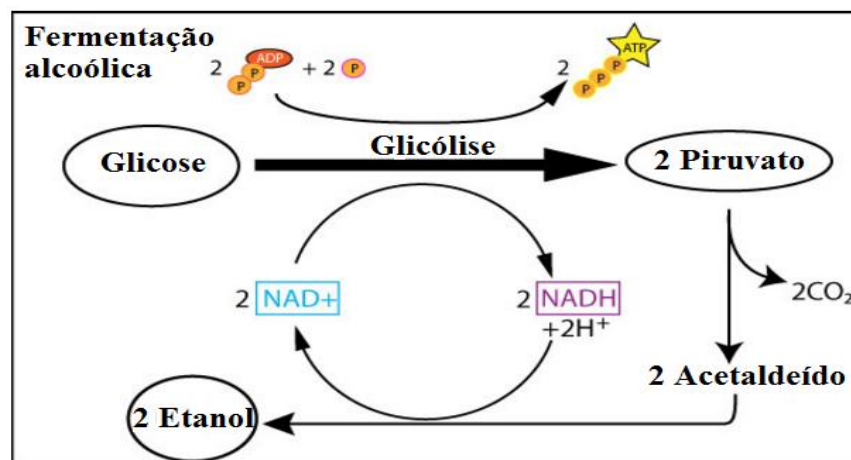


Figura 2. Esquema simplificado da fermentação alcoólica. Adaptado de Farabee et al 2014.

2.2 A LEVEDURA *DEKKERA BRUXELLESIS*

2.2.1 Ecologia da espécie

D. bruxellensis (Figura 3) foi classificada em 1964 por Van der Walt, pertencendo ao grupo dos hemiascomicetos. Esta levedura é considerada a forma teleomórfica (produtora de ascósporos) de *Brettanomyces bruxellensis*. Células vegetativas de *D. bruxellensis* são capazes de formar de 1-4 esporos por ascos (KURTZMAN et al, 2011). A espécie *B. bruxellensis* foi descrita por N. Hjelte Claussen na cervejaria Carlsberg em 1904, durante uma investigação sobre deterioração da bebida. O nome é derivado de 'fungo cervejeiro britânico', devido ao sabor produzido por esta levedura, que era típico para a cerveja britânica daquela época (CLAUSSEN, 1904). Curiosamente, a distinção entre *Dekkera* e *Brettanomyces* ainda não é tão clara e são utilizadas como sinônimos. Técnicas moleculares atuais não foram capazes de detectar diferenças sistemáticas entre os estados anamorfo e teleomorfo (OELOFSE et al, 2008). Posteriormente, *D. bruxellensis* foi encontrada em vários processos industriais, principalmente relacionados à produção de bebidas alcoólicas, como o vinho, em toda a Europa, e as cervejas Lambic, na Bélgica, onde sua presença é associada ao sabor e aroma característicos desta bebida (RENOULF & LONVAULD-FUNEL, 2007).

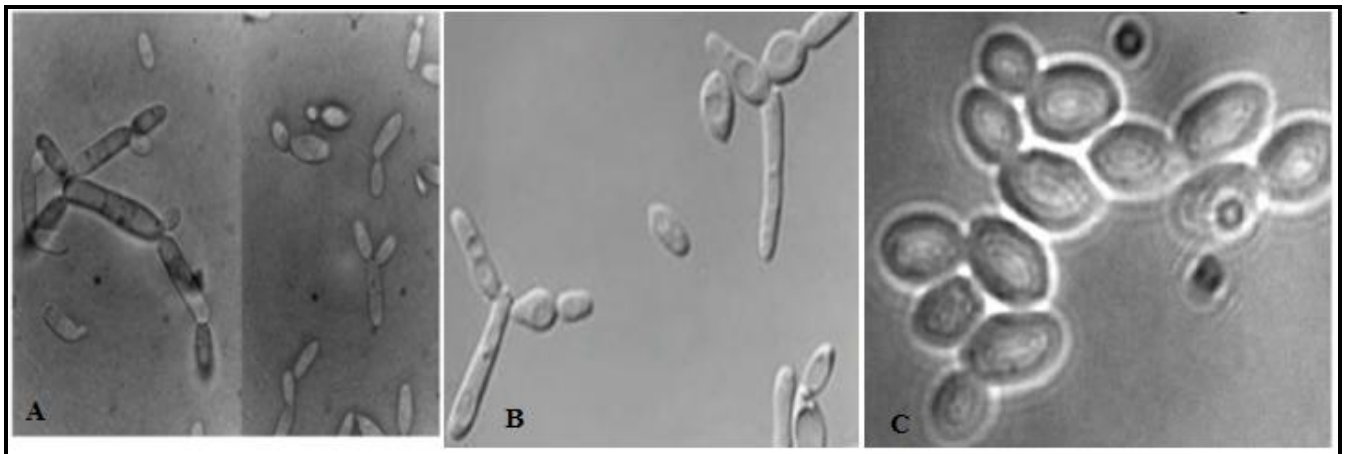


Figura 3. Células da levedura *Dekkera bruxellensis*. **A.** linhagem Y879 em meio mínimo de crescimento. Fonte: Schif-ferdecker et al, 2014. **B.** Linhagem CBS 74. Fonte: (<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/>). **C.** Linhagem industrial GDB 248 em meio YPD (microscopia de contraste de fase). Fonte: Leite et al, 2012.

Em uma análise evolutiva, estima-se que *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* divergiram de um ancestral comum há cerca de 200 milhões de anos (ROZPEDOWSKA et al, 2011). No entanto, essas duas leveduras filogeneticamente distantes adquiriram características que permitem a produção de etanol em altos rendimentos. Ambas as leveduras são (i) *Crabtree* positivas, ou seja, em altas concentrações de glicose conseguem realizar o metabolismo fermentativo mesmo em condições de

aerobiose, (ii) exibem tolerância ao elevado teor alcoólico da fermentação e (iii) conseguem sobreviver sem DNA mitocondrial (*petite* positivas) (PISKUR et al, 2006). Atualmente, são reconhecidas cinco espécies de *Dekkera/Brettanomyces*: *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anomala*, *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardenensis* e *Brettanomyces nanus* (HULIN et al, 2014).

2.2.2 Aspectos fisiológicos de *Dekkera bruxellensis*

Células de *D. bruxellensis* possuem a habilidade de metabolizar uma variedade de fontes de carbono como a glicose, frutose, galactose, sacarose, maltose, celobiose e trealose (CONTERNO et al., 2006). Em condições de elevadas concentrações de glicose, ambiente comumente encontrado nas indústrias, *D. bruxellensis* possui a capacidade de realizar fermentação mesmo na presença de oxigênio, esse efeito denominado *Crabtree* positivo é uma das características importantes da espécie (PROCHÁZKA et al, 2010). Esta capacidade de realizar o metabolismo fermentativo credencia *D. bruxellensis* a ser um micro-organismo com potencial industrial. Entretanto, essa levedura possui, em meio de caldo de cana, menores rendimentos e produtividade de etanol em comparação com *S. cerevisiae*, o que resulta em acúmulo de açúcar nas dornas industriais, levando a perdas econômicas (ARAÚJO, 2005).

Como todo micro-organismo, o crescimento da levedura *D. bruxellensis* também depende de fatores físicos em um determinado ambiente. O desenvolvimento de células de linhagens industriais de *D. bruxellensis* é constantemente investigado quanto a capacidade de tolerância a diferentes pHs (potencial hidrogeniônico) e temperaturas. Estudos avaliaram que a faixa de pH de 3 a 5 e a temperatura de 25 °C a 37 °C não afetam os parâmetros de produção de biomassa e rendimento em etanol da levedura, evidenciando resistência a mudanças de condições ambientais (BLOMQVIST, 2011). A tolerância ao pH, assim como a resistência a elevados teores alcoólicos do ambiente industrial (ROZPEĐOWSKA et al, 2011) são características da linhagem *D. bruxellensis* GDB 248 (Figura 3B) em processos fermentativos (DE SOUZA LIBERAL et al, 2007).

2.2.2.1 Efeito Custer e produção de ácido acético em células de *Dekkera bruxellensis*

As leveduras do gênero *Brettanomyces* e *Dekkera* exibem outra característica bioquímica relevante, o efeito Custer. Esse efeito fisiológico diz respeito à inibição da fermentação alcoólica em condições de anaerobiose (PRONK, 1996) e parece ser consequência da tendência de produção de ácido acético ao invés de etanol com concomitante redução de NAD⁺ (Dinucleotido de nicotinamida e adenina) (CARRASCOSA et al, 1981). Já que não há possibilidade de re-oxidação do NADH pela

via respiratória, a depleção de NAD^+ que foi utilizado para oxidar o acetaldeído a acetato afeta negativamente o fluxo pela via glicolítica (SCHEFFERS, 1966). Para tentar reoxidar o NADH produzido durante a oxidação, as leveduras produzem glicerol, contudo, a formação desse composto não é suficiente para fechar o balanço redox da célula em *D. bruxellensis* (VAN DIJKEN; SCHEFFERS, 1986).

Brettanomyces/Dekkera foram reconhecidas com grande atenção como fermento de cerveja, leveduras causadoras de deterioração do vinho, através da produção de *off-flavours* e sobretudo como altas produtoras de ácido acético (SHANTHA KUMARA et al 1993; HERESZTYN 1986a, 1986b; SPONHOLZ, 1993). A grande produção do ácido nos gêneros está relacionada com o efeito Custer e esse é formado como subproduto de assimilação da glicose, através da oxidação do acetaldeído, bem como durante a reação enzimática da álcool desidrogenase em crescimentos em que a levedura utiliza o etanol como fonte de carbono (CARRASCOSA et al, 1981; POSTMA et al, 1989).

Wijsman et al (1984) postularam que células em repouso de uma *Brettanomyces* sp. cultivadas aerobicamente apresentaram diferentes fases de atividade metabólica na qual a glicose foi primeiro dissimilada em etanol, ácido acético e quantidades equivalentes de CO_2 , uma segunda fase em que o etanol foi convertido em ácido acético e, finalmente, a oxidação completa do ácido acético produzida em ambas as fases em CO_2 após uma longa fase de latência. Consequentemente, os aspectos metabólicos de *Brettanomyces* spp. necessitam ser cuidadosamente considerados a fim de estabelecer as melhores condições experimentais para melhorar a produção de ácido acético. Estudos anteriores indicaram que concentrações de ácido acético superiores a 2 g/L exercem um efeito negativo no crescimento e potencial fermentativo de *D. bruxellensis*, no entanto em cultivos contínuos e limitação de oxigênio, a levedura apresentou uma produção inferior a 1 g/L do ácido, concentração tal que é insuficiente em interferir nos parâmetros fermentativos tanto de *D. bruxellensis* como de *S. cerevisiae* (YAHARA et al, 2007; BLOMQVIST, 2011). Em um estudo recente do nosso grupo de pesquisa, não foi observada nenhuma produção de ácido acético, em condições limitantes de oxigênio, para a levedura *D. bruxellensis* (PEREIRA et al, 2012).

2.3 DEKKERA BRUXELLENSIS COMO MICRO-ORGANISMO CONTAMINANTE DOS PROCESSOS INDUSTRIAIS

D. bruxellensis adquiriu a posição de contaminante na indústria vinícola devido à síntese de compostos voláteis responsáveis por odores desagradáveis ao vinho (CONTERNO et al, 2006). Alguns dos compostos mais conhecidos por causar esses efeitos são os fenóis voláteis, 4-vinilfenol, 4-vinylguiacol, 4-etilfenol e 4-etilguiacol (PRETORIUS, 2000). Adicionalmente, na última década, *D.*

bruxellensis foi consistentemente apontada como um dos principais micro-organismos contaminantes do processo de fermentação alcoólica para a produção de bioetanol na região Nordeste do Brasil. Nesse cenário, a linhagem *D. bruxellensis* GDB 248 apresenta alta adaptabilidade e capacidade de substituir a população inicial de *S. cerevisiae* e um dos fatores responsáveis diz respeito à habilidade de assimilação de nitrato como fonte de nitrogênio (DE SOUZA LIBERAL et al, 2007; BASÍLIO et al, 2008; DE BARROS PITA et al, 2011).

Apesar de ser considerada contaminante, *D. bruxellensis* possui potencial de aplicação industrial, visto que também é capaz de produzir etanol, ainda que com menor produtividade (DE BARROS PITA et al, 2013; LEITE et al, 2013). Esta aplicação reside no fato de que, uma vez instalada a contaminação, a eliminação desta levedura do processo é uma tarefa complexa, pois qualquer iniciativa poderia afetar também o desempenho fermentativo de *S. cerevisiae*. Desta forma, a utilização industrial desta levedura é baseada no aproveitamento de seu potencial de produção de etanol e depende de uma melhor compreensão acerca de seu metabolismo central, visando à identificação de perfis e condições ambientais que favorecem altos rendimentos e produtividade (DE BARROS PITA et al, 2011, 2013; LEITE et al, 2013; GALAFASSI 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).

Alguns estudos indicam que *D. bruxellensis* adaptou-se a condições ambientais adversas e limitantes, concentrações elevadas de etanol, valores de pH baixos e fontes pobres de nitrogênio (FUGELSANG, 1996; ROZPEDOWSKA et al, 2011). Por exemplo, *D. bruxellensis* utiliza preferencialmente íons amônio, mas também possui a capacidade de metabolizar nitrato, fonte que *S. cerevisiae* não assimila (DE BARROS PITA et al, 2011; GALAFASSI et al, 2013). Essa capacidade pode conferir a *D. bruxellensis* uma maior sobrevivência no ambiente industrial, principalmente após o esgotamento de fontes primárias de nitrogênio, que suportam o crescimento celular (DE BARROS PITA et al, 2011). Renouf et al (2006) mostraram uma taxa mais elevada de adaptação de *D. bruxellensis*, em comparação com outras leveduras selvagens, para sobreviver no mosto durante a fermentação alcoólica.

2.4 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DA LEVEDURA *DEKKERA BRUXELLENSIS*

O genoma de *D. bruxellensis* consiste de 4 a 9 cromossomos dependendo da linhagem. Os tamanhos dos cromossomos individuais variam de 1 a 6 Mb (mega bases). Estudos genéticos em *D. bruxellensis* evidenciam uma variabilidade incomum no número desses cromossomos, além de ou-

tros potenciais rearranjos genômicos e eventos de hibridização. Neste contexto, análises de 30 isolados de *D. bruxellensis* demonstraram que os seus cariótipos apresentaram fenômenos de aneuploidia. (HELLBORG & PISKUR, 2009; BORNEMAN et al, 2014).

Até o momento, há duas iniciativas de sequenciamento de genoma de *D. bruxellensis* disponíveis, com linhagens sequenciadas da França (WOOLFIT et al, 2007; PISKUR et al, 2012) e da Austrália (CURTIN et al, 2012).

A linhagem *D. bruxellensis* Y879 (CBS2499) isolada do processo industrial de vinho possui um genoma com aproximadamente 13,4 Mb (PISKUR et al., 2012). Esse estudo contribuiu para o posicionamento evolutivo da espécie, inserindo o gênero *Dekkera* nas proximidades do grupo de leveduras com menores rendimentos e produtividade etanólica, como por exemplo, *Pichia pastoris*. Esse trabalho também resultou na criação de um banco público de dados com aspectos genéticos de *D. bruxellensis* (<http://genome.jgi.doe.gov/Dekbr2/Dekbr2.home.html>) (PISKUR et al, 2012).

O importante papel de *D. bruxellensis* em habitats de produção do álcool revela a necessidade de investigação das principais características genéticas da levedura (BORNEMAN et al., 2014). Em *S. cerevisiae*, a duplicação de genes de ADH (codificador da enzima álcool desidrogenase), foi considerada, ao menos em parte, responsável pelo desenvolvimento da alta capacidade fermentativa da levedura (PISKUR et al, 2006). Por outro lado, o genoma de *D. bruxellensis* CBS2499 apresenta apenas a duplicação de determinados segmentos, sendo, portanto, o número de regiões duplicadas no seu genoma menor em comparação ao de *S. cerevisiae* (PISKUR et al., 2012). De Souza Liberal et al (2012), identificaram a presença de genes parálogos (DbARO10-1 e DbARO10-2) que codificam para a enzima fenilpiruvato descarboxilase (Phe-Pdc), envolvidos no metabolismo da fenilalanina e compostos aromáticos em *D. bruxellensis*, enquanto que no genoma de *S. cerevisiae* existe apenas uma cópia desse gene (ARO10) (VURALHAN et al, 2003). Outras descarboxilases ainda não identificadas podem estar presentes no genoma de *D. bruxellensis* (DE SOUZA LIBERAL et al, 2012). Apesar do avanço nos estudos genéticos com *D. bruxellensis*, outros aspectos devem ser compreendidos para avaliar o impacto da origem geográfica e variabilidade fenotípica da espécie (VALDES et al, 2014).

2.5 METABOLISMO CENTRAL DO CARBONO EM LEVEDURAS

O metabolismo central do carbono é bastante conservado nas diferentes espécies de leveduras, apesar de cada uma apresentar processos regulatórios específicos (FLORES et al, 2000). De um modo geral, esses micro-organismos dispõem de estratégias regulatórias especializadas, promovendo assim, a adaptação do seu metabolismo de acordo com a disponibilidade de açúcares no meio em

que está sendo cultivado (MILKOWSKI et al, 2001). O metabolismo de açúcares fornece uma fonte essencial de energia e metabólitos para a maioria dos organismos. Para o desenvolvimento de estratégias industriais e bioprocessos, a compreensão das vias metabólicas e sua regulação são de grande importância (MOKTADUZZAMAN et al, 2015).

As fontes de carbono mais utilizadas por leveduras são os monossacarídeos glicose, frutose e galactose ou dissacarídeos maltose e sacarose (MOKTADUZZAMAN et al, 2015). A troca de utilização do consumo de fontes de carbono faz com que as leveduras realizem o fenômeno de diauxia (Figura 4) (ou seja, a glicose é metabolizada de maneira preferencial, enquanto as outras fontes de carbono são consumidas após a utilização da glicose). A diauxia ocorre por causa de um fenômeno denominado repressão catabólica, nesse caso, uma repressão exercida pela glicose sobre as vias de assimilação de fontes alternativas de carbono (DYNESEN et al, 1998; GANCEDO, 1998).

Embora a glicose seja considerada o açúcar preferencial por micro-organismos e o componente mais abundante de polissacarídeos naturais, a utilização de outros açúcares está se tornando cada vez mais atraente a nível industrial para obtenção de bioprocessos economicamente eficientes. Atualmente, as pesquisas estão focadas na obtenção de monossacarídeos a partir de fontes alternativas, bem como o desenvolvimento de linhagens de leveduras com a habilidade de assimilação tanto de hexoses como de pentoses para realização do metabolismo do açúcar (MOKTADUZZAMAN et al, 2015).

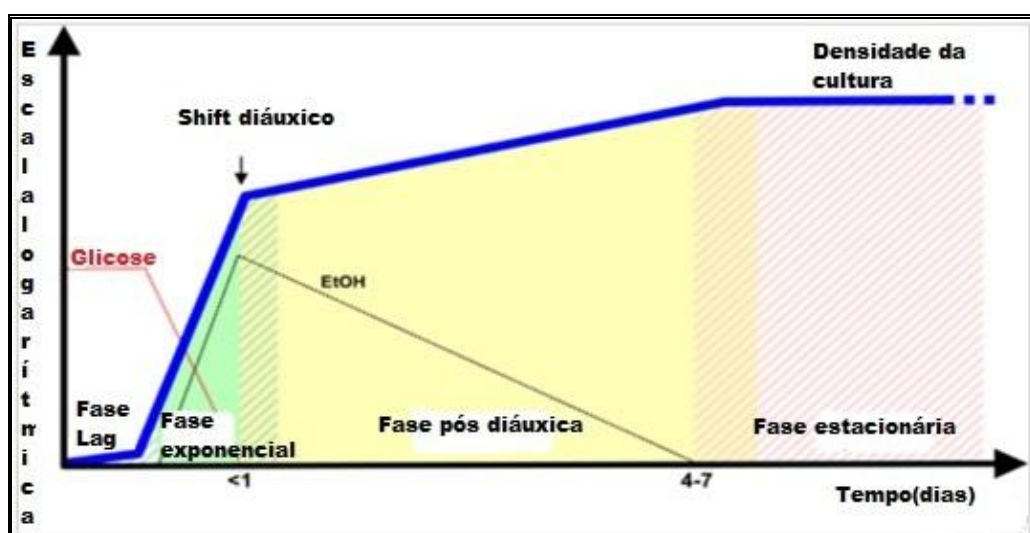


Figura 4. Fases de crescimento de *S. cerevisiae* cultivadas em meio rico suplementado com glicose. Durante a fase exponencial, as células proliferam rapidamente através da fermentação da glicose em etanol. Quando a glicose se torna limitante, células temporariamente interrompem seu crescimento para ajustar seu metabolismo (diauxia): após a mudança, as células começam a metabolizar lentamente o etanol acumulado no meio, retomando o seu crescimento.

Fonte. Adaptado de BUSTI et al, 2010.

2.5.1 Aspectos bioquímicos da metabolização da glicose

Em um processo industrial, a maioria dos açúcares (principalmente as hexoses) é passível de fermentação. Na fermentação alcoólica, esses açúcares são degradados no citoplasma da célula, através da via glicolítica ou via de Embden-Meyerhof, que envolve 10 reações ordenadas e catalisadas por enzimas específicas capazes de converter o açúcar em piruvato (BORZANI et al, 2001). O piruvato proveniente da glicólise é subsequentemente descarboxilado, numa reação não oxidativa pela enzima piruvato-descarboxilase (Pdc), formando o acetaldeído, o qual é posteriormente reduzido a etanol pela ação da enzima álcool-desidrogenase (Adh). O acetaldeído ainda pode ser convertido em acetato pela enzima acetaldeído-desidrogenase (Aldh) (Figura 5) (THOMSON et al, 2005).

O acetaldeído é um composto central no metabolismo fermentativo, relacionando-se com a produção de etanol e acetato, através de eventos de redução e oxidação (MEDINA et al, 2016). O ácido acético pode ser produzido em leveduras pela oxidação do acetaldeído através da atividade da enzima acetaldeído desidrogenase. Em *S. cerevisiae*, duas enzimas aldeído desidrogenases já foram descritas, uma delas utiliza NAD^+ e NADP^+ , é essencialmente dependente de K^+ e está localizada na mitocôndria (STEINNMANN; JAKOBY, 1967). A outra Aldh é definida para utilização de NADP^+ , está localizada no citosol e ativada por Ca^{+2} e Mg^{+2} (SEEGMILLER, 1955).

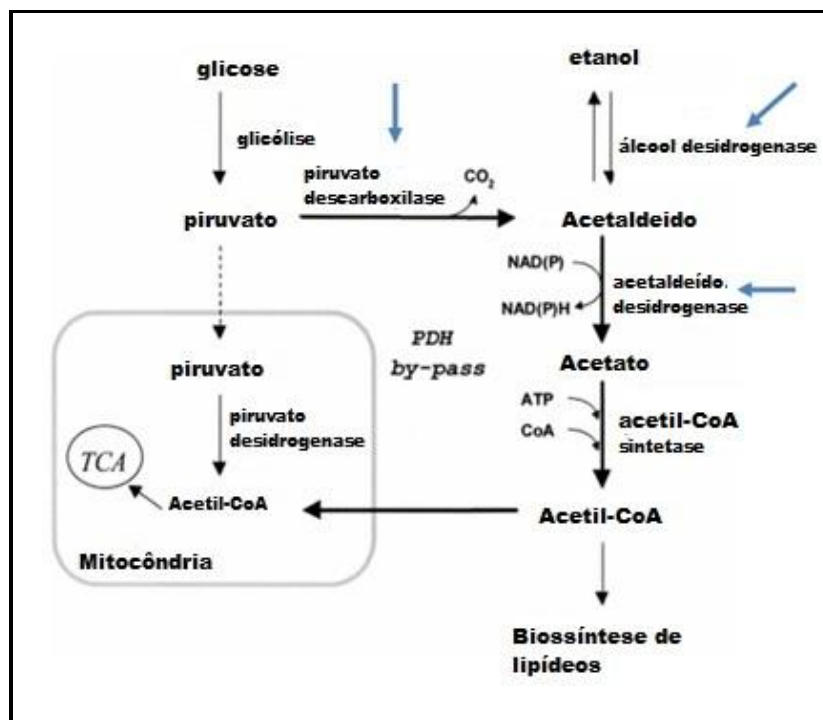


Figura 5. Principais enzimas relacionadas ao metabolismo do acetaldeído (setas azuis), piruvato-descarboxilase, álcool-desidrogenase e acetaldeído-desidrogenase. **Fonte.** Adaptado de Remize et al 2000.

