



Mutações induzidas em híbridos de *Pichia kudriavzevii* e tolerância ao estresse físico-químico sobre seu crescimento, produção de etanol e de compostos voláteis

Mutations induced in *Pichia kudriavzevii* hybrids and tolerance to physical-chemical stress on their growth, production of ethanol and volatile compounds

M. S. Versiani¹; D. A. Almeida²; R. R. Junior³; M. N. Santos⁴; J. M. S. Alves⁵;
H. M. Valério^{1*}

¹Departamento de Biologia Geral/Laboratório de Ecologia de Microrganismos e Microbiologia Ambiental (LEMMA) /CCBS/Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), 39401-089, Montes Claros-MG, Brasil

²Escola Municipal Anfrísio José da Rocha, 39628-000, Povoado Taboa, Comercinho-MG, Brasil

³Departamento de Biologia Geral/Laboratório de Ecologia Comportamental e Computacional (LECC)/CCBS/Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), 39401-089, Montes Claros-MG, Brasil

⁴Novo Nordisk Gerência de Controle Qualidade, Enzymes Production Department, Distrito Industrial, Montes Claros-MG, Brasil

⁵Departamento de Biologia Geral/Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos/CCBS/Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), 39.401-089, Montes Claros-MG, Brasil

*henrique.valerio@unimontes.br

(Recebido em 13 de janeiro de 2025; aceito em 15 de setembro de 2025)

O melhoramento genético tornou-se uma alternativa promissora, permitindo, por exemplo, a realização de hibridização entre espécies e a indução de mutações genéticas em exemplares selecionados, com o objetivo de se obter microrganismos com características otimizadas. Considerando tais possibilidades, neste trabalho foi realizado o melhoramento genético de leveduras análogas a híbridas não-*Saccharomyces*, por meio da aplicação de técnicas para indução de mutação aleatória. As metodologias propostas consistiram no uso de luz ultravioleta (UV) e brometo de etídio (EtBr). Os mutantes obtidos a partir de *Pichia kudriavzevii* pós-hibridização foram testados quanto à capacidade de consumir glicose e frutose, em fermentação sequencial com levedura comercial em caldo de cana, bem como à tolerância ao etanol, ao aumento de temperatura e às características físico-químicas dos fermentados. Os resultados demonstraram maior desempenho dos mutantes nas características avaliadas, com aumento no consumo de açúcares e nas tolerâncias térmica e alcoólica, variando entre as amostras dos dois grupos obtidos no processo de indução de mutação (mutantes por luz ultravioleta: SP 11 UV, SP 24 UV e SP 27 UV; e mutantes por brometo de etídio: SP 11 EtBr, SP 24 EtBr e SP 27 EtBr), configurando-se como alternativas promissoras para aplicação em processos fermentativos. Testes complementares serão conduzidos com o objetivo de ampliar a avaliação de outras condições e parâmetros bioquímicos.

Palavras-chave: leveduras selvagens, indução de mutação auxotrófica, fermentação.

Genetic improvement has become a promising alternative, allowing, for example, the hybridization between species and the induction of genetic mutations in selected strains, aiming to obtain microorganisms with optimized characteristics. Considering these possibilities, in this study, genetic improvement of non-*Saccharomyces* yeast strains analogous to hybrids was carried out through the application of techniques for random mutation induction. The proposed methodologies consisted of the use of ultraviolet (UV) light and ethidium bromide (EtBr). The mutants obtained from post-hybridization *Pichia kudriavzevii* were tested for their ability to consume glucose and fructose in sequential fermentation with commercial yeast in sugarcane broth, as well as for ethanol and temperature tolerance and the physicochemical characteristics of the fermented products. The results showed improved performance of the mutants in the evaluated parameters, with increased sugar consumption and enhanced thermal and alcohol tolerance, varying among the samples from the two groups obtained in the mutation induction process (UV-induced mutants: SP 11 UV, SP 24 UV, and SP 27 UV; and ethidium bromide-induced mutants: SP 11 EtBr, SP 24 EtBr, and SP 27 EtBr), making them promising alternatives for application in fermentation processes. Additional tests will be conducted to expand the evaluation of other conditions and biochemical parameters.

Keywords: wild yeasts, auxotrophic mutation induction, fermentation.

1. INTRODUÇÃO

As chamadas leveduras não convencionais (não-*Saccharomyces*) têm ganhado muita atenção, devido a possibilidade de seu uso em processos fermentativos, sejam eles voltados a produção de alimentos [1] e bebidas [2] ou de biocombustíveis [3, 4]. Leveduras não-*Saccharomyces* apesar de serem consideradas por muito tempo como agentes de contaminação, sabe-se hodiernamente, que tais leveduras apresentam alto potencial de uso na indústria fermentativa [5], por exemplo, o potencial uso cepas de *Kazachstania gamospora* e *Wickerhamomyces subpelliculosus*, como uma alternativa para a produção de pão [1], ou mesmo o uso da *Zygotorulaspora florentina* em fermentação mista ou pura na produção de cerveja, como uma alternativa que, por meio da produção de compostos secundários como os acetato de isoamila e α -terpineol, podem contribuir positivamente no aroma e sabor da bebida ao final da fermentação [2].

Outras espécies de leveduras não-convencionais tolerantes ao etanol como *W. anomalus* e *Pichia kudriavzevii* são amplamente reconhecidas por sua robustez e eficiência fermentativa, às quais se devem à capacidade de crescerem sob uma ampla variedade de condições ambientais e substratos [4]. A *P. kudriavzevii* é um anamorfo da espécie *Candida krusei* que tem ganhado muito destaque. Amplamente distribuídas em diversos ambientes, são especialmente estudadas e aplicadas na fermentação em bebidas como vinhos, por sua capacidade de reduzir ácido málico, ácidos graxos e aumentar a composição de ésteres de acetato e alcoóis superiores [6]. Outros estudos avaliam a capacidade dessa espécie em tolerar diferentes níveis de estresse, ao álcool, temperatura, entre outros [7], além de outros estudos destacarem seu potencial uso para a produção de bioetanol [3, 4].

Atualmente existem diversas estratégias que podem contribuir com o aumento da eficácia de processos fermentativos. Dentre as estratégias, o uso de leveduras não-convencionais, hibridização inter e intraespecífica e indução de mutação são exemplos práticos.

A realização de hibridização é especialmente interessante pela possibilidade de combinar características de importância industrial, com origem em diferentes espécies de leveduras *Saccharomyces* sp detentoras de genes vantajosos em processos biotecnológicos [8]. Algumas leveduras híbridas suportam bem o estresse fermentativo, demonstrando terem herdado características competitivas de espécies parentais [9], ou podem também realizar fermentação de compostos em meios que a *S. cerevisiae* não seria capaz [10].

Já o uso de indução de mutação é uma alternativa que pode ser feita de forma direcionada ou aleatória, em genes que codificam funções consideradas vantajosas na biotecnologia. Essas modificações resultam em melhorias em leveduras selecionadas através das técnicas de engenharia metabólica [11], podendo incorporar [12] ou excluir genes desejados [13] nessas cepas microbianas, com posterior triagem de mutantes mais vantajosos do ponto de vista metabólico [12, 14].

Dentre os métodos de indução de mutação aleatória em leveduras, um método relativamente simples e eficaz muito utilizado especialmente em meio acadêmico, é o uso de luz ultravioleta (UV). A luz UV é amplamente utilizada como agente mutagênico em procariotos por ser capaz de induzir a formação de ligações extras no DNA entre as pirimidinas adjacentes, podendo ser aplicada juntamente com outros métodos indutores de mutação [15].

Outro método de indução de mutação relativamente simples e eficaz é o uso de algum agente químico mutagênico, tratando-se muitas vezes, de substâncias que podem fazer parte da rotina laboratorial. Dentre alguns dos mais diversos métodos químicos possivelmente utilizáveis para provocar mutações, temos o brometo de etídio (EtBr). O brometo de etídio é um composto catiônico amplamente utilizado como corante fluorescente em processos de eletroforese, que também pode promover em microrganismos, tais como leveduras, a formação de mutantes, possuindo a capacidade de atuar como agente intercalador ligando-se ao DNA [16].

Este trabalho teve como objetivo investigar estratégias de melhoramento genético em leveduras, por meio do uso de técnicas indutoras de mutações randômicas, aplicadas a leveduras análogas a híbridas não-*Saccharomyces*, visando à obtenção de microrganismos com características fermentativas otimizadas. As técnicas utilizadas poderiam, portanto, resultar em organismos mais eficientes e resistentes, capazes de atuar em processos fermentativos sob condições adversas. Dessa forma, o estudo contribui ao apresentar possibilidades de

melhoramento de microrganismos com técnicas e metodologias relativamente simples e eficazes, que podem impulsionar o desenvolvimento de novas abordagens biotecnológicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos análogos a híbridos não-*Saccharomyces* e indução de mutação

Os análogos a híbridos não-*Saccharomyces* utilizados foram obtidos da coleção de microrganismos do Laboratório de Ecologia de Microrganismos e Microbiologia Ambiental (LEMMA) da Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES. As três cepas de leveduras utilizadas tratam-se da espécie *P. kudriavzevii*, inicialmente nomeadas como: SP11, SP24 e SP27 com os respectivos números de acesso no GenBank, OK174303, OK174307 e OK174308. O processo de mutação foi realizado com os isolados análogos de híbridos, por meio da indução de mutação utilizando um método físico e um método químico.

2.1.1 Luz UV

Para a indução de mutação por uso de luz UV, foi utilizado o método adaptado descrito por Hawary et al. (2019) [17]. As culturas com leveduras híbridas foram inoculadas em 10 mL de meio líquido YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) e incubados durante o período da noite a 30 °C, posteriormente foi feita padronização do inóculo na absorbância de 1,200 de Densidade optica (D.O_{600nm}) no espectrofotômetro, em seguida, 100 µl da suspensão padronizada foi então inoculada em placas de meio YPD-Ágar. A exposição foi realizada para todas as amostras em triplicata em irradiação de luz UV (254 nm) em período teste de 15-30 minutos, a fim de se obter uma diminuição de 50 a 90% do número das colônias visualmente nas placas (UFC/mL), tendo o melhor tempo de exposição de 30 minutos sido escolhido para prosseguir nos demais testes bioquímicos e de estresse.

Posteriormente, as placas foram mantidas em escuro durante 24 horas na incubadora BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), com objetivo de interromper o processo de fotorreação nas leveduras provocadas pela luz UV [17]; por fim, as placas foram novamente incubadas, agora por período de 3 dias a 30 °C em estufa convencional. As leveduras colhidas após exposição a luz ultravioleta, foram selecionadas aleatoriamente de subcultivo de unidades formadoras de colônias únicas em meio YPD ágar. As colônias mutantes sobreviventes foram colhidas e inoculadas em subcultivos em meio YPD líquido e incubadas novamente a 30 °C por 24 h em BOD.

2.1.2 Indução de mutagênese por brometo de etídio

O método de indução de mutagênese química por brometo de etídio (EtBr) foi realizado com o meio de cultura de acordo com o protocolo de Chmielewska e Dziuba (2003) [18] com algumas adaptações, em que as leveduras híbridas foram incubadas em tubos no período da noite, como descrito anteriormente, no entanto, nesse cultivo foi adicionado brometo de etídio (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ de peptona, 20 g L⁻¹ de glicose, 10 µg mL⁻¹ de brometo de etídio, pH = 5), cada tudo continha portanto, 1 mL do inóculo com as células de levedura padronizado e 9 mL do meio de cultivo YPD com EtBr. As leveduras permaneceram no meio descrito, por 48 horas em BOD, posteriormente foi realizada centrifugação dos tubos contendo as leveduras por 5 minutos a 3000 rpm (para remover totalmente o brometo do meio, como recomendado por Kotiet al. (2016) [19], o sobrenadante foi descartado, e um meio de cultivo fresco (10 mL de YPD) foi adicionado aos tubos (esse procedimento foi realizado novamente no dia seguinte, após 24h).

Após o total de 96 horas em contato com o brometo de etídio, todos os tubos foram novamente centrifugados, o sobrenadante foi descartado, foi realizada lavagem com solução salina 0,9% estéril e posteriormente ressuspensão com água destilada estéril, em seguida, todas as amostras foram inoculadas em placas de Petri (contendo YPD-Ágar) permanecendo por 4 dias em BOD a 30 °C.

2.2 Mutantes mais eficientes

2.2.1 Ensaio de fermentação de glicose

Foi utilizado meio semelhante à formulação do YPD, com ajuste crescente de glicose nas concentrações necessárias para cada estágio da fermentação (15° Brix (Bx) final). Os ensaios ocorreram de forma progressiva com aumento gradual do Bx (5, 8, 12 e 15 Bx como procedimento adaptativo). Foi utilizado como base o trabalho modificado de Monteiro et al. (2018) [20]. Cada ensaio foi realizado em tubos de vidro contendo 10 mL do meio de cultivo ajustado, recebendo 100 μ L de inóculo ajustado a 0,3 D.O_{600 nm}. As amostras foram incubadas em BOD por 4 dias para cada graduação de glicose, com medição de Bx e teor alcoólico todos os dias (24 h, 48 h, 72 h, 96 h) e transferência para a nova graduação de Bx após 48 horas do tempo de fermentação. Foram realizadas contagens de UFC.mL⁻¹ todos os dias a partir de 48 horas da graduação de 12 Bx (dia 0), até o momento de completar 96 horas em 15 Bx. As medições de Bx foram feitas utilizando refratômetro portátil, calibrado com água destilada. As correções do Bx foram feitas utilizando o software *BeerSmith3* Tm [21]. Os resultados obtidos para as análises com a glicose foram comparados com as análises utilizando frutose, com objetivo de verificar se havia preferência no consumo de algum dos açúcares pelas leveduras mutantes induzidas pelos dois diferentes métodos.

