

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Diversidade da assimilação de fontes de carbono em isolados industriais de
*Dekkera bruxellensis***

JACKELINE MARIA DA SILVA

Recife
2017

JACKELINE MARIA DA SILVA

**Diversidade da assimilação de fontes carbono em isolados industriais de
*Dekkera bruxellensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Marcos Antonio de Moraes Junior

Co-orientador: Prof. Diogo Ardaillon Simões

Co-orientador: Prof^a Fernanda Cristina Bezerra Leite

Recife

2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Jackeline Maria da

Diversidade da assimilação de fontes de carbono em isolados industriais de Dekkera bruxellensis / Jackeline Maria da Silva- Recife: O Autor, 2017.

67 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antonio de Moraes Junior

Coorientadores: Diogo Ardaillon Simões e Fernanda Cristina Bezerra Leite

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

Inclui referências

- 1. Leveduras (fungos) 2. 3. I. Moraes Junior, Marcos Antonio de (orientador) II. Simões, Diogo Ardaillon (coorientador) III. Leite, Fernanda Cristina Bezerra (coorientadora) IV. Título**

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-266

JACKELINE MARIA DA SILVA

**Diversidade da assimilação de fontes carbono em isolados industriais de *Dekkera
bruxellensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biotecnologia.

Aprovada em: _____

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior (Presidente)

Departamento de Genética – UFPE

Dr. Fábio Sérgio Barbosa da Silva (Examinador Externo)

Universidade de Pernambuco – UPE

Dra. Elaine Malosso (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Recife, 23 de fevereiro de 2017.

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo e companheiro que me incentivou
durante toda minha jornada.

Aos meus pais, pelo carinho, dedicação e apoio em
todos os momentos.

As minhas irmãs e amigos que sempre torceram por
mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida.

A minha querida Rosa, mainha, pelo incentivo que a mim foi concedido. Pelo esforço e pela dedicação durante a minha trajetória.

Ao meu esposo, Roberto Albuquerque, pelo apoio e atenção especialmente nesses dois últimos anos.

Ao meu pai, Ronaldo e minhas irmãs, Jupiracy e Rayssa, pela torcida.

Aos meus professores orientadores, Marcos Moraes, Diogo Simões e Fernanda Leite, pela troca de conhecimentos e pela oportunidade de participar do Núcleo de Engenharia Metabólica.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Gilberto, Nathália, Denise, Irina, Keyla e os demais integrantes. Vocês foram muito importantes durante essa etapa.

Aos colegas de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE pela convivência e aprendizado.

Aos meus amigos da graduação em Ciências Biológicas Licenciatura que se tornaram amigos de vida, Luana, Rayra, Hugo, Amanda, Karla e Sivoneide.

As minhas amigas por serem tão companheiras e prestativas.

A FACEPE pela concessão de Bolsa de Pós-graduação durante os dois anos de mestrado e Auxílio a Mobilidade Discente que possibilitou o estagio no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos, no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CNPEM.

RESUMO:

Dekkera bruxellensis pertence à família Saccharomycetaceae e é considerado um parente distante de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura, principalmente na sua forma anamorfa *Brettanomyces bruxellensis*, é um importante contaminante da produção de vinho. O objetivo deste estudo foi comparar a fisiologia de linhagens da levedura *Dekkera bruxellensis* isoladas da produção de vinho e de álcool combustível quanto ao metabolismo de diferentes açúcares potencialmente utilizados como substrato industrial. Para isso, 30 isolados de *Dekkera bruxellensis* foram avaliados quanto à habilidade de assimilação respiratória e fermentativa de monossacarídeos e dissacarídeos, a diversidade fenotípica relacionada à repressão catabólica pela glicose, e a assimilação de diferentes açúcares, tais como glicose, sacarose e celobiose sob condição anaeróbica. Diferenças entre os perfis de assimilação respiratória foram observadas para cada isolado. As mais altas velocidades de crescimento foram encontradas em meio com glicose, frutose e sacarose $0,32\text{ h}^{-1}$, $0,30\text{ h}^{-1}$ e $0,30\text{ h}^{-1}$, respectivamente, em aerobiose pelos isolados de destilaria. Em maltose e galactose, as maiores taxas de crescimento foram respectivamente, $0,21\text{ h}^{-1}$ e $0,27\text{ h}^{-1}$, alcançadas por isolados de destilaria e de vinícola, e em celobiose e lactose, as maiores taxas foram respectivamente, $0,20\text{ h}^{-1}$ e $0,15\text{ h}^{-1}$, alcançados pelos isolados de destilaria. A presença do repressor catabólico 2-deoxiglicose no meio com galactose e maltose inibiu o crescimento de todos os isolados de vinho, diferentemente de alguns isolados de etanol que apresentaram resistência a este composto. A adição de Antimicina A nos meios de cultura alterou o crescimento apenas dos isolados de vinícola. Em anaerobiose estrita, os isolados de destilaria alcançaram velocidades de crescimento iguais a $0,44\text{ h}^{-1}$; $0,40\text{ h}^{-1}$ e $0,26\text{ h}^{-1}$ em glicose, sacarose e celobiose, respectivamente. A capacidade de assimilação de diferentes açúcares pelos isolados de *D. bruxellensis* frente às diversas condições testadas mostram a diversidade fenotípica encontrada dentro desta espécie. Além disso, os dados podem colaborar para explicação da capacidade adaptativa dessa espécie em diferentes ambientes industriais cujas fontes alternativas de carbono estejam presentes. Do ponto de vista biotecnológico, estudos com isolados de *D. bruxellensis* podem ser voltados para a produção de etanol de segunda geração, cujo um dos substratos é a celobiose, açúcar dos quais linhagens selvagens de *S. cerevisiae* não são capazes de assimilar.

Palavras-chave: *Dekkera bruxellensis*. Assimilação de carbono. Cultivo anaeróbico. Diversidade fisiológica. Repressão por glicose.