A produção de etanol com liberação de gás carbônico pode ser expressa matematicamente pela equação química simplificada de Gay Lussac:



Teoricamente, para cada grama de glicose que entra na via glicolítica, são produzidos 0,51 g de etanol e 0,49 g de CO₂. Contudo, devido à produção de biomassa e de subprodutos, esses valores diminuem e tendem a ser de 0,46 g e 0,44 g, para etanol e CO₂ respectivamente (WHEAL et al., 1999).

2.6 DISULFIRAM

O disulfiram (DSF, Antabuse) é um fármaco utilizado para realização do tratamento do alcoolismo crônico em humanos, ocasionando uma forte reação quando ingerido na presença de álcool. O composto promove o bloqueio na conversão do acetaldeído em ácido acético através da inibição da enzima acetaldeído desidrogenase (ALDH, 1.2.1.10) (Figura 6), fazendo com que esse composto se acumule e ocasione estresse oxidativo na célula, além de promover a depleção de acetato no citoplasma celular (KWOLEK-MIREK et al, 2012). O mecanismo de ação do DSF em células humanas envolve reações complexas e multi-níveis. Estudos utilizando DSF indicaram a inibição da enzima superóxido dismutase (SOD) *in vitro* e células incubadas com o composto apresentaram elevação transitória no nível intracelular de radicais superóxidos, com concomitante e progressiva diminuição intracelular no nível de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (MARIKOVSKY et al, 2003; CEN et al., 2002).

O Disulfiram é rapidamente reduzido *in vivo* a N, N-dietilditiocarbamato (DDC), que é metilado para formar o Smethyl- N, N-dietilditiocarbamato (MeDDC). MeDDC é oxidado principalmente para o metabólito intermediário MeDDC sulfina, que é finalmente convertido em Smethyl- N, N-dietiltiocarbamato (MeDTC) sulfóxido, o metabólito ativo proposto para o composto *in vivo* (PIKE et al, 2001). Vários estudos sugerem que o DSF pode induzir apoptose, fragmentação do DNA, alterações no potencial da membrana mitocondrial (CEN et Al. 2002; BURKITT et al, 1998), aumento do conteúdo intracelular de proteína carbonila e ainda elevar o nível de cobre, um dos fatores responsáveis pelo estresse oxidativo (GROSICKA-MACIAG et al, 2010; CHEN et al, 2001).

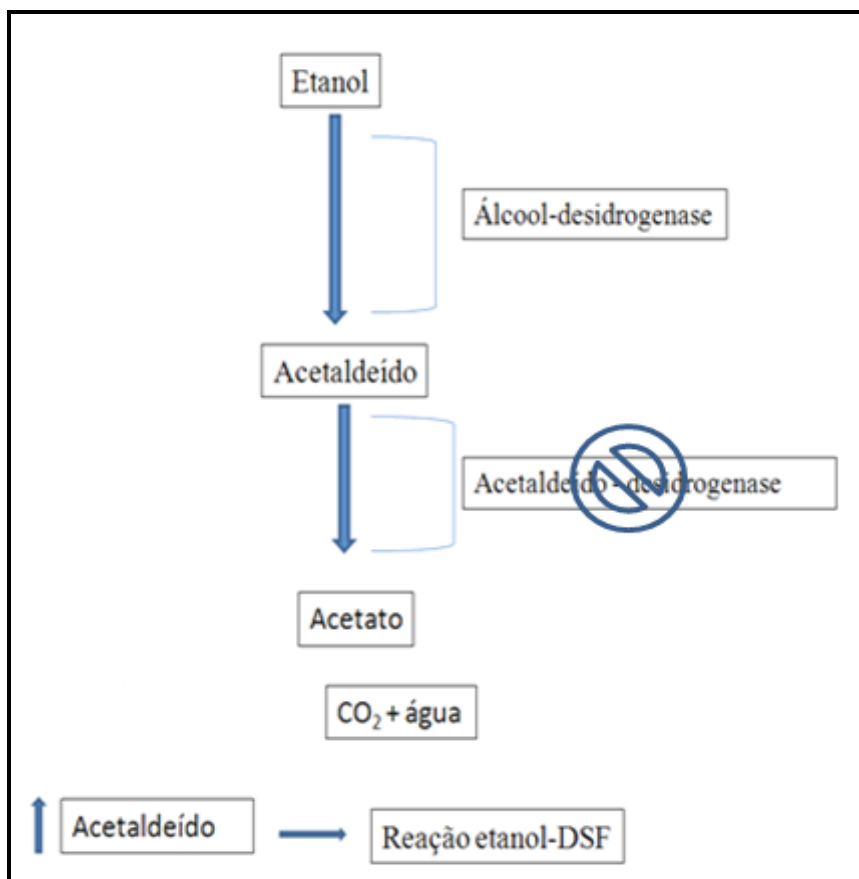


Figura 6. Reação etanol-disulfiram caracterizada pelo bloqueio da enzima acetaldeído-desidrogenase e consequente acúmulo intracelular de acetaldeído. **Fonte:** adaptado de Castro 2004.

Além do tratamento contra o alcoolismo, o DSF foi avaliado como um fármaco potencialmente eficaz contra *Giardia lamblia* (NASH & RICE 1998), *Trichomonas vaginalis* (BOUMA et al, 1998), leishmaniose (NAMAZI, 2008), na terapia da candidíase (SHUKLA et al, 2004) como um potencial inibidor da inflamação (MARIKOVSKY et al, 2003) e como alternativa no tratamento de alguns tipos de cânceres (CEN et al, 2002; SAUNA et al, 2005; NAVRÁTILOVÁ et al, 2009; WANG et al, 2011). A sua atividade antifúngica tanto em levedura como em fungos filamentosos também já foi confirmada (KHAN et al, 2007).

Alguns efeitos protetores de antioxidantes já demonstraram conseguir reduzir a ação tóxica do tratamento com o DSF. Por exemplo, a N-acetilcisteína (NAC) evita a indução da apoptose, aumenta a viabilidade celular, a razão GSH/GSSG (glutathiona reduzida e glutathiona oxidada) em células de melanoma humano (CEN et al, 2002) e também impede o aumento do conteúdo carbonila induzido pelo composto em células V79 (GROSICKA-MACIAG et al, 2010). O Ditionitrol (DTT) evita de maneira completa a atividade do DSF sobre a Aldh em pH 7,5 *in vitro*, no entanto, a inibição do MeDTC é prevenido apenas a pH 9,0 (VEVERK et al, 1997). O DTT também protege a atividade da enzima ATPase (SHUKLA et al, 2004).

Os estudos utilizando o DSF fornecem uma base para a avaliação dos efeitos tóxicos do composto nos mais diversos tipos celulares, bem como a capacidade de agentes antioxidantes em abolir o estresse oxidativo ocasionado nas células. Adicionalmente, o potencial inibitório da enzima acetaldeído desidrogenase pelo DSF traz importantes subsídios para estudos com uma levedura que possui uma grande capacidade em produzir ácido acético, como é o caso de *D. bruxellensis*, além da indicação de que esse bloqueio poderá vir a aumentar a produção de etanol pela levedura, algo que se tem buscado ao longo dos anos para aplicação industrial.

2.7 ESTRESSE OXIDATIVO

Na indústria, durante o processo de fermentação, as leveduras enfrentam várias formas de estresse, que podem afetar de alguma maneira a produção (BANAT et al, 1998; BALLESTEROS et al, 1993; BROSNAN et al, 2000). Para que o ambiente industrial consiga manter os ritmos produtivos, é necessário que as leveduras estejam com as suas populações bastante estabilizadas, e o uso de linhagens bem adaptadas é de grande importância (SILVA-FILHO et al, 2005). Durante a produção de cerveja, por exemplo, cepas de leveduras devem responder adequadamente a flutuações no pH, osmolaridade, concentração de etanol, de nutrientes, temperatura de fornecimento e condições de oxigenação que podem ocasionar estresse oxidativo nas células e consequentemente diminuir os rendimentos (GIBSON et al, 2007).

O oxigênio é uma molécula altamente reativa, podendo ser parcialmente reduzida para formar um grande número de agentes químicos reativos conhecidos, as espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o radical hidroxila (HO). Estas formas de oxigênio são altamente prejudiciais aos constituintes celulares, incluindo DNA, lipídios e proteínas (STORZ et al, 1987; WOLFF, 1986). A peroxidação lipídica, por exemplo, promove a conversão de lipídios insaturados em hidroperóxidos lipídicos, compostos polares que aumentam a fluidez membranar, perturbando a camada fosfolipídica. Com isso, as funções da membrana podem ser comprometidas, desintegrando-se e consequentemente ocasionando a morte celular (AVERY, 2011). Outras moléculas, como o H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e ânions superóxidos (O_2^-) são muitas vezes também referidos como ROS e eles podem levar à produção de espécies mais reativas, especialmente na presença de íons metálicos. ROS são gerados endogenamente em muitas células, como consequência de processos metabólicos, contudo, também podem ser formadas pela exposição das células a produtos químicos e radiação ionizante, ou exposição a metais pesados presentes no meio externo (AMES, 1983; BRENNAN; SCHIESTL, 1996).

As espécies reativas de oxigênio podem se comportar de maneira benéfica ou maléfica na célula. Concentrações baixas ou moderadas desses reativos proporcionam uma defesa importante

contra componentes extracelulares e ainda exercem papel na sinalização celular e na indução do processo de divisão (MARIANI, 2008). Quando crescem aerobicamente, os organismos são continuamente expostos a reativos oxidantes e o estresse oxidativo ocorre quando a concentração destes oxidantes aumenta para além da capacidade de tamponamento antioxidante da célula. Dada à capacidade de estar em várias partes da célula, a maioria (se não todos) os organismos evoluíram os mecanismos necessários para proteger seus componentes celulares contra as ROS (JAMIESON, 1998).

Leveduras como *S. cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe* são espécies modelo para estudos básicos em biologia celular, baseado em poderosas ferramentas genéticas que permitem a disrupção do gene e análises fenotípicas em conjunto (FORSBURG, 2001; SCHERENS; GOFFEAU, 2004). Uma das análises fisiológicas em que os estudos com levedura fornecem informações consideráveis é a resposta celular contra o estresse oxidativo e as funções de defesa envolvidas na tal resposta (MORADAS-FERREIRA et al, 1996; TOLEDANO et al, 2003). Estudos realizados com proteínas com grupos sulfidrilas evidenciaram que as mesmas são especialmente sensíveis à oxidação, o que resulta em formas oxidadas (ácido sulfínico e ácido sulfônico), que é um processo irreversível e que não pode ser reparado. A S-glutationilação, reação de tióis proteicos com o tripeptido glutathiona (G- γ -glutamil, L-cisteína e L-glicina), a GSH (glutathiona reduzida), ocasiona a formação de dissulfuretos, sendo assim um mecanismo de proteção contra danos proteicos irreversíveis (COTGREAVE; GERDES, 1998; BISWAS et al, 2006).

Em condições fisiológicas, a principal fonte de espécies reativas de oxigênio é proveniente de vazamento de elétrons na mitocôndria, embora existam algumas controvérsias sobre as quantidades exatas de ROS produzidos nos diferentes complexos da cadeia respiratória (NOHL et al, 2003; TURRENS, 1997). Em eucariotos superiores, os complexos mitocondriais I e III foram identificados como os principais locais de geração de superóxidos. A levedura *S. cerevisiae* não possui o complexo I, contudo possui algumas enzimas NADH desidrogenases situadas no espaço membranal mitocondrial (BAKKER et al, 2001). O NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) gerado na matriz mitocondrial é posteriormente oxidado por uma NADH desidrogenase interna (NDI1). Essa enzima desempenha um importante papel no equilíbrio redox, agindo sobre o NADH mitocondrial que é produzido pelo ciclo do ácido cítrico e também pelo processo de produção de etanol na levedura (MARRES et al, 1991; BAKKER et al, 2001). Várias mutações na mitocôndria ocasionam uma situação de estresse oxidativo, contudo alterações genéticas em outros locais da célula também podem acarretar esse desequilíbrio redox (HERRERO et al, 2008). Um exemplo está relacionado a mutações no gene SDH, codificador da enzima succinato desidrogenase, podendo fazer com que a célula produza grandes quantidades de radicais superóxidos e induzir o estresse oxidativo (GUO; LEMIRE, 2003). A resposta de *S. cerevisiae* para o estresse oxidativo tem sido estudada em diferentes condições, como na adição de compostos que ocasionam a formação de espécies reativas de

oxigênio, em condições de crescimento laboratorial, para que se possa analisar o grau de mudanças no estado redox da célula (GIBSON et al. 2007; KOERKAMP et al, 2002; MONJE-CASAS et al, 2004; MOYE-ROWLEY 2003).

2.7.1 Mecanismos de defesa contra as ros

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, presentes em baixas concentrações quando comparada a um substrato oxidável, possuem a capacidade de atrasar ou inibir a oxidação desse substrato de maneira eficiente (AUST et al, 2001; SHAMI; MOREIRA, 2004). A defesa oxidante é formada por um sistema de compostos enzimáticos e não enzimáticos que podem estar presentes no organismo ou adicionados ao meio de cultivo (MONTERO, 1996). As células desenvolveram estratégias enzimáticas para a defesa contra as ROS. Em *S. cerevisiae*, um grupo de enzimas agem especificamente contra as espécies reativas de oxigênio, enquanto outras exercem função regulatória em algumas proteínas, contribuindo assim para o equilíbrio redox celular. Essas enzimas podem trabalhar em diferentes compartimentos celulares como o citosol ou mitocôndrias (HERRERO, 2008).

2.7.1.1 Superóxido dismutase

A enzima superóxido dismutase têm como função a catálise da dismutação de radicais superóxidos em oxigênio e peróxido de hidrogênio, com sua atividade dependente de ions metálicos. Células de *S. cerevisiae* possuem duas SODs: a dependente de cobre (Cu) e zinco (Zn), que se localiza no citoplasma celular (SOD1) e a dependente de manganês (Mn), localizada na matriz mitocondrial (SOD2) (CULOTA et al, 2006). Estudos indicam que a SOD1, no entanto, também se localiza no espaço intermembranar mitocondrial (STURTZ et al, 2001). As duas enzimas, portanto, desempenham papel na desintoxicação de ânions superóxidos gerados na cadeia respiratória (HAN et al, 2001).

2.7.1.2 Catalases

S. cerevisiae possui duas catalases, Cta1, que se localiza nos peroxissomos, e Ctt1, que é citosólica. A função das catalases é promover a dismutação de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, utilizando as propriedades redox do seu grupo heme polipeptídico que entra em contato com o substrato. A atividade de Cta1 está supostamente relacionada a desintoxicação de peróxido de hidrogênio gerado pela beta-oxidação de ácidos graxos nos peroxissomos, envolvidos na produção de

acil-CoA (HILTUNEN et al, 2003). A expressão do gene que codifica essa enzima é induzida quando células de levedura crescem na presença de ácidos graxos como única fonte de carbono (FILIPITS et al, 1993), contudo, mutantes para esse gene ainda apresentam a capacidade de crescer nessas condições, mostrando que a atividade dessa catalase peroxisomal é dispensável (HILTUNEN et al, 2003). A função de Ctt1 no citoplasma celular ainda é motivo de bastante estudo, devido a controvérsias no crescimento de mutantes para esse gene. Esses mutantes, em condições aeróbicas não são mais sensíveis ao peróxido de hidrogênio, se comparado com o tipo selvagem, no entanto, o duplo mutante Cta1 e Ctt1 apresenta uma hipersensibilidade ao peróxido durante a fase estacionária de crescimento, o que indica uma atividade cooperativa de ambas as enzimas na levedura (IZAWA et al, 1996).

2.7.1.3 Peroxidases

A capacidade desintoxicante das superóxido dismutases e das catalases está relacionada à associação com íons metálicos, o que não ocorre com as peroxidases. Essas enzimas utilizam tióis de cisteína no seu sítio ativo. Duas classes de peroxidases são distinguíveis: glutathione peroxidases (GPXs) e as peroxidases TRX, também denominadas peroxirredoxinas. Existem dois tipos de GPXs, as GPXs, clássicas multiméricas, solúveis e agem sobre hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos. As hidroperóxidos fosfolipídeos (PHGPXs) normalmente são monoméricas e associadas à membrana, e, além de agir sobre hidroperóxidos solúveis, elas também podem exercer a sua função sobre hidroperóxidos lipídicos de membranas (BRIHELIUS-FLOHE et al, 2006). Assim, PHGRXs são consideradas como as principais enzimas na reparação da peroxidação lipídica da membrana, que é uma das principais consequências do estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Estudos iniciais têm descrito três GPXS em *S. cerevisiae*, as quais foram chamadas de Gpx1, Gpx2 e Gpx3 (INOUE et al, 1999). Entre as três proteínas, Gpx3 parece desempenhar o papel mais importante na levedura, pois mostra uma maior atividade *in vitro* (INOUE et al, 1999; AVERY, 2001). GPx3 também desempenha um papel essencial como sensor e transdutor da resposta ao estresse oxidativo pelo peróxido de hidrogênio através do fator de transcrição Yap1, que é o principal regulador dos genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo (DELAUNAY et al, 2002).

3.7.1.4 Moléculas com capacidade antioxidante

Além da proteção enzimática contra ROS, existem pequenas moléculas que atuam como antioxidantes, tais como a GSH (glutathione reduzida), o ascorbato e a vitamina E (EVANS; HALLIWELL, 2001). A administração de ascorbato em culturas de leveduras mutantes SOD, melhorou o fenótipo, com restauração significativa do crescimento, que estava diminuído nessas cepas (KRZE-

PILKO et al, 2004). Mais recentemente, foi relatado que o ácido ascórbico pode reduzir as quantidades de ácido sulfênico presentes na sua forma oxidada, revelando o composto como um potente antioxidante em várias células eucarióticas, equilibrando o processo redox celular (HANCOCK et al, 2000).

A vitamina E atua como uma molécula que quebra a cadeia de radicais à base de lípidos com capacidade de eliminação de radicais livres, como os alcóxilos e radicais hidroxilo. Sua forma solúvel, o trolox, diminui os níveis de peróxido de hidrogênio e de radicais superóxidos, bem como promove o aumento da atividade dos antioxidantes enzimáticos em células de levedura (RASPOR et al, 2005). Já a GSH é o principal tampão redox em células eucarióticas, a relação do par GSSG/GSH (glutathiona oxidada/glutathiona reduzida) é considerado como uma importante medida da situação redox da célula. A GSH em células do tipo selvagem de *S. cerevisiae* podem estar em uma concentração de 1-10 mM ou ainda maiores (DRAKULIC et al, 2005). Foi relatado em células humanas que o DSF não esgota totalmente a glutathiona, mas diminui significativamente a razão glutathiona reduzida / glutathiona oxidada (GSH / GSSG), devido à oxidação da glutathiona pela enzima glutathiona- peroxidase (CEN et al, 2002; BURKITT et al, 1998; NAMAZI 2008).

Estudos utilizando uma linhagem de *S. cerevisiae* mostraram que pequenas quantidades de GSH intracelular protegem as atividades nucleares da levedura durante o estresse oxidativo (Figura 7). Adicionalmente, esta proteção é suficiente para a sobrevivência da célula, apesar da forte oxidação de proteínas citosólicas e a inibição completa da síntese proteica. Concluiu-se que o papel essencial da GSH é preservar a função nuclear, permitindo a sobrevivência celular e a retomada do crescimento após o término do estresse oxidativo (Figura 7) (HATEM et al, 2014). A ligação entre a GSH e o metabolismo aeróbio é bem estabelecida, onde altos níveis de GSH presentes em cianobactérias e outras bactérias fotossintéticas estabeleceram uma emergência do composto para as bactérias numa altura em que condições aeróbicas generalizaram-se na Terra (FAHEY, 2001). A GSH pode ter aparecido na evolução como um protetor específico contra danos oxidativos. Poucos micro-organismos toleram o oxigênio sem produzir GSH, entre eles as halobactéria, membros das Archaeobacterias (PENNINCKX, 2002).

A N-acetilcisteína (NAC) é outro composto com propriedades redox. NAC na célula é convertida em cisteína por desacetilação e o aminoácido desempenha papéis estruturais em proteínas e também pode participar de reações de transferência de elétrons (HENNICKE et al, 2013). A cisteína também é fornecida para formação de GSH esgotada por estresse oxidativo, contribuindo assim para reduzir as espécies reativas de oxigênio (SJODIN et al, 1989; RAFTOS et al, 2007). NAC evita o esgotamento de GSH quando células são expostas a radiação e melhora a atividade de enzimas como a glutathiona peroxidase (GPx) e a fosfatase alcalina. Adicionalmente, esse composto defendeu

o tecido de ratos e glóbulos vermelhos contra o estresse oxidativo, fornecendo GSH em células submetidas à irradiação (NEAL et al, 2003).

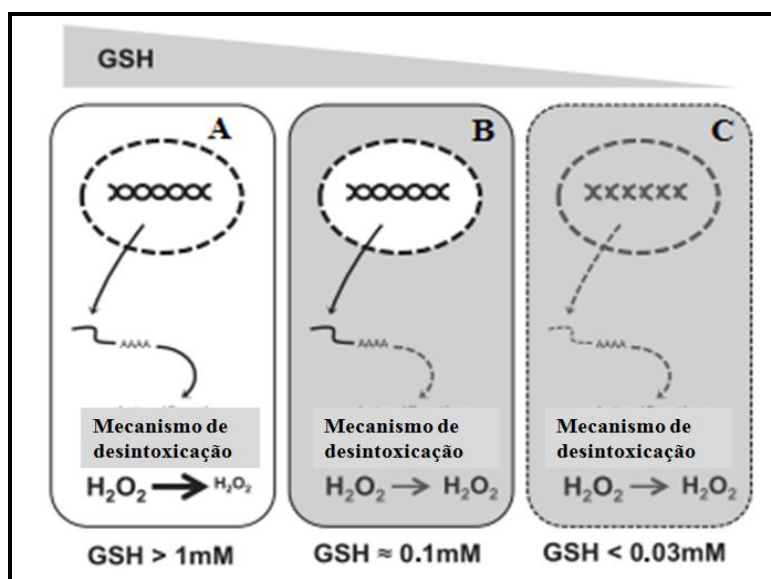


Figura 7. Avaliação do potencial antioxidante da GSH em células de *S. cerevisiae* incubadas com H_2O_2 . Em **A**: utilização de concentração elevada de GSH ($> 1mM$), as funções citosólica e nuclear são preservadas dos danos oxidativos, levando a altas taxas de sobrevivência. **B**: diminuição de 10 vezes na concentração da GSH intracelular ($0,1mM$) ainda promove a proteção do núcleo a danos oxidativos, contudo a função citosólica é substancialmente prejudicada. **C**: menor concentração de GSH ($< 0,03mM$), onde todas as funções celulares são afetadas devido a condição de estresse pelo H_2O_2 , ocasionando uma alta mortalidade celular. **Fonte:** Adaptado de Hatem et al 2014.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS E MEIOS DE CULTIVO

A linhagem *D. bruxellensis* GDB 248, isolada do processo industrial, foi utilizada neste trabalho (de SOUZA LIBERAL et al. 2007). A linhagem *S. cerevisiae* JP1 também foi utilizada como referência para os ensaios de crescimento. A manutenção das células e os pré-cultivos foram realizados em meio YPD (extrato de levedura 10 g/L, peptona a 20 g/L e dextrose 20 g/L). O meio de referência para os cultivos no multileitor de placas foi o sintético YNB (*Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate*) suplementado com glicose ou glicerol ou galactose a 20 g/L e sulfato de amônia a 5 g/L. O composto disulfiram (DSF) (tetraethylthiuram disulfide) foi utilizado para avaliação do seu efeito no crescimento das células das leveduras nas seguintes concentrações: 0 μM , 15 μM , 30 μM , 45 μM , 60 μM , 75 μM e 100 μM , com ou sem a adição de ácido acético (0,5%), em pH=5,5 (característico do meio YNB). Agentes antioxidantes foram utilizados para avaliar a capacidade de abolir o efeito do disulfiram: glutatona reduzida (GSH) (1mM) e a N-

acetilcisteína (NAC) (5mM) (MIREK, et al, 2012). Frascos Erlenmeyers de 150 mL foram utilizados para os cultivos contendo 100 ml de meio do pré-inóculo, incubados em agitação constante de 160 rpm em incubadora orbital tipo Shaker durante 48 horas a 30 °C.