2.2.2 Ensaio de fermentação de frutose

Com objetivo de se avaliar diferenças no metabolismo de consumo de açúcar das leveduras mutantes análogas de híbridas, foi preparado um meio basal de cultivo contendo a frutose como única fonte de açúcar, no qual se seguiu procedimento semelhante ao descrito anteriormente. Os ensaios ocorreram de forma progressiva com aumento gradual do Bx (5, 8, 12 e 15 Bx) e os procedimentos seguiram semelhantes à metodologia citada anteriormente baseada em Monteiro et al. (2018) [20] com modificações. Cada ensaio contendo 10 mL distribuídos em tubos de vidro, recebendo 100 μ L de inóculo ajustado a 0,3 D.O_{600 nm}. As amostras foram incubadas em incubadora BOD por quatro dias, com medição de Bx, UFC e teor alcoólico todos os dias a partir do tempo 0 (24 h, 48 h, 72 h, 96 h).

As medições de Bx foram feitas utilizando refratômetro portátil, calibrado com água destilada. As correções de Bx foram feitas utilizando o software *BeerSmith3* Tm [21].

2.3 Ensaio de fermentação sequencial

Para verificar o comportamento fermentativo das leveduras mutantes em um processo fermentativo com a presença de uma levedura potencialmente competitora, foi feito teste de fermentação sequencial utilizando uma linhagem comercial de *Saccharomyces cerevisiae*, levedura de alta fermentação (Safale-US-05).

Para isso, as leveduras foram inicialmente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado, e as células decantadas ressuspensas em 50 mL de caldo de cana a 5 Bx, acrescido de extrato de levedura a 1% (p/v), a 28 °C, agitação 200 rpm, durante 48 horas. Foi realizado novamente, e deixado durante 48 horas até atingir 10^9 células.mL⁻¹, realizando a formação da cultura *Started*, popularmente conhecida como “Pé de cuba”.

No “Pé de cuba” a massa celular foi inoculada inicialmente em 5 mL de caldo de cana clarificado ajustado a 5 Bx na concentração de 10^9 células.mL⁻¹ e gradativamente, abastecido com mais 5 mL de caldo de cana, nos Bx: 7, 9, 11, 13 e 15 e controle a 5 Bx, até completar 30 mL de meio (caldo de cana), a cada uma hora de intervalo para as leveduras adaptarem de maneira crescente a um grau Bx maior. Por fim, as amostras foram deixadas em repouso por 24 horas a 28 °C.

Posteriormente sobre o “Pé de cuba” foram adicionados 50 mL de caldo de cana a 15 Bx. Após 3 horas, os *erlenmeyers* com as amostras foram abastecidos com 50 mL de caldo a 15 Bx, após 1 hora foi reabastecido com mais 50 mL de caldo, e por fim 70 mL adicionalmente na hora seguinte até completar 250 mL de meio. Após essa etapa de preparação, iniciaram-se os ensaios

de fermentação, nos quais a cada 48 horas, foram analisadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), o Bx e pH.

Os ensaios de fermentação sequencial foram realizados utilizando a levedura híbrida mutante com posterior inoculação de levedura comercial *S. cerevisiae* como descrito anteriormente.

Inicialmente foram realizadas uma pré-cultura em *erlenmeyers* de 250 mL com a levedura híbrida e o caldo de cana preparado, como descrito no parágrafo anterior. Ao completar 4 dias, 2,5 mL de uma pré-cultura padronizada de *S. cerevisiae* (10^9 células.mL $^{-1}$), foram adicionados à cultura com o híbrido mutante. O ensaio fermentativo foi realizado por 10 dias como descrito por Chen e Liu (2016) [22].

As análises de Bx foram feitas com auxílio de um refratômetro analógico portátil. As correções de Bx foram feitas utilizando o software *BeerSmith3* TM [21].

2.4 Teste de tolerância etanólica

O teste de tolerância seguiu a metodologia adaptada descrita por Belloch (2008) [9]. Os testes foram realizados em diferentes concentrações de etanol em temperatura de 25 °C. As amostras foram repicadas em meio YPD/Ágar (peptona 20 g L $^{-1}$, extrato de levedura 10 g L $^{-1}$, dextrose 20 g L $^{-1}$ e ágar 20 g L $^{-1}$) e incubadas a 25 °C por 24h. Após esse período, uma alçada foi transferida para tubos *Falcon* com caldo YPD e levados para incubadora BOD, a 25 °C durante 48h. Após as células terem crescido, as amostras foram ajustadas para absorbância inicial 0,3 D.O_{600 nm}.

Após ajustes, foram preparados tubos com meio YEPD caldo (*Yeast Extract Peptone Dextrose*), em triplicatas, contendo 8,5 mL; 8,25 mL; 8,0 mL e 7,8 mL de meio correspondendo, respectivamente, às concentrações de etanol 5%, 7,5%, 10% e 12% (p/v), e grupo controle com 9 mL de meio. Em cada tubo foram acrescidos das suspensões ajustadas volumes correspondentes de 0,5 mL; 0,75 mL; 1 mL e 1,2 mL (5%, 7,5%, 10% e 12%). Todos os tubos, portanto, apresentavam volume final de 9 mL de inóculo. Durante o teste, foi realizada a leitura da absorbância (D.O_{600 nm}) em 24 e 48 horas de cultivo, e 100 µl de cada amostra foram retirados, diluídos e inoculados em meio BDA acrescido de ampicilina à 5 mg/mL, para contagem de UFC.

2.5 Teste de termotolerância

Para determinação de tolerância a diferentes temperaturas com as leveduras mutantes e levedura comercial, foram testadas quatro temperaturas, 30 °C, 35 °C, 40 °C e 45 °C conforme realizado anteriormente nas avaliações com as leveduras parentais e híbridas de acordo à metodologia de Mertens et al. (2015) [23], com algumas modificações.

As leveduras foram crescidas em meio YPD-Ágar por 24h, posteriormente transferidas 6 alçadas para proliferação em 30 mL de meio YPD líquido. Após 48 horas, todas as amostras foram padronizadas para 0,3 D.O_{600 nm} em espectrofotômetro. Os testes foram realizados em triplicata, além dos respectivos controles.

Em tubos de ensaio, foram adicionados 2 mL de YEPD, acrescidos de 100 µl da suspensão de células padronizada. Para o controle, as amostras seguiram durante os quatro dias consecutivos de teste em temperatura controlada de 25 °C, já as amostras fora do grupo controle, passaram por aumento da temperatura realizado a cada 24 horas, iniciando em 30 °C e finalizando a 45 °C. Todos os dias ao completar 24h em cada temperatura, 100 µl eram retirados das amostras e diluídos em 900 µl de YEPD em tubos *eppendorf*, e 100 µl dessas novas suspensões foram posteriormente plaqueados em meio BDA para contagem de UFC, e estas diluições também foram utilizadas em microscópio óptico para contagem de células em Câmara de Neubauer.

Os cálculos para Câmara de Neubauer foram realizados utilizando as seguintes fórmulas:

$$\% \text{ viabilidade} = (\text{número de células não coradas} / \text{número total de células}) \times 100$$

$$N^{\circ} \text{ células/mL} = \frac{N^{\circ} \text{ total de células}}{N^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

2.6 Análises cromatográficas de compostos voláteis

As análises de compostos voláteis foram realizadas no Laboratório de Agroquímica da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG). Foi realizado o procedimento de fermentação, igualmente descrito no tópico “2.3” para fermentação sequencial, sem a adição da levedura comercial. Após 10 dias de fermentação em caldo de cana, 30 mL do fermentado foram retirados para realização das análises de voláteis nas amostras em cultura pura. A metodologia seguida foi semelhante à descrita por Chen e Liu (2016) [22].

Os compostos voláteis foram extraídos por microextração em fase sólida (SPME), utilizando uma fibra composta de DVB/CAR/PDMS (50/30 µm), com exposição no espaço de cabeça (headspace) durante 30 minutos e dessorção direta no injetor do cromatógrafo. As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás modelo GC 7890A (Agilent Technologies), acoplado a um detector de massas (CG-EM), utilizando uma coluna capilar SLB-5MS (Agilent Technologies) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme.

O hélio, com pureza de 99,999%, foi empregado como gás de arraste a um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. As amostras (1 µL) foram injetadas automaticamente por meio de um auto-sampler CTC combiPAL, em modo splitless. O injetor split/splitless foi mantido a 220 °C.

O programa de temperatura da coluna iniciou-se a 36 °C, sendo elevado a uma taxa de 3 °C min⁻¹ até 240 °C, mantendo-se isoterma por 2 minutos. Posteriormente, a temperatura foi aumentada até 280 °C, com isoterma adicional de 2 minutos para o post run. A interface do cromatógrafo foi mantida a 280 °C e a ionização realizada por impacto eletrônico a 70 eV. A faixa de varredura do espectrômetro de massas foi de m/z 45 a 600 Da. A identificação dos compostos foi efetuada por comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles disponíveis no banco de dados NIST 2.0 do equipamento.

2.7 Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas através dos métodos lmer ou glmer do pacote lme4 [24] para correção da pseudorepetição temporal [25]. Todos os cálculos foram executados no sistema estatístico R [26].

Foram avaliados como parâmetros para variáveis resposta UFCs, absorbância (D.O.), viabilidade, densidade celular, Bx, e como variáveis explicativas a sacarose, glicose e frutose, tempo em dias, diferença de açúcares redutores e diferença de método de indução de mutação (UV, EtBr) para todas as linhagens de leveduras testadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaios de indução de mutação por luz UV e brometo de etídio

Nos testes de indução de mutação com o uso de luz UV, foi observado que o melhor tempo de exposição para a seleção das leveduras resistentes/sobreviventes foi de 30 minutos, obtendo desta forma, redução no número médio das colônias atingindo taxa de letalidade entre 50% e 90% (Figura 1). Possivelmente, o objetivo de induzir mutação foi alcançado nessas amostras, uma vez que o aumento nas taxas de letalidade em eucariotos expostos a radiação UV acima de 75% em relação aos grupos controle aumenta a possibilidade de mutagêneses positivas [27].

O uso da luz UV é uma boa alternativa para induzir melhorias no desempenho fisiológico das leveduras, na medida em que testes realizados com linhagens de *S. cerevisiae* demonstraram melhorias no rendimento de etanol produzido (g/L) e tolerâncias a glicose e ao etanol [28, 29]. O uso da UV em comprimento de onda de 250-290nm pode induzir a formação de dímeros de timina, sendo que esses dímeros são responsáveis pela transição da guanina (G) e citosina (C) para adenina (A) e timina (T) ou podem ainda causar a deleção de pares de bases A-T no DNA [30, 31], como sendo responsáveis por melhorias fisiológicas e outras alterações de diversos tipos como no metabolismo de substratos orgânicos de C e N bem como resistência a estresses

físico-químicos diversos. Agentes causadores de danos genéticos, que podem resultar em eventos de recombinação ou mutações (genotoxicidade), têm sido amplamente investigados. O uso da luz UV se mostra como uma alternativa rápida e eficaz para a otimização de linhagens, permitindo a triagem subsequente das linhagens de interesse, e provocando modificações no DNA que, por vezes, não são completamente reparáveis, configurando alterações hereditárias (mutagenicidade) [32, 33].

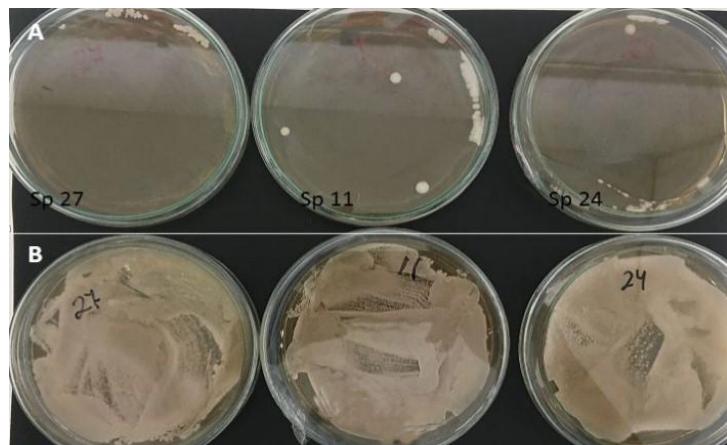


Figura 1: Diferença de crescimento das leveduras após período de incubação de 96 horas, posterior a indução da mutação pela exposição de luz ultravioleta por 30 minutos (A) e sem exposição de luz UV (B).

