

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Marcelo Menoncin

PORTO ALEGRE

2016

Marcelo Menoncin

**Expressão dos genes *PMA1*, *HSP30* e *UBI4* em cepas de *Saccharomyces cerevisiae*
durante a fermentação cervejeira**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Diego Bonatto

PORTO ALEGRE 2016

Marcelo Menoncin

Expressão dos genes *PMA1*, *HSP30* e *UBI4* em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação cervejeira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovado em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Dr. Glauco Caon

Ms. Leonardo Sewald

Prof. Dr. Rogério Margis

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao cosmos e à estrela que, ao final de sua vida, explodiu como supernova e semeou o sistema solar com os átomos fundamentais ao surgimento e evolução da vida nesse pálido ponto azul.

Agradeço Diego Bonatto, exemplo raro de profissional, que além do incentivo, proveu todo suporte possível para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço à minha família, em especial Jaqueline Barfknecht, que, mais do que mãe, é referência em todos os aspectos sejam eles profissionais ou pessoais, Camila Menoncin, que durante muito tempo foi minha segunda mãe e Gilberto Luiz Menoncin, pela excelente educação.

Agradeço Diego Drescher de Castro, por ter se tornado meu irmão, e, a partir disso, fazer parte de muito do que sou hoje.

Agradeço à Debora Bordignon, por ser a pessoa mais incrível do mundo, pelo amor e companheirismo há quatro anos.

Agradeço aos amigos Rafael Martell, Vitor Ramos, Juliane Heyde, Carolina Alff e Mariano Shigihara pela amizade, vocês são a maior herança pessoal da faculdade.

Agradeço ao Lucas Grun pelo suporte nesse trabalho, mas acima de tudo, pela amizade. Da mesma forma, agradeço à Valentina Caorsi pelo apoio na escrita do artigo.

Agradeço aos companheiros de pesquisa (Gabriel Stumpf, Gabriel Baldissera, Henrique Chapola, Itamar Nunes, Raquel Calloni, Kendi Nishino, Bruno Feltes, Joice Poloni, Larissa Penna e Beatriz Duarte) pelos aprendizados diários e notável influência.

Agradeço aos companheiros da cervejaria Seasons (Leonardo Sewald, Caroline Bender, Fernanda Forlan, Guilherme Bedin, Leonardo Garbin, Leonardo Ponso, Bruno Farias, Oscar Thomas, João Kolling, Rodrigo Sant'Anna, Moita Mello e Patrícia Lamb) pelos ensinamentos, oportunidades, confiança e companheirismo.

SUMÁRIO

Lista de figuras	6
Lista de figuras suplementares	6
Lista de tabelas	7
Resumo.....	8
<i>Abstract</i>	10
1. Introdução	
1.1 Breve histórico da cerveja e seus componentes	11
1.2 Espécies de leveduras usadas na indústria cervejeira.....	12
1.3 A fermentação cervejeira e a indução de diferentes estresses em leveduras	13
1.4 Mecanismos moleculares associados com estresse térmico em leveduras	15
1.5 Influência da temperatura na fermentação cervejeira	17
2. Objetivos	
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. Procedimentos experimentais.....	20
4. Resultados	25
5. Discussão.....	30
6. Conclusão	36
7. Figuras suplementares	37
8. Referências	39
9. Adendo: Artigo de revisão “Molecular and Biochemical Aspects of <i>Brettanomyces</i> Fermentation Employed in Beer Industry”	42

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS PRINCIPAIS

- Figura 1** – A) Representação esquemática da via glicolítica associada à fermentativa. B) Curva de crescimento típica de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação 14
- Figura 2** – Esquema demonstrando a ação das proteínas Pma1p, Hsp30p e Ubi4p..... 17
- Figura 3** – Gráfico demonstrando os resultados de viabilidade das cepas WLP565 e WLP036 obtidos por meio da coloração por azul de metileno..... 25
- Figura 4** – Gráfico demonstrando os resultados de atenuação aparente obtidos por meio do uso do refratômetro..... 26
- Figura 5** – Gráfico demonstrando os resultados da expressão do gene *PMA1* das cepas WLP565 e WLP036 obtidos por meio da técnica de RT-qPCR..... 27
- Figura 6**- Gráfico demonstrando os resultados da expressão do gene *HSP30* das cepas WLP565 e WLP036 obtidos por meio da técnica de RT-qPCR..... 28
- Figura 7** - Gráfico demonstrando os resultados da expressão do gene *UBI4* das cepas WLP565 e WLP036 obtidos por meio da técnica de RT-qPCR..... 29

FIGURAS SUPLEMENTARES

- Figura complementar 1** – Gel de checagem qualitativa de RNA em eletroforese em gel de agarose típica nesse trabalho.37
- Figura complementar 2** – *Amplification plots* típicos das reações de qPCR's obtidas nesse trabalho.....38
- Figura complementar 3** – *Melting curve* típicos das reações de qPCR's obtidas nesse trabalho38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos oligonucleotídeos usados no trabalho.....	22
Tabela 2 – Parâmetros da reação de síntese de cDNA	23
Tabela 3 – Parâmetros da reação de qPCR.....	24

Resumo

A grande variedade de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, disponíveis para uso nos diferentes estilos de cervejas, é resultado de distintas pressões de seleção artificial as quais as mesmas sofreram com o estabelecimento das escolas cervejeiras e de suas formas particulares em fermentar a cerveja. Embora amplamente utilizadas industrialmente, pouco se conhece sobre como os mecanismos transcritômicos atuam nessas cepas, sobretudo em relação à expressão de genes de estresse nas diferentes temperaturas de fermentação empregadas na indústria cervejeira. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi analisar a expressão dos genes responsivos a estresse *PMA1*, *HSP30* e *UBI4* nas cepas WLP565 (responsável pela fermentação de cervejas do estilo *Saison*) e WLP036 (responsável pela fermentação de cervejas do estilo *Altbier*) em diferentes temperaturas de fermentação em microrreatores de laboratório. Além disso, também foram realizadas análises fenotípicas de viabilidade e atenuação aparente. As cepas WLP036 e WLP565 apresentaram diferentes comportamentos no que diz respeito aos dados de atenuação aparente, viabilidade e expressão dos genes selecionados. Nesse sentido, a cepa WLP565 apresentou uma ampla variação de valores de expressão do gene *PMA1* quando cultivada em sua temperatura ideal de fermentação, contrário ao que ocorreu em 15 °C. Ainda, o gene *HSP30* foi expresso apenas na temperatura de 25 °C, enquanto *UBI4*, embora expresso nas duas temperaturas, apresentou valores maiores de expressão em 25 °C. As análises de viabilidade celular não demonstraram diferenças entre as duas temperaturas para WLP565, enquanto os dados de atenuação aparente evidenciaram que a 25 °C, essa cepa apresentou maior capacidade de atenuação. Os resultados obtidos para WLP036 indicaram que, de modo semelhante a WLP565, os valores de expressão de *PMA1* apresentaram uma amplitude de valores quando fermentada em sua temperatura ideal (15 °C). Da mesma forma, *HSP30* foi expresso apenas em 25 °C, ao passo que *UBI4* apresentou valores de expressão semelhantes nas duas temperaturas. Já, as análises fenotípicas indicaram que, embora a viabilidade em 25 °C tenha sido menor, a capacidade de atenuação foi maior se comparado a 15 °C. Nesse trabalho, a expressão dos genes *PMA1*, *HSP30* e *UBI4* mostrou-se cepa-dependente, o que pode denotar a presença de mecanismos transcricionais e pós-transcricionais característicos de cada cepa. Desse modo, os genes selecionados podem ser potenciais biomarcadores de estresse em estudos com *S. cerevisiae* durante a fermentação cervejeira.

Abstract

The wide variety of *Saccharomyces cerevisiae* brewing strains today available is the result of distinct artificial selective pressures exert by different brewing schools and their specific procedures to ferment beer. Unfortunately, little is known about how the transcriptomic mechanisms regulate gene expression on those brewing strains, especially stress-related genes in different fermentation temperatures employed on brewery. In this sense, the objective of this work was to evaluate the expression of stress-responsive genes *PMA1*, *HSP30* and *UBI4* in the WLP565 (*Saison*-associated yeast) and WLP036 (*Altbier*-associated yeast) in different fermentation temperatures using a laboratory microfermenter. Moreover, yeast viability and beer apparent attenuation were evaluated. The data gathered indicated that yeast strains WLP565 and WLP036 performed differently with regard to apparent attenuation, viability and stress-gene expression data. Yeast strain WLP565 displayed a wide *PMA1*-associated expression values at 25 °C when compared to 15 °C. On the other hand, *HSP30* was expressed only at 25 °C, while *UBI4* exhibited higher expression values at 25 °C. Viability analysis for WLP565 did not showed differences between 15 °C and 25 °C, while apparent attenuation data for WLP565 indicated a better yeast performance at 25 °C. Gene expression data for yeast strain WLP036 indicated that *PMA1* expression values was highly variable at 15 °C. Likewise, *HSP30* was expressed only in 25 °C, whereas *UBI4* showed almost similar expression values in 25 °C and 15 °C. The attenuation ability of WLP036 was better at 25 °C when compared to 15 °C. The data indicated that the gene expression of *PMA1*, *HSP30* and *UBI4* are strain-dependent, which indicates the presence of yeast strain-specific transcriptional and post-transcriptional mechanisms. Finally, the selected stress-genes used in this work can be potential stress biomarkers in studies with *S. cerevisiae* during beer fermentation.

1. Introdução

1.1 Breve histórico da cerveja e seus componentes

A domesticação de cereais realizada pelos diferentes povos pertencentes ao Crescente Fértil, como Egito e Mesopotâmia, foi um importante marco no desenvolvimento da humanidade. Foi nesta região, que hoje abrange vários países do Oriente Médio, que a cerveja, bebida obtida a partir da fermentação de açúcares provenientes de cereais como a cevada e o trigo surgiu, sendo, portanto, um dos produtos biotecnológicos mais antigos da humanidade (Hornesey, 2003).

Devido à sua importância nutricional e social, os historiadores sugerem que a passagem do nomadismo para o sedentarismo nessas sociedades ocorreu pelo anseio de se fazer cerveja e relacionam essa bebida com o surgimento da escrita (Fagan, 1996). Embora a evidência mais antiga da existência da cerveja date de aproximadamente 5.500 AEC (Antes da Era Comum), pesquisas arqueológicas apontam para a presença da cerveja na alimentação de populações humanas até dez mil anos atrás (Fagan, 1996; Hornesey, 2003).

Além de cereais maltados, a cerveja é composta por outros três ingredientes: água, lúpulo e levedura. O uso do lúpulo, adicionado à cerveja para conferir amargor, aroma e sabor, além da sua capacidade bacteriostática e conservante, foi implementado na fabricação de cervejas no século IX da Era Comum (EC). Anteriormente ao lúpulo era utilizado o *Gruit*, uma mistura de ervas que contrabalanceava o dulçor oriundo do malte, além de conferir aromas e sabores distintos de acordo com a sua composição, que variava com a disponibilidade de matéria-prima (Hornesey, 2003).

Evidentemente, pelo fato de serem organismos microscópicos, desconhecia-se a existência das leveduras até o final do século XVIII EC (Boulton e Quain, 2001). Antes disso, acreditava-se que a fermentação era um evento mágico ou puramente químico e com as pesquisas de Louis Pasteur demonstrou-se que as leveduras eram responsáveis pela fermentação (Boulton e Quain, 2001). Esse microrganismo tornou-se alvo de inúmeros estudos e hoje é considerado como um dos principais modelos de célula eucariótica, além de ter estabelecido as bases da atual área da Bioquímica (Boulton e Quain, 2001; White e Zainasheff, 2010). Além disso, a descoberta da fermentação

promovida por leveduras possibilitou a melhoria do processo fermentativo cervejeiro, sobretudo pela capacidade de isolar culturas puras para inóculo diretamente no mosto e melhorando, conseqüentemente, o produto final (Boulton e Quain, 2001; White e Zainasheff, 2010).

1.2 Espécies de leveduras usadas na indústria cervejeira

Atualmente, estão disponíveis para uso em microcervejarias inúmeras cepas das espécies *Saccharomyces cerevisiae* (responsável pela fermentação de cervejas da família *ale*), *Saccharomyces pastorianus* (responsável pela fermentação de cervejas da família *lager*) e leveduras semi-domesticadas, como as espécies do gênero *Brettanomyces* (principal contaminante de vinhos, porém amplamente utilizada na indústria de cervejas artesanais e crucial para estilos como *Lambic* e *Gueuze* (ver Adendo 1).

Análises fenotípicas e genotípicas demonstraram que essas espécies apresentam diferenças fundamentais que impactam diretamente nas características das cervejas (White e Zainasheff, 2010). Desse modo, as diferenças ao nível de genótipo e fenótipo encontradas entre as espécies citadas são resultado das diferentes pressões seletivas impostas sobre elas, por distintos grupos cervejeiros locais em suas fermentações, ao longo da história (Legras et al., 2007). Nesse sentido, as escolas cervejeiras alemã, americana, belga e inglesa promoveram a seleção artificial das cepas cervejeiras empregadas em suas indústrias e, dessa forma, favoreceram características fenotípicas distintas (Protz, 1995). Nesse contexto, destaca-se a espécie *S. cerevisiae*, que apresenta o maior número de cepas atualmente utilizadas na indústria de cervejas.

A diversidade fenotípica encontrada em cepas cervejeiras de *S. cerevisiae* englobam a produção de compostos aromáticos (ésteres, fenólicos, álcoois superiores, diacetila, ácidos orgânicos e compostos sulfurados), floculação, a capacidade de fermentar os diferentes carboidratos dissolvidos no mosto, além de apresentarem distintas temperaturas ótimas de fermentação, bem como lidar com condições indutoras de estresse (térmico, osmótico e de pH), características que estão intrinsicamente associadas aos seus genótipos (Boulton e Quain, 2001; White e Zainasheff, 2010).

1.3 A fermentação cervejeira e a indução de diferentes estresses em leveduras

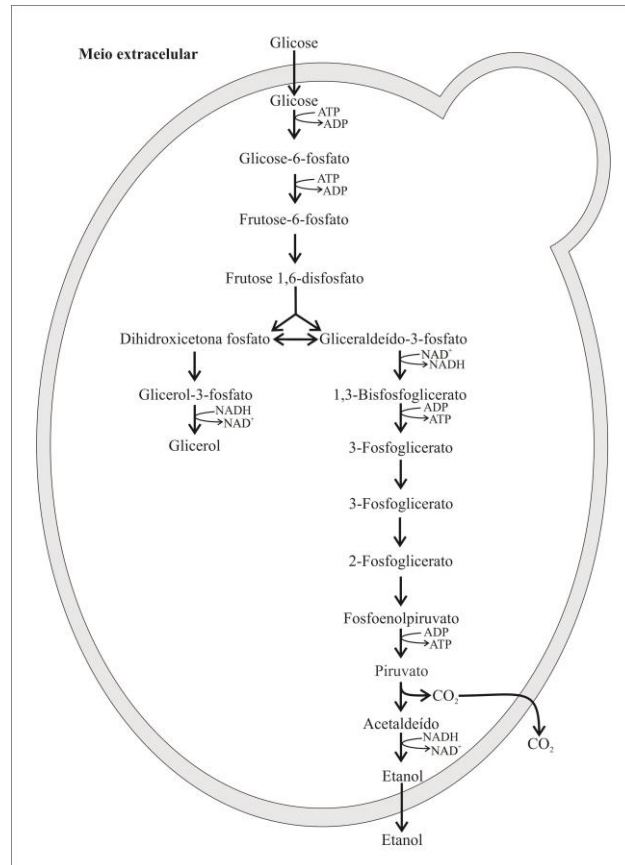
Na sua forma mais simplificada, a fermentação cervejeira é definida pelo consumo dos açúcares presentes no mosto e metabolização até etanol, dióxido de carbono e compostos aromáticos (Figura 1A), subdividindo-se em três fases distintas: *lag*, exponencial e estacionária (Figura 1B) (Lodolo et al., 2008). Cada uma dessas fases é estabelecida pela concentração de células por mL no mosto, bem como pelo padrão de expressão de diferentes genes que, conseqüentemente, modulam o metabolismo da levedura de acordo com a disponibilidade de nutrientes, tais como aminoácidos, açúcares (glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose como os principais carboidratos do mosto), oxigênio dissolvido, íons metálicos, lipídeos e vitaminas (Boulton e Quain, 2001).