3.2 ENSAIOS DE CRESCIMENTO EM MULTILEITOR DE PLACAS

Após as 48 horas de pré-inóculo, a densidade celular final foi determinada por espectrofotometria a 600 nm. As células foram coletadas e centrifugadas em microtubos de 2 ml a 10.000 rpm durante 5 minutos. Logo depois, essas células foram lavadas com água destilada estéril e resuspensas em água para o mesmo volume de coleta. Os ensaios de crescimento aeróbio foram realizados em multileitor de placas Biotek Synerg HT (Figura 8A), utilizando a microplaca característica do equipamento (Figura 8B) pela diluição das células para 0,1 DO_{600nm} em um volume de 150 µL utilizando meios de cultivo com diferentes formulações. Os cultivos foram realizados nas seguintes condições experimentais: temperatura = 30 °C, agitação contínua e intervalos de leitura de 30 minutos durante 24 horas. Todos os crescimentos celulares foram realizados em duplicatas biológicas com triplicatas técnicas e controle negativo contendo apenas o meio de cultivo dos experimentos (tópico linhagens e meios de cultivo). A velocidade de crescimento (μ , h⁻¹) foi calculada a partir da inclinação da fase logarítma de crescimento como descrito por LEITE et al (2013).

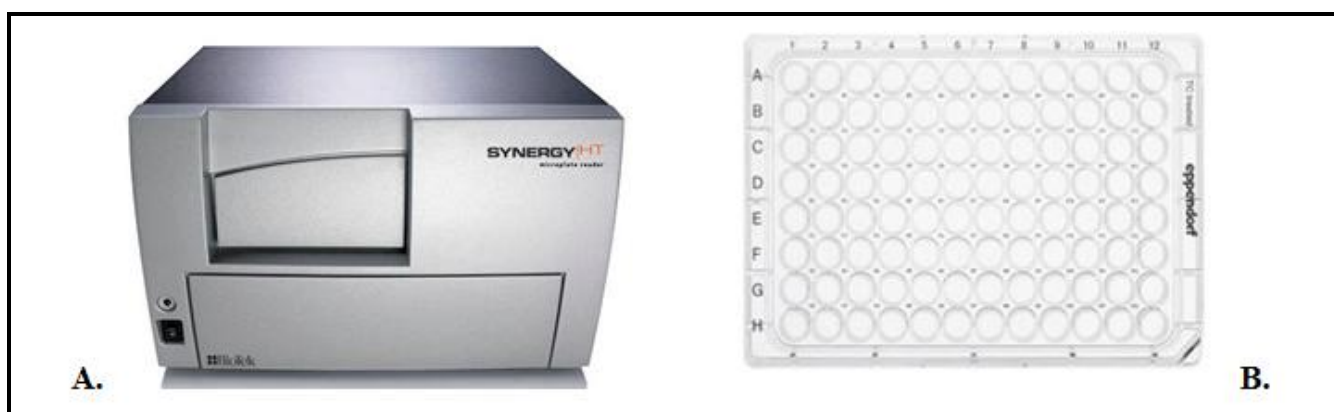


Figura 8: A. equipamento para cultivo em aerobiose (multileitor de placas); B. microplaca do cultivo

3.3 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

Para os experimentos de fermentação, as células foram pré-cultivadas como descrito anteriormente e coletadas até atingirem quantidade suficiente para a biomassa inicial. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas e ressuspensas para a concentração celular de 5% (m/v) para

50 mL de volume final com o meio de fermentação composto por YNB (fontes de nitrogênio) a 6,7 g/L acrescido de glicose a 120g/L e sulfato de amônio a 5g/L, na presença ou ausência de disulfiram. Os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyers de 125 ml agitados a 120 rpm em incubadora orbital tipo shaker a 30 °C durante 24 horas. Para determinação da cinética de fermentação, amostras foram coletadas nos tempos 0, 4, 8 e 24, centrifugadas e 2 mL do sobrenadante coletado para análise por HPLC como descrito abaixo. Os experimentos foram realizados em duplicata biológica.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS EXTRACELULARES

As amostras coletadas durante a fermentação foram filtradas em filtro de porosidade 0,22 µm (Millipore) e utilizadas nas quantificações por HPLC dos seguintes metabólitos: glicose, etanol, glicerol e acetato. Estes metabólitos foram separados pela coluna Aminex HPX-87H BioRad a 60°C, utilizando-se H₂SO₄ a 8 mM como fase móvel na vazão de 0,6 mL/min e detectados por um detector que mede o índice de refração das amostras. Para determinação das concentrações, foi utilizada uma curva de calibração do metabólito em solução padrão. Os parâmetros fermentativos foram calculados segundo descrito por LEITE et al (2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CRESCIMENTO AERÓBICO DE *DEKKERA BRUXELLENSIS* GDB 248 COM A UTILIZAÇÃO DO DISULFIRAM

No presente estudo, o efeito do DSF no crescimento de células das leveduras *D. bruxellensis* GDB 248 e *S. cerevisiae* JP1 foi avaliado com o intuito de determinar o efeito do bloqueio metabólico na produção de acetato, com consequente acúmulo do acetaldeído nas células. Os resultados mostraram que com o aumento da concentração do composto foram observados (i) aumento na duração da fase *lag* de crescimento do micro-organismo, (ii) diminuição na densidade celular final (Figura 9A) e (iii) diminuição na velocidade específica de crescimento (μ) (Tabela 1). A concentração inibitória mínima (MIC) foi de 100 µM de DSF.

Os resultados dos crescimentos da linhagem de levedura *S. cerevisiae* JP1 (Figura 9B e Tabela 1), sob a ação do disulfiram mostrou uma resposta semelhante à da linhagem GDB 248: a extensão na fase lag de crescimento com o aumento da concentração do composto. A densidade celular final nas culturas contendo 60 µM e 45 µM de DSF foram as mesmas, embora a maior concen-

tração tenha estendido ainda mais a fase lag de crescimento (Figura 9B). Adicionalmente, ocorreu uma diminuição nas velocidades específicas de crescimento com o aumento da concentração de DSF. Portanto, comparando o controle (sem disulfiram) e o crescimento com 75 μM do composto, pode-se observar a diminuição das velocidades ($0,21 \pm 0,03$ e $0,11 \pm 0,00$ respectivamente) (Tabela 1). A concentração inibitória mínima (MIC) também foi de 100 μM de DSF para JP1.

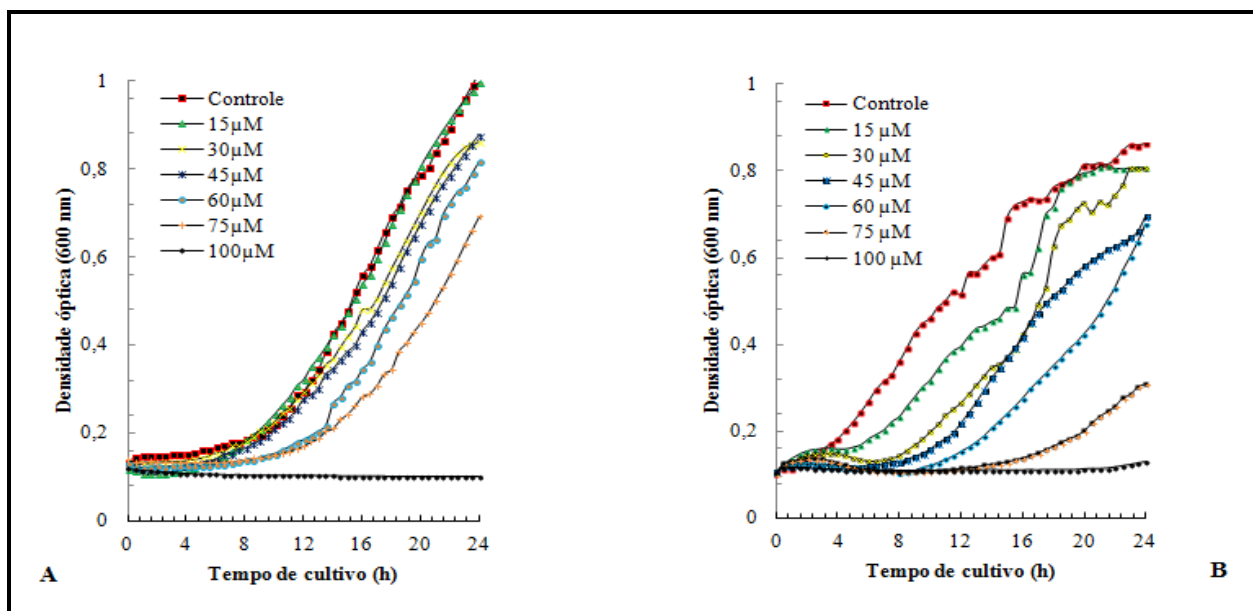


Figura 9. Efeito do disulfiram em diferentes concentrações (0-100 μM) no crescimento das leveduras *D. bruxellensis* (painel A) e *S. cerevisiae* (painel B) após cultivo de 24 horas em meio YNB. pH 5,5.

Fazendo a comparação entre as duas leveduras, podemos observar que *D. bruxellensis* apresentou maiores densidades celulares finais e maiores velocidades específicas de crescimento a partir de 45 μM de DSF (Figura 10 e Tabela 1). Quando foi utilizado 75 μM do composto, GDB 248 apresentou o dobro de densidade óptica final de JP1 (Figura 10F). Portanto, de maneira geral, *D. bruxellensis* foi considerada mais resistente ao efeito tóxico do DSF, apesar de não ocorrer crescimento das duas leveduras com 100 μM do inibidor. Conclui-se que o DSF possui um menor efeito tóxico em *D. bruxellensis* se comparado com a inibição ocasionada em *S. cerevisiae*. A intensidade do bloqueio da enzima acetaldeído, no entanto, deve apresentar-se de maneira similar nas leveduras. Essas diferenças fenotípicas indicam alguma outra fonte de acetato em *D. bruxellensis*, para suprir a depleção do acetato citosólico ocasionado pelo DSF.

Tabela 1: Velocidades específicas de crescimento (μ) das leveduras *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* cultivadas em meios com glicose e glicose e acetato com disulfiram em diferentes concentrações (0-100 μ M).

Espécie	Fonte de C	DSF (μ M)					
		0	15	30	45	60	75
<i>D. bruxellensis</i>	Glicose	0,17 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00
<i>S. cerevisiae</i>		0,21 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,00
<i>D. bruxellensis</i>	Glicose/acetato	0,14 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01
<i>S. cerevisiae</i>		0,17 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,03

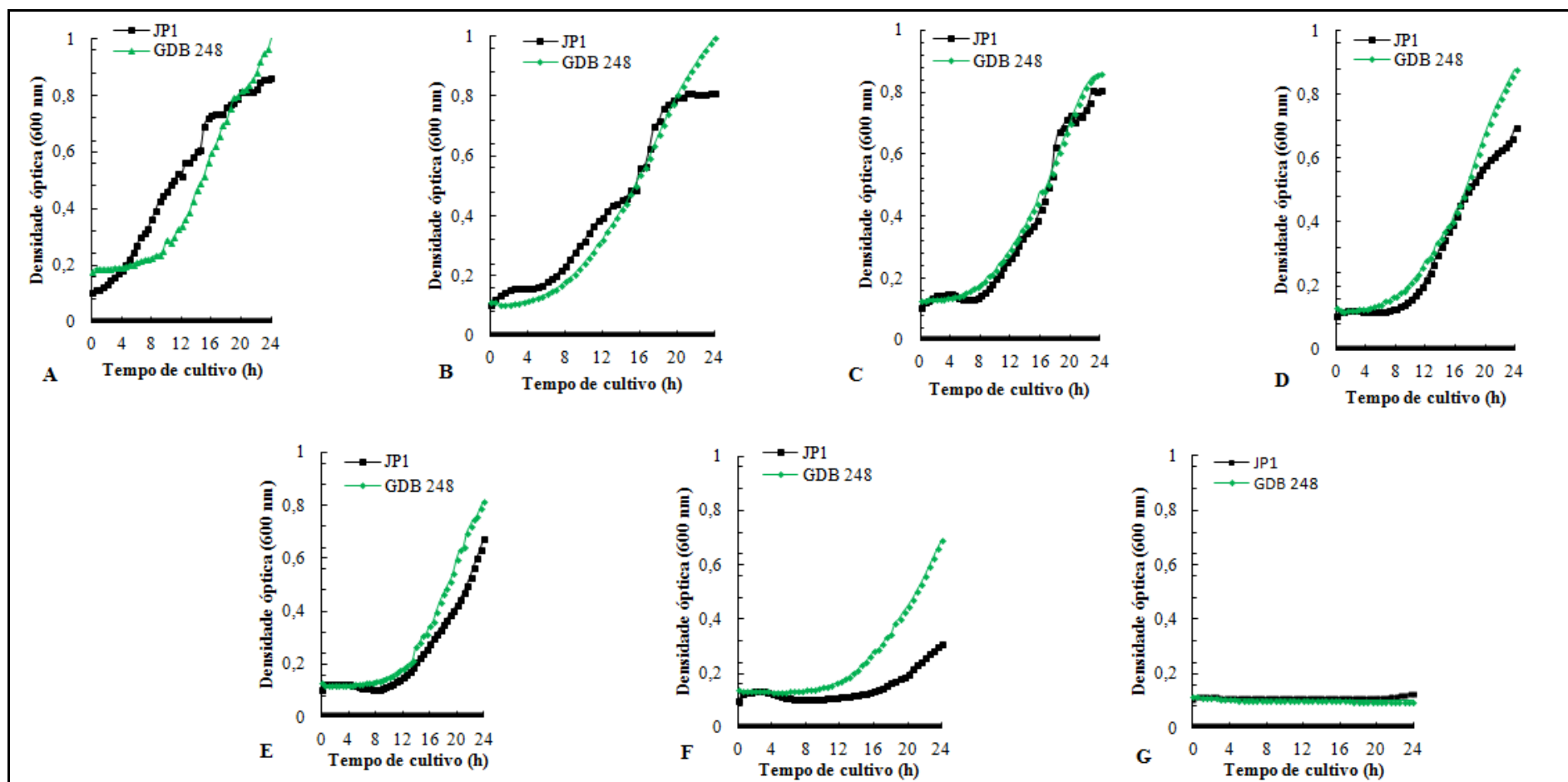


Figura 10. Efeito do disulfiram em diferentes concentrações no crescimento das leveduras *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* após cultivo de 24 horas. **A.** 0 µM, **B.** 15 µM, **C.** 30 µM, **D.** 45 µM, **E.** 60 µM, **F.** 75 µM e **G.** 100 µM. O meio de cultura foi ajustado para pH de 5,5. (Desvios padrões menores que 5%).

Em *S. cerevisiae* sabe-se que a remoção da atividade piruvato descarboxilase pela deleção dos três genes *PDC* impede o crescimento celular aeróbico em glicose pelo impedimento da síntese de acetato citosólico (FLIKVEERT et al, 1999). Essa inibição do crescimento é revertida pela adição de acetato ao meio com glicose. Desta forma, parte-se do princípio que a inibição da atividade acetaldeído desidrogenase teria o mesmo efeito. Para se testar essa possibilidade o meio com glicose e disulfiram foi suplementado com acetato. Os resultados mostraram que os perfis de crescimento foram semelhantes para as duas leveduras (Figura 11). Entretanto, percebe-se que a presença de acetato aumentou o crescimento de *S. cerevisiae* enquanto que diminuiu as densidades celulares finais e também as velocidades específicas de crescimento de *D. bruxellensis* (Figuras 10 e 11 e Tabela 1). Portanto o acetato pode agir, ainda que minimamente, induzindo um maior estresse nas células de GDB 248. Isto se dá, possivelmente, porque a produção de acetato e sua disponibilização citoplasmática em *D. bruxellensis* já é suficiente para o crescimento celular, e a adição de acetato no meio representaria uma sobrecarga intracelular do composto. Isto defere de *S. cerevisiae* e, nesse caso, a adição de acetato apenas restauraria os níveis citoplasmáticos.

Avaliando as duas condições em JP1, é interessante observar que nas concentrações de 15 a 45 μM de DSF na presença de acetato, o término da fase lag de crescimento foi antecipada em pelo menos 2 horas se comparado com a mesma concentração na condição sem acetato. No entanto, nas concentrações de 60 μM e 75 μM os cultivos entraram na fase logarítica de crescimento aproximadamente no mesmo tempo nas duas condições (10 e 12 horas respectivamente) (Figuras 10 e 11). Com 100 μM de DSF mais acetato, JP1 conseguiu entrar na fase logarítica após 16 horas de cultivo (Figura 11G). Nesse caso, quando foi utilizada uma concentração de 125 μM de DSF, não houve crescimento durante o cultivo de 24 horas (dados não mostrados). Diante dos resultados, conclui-se que *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* divergem no mecanismo adaptativo à presença de acetato, uma vez que este ácido foi capaz de reverter parcialmente a inibição do crescimento de JP1 pelo DSF, mas potencializou o efeito tóxico do DSF na GDB 248.

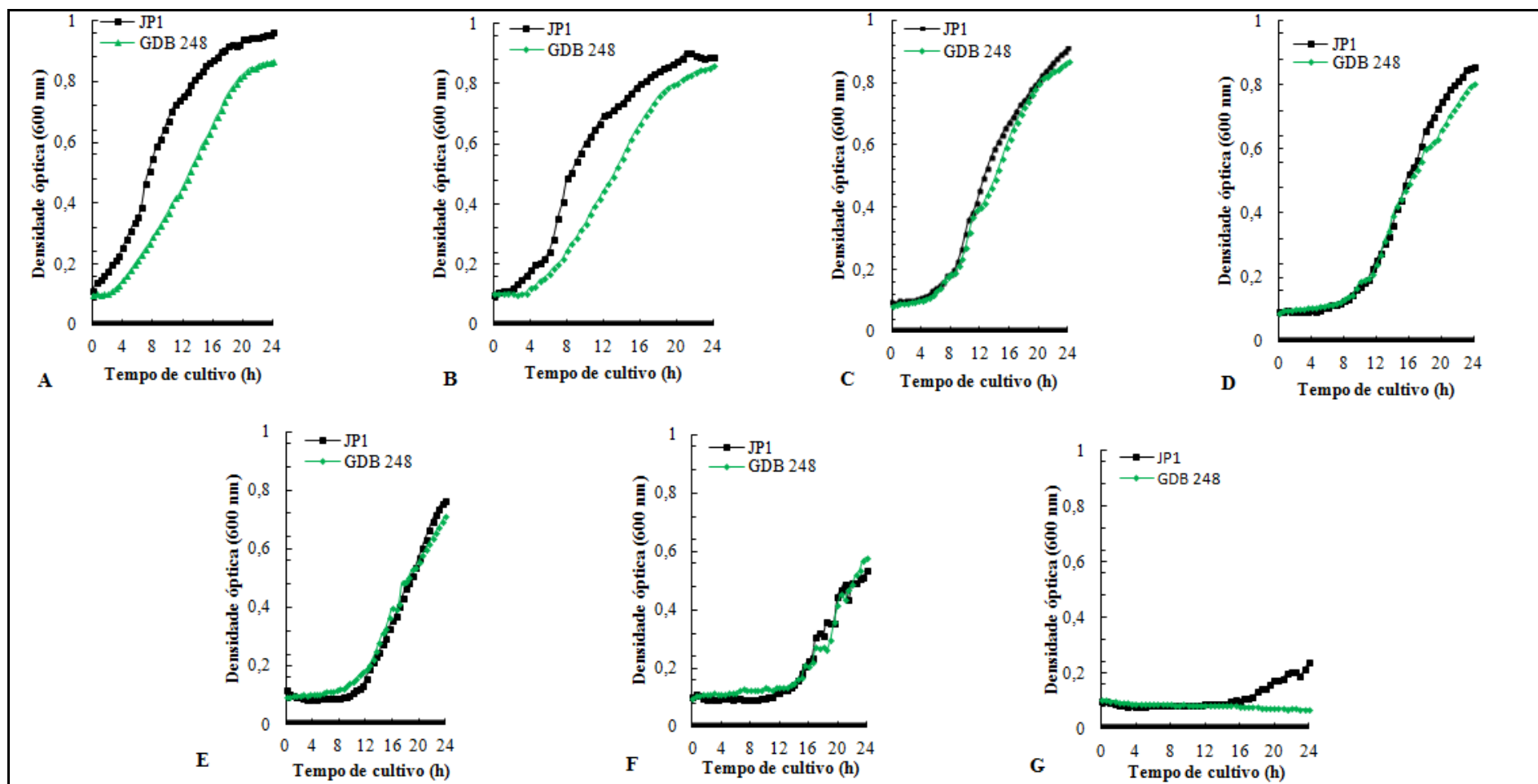


Figura 11. Efeito do disulfiram em diferentes concentrações (0-100 μM) no crescimento das leveduras *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* após cultivo de 24 horas na presença de acetato (0,5%: A. 0 μM , B. 15 μM , C. 30 μM , D. 45 μM , E. 60 μM , F. 75 μM e G. 100 μM). O meio de cultura foi ajustado para pH de 5,5. (Desvios padrões menores que 5%).

A maioria das células de leveduras apresentam uma maior sensibilidade quando ocorre a associação de ácidos e presença de oxigênio, no entanto, a anoxia pode aliviar o efeito estressor. A pouca disponibilidade de oxigênio ocasiona uma menor formação de ácido acético na sua forma não dissociada e essa condição pode ser industrialmente relevante, podendo representar um importante mecanismo que ajuda as células a sobreviverem na presença de ácidos orgânicos (PEREIRA et al, 2012; STRATFORD et al, 2014; CAPUSONI et al, 2016).