Já os testes com o brometo de etídio na concentração testada, não apresentaram diferença visual/numérica no crescimento/abundância das colônias das leveduras avaliadas nas placas após indução/exposição de acordo com os protocolos anteriormente utilizados, quando comparados aos testes controle (dados não mostrados).

3.2 Ensaios de fermentação com glicose e frutose

Nas análises comparativas de consumo dos açúcares testados, o tipo de açúcar, o tempo e os agentes mutagênicos utilizados (luz UV, EtBr) afetaram as leituras de Bx. No geral, houve maior tempo de adaptação do tratamento com a frutose, no qual o consumo deste foi menor nas primeiras 48 horas do que no tratamento com a glicose nas amostras testadas nas mesmas condições de cultivo (concentração inicial de cada açúcar testado e temperatura de incubação). Os resultados comparativos das análises para consumo da glicose e frutose estão expressos na Figura 2.

A amostra SP11 UV apresentou maior consumo da frutose do que a amostra correspondente induzida pelo EtBr após as primeiras 48 horas de teste, e com menores resultados para o teste de UFC/mL , o que pode indicar um melhoramento no metabolismo para o consumo da frutose nesta amostra SP11 UV. De forma comparativa, ficou evidente a preferência fermentativa glicofílica das leveduras testadas (resultado já esperado). No geral, a frutose quando em altas concentrações é associada a um processo fermentativo lento, estagnado e diferentes espécies de leveduras reagem de formas diferentes aos tipos de açúcares disponíveis no processo fermentativo [34, 35].

A medida que a fermentação ocorre, o açúcar é consumido associado ao crescimento e “manutenção” das leveduras, e com o passar do tempo e aumento do teor alcoólico, a viabilidade diminui [36]. O Bx é uma importante ferramenta para auxiliar na avaliação da estimativa de açúcares disponíveis especialmente em líquidos, tratando-se da quantidade relativa de sólidos solúveis naquele material analisado. Em diversas indústrias de fermentáveis, essa avaliação de sólidos solúveis é de grande relevância, portanto, é importante avaliar a capacidade da levedura de tolerar e consumir graus mais elevados de Bx no início do processo fermentativo. O tipo de açúcar no meio fermentativo também é considerado uma potencial fonte de estresse, sobretudo quando em altas concentrações [37].

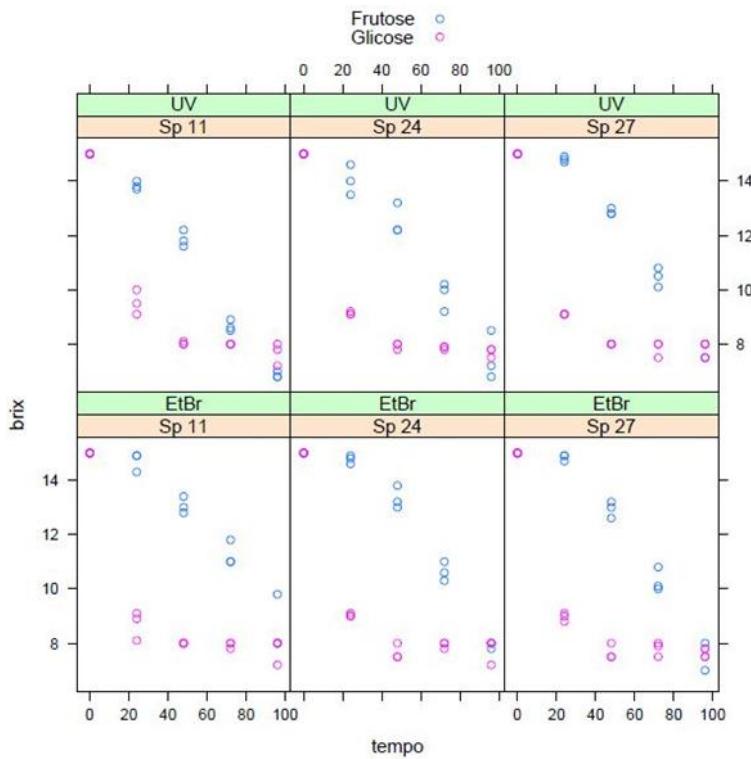


Figura 2: Consumo de glicose e frutose pelas leveduras *Pichia kudriavzevii* mutantes por luz ultravioleta (SP 11 UV, SP 24 UV e SP 27 UV) e *P. kudriavzevii* mutantes por brometo de etídio (SP 11 EtBr, SP 24 EtBr e SP 27 EtBr) medidos em Bx em função do tempo (0 a 100 horas de fermentação).

Nos testes de fermentação da frutose, a diferença de consumo foi menor, no qual a maior diferença entre as leveduras análogas e mutantes foi registrada para a levedura SP 11 UV (no grupo SP 11). Para o grupo SP 27 ambas as amostras mutantes foram relativamente melhores do que a SP 27 análoga parental pré-exposição aos agentes mutagênicos testados.

Para os valores de UFC, as contagens médias de UFC/mL nos testes com a frutose demonstraram crescimento mais lento das colônias das leveduras testadas do que nos testes com a glicose, a despeito do tipo de mutante induzido. No geral, nos testes com frutose, a maior quantidade celular foi observada entre 48/72 horas de teste, após esse período ocorria declínio ou estagnação na quantidade de UFC/mL . Para a glicose, é possível perceber aumento (na maioria das amostras avaliadas) das contagens de UFC/mL até 48 horas, apresentando resultados proporcionais ao consumo do Bx. Tal comportamento pode ser explicado pela relação consumo de nutrientes no meio/produção de álcool e maior demanda nutricional no meio pelo crescimento celular.

Como demonstrado em diversos trabalhos, é comum que quando a levedura alcança o nível máximo de consumo dos açúcares fermentáveis, o crescimento celular diminui e as leveduras entram em fase estacionária. No trabalho de Hawaz et al. (2022) [38], com leveduras silvestres produtoras de etanol, ao alcançar 72 horas de experimento, houve redução do rendimento de etanol, juntamente com o esgotamento dos açúcares fermentáveis na fermentação, sendo que a maioria das linhagens testadas no experimento diminuiu a contagem celular após 48 horas. Um breve aumento no UFC/mL após atingir o consumo máximo de açúcares fermentáveis pode ter relação com o uso do próprio etanol no meio como fonte de carbono para crescimento e manutenção celular [39].

Os resultados de UFC para glicose e frutose nas leveduras análogas parentais, demonstraram que houve aumento de UFC/mL após a indução da mutação para ambos os açúcares testados como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) durante o ensaio de capacidade fermentativa, durante o teste de fermentação em glicose e frutose, com as leveduras SP 11 UV, SP 11 EtBr, SP 24 UV, SP 24 EtBr, SP 27 UV e SP 27 EtBr e suas correspondentes análogas.

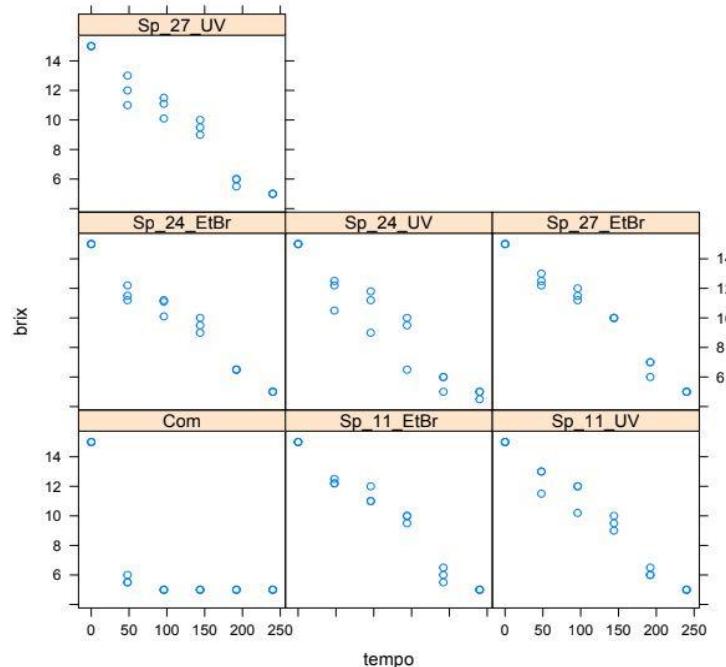
Amostra	Glicose (UFC)	Frutose (UFC)
SP 11 (análogo)	$5,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$
SP 11 UV	$1,7 \times 10^9$	$9,1 \times 10^8$
SP 11 EtBr	$1,4 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$
SP 27 (análogo)	$2,7 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
SP 27 UV	$3,1 \times 10^9$	$6,3 \times 10^8$
SP 27 EtBr	$2,1 \times 10^9$	$5,6 \times 10^8$

3.3 Ensaio de fermentação sequencial

A levedura comercial Safale US-05 no geral apresentou crescimento reduzido na quantidade de células e na formação de colônias, quando comparadas com as leveduras *Pichia* spp. testadas, seja por observação visual da massa celular, ou avaliando em *UFC/mL*, porém, a alta eficiência no consumo e conversão de sacarose em álcool, diminuindo o Bx do meio de 15%, para 5% em apenas 48 horas foi maior que o observado para as leveduras selvagens testadas.

As leveduras mutantes conseguiram reduzir a 5% de Bx, apenas após o dia 8 do experimento, depois de mais de 24 horas da adição da levedura comercial ao meio. Porém, inicialmente, a adição da levedura comercial após 7 dias de fermentação apenas com as *Pichia* spp. testadas em cada tratamento, não impactou a leitura de Bx do refratômetro.

Os resultados das leituras de Bx estão expressos na Figura 3.



*Figura 3: Consumo da sacarose presente no mosto de cana-de-açúcar com Bx inicial 15°, durante os dez dias dos testes de fermentação, com leituras a cada 48 horas para as leveduras *Pichia kudriavzevii* mutantes por luz ultravioleta e *P. kudriavzevii* mutantes por brometo de etídio e a levedura comercial Safale US-05 (Com) como controle de referência.*

Os mutantes apresentaram dificuldade em consumir sacarose no experimento. Como é possível observar, em mosto de cana-de-açúcar para reduzir o Bx entre 7-5, foram necessários pelo menos, 192 horas de fermentação (dia 8) nas condições testadas.

Os resultados de *UFC/mL* demonstraram que todas as amostras apresentaram aumento progressivo nos primeiros dias (do dia 0 ao dia 4), com exceção de uma pequena variação ocorrida

na levedura comercial Safale US-05, no dia 4. No geral, a contagem de colônias para a levedura comercial permaneceu estável do dia 2 ao dia 10, sem grandes variações. As demais amostras apresentaram aumento gradual até o quarto ou sexto dia, seguido de diminuição. Comparando os resultados das leveduras mutantes com a comercial, observou-se que as leveduras mutantes demonstraram boa capacidade adaptativa ao ambiente fermentativo testado, apresentando quantidades de *UFC/mL* iguais ou superiores em vários momentos durante o experimento (Tabela 2).

Tabela 2: Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) durante a fermentação em garapa no ensaio de fermentação sequencial para as leveduras: Safale US-05 (comercial), SP 11 UV, SP 11 EtBr, SP 24 UV, SP 24 EtBr, SP 27 UV e SP 27 EtBr.

Tempo (dias)	Safale US-05	SP 11 UV	SP 11 EtBr	SP 24 UV	SP 24 EtBr	SP 27 UV	SP 27 EtBr
0	$8,6 \times 10^7$	$9,8 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$2,4 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$
2	$1,6 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$8,8 \times 10^8$	$1,8 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$
4	$8,1 \times 10^8$	$2,7 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$3,1 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$
6	$1,7 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$	$3,3 \times 10^9$	$3,1 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$
8	$1,2 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$
10	$1,9 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$2,7 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$

A estratégia de utilizar uma levedura comercial em fermentação sequencial com uma levedura não-*Saccharomyces* é muito utilizada, especialmente em bebidas fermentadas. O trabalho de Shi et al. (2019) [40], que testavam o efeito das leveduras *Issatchenkov terricola* SLY-4/S e *P. kudriavzevii* F2-24/S no sabor e qualidade em vinho, com o uso de co-fermentação simultânea e sequencial com *S. cerevisiae*, em que foi observado que o método de fermentação sequencial reduziu o efeito de inibição da *S. cerevisiae* nas duas leveduras testadas, produzindo vinho com menor acidez volátil e maior teor de compostos terpenos na fermentação sequencial de *P. kudriavzevii* F2-24/S e *S. cerevisiae*, melhorando a qualidade do vinho. Esses resultados podem indicar que, o fato da presença da levedura comercial aparentemente não ter afetado diretamente o experimento com base apenas nos parâmetros avaliados neste trabalho, poderia ser devido à estratégia utilizada em fermentação sequencial (como demonstrado no experimento citado anteriormente). Entretanto, os resultados físico-químicos obtidos das amostras produzidas ao final da fermentação podem ter sofrido influência da levedura comercial.