A fase *lag* (Figura 1B) caracteriza-se pela adaptação das leveduras ao mosto cervejeiro. Nesse momento, as células consomem nutrientes do mosto, bem como disponibilizam as suas reservas intracelulares de glicogênio e trealose para promover a síntese de proteínas, lipídeos de membrana e ergosterol. A fase exponencial ou logarítmica (Figura 1B) é definida pela forte atividade glicolítica (Figura 1A), promovendo o ciclo celular e produção de metabólitos secundários, como compostos aromáticos, gás carbônico e etanol. Na fase estacionária (Figura 1B), a maioria dos mono e dissacarídeos (glicose, frutose, maltose e sacarose) já foram consumidos e moléculas aromáticas, como álcoois superiores, ésteres, compostos sulfurados orgânicos e inorgânicos e ácidos orgânicos já estão formados, restando apenas a reabsorção de diacetila e acetaldeído que, se presentes em altas concentrações, podem contribuir negativamente para as características organolépticas da cerveja (Boulton e Quain, 2001; White e Zainasheff, 2010). Por fim, as leveduras floculam em resposta ao fim da oferta de nutrientes, momento em que a viabilidade celular, bem como a vitalidade, passam a diminuir gradativamente (Boulton e Quain, 2001; White e Zainasheff, 2010).

Ao longo do processo fermentativo cervejeiro, as leveduras são expostas a uma ampla variedade de estresses ambientais, como (i) anaerobiose, (ii) estresse osmótico devido à alta densidade do mosto, (iii) altas concentrações de etanol, (iv) limitação de nutrientes essenciais, (v) altas pressões hidrostáticas, (vi) choque térmico e (vii) longos períodos de estocagem em temperaturas baixas (Gibson et al., 2007). Essas situações

adversas exigem uma resposta fisiológica, de modo que as leveduras se tornem capazes sobreviver, mesmo nessas condições.

A



B

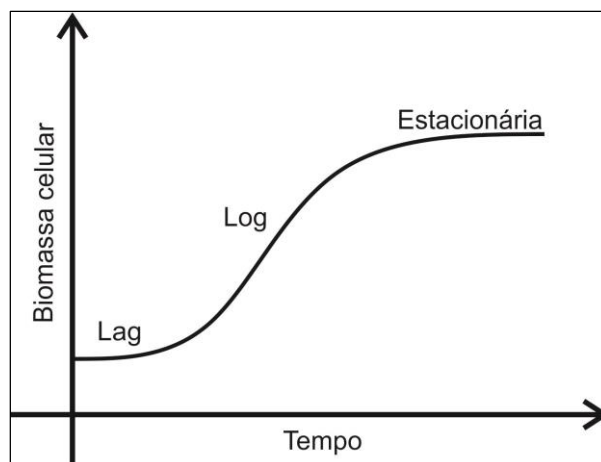


Figura 1. Em (A), representação esquemática da via glicolítica associada à fermentativa durante a fermentação. **Em (B)**, curva típica de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ao longo da fermentação.

1.4 Mecanismos moleculares associados com estresse em leveduras

A espécie *S. cerevisiae* apresenta uma rápida resposta molecular quando exposta a condições ambientais desfavoráveis, que é chamada de resposta ao estresse (Gibson et al., 2007). Esse mecanismo é evidenciado pela atuação de diferentes vias moleculares que resultam na resposta à mudança de temperatura e outros estressores, sendo denominado resposta ao choque térmico. Essa resposta é mediada pela ativação transcricional de genes que codificam para as chamadas proteínas de choque térmico (do inglês *heat shock proteins* ou HSPs) (Gibson et al., 2007). Os genes que codificam para HSPs apresentam promotores e sequências regulatórias responsivas a estresses, tais como o HSE (*heat shock elements*) e STRE (*stress response elements*) (Gibson et al., 2007; Morano et al., 2012; Verghese et al., 2012.). Neste contexto, a expressão dos genes que codificam para as proteínas HSPs está relacionado com o controle do ciclo celular e suas diferentes fases, com a replicação de DNA, transcrição, tradução, dobramento e transporte de proteínas, além do controle de expressão de proteínas de membrana (Morano et al., 2012; Verghese et al., 2012). Dessa forma, destacam-se a família proteica Hsp70 e as classes Hsp60p e Hsp90p, as quais atuam como chaperonas ou chaperoninas que, com gasto de ATP, se ligam a proteínas e as solubilizam ou corrigem a sua conformação (Verghese et al., 2012). Além dessas proteínas, também são importantes para a tolerância a diferentes tipos de estresse as proteínas Hsp104p e as pequenas HSPs denominadas de Hsp26p e Hsp12p, que também são expressas quando a população de leveduras entra na fase estacionária ou quando há indução de esporulação (Verghese et al., 2012).

Por sua vez, as enzimas da via glicolítica, tais como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (codificada por *HSP35*), a enolase (*HSP48*) e a fosfoglicerato cinase (*PGK1*) são induzidas durante o choque térmico, causando o aumento na atividade glicolítica e promovendo a geração de ATP celular necessário para lidar com condições indutoras de estresse (Iida, 1985 e Piper, 1997; Lindquist e Craig, 1988). Destaca-se também a proteína Hsp30, que se localiza na membrana plasmática em condições de

choque térmico, regulando negativamente Pma1p (proteína transmembrana que regula o pH intracelular, liberando prótons para o meio extracelular com gasto de ATP), sendo expressa em condições de limitação de nutrientes e altas concentrações de etanol (Figura 2) (Bisson, 2016; Yenush, 2016).

Além das HSPs, a síntese de trealose está relacionada com a resposta ao estresse térmico, uma vez que nessa condição, sua biossíntese aumenta em até cem vezes, valor que é diminuído quando as células são expostas a temperatura baixas (Eleutherio, 2015). Isso ocorre graças a ação protetiva da trealose em proteínas e membranas, mantendo assim a integridade estrutural da célula (Eleutherio et. al, 2015).

É importante ressaltar que outras proteínas, tais como ubiquitinas, são fortemente induzidas em situações de estresse, sendo também consideradas, em alguns contextos específicos, como HSPs (Mager e De Kruijff, 1995). Um exemplo é o gene *UBI4*, que é essencial para a resposta celular ao estresse e codifica para a poliubiquitina Ubi4p. A Ubi4p, ao se ligar à proteínas desnaturadas ou danificadas, marca as mesmas para degradação pela via proteolítica (Finley et al., 2012). Desse modo, não são formados agregados de proteínas mal dobradas, que são relacionados à diminuição da viabilidade celular, bem como ao mal funcionamento do proteasoma (Figura 2) (Riezman, 2004).

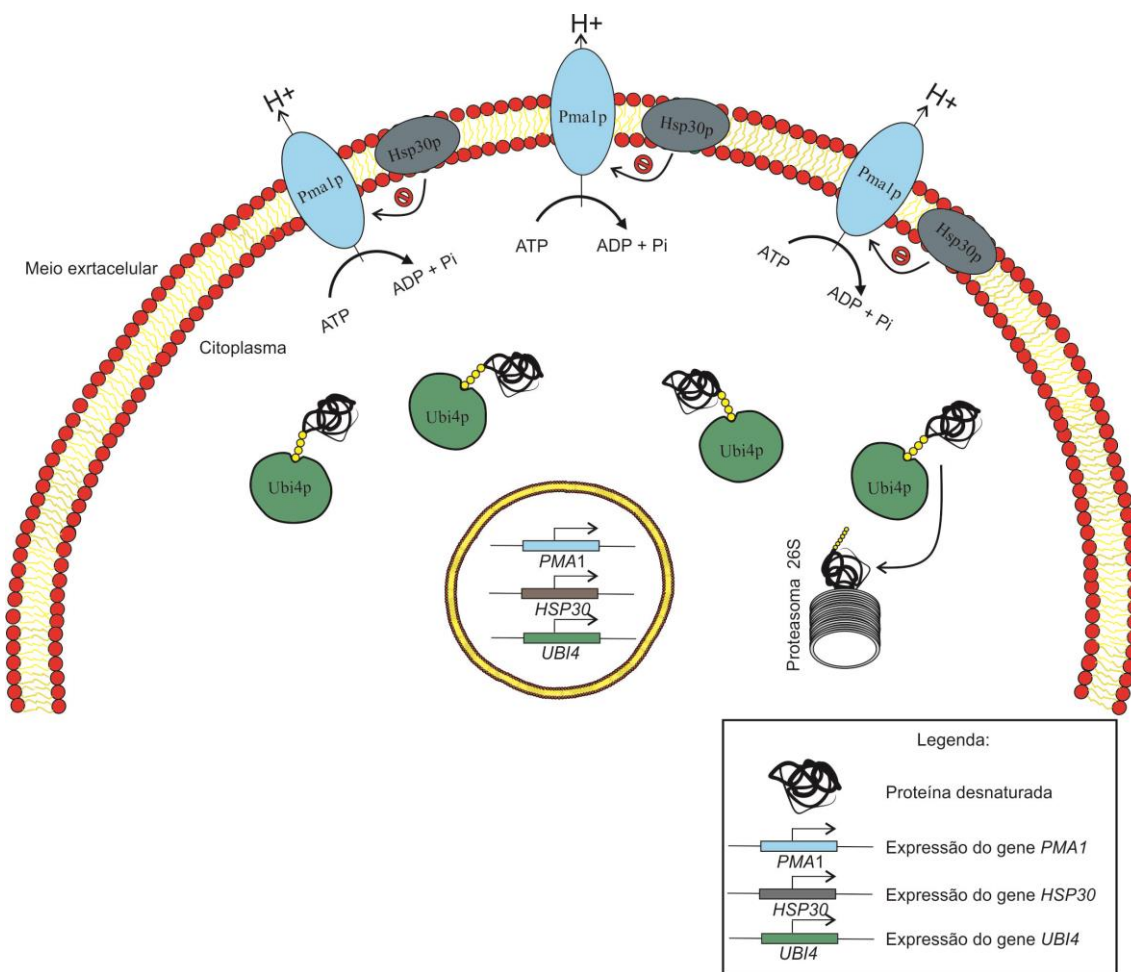


Figura 2: Desenho esquemático do mecanismo de ação da proteína de membrana Hsp30p regulando negativamente a atividade de Pma1p, enquanto Ubi4p atua na ubiquitinação de proteínas desnaturadas, direcionando-as para a degradação pela via proteasoma 26S.

1.5 Influência da temperatura na fermentação cervejeira

A temperatura ideal de fermentação é uma das características que mais diferencia as espécies de leveduras cervejeiras. Nesse sentido, cada cepa produz um conjunto de compostos aromáticos específicos, bem como taxas de atenuação do mosto característicos de suas temperaturas fermentativas, o que torna o controle de temperatura de fermentação um ponto crucial na produção de cervejas (Boulton e Quain, 2001; White e Zainasheff, 2010). Desse modo, *S. pastorianus* distingue-se de *S. cerevisiae* por fermentar em temperaturas mais baixas, com valores mínimos de aproximadamente 8 °C. Vale ressaltar que estilos “híbridos” de cerveja como *Californian Common Beer* (fermentada com *S. pastorianus*) e *Altbier* (fermentada com *S. cerevisiae*) apresentam temperaturas de

fermentação de aproximadamente 15 °C, sendo essa a temperatura máxima encontrada para cervejas do tipo *Lager* e mínima para aquelas da família *Ale*. Por outro lado, a espécie *S. cerevisiae* apresenta representantes com temperatura ideal de fermentação em torno de 25 °C, como é o caso das cervejas do estilo *Saison* (que resulta em elevadas taxas de atenuação, além de cervejas bastante esterificadas, característico de cervejas belgas) (Boulton e Quain, 2001; White e Zainasheff, 2010).

Tendo em vista essa amplitude de temperaturas ideais encontradas nas diferentes cepas de leveduras cervejeiras, espera-se um comportamento distinto no que diz respeito à expressão gênica nessas cepas. Contudo, apesar do conhecimento avançado em termos de marcadores de estresse, esses tem sido pouco utilizados na indústria cervejeira. Assim, há um restrito conhecimento acerca do transcrito de diferentes leveduras durante a fermentação de cervejas, especialmente à expressão de biomarcadores de estresse em diferentes temperaturas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão dos biomarcadores de estresse *PMA1*, *UBI4* e *HSP30* em duas cepas cervejeiras de *S. cerevisiae*, cultivadas em microrreatores contendo meio de cultura que simula o mosto cervejeiro nas temperaturas de 15 °C e 25 °C.

2.2 Objetivos específicos

1. Comparar, na fase estacionária, a expressão dos genes *PMA1*, *UBI4* e *HSP30* por qRT-PCR entre as cepas cervejeiras de *S. cerevisiae* WLP036 e WLP565 em microrreatores contendo mosto semi-sintético a 15 °C e 25 °C.

2. Analisar a viabilidade celular pelo método da coloração por azul de metileno nas cepas WLP036 e WLP565 de *S. cerevisiae* ao alcançarem a fase estacionária após crescimento nas temperaturas de 15°C e 25°C em mosto semi-sintético.

3. Verificar a atenuação aparente das cepas WLP036 e WLP565 de *S. cerevisiae* ao alcançarem a fase estacionária após crescimento nas temperaturas de 15°C e 25°C em mosto cervejeiro semi-sintético.

3. Procedimentos experimentais

3.1 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, meios de cultura e cultivo em microrreatores

As cepas WLP036 *Dusseldorf Alt Yeast* (obtida da cervejaria Zum Uerige, Düsseldorf, Alemanha), responsável pela fermentação de cervejas do estilo *Altbier* e WLP565 *Belgian Saison* (isolada da cervejaria Dupont, na Bélgica), responsável pela fermentação de cervejas do estilo *Saison*, foram adquiridas da empresa White Labs (San Diego, California, Estados Unidos) e usadas neste trabalho. Para tanto, triplicatas técnicas e biológicas das cepas totalizando 36 amostras foram cultivadas em mosto cervejeiro sintético composto por: 0,595 g de bases nitrogenadas de leveduras sem aminoácidos e sulfato de amônia (YNB; BD Company, New Jersey, Estados Unidos), 10% (p/v) de extrato de malte (BD Company, New Jersey, Estados Unidos) e 1,02 g de polipeptona (BD Company, New Jersey, Estados Unidos) correspondente a 150 mg/L de aminos nitrogenadas livres para um volume de 350 mL. As culturas foram mantidas em incubadora com agitação a 180 rotações por minuto (rpm), a uma temperatura de 25 °C, até atingirem a fase estacionária (densidade celular de $1-2 \times 10^8$ células/mL). Posteriormente, uma alíquota contendo $3,6 \times 10^8$ células totais foi inoculada em 40 mL de mosto-padrão cervejeiro 12 °P (1,048 GO) em microrreatores mantidos em estufas nas temperaturas de 15 °C e 25 °C, respectivamente, simulando, dessa forma, a fermentação em larga escala encontrado em microcervejarias.