Os ácidos orgânicos fracos possuem a característica de inibir o crescimento celular, devido a interferência no metabolismo como um todo e bioconversões menos eficientes. O principal mecanismo de toxicidade do ácido fraco é provavelmente baseado na acidificação intracelular e acúmulo de ânions. Quando o pH do meio é mais baixo do que o pKa do ácido (pKa do ácido acético é 4,75), a formação de moléculas de ácido na sua forma não dissociada é facilitada. A acidificação resultante do citoplasma e o aumento da concentração de ânion ácido intracelular ocasionam à inibição de vários processos metabólicos (ARNEBORG et al, 2000; MARTYNOVA et al, 2016). No presente trabalho, sabemos que o pH inicial do meio é 5,5, contudo, *D. bruxellensis* é uma levedura acetogênica e a produção do composto pela levedura pode ter diminuído o pH ao longo do cultivo e ter influenciado no crescimento.

Em *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422, a presença de acetato de sódio a 40 mM e pH controlado (4,0, 4,5 e 5,0) revelou que em todos os controles nos quais não havia ácido acético, crescimento, consumo de substrato e a produção de metabólitos foram semelhantes, independente do pH do meio. Já quando houve a utilização do acetato ocorreu atrasos nos crescimentos, consumo de substrato e produção de metabólitos, sendo mais acentuado no pH mais baixo (MARTYNOVA et al, 2016).

Pereira et al (2012) realizaram ensaios fermentativos com *D. bruxellensis* e adicionaram ácidos orgânicos ao meio, ácido láctico e ácido acético a 0.1 g/L^{-1} e 0.2 g/L^{-1} , respectivamente. O início da adição foi no terceiro ciclo e ao final do sexto ciclo as células obtiveram um declínio substancial nas suas populações. Castro et al (2005) avaliaram a capacidade de diferentes leveduras pertencentes ao gênero *Brettanomyces*, como *B. bruxellensis*, *B. custersianus*, *B. intermedius* e *B. clausenni*, em produzir acetato sob condições aeróbicas, verificando que *B. bruxellensis* obteve a maior produtividade volumétrica e taxa de produção específica. Utilizando *B. bruxellensis* em uma fermentação aeróbica controlada com glicose a 50 g/L e pH 5.5, os autores observaram rendimento de produção de acetato de 0.14 g/g. No entanto, o processo foi considerado limitado devido a inibição causada pela associação entre a glicose e o acetato, a qual foi dependente da espécie ou da linhagem e também da concentração do

substrato (ORTIZ-MUÑOZ et al, 2010). Apesar da divergência entre *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* observada neste trabalho frente à adição de acetato, a literatura relata que a resistência de leveduras do gênero *Brettanomyces* ao ácido é similar à *S. cerevisiae* sob condições aeróbicas, com possíveis variações entre linhagens distintas (ORTIZ-MUÑOZ et al, 2010). A produção de acetato pela linhagem GDB 248 pode atingir níveis semelhantes ao de etanol quando células em estado estacionário recebem pulso de glicose (LEITE et al 2013). Isto mostra a propensão desta levedura para a produção de acetato, o que deve estar relacionado com o seu metabolismo preferencialmente oxidativo (LEITE et al, 2013).

A disponibilidade de oxigênio afeta a cinética de crescimento de *D. bruxellensis* na presença de acetato. Um estudo envolvendo 29 linhagens de *D. bruxellensis* mostrou uma diversidade considerável na tolerância ao composto nas concentrações até 120 mM em meio com pH ajustado para 4,5. O cultivo em meio líquido sob condições aeróbicas revelou que mesmo a linhagem CBS 4482, considerada mais tolerante ao ácido acético a 120mM, foi negativamente afetada (MOKTADUZZAMAN et al, 2015).

A indução do estresse oxidativo, deslocando o equilíbrio redox celular é uma das consequências da utilização do DSF (CEN et al, 2002). Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que a levedura *D. bruxellensis* apresentou uma maior sensibilidade ao estresse oxidativo se comparada com *S. cerevisiae* em cultivos com substratos de fermentação industrial (LEITE et al, 2016). Nos resultados do presente estudo, *D. bruxellensis* foi considerada mais resistente ao DSF que *S. cerevisiae* na ausência de acetato. Mas o resultado foi justamente o oposto quando na presença de acetato no meio.

Um estudo comparativo entre a linhagem *S. cerevisiae* SP4 e seu mutante para o gene que codifica a enzima superóxido-dismutase mostrou a inibição completa do crescimento celular na presença de DSF nas concentrações de 75 μ M e 50 μ M. Nos dois casos ocorreu o aumento na duração da fase *lag* de crescimento com o aumento da concentração do DSF, assim como uma diminuição na densidade celular final ao longo do cultivo de 24 horas (KWOLEK-MIREK et al, 2012), da mesma forma que observado no presente estudo. Naquele mesmo trabalho foi observado diminuição de 50% na sobrevivência do mutante *Asod1* na concentração de 30 μ M de DSF. Outros trabalhos têm relatado o efeito tóxico do DSF em outros mutantes de *S. cerevisiae* como *Apso2* (0-30 μ M de DSF) (BRENDDEL et al, 2010), em outras leveduras como *C. albicans* (0-100 μ M de DSF) (SHUKLA et al, 2004) e em células de astrócitos (0-100 μ M de DSF) (CHEN et al, 2001).

O bloqueio da enzima acetaldeído desidrogenase pelo DSF ocasiona acúmulo do acetaldeído intracelular, o qual afeta negativamente a viabilidade da levedura *S. cerevisiae*. Mutantes do gene *PSO2*, que codifica para uma proteína específica de reparação de quebra de dupla cadeia do DNA, apresentaram maior sensibilidade ao disulfiram em comparação com o tipo selvagem. Isso sugere que o acetaldeído acumulado induz lesões no DNA, incluindo ligações cruzadas intercadeias altamente deletérias (BRENDDEL et al, 2010). Adicionalmente, avaliações microscópicas mostraram que a exposição de células da levedura ao DSF na concentração de 20-100 μ M ocasiona uma diminuição significativa na atividade metabólica, alterações de morfologia e processos de desintegração mitoncondrial, proporcionando um aumento na frequência de morte (KWOLEK-MIREK et al, 2012). Tudo isso indica que a inibição da Aldh pela presença de DSF, e consequente acúmulo do acetaldeído citosólico, deve induzir estresse oxidativo nas células das leveduras.

Estudos estabelecem que o metabólito ativo do DSF, o dietilditiocarbamato (DDC), inibe irreversivelmente a Aldh via modificação covalente no seu sítio ativo (VEVERKA et al, 1997). No entanto, trabalhos anteriores têm apresentado modelos contrários. Neims et al, (1966) propôs que a inibição ocorre devido à formação de um composto dissulfeto misto entre um grupo cisteína-SH e DDC. No entanto, Stromme (1965) relatou que camundongos expostos ao DSF não demonstraram formação de dissulfeto misto.

A tendência biológica de maior resistência de *D. bruxellensis* ao efeito do disulfiram no teste sem acetato pode ser avaliada pela velocidade relativa de crescimento (%), o efeito contrário pode ser observado com adição do ácido, ou seja, nessa condição JP1 obteve maiores velocidades em relação à GDB 248, indicando o contraste fenotípico entre as leveduras na presença do ácido (Figura 12A e B). Essa maior resistência em comparação a JP1 pode ser observada na duração da fase *lag* de crescimento, que GDB 248 sai de 8 horas na referência para 12 horas na condição de 75 μ M e JP1 sai de 4 horas para 17 horas nas mesmas concentrações (Figura 12C). Apesar de JP1 apresentar uma maior duração na fase *lag* de crescimento no teste com acetato, (Figura 12D), concluímos anteriormente que o fato da levedura apresentar maiores densidades celulares finais, velocidade específica de crescimento em algumas concentrações de DSF e ter crescido mesmo com 100 μ M do composto, faz com que consideremos que a levedura melhorou seus crescimentos com a adição do ácido, resultado oposto ao de GDB 248.

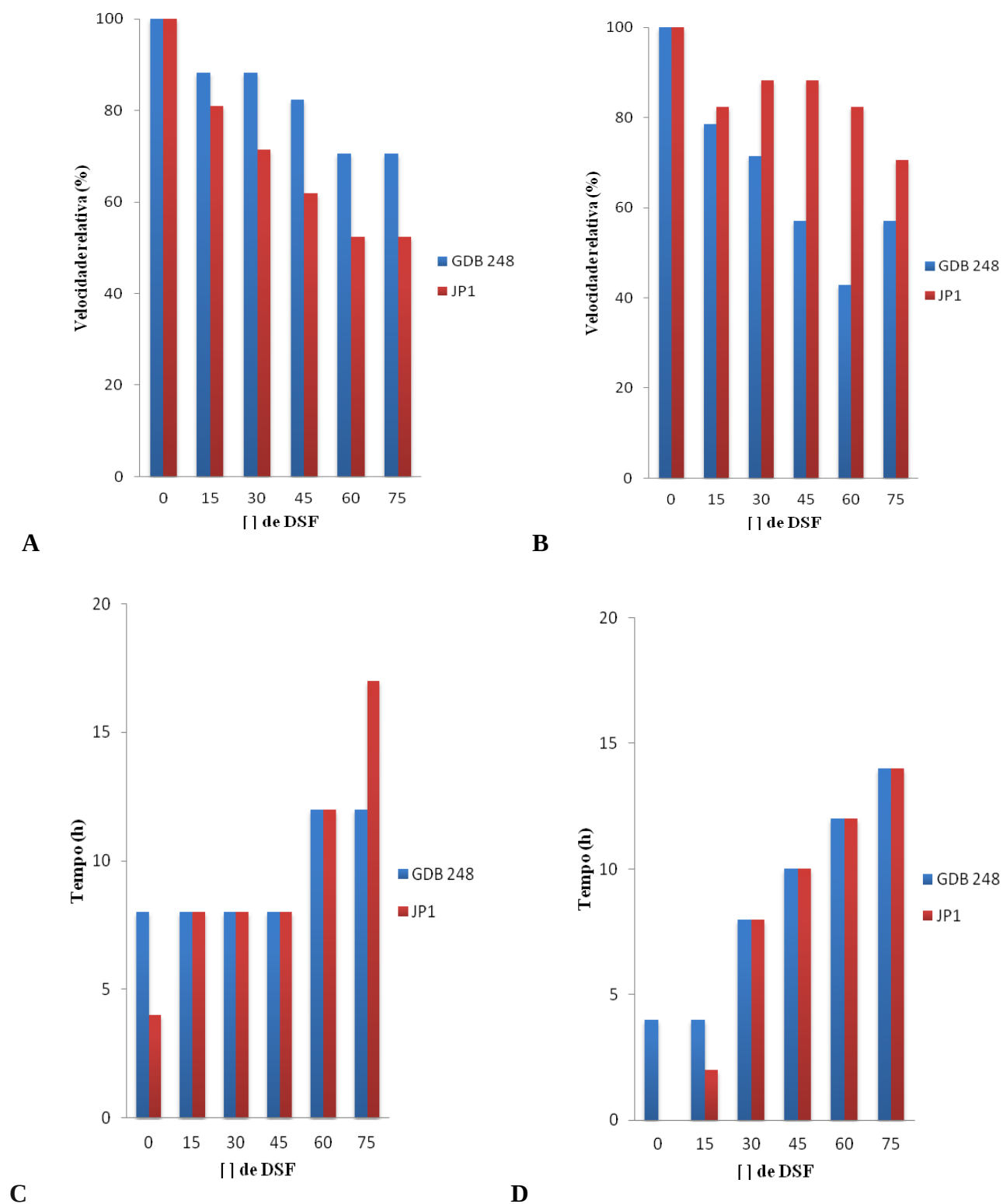


Figura 12. Cinética da velocidade relativa e extensão da fase *lag* de crescimento das leveduras *D. bruxellensis* GDB 248 e *S. cerevisiae* JP1 cultivadas em meio mineral com presença de diferentes concentrações de disulfiram. Velocidade relativa (%) em teste sem acetato (Painel A) e com acetato (Painel B). Extensão da fase *lag* em teste sem acetato (Painel C) e com acetato (Painel D).

4.2 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE AGENTES ANTIOXIDANTES NO CRESCIMENTO DE *DEKKERA BRUXELLENSIS* E *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

4.2.1 Glutathione reduzida

Além dos efeitos acima, a presença de DSF promove a gradativa diminuição na concentração intracelular de glutathione reduzida (GSH). Mudança no conteúdo intracelular de GSH é particularmente maior em linhagens com deficiência em SOD. O crescimento de *D. bruxellensis* GDB 248 foi avaliado utilizando a glutathione na sua forma reduzida quando a célula estava exposta ao DSF. A primeira observação é que a GSH promoveu aumento no crescimento celular sem a adição de DSF (Figura 13A). Além disso, em todas as concentrações de DSF foi observado que o crescimento celular foi restaurado no meio que continha GSH, comparado quando o meio estava sem o agente redutor (Figura 13). Nesse caso, parâmetros como entrada na fase logarítmica e densidades celulares finais foram revertidos do efeito negativo do DSF (Figura 13). Adicionalmente, é evidente o fato de que os crescimentos foram bastantes semelhantes no meio com GSH, mesmo quando foi utilizada a concentração máxima do DSF (100 μ M) em comparação com o controle, no qual ele não foi adicionado (Figura 13). Portanto, GSH conseguiu abolir o efeito tóxico do disulfiram nos crescimentos com GDB 248. Além disso, não houve diferenças significativas na velocidade de crescimento celular nas diferentes concentrações de DSF quando na presença de GSH (Tabela 2). Os resultados com a linhagem JP1 também indicaram restauração completa no crescimento da levedura quando houve a utilização de GSH. Praticamente não se observa a fase *lag* de crescimento no meio que continha o agente redutor, comparado com os crescimentos na ausência deste agente (Figura 14). Em algumas concentrações, por exemplo, as densidades celulares finais foram maiores inclusive do que no grupo controle (Figura 14 A, B, C e E). Na presença de GSH o crescimento da cultura na presença de 100 μ M de DSF foi igual ao do meio controle (Figura 14A e G). As velocidades de crescimento foram sempre maiores na presença de GSH (Tabelas 1 e 2).

Dados da literatura mostraram que a inibição do crescimento de células mutantes *Asod1* e parental de *S. cerevisiae* por DSF pode ser revertida pela adição de alguns antioxidantes hidrofílicos no meio de crescimento, tais como ascorbato (ASC), cisteína (CYS), glutathione reduzida (GSH) e N-acetilcisteína (NAC) (KWOLEK-MIREK et al, 2012). Também foi relatado que a sensibilidade ao chumbo em linhagens de *S. cerevisiae* com deleção dos genes *GSH1* e *GSH2* foi revertida pela adição

de GSH no meio de cultura. Este efeito foi suprimido pela adição concomitante de iodoacetamida, um agente alquilante depletor de GSH, e aquelas células votaram a apresentar sensibilidade ao chumbo (PEREZ, 2012). Além de GSH, alguns aminoácidos podem atuar como agentes antioxidantes (ácido L-glutâmico, L-cisteína e glicina), tal como ocorreu na recuperação da resistência em células tratadas com chumbo (PEREZ, 2012).

A homeostase redox é algo estabelecido por sistemas antioxidantes, envolvendo uma grande coleção de enzimas que limpam ou degradam ROS, moléculas que são produzidas endogenamente durante o crescimento celular. Além da proteção enzimática contra as ROS, as células também contêm pequenas moléculas antioxidantes e a glutatona na sua forma reduzida exerce papel fundamental no equilíbrio oxidativo (HATEM et al, 2016). Em células de *E. coli* mutante de genes *GSH*, resultados utilizando peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos indicaram que sua enzima é dispensável para o crescimento da bactéria durante a fase exponencial, contudo essas células são significativamente mais sensíveis aos compostos durante a fase estacionária em comparação ao tipo selvagem (GREENBERG; DEMPLE, 1986; CHESNEY et al, 1996). Já nos eucariotos, a GSH é essencial para a resistência ao estresse oxidativo (PENNINCKX, 2002; TOLEDANO et al, 2007). Linhagens de *S. cerevisiae* com níveis reduzidos de GSH devido a mutações nos genes *GSH1* e *GSH2* apresentaram extensa sensibilidade ao metilglioxal (GRANT; DAWES, 1996; KISTLER et al, 1990; OHTAKE et al, 1990; OHTAKE et al, 1991; GRANT et al, 1996). Ao contrário dos mutantes de *gsh*⁻ de *E. coli*, mutantes de *S. cerevisiae* têm taxas de crescimento diminuídas em comparação com seus parentais e são incapazes de crescer em meio mineral sem GSH. Esta auxotrofia é provavelmente causada pela exigência de um redutor em condições normais (WU; MOYE-ROWLEY, 1994; GRANT et al, 1996). Em *Candida glabrata*, GSH é fundamental na proteção contra o estresse oxidativo e a tolerância a metais pesados. Foi mostrado que o agente antioxidante é fundamental para suprimir o efeito de ROS gerados pela menadi-ona e o H₂O₂ na levedura (ESCOBEDO et al, 2013). Além desse papel na manutenção da homeostase redox, estudos evidenciaram que a GSH estaria envolvida na regulação do crescimento do micélio em *Candida albicans* (THOMAS et al, 1991; MANAVATHU et al, 1996). Em estudo realizado com o agente antifúngico CTBT (7-clorotetrazol [5,1-c] benzo [1,2,4] triazina), que sensibiliza leveduras (CERNICKA et al, 2007) e fungos filamentosos (CULAKOVA et al, 2012), observou-se que esse composto induz a formação de radicais superóxidos e estresse oxidativo, resultando em morte celular. O efeito de agentes redutores (1 a 5 mM) contra a toxicidade de CTBT em bactérias foi avaliado. A presença dos antioxidantes ascorbato, cisteína e glutatona permitiu que as células de *E. coli* pudessem crescer no meio com CTBT (CULAKOVA et al, 2013), tal qual como foi observado com o DSF.

O estresse oxidativo tem uma íntima relação com as mitocôndrias, a principal fonte de ROS nas células. Por isso, a regulação redox é crítica para numerosas funções mitocondriais. Por exemplo, a deficiência de GSH em células de mamíferos ocasiona dano mitocondrial generalizado (MEISTER, 1995). Leveduras com deficiência na produção de GSH são incapazes de crescer usando apenas o metabolismo respiratório devido ao acúmulo de danos oxidativos no DNA mitocondrial (AYER et al, 2010).

Embora vários dados na literatura mostrem que a presença do acetaldeído é capaz de aumentar a produção de ROS pelas células de levedura e que GSH é capaz de detoxificar este ROS produzido, mecanismos não enzimáticos de ação direta de GSH sobre a molécula de acetaldeído tem sido propostos. Matsufuji et al (2013) mostraram que a molécula de GSH poderia atuar como um sequestrador de acetaldeído livre a partir de uma reação não enzimática na razão de quatro moléculas de acetaldeído por molécula de GSH. Isto mostra ação direta da glutathione sobre o acetaldeído além da sua ação indireta sobre o ROS produzido. Neste caso, o acúmulo de acetaldeído produzido pela inibição da AldH por DSF pode ser reduzido pelo excesso de GSH adicionado ao meio.

Uma das características importantes que fazem com que a GSH tenha essa grande capacidade antioxidante é o mecanismo de S-glutathionilação, que é a adição de glutathione a resíduos de cisteína presentes nas proteínas (DEMASI et al, 2001). Esse evento é um mecanismo de regulação redox da atividade de várias proteínas, fornecendo proteção contra oxidação irreversível (SHELTON; MIEYAL, 2008). Resultados com a levedura *S. cerevisiae* indicam a importância desse processo na proteção contra danos oxidativos (DEMASI et al, 2003; OHARA, 2015).

4.2.2 N-acetilcisteína

Diferente do observado com a GSH, a inibição do crescimento causado pelo DSF na linhagem GDB 248 foi apenas parcialmente revertida pela adição de N-acetilcisteína (NAC) no meio. Em todas as concentrações de DSF testadas foi observada queda na densidade celular da cultura entre 10 e 12 horas de cultivo, principalmente a partir de 60 μ M (Figura 13 E, F, G). Em *S. cerevisiae* JP1 também houve restauração do crescimento celular na presença de NAC e DSF (Figura 14 B, C, D, E e F), diminuindo significativamente a fase *lag* e aumentando tanto a velocidade de crescimento exponencial como a biomassa final (Figura 14 e Tabela 2). Entretanto, diferente do que aconteceu com a GDB 248, a queda na biomassa pela presença de NAC só foi observada na concentração mais alta de DSF (Figura

14G). Este fenômeno de morte celular induzida poderia ser explicado a partir da indução do mecanismo de apoptose. Entretanto, apenas com os dados obtidos, não é possível continuar e aprofundar a discussão. Portanto, os resultados com a glutathione e a N-acetilcisteína indicam que os compostos resolvem mais rapidamente o estresse oxidativo na levedura *S. cerevisiae*, o que é refletido nas velocidades específicas, contudo, apesar das velocidades não melhorarem em *D. bruxellensis*, os compostos também foram eficazes na levedura e esse parâmetro mais lento deve ser uma característica específica da linhagem GDB 248.

A atividade antioxidante da NAC foi avaliada e bem estabelecida em células tumorais. Em células de câncer de pâncreas, NAC foi capaz não apenas de eliminar os efeitos de ROS causados por H_2O_2 como também inibiu o complexo proteossoma celular responsável pela via da proteólise de proteínas desoveladas produzidas por moléculas oxidantes (HALASI et al, 2013). Em células de melanoma NAC foi capaz de inibir apoptose induzida pelo DSF pelo aumento da razão GSH/GSSG, com consequente aumento da viabilidade celular (CEN et al, 2002).

Kin et al (2013) avaliaram a capacidade antioxidante e radioprotetora de NAC em células de *S. cerevisiae* incubada sob a influência de radiações gama. O estudo investigou a atividade de NAC em três níveis: sob o aspecto de ROS, atividade enzimática e expressão gênica. O tratamento das células com radiação gama induziu a expressão de genes codificadores de enzimas antioxidantes como *Sod1*, *Sod2*, *Gpx1* e *Gpx2*, mas esta indução foi reduzida na presença de NAC. A partir disso, NAC reduziu a atividade enzimática de SOD e o nível intracelular de GSH da levedura. Os resultados indicaram que NAC possui a capacidade de reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio induzidas por radiação in vivo, contudo não protege as células contra a morte celular. O estudo concluiu que NAC não interfere na fase logarítmica do crescimento da levedura, contudo afeta a fase estacionária do crescimento celular, devido à redução na atividade das enzimas antioxidantes.

Esses resultados ajudam a explicar a queda na densidade celular na fase estacionária nos experimentos do presente trabalho, em algumas concentrações de DSF, tanto de GDB 248, quanto de JP1, incubadas com o composto e NAC (Figuras 13 e 14).