Dessa forma, apesar da presença da *S. cerevisiae* geralmente inibir o crescimento de outras leveduras, o uso das leveduras não-*Saccharomyces* como iniciadoras da fermentação pode ser uma alternativa interessante para a produção de um fermentado final que apresente à contribuição de ambas as espécies (*Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*) [41].

3.4 Testes de tolerância ao etanol (EtOH)

Nos testes de tolerância ao etanol foi possível perceber dificuldade significativa das leveduras mutantes em tolerar concentração alcoólica $\geq 10\%$, não havendo crescimento de colônias em algumas amostras. A influência do etanol no crescimento das colônias fica ainda mais perceptível, quando comparamos com o grupo controle (sem etanol), no qual, de forma geral, as contagens de *UFC/mL* foram menores do que os seus respectivos controles (0%), independentemente do tempo de experimento (dia 0 ao dia 2), e em qualquer concentração de etanol.

Na concentração de 12% (v/v), diluições de 10^{-1} e 10^{-2} não apresentaram nenhum crescimento de colônias em meio BDA, em algumas amostras das leveduras testadas, sendo o grupo mutante por EtBr, o mais sensível ao aumento da concentração de etanol no meio. A diferença de crescimento celular das leveduras nas diferentes concentrações de etanol avaliadas pode ser visivelmente observada nos ensaios (Figura 4).

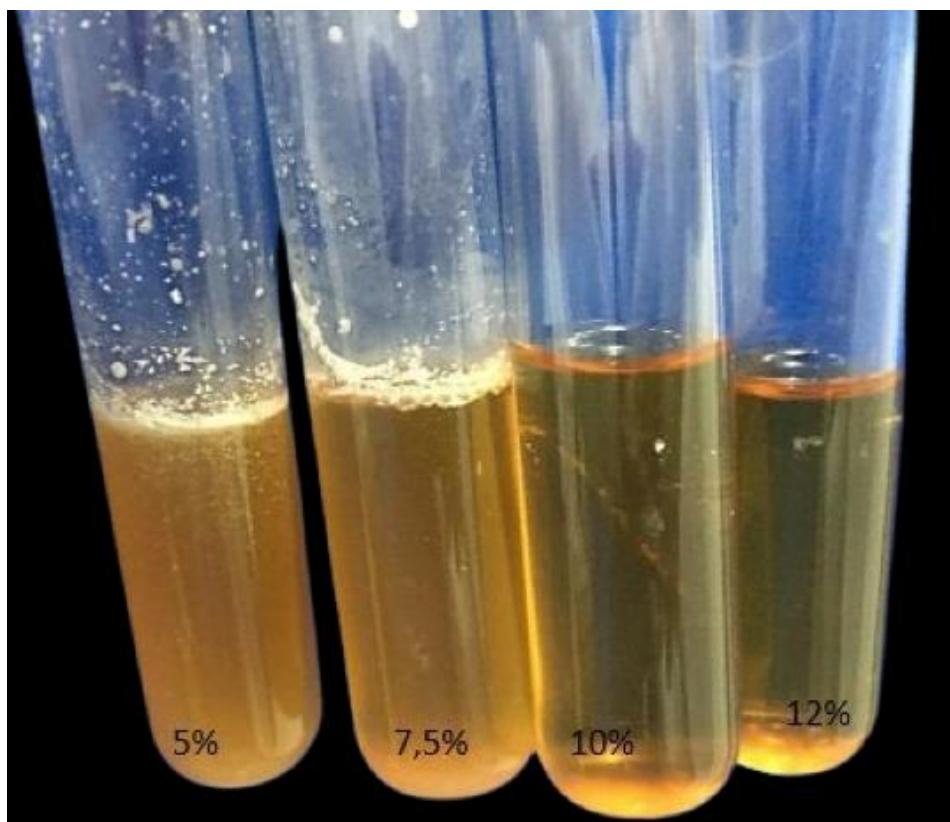


Figura 24: Diferença visual de crescimento das leveduras em meio líquido YPD acrescidos com etanol nas concentrações de 5%, 7,5%, 10% e 12% (v/v).

Apesar das leveduras *P. kudriavizevii* serem conhecidas por possuírem alta capacidade de tolerar diversas condições de estresse, entre eles, altos níveis de etanol [4], avaliando os resultados apresentados pelos dois grupos mutantes testados, ambos apresentaram sensibilidade ao etanol.

Uma vez que altas concentrações de etanol podem ser tóxicas para as células, ao entrar em contato com altas concentrações alcoólicas, iniciam-se diversos mecanismos de defesa utilizados pelas células das leveduras em geral [42]. A sensibilidade ao etanol em concentrações $\geq 10\%$ é explicável, pois tais concentrações podem causar danos na parede celular e na membrana plasmática impactando no crescimento celular, sobrevivência e morte dessas células [43]. A influência da concentração alcoólica na contagem de UFC está expressa na Figura 5.

Na concentração de 10%, a amostra SP 24 UV demonstrou os melhores resultados, atingindo uma média de $3,23 \times 10^7$ UFC/mL no segundo dia. Em concentrações menores que 10%, o tipo de mutação não parece ter afetado o perfil de tolerância para a contagem UFC. Nas concentrações de 7,5% a maior quantidade de UFC/mL registrada no segundo dia foi da levedura SP 24 EtBr ($7,89 \times 10^7$ UFC/mL) e em 5% a levedura SP 24 EtBr apresentou $1,17 \times 10^8$ UFC/mL e de forma semelhante a levedura SP 11 UV que apresentou $1,1 \times 10^8$ UFC/mL.

Na Figura 6 estão expressos os resultados médios das leituras de absorbância para os grupos das leveduras UV e EtBr inoculadas em meio YPD líquido acrescido de etanol nas concentrações crescentes testadas. As leituras de absorbância demonstraram que à medida que a concentração alcoólica aumenta, a leitura do espectrofotômetro diminui, indicando que há diminuição da densidade celular na suspensão de células do meio de cultivo, e isso fica ainda mais evidente no grupo EtBr. Podemos observar ainda um aumento na leitura de absorbância com o passar do tempo dos experimentos (de 24 h para 48 h), para ambos os grupos nas concentrações $\leq 10\%$ (v/v).

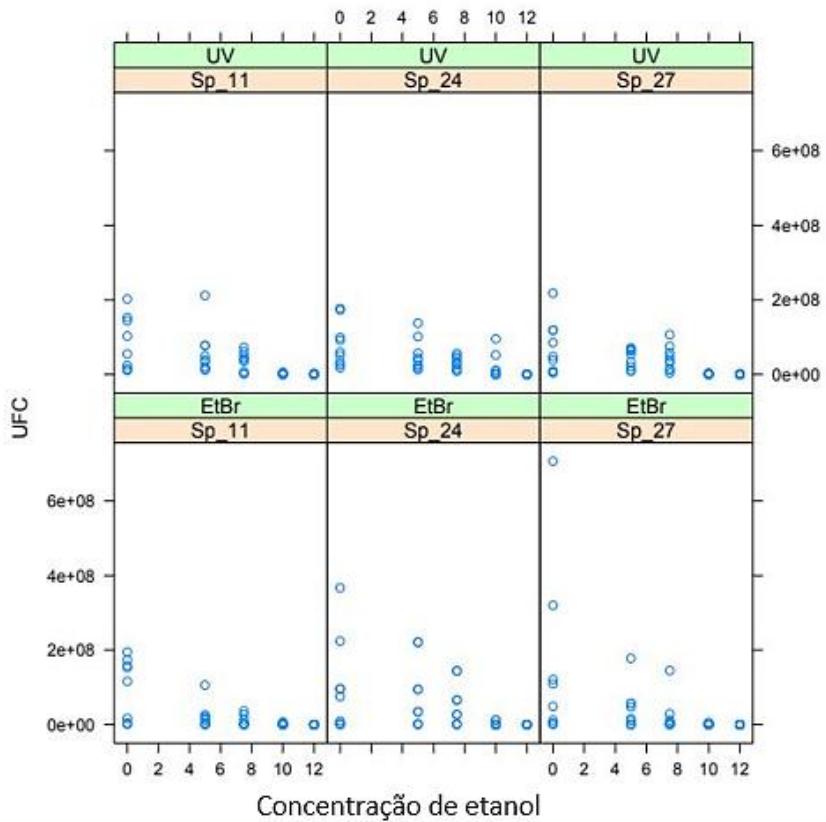


Figura 5: Resultados da contagem de UFC/mL nas diferentes concentrações de etanol testadas (5%, 7,5%, 10% e 12%) para as leveduras *Pichia kudriavzevii* mutantes por luz UV e EtBr e seus respectivos controles (0%) inoculadas em meio YPD líquido.

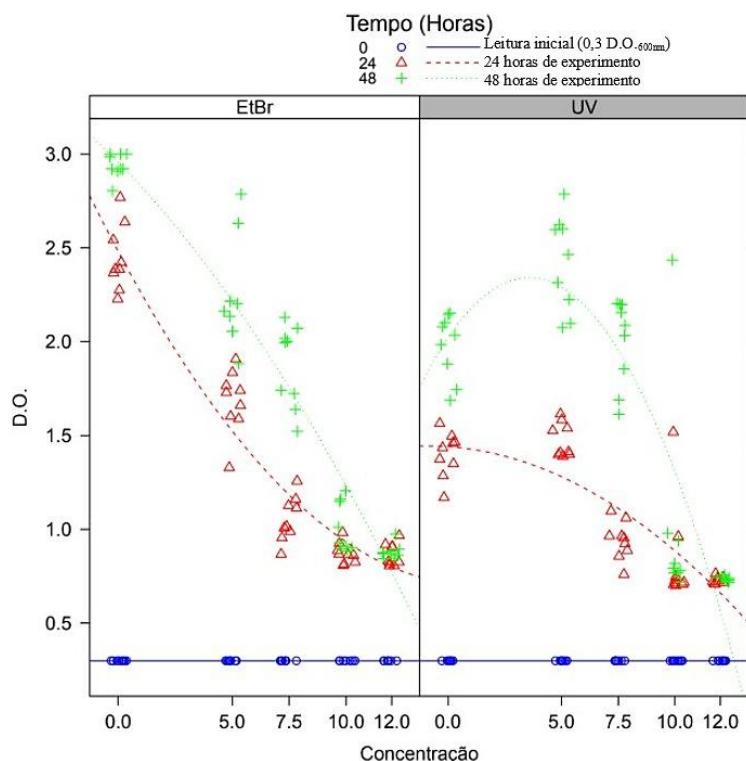


Figura 6: Análises de tolerância ao etanol em diferentes concentrações em meio YPD líquido inoculado com as amostras de leveduras mutantes *Pichia kudriavzevii* nos grupos UV e EtBr. Resultados expressos referentes as leituras de absorbância nos tempos 0, 24 e 48h de cultivo para D.O. a 600nm.

Para os resultados de *UFC/mL*, comparando os resultados obtidos nesse experimento, com os resultados obtidos no teste com as leveduras análogas não induzidas às mutações testadas, é possível observar que, com exceção dos testes em concentração de 12% de etanol, nas demais concentrações os resultados de *UFC/mL* das leveduras mutantes foram maiores do que as contagens das leveduras análogas nas mesmas condições. Em 12% de concentração de etanol a levedura SP 11 UV foi a que melhor tolerou ao etanol, quando comparada aos resultados expressos pela levedura análoga correspondente. Foi possível observar a diferença entre a tolerância ao álcool das leveduras análogas (parentais) e das leveduras mutantes SP 11 e 27 dos dois grupos, UV e EtBr. Para algumas amostras na concentração de etanol 12% as contagens de *UFC/mL* não puderam ser avaliadas por não haver crescimento de nenhuma colônia nas placas (Tabela 3 - resultados que apresentaram zero *UFC* estão expressos como *N.D.*).

É importante salientar que tais variáveis aqui testadas (etanol, glicose, frutose, termotolerância), quando testados simultaneamente, podem afetar na capacidade fisiológica das leveduras de resposta a esses estresses [43].

Tabela 3: Resultados das médias de UFC das leveduras Pichia kudriavzevii análogas e mutantes SP 11 e SP 27 nos testes de tolerância ao etanol em diferentes concentrações em meio YPD líquido a pós 48h de fermentação.

Amostra de levedura	Dia	Concentração (%)	UFC*
SP11 Análoga	2	12	$2,7 \times 10^2$
SP 11 UV	2	12	1×10^5
SP 11 EtBr	2	12	N.D
SP 27 Análoga	2	12	4×10^3
SP 27 UV	2	12	N.D
SP 27 EtBr	2	12	N.D
SP11 Análoga	2	10	$1,2 \times 10^5$
SP 11 UV	2	10	$2,3 \times 10^6$
SP 11 EtBr	2	10	$3,7 \times 10^6$
SP 27 Análoga	2	10	$1,9 \times 10^5$
SP 27 UV	2	10	$1,5 \times 10^6$
SP 27 EtBr	2	10	2×10^6
SP11 Análoga	2	7,5	$1,2 \times 10^6$
SP 11 UV	2	7,5	$4,9 \times 10^7$
SP 11 EtBr	2	7,5	$2,7 \times 10^7$
SP 27 Análoga	2	7,5	$2,4 \times 10^6$
SP 27 UV	2	7,5	$4,6 \times 10^7$
SP 27 EtBr	2	7,5	$6,2 \times 10^7$
SP11 Análoga	2	5	$3,1 \times 10^7$
SP 11 UV	2	5	1×10^8
SP 11 EtBr	2	5	$4,6 \times 10^7$
SP 27 Análoga	2	5	$1,4 \times 10^7$
SP 27 UV	2	5	$6,6 \times 10^7$
SP 27 EtBr	2	5	$9,4 \times 10^7$

*Médias das UFCs calculadas a partir das análises de todas as amostras incubadas em triplicata.