3.2 Análise de viabilidade

O número de células viáveis foi estimado pela técnica de coloração celular com azul de metileno (AM) alcalino no momento em que as fermentações alcançaram a fase estacionária, ou seja, quando as culturas atingiram uma densidade celular de $1-2 \times 10^8$ células/mL. A solução alcalina de AM consiste em uma parte de solução de azul de metileno 0,1 M misturada com 9 partes de tampão glicina 0,1 M, com pH final ajustado para 10,6 (Sami et al., 1994). Para a análise da viabilidade, uma alíquota de 0,5 mL contendo 10^7 células totais foi misturada com 0,5 mL de solução corante. Após 15 minutos de contato, as amostras foram analisadas em câmara de Neubauer aprimorada, onde as células coradas com o azul de metileno, foram consideradas não-viáveis, e as não coradas, viáveis. A estimativa da porcentagem de viabilidade celular foi feita pela

seguinte fórmula: viabilidade % = (número total de células - número total de células coradas/número total de células × 100). A análise estatística dos dados foi feita por meio do cálculo de ANOVA de duas vias, sendo considerada estatisticamente significativas variâncias das amostras com valor de $p < 0,05$.

3.3 Análise da atenuação cervejeira

A diferença de densidade do mosto (indicado pela quantidade de sólidos dissolvidos) ao longo da fermentação é um indicador da taxa de atenuação cervejeira no decorrer do processo fermentativo. Por meio da sua medição, é possível acompanhar o decréscimo de densidade do mosto, inferir a atenuação total aparente, e por consequência, o seu teor alcoólico (Boulton e Quain, 2001). Para medição da atenuação aparente após as fermentações alcançarem a fase estacionária ($1-2 \times 10^8$ células/mL), foi utilizado o modelo de refratômetro com precisão de leitura de 0 a 32, com medida em escala °Brix, com correção automática de temperatura de 10 a 30 °C (ATC) (AFAB Enterprises, Florida, Estados Unidos). Após as medições, foi utilizado o software *Brewzor Calculator* (disponível em https://play.google.com/store/apps/details?id=com.brewzor.calculator&hl=pt_BR) para correção e ajuste de escala para densidade específica (kg/m^3) tendo em vista que o álcool gerado durante o processo de fermentação altera a leitura do refratômetro. A análise estatística dos dados foi feita por meio do cálculo de ANOVA de duas vias, sendo considerada estatisticamente significativas variâncias das amostras com valor de $p < 0,05$.

3.4 Extração de RNA

As extrações de RNA foram efetuadas assim que as culturas atingiram a fase estacionária ($1-2 \times 10^8$ células/mL). Para tanto, uma alíquota de 2 mL foi centrifugada ($1000 \times g$ por 10 minutos), seguido do tratamento do precipitado celular com 500 unidades/mL da enzima liticase (Sigma, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) em tampão Sorbitol (Sigma, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) 2 M para degradação da parede celular, posteriormente foi executada a extração do RNA total usando o kit *illustra RNAspin mini* (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). O RNA total extraído foi analisado qualitativamente em eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) em tampão tris-acetato-EDTA (TAE) 1× (composto por 242 g de

TRIS base (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol), 57,1 mL de ácido acético glacial 100 mL de solução de EDTA dissódico (Na₂ EDTA) 0,5 M (pH 8,0) e água MilliQ até 1 L) (Ogden e Adams, 1987). Para o preparo da eletroforese descrita, foram utilizados 5 µL de RNA extraído, 1 µL de formamida, 1 µL de SYBR green e 1 µL de *loader* (mistura previamente colocada em termociclador a 65 °C por 15 minutos para a desnaturação do RNA). Posteriormente, as amostras do RNA extraído foram quantificadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 nm (A₂₆₀) e 280 nm (A₂₈₀), cuja razão indica a quantidade de RNA em ng/µL, bem como a presença de contaminação proteica na amostra (Manchester, 1995).

3.5 Desenho e síntese dos oligonucleotídeos

Os iniciadores para amplificação dos genes *PMA1*, *UBI4* e *HSP30*, além de *ACT1* (usado como controle positivo) foram desenhados com o programa *PrimerQuest* (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) a partir do genoma da levedura referência S288c (*Saccharomyces cerevisiae*). As estruturas secundárias potenciais dos iniciadores foram avaliadas com o programa *Beacon Designer free edition* (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>) e do *amplicon* com a ferramenta *UNA fold* (<http://www.idtdna.com/UNAFold?>). As sequências dos iniciadores, bem como as temperaturas de anelamento, desnaturação e tamanho do *amplicon* encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos usados nas reações de qPCR.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' → 3')	Temperatura de desnaturação	Temperatura de anelamento	Tamanho do <i>Amplicon</i> em pares de bases (pb)
<i>ACT1</i> Senso <i>ACT1</i> Antissenso	5' CGTGCTGTCTTCCCATCTATC 3' 3' CATCACCAACGTAGGAGTCTTT 5'	62 °C 62 °C	57 °C 57 °C	88 pb
<i>PMA1</i> Senso <i>PMA1</i> Antissenso	5' GGTCTGGACTGCTTGTCT 3' 3' CCGACTGGGACACCAATAATAG 5'	62 °C 62 °C	57 °C 57 °C	90 pb
<i>HSP30</i> Senso <i>HSP30</i> Antissenso	5' GAGAGGTTTCGGATTGGTTATGG 3' 3' GTCAATCTGGAGCCCTTGTT 5'	62 °C 62 °C	57 °C 57 °C	105 pb
<i>UBI4</i> Senso <i>UBI4</i> Antissenso	5' CGGTAGAACGCTGTCTGATTAC 3' 3' GATCTGCATACCACCTCTTAGC 5'	62 °C 62 °C	57 °C 57 °C	82 pb

3.6 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita utilizando o kit *Phusion RT-PCR Kit* (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) no qual 100 ng de RNA iniciais foram submetidos à ação da transcriptase reversa (RT enzyme mix, M-MuLV RNase H+ RT com inibidor de RNase, 2 μ L), juntamente com 1 μ L de dNTP 10 mM, 1 μ L de Oligo(dT) oligonucleotídeo, 2 μ L de 10 \times RT (tampão contendo 50 mM de MgCl₂) e o restante de água livre de RNase, totalizando 20 μ L de reação. Os parâmetros de síntese foram como descrito na Tabela 2. Posteriormente, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro em A260 e a qualidade determinada pela razão A260/A280, como descrito no item 4.

Tabela 2. Parâmetros da reação de síntese de cDNA

Parâmetro	Temperatura	Tempo
Desnaturação do RNA	65 °C	5 min.
Adição de RT, tampão e H ₂ O	4 °C	10 min.
Extensão de oligo(dT)	25 °C	10 min.
Síntese de cDNA	40 °C	30 min.
Término da reação	85 °C	5 min.
Resfriamento da amostra	4 °C	Indeterminado

3.7 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Para as reações de PCR em tempo real visando a análise de expressão diferencial dos genes *PMA1*, *UBI4* e *HSP30* foi empregado o uso do kit SYBR Green PCR Master Mix otimizado para eficiência máxima para o menor limiar e maior ΔR_n (Applied biosystems, Califórnia, EUA). Foram testadas concentrações iniciais de oligonucleotídeos senso e antissenso de 100 nM, 200 nM e 300 nM, além de 1 ng, 2 ng,

4 ng e 8 ng de cDNA iniciais para otimização das reações. Encontrou-se, como ideal, o uso de 100 nM de oligonucleotídeos para os genes *ACT1* e *UBI4* e 300 nM para os genes *PMA1* e *HSP30*, com uma quantidade de cDNA de 8 ng. A especificidade das reações foram analisada pela análise de *Melting curve*. Os parâmetros das reações de qPCR encontram-se na tabela 3. As curvas de amplificação foram analisadas no software *StepOne* v2.3 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). Foram efetuados controles negativos da reação para teste de amplificação inespecífica sem amostra. Os resultados obtidos a partir das reações foram analisados por meio do cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando a expressão do gene *ACT1* (Eficiência %: 125,009, R²: 0.967) como referência para a análise de expressão dos demais genes (Scheffe et al., 2006). A análise estatística dos dados foi feita por meio do cálculo de ANOVA de duas vias para cada um dos genes em questão, sendo considerada estatisticamente significativas as variâncias das amostras com valor de $p < 0,05$.

Tabela 3. Parâmetros da reação de qPCR

Parâmetro de ciclagem	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95 °C	10 min.	1
Desnaturação	95 °C	15 seg.	40
Anelamento	57 °C	1 min.	
Extensão	60 °C	1 min.	
Extensão final	72 °C	5 min.	1

4. Resultados

4.1 A temperatura de cultivo influencia a viabilidade celular

Os dados obtidos pela técnica de coloração por azul de metileno demonstraram que as cepas WLP036 e WLP565, ao alcançarem a fase estacionária ($1-2 \times 10^8$ células/mL), apresentaram diferenças significativas no que diz respeito à viabilidade celular quando expostas às temperaturas de 15 °C e 25 °C ($p = 0,0321$). Desse modo, quando cultivadas na temperatura de 25 °C, houve um decréscimo no valor de viabilidade mais acentuado em WLP036 (média de 91,92%) do que em WLP565 (média de 95,01%). No entanto, não houve diferença estatística entre as cepas e interação das variáveis (temperaturas versus cepas; Figura 3).

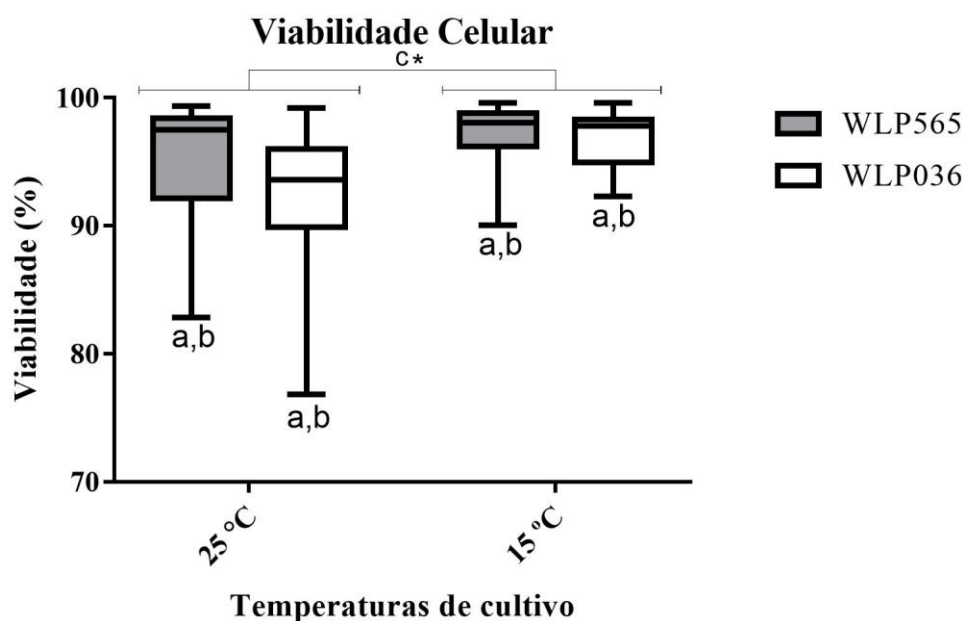


Figura 3. Viabilidade celular das cepas WLP036 e WLP565 ao alcançarem a fase estacionária nas condições de crescimento de 25 °C e 15 °C. Legenda: a, variância entre cepas ($p = 0,2776$); b, variância da interação dos fatores “cepa” e “temperatura de cultivo” ($p = 0,3837$); c, variância entre as temperaturas de cultivo ($p = 0,0321$) e *, estatisticamente significativo.

4.2 Cepas e temperaturas de cultivo afetam o valor de atenuação aparente

Os dados obtidos por meio da leitura em refratômetro demonstraram que houveram diferenças entre as cepas e as temperaturas de cultivo (Figura 4). Assim, a maior média

de atenuação aparente ao alcançar a fase estacionária foi observada pela cepa WLP565 na sua temperatura ideal de fermentação (25 °C), com valor de 1,010 kg/m³. Esse resultado apresentou significância estatística (p = 0,0003) se comparado aos valores de WLP565 na condição de 15 °C (1,014 kg/m³), bem como WLP036 nas duas condições 25 °C e 15 °C, que obteve médias de 1,017 kg/m³ e 1,018 kg/m³, respectivamente (Figura 4).

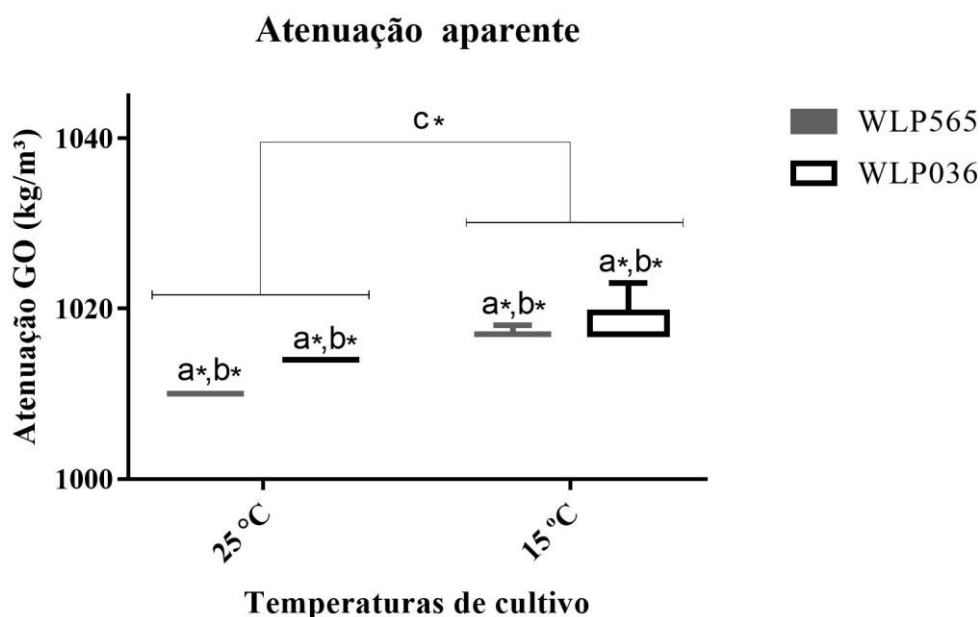


Figura 4. Atenuação aparente das cepas WLP036 e WLP565 ao alcançarem a fase estacionária nas condições de crescimento de 25 °C e 15 °C. Legenda: a, variância entre cepas (p < 0,0001); b, variância da interação dos fatores cepa e temperatura de cultivo (p = 0,0003); c, variância entre as temperaturas de cultivo (p < 0,0001) e *, estatisticamente significativo.