ABSTRACT:

Dekkera bruxellensis belongs to the family Saccharomycetaceae and is considered a distant relative of *Saccharomyces cerevisiae*. This yeast, mainly in its anamorphic form *Brettanomyces bruxellensis*, is an important contaminant of wine production. The aim of this study was to compare the physiology of strains *Dekkera bruxellensis* yeast isolated from wine production and ethanol on the metabolism of different sugars potentially used as industrial substrate. To this, 30 isolates of *Dekkera bruxellensis* were assessed for fermentative and respiratory assimilation ability monosaccharides and disaccharides, phenotypic diversity related to catabolite repression by glucose and the assimilation of different sugars, such as glucose, sucrose and cellobiose under anaerobic conditions. Differences between the profiles of respiratory assimilation were observed for each isolate. The highest growth rates were found in glucose, fructose and sucrose 0.32 h⁻¹, 0.30 h⁻¹ and 0.30 h⁻¹, respectively, in aerobiosis by distillery isolates. In maltose and galactose, the highest growth rates were respectively 0.21 h⁻¹ and 0.27 h⁻¹, reached by distillery and wine isolates, and in cellobiose and lactose, the highest rates were 0, 20 h⁻¹ and 0.15 h⁻¹, reached by distillery isolates. The presence of the 2-deoxyglucose catabolic repressor in the medium with galactose and maltose inhibited the growth of all the wine isolates, unlike some ethanol isolates were resistant to this compound. The addition of Antimycin A in the culture media altered the growth of only the wine isolates. In strict anaerobiosis the isolates of distillery reached growth rates equal to 0.44 h⁻¹; 0.40 h⁻¹ and 0.26 h⁻¹ in glucose, sucrose and cellobiose, respectively. The capacity of assimilation of different sugars by *D. bruxellensis* isolates against the different conditions tested shows the phenotypic diversity found within this species. Moreover, the data can corroborate to explain the adaptive capacity of this species in different industrial environments whose alternative carbon sources are present. In biotechnological point of view, studies with isolated *D. bruxellensis* may be facing a second-generation ethanol, which one of the substrates is a cellobiose, sugar from which wild strains of *S. cerevisiae* are not able to assimilate.

Keywords: Carbon assimilation. Anaerobic cultivation. Physiological diversity. Glucose repression.

Lista de figuras

CAPÍTULO 1

Revisão bibliográfica	Página
Figura 1.1 - Linhagens da espécie <i>Dekkera bruxellensis</i>	15
Figura 1.2 - Arvore filogenética das espécies do gênero <i>Dekkera</i>	16
Figura 1.3 - Metabolismo das hexoses em <i>S. cerevisiae</i> .	19
Figura 1.4 - Estrutura química da sacarose.	22
Figura 1.5 - Estrutura química da maltose.	22
Figura 1.6 - Estrutura química da celobiose.	23
Figura 1.7 - Estrutura química da lactose.	24

CAPÍTULO 2

Artigo a ser submetido	Página
Figura 2.1 - Cinética de crescimento aeróbio de isolados de <i>D. bruxellensis</i> em monossacarídeos.	40
Figura 2.2 - Cinética de crescimento aeróbio de isolados de <i>D. bruxellensis</i> em dissacarídeos.	42
Figura 2.3 - Velocidades de crescimento de diferentes isolados de <i>D. bruxellensis</i> de destilaria de etanol e vinho em diferentes fontes de carbono.	44
Figura 2.4 - Mapa de calor (<i>heat map</i>) do teste de crescimento qualitativo em placa de Petri de diversos isolados de <i>D. bruxellensis</i> em diferentes fontes de carbono e adição de Antimicina A (AA).	46
Figura 2.5 - Mapa de calor (<i>heat map</i>) do teste de crescimento qualitativo em placa de Petri de diferentes isolados de <i>D. bruxellensis</i> em diferentes fontes de carbono e adição de 2-deoxi-D-glicose.	47
Figura 2.6 - Cinética de crescimento anaeróbico de diferentes linhagens de <i>D. bruxellensis</i> em meio com glicose, sacarose ou celobiose como fonte de carbono.	50

Lista de tabelas

CAPÍTULO 2

Artigo a ser submetido

Página

Tabela 2.1 – Isolados de <i>D. bruxellensis</i> utilizados neste estudo.	38
Tabela 2.2 – Velocidades de crescimento dos isolados de <i>D. bruxellensis</i> em microcultivo aeróbio.	48
Tabela 2.3 – Velocidades de crescimento dos isolados de <i>D. bruxellensis</i> em microcultivo anaeróbio.	49

Lista de Abreviações

AA	Antimicina A
2-DG	2-deoxi-D-glicose
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
HXT	Transportador de hexose
C	Carbono
N	Nitrogênio
YNB	Yeast Nitrogen Base
OD	Densidade óptica, do inglês optical density
CO ₂	Dióxido de carbono
HK	Hexoquinase
ATP	Adenosina trifosfato, do inglês Adenosine triphosphate
ADP	Adenosina difosfato, do inglês Adenosine diphosphate
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
PDH	Piruvato desidrogenase
PDC	Piruvato descarboxilase
ADH	Álcool desidrogenase
DHAP	Diidroxiacetona-fosfato
O ₂	Oxigênio
GCR	Glucose Catabolite Repression
pH	Potencial Hidrogeniônico
μ	Velocidade de crescimento específico (h ⁻¹)
mL	Mililitros
mg	Miligrama
L	Litro
g/L	Gramas por litro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	TAXONOMIA E DIVERSIDADE DA LEVEDURA <i>D. BRUXELLENSIS</i>	15
2.2	FISIOLOGIA DA LEVEDURA <i>D. BRUXELLENSIS</i>	17
2.2.1	Metabolismo do carbono.....	17
2.2.2	Repressão catabólica exercida pela glicose	25
2.2.3	Efeito da disponibilidade de oxigênio sobre o metabolismo de leveduras	26
2.3	<i>DEKKERA BRUXELLENSIS</i> NO CONTEXTO INDUSTRIAL.....	27
2.3.1	Vinho.....	27
2.3.2	Produção de etanol	29
3	ARTIGO: DIVERSIDADE DA ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO EM ISOLADOS INDUSTRIAIS DE <i>DEKKERA BRUXELLENSIS</i>	32
4	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56
	ANEXO A – Material suplementar do artigo	63
	ANEXO B – Atividade complementar	68
	ANEXO C – Guia de autores para submissão do artigo	69

1 INTRODUÇÃO

A levedura *Dekkera bruxellensis* (VAN DER WALT, 1964) pertence à família Saccharomycetaceae e é considerada um parente distante de *Saccharomyces cerevisiae*, ambos os gêneros constituindo parte do grupo dos hemiascomicetos. Esta levedura, principalmente na sua forma anamorfa *Brettanomyces bruxellensis*, é um importante contaminante da produção de vinho (SANGORRIN et al., 2013). As espécies *Dekkera bruxellensis* e *Saccharomyces cerevisiae* comungam aspectos fisiológicos interessantes, dentre os quais, ambas são microrganismos anaeróbicos facultativos, tolerantes a etanol e *Crabtree* positivas, que se refere à habilidade e preferência pelo metabolismo fermentativo quando em presença de altas concentrações de glicose sob condição aeróbica (WOOLFIT et al., 2007; LEITE et al., 2013).