3.5 Teste de termotolerância

Nos testes de termotolerância, foi possível observar menor número de células com as amostras de leveduras comerciais em todas as temperaturas testadas, quando comparadas às demais amostras de leveduras mutantes testadas. Apesar do menor número de *UFC/mL* do grupo comercial, é perceptível a capacidade do uso da levedura comercial nos processos fermentativos, nos quais sua capacidade de tolerar altas temperaturas esteve semelhante ou até mesmo melhor do que as demais leveduras mutantes testadas, quando avaliamos a viabilidade celular (exceto a 35 °C com as leveduras induzidas por brometo de etídio). A alta viabilidade celular das leveduras comerciais até 45 °C pode ser explicada por se encaixar nos limites de tolerância já estabelecidos

da *S. cerevisiae*, para qual em um processo fermentativo normal de uma bebida alcoólica, o caldo pode alcançar temperaturas de 37 °C a 45 °C [39]. A *P. kudriavzevii* é conhecida por sua alta capacidade de tolerar estresses, dentre estes, ser capaz de produzir etanol em temperaturas entre 40 °C - 45 °C [4, 44].

Dentro do grupo UV, a levedura SP 11 UV apresentou a maior viabilidade celular no grupo controle a 28 °C (75,95%) e na temperatura a 30 °C (47,37%), quando comparada com as outras amostras. Nas demais temperaturas testadas (35 °C, 40 °C e 45 °C) a maior viabilidade foi da SP 24, registrando 61,06%, 63,58% e 31,73% respectivamente. Já nos grupos controle houve alternância quanto aos melhores resultados expressos de viabilidade celular entre as leveduras SP 11 e SP 27 (Figura 7).

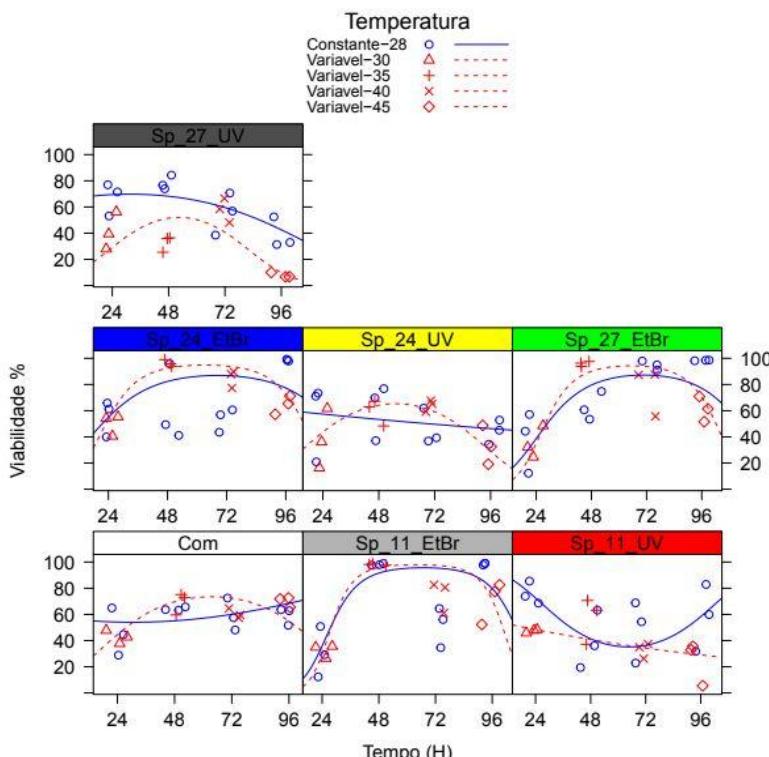


Figura 7: Média da viabilidade celular (%), das leveduras testadas SP 11, 24 e 27 (UV e EtBr) e levedura comercial (Safale US-05) em diferentes temperaturas (cor vermelha) e grupo controle em temperatura constante de 28 °C (azul).

Considerando os resultados apresentados pelas leveduras induzidas por brometo de etídio, na temperatura de 30 °C e 40 °C, o melhor resultado foi da SP 24 (49,43%; 86,96%). A amostra SP 11 apresentou melhor viabilidade nas temperaturas teste de 35 °C e 45 °C (98,07%; 71,57%, respectivamente).

De forma geral, as leveduras induzidas por brometo apresentaram melhores resultados nos testes de termotolerância comparadas aos mutantes UV. Nos ensaios a 30 °C, a melhor viabilidade celular apresentada foi da SP 24 EtBr (49,43%). Na temperatura de 35 °C, SP 11 EtBr se destacou com 98,07%, de viabilidade. Para 40 °C, SP 24 EtBr apresentou o melhor resultado de viabilidade celular (86,96%), e por fim, na maior temperatura testada, 45 °C, a maior viabilidade celular apresentada foi da amostra SP 11 EtBr (71,57%), muito próximo à ela, a levedura comercial com 70,13%.

Em comparação com o grupo controle, o dia 1 (incubação a 30 °C), apresentou resultados semelhantes entre o controle e leveduras mutantes (até mesmo com a levedura comercial). No dia 2, ocorreram algumas diferenças entre elas, sendo que as mudanças mais significativas registradas foram da SP 27 UV que apresentou viabilidade de 78,25% no grupo controle e 32,68% na temperatura teste (35 °C), e das leveduras SP 24 EtBr e 27 EtBr, com ≥ 96% no grupo controle e pouco mais de 62% na temperatura de 35 °C. Para o teste à 40 °C no geral, as leveduras de ambos

os grupos apresentaram maior viabilidade nesta temperatura do que no controle (exceto para as amostras SP 11 UV e 27 EtBr).

Por fim, na temperatura de 45 °C, todas as leveduras mutantes apresentaram viabilidade inferior ao apresentado pelo grupo controle, e neste aspecto, esses resultados estão de acordo com o observado para *P. kudriavzevii* no geral, como relatado no trabalho de Martínez-avila et al. (2020) [45], onde se verificou que a tolerância dessa espécie a temperatura está entre 42°C e 46°C, apresentando bons resultados até 42°C. Dessa forma, as induções de mutação não influenciaram fortemente a tolerância a altas temperaturas quando se avaliaram resultados apresentados por cepas potenciais a essa finalidade.

Para as leveduras induzidas por brometo de etídio, a temperatura de 35 °C foi a temperatura ótima para essas leveduras, em relação ao controle a 28 °C alcançando as maiores viabilidades celulares do grupo e de todas as leveduras testadas nas diferentes temperaturas, atingindo quase 100% de viabilidade. Para os resultados de *UFC/mL* é possível observar que a levedura comercial cresceu em menor quantidade que as leveduras mutantes testadas. Dentre as temperaturas teste, 30 °C e 35 °C foram as temperaturas que apresentaram maiores *UFC/mL* para as leveduras mutantes, sendo que nestas temperaturas, o grupo EtBr foi o que mais se destacou. Na temperatura de 40 °C as leveduras do grupo UV apresentaram resultados semelhantes entre si e dentro do grupo EtBr, a exceção nessa temperatura ficou para a levedura SP 11 EtBr, apresentando os maiores resultados com $2,2 \times 10^9$ *UFC/mL*. Já para a temperatura de 45 °C, a SP 24 UV obteve os maiores valores para *UFC/mL* (Figura 8).

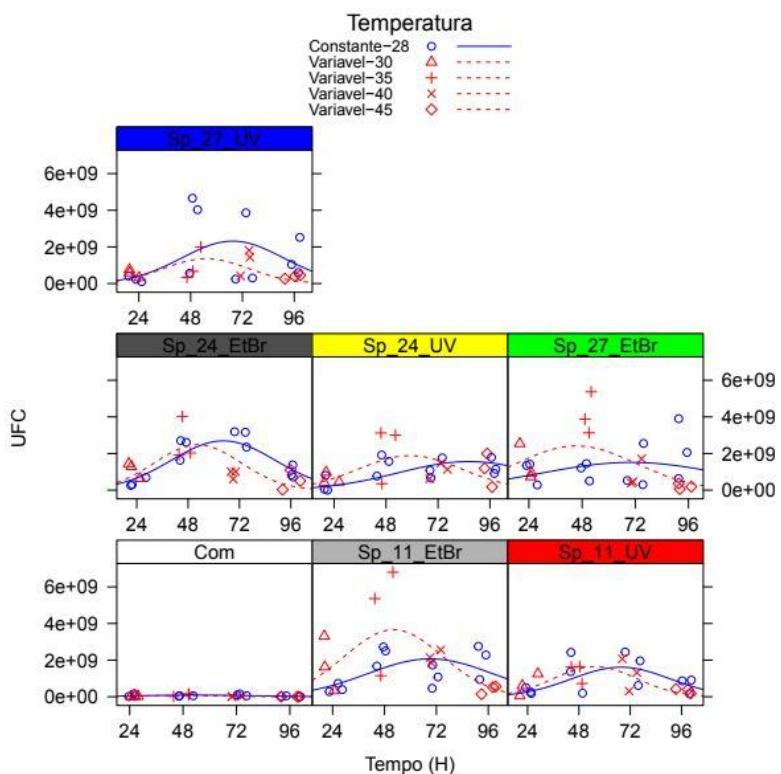


Figura 8: *UFC/mL* das leveduras testadas, SPs 11, 24, 27 (UV e EtBr) e levedura comercial Safale US-05 em diferentes temperaturas (30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C) (cor vermelha) e grupo controle em temperatura constante de 28 °C (azul).

Semelhante aos resultados observados com os mutantes de brometo de etídio neste trabalho, comparando os resultados do teste de temperatura com o teste de tolerância ao etanol, foi relatado no trabalho de Astuti et al. (2018) [46] com leveduras mutantes de *P. kudriavzevii*, no qual as leveduras que apresentaram alta tolerância ao estresse de temperatura, não necessariamente eram tolerantes ao etanol, o que segundo os autores, a indução aleatória causada pelo mutagênico químico metanossulfonato de etila (EMS) utilizado no experimento, pode ter induzido

essencialmente o melhoramento da tolerância a temperatura e não contra estresse ao etanol. Dessa forma, a mutação por agente químico neste trabalho (com brometo de etídio), também pode ter afetado de forma mais acentuada, alguns dos mecanismos de defesa contra estresse térmico utilizados por esse grupo de leveduras originalmente oriundas de fermentação de Cachaça.

3.6 Análises cromatográficas de compostos voláteis

Nos mutantes induzidos por luz UV não houve picos apontando a presença de etanol. No grupo induzido por brometo somente a amostra SP 11 não apresentou picos relativos ao etanol.

Dois outros compostos estavam presentes quando associados ao etanol, sendo eles, o acetato de etila e o álcool isopentílico. A presença do acetato de etila somente foi registrada nas amostras com altos níveis de etanol, o que pode ser explicado, pois a presença elevada desse composto aumenta a presença de ésteres etílicos no meio [22]. A *P. kudriavzevii* conhecidamente é uma grande produtora de acetato de etila e álcool isoamílico a partir do etanol, consumindo parte do etanol como fonte de carbono para manter seu crescimento e manutenção celular após consumir toda a fonte de substrato principal [39].

Nas Tabelas 4, 5 e 6 estão expressos os resultados das análises dos compostos voláteis das amostras dos grupos mutantes luz UV e brometo por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM), bem os perfis e picos de cada um dos compostos identificados nos cromatogramas gerados (Figuras 9, 10, 11, 12, 13 e 14). A maioria das amostras apresentaram, essencialmente, os mesmos resultados para os compostos encontrados nos fermentados das leveduras mutantes em cultura pura. Todos os compostos divergentes entre cada levedura correspondente do outro grupo mutante foram destacados nas tabelas com um asterisco na cor vermelha.

Tabela 4: Resultados das análises cromatográficas dos fermentados para as amostras das leveduras mutantes por brometo (SP 11 EtBr) à esquerda e das mutantes por luz UV (SP 11 UV) à direita.