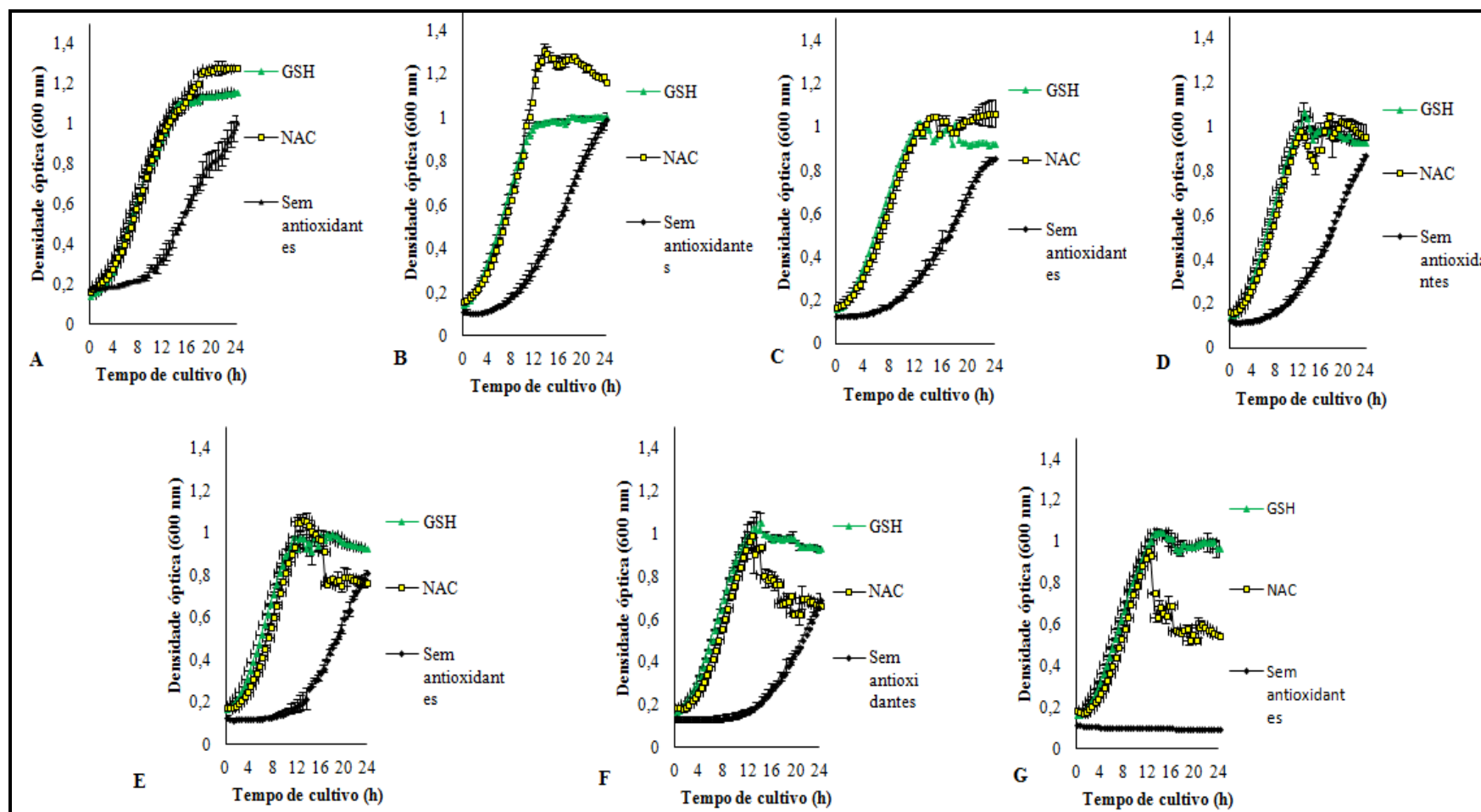


Figura 13. Efeito dos agentes antioxidantes glutathiona reduzida (GSH) e N-acetilcisteína (NAC) no crescimento da levedura *D. bruxellensis* GDB 248 incubada com DSF em diferentes concentrações (0-100µM): A. 0 µM B. 15 µM C. 30 µM D. 45 µM E. 60 µM F. 75 µM G. 100 µM. Meio com pH inicial de 5,5.

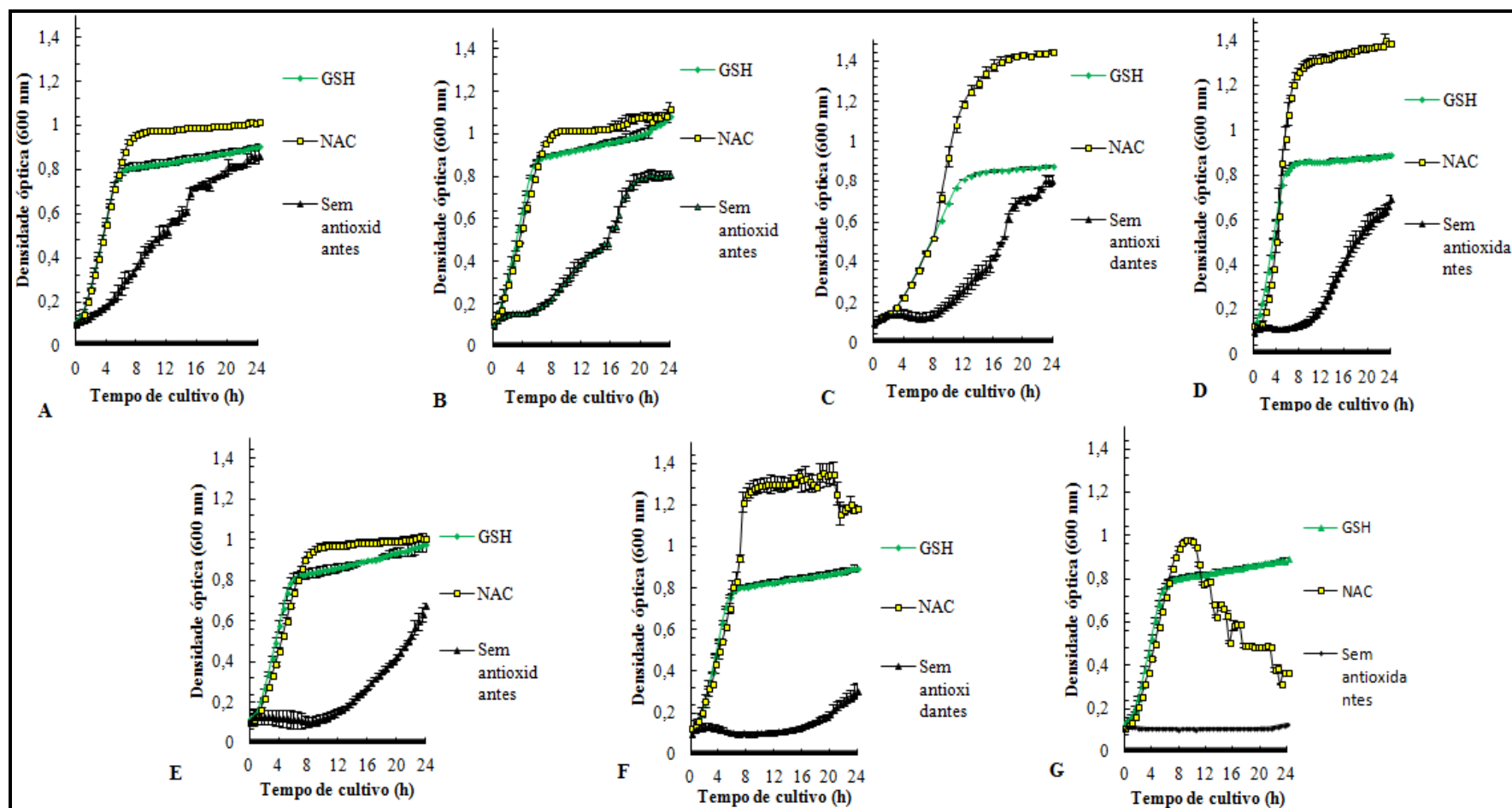


Figura 14. Efeito de agentes antioxidantes no crescimento da levedura *S. cerevisiae* JP1 incubada com DSF em diferentes concentrações (0-100µM). A. 0 µM B. 15 µM C. 30 µM D. 45 µM E. 60 µM F. 75 µM G. 100 µM. GSH: glutatona reduzida. NAC: N-acetilcisteína. Meio com pH inicial de 5,5.

Tabela 2: Velocidades específicas de crescimento (μ) das leveduras *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* cultivadas em meio sintético (pH 5,5) com disulfiram em diferentes concentrações (0-100 μ M) e agentes antioxidantes.

Espécie	Agentes antio- xidantes	DSF (μ M)					
		0	15	30	45	60	75
<i>D. bruxellensis</i>	GSH	0,12 $\pm$ 0,002	0,12 $\pm$ 0,0002	0,12 $\pm$ 0,0001	0,14 $\pm$ 0,0001	0,13 $\pm$ 0,002	0,13 $\pm$ 0,0006
<i>S. cerevisiae</i>		0,24 $\pm$ 0,004	0,23 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,0008	0,25 $\pm$ 0,002	0,24 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,002
<i>D. bruxellensis</i>	NAC	0,12 $\pm$ 0,001	0,12 $\pm$ 0,004	0,12 $\pm$ 0,003	0,11 $\pm$ 0,0006	0,12 $\pm$ 0,0009	0,12 $\pm$ 0,002
<i>S. cerevisiae</i>		0,21 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,0008	0,29 $\pm$ 0,002	0,25 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,0004	0,18 $\pm$ 0,02

Kwolek-Mirek et al (2012) observaram que a completa inibição do efeito do DSF em células de *S. cerevisiae* foi observada quando utilizaram 5 mM de cisteína no meio de cultura. Em outro estudo realizado em *E. coli*, a cisteína restaurou o crescimento bacteriano que havia sido inibido com o uso do agente antifúngico CTBT, composto capaz de gerar radicais superóxidos e morte celular (CULAKOVA et al, 2013).

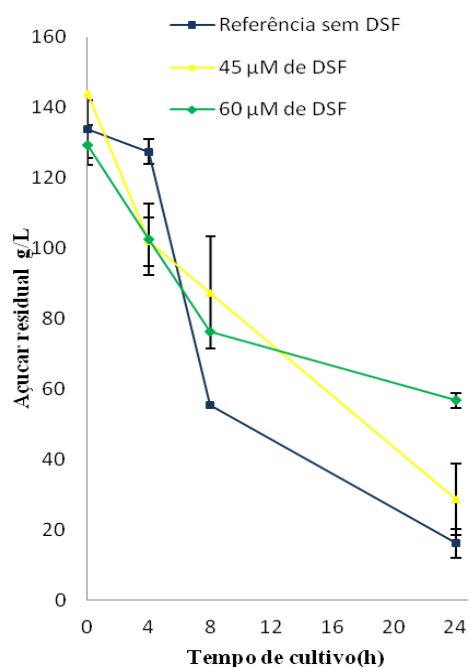
Em células da levedura *C. albicans*, a produção de sulfito a partir da cisteína contribui para processos de estresse no micro-organismo, e grandes quantidades do composto foram encontrados em sobrenadantes de células incubadas com o aminoácido, diferente do meio que não o continha (HENNICKE et al, 2013). Outros trabalhos também já relataram a sensibilidade de *C. albicans* ao sulfito, um fenótipo que é compartilhado com algumas linhagens de *S. cerevisiae* (CHIRANAND et al, 2008). Diferentes mecanismos possíveis de toxicidade com a utilização de cisteína têm sido sugeridos em diversos micro-organismos, incluindo interferência na atividade de enzimas respiratórias e danos oxidativos ao DNA (COWMAN et al, 1983; PARK; IMLAY, 2003). A interferência, na fase estacionária de crescimento, nos testes com as leveduras *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* incubadas com N-aceticisteína, podem de alguma maneira se relacionar com esses mecanismos celulares relacionados ao catabolismo da cisteína nas leveduras.

4.3 ANÁLISE DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

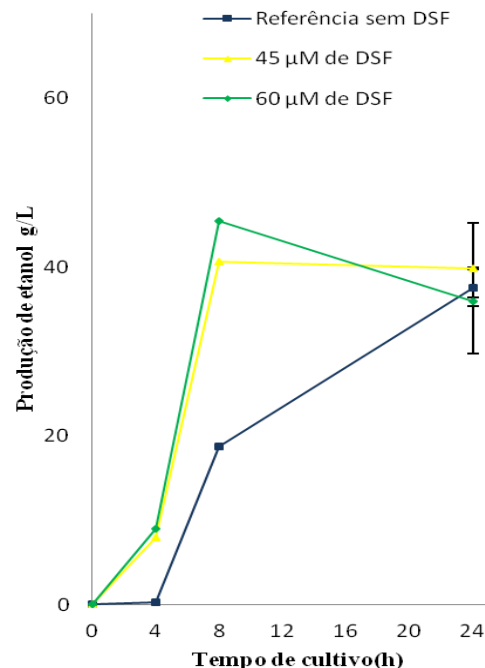
Para avaliar a capacidade fermentativa de *D. bruxellensis* GDB 248 com a utilização do disulfiram foram realizados ensaios contendo alta concentração de glicose, ambiente aeróbico para estimular a produção de ácido acético, em três condições: controle sem DSF, 45 μ M e 60 μ M do composto. Os parâmetros propostos para análise nos experimentos foram o consumo de açúcar, produção de etanol, produção de ácido acético e produção de glicerol, além dos rendimentos.

A velocidade de consumo de açúcar da levedura *D. bruxellensis* é caracterizada por ser mais lenta em relação à de *S. cerevisiae*. Nos resultados do presente trabalho podemos observar que o perfil de consumo de açúcar da GDB 248 no início da fermentação, nas três condições, se manteve semelhante (Figura 15A), no entanto, o consumo final de açúcar diminuiu consideravelmente na condição de 60 μ M (56,5%) em comparação com a condição de 45 μ M (80,4 %) e a referência (89,8%) (Tabela 3). Além disso, houve um aumento inicial da produção de etanol nos testes com DSF, apesar de ao final do cultivo essa produção ser um pouco menor (Figura 15B). Portanto, em presença de 60 μ M de DSF, a levedura conseguiu obter um maior rendimento em etanol, 0,49 g (g glicose)⁻¹ e a referência 0,32 g (g glicose)⁻¹ (Tabela 3). Esses resultados indicam a eficiência do DSF em promover o bloqueio da enzima acetaldeído desidrogenase e aumentar o rendimento em etanol da levedura.

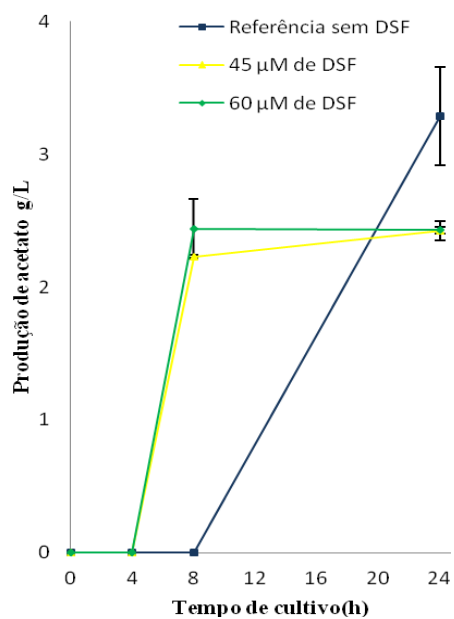
Em relação à produção de ácido acético, podemos observar que com 8 horas de fermentação o acetato é detectado nas condições de 45 μ M e 60 μ M, diferente da referência sem DSF (Figura 15C). Como a produção de acetato está bloqueada via acetaldeído devido à inibição da Aldh pelo DSF, esse acetato provavelmente deve estar sendo exportado da mitocôndria para o citoplasma celular. Na referência, como não há utilização de DSF, a maioria do acetaldeído proveniente do piruvato é oxidado a acetato, que é rapidamente direcionado para síntese de ácidos graxos. Portanto, podemos observar que o rendimento em ácido acético é maior na condição de 60 μ M de DSF em comparação com as outras duas condições e, nessa condição, o rendimento em glicerol foi menor em comparação com a referência (Tabela 3), o que já é uma característica da levedura *D. bruxellensis* (PEREIRA et al, 2014).



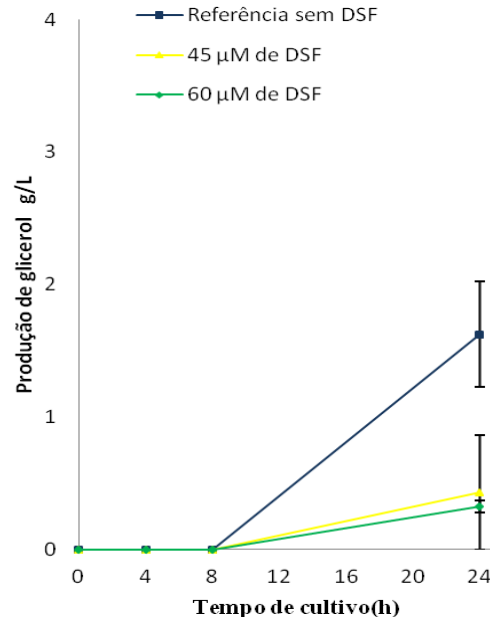
A



B



C



D

Figura 15. Parâmetros fisiológicos de ensaio fermentativo da levedura *Dekkera bruxellensis* GDB 248 em meio YNB sem aminoácidos, com adição de glicose e sulfato de amônio. Açúcar residual (painel A), produção de etanol (painel B), produção de acetato (painel C) e produção de glicerol (painel D). Referência sem DSF (azul), 45 μM de DSF (amarelo), 60 μM de DSF (verde).

O bloqueio da enzima Aldh promoveu um aumento significativo na taxa de consumo de glicose nas primeiras 4 horas do ensaio fermentativo, valor acima do que foi calculado por Leite et al (2013) para consumo de glicose em meio aerado, e cerca de sete vezes maior do que na condição de referência. Isto levou a consequente maior taxa de produção de etanol no tratamento naquele intervalo em relação a condição de referência (Figura 16B). Essa taxa de consumo se manteve constante no intervalo de 4 a 8 horas. Em consequência, a produção de etanol foi significativamente maior do que na condição de referência e, adicionalmente, o acetato já é detectado nesse período devido ao “overflow” metabólico a partir da mitocôndria. Este efeito deve ser o responsável pela diminuição no consumo de glicose no intervalo posterior (entre 8 e 24 horas) (Figura 16B). Ao final da fermentação esta diminuição resultou na presença de açúcar residual na condição de tratamento com 60 μ M de DSF não observado na condição de referência (Figura 15A). Na condição de referência, o acetato só foi detectado apenas no último intervalo fermentativo, exatamente quando o fluxo metabólico de assimilação de glicose foi aumentado no intervalo entre 4 e 8 h de fermentação (Figura 16A).

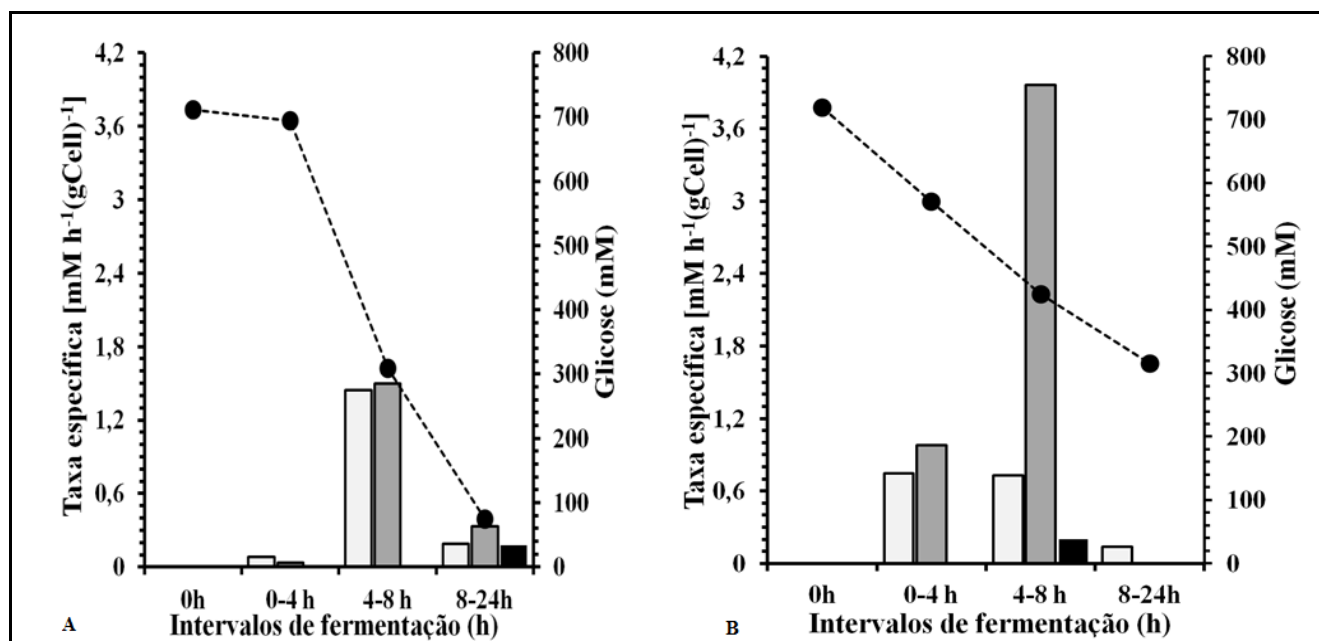


Figura 16: Taxas específicas de consumo de glicose e produção de etanol e acetato da levedura *D. bruxellensis* incubada sem DSF (Painel A) e com 60 μ M de DSF (Painel B) em ensaio fermentativo aerado. Consumo de glicose (coluna branca), produção de etanol (coluna cinza) e produção de acetato (coluna preta).

Diante dos resultados, conclui-se finalmente que o fluxo da via glicolítica é controlado pelo fluxo na via de síntese de acetil-CoA citosólico, seja pela enzima acetaldeído desidrogenase ou pelo acúmulo dos metabólitos acetato e/ou acetil-CoA, e o seu bloqueio pelo DSF interfere na capacidade de assimilação glicolítica da glicose. Esse bloqueio, portanto, aumenta o consumo inicial de glicose, aumenta a conversão do piruvato ao acetaldeído e do mesmo ao etanol e também estimula a exportação do acetato mitocondrial. Esse transporte mitocondrial do ácido para o citoplasma já foi relatado em *Kluyveromyces Lactis* (RATLEDGE; EVANS, 1989) e é dito ausente em *S. cerevisiae* quando glicose é utilizada como fonte de carbono (FLIKWEERT et al, 1999).

Apesar dos processos fermentativos serem realizados em ambientes com grande limitação de oxigênio, já é estabelecido a capacidade de *D. bruxellensis* em produzir grande quantidade de ácido acético e vir a inibir crescimento e viabilidade celular de *S. cerevisiae* no ambiente industrial, fazendo com que sua produção de etanol seja bastante afetada (ABBOTT et al, 2005; LEMA et al, 1996, GERRO'S et al, 2000), apesar de que em certas condições a quantidade de ácido não é suficiente para exercer tal efeito (MENEHIN et al, 2013). Níveis elevados de produção do ácido (10 g/L^{-1}) só são conseguidos em ambientes com níveis altos de oxigenação (USCANGA et al, 2003).

Em *Kluyveromyces marxianus*, o aumento do fluxo através do desvio da PDH durante condições limitantes de oxigênio fazem com que uma acumulação de acetato através da oxidação do acetaldeído seja esperada. Em condições fermentativas com pouco oxigênio e muita biomassa, o acúmulo de ácido acético coincide com uma diminuição na taxa de crescimento e na produção de etanol pela levedura (KOYNOV et al., 2007). O aumento do fluxo através do desvio da PDH, relatado anteriormente, é um efeito fisiológico em condições de pouca oxigenação e grande quantidade de substrato, contudo além dessas características, a taxa de crescimento das células é um fator chave para que o metabolismo seja direcionado para a fermentação aeróbica e taxas mais baixas favorecem a descaboxilação do piruvato ao acetaldeído (FONSECA et al, 2007). Contudo, a oxidação do acetaldeído a acetato é considerado um desvio metabólico que desfavorece a produção de etanol, tanto em *D. bruxellensis* como em *K. marxianus*.