Algumas linhagens de *Brettanomyces bruxellensis* isoladas do vinho possuem a capacidade de assimilar diferentes fontes de carbono, tais como a glicose, frutose, galactose, sacarose, maltose e celobiose (CONTERNO et al., 2006; CRAUWELS et al., 2015). Além disso, linhagens de *D. bruxellensis* pertencentes à coleção CBS, a exemplo CBS 72 e CBS 78 assimilam além dos açúcares citados, manose e amido (GALAFASSI et al., 2011). REIS et al. (2014) mostraram que *D. bruxellensis* GDB 248 isolada de destilaria de etanol também é capaz de assimilar e fermentar celobiose, apesar de mais vagarosamente e menos eficiente que a assimilação e fermentação de sacarose.

Apesar dos estudos sobre a capacidade de assimilação de determinadas fontes de carbono por *D. bruxellensis*, esses aspectos fisiológicos não parecem ser amplamente difundidos entre as linhagens clonais desta espécie encontradas em diferentes processos industriais, como na produção de vinho, de etanol combustível e num tipo de cerveja ácida da Bélgica chamada de Lambic. Isto decorre da grande variabilidade genética descrita para a espécie decorrente da sua instabilidade genômica (HELLBORG E PISKUR et al., 2009). Esta variabilidade dificulta o entendimento da alta capacidade adaptativa desta espécie aos processos industriais. Com isso, parece crucial o estudo da diversidade de assimilação do carbono entre linhagens de *Dekkera bruxellensis* isoladas de nichos distintos, para compreensão do sucesso adaptativo desta levedura no contexto industrial.

1.1 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Comparar a fisiologia de linhagens da levedura *Dekkera bruxellensis* isoladas da produção de vinho e de álcool combustível quanto ao metabolismo de açúcares potencialmente utilizados como substrato industrial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diferir a habilidade de assimilação respiro-fermentativa de glicose, frutose, galactose, maltose, celobiose, sacarose e lactose de 20 linhagens de *Dekkera bruxellensis* isoladas de vinícolas situadas no Chile (quatro), Rio Grande do Sul (10) e Santa Catarina (seis) e 10 linhagens isoladas de duas destilarias de etanol situadas no estado da Paraíba;
- Avaliar o efeito repressor da glicose sobre o metabolismo de outras fontes de carbono (frutose, galactose, maltose, celobiose e sacarose) em diferentes isolados de *D. bruxellensis*.
- Comparar as linhagens de *D. bruxellensis* quanto à sua capacidade de metabolizar glicose, sacarose e celobiose como fonte de carbono em ambiente anaeróbio.

CAPÍTULO 1

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TAXONOMIA E DIVERSIDADE DA LEVEDURA *DEKKERA BRUXELLENSIS*

A levedura *Dekkera bruxellensis* pertence à família Saccharomycetaceae e é considerado um parente distante de *Saccharomyces cerevisiae*, ambos os gêneros constituindo parte do grupo dos hemiascomicetos. Esta levedura, principalmente na sua forma anamorfa *Brettanomyces bruxellensis*, é um importante contaminante da produção de vinho (SANGORRIN *et al.*, 2013). A primeira menção ao gênero *Brettanomyces* foi feita em 1904, quando Hjelte Claussen isolou pela primeira vez esta levedura de bebidas britânicas. Em 1940, o gênero *Brettanomyces* foi estabelecido. Mais tarde em 1964, foi criado o gênero *Dekkera* após a observação da formação de ascósporos em algumas linhagens de *Brettanomyces* (VAN DER WALT, 1964) (Figura 1.1). Ainda é comum na literatura utilizar ambos os nomes dos gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces*. Neste grupo são encontradas as espécies anamorfas *Brettanomyces/Dekkera anomala*, *B./D. bruxellensis*, *B. custersianus*, *B. naardenensis* e *B. nanus* (Figura 1.2). Dentre as cinco espécies citadas *D. anomala* e *D. bruxellensis* são teleomorfos (SCHIFFERDECKER *et al.*, 2014).

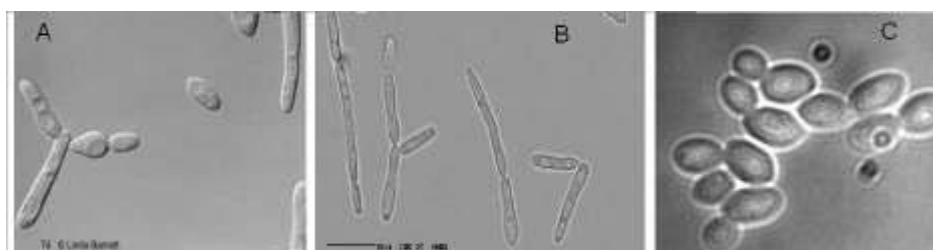


Figura 1.1 - Linhagens da espécie *Dekkera bruxellensis*. (A) Linhagem CBS 74 (<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/>); (B) Linhagem CBS 2499 (<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/>); (C) Linhagem industrial GDB 248 em meio YPD em microscopia de contraste de fase (Retirado de Leite, 2012).

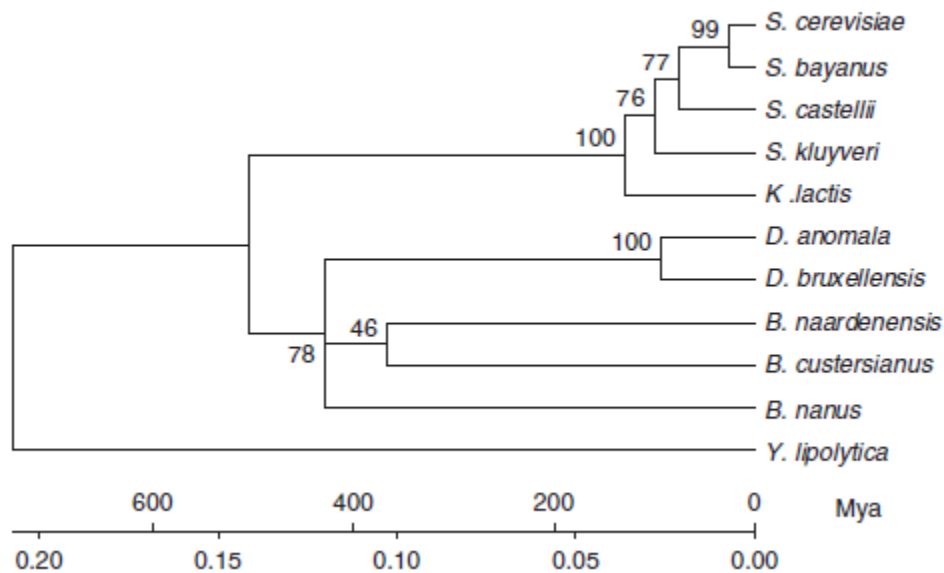


Figura 1.2 - Arvore filogenética das espécies do gênero *Dekkera* baseada na análise de restrição da sequência de DNA ribossomal 26S (ROZPEDOWSKA et al., 2011).