SP 11 EtBr	SP 11 UV
Acetato de Isopentila	Acetato de Isopentila
Benzaldeido	Benzaldeido
Hexanoato de Etila	Hexanoato de Etila
2-Etilhexan-1-Ol	2-Etilhexan-1-Ol
Benzenoacetaldeido	Benzenoacetaldeido
Acetofenona	Acetofenona
3-Etil-2,5-Dimetilpirazina	3-Etil-2,5-Dimetilpirazina
2-Feniletan-1-Ol	2-Feniletan-1-Ol
ÁcidoOctanoico	ÁcidoOctanoico
Octanoato de Etila	Octanoato de Etila
3,5-Dimetil-2-Isobutilpirazina	3,5-Dimetil-2-Isobutilpirazina
2-Fenil Acetato de Etila*	Acetato de 2-Etilfenila
Acetato de 2-Etilfenila	2,6-Di-Tert-Butil-P-Benzoquinona
2,6-Di-Tert-Butil-P-Benzoquinona	2,4-Di-Tert-Butilfenol
2,4-Di-Tert-Butilfenol	

Tabela 5: Resultados das análises cromatográficas dos fermentados para as amostras das leveduras mutantes por brometo (SP 24 EtBr) à esquerda e mutantes por luz UV (SP 24 UV) à direita.

SP 24 EtBr	SP 24 UV
Etanol*	Acetato de Isopentila
Acetato de Etila*	Benzaldeido
Alcoolisopentilico*	Hexanoato de Etila
Acetato de Isopentila	2-Etilhexan-1-Ol
Benzaldeido	Benzenoacetaldeido
Hexanoato de Etila	Acetofenona
2-Etilhexan-1-Ol	3-Etil-2,5-Dimetilpirazina
Benzenoacetaldeido	2-Feniletan-1-Ol
Acetofenona	ÁcidoOctanoico
3-Etil-2,5-Dimetilpirazina	Octanoato de Etila
2-Feniletan-1-Ol	3,5-Dimetil-2-Isobutilpirazina
ÁcidoOctanoico	2-Fenilacetato de Etila*
Octanoato de Etila	Acetato de 2-Etilfenila
3,5-Dimetil-2-Isobutilpirazina	2,6-Di-Tert-Butil-P-Benzoquinona
Acetato de 2-Etilfenila	2,4-Di-Tert-Butilfenol
2,6-Di-Tert-Butil-P-Benzoquinona	
2,4-Di-Tert-Butilfenol	

Tabela 6: Resultados das análises cromatográficas dos fermentados para as amostras das leveduras mutantes por brometo (SP 27 EtBr) à esquerda e mutantes por luz UV (SP 27 UV) à direita.

SP 27 EtBr	SP 27 UV
Etanol*	Acetato de isopentila
Acetato de etila*	Benzaldeido
Alcoolisopentilico*	Hexanoato de etila
Acetato de isopentila	2-ethylhexan-1-ol
Benzaldeido	Benzenoacetaldeido
Hexanoato de etila	Acetofenona
2-ethylhexan-1-ol	3-ethyl-2,5-dimetilpirazina
Benzenoacetaldeido	2-feniletan-1-ol
Acetofenona	Octanoato de etila
3-ethyl-2,5-dimetilpirazina	3,5-dimetil-2-isobutilpirazina
2-feniletan-1-ol	Acetato de 2-ethylfenila
Ácidooctanoico	2,6-di-tert-Butil-p-benzoquinona
Octanoato de etila	2,4-di-tert-butilfenol
3,5-dimetil-2-isobutilpirazina	Ácidooctanoico
2-fenilacetato de etila*	
Acetato de 2-ethylfenila	
2,6-di-tert-Butil-p-benzoquinona	
2,4-di-tert-butilfenol	

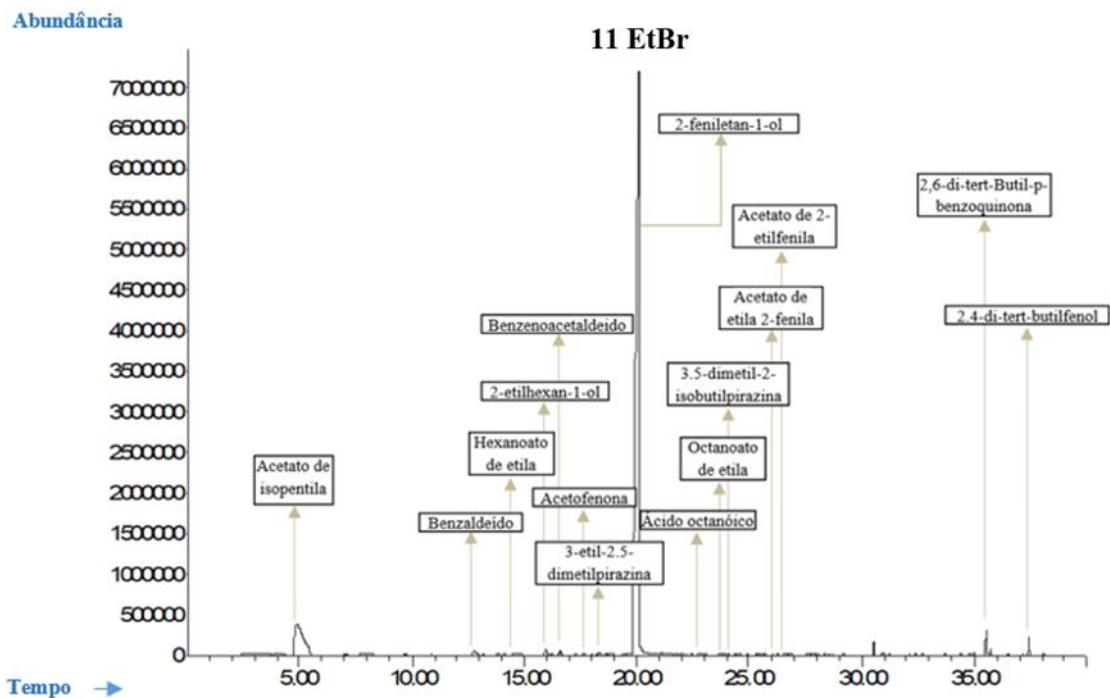


Figura 9: Cromatograma gerado por CG acoplada ao EM. Resultados referentes a amostra do fermentado produzidos pelo grupo de leveduras *Pichia kudriavzevii* híbridas mutantes induzidas por EtBr (brometo de etídio) 11 EtBr conforme descrito em métodos, e todos os compostos caracterizados com base no banco de dados (biblioteca) do equipamento utilizado.

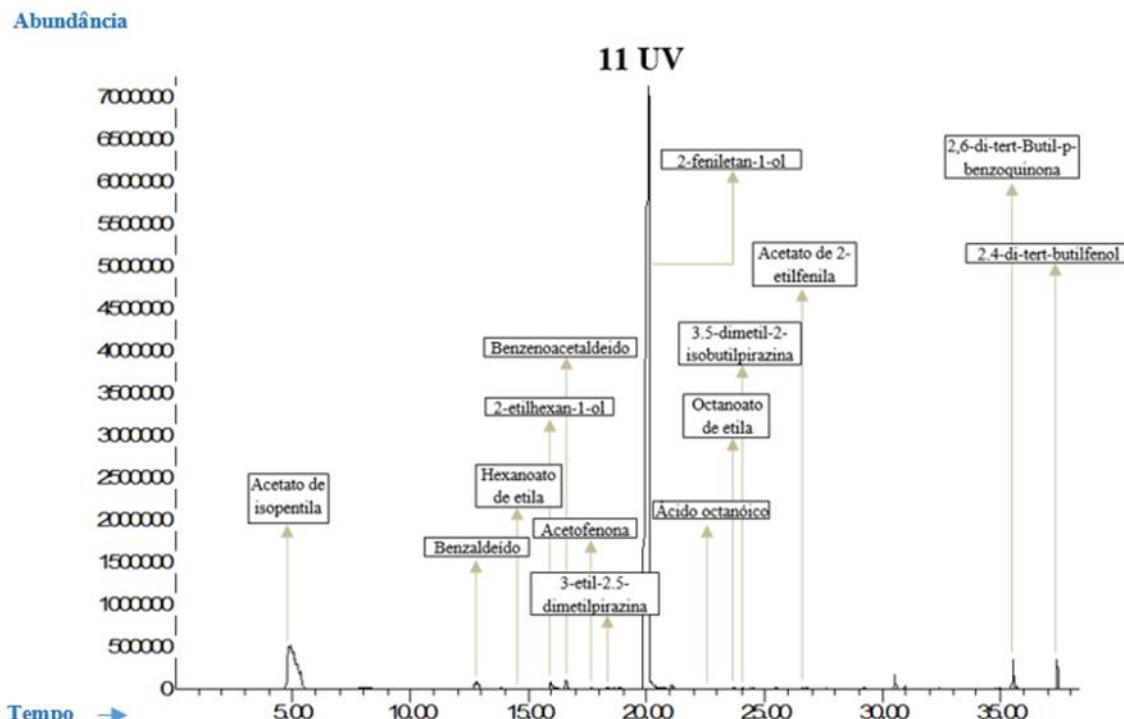


Figura 10: Cromatograma gerado por CG acoplada ao EM. Resultados referentes a amostra do fermentado produzidos pelo grupo de leveduras *Pichia kudriavzevii* híbridas mutantes induzidas por UV (Luz Ultravioleta) 11 UV conforme descrito em métodos, e todos os compostos caracterizados com base no banco de dados (biblioteca) do equipamento utilizado.

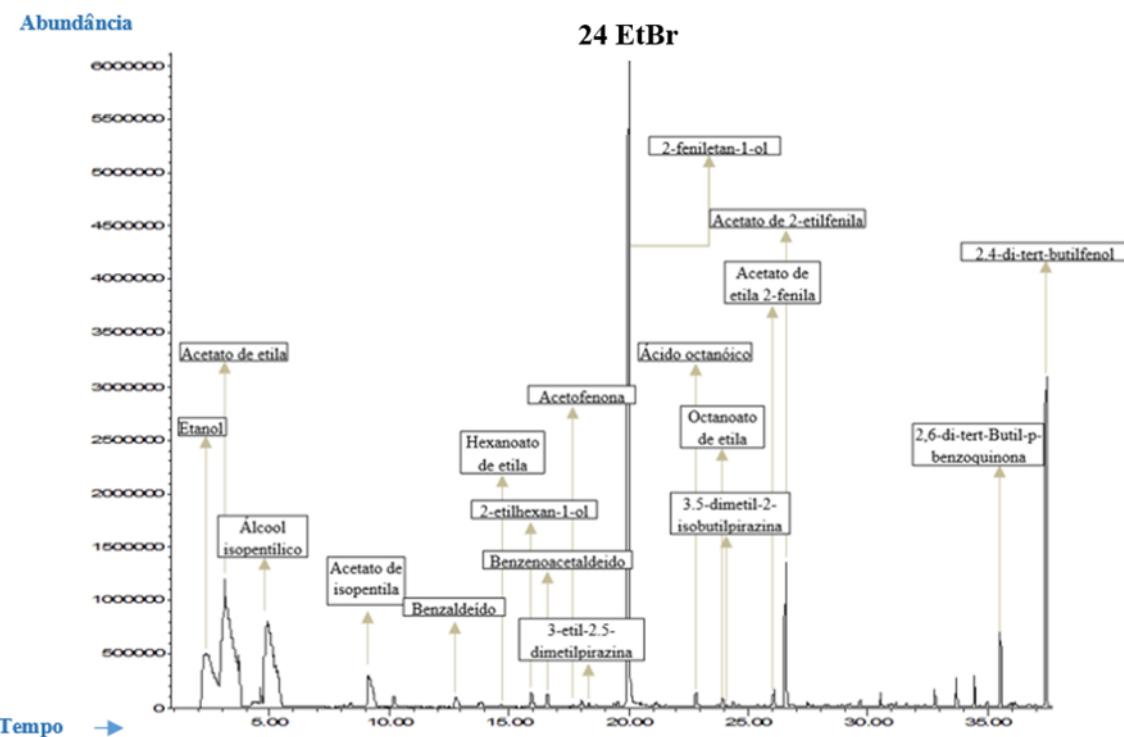


Figura 11: Cromatograma gerado por CG acoplada ao EM. Resultados referentes a amostra do fermentado produzidos pelo grupo de leveduras *Pichia kudriavzevii* híbridas mutantes induzidas por EtBr (brometo de etídio) 24 EtBr conforme descrito em métodos, e todos os compostos caracterizados com base no banco de dados (biblioteca) do equipamento utilizado.