4.3.1 Cepas e temperaturas de cultivo afetam os valores de expressão de *PMA1*, *HSP30* e *UBI4*.

Os dados obtidos por meio da técnica de RT-qPCR nas cepas WLP565 e WLP036 indicaram que ambas se comportaram de maneira semelhante no que diz respeito à expressão de *PMA1* ao entrar na fase estacionária quando cultivadas em suas temperaturas ideais de fermentação (25 °C e 15°C, respectivamente). Nesse sentido, as cepas apresentaram uma amplitude alta de valores expressão ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) que vão de 0,6 a 4,9 em WLP565 e 0,7 a 9,1 em WLP036 (Figura 5). Deve ser pontuado, também, que a expressão de *PMA1* nas duas cepas em suas temperaturas não ideais de fermentação foi menor para WLP565 e quase nula em WLP036, havendo uma menor amplitude nos valores de

transcrição desse gene (Figura 5). Desse modo, diferentes cepas afetaram o valor de expressão desse gene, bem como a interação dos fatores (cepa versus temperatura) (Figura 5).

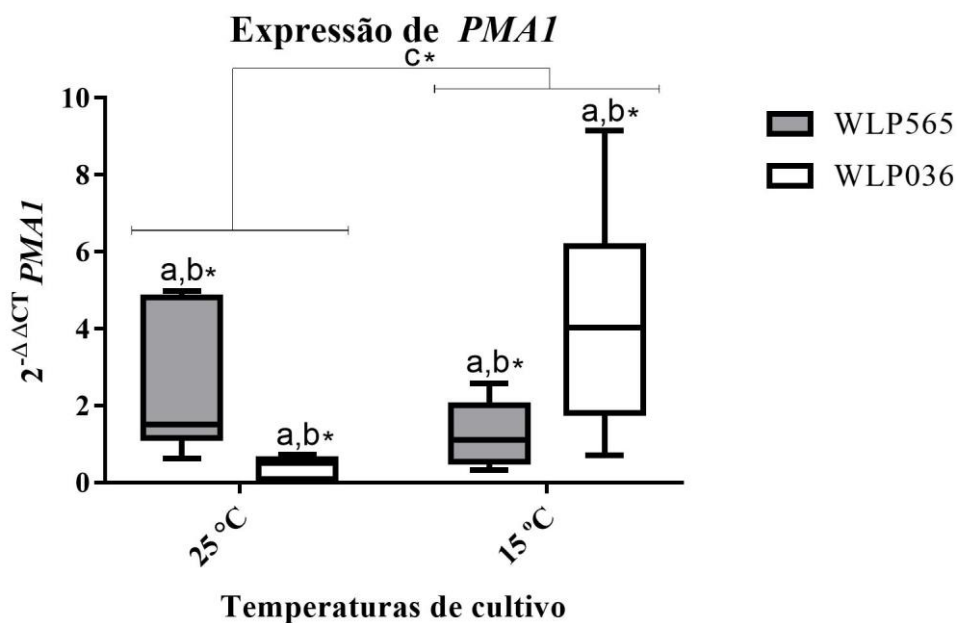


Figura 5. Expressão diferencial do gene *PMAI* nas cepas WLP036 e WLP565 ao alcançarem a fase estacionária nas condições de crescimento de 25 °C e 15 °C. Legenda: a, variância entre cepas ($p = 0,4279$); b, variância da interação dos fatores cepa e temperatura de cultivo ($p = 0,0005$); c, variância entre as temperaturas de cultivo ($p = 0,0321$) e *, estatisticamente significativo.

Os dados obtidos por meio da técnica de RT-qPCR nas cepas WLP565 e WLP036 ao alcançarem a fase estacionária demonstraram que a expressão de *HSP30* ocorreu praticamente apenas na temperatura de 25 °C (Figura 6). Nesse contexto, embora ambas as cepas tenham expressado esse gene, foi significativamente maior a expressão em WLP036, com média de 4,93, se comparado ao valor de 2,74 obtido para WLP565 (Figura 6). Portanto, houveram diferenças estatisticamente significativas entre as cepas, temperaturas de cultivo e também na interação dos fatores (cepas versus temperatura de cultivo) (Figura 6).

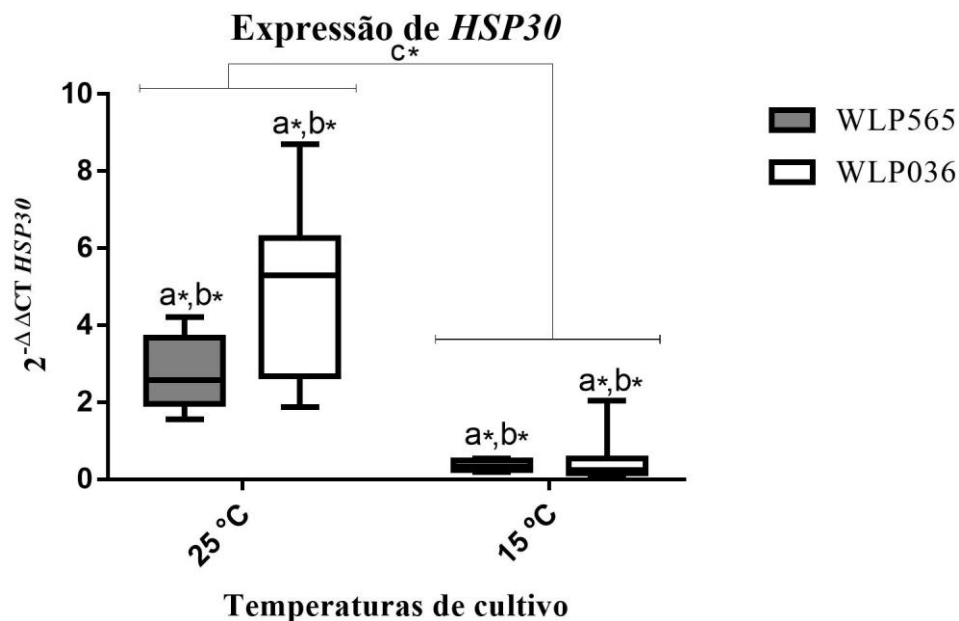


Figura 6. Expressão diferencial do gene *HSP30* nas cepas WLP036 e WLP565 ao alcançarem a fase estacionária nas condições de crescimento de 25 °C e 15 °C. Legenda: a, variância entre cepas ($p = 0,0213$); b, variância da interação dos fatores cepa e temperatura de cultivo ($p = 0,0389$); c, variância entre as temperaturas de cultivo ($p < 0,0001$) e *, estatisticamente significativo.

Os dados obtidos por meio da técnica de RT-qPCR nas cepas WLP565 e WLP036 demonstraram que a expressão de *UBI4* apresentou valores maiores na cepa WLP036 nas duas condições de cultivo (15 °C e 25 °C), com valores médios de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de 1,75 e 1,17, respectivamente (Figura 7). Em contrapartida, WLP565 alcançou média de 1,37 quando cultivada em 25 °C e 0,52 em 15 °C. Portanto, para o gene *UBI4*, diferentes cepas e temperaturas de cultivo afetaram significativamente sua expressão (Figura 7). Em contrapartida, a interação dos fatores (cepa versus temperatura de cultivo) não apresentou diferenças significativas.

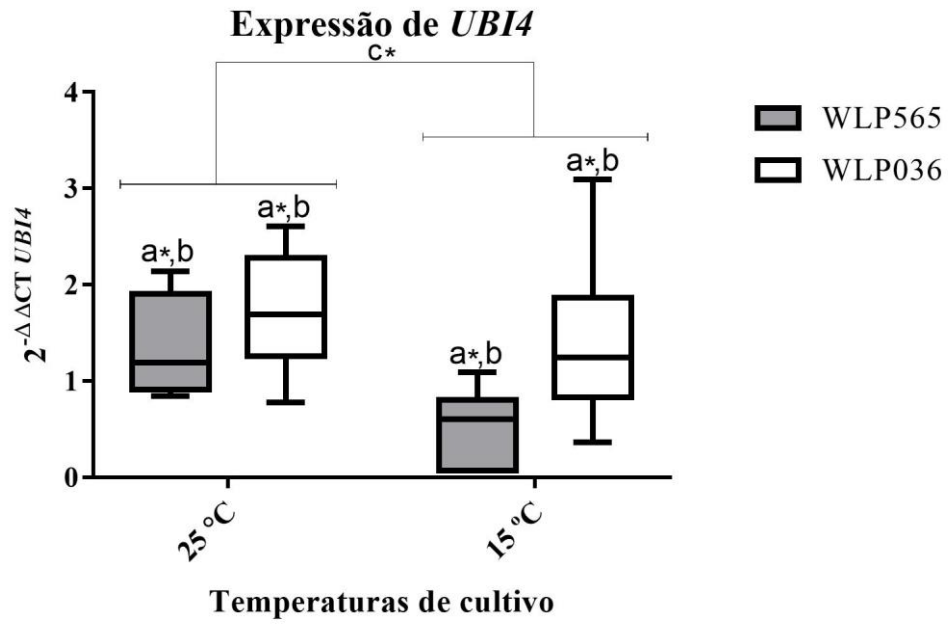


Figura 7. Expressão diferencial do gene *UBI4* nas cepas WLP036 e WLP565 ao alcançarem a fase estacionária nas condições de crescimento de 25 °C e 15 °C. Legenda: a, variância entre cepas ($p = 0,0051$); b, variância da interação dos fatores cepa e temperatura de cultivo ($p = 0,2361$), c, variância entre as temperaturas de cultivo ($p < 0,0060$) e *, estatisticamente significativo.

5 Discussão

5.1 Mudanças fisiológicas da fase exponencial para a estacionária

Durante a mudança da fase exponencial para a fase estacionária, as leveduras passam por uma alteração fisiológica ligada aos diferentes estresses impostos pelo ambiente e à depleção de nutrientes (Gibson, 2007). Ao entrar na fase estacionária, as células tornam-se mais resistentes ao calor por meio da expressão de proteínas de choque térmico, acumulam glicogênio e trealose, adquirem maior capacidade de lidar contra efeitos deletérios de radicais livres oriundos do oxigênio e apresentam menor gasto energético (Gray, 2004; Gibson, 2007). Nesse momento, visando a sobrevivência a longo prazo, as células entram em estado de quiescência (G0), conferindo características como: espessamento das paredes celulares, tornando-as mais resistentes à degradação, aumento no número e tamanho dos vacúolos, formação de pseudohifas em algumas cepas, além de decréscimo na síntese proteica (Boulton e Quain, 2001; Gray, 2004). Entretanto, no estado de quiescência, as reservas de glicogênio rapidamente são exauridas, causando um acelerado decréscimo na viabilidade celular (Gibson, 2007).

5.2 Análises de viabilidade

Embora as análises de viabilidade tenham apresentado diferenças significativas entre as temperaturas de cultivo, não foram evidenciadas diferenças entre as linhagens testadas, bem como na interação das variáveis (temperatura de cultivo versus cepas). Houve, entretanto, uma pequena diferença na viabilidade celular entre as cepas WLP565 e WLP036 quando cultivadas a 25 °C no início da fase estacionária. Assim sendo, nesse momento (48 h a 72 h após o inóculo), provavelmente não houve tempo suficiente para uma queda acentuada de viabilidade na cepa WLP036.

A temperatura de fermentação influencia nas taxas de crescimento, densidade celular, formação de compostos aromáticos e capacidade fermentativa (White e Zainasheff, 2010). As enzimas glicolíticas e fermentativas apresentam distintas taxas de expressão em diferentes temperaturas de cultivo, por exemplo, foi demonstrado que *S. cerevisiae* apresenta maior atividade dessas enzimas a 30 °C do que a 12 °C quando expostas a altas concentrações de glicose (Cruz et al., 2012; Yu et al., 2012). Desse modo, é interessante pontuar que a cepa WLP565 apresentou baixa variação de viabilidade nas duas condições

de crescimento, sugerindo que, embora não propicie condições ideais de fermentação, temperaturas mais baixas, como 15 °C, não são um fator limitante para sua viabilidade. Em contrapartida, os dados de atenuação demonstram que a 15 °C a sua capacidade fermentativa, se comparado a 25 °C, diminuiu significativamente, indicando que a velocidade de atenuação do mosto foi menor, uma vez que o metabolismo de carboidratos é mais baixo em temperaturas menores (Cruz et al., 2012).

5.2 Atenuação aparente

Entre os testes empregados nesse trabalho, a análise de atenuação aparente foi o que demonstrou diferenças mais expressivas entre as cepas e as condições de cultivo. Desse modo, as enzimas glicolíticas e fermentativas trabalham melhor nas temperaturas mais altas de fermentação cervejeira (25 °C) (Cruz et al., 2012; Yu et al., 2012). Assim, os dados obtidos indicaram que as atividades glicolítica e fermentativa foram maiores a 25 °C do que a 15 °C em ambas cepas. É importante pontuar que *S. cerevisiae* tem sua temperatura ótima de crescimento acima de 30 °C, onde alcança uma biomassa celular maior (Munna et al., 2015). Entretanto, no que diz respeito à fermentação cervejeira, as temperaturas ideais são mais baixas, alcançando máximas em torno de 25 °C nas cepas que fermentam o estilo *Saison* (maior temperatura descrita de fermentação para cervejas *ale*) e mínimas próximas de 15 °C nas cepas que fermentam *Altbiers* (menor temperatura descrita de fermentação para cervejas *ale*). Isso ocorre porque, no contexto cervejeiro, fatores que induzem crescimento excessivo de biomassa celular, como altas temperaturas, causam aumento nas concentrações de compostos aromáticos indesejáveis como álcoois superiores em excesso, diacetil, ésteres, entre outros (White e Zainasheff, 2010). Assim sendo, é possível que cada cepa tenha sofrido pressões seletivas de modo a alcançar um equilíbrio na formação de compostos aromáticos e taxa de crescimento.

5.3.1 Expressão diferencial do gene *PMA1*

O gene *PMA1* é essencial para *S. cerevisiae*, codificando para a principal proteína transmembrana tipo P2 H⁺ATPase (Ramos et al., 2016). Por meio da hidrólise de ATP, essa proteína libera íons H⁺ para o meio extracelular (Figura 2). Dessa maneira, há a formação de um gradiente eletroquímico de prótons, que regula o pH intracelular e também direciona a absorção de nutrientes através da membrana plasmática (Ramos et al., 2016). Esse gene tem sua transcrição regulada por glicose por meio dos fatores de

transcrição Rap1p e Gcr1p e também pelo ciclo celular, visto que seu promotor é um sítio de ligação do fator de transcrição Mcm1p que controla o prosseguimento do ciclo celular, a síntese e manutenção de estruturas da parede celular e membrana plasmática, entre outros (Kuo e Grayhack 1994; Goossens et al., 2000; Eraso et al., 2006).

A proteína Pma1p, por sua vez, tem sua atividade aumentada de cinco a dez vezes mais na presença de glicose via fosforilação no resíduo de serina C-terminal por meio da atuação da cinase Ptk2p (Goossens et al., 2000; Eraso et al., 2006). Em contrapartida, quando Pma1p é fosforilada pelas caseína cinases Yck1p e Yck2p, na ausência de glicose, há uma diminuição na atividade dessa proteína (Estrada et al., 1996). Além disso, há outras regulações pós-traducionais que incluem a mudança conformacional de Pma1p causada pela ligação (na ausência de glicose) ou desligamento (na presença de glicose) de tubulinas acetiladas (Tub1p, Tub2p e Tub3p), promovendo uma diminuição ou aumento na atividade enzimática, respectivamente (Campetelli et al., 2005).