As leveduras do gênero *Brettanomyces/Dekkera* têm sido isoladas de muitas bebidas fermentadas, tais como cerveja e cidra (FUGELSANG et al., 1993; GILLILAND, 1961; VAN OEVELEN et al., 1976). Entretanto, o hábitat clássico do gênero *Brettanomyces/Dekkera* é em barris de envelhecimento de vinhos vermelhos, do qual elas podem crescer por meio da fermentação da pequena quantidade de açúcar residual presente no vinho, produzindo então compostos desagradáveis como os etilfenóis em quantidades que afetam o aroma e sabor (CHATONNET et al., 1995). Além de serem apontadas como contaminantes nos processos de produção de vinho, as leveduras do grupo *Brettanomyces/Dekkera*, especificamente *D. bruxellensis*, foi considerada o principal contaminante dos processos de fermentação alcoólica industrial em destilarias do Nordeste do Brasil que usam como substrato a cana-de-açúcar (de SOUZA LIBERAL et al., 2007). A produção de álcool combustível é realizada em um processo “aberto”, sem etapas de esterilização do meio, sendo por isso propício à contaminação. Na indústria alcooleira, alguns ambientes, tais como o caldo de cana-de-açúcar, água de lavagem e vinhaça, podem favorecer o crescimento e propagação de diversas leveduras selvagens, fato este que pode explicar a entrada da levedura *D. bruxellensis* no processo fermentativo industrial (DA SILVA et al., 2016). A adaptação de *D. bruxellensis* ao ambiente industrial tem motivado recentes estudos relacionados tanto à fisiologia quanto à genética dos isolados industriais, e alguns grupos de pesquisa têm elaborado experimentos em condições que simulam o contexto industrial (GALAFASSI et al., 2011; PEREIRA et al., 2014; LEITE et al., 2016). Embora trabalhos anteriores apontem essa espécie como um

microrganismo contaminante, essa caracterização tem sido modificada quando se trata da produção de etanol combustível. Dados atuais mostram que isolados dessa espécie tem a habilidade de produzir etanol com rendimentos atrativos próximos aos apresentados por *S. cerevisiae* (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; DE BARROS PITA et al., 2011), e o consórcio entre a levedura *D. bruxellensis* e a bactéria láctica *Lactobacillus vini* tem sido proposto para produção de etanol (PASSOTH et al., 2007).

Recentemente, um trabalho realizado por da SILVA et al. (2016) visou o isolamento e a identificação de isolados da levedura *D. bruxellensis* encontrados em diferentes pontos da planta de fermentação industrial nas destilarias Tabú e Japungu no estado da Paraíba. Foi percebido que na destilaria Tabu os 75 isolados identificados como *D. bruxellensis* estavam distribuídos em maior quantidade na lagoa de tratamento de vinhaça (53%), seguido pelo caldo misto (33,9%) e água de lavagem (13,1%); já na destilaria Japungu os 82 isolados dessa espécie estavam difundidos em sua maioria na lagoa de tratamento de vinhaça (46,8%), seguido pela água de lavagem (33,4%) e caldo misto (19,8%). Este estudo mostrou que os ambientes naturais das destilarias de álcool combustível são reservatórios de leveduras da espécie *D. bruxellensis*.

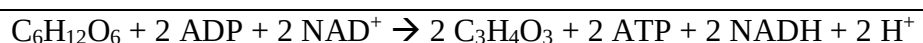
2.2 FISIOLOGIA DA LEVEDURA *D. BRUXELLENSIS*

2.2.1 Metabolismo do carbono

O repertório de utilização de açúcares e outras fontes de carbono por *B/D. bruxellensis* é bem amplo, como observado na descrição fisiológica da espécie, mas se mostra muito variável dentre as linhagens descritas (KURTZMANN et al., 2011). Isolados de vinho possuem a capacidade de assimilar diferentes fontes de carbono, tais como a glicose, frutose, galactose, sacarose, maltose e celobiose (CONTERNO et al., 2006). Além disso, linhagens de *D. bruxellensis* pertencentes à coleção CBS, tais como CBS 72 e CBS 78 assimilam os açúcares anteriormente mencionados, e também manose e amido (GALAFASSI et al., 2011). A assimilação da lactose, arabinose e rafinose por sua vez parece ser uma característica linhagem-específica (LEITE et al., 2013). A utilização de pentoses não aparece na descrição da espécie (KURTZMANN et al., 2011).

A glicólise é a principal via metabólica envolvida na fermentação de hexoses a etanol (Figura 2). Por meio dessa rota, a glicose é metabolizada e a partir dela são formadas duas

moléculas de piruvato. Esse processo ocorre em duas etapas: a primeira se refere à fosforilação da glicose no citoplasma a glicose-6-fosfato pela ação da hexoquinase (HXK) e glucoquinase (GLK). Uma vez fosforilada a glicose é mantida presa na célula sendo posteriormente oxidada à gliceraldeído-3-fosfato e à diidroxicetona-fosfato. Nessa etapa da via há gasto de energia (duas moléculas de ATP). A segunda etapa consiste na transformação da diidroxicetona-P em gliceraldeído-3P. As duas moléculas de gliceraldeído-3P são transformadas em duas moléculas de piruvato, como mostrado na equação abaixo. Nessa etapa há reposição da energia gasta na primeira etapa, com a produção líquida de 2 moles de ATP, e também são produzidas duas moléculas de $\text{NADH} + \text{H}^+$ (GUERRA, 2011).



As moléculas de piruvato formadas podem ser convertidas diretamente a acetil-CoA pela ação da piruvato desidrogenase (PDH) e entrar no ciclo do ácido tricarboxílico mitocondrial. Nesse ciclo o carbono é plenamente oxidado a CO_2 com geração de NADH e FADH_2 mitocondrial que serão reoxidados na cadeia respiratória para a produção de ATP. Alternativamente, o piruvato pode ser convertido no citosol a acetaldeído pela ação da piruvato descarboxilase (PDC), e o acetaldeído reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase dependente de NADH (ADH) para regenerar o NADH glicolítico (ZEEMAN, 2000). Esta constitui a via fermentativa de produção de etanol, ou fermentação alcoólica. A via respiratória produz aproximadamente 15 vezes mais energia em termos de rendimento de ATP em relação à via fermentativa, que pode ser utilizado nas vias anabólicas dependentes de energia nas células (HAGMAN, 2013). O acetaldeído pode também ser oxidado a acetato pela acetaldeído desidrogenase que pode utilizar NAD^+ ou NADP^+ como aceptor de elétron. Em aerobiose, o etanol pode ser re-assimilado pela ADH dependente de NAD^+ para produzir acetaldeído, e este a acetato tanto na mitocôndria como no citosol. O acetato citosólico é condensado a acetil-CoA que pode ser utilizado para a síntese de ácidos graxos e ésteres, ou desempenhar funções regulatórias na acetilação de proteínas ou da cromatina no núcleo. Portanto, o ponto final do metabolismo das fontes de carbono é a formação de acetil-CoA mitocondrial e citosólico para a produção de energia e de componentes celulares.