Pereira et al (2012) realizaram experimentos fermentativos com limitação de oxigênio utilizando linhagens de *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae*. Os resultados médios mostraram um rendimento de $0,38 \text{ g de etanol (g sacarose)}^{-1}$ para a levedura *D. bruxellensis* e de $0,47 \text{ g de etanol (g sacarose)}^{-1}$ para *S. cerevisiae* JP1 durante fermentação de 24 horas. Contudo a maior diferença na produção de etanol ocorreu entre linhagens de *D. bruxellensis*, ($Y_{p/s} = 0,42 \text{ g/g}^{-1}$) para GDB 248 e ($Y_{p/s} = 0,32 \text{ g/g}^{-1}$) para

TPC2-1, indicando assim, a variabilidade fisiológica existente na espécie. Em condições onde se utiliza culturas puras de *D. bruxellensis*, o consumo de glicose para obtenção de etanol tende a ser mais lento durante o cultivo (PEREIRA et al, 2012) e isso inclusive já foi relatado em outros estudos onde o processo fermentativo teve que ser mais longo para obtenção de altos rendimentos (BLOMQVIST et al, 2010, GALAFASSI et al, 2010). A cinética de fermentação de *D. bruxellensis* em melaço de cana-de-açúcar em lotes únicos mostrou que a levedura possui um consumo mais lento da sacarose em comparação com *S. cerevisiae*, no entanto, utilizando glicose e frutose, o consumo foi realizado em 6 horas de fermentação pelas leveduras (PEREIRA et al, 2014).

Tabela 3. Parâmetros fermentativos de *Dekkera bruxellensis* GDB 248 em meio YNB sem aminoácidos, glicose e sulfato de amônio com DSF em duas concentrações testes (45 μ M e 60 μ M) após cultivo de 24h

Parâmetros fermentativos	DSF (μ M)		
	0	45	60
Consumo de açúcar (%)	89.8 $\pm$ 0.4	80.4 $\pm$ 0.8	56.5 $\pm$ 0.0001
Rendimento em etanol (g/g)	0.32 $\pm$ 0.03	0.34 $\pm$ 0.0004	0.49 $\pm$ 0.003
Rendimento em acetato (g/g)	0.02 $\pm$ 0.003	0.02 $\pm$ 0.0006	0.03 $\pm$ 0.0003
Rendimento em glicerol (g/g)	0.01 $\pm$ 0.3	0.003 $\pm$ 0.04	0.004 $\pm$ 0.001

A levedura *D. bruxellensis* possui capacidade em produzir etanol e ácido acético em condições de oxigenação no meio (ROZPEDOWSKA et al, 2011; LEITE et al., 2012). No entanto, em condições anaeróbicas, a levedura não apresentou condições expressivas de ácido, isoladamente ou em co-culturas com *S. cerevisiae* (PEREIRA et al, 2012; PEREIRA et al, 2014). A produção de ácido acético por *D. bruxellensis* ainda necessita de um maior estudo, e variações dependendo da linhagem da levedura e condições experimentais devem ocorrer. A produção do ácido em culturas sob certas condições também pode influenciar no metabolismo de *S. cerevisiae* (BECKNER et al, 2011).

De acordo com a produção de etanol, estudos puderam observar que o rendimento de *D. bruxellensis* em condições limitantes de oxigênio é praticamente o mesmo que o de *S. cerevisiae* (GALA-

FASSI et al, 2010; PEREIRA et al, 2014), contudo o reciclo de células pode fazer com que *D. bruxellensis* prefira crescer a realizar o metabolismo fermentativo (PEREIRA et al, 2014). Essa capacidade de rendimento em biomassa de Dekkera também já foi observado em outros estudos (DE SOUZA LIBERAL et al, 2007; BLOMQVIST et al, 2010; DE BARROS PITA et al, 2011), inclusive em co-culturas com *Lactobacillus vini* (DE SOUZA BARROS et al, 2012). Em relação à produtividade etanólica, *D. bruxellensis* não consegue competir com *S. cerevisiae* em processos de batelada (GALAFASSI et al, 2011). Blomqvist et al (2010) chegaram a conclusão que *D. bruxellensis* realiza um metabolismo energeticamente mais eficiente em condições limitadas de oxigênio, o que está estritamente relacionado com a diminuição na produtividade em etanol. Com o aumento da oxigenação do cultivo, *D. bruxellensis* tende a consumir mais açúcar, o que resulta em uma competição maior com *S. cerevisiae* em co-culturas, contudo, a levedura produz menos etanol, devido a grande produção de ácido acético nessas condições (BLOMQVIST et al, 2012). *Kluyveromyces marxianus* também possui a tendência em produzir piruvato e acetato quando é submetida a excesso de açúcar (HENSING et al, 1994).

D. bruxellensis tem sido considerada de alta relevância para a fermentação alcoólica devido a sua manutenção no ambiente industrial, mesmo quando não é a principal levedura da dorna (DE SOUZA LIBERAL et al, 2007; PASSOTH et al, 2007; BASILIO et al, 2008; PEREIRA et al, 2012; DE SOUZA BARROS et al, 2012). Embora o número de dados sejam pequenos, há uma concordância que sua elevada tolerância a diferentes formas de estresse seja um dos fatores (ROZPEDOWSKA et al, 2011), além da capacidade de assimilar nitrato, que pode ser um aceptor de elétrons, capaz de suprimir o efeito *Custer* e aumentar a produção de etanol (DE BARROS PITA et al, 2011). Essa capacidade que também foi observada posteriormente (GALAFASSI et al, 2013).

No presente trabalho podemos observar que o DSF aumenta o rendimento em etanol da levedura *D. bruxellensis* em comparação com a referência e, adicionalmente, o composto também aumentou a produtividade da levedura nessas condições de cultivo. Estudos subsequentes utilizando outros substratos, como o caldo de cana-de-açúcar devem ser realizados para avaliar o real potencial desse composto na produção de etanol no processo industrial.

4.3.1 Avaliação do crescimento de *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* em glicerol e galactose como fonte de carbono na presença de DSF

Os resultados anteriores levaram a formulação da hipótese de que em *D. bruxellensis* a ausência da atividade AldH citoplasmática e, conseqüentemente, o impedimento da produção de acetato, seria

compensado pela exportação do acetato mitocondrial para o citoplasma. Mais uma vez *S. cerevisiae* JP1 foi utilizada como referência pois não é capaz de realizar esta exportação quando cultivada em glicose (FLIKWEERT et al, 1999). Linhagens de *S. cerevisiae* descarboxilase-negativa (mutante para os genes estruturais *PDC1*, *PDC5* e *PDC6*) não são capazes de crescer em glicose como única fonte de carbono a menos que o meio seja suplementado com acetato, ou mesmo etanol, devido a incapacidade de exportar acetato gerado na mitocôndria pela hidrólise do acetil-CoA para o citoplasma a partir do sistema de transporte chamado de “*shuttle* de carnitina”. Isso prova que a enzima piruvato descarboxilase é essencial no crescimento da levedura em glicose, para estabelecer o aporte necessário de acetil-CoA citosólico (FLIKWEERT et al, 1999; VAN MARIS et al, 2004). Entretanto, nesta levedura o acetato produzido no citoplasma pode ser transportado para a mitocôndria para aliviar os efeitos da mutação no gene *PDA1* que codifica a piruvato desidrogenase. A essencialidade da enzima piruvato descarboxilase na assimilação do carbono não é geral entre as leveduras. Em *Kluyveromyces lactis* a deficiência dessa enzima não impede o crescimento em glicose (BIANCHI et al, 1996). O crescimento da espécie nessas condições pode ser estabelecido por dois mecanismos: *shuttle* de carnitina com transporte de acetil-CoA mitocondrial para o citoplasma (KOHLHAW; TAN-WILSON, 1977) ou ainda através do transporte de citrato, que quando no citoplasma celular seria convertido em acetil-CoA e oxaloacetato pela enzima ATP citrato liase (EC 4.1.3.8) (RATLEDGE; EVANS, 1989). Portanto, diferente de *S. cerevisiae*, a levedura *K. lactis* é capaz de promover o fluxo de acetato da mitocôndria para o citoplasma mesmo na presença de glicose.

As células das linhagens GDB 248 e JP1 foram cultivadas em meios contendo glicerol ou galactose como fonte de carbono, na presença e ausência de DSF, e com ou sem suplementação de acetato (Figura 17). Deve-se levar em consideração que glicerol é uma fonte de carbono apenas respirável, e portanto sua metabolização acontece apenas dentro das mitocôndrias. Galactose, apesar de ser uma hexose, apresenta baixo metabolismo fermentativo devido ao baixo fluxo de assimilação pela via de Leloir, levando a baixa produção de piruvato que é majoritariamente convertido a acetil-CoA mitocondrial. Para *D. bruxellensis* observou-se que a presença de DSF não alterou o perfil de crescimento nem para glicerol e nem para a galactose (Figura 17 A e C), mesmo na dose que impede o crescimento em glicose (Figura 9A). Já em *S. cerevisiae*, a presença de DSF reduziu significativamente o crescimento em galactose e, em menor proporção, em glicerol (Figura 17 B e D). A adição de acetato no meio reverteu o efeito negativo do DSF para *S. cerevisiae* (Figura 17 B e D), mas não teve efeito em *D. bruxellensis*, confirmando que realmente esta primeira levedura não é capaz de exportar acetato da mitocôndria para o citoplasma. Esses resultados confirmam que em *D. bruxellensis* a depleção do

acetato citosólico causado pela inativação da enzima acetaldeído desidrogenase pelo DSF pode ser compensada pela exportação do acetato mitocondrial para o citoplasma com o objetivo de produção de ácidos graxos, que possibilita o crescimento celular. Nesse contexto, *D. bruxellensis* tem comportamento fisiológico semelhante a *K. lactis*.

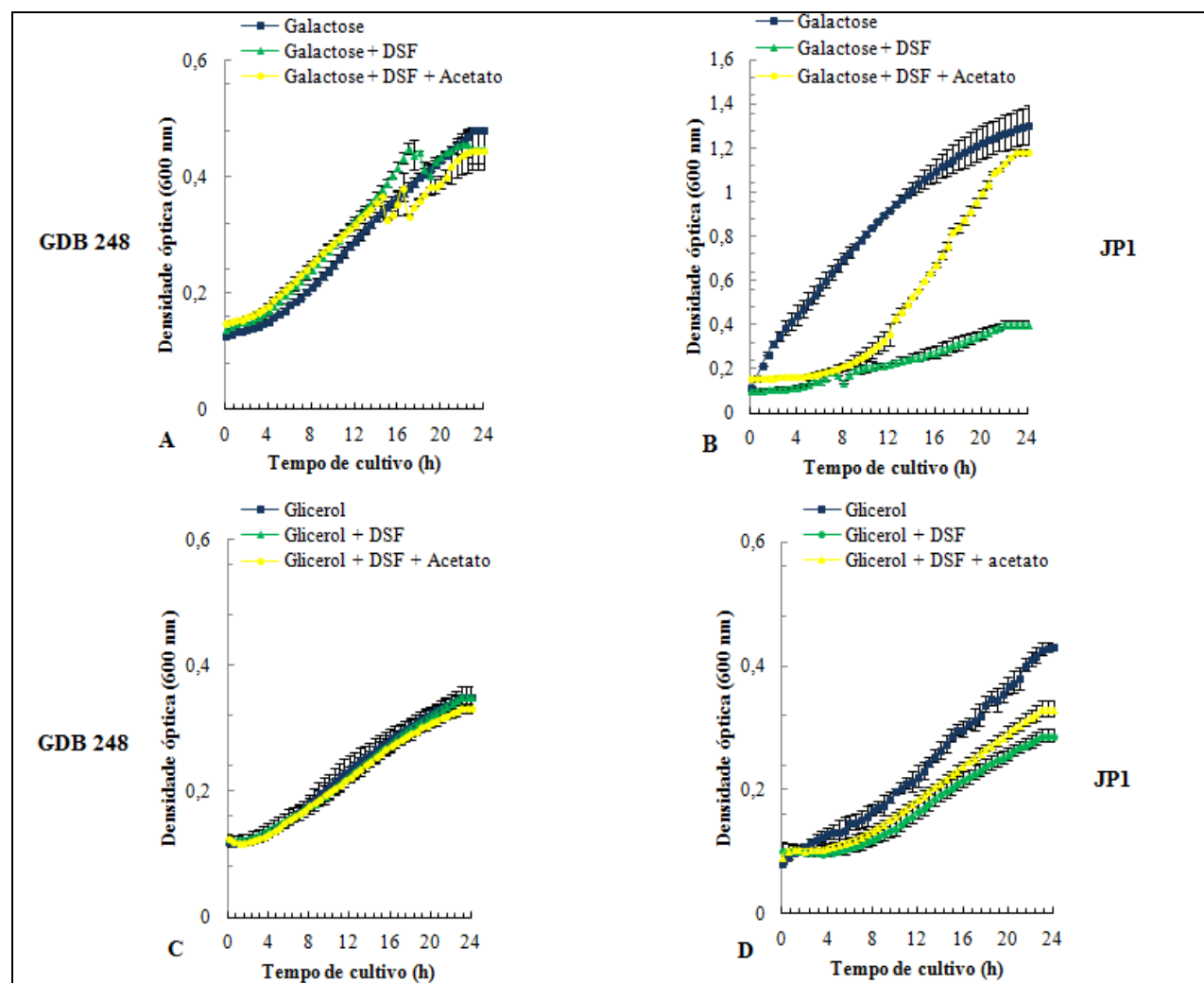


Figura 17. Crescimento das leveduras *D. bruxellensis* GDB 248 e *S. cerevisiae* JP1 com glicerol e galactose como fonte de carbono e 100 μ M de DSF. GDB 248 crescida em galactose (Painel A). JP1 crescida em galactose (Painel B). GDB 248 crescida em glicerol (Painel C). JP1 crescida em glicerol (Painel D). Galactose e glicerol (Azul). Galactose + DSF e glicerol + DSF (Verde). Galactose + DSF + acetato e glicerol + DSF + acetato (Amarelo).

O metabolismo do acetil-CoA na levedura *S. cerevisiae* tem sido bastante estudado (KRIVORUCHKO et al., 2014; NIELSEN, 2014). Esse composto na levedura está presente em pelo menos quatro compartimentos celulares: citoplasma, mitocôndrias, peroxissomos e núcleo. Algumas rotas meta-

bólicas de utilização de acetil-CoA são reconhecidas na levedura, como por exemplo, unidades de acetil entram no ciclo do glioxilato e estão relacionadas a síntese de ácidos dicarboxílicos que podem ser direcionados dos peroxissomos para o citoplasma. Adicionalmente, o composto pode partir do citoplasma para as mitocôndrias e servir como substrato no ciclo do ácido cítrico (CHEN et al, 2015). Outra via é dependente de carnitina, onde unidades em forma de acetil-carnitina podem ser transportadas do citoplasma para as mitocôndrias, contudo, *S. cerevisiae* não é capaz de sintetizar carnitina na presença de glicose, podendo usar se ela for fornecida ao meio de cultivo (VAN ROERMUND et al, 1999).

Estudos ao longo dos anos tentaram elucidar se grupos acetil poderiam ser transportados da matriz mitocondrial para o citoplasma, apesar da grande impermeabilidade da membrana mitocondrial (VAN ROERMUND et al, 1995). Em eucariotos, já é estabelecido o mecanismo de transporte citrato/malato e/ou citrato com transferência de grupos acetil para o citoplasma celular. O transporte é caracterizado quando o acetil-CoA intramitocondrial é convertido em citrato oriundo de reação com o oxaloacetato, que é exportado para o citoplasma e lá pode ser convertido em acetil-CoA novamente pela enzima citrato liase, proteína amplamente distribuída em fungos, mas ausente em *S. cerevisiae* (HYNES E MURRAY, 2010).

Em *S. cerevisiae* cultivada em glicose, a maioria do fluxo glicolítico é direcionado ao etanol devido ao efeito *Crabtree*. A única estratégia viável para eliminar a produção de etanol está relacionado ao bloqueio na atividade da enzima piruvato descarboxilase fazendo com que o piruvato não seja convertido em acetaldeído, o qual forma o etanol (FLIKWEERT et al, 1999). A sensibilidade à glicose de mutantes PDC ainda permanece sem um motivo aparente. Em células que não entram no metabolismo de fermentação alcoólica, bloqueado nas linhagens mutantes (BLOM et al, 2000; DIDERICH et al, 2002), ocorre uma dependência do processo respiratório para reoxidar o NADH citosólico (PRONK et al, 1996). Em *S. cerevisiae* parental, a respiração é reprimida mas não é bloqueada, como comprovado pelo consumo de oxigênio, mostrando que a repressão da glicose em mutantes PDC não é a única causa dessa sensibilidade (VAN MARIS et al, 2003). Experimentos de seleção adaptativa foram realizados utilizando um mutante PDC negativo que permitiram o isolamento de uma linhagem mutante denominado "C2-independente", com capacidade de crescer em glicose e produzir grandes quantidades de ácido pirúvico (VAN MARIS et al 2004). Esta linhagem apresentou uma deleção de 225 pb interna ao gene MTH1 (MTH1- Δ T) que já tinha sido atribuída como uma das causas do restabelecimento do crescimento do mutante PDC de *S. cerevisiae* em glicose e sem acetato ou etanol (OUD et al, 2012). No entanto, ao inserir o alelo deletado em uma linhagem PDC negativo não adaptada, a velo-

cidade de crescimento ($\mu_{\max} = 0,10 \text{ h}^{-1}$) foi mais lenta em meio com 2% de glicose em comparação com a linhagem adaptada "C2-independente" ($\mu_{\max} = 0,20 \text{ h}^{-1}$), indicando a possível presença de outras alterações genéticas vantajosas na linhagem (OUD et al, 2012). A proteína Mth1 atua como um regulador transcricional negativo na via de sinalização da glicose, juntamente com outros reguladores (GAMO et al, 1994). Estudos mostraram que a deleção do gene *MTH1* reduz o transporte de glicose e, consequentemente alivia a repressão catabólica pela glicose (LAFUENTE et al, 2000; SHULTE et al, 2000). Entretanto, a restauração do crescimento da linhagem PDC negativa *MTH1-ΔT* não leva, por si só, a formação de Acetil-CoA citosólico e indica caminhos alternativos para formação e utilização desse composto. Os dados mostram que ocorre formação de acetato através de Acetil-CoA mitocondrial pela atividade da enzima Acetil-CoA hidrolase, codificada pelo gene *ACH1*. Contudo, a atividade desta enzima é limitada pela baixa disponibilidade de acetil-CoA livre na mitocôndria, já que este é prontamente assimilado pela via TCA, ou ciclo de Krebs, e pela rigorosa regulação do complexo PDH pela glicose em *S. cerevisiae* (CHEN et al, 2015). Além da deleção do gene *MTH1*, nessas cepas evoluídas foi identificada uma deleção no gene *HXT3*, o que limita substancialmente o transporte de glicose (ZHANG et al, 2015), e já é bem demonstrado que a taxa de transporte de glicose determina a força da repressão metabólica pela glicose (REIFENBERGER et al, 1997). Portanto, a baixa absorção de glicose deve ter resultado no alívio da repressão nessa linhagem. Assim, mesmo com a elevada concentração de glicose no meio de cultivo, muitos genes geralmente reprimidos estariam em um processo de desrepressão. Um desses genes seria justamente o *ACH1*, e o aumento na atividade acetil-CoA hidrolase resultaria no suprimento citoplasmático de C2 pelo acetato mitocondrial (ZHANG et al, 2015).

A enzima Ach1 de *S. cerevisiae* apresenta a atividade CoA transferase que é capaz de transferir CoA do succinil-CoA para o acetato que entra na mitocôndria proveniente do citoplasma (FLECK E BROCK, 2009). Isto permite o funcionamento do ciclo de Krebs mesmo nas linhagens com deleção no gene *PDA1* cultivadas em glicose (CHEN et al 2015). A atividade reversa, Acetil-CoA a succinato com formação de acetato e succinil-CoA, foi observada na linhagem PDC negativa com a mutação em *MTH1*. A adição de succinato melhora o crescimento do mutante *MTH1-T*, não em relação ao perfil de crescimento da fase exponencial, mas na redução na extensão da fase *lag* na linhagem PDC negativa. O resultado de que o mutante *MTH1-T* é capaz de crescer em glicose, embora em baixa velocidade de crescimento, e de que este mutante é incapaz de crescer em glicose na ausência do gene *ACH1* prova que de fato a exportação de acetato da mitocôndria para o citoplasma em *S. cerevisiae* é dependente da acetil-CoA hidrolase e que é negativamente regulado pela glicose (CHEN et AL, 2015).

Os resultados do presente estudo com a levedura *D. bruxellensis* GDB 248, através dos crescimentos, indicam algum mecanismo utilizado pela levedura para que a mesma consiga crescer mesmo com o bloqueio na produção de acetato/acetil-CoA citosólico promovido pelo DSF (Figura 17 A e C). O *shuttle* de acetato mitocondrial para o citoplasma, já relatado em outras leveduras, provavelmente deve estar ocorrendo. A expressão de genes relacionados ao metabolismo respiratório, bem como estudos a nível bioquímico devem elucidar os mecanismos específicos empregados pela levedura para que ocorra esse fornecimento de acetil-CoA para o citoplasma.

5 CONCLUSÕES

- *D. bruxellensis* apresenta sensibilidade ao disulfiram e a adição do ácido acético no meio de cultura não conseguiu melhorar os crescimentos das células de *D. bruxellensis* sob efeito do disulfiram. *S. cerevisiae* também apresenta sensibilidade ao disulfiram. Entretanto, o ácido acético restaurou seu crescimento.
- *D. bruxellensis* é mais resistente ao efeito tóxico do disulfiram em comparação a *S. cerevisiae* nos crescimentos sem adição de ácido acético. Com acetato, *S. cerevisiae* reverteu os crescimentos e o composto deve estar sendo melhor utilizado no metabolismo de ácidos graxos. Esse contraste indica uma fonte alternativa de acetato para *D. bruxellensis*, o qual deve ser proveniente das mitocôndrias
- O metabolismo do acetaldeído é substancialmente afetado pelo DSF. Nossos dados indicam que a enzima acetaldeído desidrogenase é inibida pelo DSF nas leveduras *D. bruxellensis* GDB 248 e *S. cerevisiae* JP1.
- A glutatona reduzida e a N-acetilcisteína restauram os crescimentos de *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* sob efeito do disulfiram. A adição dos antioxidantes, portanto, é um importante reversor do estresse oxidativo nas leveduras, contudo de uma maneira mais rápida em *S. cerevisiae*.
- *D. bruxellensis* possui maior eficiência fermentativa com a utilização do DSF. O aumento inicial da produção de etanol e no rendimento final comprova a eficiência do bloqueio da enzima acetaldeído desidrogenase ocasionado pelo DSF na linhagem GDB 248.

- *D. bruxellensis* apresentou um maior rendimento em acetato na condição onde sua produção via oxidação do acetaldeído estava bloqueada pelo DSF, o que indica que o ácido acético deve ser proveniente de transbordamento mitocondrial.
- Os crescimentos de GDB 248 e JP1 com glicerol e galactose como fonte de carbono, além da utilização do DSF, forneceram mais subsídios desse processo de exportação de acetato mitocondrial em *D. bruxellensis*, devido ao fenótipo contrastante com *S. cerevisiae*.