Conforme demonstrado na Figura 5, houve uma alta amplitude na expressão de *PMAI* nas cepas WLP565 e WLP036 quando cultivadas em suas temperaturas ideais de fermentação. Essa variação pode estar atrelada ao fato de que a regulação transcricional desse gene é também regulada pelo ciclo celular por meio do fator de transcrição Mcm1p (Kuo e Grayhack, 1994). Assim, diferentes fases da mitose (G1, S e G2) podem apresentar distintos valores de expressão de *PMAI* e tendo em vista que, durante a fermentação, o ciclo celular da população de leveduras não está sincronizado, esse fator pode ter sido determinante para essa amplitude nos valores de expressão. Dessa maneira, uma pesquisa que avaliasse também a porcentagem de células em cada uma das fases da mitose seria mais conclusiva quanto a essa hipótese (Poletto et al., 2010).

Por outro lado, houve um decréscimo na expressão de *PMAI* quando cultivadas nas temperaturas não ideais. Isso ocorreu, provavelmente, por consequência da exposição a um ambiente desfavorável o qual se espera que muitas células estejam presas em G1 ou G0. Ainda, na cepa WLP036, a expressão de *PMAI* pode ter sido inibida pela expressão de *HSP30* (Figura 6) que regula negativamente Pma1p durante estresse por choque térmico (Figura 3) (Meena et al., 2011).

5.3.2 Expressão diferencial do gene *HSP30*

O gene *HSP30* codifica para uma proteína de choque térmico de membrana que contém sete domínios transmembrana e atua como uma chaperona na membrana plasmática (Meena et al., 2011). Sua expressão contribui para a termotolerância em *S. cerevisiae*, uma vez que durante o estresse térmico, na presença de glicose, ela se ancora de modo integral à membrana e diminui o gasto de ATP da célula por meio da inibição da atividade e das quantidades de Pma1p (que pode gastar até mais do que 20% do ATP celular) conforme esquematizado na Figura 2 (Piper et al., 1997; Meena et al., 2011). Além de estresse térmico, outras condições celulares desfavoráveis também induzem sua expressão, como exposição a ácidos orgânicos fracos, estresse hiperosmótico, estresse oxidativo, limitação de glicose, exposição a concentrações elevadas de etanol, e a entrada na fase estacionária (Panaretou e Piper, 1992; Seymour e Piper, 1999). Sua expressão depende parcialmente de Msn2p e Msn4p que se ligam a sequências STREs, presentes à montante do promotor de *HSP30* (Seymour e Piper, 1999). Além disso, sua regulação transcricional depende, também, de Pci8 e Sfl1p (Shalev et al., 2001; Galeote et al., 2007).

No presente estudo, a expressão de *HSP30* ocorreu praticamente apenas na temperatura de 25 °C, demonstrando que sua importância fisiológica está atrelada à temperaturas mais altas quando não há outros fatores que induzem estresse como os mencionados acima. Nesse contexto, embora ambas as cepas tenham expressado esse gene, foi significativamente maior a expressão em WLP036 (Figura 6) que, juntamente com a análise de *PMAI* e atenuação aparente, possibilita inferir que essa cepa está em condição de estresse térmico. A partir disso, infere-se que a superexpressão de *HSP30* atua na diminuição dos níveis de Pma1p para evitar gasto excessivo de energia celular na forma de ATP e também devido à sua atividade de chaperona na manutenção da integridade das proteínas de membrana (Meena et al., 2011).

Por outro lado, é interessante notar que WLP565 expressou *PMAI* e *HSP30* concomitantemente, alcançando valores médios próximos de 2,29 e 2,74, respectivamente (Figura 5). Nesse caso, é provável que a expressão esteja ligada à entrada na fase estacionária, que dispara a expressão de *HSP30* devido à limitação de fontes de carbono, hipótese que é corroborada pelas análises de atenuação aparente, tendo em vista que na temperatura de 25 °C, a densidade baixou de 1,045 kg/m³ para 1,010 kg/m³ até entrar na fase exponencial (Galeote, 2007). Ainda, no que diz respeito a expressão de

HSP30 nas cepas cultivadas em 15 °C, os valores podem ter sido baixos pois não há estresse térmico e, por mais que esteja no início da fase estacionária, devido ao à atividade mais lenta de enzimas glicolíticas e fermentativas em temperaturas menores, ainda há fontes de carbono, haja vista que a densidade média do meio foi de 1,017 kg/m³ para WLP565 e 1,018 kg/m³ para WLP036, o que indica a presença de maiores níveis de maltose e maltotriose no mosto se comparado à densidade de 1,010 kg/m³ (Cruz et al., 2012).

5.3.3 Expressão diferencial do gene *UBI4*

O gene *UBI4* codifica para uma ubiquitina de 76 resíduos altamente conservados (Finley et al., 2012). A conjugação dessa ubiquitina à proteínas marca-as para degradação seletiva por meio da via proteolítica, sendo essencial para a manutenção da homeostase celular ao sinalizar proteínas defeituosas para degradação via proteasoma ubiquitina-26S (Figura 3) (Finley et al., 2012). A expressão de *UBI4* ocorre durante estresse, sendo crucial para a recuperação e sobrevivência de células que estão passando por estresse térmico, falta de nitrogênio, exposição prolongada a condições que induzem esporulação e replicação de DNA em condição de estresse (Simon et al., 1999). Além disso, assim como *HSP30*, esse gene também é expresso quando as culturas de células entram em fase estacionária devido à depleção de nutrientes e também durante estresse oxidativo (Cheng et al., 1994; Treger et al., 1988). Em contrapartida, a expressão de *UBI4* está ligada às sequências regulatórias HSEs por meio do fator de transcrição Hsf1p e STREs, por meio de Msn2p e Msn4p, que contribuem independentemente para sua transcrição (Simon et al., 1999). Portanto, embora *HSP30* e *UBI4* sejam expressos em condições estressantes semelhantes, eles apresentam diferentes vias de sinalização e temperaturas para isso, uma vez que Hsf1p, Msn2p e Msn4p são acionados em limiares distintos (Simon et al., 1999).

Conforme pontuado na Figura 7, as maiores diferenças de expressão do gene *UBI4* foram demonstradas comparando-se WLP565 e WLP036 na temperatura de 25 °C com WLP565 cultivada a 15 °C, visto que WLP036 expressou valores similares nas duas temperaturas. É importante notar que WLP565 expressou valores maiores de *UBI4* na sua temperatura ideal (25 °C) do que a 15 °C, possivelmente devido à limitação de fontes de carbono ao entrar na fase estacionária, semelhante ao que ocorre com *HSP30*.

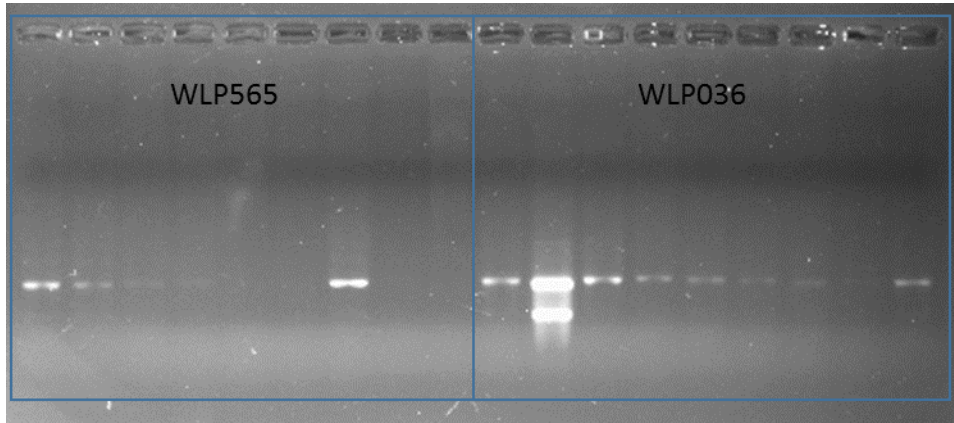
Observou-se também que, em ambas temperaturas, WLP036 expressou mais *UBI4* do que WLP565, indicando que essa cepa, aparentemente, expressa essa ubiquitina ao alcançar a fase estacionária. Por outro lado, ambas as cepas expressaram esse gene ao entrarem em fase estacionária, o que difere da expressão de *HSP30* que apresentou valores próximos de zero na temperatura de 15 °C. Assim, é possível que *UBI4* tenha o seu limiar de expressão menor que *HSP30* devido à limitação de nutrientes (e outros tipos de estresses, como osmótico e oxidativo), e com a atuação de diferentes fatores transcricionais responsivos a estresses (Simon et al., 1999).

6 Conclusão

Esse trabalho demonstrou que os marcadores *PMA1*, *HSP30* e *UBI4* possuem potencial para avaliar a condição fisiológica de leveduras cervejeiras expostas a diferentes condições de cultivo, como, por exemplo, a temperatura. Nesse sentido, foram evidenciadas características transcritômicas inerentes às diferentes cepas de *S. cerevisiae*, e também que os genes selecionados podem ter mecanismos transcricionais e pós-transcricionais próprios, dependente tanto da condição ambiental, quanto da genotípica. Contudo, serão necessárias mais pesquisas relacionadas à transcrição desses genes, incluindo análises em mais fases fermentativas (lag, exponencial e estacionária tardia), bem como análises fenotípicas (como a estimativa de porcentagem de células em cada uma das fases mitóticas) para que se obtenha uma resposta mais acurada quanto à expressão diferencial de *PMA1*, *HSP30* e *UBI4* em *S. cerevisiae* durante a fermentação de cervejas.

7 Figuras Suplementares

A



B

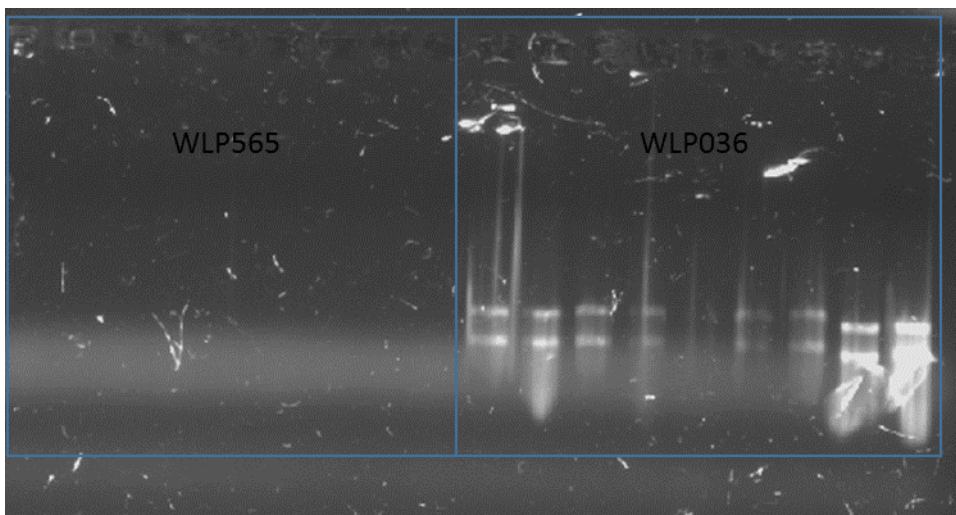


Figura suplementar 1. Análise qualitativa das 36 amostras de RNA extraída das cepas WLP565 e WLP036 ao alcançarem a fase estacionária nas temperaturas de 15 °C (A) e 25 °C (B) em gel de agarose.

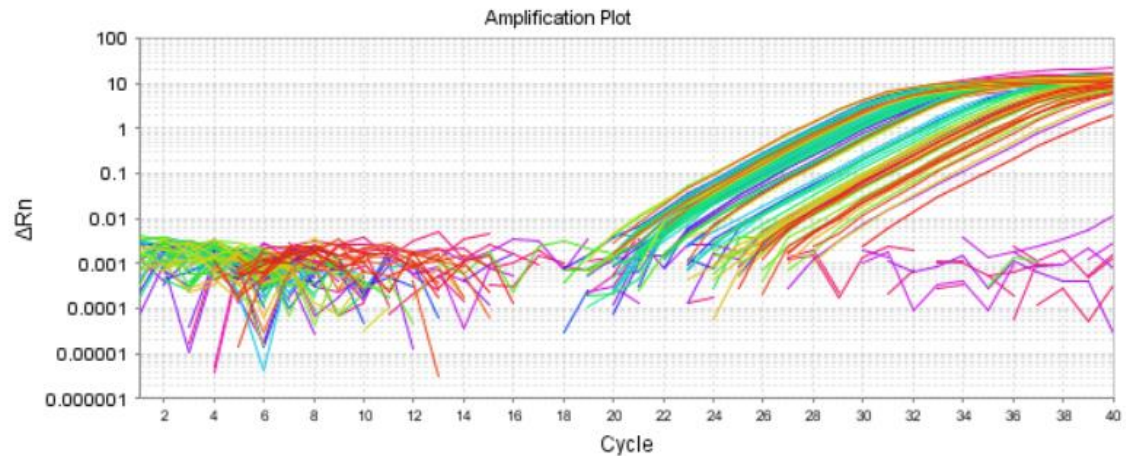


Figura suplementar 2. *Amplification plot* típico das reações e RT-qPCR após a amplificação dos genes *ACT1*, *PMA1*, *HSP30* e *UBI4* das cepas WLP565 e WLP036 ao alcançarem a fase estacionária nas temperaturas de 25 °C e 15 °C.

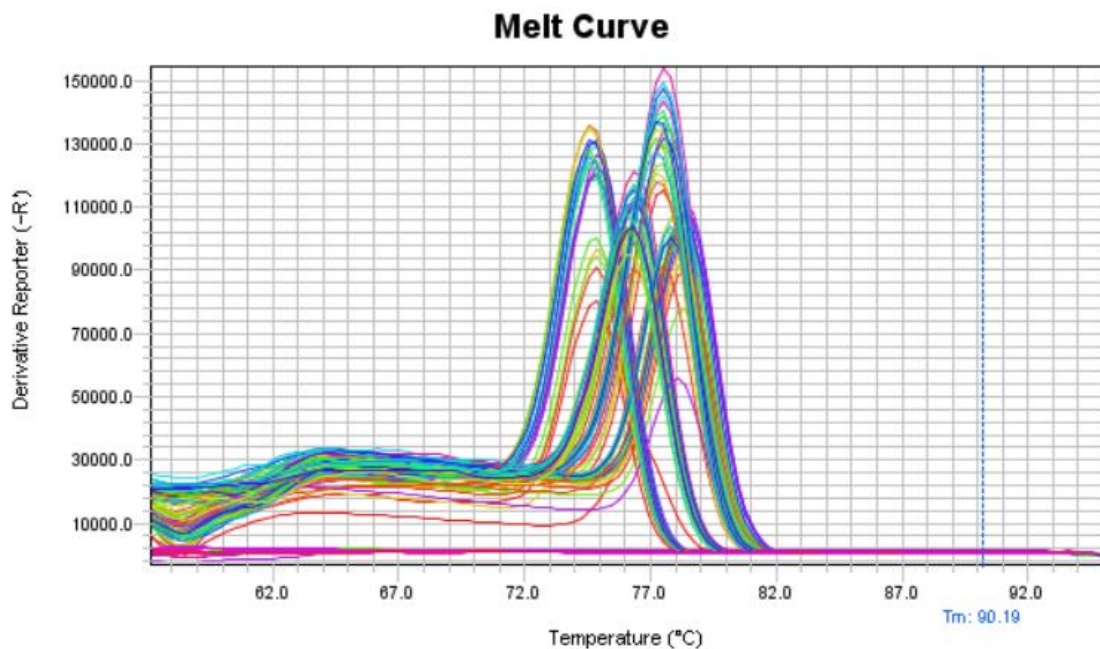


Figura suplementar 3. *Melting curve* típico das reações e RT-qPCR após a amplificação dos genes *ACT1*, *PMA1*, *HSP30* e *UBI4* das cepas WLP565 e WLP036 ao alcançarem a fase estacionária nas temperaturas de 25 °C e 15 °C.