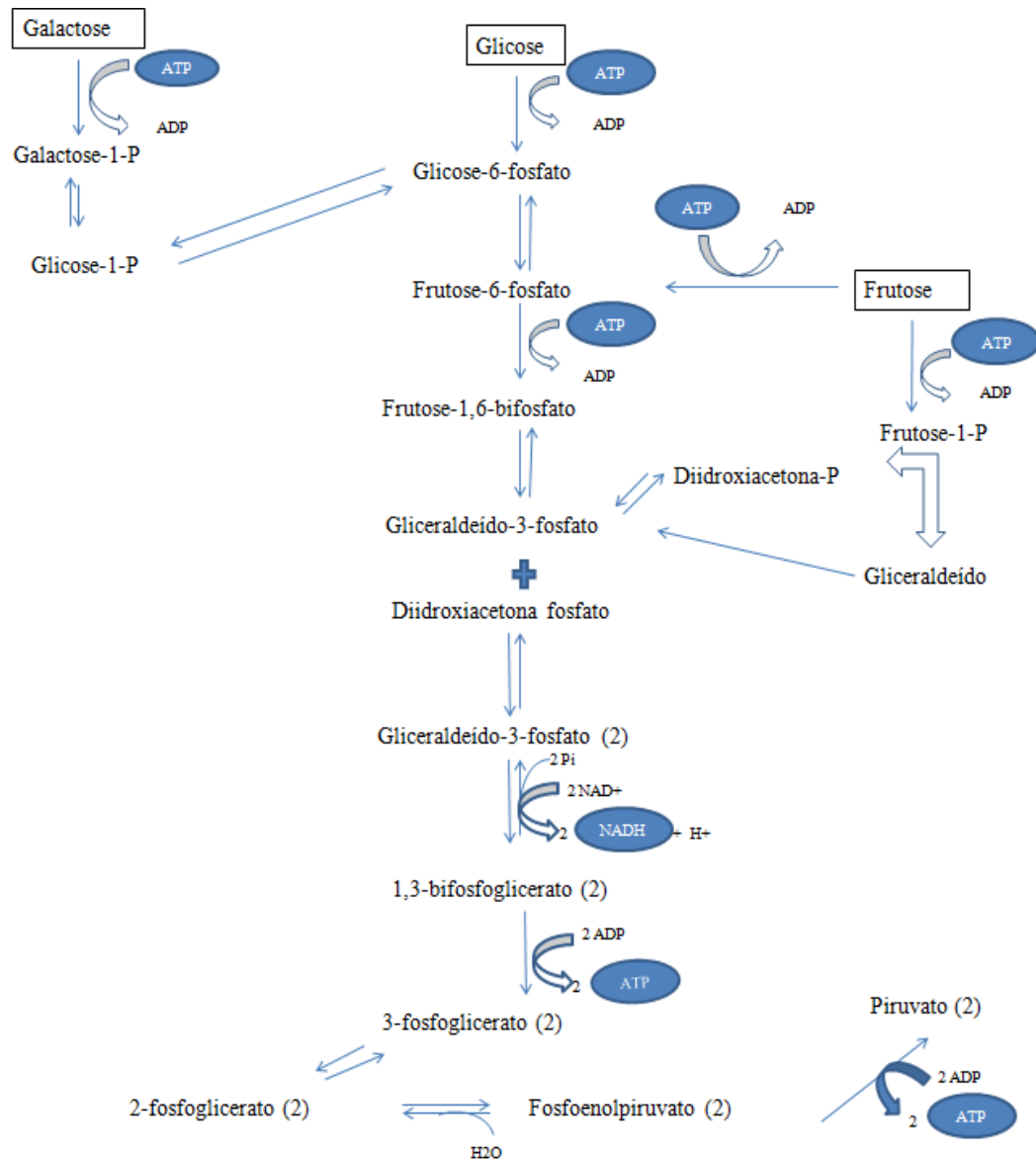


Figura 1.3 - Metabolismo das hexoses em *S. cerevisiae*. À esquerda - conversão da galactose em glicose-6-fosfato pela via de Leloir (extraído e modificado da figura 3.22 de MOAT; FOSTER, 1988). Via glicolítica (extraído e modificado da figura 15.2 de LEHNINGER, 2002).

Na fermentação alcoólica o piruvato é convertido a etanol e CO₂ sem a produção de ATP. Portanto, toda a energia proveniente da fermentação é produzida ao nível do substrato na via glicolítica, com saldo de 2 moles de ATP por mol de glicose consumida que é menor do que os 30 moles de ATP por mol de glicose produzido pela respiração. A via glicolítica é comum as duas vias e o destino do piruvato para a via fermentativa ou ciclo de Krebs/respiração, em algumas leveduras, é determinado pela presença ou ausência de oxigênio (RETTORI e VOLPE, 2000). Entretanto, em *S. cerevisiae* e outras espécies do clado

Saccharomyces classificados como *Crabtree* positivos (ver definição abaixo), o metabolismo fermentativo pode ocorrer em paralelo à respiração em cultivos aeróbios quando a concentração de glicose estiver acima de um valor chamado concentração crítica (acima de 5 mM), constituindo o chamado metabolismo respiro-fermentativo. *Saccharomyces cerevisiae* faz uso da via aeróbia de modo exclusivo apenas quando em concentrações abaixo da concentração crítica e/ou em cultivos contínuos limitados em carbono em baixas velocidades de diluição ($<0,15 \text{ h}^{-1}$) (ALEXANDER e JEFFRIES, 1990).

O etanol só é produzido a partir de açúcares e, portanto, o termo fermentação não se aplica a cultivos que utilizem outras fontes de carbono. Além disso, depende da produção de piruvato a partir de glicólise. Isto implica que os polissacarídeos devem ser hidrolisados aos monossacarídeos constituintes e esses a algum metabólito da glicólise, como por exemplo, a galactose a glicose 6-P ou a xilose a frutose 6-P e gliceraldeído 3-P (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).