REFERÊNCIAS

- 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. **Appl Microbiol Biotechnol.** 66:641–647. 2005.
- AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. **Science** 221, 1256–1263. 1983.
- AUST O, SIES H, STAHL W, POLIDORI MC. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. **J Chromatogr** ; 2001.
- AYER, A; TAN, S.X; GRANT, C.M; MEYER, A.J; DAWES, I.W; PERRONE, G.G. The critical role of glutathione in maintenance of the mitochondrial genome, Free Radic. **Biol. Med.** 49 1956–1968. 2010.
- ARAÚJO, P.R.L; BASÍLIO, A.C.M; SIMÕES, D.A; MORAIS JR, M.A; MORAIS, J.O.F. Informação sobre algumas leveduras contaminantes da fermentação alcoólica industrial isoladas no nordeste de Brasil. In: XV Simpósio de Nacional de Bioprocessos, 15, **Recife, Anais...**, Recife, 2005.
- ARNEBORG, N; JESPERSEN, L; JAKOBSEN, M. Individual cells of Saccharomyces cerevisiae and Zygosaccharomyces bailii exhibit different short-term intracellular pH responses to acetic acid. **Arch Microbiol.** 174(1–2):125–128. 2000.
- AVERY, A.M; AVERY, S.V. Saccharomyces cerevisiae expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. **J. Biol. Chem.** 276 (2001) 33730–33735. 2001.
- AVERY, A.M; WILLETTS, S.A; AVERY, S.V. Genetic dissection of the phospholipids hydroperoxidase activity of yeast Gpx3 reveals its functional importance, **J. Biol. Chem.** 279 (2004) 46652–46658. 2004.
- AVERY, S.V. Molecular targets of oxidative stress. **J Biol Chem** 434: 201-210. 2011.
- BARJA, G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites production in states 4 and 3, organ specificity and relation to aging and longevity. **Bioenerg. Biomembr.** 31347–366. 1999.
- BASILIO, A.C.M; ARAUJO, P.R.L; MORAIS, J.O.F; SILVA-FILHO, E.A; MORAIS, M.A. JR; SIMOES, D.A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Curr Microbiol.** 56:322–326. 2008.
- BALLESTEROS, I., OLIVA, J.M., BALLESTEROS, M. AND CARRASCO, J. Optimization of the simultaneous saccharification and fermentation process using thermotolerant yeasts. **Applied Biochemistry Biotechnology.** 30/40, 201-211. 1993.
- BANAT, I.M; NIGAM, P; SINGH, D; MARCHANT, R; MCHALE, A.P. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I: Yeasts in general. **World Journal Microbiology Biotechnology.** 13, 809-821. 1998.

- BAKKER, BM; OVERKAMP, K.M; VAN MARIS, A.J.A; KÖTTER, P; LUTTIK, M.A.H; VAN DIJKEN, J.P; PRONK, J.T. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.** 25 (2001) 15–17. 2001.
- BARNETT, J.A. A history of research on yeasts. 1: Work by chemists and biologists 1789-1850. **Yeast** 14(16), 1439-1451. 1998
- BARNETT, J.A. (2000). A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. **Yeast** 16(8), 755-771. 2000.
- BERNARDES, W. Infográfico: Brasil é maior exportador de etanol do mundo. *Jornal cana*.2014. Disponível em <http://www.jornalcana.com.br/infografico-brasil-e-maior-exportador-de-etanol-mundo/>. Acessado em 21 de junho de 2015.
- BECKNER,M; IVEY, M.L; PHISTER,T.G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in Applied Microbiology*. ISSN 0266-8254. 2011.
- BISWAS, S; CHIDA, A.S; RAHMAN, I. Redox modifications of protein thiols: emerging roles in cell signalling. **Biochem. Pharmacol.** 7 551–564. 2006.
- BORNEMAN, A.R; ZEPPEL, R; CHAMBERS, P.J; CURTIN, C.D. Insights into the *Dekkera bruxelensis* genomic landscape: comparative genomics reveals variations in ploidy and nutrient utilisation potential amongst wine isolates. **PLoS Genet** 10: e1004161. 2014.
- BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: E. Blücher, v. 3, 2001.
- BURKITT MJ, BISHOP HS, MILNE L, TSANG SY, PROVAN GJ, NOBEL CSI, et al. Dithiocarbamate toxicity toward thymocytes involves their copper-catalyzed conversion to thiuram disulfides, which oxidize glutathione in redox cycle without the release of reactive oxygen species . **Arch. Biochem Biophys**; 353(1):73-84.1998.
- BOUMA, M.J; SNOWDON, D; FAIRLAMB, A.H; ACKERS, J.P. Activity of disulfiram(bis(diethylthiocarbamoyl)disulphide)and ditiocarb (diethyldithiocarbamate) against metronidazole-sensitive and -resistant *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **J Antimicrob Chemother**.42 (6):817–20. 1998.
- BUSTI, S; COCCETTI, P; ALBERGHINA,L; MARCO VANONI. Glucose Signaling – Mediated Coordination of Cell Growth and Cell Cycle in *Saccharomyces Cerevisiae*. **Sensors**, 10(6), 6195-6240; doi: 10.3390/s100606195. 2010.
- BURKITT, M.J; BISHOP, H.S; MILNE, L; TSANG, S.Y; PROVAN, G.J; NOBEL, C.S.I et al. Dithiocarbamate toxicity toward thymocytes involves their copper-catalyzed conversion to thiuram disulfides, which oxidize glutathione in a redox cycle without the release of reactive oxygen species. **Arch Biochem Biophys**. 353(1):73–84. 1998.
- BUU, L.M; CHEN, Y.C; LEE, F.J.S. Functional characterization and localization of acetyl-CoA hydrolase, Ach1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. **J BiolChem**. 278:17203–9. 2003.

- BIANCHI, M.M; TIZZANI, L; DESTUELLE, M; FRONTALI, L; WESOŁOWSKI- LOUVEL, M. The 'petite-negative' yeast *Kluyveromyces lactis* has a single gene expressing pyruvate decarboxylase activity. **Mol. Microbiol.** 19, 27-36.1996.
- BRIHELIUS-FLOHE, R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. **Biol. Chem.** 387 (2006) 1329–1335. 2006.
- BROSNAN, M.P., DONNELLY, D., JAMES, T.C. AND BOND, U. The stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. **Journal of Applied Microbiology.** 88, 746-755. 2000.
- BLOMQVIST, J.; EBERHARD, T.; SCHNÜRER, J.; PASSOTH, V. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1487-1497, 2010.
- BLOMQVIST, J. *Dekkera bruxellensis* - a competitive yeast for ethanol production from conventional and non-conventional substrates. Uppsala: **Swedish University of Agricultural Sciences**, 59p. 2011.
- BLOMQVIST, J; NOGUE, V.S; GORWA-GRAUSLUND, M; PASSOTH, V. Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic conditions. **Yeast.** 29:265–274. 2012.
- BLOM, J; TEIXEIRA DE MATTOS,M.J; GRIVELL,L.A. Redirection of the respiro-fermentative flux distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the transcription factor Hap4p. **Appl Environ Microbiol.** 66:1970–1973. 2000.
- BRENNAN, R. J. SCHIESTL, R. H. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. **Mutation Res. (Fund. Mol. Mech. Mutagen)** 356 .171–178. 1996.
- BRENDEL M, MARISCO G, GANDA I, WOLTER R, PUNGARTNIK C. DNA repair mutant *pso2* of *Saccharomyces cerevisiae* is sensitive to intracellular acetaldehyde accumulated by disulfiram-mediated inhibition of acetaldehyde dehydrogenase.**Genet Mol Res.** :48–57. 2010.
- CAPUSONI, C; ARIOLI, S ZAMBELL,P; MOKTADUZZAMAN, MD MORA,D; COMPAGNO, C. Effects of oxygen availability on acetic acid tolerance and intracellular pH in *Dekkera bruxellensis*. **Appl. Environ. Microbiol.** doi:10.1128/AEM.00515-16. 2016.
- CASTRO,C; ESCUDERO,B.I; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, J; HAYWARD-JONES, P.M; AGUILAR-USCANGA,M.G. Effect of Physical Factors on Acetic Acid Production in *Brettanomyces* Strain. **Journal of Food Process Engineering.** Vol. 28, n. 2, 2005, pp. 133-143. doi:10.1111/j.1745-4530.2005.00393.x . 2005.
- CARRASCOSA, J; VIGUERA, M. D; NÚÑEZ DE CASTRO, I; SCHEFFERS, W. Metabolism of acetaldehyde and custers effect in the yeast. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 47, n. 3, p. 209-215, 1981.
- CASPETA, L., BUIJS, N.A.A. & NIELSEN, J. The role of biofuels in the future energy supply. **Energy & Environmental Science** 6(4), 1077-1082. 2013.

- CEN, D; GONZALEZ, RI; BUCKMEIER, JÁ; KAHN, RS; TOHIDIAN, NB; MEYSKENS, FL. Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: a redox-related process. **Mol Cancer Ther**;1(3):197–204. 2002.
- CERNICKA J, KOZOVSKA Z, HNATOVA M, VALACHOVIC M, HAPALA I, RIEDL Z, et al. Chemosensitisation of drug-resistant and drug-sensitive yeast cells to antifungals. **Int J Antimicrob Agents**;29:170–8. 2007.
- CHEN, Y; ZHANG, Y; SIEWERS, V; NIELSEN, J. Ach1 is involved in shuttling mitochondrial acetyl units for cytosolic C2 provision in *Saccharomyces cerevisiae* lacking pyruvate decarboxylase. **FEMS Yeast Res**. 15(3). 2015. doi:10.1093/femsyr/fov015.
- CONTERNO, L.; JOSEPH, C.; ARVIK, T. J.; HENICK-KLING, T.; BISSON, L. F. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **American journal of enology and viticulture**, v. 57, n. 2, p. 139, 2006.
- COTGREAVE, I.A; GERDES, R.G. Recent trends in glutathione biochemistry—glutathione–protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 2421–9. 1998.
- CULAKOVA, H; DZUGASOVAB, V; GBELSKAA,Y; SUBIK, J. Antibacterial activity of CTBT (7-chlorotetrazolo[5,1-c]benzo[1,2,4]triazine) generating reactive oxygen species. **Microbiological Research** 168147– 152. 2013.
- CHEN SH, LIU SH, LIANG YC, LIN JK, LIN-SHIAU SY. Oxidative stress and c-Jun-amino-terminal kinase activation involved in apoptosis of primary astrocytes induced by disulfiram- Cu²⁺ complex. **Eur J Pharmacol**;414(2–3):177–88. 2001.
- CHENG, J.J. & TIMILSINA, G.R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. **Renewable Energy** 36(12), 3541-3549. 2011.
- CHEN, S.H; LIU, S.H; LIANG, Y.C; LIN, J.K; LIN-SHIAU, S.Y. Oxidative stress and c-Jun-amino-terminal kinase activation involved in apoptosis of primary astrocytes induced by disulfiramCu²⁺ complex. **Eur J Pharmacol**. 414(2–3):177–88. 2001.
- CHIRANAND W, MCLEOD I, ZHOU H, LYNN JJ, VEGA LA, MYERS H, YATES JR, III, LORENZ MC, GUSTIN MC. CTA4 transcription factor mediates induction of nitrosative stress response in *Candida albicans*. **Eukaryot. Cell** 7:268 –278. 2008.
- CLAUSSEN, N.H. On a method for the application of Hansen's pure yeast system in the manufacturing of well-conditioned English stock beers. **Journal of the Institute of Brewing** 10. 1904.
- COWMAN RA, BARON SS, FITZGERALD RJ. 1983. Cysteine toxicity for oral streptococci and effect of branched-chain amino acids. **Infect. Immun**. 39:1107–1113.

- CURTIN, C.D; BORNEMAN, A.R; CHAMBERS, P.J; PRETORIUS, I.S. De-novo assembly and analysis of the heterozygous triploid genome of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* AWRI1499. **PLoS ONE** 7: e33840. 2012.
- CULAKOVA H, DZUGASOVA V, GBELSKA Y, SUBIK J. CTBT (7-chlorotetrazolo[5,1-c]benzo[1,2,4]triazine) producing ROS affects growth and viability of filamentous fungi. **FEMS Microbiol Lett**;328:138–43. 2013.
- CHESNEY, J.A; EATON, J.W; MAHONEY, J.R JR. Bacterial glutathione: a sacrificial defense against chlorine compounds. **J. Bacteriol.** 178:2131–35. 1996.
- DAVIDSON, J.F; SCHIESTL, R.H. Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** 21 (2001) 8483–8489. 2001.
- DAENEN, L; SAISON, D; STERCKX, F; DELVAUX, F.R; VERACHTERT, H; DERDELINCKX, G. Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. The Society for Applied Microbiology, **Journal of Applied Microbiology** 104 478–488. 2008.
- DE BARROS PITA, W; TIUKOVA, I; LEITE, F.C.B; PASSOTH, V; SIMÕES, D.A; MORAIS JR, M.A. The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. **Yeast**.30: 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** (Gedrukt). , v.100, p.99 – 107, 2011.
- DELAUNAY, A; PFLIEGER, D; BARRAULT, M.B; VINH, J; TOLEDANO, M.B.A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation **Cell** 111 (2002) 471–481. 2002.
- DEMASI, M.; SHRINGARPURE, R.; DAVIES, K. J. Glutathiolation of the proteasome proteolytic inhibitors. **Arch Biochem Biophys.**, v. 389, p. 254-263, 2001.
- DEMASI, M.; SILVA, G. M.; NETTO, L. E. 20 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated. **J Biol Chem.**, v. 278, p. 679-685, 2003.
- DE SOUZA LIBERAL, A.T; BASÍLIO, A.C.M; BRASILEIRO, BTRV; SILVA FILHO, E.A; SIMOES, D.A; MORAIS JUNIOR, M.A. Identification of the yeast *Dekkera bruxellensis* as major contaminant in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology.** , v.102, p.538 – 547, 2007.
- DE SOUZA LIBERAL, A.T; CARAZZOLLE, M.F; PEREIRA, G.A; SIMÕES, D.A; MORAIS JR, M.A. The yeast *Dekkera bruxellensis* genome contains two orthologs of the ARO10 gene encoding for phenylpyruvate decarboxylase. **World J Microbiol Biotechnol** 28: 2473–2478. 2012.
- DE SOUZA BARROS, R; DOS SANTOS, B.M; DE SOUZA, R.F.R; DA SILVA P.Q.N; LUCENA, B.L; MARCOS MORAIS, M.A .JR. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. **J Ind Microbiol Biotechnol.** 39(11):1645–1650.doi:10.1007/s10295-012-1167-0. 2012.

DE SOUZA, R.B; MENEZES, J.A; SOUZA, R.F.R; DUTRA, E.D; MORAIS JR, M.A. Mineral Composition of the Sugarcane Juice and Its Influence on the Ethanol Fermentation. **Appl Biochem Biotechnol** 175:209–222 DOI 10.1007/s12010-014-1258-7. September 2014.

DIDERICH, J. A; RAAMSDONK,L.M; KUIPER,A; KRUCKEBERG,A.L;TEIXEIRA DE MATOS,M.J; VAN DAM,K. Effects of a hexokinase II deletion on the dynamics of glycolysis in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Fems Yeast Res.** 2:165–172. 2002.

DRAKULIC, T; TEMPLE, M.D; GUIDO, R; JAROLIM, S; BREITENBACH, M; P ATTFIELD, P.V; DAWES, I.W. Involvement of oxidative stress response genes in redox homeostasis, the level of reactive oxygen species, and ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.** 5 (2005) 1215–1228. 2005.

ESCOBEDO, G.G; ORTA-ZAVALZA, E; CASTANˆO, I; DE LAS PENˆAS, A. Role of glutathione in the oxidative stress response in the fungal pathogen *Candida glabrata*. *Curr Genet* 59:91–106. 2013.
ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 469- 486, Oct. 2000.

EVANS, P; HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br. J. Nutr.* 85 (Suppl 2) (2001) S67–S74. 2001.

FARABEE, M; KIMBALL, J; JOHNSON, A.D. Alcoholic fermentation. *biobook* 19 of september,15:41:45 edt. 2014.

FAHEY, R.C. Novel thiols of prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 533–556. 2001.

FLORES, C.L.; RODRIGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy yielding metabolism in non conventional yeasts. **FEMS Microbiol. Rev.** 24, 507-529. 2000.

FORSBURG, S.L. The art and design of genetic screens: yeast, **Nature Rev. Genet.** 2659–668. 2001.

FILIPITS, M; SIMON, M.M; RAPATZ, W; HAMILTON, B; RUIS, H. A *Saccharomyces cerevisiae* upstream activating sequence mediates induction of peroxisome proliferation by fatty acids. **Gene** 49–55. 1993.

FINK, A. L., CALCIANO, L. J., GOTO, Y., KUROTSU, T., PALLEROS, D. R. **Yeasts.** *Biochemistry* 33, 12504–12511. 1994.

FLIKWEERT MT, DE SWAAF M, VAN DIJKEN JP, PRONK JT. Growth requirements of pyruvate-decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Lett** 174(1):73–79. 1999.

FONSECA, G.G; GOMBERT, A.K; HEINZLE, E;WITTMANN, C. Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. **Fems Yeast Res.**7:422–435.2007.

FUGELSANG, K.C. **Wine Microbiology**. ChapmanHall:NewYork. 1996.

FLECK, C.B; BROCK, M. Re-characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* Ach1p: fungal CoA-transferases are involved in acetic acid detoxification. **Fungal Genet Biol.** 46:473–85. 2009.

GAMO, F.J; LAFUENTE, M.J; GANCEDO, C . The mutation DGT1-1 decreases glucose transport and alleviates carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol.** 176(24):7423–7429. 1994.

GALAFASSI S, MERICO A, PIZZA F, HELLBORG L, MOLINARI F, PISKUR J, COMPAGNO C . Dekkera/Brettanomyces yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygenlimited and low-pH conditions. **J Ind Microbiol Biotechnol** 38:1079–1088. 2010.

GALAFASSI, S; CAPUSONI, C; MOKTADUZZAMAN, M; COMPAGNO, C. Utilization of nitrate abolishes the 'Custers effect' in Dekkera bruxellensis and determines a different pattern of fermentation products. **J Ind Microbiol Biotechnol** 40(3–4): 297–303. 2013.

GALAFASSI, S; TOSCANO, M; VIGENTINI, I; PISKUR, J; COMPAGNO, C. Osmotic stress response in the wine yeast Dekkera bruxellensis. **Food Microbiol.** 36:316–319. 2013.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 2. p. 334-361, June 1998.

GERO'S, H; AZEVEDO, M.M; CASSIO, F. Biochemical studies on the production of acetic acid by the yeast Dekkera anomala. **Food Technol Biotechnol.** 38:59–62. 2000.

GIBSON, B.R; LAWRENCE, S.J LECLAIRE, J.P.R; POWELL, C.D; SMART, K.A. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiol Rev** 31535–569. 2007.

GNANSOUNOU, E. Production and use of lignocellulosic bioethanol in Europe: Current situation and perspectives. **Bioresource Technology** 101(13), 4842-4850. 2010.

GUO, J; LEMIRE, B.D. The ubiquinone-binding site of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate–ubiquinone oxidoreductase is a source of superoxide, **J. Biol. Chem.** 278 (2003) 47629–47635. 2003.

GREENBERG, J.T; DEMPLE, B. Glutathione in *Escherichia coli* is dispensible for resistance to H₂O₂ and gamma radiation. **J. Bacteriol.** 168:1026–29. 1986.

GRANT, C.M; MACIVER, F.H; DAWES, I.W. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.** 29:511–15. 1996.

GRANT, C.M; DAWES, I.W. Synthesis and role of glutathione in protection against oxidative stress in yeast. **Redox Rep.** 2:223– 29. 1996.

GROSICKA-MACIAG, E; KURPIOS-PIEC, D; GRZELA, T; CZECZOT, H; SKRZYCKI, M; SZUMILO, M et al. Protective effect of N-acetyl-L-cysteine against disulfiram-induced oxidative stress and apoptosis in V79 cells. **Toxicol Appl Pharmacol**. 248(3):210–6.2010.

HALASI, M; WANG, M; CHAVAN, T.S; GAPONENKO, V; HAY, N; GARTEL, A.L. ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome Inhibitors. **Biochem. J.** 454, 201–208 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20130282. 2013.

HANCOCK, R.D; GALPIN, J.R; VIOLA, R. Biosynthesis of L-ascorbic acid (vitamin C) by *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.** 186 (2000) 245–250. 2000.

HYNES, M.J; MURRAY, S.L. ATP-citrate lyase is required for production of cytosolic acetyl coenzyme A and development in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryot Cell**. 9:1039–48. 2010.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free radical, other reactive species and disease. *In: Free radicals in biology and medicine*. 3rd Oxford: **Clarenton Press**. p.617-783. 1999.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.MC. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4th ed. Oxford University Press, 2007.

HATEM, E; BERTHONAUD, V; DARDALHON, M; LAGNIEL. G; BAUDOUIN-CORNU, P; HUANG, M; LABARRE, J; CHÉDIN, S. Glutathione is essential to preserve nuclear function and cell survival under oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine** 67 103–114. 2014.

HATEM, E; LAGNIELA, G; JEAN-JACQUES , H; LABARRE, J; KURAS, L; CHÉDIN, S. Characterization of the oxidative stress response in yeast cells protected by gamma-glutamylcysteine instead of glutathione. *Journal of International Society of Antioxidants in Nutrition & Health* Journal of ISANH Volume 3: **Special Issue for Paris Redox** 2016

HENSING, M.C; VROUWENVELDER, H; HELLINGA, C; BAARTMANS, R; VAN DIJKEN, J.P. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. **Appl Microbiol Biotechnol**. 42: 516–521. 1994.

HELLBORG, L; PISKUR, J. Complex nature of the genome in a wine-spoilage yeast, *Dekkera bruxelensis*. **Eukaryot Cell** 8: 1739–1749. 2009.

HERRERO , E; ROS, J; BELLÍ, G; CABISCOL, E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta** 1780:1217–1235. 2008.

HENNICKE, F; GRUMBT, M; LERMANN, U; UEBERSCHAAR, N; PALIGE, K; BÖTTCHER, B; JACOBSEN, I.D; STAIB, C; MORSCHHÄUSER, J; MONOD, M; HUBE, B; HERTWECK, C; STAIB, P. Factors Supporting Cysteine Tolerance and Sulfite Production in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell** p. 604–613. Volume 12 Number 4. April 2013.

HILTUNEN, J.K; MURSULA, A.M; ROTTENSTEINER, H; WIERENGA, R.K; KASTANIOTIS, A.J; GURVITZ, A. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.** 27:35–64. 2003.

HULIN, M; HARRISON, E; STRATFORD, M; WHEALS, A.E. Rapid identification of the genus *Dekkera/Brettanomyces*, the *Dekkera* subgroup and all individual species. *International Journal of Food Microbiology* .2014.

INOUE, Y; MATSUDA, T; SUGIYAMA, K.I; IZAWA, S; KIMURA, A. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 27002–27009. 1999.

IZAWA, S; INOUE, Y; KIMURA, A. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasemic *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biochem.* 320 (1996) 61–67. 1996.

JAMIESON, D. J. Oxidative Stress Responses of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511–1527. 1998.

JEKATERINA, M; AGNESE, K; JURIS, K; JANIS, L; RITA, S; ARMANDS, V. Effects of acetate on *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422 growth and metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol*.doi 10.1007/s00253-016-7392-0. 2016.

KIM, J.K; PARK, J; RYU, T.H; NILI, M. Effect of N-acetyl-L-cysteine on *Saccharomyces cerevisiae* irradiated with gamma-rays. *Chemosphere* 92. 512–516. 2013.

KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. & BOEKHOUT, T. The yeasts, a taxonomic study. 5.ed: **Elsevier**; 1). ISBN 978-0-444-52149. 2011.

KOERKAMP MG, REP M, BUSSEMAKER HJ, HARDY GPMA, MUL A, PIEKARSKA K, SZIGYARTO CA, TEIXEIRA DE MATTOS JM, TABAK HF. Dissection of transient oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae* by using DNA microarrays. *Mol Biol Cell* 13:2783–2794. 2002
KISTLER, M; MAIER, K; ECKARDT-SCHUPP, F. Genetic and biochemical analysis of glutathione-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutagenesis*. 5:39– 44. 1990.

KOHLHAW, G.B; TAN-WILSON, A. Carnitine-acetyltransferase: candidate for the transfer of acetyl groups through the mitochondrial membrane of yeast. *J. Bacteriol.*129, 1159–1161.1977.

KOYNOV, A; TRYGGVASON, G; KHINAST, J.G. Characterization of the localized hydrodynamic shear forces and dissolved oxygen distribution in sparged bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* 97(2):317–331.2007.