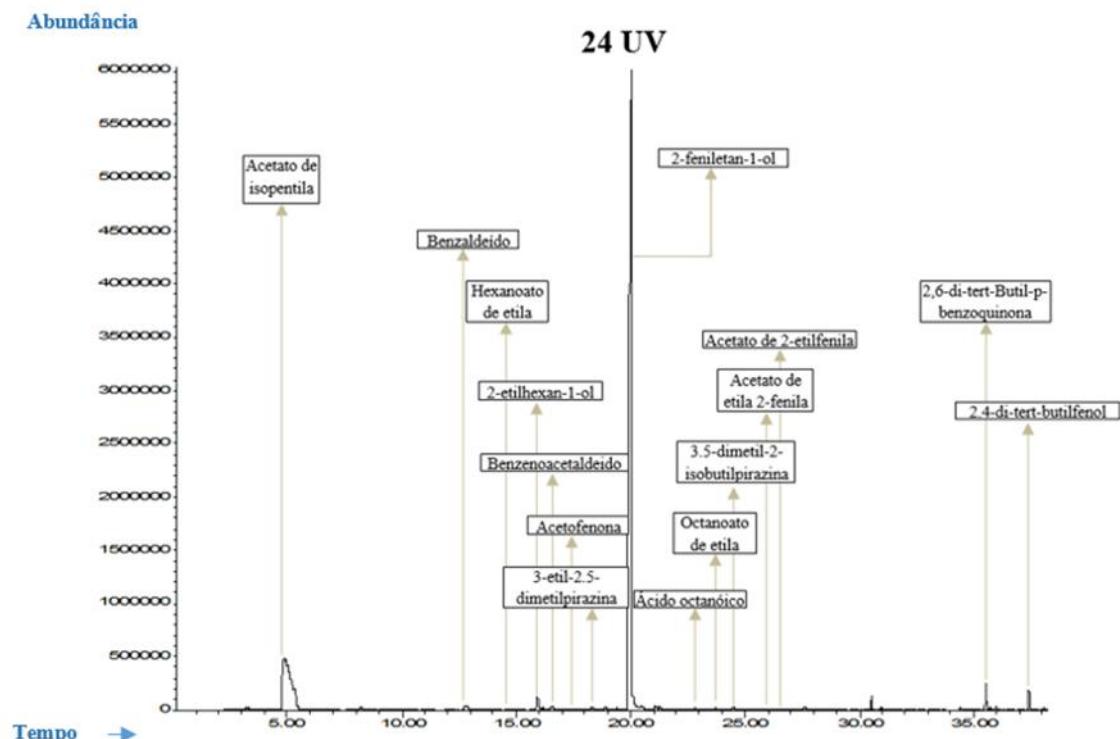


Figura 12: Cromatograma gerado por CG acoplada ao EM. Resultados referentes a amostra dos fermentados produzidos pelo grupo de leveduras *Pichia kudriavzevii* híbridas mutantes induzidas por UV (Luz Ultravioleta) 24 UV conforme descrito em métodos, e todos os compostos caracterizados com base no banco de dados (biblioteca) do equipamento utilizado.

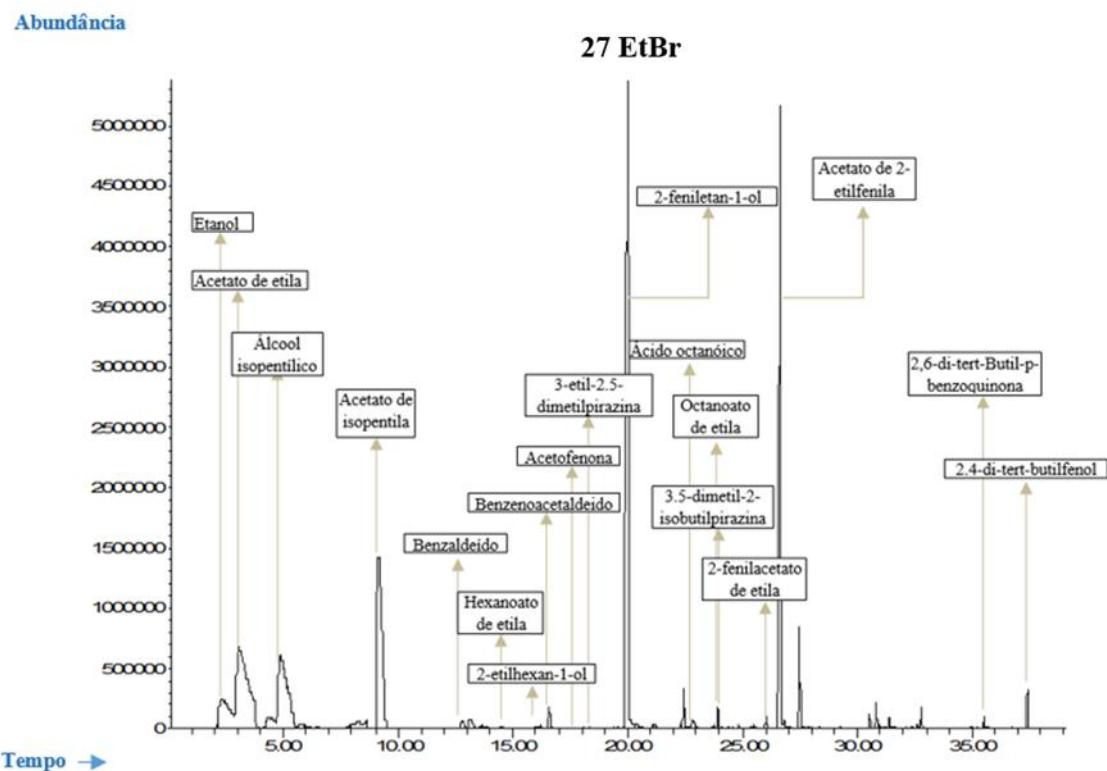


Figura 13: Cromatograma gerado por CG acoplada ao EM. Resultados referentes a amostra dos fermentados produzidos pelo grupo de leveduras *Pichia kudriavzevii* híbridas mutantes induzidas por EtBr (brometo de etídio) 27 EtBr conforme descrito em métodos, e todos os compostos caracterizados com base no banco de dados (biblioteca) do equipamento utilizado.

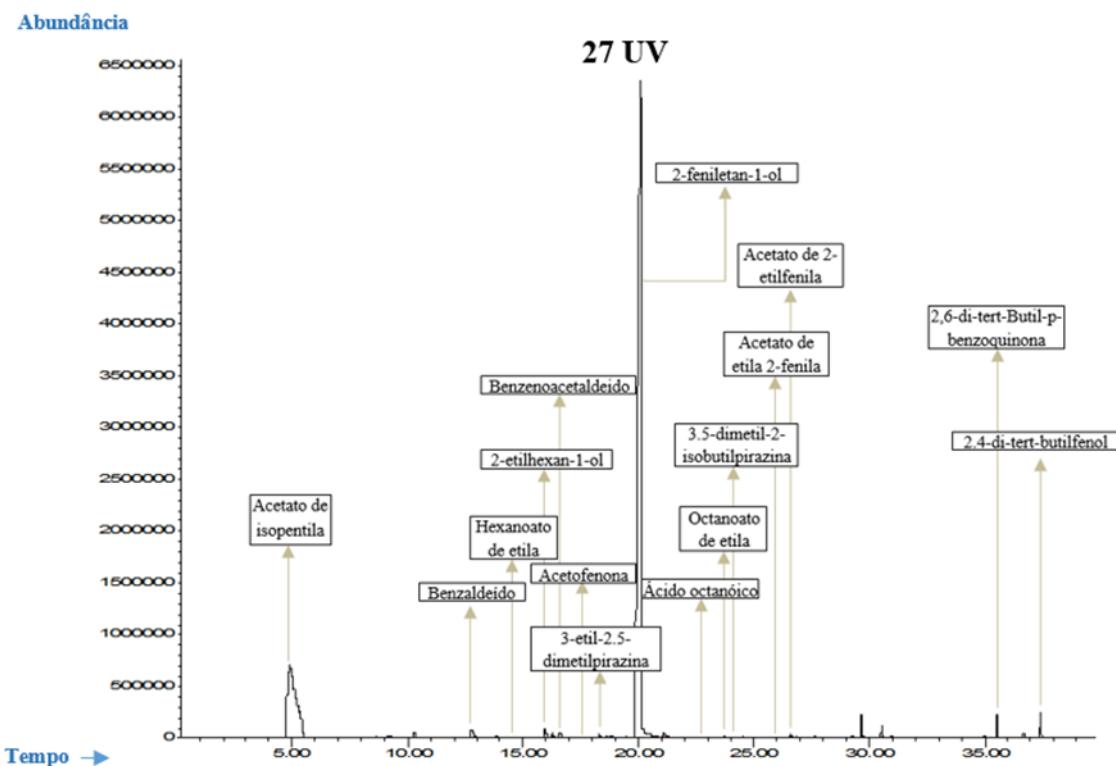


Figura 14: Cromatograma gerado por CG acoplada ao EM. Resultados referentes a amostra dos fermentados produzidos pelo grupo de leveduras *Pichia kudriavzevii* híbridas mutantes induzidas por UV (Luz Ultravioleta) 27 UV conforme descrito em métodos, e todos os compostos caracterizados com base no banco de dados (biblioteca) do equipamento utilizado.

Em bebidas como as cervejas, é comum encontrar alguns desses compostos listados acima. Dentre os ésteres, alguns considerados de extrema importância para adicionar sabores e aromas na bebida são: acetato de etila, acetato de isoamila (acetato de isopentila) associado ao aroma de banana, acetato de isobutila, associado a aromas frutados, fenil acetato de etila (2-fenilacetato de etila) (rosas e mel), hexanoato de etila (maçã doce); e octanoato de etila (maçã azeda) [47, 48]. Dentre os ésteres citados anteriormente, acetato de etila e acetato de isoamila estavam presentes em grande quantidade nas amostras analisadas neste trabalho, em contrapartida, hexanoato de etila e octanoato de etila foram alguns dos compostos detectados em menores quantidades, sendo em algumas amostras os compostos em menor quantidade. Já o fenil acetato de etila (2-fenilacetato de etila), só foi detectado nas amostras SP 11 EtBr, 24 UV e 27 EtBr, e nenhuma relação com a indução da mutação foi observada como possível explicação para sua ocorrência em algumas amostras e em outras não. O maior pico apresentado no cromatograma na maioria das amostras foi referente ao 2-feniletan-1-ol (2-PE), com exceção em uma pequena diferença da amostra SP 24 EtBr.

2-feniletan-1-ol ou álcool fenetílico, trata-se de um álcool primário amplamente encontrado na natureza. Muito utilizado na indústria de cosméticos, esse álcool é adicionado muitas vezes em óleos essenciais por seu característico odor de rosa. Em cervejas, muitas vezes é desejável, contribuindo positivamente no aroma e sabor da bebida e normalmente sua produção está diretamente relacionada com o tipo de cepa e condições que favorecem o crescimento da levedura [48], sobretudo por *P. kudriavzevii* testada em resíduos agroindustriais ou em meios sintéticos de fermentação [49].

Dessa forma, o 2-PE é considerado valioso e algumas pesquisas buscam por alternativas biotecnológicas para produzir quantidades significativas desse composto. Como relatado no trabalho de Martínez-avila et al. (2020) [45], foi usada uma cepa potencial de *P. kudriavzevii* isolada de fermentado de bagaço de cana-de açúcar, para avaliar a produção de 2-PE através de ajustes no pH, temperatura, adição de micronutriente, entre outros, confirmando a capacidade de se utilizar cepas de *P. kudriavzevii* para produzir 2-PE para fins industriais. 2-PE pode ser especialmente estimulado através da manipulação da temperatura para aumento da produção em *P. kudriavzevii* que a 31 °C foi aparentemente ótima para a cepa testada por eles visando produção de 2-PE [45], diferente da utilizada no presente trabalho para fermentação do caldo de cana-de-açúcar, produzindo 2-PE a 28 °C pela linhagem de *Pichia* spp. testada.

4. CONCLUSÃO

Como demonstrado, as induções de mutação aqui testadas melhoraram o desempenho das leveduras utilizadas quando comparadas às leveduras híbridas parentais (não induzidas), especialmente no consumo de glicose e frutose, rendimento e produtividade etanólica, tal como tolerância ao etanol pelo grupo UV, porém, quando comparadas à levedura comercial, seus resultados foram inferiores com relação ao consumo de sacarose, sendo que, mesmo em fermentação sequencial, o controle (somente a levedura comercial), apresentou melhores resultados, porém, é importante destacar, que a manipulação de variáveis como temperatura e substrato, pode afetar o resultado dos testes realizados.

Nos testes de tolerância, cada grupo se destacou em tipos de tolerância diferentes, ou seja, para tolerância ao etanol o grupo UV apresentou os melhores resultados (a SP 24 UV foi a única que apresentou crescimento de UFC, na concentração de 12%). Para os testes de termotolerância, os melhores resultados foram apresentados pelo grupo EtBr, apresentando viabilidade superior a 90% na temperatura de 35°C (no geral, este grupo apresentou bons resultados em temperaturas entre 30 - 40 °C).

Com relação as análises cromatográficas, de forma geral, muitos compostos associados a aromas e sabores frutados, floridos e amendoados comuns em bebidas fermentadas, como o vinho por exemplo, foram encontrados nas amostras dos fermentados produzidos a partir do mosto de cana-de-açúcar inoculado com as leveduras testadas nesse estudo. O 2-feniletan-1-ol, foi o composto relacionado ao maior pico apresentado nos cromatogramas de quase todas as amostras, o que pode orientar o desenvolvimento de novas pesquisas com o uso dessas leveduras, objetivando a produção desse composto.

Considerando o interesse industrial no 2-feniletan-1-ol, e os resultados apresentados neste trabalho com as leveduras mutantes, que apresentaram boa capacidade fermentativa em diferentes substratos e tolerância, especialmente a altas temperaturas, essas leveduras tornam-se uma alternativa interessante e promissora. A utilização dessas leveduras pode, portanto, contribuir para a otimização de processos fermentativos, por exemplo, ampliando a viabilidade de produção de compostos de interesse, em condições operacionais mais severas, que frequentemente limitam a atividade de linhagens selvagens de leveduras.