8 Referências

- Boulton e Quain. *Brewing Yeast & Fermentation*. Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing company, 2001.
- Bisson LF, Fan Q, Walker GA. Sugar and Glycerol Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Advan in Experim Med and Biol*. 2016;892:11-31.
- Campetelli AN, Previtali G, Arce CA, Barra HS, Casale CH. Activation of the plasma membrane H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by glucose is mediated by dissociation of the H⁺-ATPase-acetylated tubulin complex. *FEBS J*. 2005;272:5742–52.
- Cheng L, Watt R, Piper PW. Polyubiquitin gene expression contributes to oxidative stress resistance in respiratory yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *MGG Mol Gen Genet*. 1994;243:358–62.
- Cruz LAB, Hebly M, Duong G-H, Wahl SA, Pronk JT, Heijnen JJ, Daran-Lapujade P, van Gulik WM. Similar temperature dependencies of glycolytic enzymes: an evolutionary adaptation to temperature dynamics. *BMC Syst Biol*. 2012;6:1.
- Eleutherio E, Panek A, De Mesquita JF, Trevisol E, Magalhães R. Revisiting yeast trehalose metabolism. *Curr Genet*. 2015;61:263-74.
- Eraso P, Mazón MJ, Portillo F. Yeast protein kinase Ptk2 localizes at the plasma membrane and phosphorylates in vitro the C-terminal peptide of the H⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2006;1758:164–70.
- Estrada E, Agostinis P, Vandenheede JR, Goris J, Merlevede W, François J, Goffeau A, Ghislain M. Phosphorylation of Yeast Plasma Membrane H⁺-ATPase by Casein Kinase I. *Biochemistry*. 1996;271:32064–72.
- Finley D, Ulrich HD, Sommer T, Kaiser P. The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2012;192:319–60.
- Fagan BM. *The Oxford Companion to Archaeology*. Oxford University Press, Oxford, 1996.
- Goossens A, de La Fuente N, Forment J Serrano R, Portillo F. Regulation of yeast H⁽⁺⁾-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol Cell Biol*. 2000;20:7654–61.
- Galeote VA, Alexandre H, Bach B, Delobel P, Dequin S, Blondin B. Sfl1p as an activator of HSP30 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 2007;52:55–63.
- García-Arranz M, Maldonado AM, Mazón MJ, Portillo F. Transcriptional control of yeast plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase by glucose. Cloning and characterization of a new gene involved in this regulation. *J Biol Chem*. 1994;18076–18082.
- Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JP, Powell CD, Smart KA. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev*. 2007;31:535-69.
- Gray JV, Petsko GA, Johnston GC, Ringe D, Singer RA & Werner- WashburneM. “Sleeping beauty”: quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Revs*. 2004;68:187–206.
- Hornesey IS. *A History of Beer and Brewing*. RSC paperbacks: Cambridge, 2003.

- Iida H, Yahara I. Yeast heat shock protein of Mr 48000 is an isoprotein of enolase. *Nature*. 1985; 315:688–690.
- Kuo MH, Grayhack E. A library of yeast genomic MCM1 binding sites contains genes involved in cell cycle control, cell wall and membrane structure, and metabolism. *Mol Cell Biol*. 1994;14:348–59.
- Legras J-L, Merdinoglu D, Cornuet J-M e Karst F. Bread, Beer and Wine: *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Ecol*. 2007;16:2091-102.
- Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet*. 1988;22:631–677.
- Lodolo EJ, Kock JL, Axcell BC, Brooks M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*-the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Res*. 2008;8:1018-36.
- Mager WH, De Kruijff AJ. Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol Rev*. 1995;59:506–31.
- Manchester KL. Value of A260/A280 Ratios for Measurement of Purity of Nucleic Acids. *BioTechniques*. 1995;19:208-210.
- Meena RC, Thakur S, Chakrabarti A. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Plasma membrane H⁺-ATPase (Pma1) by Dextrose and Hsp30 during Exposure to Thermal Stress. *Indian J Microbiol*. 2011;51:153–8.
- Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2012;190:1157-95.
- Munna MS, Humayun S, Noor R. Influence of heat shock and osmotic stresses on the growth and viability of *Saccharomyces cerevisiae* SUBSC01. *BMC Res Notes*. 2015;8:369.
- Ogden, R C e Adams D A, Electrophoresis in Agarose and Acrylamide Gels. *Methods in Enzymol*. 1987; 152:61-87.
- Panaretou B, Piper PW. The plasma membrane of yeast acquires a novel heat-shock (hsp30) and displays a decline in proton-pumping ATPase levels in response to both heat shock and the entry to stationary phase. *Eur J Biochem*. 1992;206:635–40.
- Piper PW, Ortiz-Calderon C, Holyoak C, Coote P, Cole M. Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase. *Cell Stress Chaperones*. 1997;2:12–24.
- Poletto NP, Henriques JAP, Bonatto D. Relationship between endoplasmic reticulum- and Golgi-associated calcium homeostasis and 4-NQO-induced DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*. 2010;192:247–57.
- Protz R. *Ultimate Encyclopedia of Beer*. Carlton Books Limited, Smithmark Pub, 1995.
- Ramos J, Sychrová H, Kschischo M. Yeast Membrane Transport. *Advan in Experim Med and Biol*. 2016; 892:11-31.
- Riezman H. Why do cells require heat shock proteins to survive heat stress? *Cell Cycle*. 2004;3:61-3.
- Sami M, Ikeda M, Yabuuchi AS. Evaluation of the Alkaline Methylene Blue Staining Method for Yeast Activity Determination. 1994;78:212–6.

Simon JR, Treger JM, McEntee K. Multiple independent regulatory pathways control UBI4 expression after heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1999;31:823–32.

Seymour IJ, Piper PW. Stress induction of *HSP30*, the plasma membrane heat shock protein gene of *Saccharomyces cerevisiae*, appears not to use known stress-regulated transcription factors. *Microbiol*. 1999;145,23 1-239.

Shalev A, Valasek L, Pise-Masison CA, Radonovich M, Phan L, Clayton J, He H, Brady JN, Hinnebusch AG, Asano K. *Saccharomyces cerevisiae* protein Pci8p and human protein eIF3/ Int-6 interact with eIF3 core complex by binding to eIF3 core complex subunits. *J Biol Chem*. 2001;276:34948–34957.

Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. Quantitative Real-time RT-PCR Data Analysis: Current Concepts and the Novel “Gene Expression’s C T Difference” Formula. *J of Molec Med*. 2006;84:901-10.

Treger JM, Heichman KA, McEntee K. Expression of the yeast UBI4 gene increases in response to DNA-damaging agents and in meiosis. *Mol Cell Biol*. 1988;8:1132–6.

Verghese J, Abrams J, Wang Y, Morano KA. Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012;76:115-58.

Yenush L. Potassium and Sodium Transport in Yeast. *Advan in Experim Med and Biol*. 2016;892:187-228.

Yu Z, Zhao H, Zhao M, Lei H, Li H. Metabolic Flux and Nodes Control Analysis of Brewer’s Yeasts under Different Fermentation Temperature during Beer Brewing. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;168:1938–52.

White C. e Zainasheff J. *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*. Brewers Association: Brewers Publications, 2010.

9 Adendo

ADVANCED DRAFT MANUSCRIPT

Molecular and Biochemical Aspects of *Brettanomyces* Fermentation Employed in Beer Industry

Marcelo Menoncin and Diego Bonatto

Biotechnology Center of the Federal University of Rio Grande do Sul, Department of
Molecular Biology and Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto
Alegre, RS, Brazil

Short title: *Brettanomyces* and brewing industry

***Corresponding Author:**

Diego Bonatto

Centro de Biotecnologia da UFRGS - Sala 219
Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Avenida Bento Gonçalves 9500 - Prédio 43421
Caixa Postal 15005
Porto Alegre – Rio Grande do Sul
BRAZIL
91509-900
Phone: (+55 51) 3308-6080
Fax: (+55 51) 3308-7309

Contract/grant sponsor: CNPq

Abstract

The fermentative process on brewing industry changed with the employment of single yeast strains. The use of single yeast strains allowed a better fermentative control process, and thus improving beer qualities. This way, the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* have been industrially used in beer fermentations of *ale* and *lager* beers, respectively. However, spontaneously fermented beers, like *Lambic* and *Gueuze*, contains distinct bacteria and wild yeasts species. In this sense, a semi-domesticated yeast genus which is crucial component of *Lambic* beers, *Brettanomyces* (*Dekkera*), is gaining increasingly attention on brewing industry. *Brettanomyces* display *Saccharomyces*-like features, as Crabtree effect, ethanol synthesis and tolerance to harsh environments. On the other hand, its higher β -glucosidase and esterase activities, capacity to form phenolic compounds, tetrahydropyridines, as well as ferment dextrins and metabolize cellobiose from wooden casks had made it attractive for breweries. Although *Brettanomyces* spp. is recognized by its importance in some beer styles, its molecular and biochemical features for brewing are poorly understood until now. Therefore, this review aim to approach the current molecular knowledge and the biochemistry underlying the performance of *Brettanomyces* on brewing industry.

Keywords: *Brettanomyces bruxellensis*, brewing, Crabtree effect, Custers effect, β -glucosidase, acetic acid, esters, phenolic compounds.

Introduction

Beer, being an oldest biotechnological product, have significant nutritional, social, scientific and economic impact in all societies that combine cereal's malts, hop and/or different herbs, and water to create a syrupy liquid (wort) that is further fermented by indigenous yeast/bacteria or by pure cultures of *Saccharomyces* sp.. In this sense, archeological data suggest that beer was initially made by the first agriculturist societies at approximately 10,000 years ago, coinciding with cereal domestication (Fagan, 1996). Nowadays, the consumption of the beer is increasing worldwide and, consequently, the beer industry is experimenting a constant and positive growing rate, which is linked with employments generation, affecting micro- and macro economies (<http://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production>, <http://www.statista.com/chart/3568/craft-beer-in-2014/>). Hence, scientific researches involving beer constituents remain substantial to support the advancement on beer knowledge and development.

With regard to beer components, the discovery that yeasts is responsible for beer fermentation came only in 1860s as the consequence of Louis Pasteur's work (Barnett 1998). Hence, yeast knowledge and domestication allows a better control on fermentation process and a quality improvement of the final product. Nowadays, there are a plenty of different yeast strains used on brewing. These strains are composed by *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* and semi-domesticated unconventional species. A non-conventional brewing yeast genus that is gaining increasingly attention due its unique features is *Dekkera/Brettanomyces*. The first mention of this genus came from N. Hjelte Claussen in 1904 while searching at the Carlsberg brewery for the components that leads to the peculiar characteristics of some English stock ales (e.g., copious and lasting foam, acid, and volatile substances) (Claussen, 1904). *Brettanomyces* and its teleomorph form *Dekkera* are mainly associated with wine spoilage (Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003). On the other hand, *Brettanomyces/Dekkera* contribution to flavor, aroma and attenuation is well recognized in Belgian beer styles like Lambic and Gueuze (D. Van Oevelen, 1976). Besides that, it has an important role on secondary conditioning of Trappist beers (Vanderhaegen et al., 2003) and English stock ales (Claussen, 1904).

Brettanomyces has a high esterase activity, a group of enzymes responsible for the biosynthesis of fruit-like esters (Spaepen and Verachtert, 1982). Additionally, *Brettanomyces* spp. release flavor-active compounds in response to β -glucosidase activity, which breaks down glycosides from hops or fruits to aglycones (e.g., linalool) (Daenen et al., 2008a). Additionally, *Brettanomyces* spp. release volatile phenols as 4-vinylguaiacol and tetrahydropyridines (clove and cracker biscuit-like flavors, respectively) in beer (Cabrita et al., 2012; Kosel, Čadež and Raspor, 2014).

Although *Brettanomyces* spp. is recognized by its importance on wine and beer fermentation, its molecular and biochemical features for brewing are poorly understood until now. Thus, the aim of this work is to review the current knowledge about the molecular and biochemical pathways, as well as its biotechnological potential on brewing industry, especially focusing on aromatic compounds biosynthesis.

***Brettanomyces/Dekkera* Taxonomy**

The name *Brettanomyces* is derived from the greek meaning "British fungus" (Claussen, 1904). However, it was not the first name gave to this genus, which was actually included on *Torula* species (Gilliland 1961). Likewise, species belonging to genus *Brettanomyces* undergo many reclassifications through the years, and even presently, its taxonomy is still not well defined. Currently, the genus *Brettanomyces* includes five species recognized within the anamorph (asexual) form and two species within the teleomorph (sexual) form. The anamorph forms are *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardenensis*, and *Brettanomyces nanus*. By its turn, teleomorph are *Dekkera bruxellensis* and *Dekkera anomala* (Boekhout et al., 1994; Cocolin et al., 2004; Oelofse, Pretorius and du Toit, 2008). Since the molecular differences between anamorph and teleomorph species are arguable, *Dekkera* and *Brettanomyces* are often take as synonyms and throughout this article it will be mentioned as *Dekkera/Brettanomyces*.

Several biochemical and molecular features were used to reconstruct *Dekkera/Brettanomyces* phylogeny. The data included cellular morphology, physiologic comparisons (i.e. metabolization abilities related to different carbon sources such as

glucose and maltose), single nucleotide polymorphisms (SNP's) of coenzyme Q, along with DNA similarities (e.g. rDNA 26S) and isozymes (Boekhout et al., 1994). Nowadays, next generation genomic sequencing is providing an easier and faster comparison between orthologous, turning the distinction amongst species simpler (Curtin et al., 2012).

Current phylogeny places this genus within the clade of the methylotropic species *Komagetalla (Pichia) pastoris*, *Kuraishia capsulata* and *Ogataea polymorpha*, thus forming an 'intermediate' evolutionary group between the Saccharomycetaceae and CTG clades (Curtin et al., 2012). However, a multi-gene phylogeny positioned *K. pastoris* out of the clade that contains *Brettanomyces* (Kurtzman and Robnett, 2013).

There is another names utilized by yeast manufacture towards beer industry that is technically incorrect and belong to older nomenclature. An example is *Brettanomyces lambicus* taken as an important organism composing the spontaneously fermented Lambic beers. It is actually a strain of the species *Brettanomyces bruxelensis*. Other synonyms for this species are *B. abstinens*, *B. custersii* and *B. intermedius*. For *B. anomalus* there is just one (*B. claussenii*). Furthermore, regarding teleomorph form, *D. bruxellensis* has one synonym, which in some research are mentioned as *D. intermedia* (Smith, Yamazaki and Poot, 1990). Since *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* is the best-known specie within this genus, the majority molecular information gathered in this article came from surveys with this specie.

1 - The profile of *Brettanomyces* beer fermentation

Although 200 million years phylogenetically distant from *Saccharomyces cerevisiae*, these species share with *S. cerevisiae* a plenty of phenotypic characteristics that are of interest of beverage industry involving biochemical (Crabtree effect and biosynthesis of flavor active compounds) and molecular (transcriptomic plasticity to deal with stress-inductive environments) aspects (Rozpędowska et al., 2011). These two organisms have converged to similar niches (i.e. fruit peels, beer fermenters and casks, among others) in which both evolved in a way to utilize carbon sources mainly through fermentation (Rozpędowska et al. 2011). Although relying different biochemical and molecular mechanisms, both species fall in the scope of beer industry interest as it

produce high amounts of ethanol by anaerobic fermentation (in which both reach concentration as far as 14 % abv (w/v), capacity to grow in anaerobic and acidic environments, support high osmotic pressure and environments with low levels of nutrients. (Nardi, Remize and Alexandre, 2010; Rozpędowska et al., 2011). In this sense, the main characteristics evolving *Brettanomyces* beer fermentation profile are described below.