KHAN, S; SINGHAL, S; MATHUR, T; UPADHYAY, D.J; RATTAN, A. Antifungal potential of disulfiram. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 48(3):109–13. 2007.

KUMAR, D.P; TIWARI, A; BHAT, R. Effect of pH on the Stability and Structure of Yeast Hexokinase A. *the journal of biological chemistry* Vol. 279, No. 31, Issue of July 30, pp. 32093–32099 2004.

KWOLEK-MIREK, M; ZADRAG-TECZA, R; BARTOSZ, G. Ascorbate and thiol antioxidants abolish sensitivity of yeast *Saccharomyces cerevisiae* to disulfiram. **Cell Biol Toxicol** 28:1–9. 2012.

KRIVORUCHKO, A; ZHANG, Y; SIEWERS, V et al. Microbial acetylCoA metabolism and metabolic engineering. **Metab Eng.**28C:28–42. 2014.

KRZEPILKO, A; SWIECILO, A; WAWRYN, J; ZADRAG, R; KOZIOL S; BARTOSZ, G; BILINSKI, T. Ascorbate restores lifespan of superoxide–dismutase deficient yeast, **Free Radic. Res.** 38 (2004) 1019–1024. 2004.

LAFUENTE, M.J; GANCEDO, C; JAUNIAUX, J.C; GANCEDO, J.M. Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol.** 35(1):161–172. 2000.

LEITE, F.C.B; BASSO, T.O; PITA, W.B; GOMBERT, A; SIMOES, D; MORAIS JUNIOR, M.A. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. **FEMS Yeast Res.** 13:34–43.2013.

LEMA, C; GARCIA-JARES, C; ORRIOLS, I; ANGULO, L. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. **Am J Enol Viticult.** 47:206–216. 1996.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de etanol. **Biotecnologia Industrial**, São Paulo: Edgard Blücher LTDA, cap. 1, p. 11- 20. 2001.

MANAVATHU, M., GUNASEKARAN, S., PORTE, Q., MANAVATHU, E. AND GUNASEKARAN, M. Changes in glutathione metabolic enzymes during yeast to mycelium conversion of *Candida albicans*. **Can. J. Microbiol.** 42, 76–79. 1996.

MARRES, C.A.M; DE VRIES, S; GRIVELL, L.A. Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH:ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.** 195:857–862. 1991

MORADAS-FERREIRA, P; P; COSTA, V; PIPER, P; MAGER, W. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. **Mol. Microbiol.** 19 (1996) 651–658. 1996.

MARIANI, D . Citotoxicidade e função do sistema de defesa antioxidante durante a exposição a cisplatina no modelo *Saccharomyces cerevisiae*. **Dissertação de Mestrado** submetida ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica, UFRJ, Rio de Janeiro. 2008

MARIKOVSKY M; ZIV V; NEVO N; HARRIS-CERRUTI C; MAHLER O. Cu/ Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. **J Immunol**;170(6):2993–3001. 2003.

MATSUFUJI Y1, YAMAMOTO K, YAMAUCHI K, MITSUNAGA T, HAYAKAWA T, NA GAWA T. Novel physiological roles for glutathione in sequestering acetaldehyde to confer acetaldehyde tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2013 Jan;97(1):297-303. doi: 10.1007/s00253-012-4147-4. Epub 2012 May 22. 2013.

MEILGAARD, M.C. Flavor chemistry of beer: part I: flavor interaction between principal volatiles. **MBAA. Technol Q** 12:107–117. 1975^a.

MCGOVERN, P.E., ZHANG, J., TANG, J., ZHANG, Z., HALL, G.R., MOREAU, R.A., NUNEZ, A., BUTRYM, E.D., RICHARDS, M.P., WANG, C.S., CHENG, G., ZHAO, Z. & WANG, C. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. **Proceedings of the National Academy of Sciences** of the United States of America 101(51), 17593-1759. 2004.

MEISTER, A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency, **Biochem. Biophys. Acta** 1271 35–42. 1995.

MEDINA, K; EDUARDO BOIDO, E; FARIÑA, L; DELLACASSA, E; CARRAU, F. Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* strains cofermentation increase acetaldehyde accumulation: effect on anthocyanin-derived pigments in Tannat red Wines. **Yeast** 2016.

MENEGHIN, M.C; BASSI, A.P.G; CODATO, C.B; REIS, V.R; CECCATO-ANTONINI, S. R. Fermentative and growth performances of *Dekkera bruxellensis* in different batch systems and the effect of initial low cell counts in co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. Special Issue on ICY 2012: **Yeasts** for a sustainable future. 2013.

MILKOWSKI, C.; KRAMPE, S.; WEIRICH, J.; HASSE, V.; BREUNIG, K.D. Feedback Regulation of Glucose Transporter Gene Transcription in *Kluyveromyces lactis* by Glucose Uptake. **J.Bacteriol**. 183: 5223-5229. 2001.

MONJE-CASAS F, MICHÁN C, PUEYO C. Absolute transcript levels of thioredoxin- and glutathione-dependent redox systems in *Saccharomyces cerevisiae*: response to stress and modulation of growth. **Biochem J** 383:139–147. 2004.

MOYE-ROWLEY WS. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. **Eukaryot Cell** 2:381–389. 2003.

MONTERO M. Los radicales libres y las defensas antioxidantes: revisión. **Ann Fac Med**; 57(4):278-81. 1996.

MONTEIRO, M; HORTA, B.B; PIMENTA, D.C; AUGUSTO, O; NETTO, L.E. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 4886–4891. 2007.

MOKTADUZZAMAN, M; GALAFASSI, S; VIGENTINI, I; FOSCHINO, R; CORTE, L; CARDINALI, G; PIŠKUR, COMPAGNO, C. Strain-dependent tolerance to acetic acid in *Dekkera bruxellensis*.488 **Ann Microbiol.** doi: 10.1007/s13213-015-1115-0. 2015.

MOKTADUZZAMAN, MD; GALAFASSI, S; CAPUSONI, C; VIGENTINI, I; LING, Z; PIŠKUR, J; COMPAGNO, C. Galactose utilization sheds new light on sugar metabolism in the sequenced strain *Dekkera bruxellensis* CBS 2499. **FEMS Yeast Research**, Vol. 15, No. 2. 2015.

NAMAZI, M.R. Potential utility of disulfiram against leishmaniasis. **Indian J Med Res.**127(2):193–4. 2008.

NASH, T; RICE, W.G. Efficacies of zinc-finger-active drugs against *Giardia lamblia*. **Antimicrob Agents Chemother.**42 (6):1488–92.1998.

NAVRÁTILOVÁ, J; JUNGOVÁ, P; VANHARA, P; PREISLER, J; KANICKY, V; SMARDA, J. Copper ions regulate cytotoxicity of disulfiram to myeloid leukemia cells. **Int J Mol Med.**24 (5):661–70. 2009.

NEIMS AH, COFFEY DS AND HELLERMAN L, A. Sensitive radioassay for sulfhydryl groups with tetraethylthiuram disulfide. **J Biol Chem** 241: 3036-2040, 1966.

NEAL, R., MATTHEWS, R.H., LUTZ, P., ERCAL, N. Antioxidant role of N-acetyl cysteine isomers following high dose irradiation. Free Radic. **Biol. Med.** 34, 689–695. 2003.

NETO, A.G.B; PESTANA-CALSAA, M.C; DE MORAIS JR, M.A; CALSA JR, T. Proteome responses to nitrate in bioethanol production contaminant *Dekkera bruxellensis*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.014> 1874-3919/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved. 2014.

NIELSEN, J. Synthetic biology for engineering acetyl coenzyme A metabolism in yeast. **MBio.**5:e02153. 2014.

NOHL, H; KOZLOV, A.V; GILLE, L; STANIEK, K. Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts, **Biochem. Soc. Trans.** 31 1308–131. 2003.

ORTIZ-MUÑIZ, B; CARVAJAL-ZARRABAL, O; TORRESTIANA- SÁNCHEZ, B; AGUILAR-USCANGA, M.G. Kinetic Study on ethanol Production Using *Saccharomyces cerevisiae* ITV- 01 Yeast Isolated from Sugar Cane Molasses. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology.**Vol. 85, n. 10, 2010, pp. 1361-1367. doi:10.1002/jctb.2441. 2010.

OELOFSE, A., PRETORIUS, I.S., DU TOIT, M. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera*

during winemaking: a synoptic review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 29, 128–144. 2008.

ODD, B; FLORES, C.L; GANCEDO, C; ZHANG, X; TRUEHEART, J; DARAN, J.M et al. An internal deletion in MTH1 enables growth on glucose of pyruvate decarboxylase negative, non-fermentative *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb Cell Fact.** 11(1):131. doi:10.1186/1475-2859-11-131. 2012.

OHARA, E. Caracterização da tolerância ao estresse oxidativo, capacidade de remoção de proteínas oxidadas e a expectativa de vida de linhagens da levedura *S. cerevisiae* com mutações sítio-específicas na subunidade $\alpha 5$ do proteossomo 20S: Implicações na prevenção de agregação proteica. Dissertação (**Mestrado em Ciências Morfofuncionais**) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2015.

OHTAKE, Y; SATOU, A; YABUUCHI, S. Isolation and characterization of glutathione biosynthesis-deficient mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. **Agric. Biol. Chem.** 54:3145–50. 1990.

OHTAKE, Y; YABUUCHI, S. Molecular cloning of the γ -glutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** 7:953–61. 1991.

PASSOTH, V; BLOMQVIST, J; SCHNURER, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. **Appl Environ Microbiol.** 73:4354–4356. 2007.

PACHECO, T.F. fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente. **Dissertação de mestrado.** 2010.

PARK S, IMLAY JA. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction. **J. Bacteriol.** 185: 1942–1950. 2003.

PEREIRA LF, BASSI APG, AVANSINI SH, NETO AGB, BRASILEIRO BTRV, CECCATO-ANTONINI SR, DE MORAIS JR MA. 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** 101(3):529–539. 2012.

PEREIRA, L.F. Fisiologia da levedura *Dekkera bruxellensis* durante a fermentação com substratos industriais. **Tese de doutorado.** 2013.

PEREIRA, L.F; LUCATTI,E; BASSO,L;C; MORAIS JR,M.A. The fermentation of sugarcane molasses by *Dekkera bruxellensis* and the mobilization of reserve carbohydrates. **Antonie van Leeuwenhoek.** 105:481–489. 2014.

PENNINCKX MJ An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. **FEMS Yeast Res** 2:295–305. 2002.

PEREZ, R.R. Avaliação do papel da glutatona e do vacúolo como mecanismos de defesa contra a toxicidade induzida pelo chumbo na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Dissertação de mestrado.** Instituto superior de engenharia do porto, 2012.

- PISKUR, J., ROZPEDOWSKA, E., POLAKOVA, S., MERICO, A. & COMPAGNO, C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends in Genetics** 22(4), 183-186. 2006.
- PIKE, M.G; MAYS, D.C; MACOMBER, D.W; LIPSKY, J.J. Metabolism of a disulfiram metabolite, S-methyl-N,N-diethyldithiocarbamate, by flavin monooxygenase in human renal microsomes. **Drug Metab Dispos.** 29(2):127–32. 2001.
- PIŠKUR, J; LING, Z; MARCET-HOUBEN, M; ISHCHUK, O.P; AERTS, A; LABUTTI, K; COPELAND, A; LINDQUIST, E; BARRY, K; COMPAGNO, C; BISSON, L; GRIGORIEV, I.V; GABALDÓN, T; PHISTER, T. The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. **Int. J. Food Microbiol.** 157, 202–209. 2012.
- PRETORIUS, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast** 16(8): 675–729. 2000.
- PROCHÁZKA, 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.
- PRONK JT, YDE STEENSMA H, VAN DIJKEN JP. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** 12:1607–1633. 1996.
- RASPOR, P; PLESNICAR, S; GAZDAG, Z; PESTI, M; MIKLAVCIC, M; LAH, B; LOGAR-MARINSEK, R; POLJSAK, B. Prevention of intracellular oxidation in yeast: the role of vitamin E analogue, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylkroman- 2-carboxyl acid). **Cell Biol. Int.** 29 (2005) 57–63. 2005.
- RAFTOS, J.E., WHILLIER, S., CHAPMAN, B.E., KUCHEL, P.W. Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** 39, 1698–1706. 2007.
- RATLEDGE, C; EVANS, C.T. Lipids and their metabolism. In: *The Yeasts*, 2nd edn. Vol. 3 (ROSE, A.H. AND HARRISON, J.S. Eds.), pp. 367^455. **Academic Press**, New York.1989.
- RAHA, S; ROBINSON, B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and Ageing. **Trends Biochem. Sci.** 25 (2000) 502–508. 2000.
- REIS, A.L.S; SOUZA, R.F.R; TORRES, R.R.N.B; LEITE, F.C.B; PAIVA, P.M.G; VIDAL, E.E; MORAIS JR, M.A. Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain. **Springer Plus** 3:38. 2014.
- REMIZE,F;ANDRIEU, E; DEQUIN, S. Engineering of the Pyruvate Dehydrogenase Bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: Role of the Cytosolic Mg21 and Mitochondrial K1 Acetaldehyde Dehydrogenases Ald6p and Ald4p in Acetate Formation during Alcoholic Fermentation. **Applied and environmental microbiology**, 0099-2240/00/\$04.0010 p. 3151–3159. Aug. 2000.

- REIFENBERGER, E; BOLES, E; CIRIACY, M. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **Eur J Biochem.** 245(2):324–333.1997.
- RENOUF,V; FALCOU,M; MIOT-SERTIER, C et al. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. **J Appl Microbiol**100: 1208 –1219. 2006.
- RIBEIRO, SMR; QUEIROZ, J.H; PELUZO, M.C.G; COSTA, N.M.B; MATTA, S.L.P; QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci.J.** V.21, N.3. P.133-149. Dec. 2005.
- ROZPEDOWSKA, E; HELLBORG, L; ISHCHUK, O.P; ORHAN, F; GALAFASSI, S; MERICO, A; WOOLFIT, M; COMPAGNO, C; PISKUR, J. Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. **Nat Commun.** 2:302. 2011.
- SAUNA, Z.E; SHUKLA, S; AMBUDKAR, S.V. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. **Mol BioSyst.** 1(2):127–34. 2005.
- SEEGMILLER. J.E. TPN Linked aldehyde dehydrogenase from yeasts. **Methods in enzymology.** 1955.
- SJODIN, K., NILSSON, E., HALLBERG, A., TUNEK, A. Metabolism of N-acetyl-Lcysteine. Some structural requirements for the deacetylation and consequences for the oral bioavailability. **Biochem. Pharmacol.** 38, 3981–3985. 1989.
- SILVA-FILHO, E.A., SANTOS, S.K.B., RESENDE, A.M., MORAIS, J.O.F., MORAIS M.A., JR. AND SIMÕES, D.A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek** 88, 13–23. (2005a).
- SILVA-FILHO, E.A., MELO, H.F., ANTUNES, D.F., DOS SANTOS, S.K.B., RESENDE, M.A., SIMÕES, D.A., MORAIS, M.A., JR. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **J Ind Microbiol Biotechnol** 32, 481–486. (2005b).
- SOUZA, R.B; SANTOS, B.M; SOUZA, R.F.R; SILVA, P.K.N et al. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. **j ind microbiol biotechnol** doi 10.1007/s10295-012-1167-0. 2012.
- SOLOMON, B.D., BARNES, J.R., HALVORSEN, K.E. Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. *Biomass & Bioenergy* 31(6), 416-425. 2007.SHELTON, M.D.; MIEYAL, J. J. Regulation by reversible S-glutathionylation: molecular targets implicated in inflammatory diseases. **Mol Cells.**, v. 25, n. 3, p. 332-346, 2008.
- STEINNMAN, C.R; JAKOBY, W.B. Yeasts Aldehyde dehydrogenase. **J.Bio. Chem.** 1967.
- SCHEFFERS, W.A; MISSET, O. The custers effect in *Brettanomyces intermedius*. **Proceed.** 1974.

- SHAMI, N.J.I.E; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.** vol.17 no.2 Campinas Apr./June 2004.
- SCHERENS, B; GOFFEAU, A. The uses of genome-wide mutant collections. **Genome Biol.** 5229. 2004.
- SCHIFFERDECKER, A.J; DASHKO, S; P. ISHCHUK, O; PIŠKUR, J. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. **Yeast** 31: 323–332. DOI: 10.1002/yea. 2014.
- SCHEFFERS, W. Simulation of fermentation in yeasts by acetoin and oxygen. **Nature**, v. 210, p. 533-534, 1966.
- SHUKLA S, SAUNA ZE, PRASAD R, AMBUDKAR SV. Disulfiram is a potent modulator of multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans*. **Biochem Biophys Res Commun.** ;322 (2):520–5. 2004.
- SCHULTE, F; WIECZORKE, R; HOLLENBERG, C.P; BOLES, E. The *HTR1* gene is a dominant negative mutant allele of *MTH1* and blocks Snf3-and Rgt2-dependent glucose signaling in yeast. **J Bacteriol.** 182(2):540–542. doi:10.1128/Jb.182.2.540-542.2000.
- STIPANUK MH, DOMINY JE, JR, LEE JI, COLOSO RM. Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism. **J. Nutr.** 136:1652S–1659S. 2006.
- STRATFORD M, STEELS H, NEBE-VON-CARON G, AVERY S V., NOVODVORSKA M, ARCHER DB. Population heterogeneity and dynamics in starter culture and lag phase adaptation of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* to weak acid preservatives. **Int J Food Microbiol** 550 181:40–47. 2014
- STROMME JH. Metabolism of disulfiram and diethyldithiocarbamate in rats with demonstration of an in vivo ethanol-induced inhibition of the glucuronic acid conjugation of the thiol. **Biochem Pharmacol** 14: 393-410, 1965.
- TILMAN, D., SOCOLOW, R., FOLEY, J.A., HILL, J., LARSON, E., LYND, L., PACALA, S., REILLY, J., SEARCHINGER, T., SOMERVILLE, C. & WILLIAMS, R. Energy. Beneficial biofuels--the food, energy, and environment trilemma. **Science** 325(5938), 270-271. 2009.
- TIUKOVA, I.A; DE BARROS PITA, W; SUNDELL. D; MOMENI, M.H; HORN, S.J; STAHLBERG, J; MORAIS JR, M.A; PASSOTH, V. Adaptation of *Dekkera bruxellensis* to lignocellulose-based substrate. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 2014.
- TOLEDANO, M.B; DELAUNAY, A; BITEAU, B; SPECTOR, D; AZEVEDO, D; HOHMANN, S; MAGER, Oxidative Stress Responses in Yeast, Topics in Current Genetics, **Yeast Stress Responses**. vol. 1, Springer-Verlag. pp. 241–303. 2003.
- TOLEDANO MB, KUMAR C, LE MOAN N, SPECTOR D, TACNET F. The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. **FEBS Lett** 581:3598–3607. 2007.

- TORIJA, M.J; ROZÉS, N; POBLET, M; GUILLAMÓN, J.M; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **Rev. Int J. Food Microbiol.**, v.80, p.47-53, 2003.
- TURRENS, Superoxide production by the mitochondrial respiratory Chain. **Biosci. Rep.** 17 (1997) 3–8. 1997.
- THOMAS, D., KLEIN, K., MANAVATHU, E., DIMMOCK, J.R. AND MUTUS, B. (1991) Glutathione levels during thermal induction of the yeast to mycelial transition in *Candida albicans*. **FEMS Microbiol. Lett.** 77, 31^334. 1991.
- USCANGA, M.G.A; DELIA, M.L; STREHAIANO, P. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. **Appl Microbiol Biotechnol.** 61:157–162. 2003.
- VAN ROERMUND, C.W.T; ELGERSMA, Y; SINGH, N et al. The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. **EMBO J.**14:3480–6. 1995.
- VAN ROERMUND, C.W; HETTEMA, E.H; VAN DEN BERG, M et al. Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetylCoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p. **EMBO J.**18:5843–52. 1999.
- VAN MARIS, A.J; GEERTMAN, J.M; VERMEULEN, A; GROOTHUIZEN, M.K; WINKLER, A.A; PIPER, M.D et al. Directed evolution of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*, yielding a C2-independent, glucosetolerant, and pyruvate-hyperproducing yeast. **Appl Environ Microbiol.** 0(1):159–166. 2004.
- VALDES, J; TAPIA, P; CEPEDA, V; VARELA, J; GODOY, L; CUBILLOS, F.A; SILVA, E; MARTINEZ, C; GANGA, M.A. Draft genome sequence and transcriptome analysis of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* LAMAP2480 provides insights into genetic diversity, metabolism and survival. **Federation of European Microbiological Societies**. Published by John Wiley & Sons Ltd. All rights reserved. 2014.
- VAN MARIS AJ, GEERTMAN JM, VERMEULEN A, GROOTHUIZEN MK, WINKLER AA, PIPER MD ET AL. Directed evolution of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*, yielding a C2-independent, glucosetolerant, and pyruvate-hyperproducing yeast. **Appl Environ Microbiol** 70(1):159–166. 2004
- VAN DIJKEN, J.P; SCHEFFERS, W. A redox balance in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v.32, p. 199-224, 1986.
- VAN VLEET JH, JEFFRIES TW. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Curr Opin Biotech**;20: 300–6. 2009.

VEVERKA, K.A; JOHNSON, K.L; MAYS, D.C; LIPSKY, J.J; NAYLOR, S. Inhibition of Aldehyde Dehydrogenase by Disulfiram and Its Metabolite Methyl Diethylthiocarbamoyl-Sulfoxide. **Biochemical Pharmacology**, Vol. 53, pp. 511-518, 1997.

VURALHAN, Z; MORIAS, M.A; TAI, S.L; PIPER M.D.W; PRONK, J.T. Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol** 69:4534–4541. 2003.

TRABULSI, L.R.; ALTESTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu. 760p. 2008.

WANG, F; ZHAI, S; LIU, X; LI, L; WU, S; DOU, Q.P et al. A novel dithiocarbamate analogue with potentially decreased ALDH inhibition has copper-dependent proteasome-inhibitory and apoptosis-inducing activity in human breast cancer cells. **Cancer Lett.**300(1):87–95. 2011.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVESAND, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnol.**, 17, 482-487. 1999.

WIJSMAN, M. R; DIJKEN, J. P; KLEEFF, B. H. A; SCHEFFERS, W. A. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 50, n. 2, p. 183-192, 1984.

WOOLFIT, M; ROZPĘDOWSKA, E; PISKUR, J; WOLFE, K.H. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis*. **Eukaryotic Cell** 6, 721–733. 2007.

WU, A-L; MOYE-ROWLEY, W.S. GSH1, which encodes γ -glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. **Mol. Cell. Biol.** 14:5832–39. 1994.

YAHARA, G. A; JAVIER, M. A; TULIO, M. J. M; JAVIER, G. R; GUADALUPE, A. U. M. Modeling of yeast *Brettanomyces bruxellensis* growth at different acetic acid concentrations under aerobic and anaerobic conditions. **Bioprocess and biosystems engineering**. v. 30, n. 6, p. 389 -395, 2007.

YIMING, Z; GUODONG, L; MARTIN, K. M. E; ANASTASIA, K; BJÖRN, M. H; YUN, C; VERENA, S; JENS, N. Adaptive mutations in sugar metabolism restore growth on glucose in a pyruvate decarboxylase negative yeast strain. **Microb Cell Fact.**2015.

YUN, C; YIMING, Z; VERENA, S; JENS, N. Ach1 is involved in shuttling mitochondrial acetyl units for cytosolic C2 provision in *Saccharomyces cerevisiae* lacking pyruvate decarboxylase. **FEMS Yeast Research**. Vol. 15, n. 3. 2015.