2.2.1.1 Metabolismo de monossacarídeos em leveduras

Dentre os carboidratos, as hexoses, e principalmente a D-glicose, são as fontes de carbono mais comumente utilizadas pelos fungos. Em *S. cerevisiae*, quando a glicose está presente no meio, a absorção e o metabolismo de outros açúcares, tais como, galactose, sacarose e maltose são reprimidos, assim como também numerosas enzimas da gliconeogênese e do ciclo de Krebs, por um fenômeno conhecido como repressão catabólica exercida pela glicose (do Inglês *Glucose Catabolite Repression* – GCR) (WINDE et al., 1997).

As hexoses entram na célula por difusão facilitada, utilizando carreadores específicos ou gerais para hexoses com diferente afinidade em relação a cada açúcar (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010). Em *S. cerevisiae*, os transportadores de monossacarídeos, tais como glicose e frutose são codificados pelos genes *HXT*. Esse sistema de transporte é formado por uma família composta de aproximadamente 20 genes (*HXT1* a *HXT17*, *GAL2*, *SNF3* e *RGT2*), que diferem na regulação e na afinidade as diferentes hexoses (OZCAN e JONHSTON, 1999). A frutose também é transportada pelas proteínas Hxt e assimilada na via glicolítica diretamente a partir de sua fosforilação pela GLK (BERTHELS et al., 2008). Por outro lado, a hexose galactose percorre um caminho mais longo na sua assimilação que se inicia pela captação pela proteína Gal2. Este açúcar é metabolizado pela chamada via de Leloir que

envolve sua fosforilação a galactose-1-fosfato pela galactoquinase (Gal1p) e isomerização a glicose-1-fosfato pela galactose-1-fosfato-uridiltransferase. A fosfoglicomutase (Gal5p) converte a glicose-1-fosfato a glicose-6-fosfato que finalmente é assimilada pela via glicolítica e/ou pela via das pentoses fosfato (BHAT e MURTHY, 2001). Como visto adiante, a glicose e a frutose estão presentes também na composição da sacarose do caldo de cana. A glicose faz parte da composição de dissacarídeos como maltose, celobiose e de polissacarídeos como amido e celulose. A frutose também constitui polissacarídeos como inulina. E a galactose compõe o dissacarídeo lactose de soro de queijo ou de leite e ainda as poligaracturanas da pectina que forma a parede celular de cítricos e cactos e a biomassa de algas vermelhas marinhas, representando uma atrativa fonte de carbono industrial (PACKER, 2009).

2.2.1.2 Metabolismo de dissacarídeos em leveduras

A glicose é o substrato mais comumente usado para estudos fisiológicos sobre metabolismo do carbono em leveduras. Entretanto, apenas poucas aplicações industriais são baseadas em glicose como matéria-prima. Substratos industriais tais como o melaço, soro de leite, hidrolisados de amido e mosto contêm dissacarídeos (sacarose, maltose ou lactose) como principal fonte de carbono e estes precisam ser hidrolisados a monossacarídeos (WEUSTHUIS, 1994).

2.2.1.2.1 Sacarose

Dissacarídeo não redutor formado pela ligação glicosídica entre uma molécula de D-glicose e D-frutose (Figura 3). Em *S. cerevisiae* é hidrolisada extracelularmente pela enzima invertase (β -D-fructosidase) ou sacarase que é secretada pelas células, codificadas pelos genes *SUC*. Entretanto, este açúcar pode ser internalizado por meio de duas permeases, codificadas pelos genes *AGT1* e *MALx1*, com simporte de H^+ (BADOTTI et al., 2008). Desta forma, a sacarose pode ser hidrolisada dentro das células pelas formas truncadas da invertase. Em *Kluyveromyces marxianus* a sacarose é hidrolisada pela enzima inulinase extracelular (ROUWENHORST et al., 1991). Em contraste, em *D. bruxellensis* linhagem GDB 248, a

sacarose deve ser transportada para o interior da célula já que sua atividade invertase é fundamentalmente intracelular (LEITE et al., 2013).

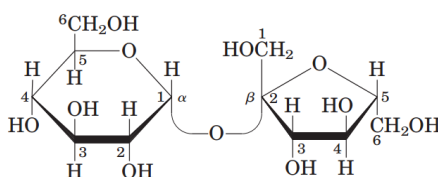


Figura 1.4 - Estrutura química da sacarose (β -D-fructofuranosídeo) (LEHNINGER, 2014).

2.2.1.2.2 Maltose

A maltose é um dissacarídeo gerado a partir da hidrólise do amido pela ação da enzima alfa-amilase, e é composta pela ligação α -1,4 entre duas moléculas de glicose (Figura 4). Na indústria cervejeira, a maltose é o açúcar fermentescível predominante do mosto, representando cerca de 60 – 65% dos carboidratos presentes. Além da maltose, a maltotriose (cerca de 20 – 25%) e glicose (cerca de 10 a 15%), também constituem o mosto, seguidos da sacarose e frutose em quantidade relativamente baixa (SANTANA, 2007). A levedura *Saccharomyces pastorianus* é bastante utilizada nos processos industriais de produção de cerveja pela ação da α -glicosidase (LEI et al., 2016). Em *S. cerevisiae*, este processo se dá preferencialmente no interior das células e depende da ativação do regulon MAL, um conjunto de genes que codifica permeases e hidrolases. Algumas permeases *Mal* também transportam sacarose.

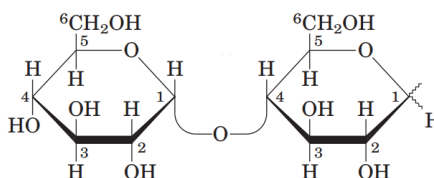


Figura 1.5 - Estrutura química da maltose (4-O- α -D-Glicopiranosil-D-glicose) (LEHNINGER, 2014).

Esse dissacarídeo é um bom substrato modelo para avaliar as necessidades energéticas do transporte ativo de açúcar em *S. cerevisiae*. Uma vez que a hidrólise da maltose não requer ATP, a única diferença entre a energética da maltose e o metabolismo da glicose reside na etapa de transporte: o transporte da maltose é ativo, enquanto o da glicose é passivo. Em *S.*

cerevisiae, a primeira etapa da metabolização da maltose é a sua passagem através da membrana plasmática por mecanismo de próton simporte (SERRANO, 1977), seguida da hidrólise intracelular pela ação da maltase. Uma vez dentro da célula, as hexoses são convertidas para glicose-6-fosfato até que o piruvato seja produzido pelas enzimas da glicólise (LEHNINGER, 2014). Diferentes linhagens do grupo *Brettanomyces/Dekkera* são capazes de assimilar maltose quando em ambiente aeróbico (GALAFASSI et al., 2011). Entretanto, BLOMQVIST et al. (2010) e LEITE et al. (2013) mostraram, respectivamente, que *D. bruxellensis* CBS 11269 e GDB 248 apresentam velocidades de crescimento geralmente menores em maltose se comparado ao crescimento com glicose.