1.1 - Crabtree effect and Ethanol Yield

As well as *S. cerevisiae*, *Brettanomyces* species display the Crabtree effect. This biochemical mechanism consists in the aerobic catabolic repression when a fermentable carbon source is presented above 2% (w/v) even in the presence of molecular oxygen (De Deken, 1966). The Crabtree effect allows the yeast to rapidly assimilate glucose and generate ethanol, thus inhibiting the growth of potential competing microorganisms. In this sense, the Crabtree effect is part of the "make-accumulate-consume" strategy used by several microorganisms, where ethanol will be aerobically utilized as carbon source after glucose depletion (De Deken 1966; Rozpędowska et al. 2011).

The Crabtree effect also provides more ATP molecules in comparison to aerobic metabolism when high levels of glucose are available due to the fast metabolization of glucose through glycolytic/fermentative pathways (De Deken, 1966).

Genes linked to fast growth (coding to enzymes involved in rRNA biosynthesis, formation of pyrimidines, RNA helicases, proteins linked to RNA biogenesis and transport, among others) and respiration, also known as MRP (coding to mitochondrial ribosomal proteins, i.e. MRPs, proteins necessary to mitochondrial respiratory complex, ions transport to the cytochrome oxidase, among others) has a fixed promoter motif (AATTTT) in closely related species of *S. cerevisiae* and *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* (i.e. *K. lactis*, *Ashbya gossypii*, *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii* and *K. waltii*). Nevertheless, *Saccharomyces cerevisiae* and *Dekkera/Brettanomyces* suffered a promoter rewiring, resulting in a loss of this motif in those genes associated to respiration. Therefore, in *S. cerevisiae* as well as in *D/B. bruxellensis*, this motif is absent at a permanent position in genes linked to respiration (in the case of *D/B. bruxellensis*, approximately 90% of them). Thus, it causes a significant decrease in respiration-

associated gene expression with respect to cell growth in a medium containing available fermentable carbon sources as the fermentation-associated genes are expressed at higher levels than those of respiration (Galafassi et al., 2011).

Ethanol yield is normally obtained above 14% (v/v) using *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* (Rozpędowska et al., 2011), also being employed for the manufacture of high gravity beers (HGB) or “imperialized” craft beers that contain an elevated concentration of ethanol by volume (abv %).

1.2 - Custers Effect

It is known that in *Dekkera/Brettanomyces* genera the absence of oxygen, inhibits its fermentative metabolism (Carrascosai et al. 1981). In this sense, glucose fermentation is effective in the presence of oxygen or organic (H⁺) acceptors (e.g., acetone, acetoin, dihydroxyacetone) (Carrascosai et al., 1981). The inability to ferment without oxygen was firstly named "negative Pasteur effect" and posteriorly named Custer effect (Barnett and Entian 2005). Biochemical and molecular mechanisms that drive this effect are still not fully understood. However it is known that continuous production of acetate from acetaldehyde promotes the accumulation of NADH, causing a redox imbalance (NAD⁺/NADH) that stop glycolysis and fermentation, causing a relative extended lag phase when cells are switched from aerobic to anaerobic environment which could be ameliorated with addition of H⁺ acceptors. In the presence of oxygen/H⁺ acceptors, NADH and NADPH are oxidized during aerobic metabolism, restoring redox balance (Gaunt, Degen and Lloyd 1988). Additionally, it was found that *Dekkera/Brettanomyces* cells strongly express NADH-ubiquinone reductase (part of mitochondrial complex I) when growing in semi-anaerobic medium (Tiukova et al., 2013). Thus, in semi-anaerobic environments, there is more NADH-generating enzymes expressed in contrast to NAD⁺-generating enzymes, which explain why NAD⁺/NADH imbalance occurs (Steensels et al., 2015). Nevertheless, there are some pathways that can partly and slowly restore the NAD⁺/NADH balance. These mechanisms involve reoxidation of NADH, therefore providing NAD⁺ for the metabolism of glyceraldehyde 3-phosphate to 1,3-bisphosphoglycerate during glycolysis. One of these features is the capacity to utilize

nitrate as a sole nitrogen source, since nitrate assimilation and metabolism require NADH and NADPH as electron donors. Interestingly, nitrate metabolism abolishes Custers effect, therefore improving fermentation in anaerobic environments (Galafassi et al., 2013). Moreover, reactions involving NAD reoxidation include the metabolism of hydroxycinnamic acids (p-coumaric and ferulic) present in beer environments. *S. cerevisiae* does not display the Custers effect phenotype, which means that *Dekkera/Brettanomyces* evolved in a different way with regard to fermentation as *Saccharomyces* spp. did. In this sense, as this phenotype is strictly oxygen-linked, especial attention may be paid on wort oxygenation after mashing as its levels deeply impart overall beer characteristics, especially when *Dekkera/Brettanomyces* is chosen for fermentation.

1.3 - Acetic Acid Biosynthesis

Dekkera/Brettanomyces spp. may synthesize considerable quantities of acetic acid and can potentially use it as a non-fermentative carbon source. The acetic acid acidifies the medium, inhibiting the growth of potential competitors. It was reported that *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* is able to survive in pH as low as 2.3, while *S. cerevisiae* tolerates no more than a pH value of 3.2 (Rozpędowska et al., 2011). High acetic acid yields in *Brettanomyces/Dekkera* are associated with fermentative metabolism. Acetaldehyde from pyruvate is enzymatically oxidized to acetate in response to NAD⁺-aldehyde dehydrogenase activity. Since acetyl-CoA synthetase activity is strongly repressed in sugar-rich environments in response to the Crabtree effect, expressive quantities of acetic acid are generated (Gerós, Azevedo and Cássio, 2000). It was show that acetate biosynthesis in *Dekkera anomala* IGC 5153 is induced in the presence of 2% (w/v) of glucose, while in culture medium with low sugar concentrations acetic acid was not synthesized (Gerós, Azevedo and Cássio, 2000). Otherwise, acetogenic *Brettanomyces abstinens* (currently *B. bruxellensis*) apparently shows NAD⁺-aldehyde dehydrogenase activity even in presence of low glucose amounts, like 0.3 % (w/v) (Carrascosai et al., 1981).

It is know that high oxygen concentration stimulates acetic acid synthesis, where a beer wort fermented with high levels of oxygen will contain a high concentration of acetic acid as well as more acetate-dependent esters will be formed. The presence of acetic

acid is considered a positive characteristic in some beer styles, especially in spontaneously fermented barrel-aged beers as Lambic, Gueuze, Flandres Red Ale and Coolship Ales (Tonsmeire, 2014).

1.4 - Volatile esters and *Brettanomyces*

Esters is one of the main flavor compounds of top fermented beers (ale) and has a notable importance in spontaneously fermented Lambic and Gueuze beers. (Spaepen and Verachtert, 1982; Pires et al., 2014). During beer production, several esters are produced by a yeast strain-dependent fashion, where its presence can impart beers either positively (fruit taste) or negatively (solvent-like aroma, excessive fruitiness). The initial conditions of beer fermentation like temperature, wort composition and aeration directly affect the overall amount of esters produced (Spaepen and Verachtert, 1982; Pires et al., 2014).

There are two groups of volatile esters present in beer, which are the acetate esters and medium-chain fatty acid (MCFA) ethyl esters. It is known that *Saccharomyces cerevisiae* harbor four enzymes that are responsible for acetate and MCFA ester formation, while ester-synthesizing enzymes in *Brettanomyces/Dekkera* spp. were not studied yet. In *S. cerevisiae*, acetate esters production depends on two enzymes: alcohol acetyl-transferase I and II (AATases I and II) and MCFA esters rely ethanol acyl-CoA/ethanol *O*-acyltransferases (AEATases) activity (Pires et al. 2014).

While biochemical knowledge regarding ester biosynthesis on *Brettanomyces* is unknown, the data indicate that *B. bruxellensis* is capable to produce a large amount of acetate and MCFA esters. These esters include ethyl acetate, ethyl lactate, isoamyl acetate and phenethyl acetate, found mainly in Gueuze, Lambic beers and American Coolship Ales (Spaepen and Verachtert, 1982). In addition, *Brettanomyces* accumulates C8 to C12 fatty acids in high concentrations and metabolize them to their respective esters, indicating an elevated β -oxidation activity. The esters levels found in beer are influenced by the presence of other microorganisms like acetic- and lactic acid bacteria, whose fermentation by-products are substrate for esters synthesis (Bokulich, Bamforth and Mills 2012; Spaepen, Oevelen and Verachtert, 1978). Little is known about *Brettanomyces* ester composition regarding pure culture fermentation.

1.5 - Role of *Brettanomyces* on Aromatic Phenolic Synthesis

Volatile phenols comprise a group of aromatic molecules often found in fermented alcoholic beverages. Its presence arises mainly from the metabolism of hydroxycinnamic acids (HCAs) provenient from barley and hops during fermentation by some bacteria and yeast. Similarly to esters, volatile phenols can contribute to aroma (spicy, clove, smoky) as well as off-flavors (phenolic, medicinal, stable, barnyard).

Volatile phenols are required in beer styles like American Coolship Ale, Flandres Red Ale, Lambic, Fruit Lambic, Oud Bruin (all with *Brettanomyces* presence) and new craft beer creations. In this sense, *Brettanomyces* spp. have the ability to produce these strong aromatic compounds using cinnamate decarboxylase (CD) and vinylphenol reductase (VPR). (Heresztyn, 1986; Chatonnet et al., 1992; Tchobanov et al., 2008; Harris et al., 2009).

While genes coding to CD and VPR remain unidentified in *Brettanomyces*, it is known that synthesis of volatile phenols occurs in two enzymatic sequential steps: (I) decarboxilation of p-coumaric and ferulic acids to their correspondent hidroxytyrenes (4-vinylphenol and 4-vinylguaiacol) by cinnamate decarboxylase, and (ii) reduction of these molecules to 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol by vinylphenol reductase. In addition to these phenolics, it was also found that 4-ethylcatechol is synthesized from caffeic acid in low amounts (Edlin et al., 1998; Cabrita et al., 2012). It should be pointed that some *Saccharomyces cerevisiae* strains also synthesize hidroxytyrenes but no hydroxyccinnamic acids. In this sense, hidroxytyrenes synthesis arise from the activity of both phenyl acrylic acid decarboxylase (*PADI*) and putative ferulic acid decarboxylase (*FDCI*), whose codify merely to cinnamate decarboxylase (Mukai et al., 2010). The phenotype of *S. cerevisiae* strains which harbor hidroxytyrenes synthesis responsible-enzymes are known as positive phenolic off flavor (pof+).

The production of ethylphenols is strain and environment dependent. Kosel et al. demonstrate that in pure culture fermentation, HCAs are quickly and completely converted to vinylphenols. However, 30% less conversion to ethylphenols was obtained in mixed cultures with *Brettanomyces/Dekkera* and *S. cerevisiae*. Thus, it was possible to infer that *Brettanomyces/Dekkera* have a metabolic preference for HCAs instead directly

uptake vinylphenols synthesized by *S. cerevisiae*. This hypothesis was corroborated by showing that VPR gene was less expressed in mixed fermentation culture, where smaller amounts of 4-vinylphenol and 4-vinylguaiacol were available (Kosel, Čadež and Raspor, 2014).

1.6 – α - And β -Glucosidase Activity and Flavor Active Aglycones

The genus *Brettanomyces* can express β -glucosidase enzyme, which is responsible for the metabolization of glycosides to aglycones (flavor-active molecule), allowing *Dekkera/Brettanomyces* to metabolize sugars (e.g., cellobiose) present in wood barrels.

Considering, glycosides these molecules are converted to di – or triglycosides (β -D-glucosides) by glycosidase that are further hydrolyzed by the enzyme 1,4- β -glucosidase, resulting in aglycones (molecules that suggest spice and cherry-like aromas to beer) (Sarry and Günata, 2004). It has been described that some *Saccharomyces* strains has the ability metabolize glycosides to aglycones by the activity of exo- β -glucanase (Exg1p). However, the metabolism of glycosides is apparently higher in *Brettanomyces* spp. In this sense, Daenen et al. found a cell-associated β -glucosidase with a broader activity in a Lambic-isolated *Brettanomyces custersii* LD72 (Daenen et al. 2008). The β -glucosidase enzyme of *Brettanomyces custersii* LD72 was able to release different aglycones, like trans-2-hexen-1-ol, benzaldehyde, benzyl alcohol, eugenol, trans- and cis-isoeugenol, methyl salicylate and geraniol (Daenen et al., 2008b). This study also preliminary demonstrate that amygdalin hydrolysis, resulting in benzaldehyde, benzyl alcohol and benzyl acetate, can occur in response to activity of glycoside hydrolase in some *Brettanomyces* species (Daenen et al., 2008b).

Besides the capacity of forming aglycones, the presence of β -Glucosidase in *Dekkera/Brettanomyces* also allows it to utilize sugar present in oak barrels as cellobiose. It was reported that the last phases of Lambic fermentation (i.e 13th–24th month) is dominated mainly by *Brettanomyces custersii*. In this regard, it has been suggested that the metabolization of cellobiose released from the wooden casks supports this species to thrive at this stage of fermentation (Vanderhaegen et al. 2003, Verachtert and Dawoud, 1984). The capacity to utilize oak-released sugar allow *Brettanomyces* spp. to form biofilms in the wood, and once established in this environment, it is hard to clean it, so when this happens in winery, they are incinerated. On the other hand, breweries that

require *Brettanomyces* primary or secondary fermentation reutilize barrels with this yeast in order to incorporate "Brett" features to the beer and decrease next batch pitching rate (i.e. initial cell number at fermentation beginning) as fermentation begins with considerable cell number bound to the barrel interior (White and Zainasheff, 2010).

It should be also pointed that the characteristic associated with wort overattenuating properties of *Brettanomyces spp.* came also because it harbours α -glucosidase-coding gene. α -glucosidase activity is linked with metabolization of maltodextrins resulting from high mashing temperatures in which *S. cerevisiae* is not able to utilize as a carbon source (Kumara, De Cort and Verachtert 1993).

Genomic organization

The only representative of *Brettanomyces* that have its genome sequenced is *Brettanomyces bruxelensis* (strains AWRI1499, CBS2499, AWRI1608 and AWRI1613) (Curtin et al., 2012; Piškur et al., 2012). Therefore, the genome and transcriptome of the other *Brettanomyces* species is virtually unknown.

In terms of chromosome number, it was found a variation between four and nine chromosomes within *D. bruxellensis* strains, with lengths from less than 1 Mpb to more than 6 Mpb. (Hellborg and Piškur, 2009). From the comparison of allele proportions at heterozygous sites for the four *B. bruxellensis* strains it was possible to infer a triploid genome for the former two and a diploid for the last two (Borneman et al., 2014). *B. bruxellensis* strains with triploid genome harbor a common chromosome double copy and an unusual set of other chromosomes. The presence of the third chromosome is probably linked to sulphite resistance in wineries (Borneman et al., 2014). In the same way, its occurrence could confers selective advantages in nutrient-scarce environments like post-fermented wine and beer (e.g. nitrate and remaining carbohydrates uptake and tolerance to ethanol and osmotic pressure).