5. AGRADECIMENTOS

M. S. Versiani foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Brasil, H. M. Valério é pesquisador financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG. Os autores reconhecem o apoio financeiro e a infraestrutura da Unimontes e do Dr. Flaviano Oliveira Silvério do ICA da Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, pelos seus ensaios de laboratório e suporte físico-químico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zhou N, Schifferdecker AJ, Gamero A, Compagno C, Boekhout T, Piškur J, et al. Kazachstania gamospora and *Wickerhamomyces subpelliculosus*: two alternative baker's yeasts in the modern bakery. *Int J Food Microbiol.* 2017;250:45-58. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.013
2. Canonic L, Galli E, Ciani E, Comitini F, Ciani M. Exploitation of three non-conventional yeast species in the brewing process. *Microorganisms.* 2019 Jan;7(1):1-11. doi: 10.3390/microorganisms7010011
3. Chan GF, Gan HM, Ling HL, Rashid NAA. Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a potential producer of bioethanol and phytase. *Eukaryot Cell.* 2012 Oct;11(10):1300-1. doi: 10.1128/EC.00229-12
4. Mukherjee V, Radecka D, Aerts G, Verstrepen KJ, Lievens B, Thevelein JM. Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. *Biotechnol Biofuels.* 2017;10:216. doi: 10.1186/s13068-017-0899-5
5. Drumonde-Neves J, Fernandes T, Lima T, Pais C, Franco-Duarte R. Learning from 80 years of studies: a comprehensive catalogue of non-*Saccharomyces* yeasts associated with viticulture and winemaking. *FEMS Yeast Res.* 2021 Apr;21(3):foab017. doi: 10.1093/femsyr/foab017
6. Vicente J, Calderón F, Santos A, Marquina D, Benito S. High Potential of *Pichia kluyveri* and Other *Pichia* Species in Wine Technology. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan;22(3):1196. doi: 10.3390/ijms22031196
7. Chamnipa N, Thanonkeo S, Klanrit P, Thanonkeo P. The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production. *Braz J Microbiol.* 2018 Apr;49(2):378-91. doi: 10.1016/j.bjm.2017.09.002
8. Peris D, Moriarty RV, Alexander WG, Baker E, Sylvester K, Sardi M, et al. Hybridization and adaptive evolution of diverse *Saccharomyces* species for cellulosic biofuel production. *Biotechnol Biofuels.* 2017 Dec;10(1):78. doi: 10.1186/s13068-017-0763-7
9. Belloch C. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces* sensu stricto complex. *Int J Food Microbiol.* 2008 Feb;122(1-2):188-95. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.083
10. Ruchala J, Kurylenko OO, Dmytruk KV, Sibirny AA. Construction of advanced producers of first- and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*). *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2020 Jan;47(1):109-32. doi: 10.1007/s10295-019-02242-x
11. Cai P, Gao J, Zhou Y. CRISPR-mediated genome editing in non-conventional yeasts for biotechnological applications. *Microb Cell Factories.* 2019 Dec;18(1):63. doi: 10.1186/s12934-019-1112-2
12. Geertman JMA, van Maris AJA, van Dijken JP, Pronk JT. Physiological and genetic engineering of cytosolic redox metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved glycerol production. *Metab Eng.* 2006 Nov;8(6):532-42. doi: 10.1016/j.ymben.2006.06.004
13. Gorter de Vries AR, de Groot PA, van den Broek M, Daran JMG. CRISPR-Cas9 mediated gene deletions in lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Microb Cell Factories.* 2017 Dec;16(1):222. doi: 10.1186/s12934-017-0835-1
14. Thykaer J, Nielsen J. Metabolic engineering of beta-lactam production. *Metab Eng.* 2003;(5):56-69. doi: 10.1016/s1096-7176(03)00003-x

15. Naeem M, Sadia B, Awan FS, Zia MA. Enhanced Production of Streptokinase by UV- and Ethidium Bromide-Treated *Streptococcus equisimilis* Mutant. *Pak J Zool.* 2018 Mar;50(2):655-61. doi: 10.17582/journal.pjz/2018.50.2.655.661
16. Sayas E, García-López F, Serrano R. Toxicity, mutagenicity and transport in *Saccharomyces cerevisiae* of three popular DNA intercalating fluorescent dyes: Comparison of DNA intercalating dyes. *Yeast.* 2015 Sep;32(9):595-606. doi: 10.1002/yea.3081
17. Hawary H, Rasmey AHM, Aboseidah AA, El-Morsi ES, Hafez M. Enhancement of glycerol production by UV-mutagenesis of the marine yeast *Wickerhamomyces anomalus* HH16: kinetics and optimization of the fermentation process. *3 Biotech.* 2019 Dec;9(12):446. doi: 10.1007/s13205-019-1981-4
18. Chmielewska J, Dziuba E. Respiratory deficient mutants of xylose-fermenting yeast—obtainment and features. *Electron J Pol Agric Univ.* 2003;6(2):01.
19. Koti S, Govumoni SP, Gentela J, Venkateswar Rao L. Enhanced bioethanol production from wheat straw hemicellulose by mutant strains of pentose fermenting organisms *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *SpringerPlus.* 2016 Sep;5(1):1545. doi: 10.1186/s40064-016-3222-1
20. Monteiro B, Ferraz P, Barroca M, da Cruz SH, Collins T, Lucas C. Conditions promoting effective very high gravity sugarcane juice fermentation. *Biotechnol Biofuels.* 2018 Dez;11(1):251. doi: 10.1186/s13068-018-1239-0
21. Smith BG. Beersmith: Home Brewing Software. Version 3. Beersmith LLC. 2018. Disponível em: <https://beersmith.com>.
22. Chen D, Liu SQ. Impact of simultaneous and sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on non-volatiles and volatiles of lychee wines. *LWT Food Sci Technol.* 2016 Jan;65:53-61. doi: 10.1016/j.lwt.2015.07.050
23. Mertens S, Steensels J, Saelens V, De Rouck G, Aerts G, Verstrepen KJ. A Large set of newly created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in lager beers. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Dec;81(23):8202-14. doi: 10.1128/AEM.02464-15
24. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw.* 2015;67(1):1-48. doi: 10.18637/jss.v067.i01
25. Crawley MJ. The R book. 2. ed. Chichester: Wiley; 2013. Disponível em: <http://www.bio.ic.ac.uk/research/mjcraw/therbook/index.htm>.
26. R Core Team. R: A Language and environment for statistical computing. R package version 4.1.0. 2022. Disponível em: <https://www.r-project.org>.
27. Yi S, Zhang X, Li HX, Du XX, Liang SW, Zhao XH. Screening and mutation of *Saccharomyces cerevisiae* UV-20 with a high yield of second generation bioethanol and high tolerance of temperature, glucose and ethanol. *Indian J Microbiol.* 2018 Dec;58(4):440-7. doi: 10.1007/s12088-018-0741-1
28. Revin V, Atykyan N, Lyovina E, Dragunova Y, Ushkina V. Effect of ultraviolet radiation on physiological and biochemical properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of ultradispersed starch raw material. *Electron J Biotechnol.* 2018 Jan;31:61-6. doi: 10.1016/j.ejbt.2017.11.004
29. Sridhar M. Effect of UV radiation on thermotolerance, ethanol tolerance and osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* VS1 and VS3 strains. *Bioresour Technol.* 2002 Jul;83(3):199-202. doi: 10.1016/s0960-8524(01)00221-8
30. Arora N, Yen HW, Philippidis GP. Harnessing the power of mutagenesis and adaptive laboratory evolution for high lipid production by oleaginous microalgae and yeasts. *Sustainability.* 2020 Jun;12(12):5125. doi: 10.3390/su12125125
31. Muthuraj M, Selvaraj B, Palabhanvi B, Kumar V, Das D. Enhanced lipid content in *Chlorella* sp. FC2 IITG via high energy irradiation mutagenesis. *Korean J Chem Eng.* 2019 Jun;36(1):63-70. doi: 10.1007/s11814-018-0180-z
32. Soloneski S, Larramendy ML. Genotoxicity and Mutagenicity: Mechanisms and test methods. London (UK): IntechOpen; 2021. doi: 10.5772/intechopen.84992
33. Li X, Lin Y, Kong H, Wang Z. Screening of ultraviolet-induced thermotolerant yeast mutants and their performance. *Fermentation.* 2023 Jun;9(7):608. doi: 10.3390/fermentation9070608
34. Furlani MVM, Maturano YP, Combina M, Mercado LA, Toro ME, Vazquez F. Selection of non-*Saccharomyces* yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: a strategy to obtain wines with reduced ethanol content. *FEMS Yeast Res.* 2017;17(2):fox010. doi: 10.1093/femsyr/fox010
35. Wei J, Zhang Y, Yuan Y, Dai L, Yue T. Characteristic fruit wine production via reciprocal selection of juice and non-*Saccharomyces* species. *Food Microbiol.* 2019;79:66-74. doi: 10.1016/j.fm.2018.11.008
36. Miller KV, Block DE. A review of wine fermentation process modeling. *J Food Eng.* 2020 May;273:109783. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2019.109783
37. Eigenfeld M, Kerpes R, Becker T. Understanding the impact of industrial stress conditions on replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Fungal Biol.* 2021 Jun;2:665490. doi: 10.3389/ffunb.2021.665490

38. Hawaz E, Tafesse M, Tesfaye A, Beyene D, Kiros S, Kebede G, et al. Isolation and characterization of bioethanol producing wild yeasts from bio-wastes and co-products of sugar factories. *Ann Microbiol.* 2022 Dec;72(1):39. doi: 10.1186/s13213-022-01695-3
39. Nieto-Sarabia VL, Ballinas-Cesatti CB, Melgar-Lalanne G, Cristiani-Urbina E, Morales-Barrera L. Isolation, identification, and kinetic and thermodynamic characterization of a *Pichia kudriavzevii* yeast strain capable of fermentation. *Food Bioprod Process.* 2022 Jan;131:109-24. doi: 10.1016/j.fbp.2021.10.013
40. Shi WK, Wang J, Chen FS, Zhang XY. Effect of *Issatchenka terricola* and *Pichia kudriavzevii* on wine flavor and quality through simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT.* 2019 Dec;116:108477. doi: 10.1016/j.lwt.2019.108477
41. Curiel JA, Morales P, Gonzalez R, Tronchoni J. Different non-*Saccharomyces* yeast species stimulate nutrient consumption in *S. cerevisiae* mixed cultures. *Front Microbiol.* 2017 Oct;8:2121. doi: 10.3389/fmicb.2017.02121
42. Vamvakas SS, Kapolos J. Factors affecting yeast ethanol tolerance and fermentation efficiency. *World J Microbiol Biotechnol.* 2020 Aug;36(8):114. doi: 10.1007/s11274-020-02881-8
43. Pongcharoen P, Chawneua J, Tawong W. High temperature alcoholic fermentation by new thermotolerant yeast strains *Pichia kudriavzevii* isolated from sugarcane field soil. *Agric Nat Resour.* 2018 Dec;52(6):511-8. doi: 10.1016/j.anres.2018.11.017
44. Ndubuisi IA, Qin Q, Liao G, Wang B, Moneke AN, Ogbonna JC, et al. Effects of various inhibitory substances and immobilization on ethanol production efficiency of a thermotolerant *Pichia kudriavzevii*. *Biotechnol Biofuels.* 2020 Dec;13(1):91. doi: 10.1186/s13068-020-01729-5
45. Martínez-Avila O, Sánchez A, Font X, Barrena R. 2-phenylethanol (rose aroma) production potential of an isolated *Pichia kudriavzevii* through solid-state fermentation. *Process Biochem.* 2020 Jun;93:94-103. doi:10.1016/j.procbio.2020.03.023
46. Astuti RI, Alifianti S, Maisyitoh RN, Mubarik NR, Meryandini A. Ethanol production by novel proline accumulating *Pichia kudriavzevii* mutants strains tolerant to high temperature and ethanol stresses. *OnLine J Biol Sci.* 2018 Mar;18(3):349-57. doi: 10.3844/ojbsci.2018.349.357
47. Pires E, Brányik T. Biochemistry of beer fermentation. 1. ed. New York: Springer; 2015. doi: 10.1007/978-3-319-15189-2
48. Shopska V, Denkova R, Lyubenova V, Kostov G. Kinetic characteristics of alcohol fermentation in brewing: state of art and control of the fermentation process. In: Ray RC, Montet D, editores. *Advances in food and nutrition research.* Londres: Academic Press; 2019. p. 529-75. doi: 10.1016/B978-0-12-815271-3.00013-0
49. Mitri S, Koubaa M, Maroun RG, Rossignol T, Nicaud JM, Louka N. Bioproduction of 2-phenylethanol through yeast fermentation on synthetic media and on agro-industrial waste and by-products: A Review. *Foods.* 2022 Jan;11(1):109. doi: 10.3390/foods11010109