2.2.1.2.3 Celobiose

A celobiose é um dissacarídeo composto pela ligação β -1,4 entre duas moléculas de glicose (Figura 5). Este açúcar não é encontrado livre na natureza, sendo então produzido pela hidrólise incompleta da celulose.

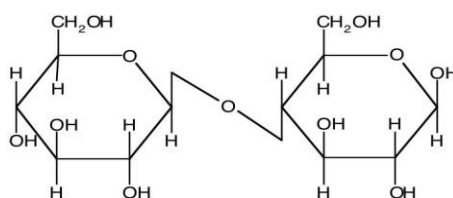


Figura 1.6 - Estrutura química da celobiose (D-Glicosil- β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glicose) (<http://textilecentre.blogspot.com.br/2016/09/chemical-structure-of-cotton-fibre.html>).

Para que ocorra metabolização de celobiose é necessária a ação da enzima β -glicosidase. Estas enzimas têm sido isoladas de muitas espécies fúngicas, incluindo leveduras fermentadoras de celobiose. As β -glicosidases hidrolisam celobioses e celodextrinas até a glicose, e são competitivamente inibidas pelos seus produtos (BEZERRA e DIAS, 2005). Podem ser classificadas em três diferentes tipos: intracelular, associada à parede celular e extracelular. Não surpreendentemente, o seu pH ótimo é baseado na sua localização celular (DASHTBAN et al., 2009). *Candida wickerhamii* foi a primeira levedura estudada capaz de fermentar celobiose e celodextrinas solúveis até etanol (FREER et al., 1993). Além das espécies do grupo *Candida*, recentemente leveduras do gênero *Hansenula* e *Clavispora* foram identificadas como fermentadoras de celobiose. Foi mostrado também que a levedura *Clavispora* sp. possui atividade β -glicosidase, além de exibir tolerância a inibidores decorrentes do pré-tratamento da

biomassa lignocelulósica, como furfural e hidroximetilfurfural (LIU et al., 2012). A levedura *Dekkera bruxellensis* linhagem GDB 248 é capaz de assimilar celobiose em cultivos aeróbios (LEITE et al., 2013). REIS et al. (2014) mostraram que nessa linhagem a atividade β -glicosidase é intracelular e que ela pode assimilar celobiose com 64,5% de eficiência relativa de etanol comparada com a assimilação de sacarose, em condições semelhantes às industriais com limitação de oxigênio, alto inóculo de biomassa (10% p/v), baixa agitação, alta concentração de carbono e alta pressão de CO₂.

2.2.1.2.4 Lactose

A lactose é um dissacarídeo formado pela ligação β -1,4 entre uma glicose e uma galactose (Figura 6), sendo o principal carboidrato encontrado no leite. A lactose pode ser metabolizada somente por espécies de fungos que possuem a enzima lactase (β -galactosidade) considerando que seus constituintes (glicose e galactose) podem ser utilizados por um grande número de espécies fúngicas (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010). Uma dessas espécies é a levedura *K. marxianus* que tem a capacidade de utilizar acentuadamente a lactose como a principal fonte de carbono (KOKKILIGADDA et al., 2016). A enzima β -galactosidade em *K. marxianus* é intracelular, e por isso a lactose é primeiramente transportada para o interior da célula pela ação de permeases sendo então hidrolisada intracelularmente. A glicose gerada é assimilada diretamente pela via glicolítica enquanto a galactose é inicialmente assimilada pela via de Leloir, e posteriormente pela glicólise (SONG et al., 2011; GUIMARAES et al., 2010).

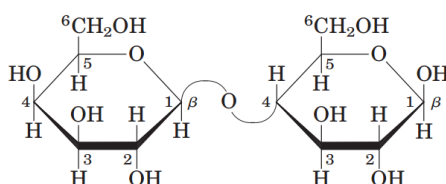


Figura 1.7 - Estrutura química da lactose (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glicose) (LEHNINGER, 2014).

A conversão da lactose do soro do leite a etanol através da fermentação pode ser uma alternativa favorável por não produzir impactos negativos ao ambiente e por fornecer uma fonte de energia renovável e capaz de colaborar com a matriz energética da própria indústria (DINIZ, 2009). Além disso, a lactose presente no soro é considerada como poluente ambiental e sua utilização para produção de enzimas e combustível pode ser efetiva para processos de

biorremediação (KOKKILIGADDA et al., 2016). A levedura *S. cerevisiae*, normalmente utilizada nos processos de fermentação alcoólica da sacarose, não tem a capacidade de assimilar ou fermentar lactose, diferentemente das leveduras do gênero *Kluyveromyces*, que apesar de possuírem o mesmo ancestral comum, apresentam requerimentos nutricionais e vias metabólicas distintas, devido, provavelmente, as diferenças entre os nichos ecológicos destes microrganismos (RUBIO-TEIXEIRA, 2005). Já para a espécie *D. bruxellensis*, a capacidade de metabolizar a lactose parece ser uma característica linhagem-dependente e parece que apenas algumas poucas têm essa capacidade (KURTZMAN et al., 1998).

2.2.2 Repressão catabólica exercida pela glicose

A glicose é a fonte de carbono preferencial da grande maioria dos microrganismos, incluindo *S. cerevisiae*. Quando entra na célula das leveduras, a glicose é rapidamente assimilada pela via glicolítica e preferencialmente fermentada a etanol (McCARTNEY et al., 2014). Isto ocorre devido ao mecanismo chamado de repressão catabólica pela glicose (*Glucose Catabolite Repression* – GCR) que pode ser definida como o controle da expressão gênica, em nível transcricional, que ocorre quando as células estão submetidas a concentrações de glicose acima de 5 mM no meio (CARLSON, 1999). Um dos principais efeitos desse mecanismo é a inibição parcial da respiração durante o crescimento celular mesmo em aerobiose, desviando carbono para o metabolismo fermentativo (THEVELEIN, 1994). Além disso, genes envolvidos no ciclo de Krebs e na cadeia transportadora de elétrons têm a sua transcrição diminuída ou mesmo reprimida (GOMES, 2004). Este efeito também é responsável pela inibição do metabolismo de outros açúcares ou fontes de carbono que estejam presentes no meio pela repressão da expressão de seus genes ou inibição alostérica das proteínas envolvidas, permeases e hidrolases. Um composto sintético análogo da glicose chamado 2-deoxi-D-glicose (2-DG) tem sido muito utilizado para o estudo dos fenômenos relacionados com a GCR. Depois de transportado, o 2-DG é fosforilado a 2-deoxi-glicose-6-fosfato (2DG-6P) pela ação das hexoquinases, mas devido à ausência do grupo hidroxila (OH) no carbono 2 da 2-deoxi-D-glicose, a fosfoglicose isomerase não consegue utilizar a 2DG-6P como substrato dando continuidade a via glicolítica. O acúmulo da 2-DG-6P nas células pode resultar na ativação da GCR (PELICANO et al., 2006). Em *S. cerevisiae* a 2-DG inibe a biossíntese da parede celular (polissacarídeos e glicoproteína), fazendo com que as células se tornem osmoticamente frágeis (KRATKY et al., 1975; BIELY et al., 1971). Conclui-se,