Considering genome data, *Brettanomyces bruxelensis* have approximately 5.400 genes with similar introns content found in *Saccharomyces cerevisiae* and other hemiascomycetes (approximately 4% of the genes) (Woolfit et al., 2007; Curtin et al.,

2012). Many of these genes encode enzymes and transporters related to nitrogen and lipid metabolism, allowing this yeast to survive in environments with low nutrient offer (Curtin et al., 2012). Similarly to *S. cerevisiae*, *Dekkera/Brettanomyces* genus are able to form petite mutants resulting from mutations on mtDNA, being respiration deficient (C. R. McArthur and G. D. Clark-Walker, 1997).

Genes and Transcription Factors in Stress Conditions

It has been described that *Brettanomyces* can tolerate situations much more severe than *S. cerevisiae*, displaying growth after the main fermentation made by *S. cerevisiae* in both beer and wine, which contains high levels of ethanol and low concentration of dissolved oxygen. The capacity of *Brettanomyces* spp. to survive harsh environments are associated with its cell wall structure, displaying proteins involved in adhesion, cell wall budding and pseudohyphal growth (Woolfit et al., 2007; Curtin et al., 2012). Moreover, it has been suggested that *Brettanomyces* utilize N sources with more effectiveness than *S. cerevisiae* (Conterno et al., 2006; De Barros Pita et al., 2011). Unlike *S. cerevisiae*, *Brettanomyces/Dekkera* can utilize nitrate as a sole nitrogen source (De Barros Pita et al., 2011). Nitrate assimilation is due to genes that codify to nitrate transporter (*YNT1*), nitrate reductase (*YNR1*) and nitrite reductase (*YNR1*), along with two transcription factors important for the utilization of this N source (*YNA1* and *YNA2*) (Woolfit et al., 2007). Several genes coding to membrane-associated proteins involved in alternative carbon metabolism are present in this genus, allowing *Dekkera/Brettanomyces* to use chitin, N-acetylglucosamine, galactose, mannose and lactose (Woolfit et al., 2007; Curtin et al., 2012). Moreover, important genes involved in stress-tolerance like *ATP1*, *ERG6* and *VPS34* along with stress regulators *MSN4*, *SNF1*, *HSP82*, *NTH1* has a particular expression in *Brettanomyces bruxellensis* (Nardi, Remize and Alexandre, 2010). These differences in gene expression along with remarkable ability to uptake scarce nutrients explain at some extent why this genus can survive in situations when *Saccharomyces* spp. probably would not be able.

References:

- Boekhout T, Kurtzman CP, O'Donnell K et al. Phylogeny of the yeast genera *Hanseniaspora* (anamorph *Kloeckera*), *Dekkera* (anamorph *Brettanomyces*), and *Eeniella* as inferred from partial 26S ribosomal DNA nucleotide sequences. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:781–6.
- Borneman AR, Zeppel R, Chambers PJ et al. Insights into the *Dekkera bruxellensis* Genomic Landscape: Comparative Genomics Reveals Variations in Ploidy and Nutrient Utilisation Potential amongst Wine Isolates. *PLoS Genet* 2014;10.
- C. R. McArthur and G. D. Clark-Walker. Mitochondrial DNA Size Diversity in the *Dekkera/Brettanomyces* Yeasts. *Nurse Pract* 1997;22:153.
- Cabrita MJ, Palma V, Patão R et al. Conversion of hydroxycinnamic acids into volatile phenols in a synthetic medium and in red wine by *Dekkera bruxellensis*. *Ciência e Tecnol Aliment* 2012;32:106–12.
- Carrascosai JM, Dolores M, I Inuiezdec et al. Metabolism of acetaldehyde and Custers effect in the yeast *Brettanomyces abstinentis*. 1981;47:209–15.
- Chatonnet P, Dubourdieu D, Boidron J et al. The origin of ethylphenols in wines. *J Sci Food Agric* 1992;60:165–78.
- Claussen NH. On a Method /or the Application of Hanseris Pure Yeast System in the Manufacturing of Well- Conditioned English Stock Beers. 1904.
- Cocolin L, Rantsiou K, Iacumin L et al. Molecular Detection and Identification of *Brettanomyces* / *Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces* / *Dekkera anomalous* in Spoiled Wines. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:1347–55.
- Conterno L, Joseph CML, Arvik TJ et al. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *Am J Enol Vitic* 2006;57:139–47.
- Curtin CD, Borneman AR, Chambers PJ et al. De-novo assembly and analysis of the heterozygous triploid genome of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* AWRI1499. *PLoS One* 2012;7:e33840.
- Van Oevelen D, l'Escaille F and Verachtert H. Synthesis of aroma components during the spontaneous fermentation of lambic and gueuze. *J. Inst. Brew.* 1976;82:322–6.
- Daenen L, Saison D, Sterckx F et al. Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. *J Appl Microbiol* 2008a;104:478–88.
- Daenen L, Sterckx F, Delvaux FR et al. Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) used in the production of special fruit beers. *FEMS Yeast Res* 2008b;8:1103–14.
- De Barros Pita W, Leite FCB, De Souza Liberal AT et al. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* 2011;100:99–107.
- De Deken RH. The Crabtree Effect : A Regulatory System in Yeast. *J. Gen Microbiol* 1966:149–56.
- Edlin DAN, Narbad A, Gasson MJ et al. Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalous*. *Enzyme Microb Technol* 1998;22:232–9.

- Edlin DAN, Narbad A, Gasson MJ, Dickinson JR & Lloyd D (1998) Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*. *Enzyme Microb Technol* 22: 232–239.
- Fagan BM. *The Oxford Companion to Archaeology*. Oxford: Oxford University Press, 1996.
- Galafassi S, Capusoni C, Mokatduzzaman M et al. Utilization of nitrate abolishes the “Custers effect” in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2013;40:297–303.
- Galafassi S, Merico A, Pizza F et al. *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011;38:1079–88.
- Gerós H, Azevedo MM, Cássio F. Biochemical Studies on the Production of Acetic Acid by the Yeast *Dekkera anomala*. *Food Technol Biotechnol* 2000;38:59–62.
- Gilliland R. *Brettanomyces*. I. Occurrence, characteristics, and effects on beer flavour. *J Inst Brew* 1961;67.
- Harris V, Ford CM, Jiranek V et al. Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;81:1117–27.
- Hellborg L, Piškur J. Complex nature of the genome in a wine spoilage yeast, *Dekkera bruxellensis*. *Eukaryot Cell* 2009;8:1739–49.
- Heresztyn T. Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. *Arch Microbiol* 1986;146:96–8.
- Hornsey IS. *A History of Beer and Brewing*. Cambridge: RSC paperbacks, 2003.
- Unger RW. *Beer in the Middle Ages and the Renaissance*. University of Pennsylvania: University of Pennsylvania Press, 2004.
- Kosel J, Čadež N & Raspor P. Factors affecting volatile phenol production during fermentations with pure and mixed cultures of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol Biotechnol* 2014; 52: 35–45.
- Kurtzman CP, Robnett CJ. Relationships among genera of the Saccharomycotina (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species. *FEMS Yeast Res* 2013;13:23–33.
- Loureiro V & Malfeito-Ferreira M. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int J Food Microbiol* 2003;86: 23–50.
- Mukai N, Masaki K, Fujii T et al. PAD1 and FDC1 are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* 2010;109:564–9.
- Nardi T, Remize F & Alexandre H. Adaptation of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces bruxellensis* to winemaking conditions: a comparative study of stress genes expression. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;88: 925–937.
- Oelofse a., Pretorius IS, du Toit M. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking: A Synoptic Review. *South African J Enol Vitic* 2008;29:128–44.

- Pires EJ, Teixeira J a, Brányik T & Vicente A. Yeast: the soul of beer's aroma--a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*.2014;98: 1937–1949.
- Pires EJ, Teixeira J a, Brányik T et al. Yeast: the soul of beer's aroma--a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;98:1937–49.
- Piškur J, Ling Z, Marcet-Houben M et al. The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. *Int J Food Microbiol* 2012;157:202–9.
- Rozpędowska E, Hellborg L, Ishchuk OP et al. Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nat Commun* 2011;2:302.
- Sarry JE, Günata Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem* 2004;87:509–21.
- Scheffers W a. Stimulation of fermentation in yeasts by acetoin and oxygen. *Nature* 1966;210:533–4.
- Smith MTH, Yamazaki M, Poot GA. *Dekkera*, *Brettanomyces* and *Eeniella*: Electrophoretic Comparison of Enzymes and DNA-DNA Homology. *Yeast* 1990;6:299-310.
- Spaepen BM, Oevelen D Van & Verachtert H. Fatty acids and esters produced during the spontaneous fermentation of lambic and gueuze. *J Inst Brew* 1978; 84: 278–282.
- Spaepen M, Verachtert H. Esterase activity in the genus *Brettanomyces*. *J Inst Brew* 1982;88:11-17.
- Spitaels F, Wieme AD, Janssens M et al. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PLoS One* 2014;9:e95384.
- Steensels J, Daenen L, Malcorps P et al. *Brettanomyces* yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int J Food Microbiol* 2015;206:24–38.
- Tchobanov I, Gal L, Guilloux-Benatier M et al. Partial vinylphenol reductase purification and characterization from *Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Microbiol Lett* 2008;284:213–7.
- Tiukova IA, Petterson ME, Tellgren-Roth C et al. Transcriptome of the Alternative Ethanol Production Strain *Dekkera bruxellensis* CBS 11270 in Sugar Limited, Low Oxygen Cultivation. *PLoS One* 2013;8.
- Tonsmeire M. American Sour Beer: Innovative Techniques for Mixed Fermentations. Brewers Association: Brewers publications, 2014.
- Vanderhaegen B, Neven H, Coghe S et al. Bioflavoring and beer refermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003;62:140–50.
- Verachtert H. and Dawoud E. Microbiology of lambic-type beers. *Journal of Applied Bacteriology*, 1984;57, R11–R12.
- White C. and Zainasheff J. Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation. Brewers Association: Brewers Publications, 2010.
- Wijsman MR, van Dijken JP, van Kleeff BH & Scheffers WA. 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*. 1984;50:183–192.

Wikén T, Scheffers W a., Verhaar a. JM. On the existence of a negative pasteur effect in yeasts classified in the genus *Brettanomyces* Kufferath et van Laer. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1961;27:401–33.

Woolfit M, Rozpędowska E, Piškur J et al. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis*. *Eukaryot Cell* 2007;6:721–33.

Figure legends:

Figure 1. Schematic overview of the main metabolic pathways of *Brettanomyces* spp. during beer fermentation focusing on the key enzymes linked to flavor active compounds biosynthesis and redox balance (NAD⁺/NADH) regulation associated with Custers effect.

Figure 2. Comparison table (presence/absence) between the genus *Brettanomyces* and *Saccharomyces* regarding overall characteristics of its brewing species and flavor-active compounds biosynthesized during beer fermentation.

Figures:

Figure 1.

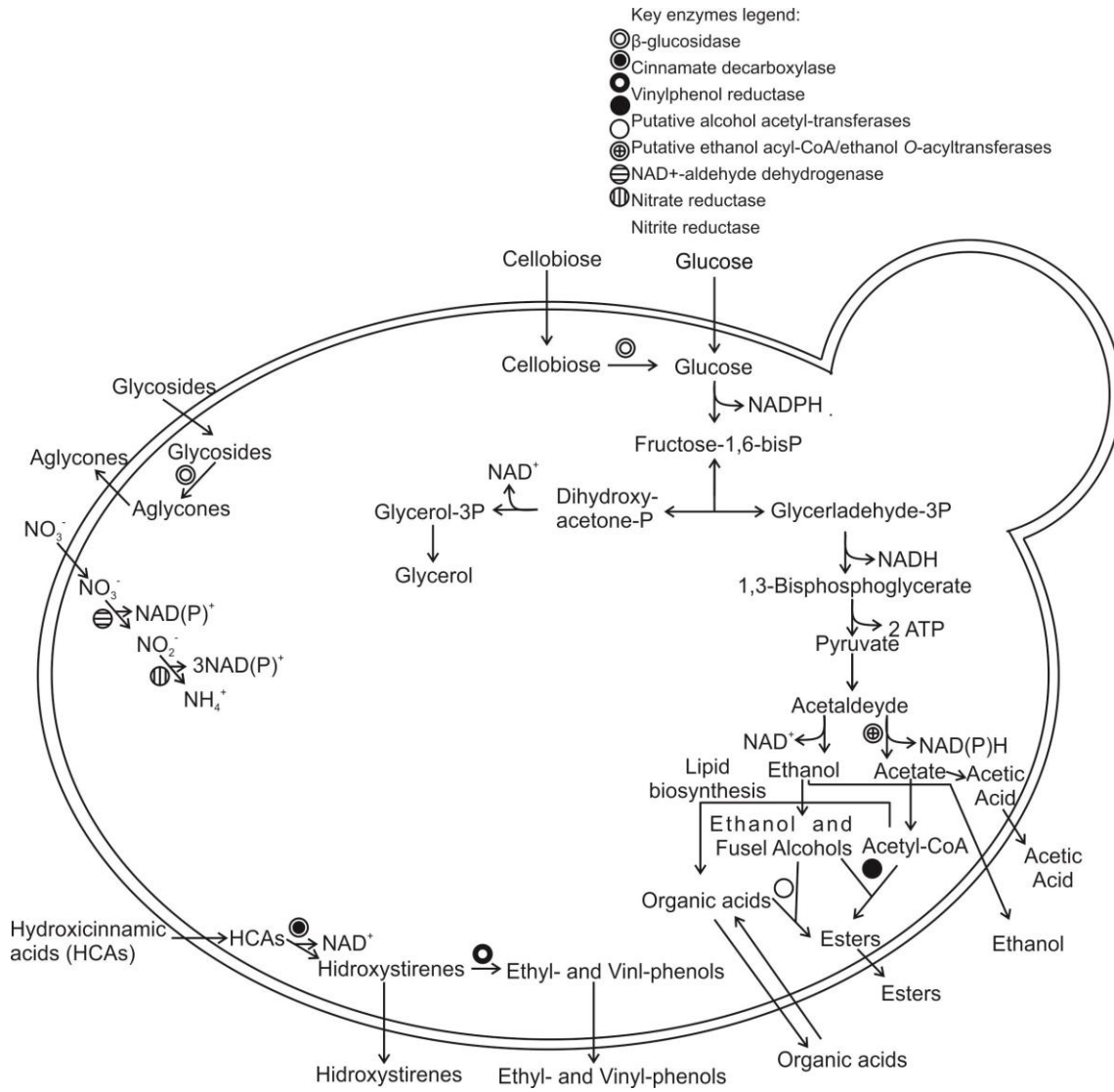


Figure 2.

Characteristic	Brewing Yeast Genus	
	<i>Brettanomyces</i>	<i>Saccharomyces</i>
Crabtree effect	✓	✓
Custers effect	✓	X
Acetic acid biosynthesis	✓	X
MCFA esters biosynthesis	✓	✓
Acetate esters biosynthesis	✓	✓
4-Vinylguaiacol and 4-Vinylphenol biosynthesis	✓	✓
4-Ethylguaiacol and 4-Ethylphenol biosynthesis	✓	X
Aglycones biosynthesis	✓	✓
Glycerol biosynthesis	X	✓
Cellobiose metabolization	✓	X
β-glucosidase activity	✓	X
α-glucosidase activity (maltodextrins metabolization)	✓	X
Nitrate uptake and metabolization	✓	X
Pseudohyphae formation (pellicle/biofilm)	✓	X
Tetrahydropyridines biosynthesis	✓	X
Triploid genome occurrence	✓	X

Legend of presence/absence symbols:

✓ Presence
 X Absence