portanto, que a forma fosforilada da glicose é a responsável para sinalização do mecanismo GCR nas células. Como o 2-DG-6P não é metabolizado, este se acumula nas células e induz um estado permanente de repressão catabólica. Com isso, as células ficam impedidas de utilizarem outras fontes de carbono, impedindo, por exemplo, o crescimento sobre glicerol ou galactose. Este composto tem sido utilizado para o isolamento de linhagens mutantes resistentes a GCR ou para caracterizar a extensão da GCR em diferentes organismos. Células de *D. bruxellensis* são capazes de crescer em diferentes fontes de carbono, entretanto muito pouco se sabe sobre a regulação gênica em resposta a GCR. Por exemplo, o gene *FBP1* da gliconeogênese é fortemente reprimido pela glicose (LEITE et al., 2016), tal como acontece em *S. cerevisiae*. Dados preliminares mostraram que o 2-DG impede o crescimento de *D. bruxellensis* GDB 248 quando glicerol, etanol, rafinose ou maltose são utilizados como fonte de carbono, confirmando a existência de repressão catabólica pela glicose sobre a assimilação dessas fontes de carbono. Entretanto, a variabilidade intra-específica encontrada em relação à utilização de fontes de carbono sugere variabilidade na resposta a GCR nesta levedura.

2.2.3 Efeito da disponibilidade de oxigênio sobre o metabolismo de leveduras

O oxigênio é o fator chave da regulação do metabolismo em leveduras. Quando o oxigênio está presente, as células respiram, promovendo oxidação total das moléculas de açúcar, produzindo gás carbônico (CO₂) e água. Na ausência ou limitação de oxigênio, a maioria das espécies de leveduras descritas na literatura é capaz de fermentar açúcar a etanol e CO₂ (BARNETT et al., 1990; van DIJKEN et al., 1986).

Existem quatro efeitos metabólicos nas leveduras que estão relacionados à disponibilidade de oxigênio: *Pasteur*, *Custer*, *Crabtree* e *Kluyver*. O efeito *Pasteur* é definido como a inibição do metabolismo fermentativo quando em presença de oxigênio (LAGUNAS et al., 1982). Em contraste, o efeito *Custer* é definido como inibição da fermentação na ausência de oxigênio (WIJSMAN et al., 1984). O efeito *Crabtree* é definido como a ocorrência do metabolismo fermentativo mesmo na presença de oxigênio na presença de altas concentrações de açúcar (FIECHTER et al., 1981). E por último, o efeito *Kluyver* está relacionado à habilidade das leveduras em utilizar dissacarídeos na presença de oxigênio, mas não na ausência (SIMS e BARNETT, 1978). *Saccharomyces cerevisiae* e *D. bruxellensis* possuem o fenótipo *Crabtree* positivo (ROZPEDOWSKA et al., 2011; LEITE et al., 2016). Em *S. cerevisiae*, esse fenômeno pode ser explicado pela saturação da capacidade respiratória

em re-oxidar o NADH gerado pela via glicolítica em razão da repressão da síntese de muitas enzimas respiratórias pela glicose (PRONK et al., 1996). Nessa situação é observado o acúmulo de coenzimas reduzidas, principalmente o NADH, uma vez que a produção dessa molécula na glicólise será maior que a habilidade que a célula tem de reoxidá-la através da doação de seus elétrons para o oxigênio presente no meio, o qual constitui o aceptor final de elétrons neste caso. Além de apresentar o efeito *Crabtree* positivo, *D. bruxellensis* apresenta o efeito *Custers*, o qual se deve a um desequilíbrio redox resultante da baixa capacidade dessas células em produzir metabólitos reduzidos como o glicerol quando em anaerobiose (WIJSMAN et al., 1984).

Diferentemente de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* que são consideradas anaeróbias facultativas, as leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Brettanomyces naardenensis* são classificadas como aeróbias obrigatórias (metabolismo puramente respiratório) e são consideradas *Crabtree* negativas, pois produtos de fermentação são ausentes, e sob condições aeróbicas, são formados apenas biomassa e gás carbônico (ROZPEDOWSKA et al., 2011).

O efeito da ausência da respiração sobre o metabolismo celular pode ser avaliado pelo uso de inibidores da cadeia fosforilativa. Neste caso, o ambiente aeróbio mantém a presença do oxigênio que é utilizado em algumas importantes reações oxidativas pelas células. O principal inibidor utilizado é a antimicina A, um composto secundário produzido por várias espécies de bactérias do gênero *Streptomyces* (RASIMUS-SAHARI et al., 2016). Este composto se liga à citocromo C redutase impedindo a oxidação da ubiquinona e interrompendo o ciclo oxidativo da cadeia respiratória (LIN et al., 2017). Este composto tem sido usado para o isolamento de linhagens mutantes com alto fluxo pelo metabolismo fermentativo ou mesmo para selecionar leveduras e linhagens naturais com esta característica. Existe uma relação entre os fenômenos que são estudados com o uso de 2-DG e antimicina A e estes dois compostos podem ser combinados no isolamento de linhagens com alta capacidade fermentativa.

2.3 *DEKKERA BRUXELLENSIS* NO CONTEXTO INDUSTRIAL

2.3.1 Vinho

As leveduras do gênero *Dekkera/Brettanomyces* são prejudiciais ao processo de produção da cerveja e do vinho, devido à produção em altas concentrações de compostos voláteis e compostos fenólicos, como o 4-etil-fenol (encontrado no vinho em baixas

concentrações), que alteram a composição do aroma e do sabor do vinho. Estes compostos podem ser sintetizados a partir dos precursores ácido hidroxiciamínico e o ácido p-cumárico (SCHIFFERDECKER et al., 2014). Os metabólitos produzidos por estas leveduras conferem ao vinho aromas desagradáveis que são associados ao suor de cavalo, plástico queimado, curral, animais molhados e fumaça (LICKER et al., 1998). Quando o vinho está contaminado com leveduras do gênero *Dekkera/Brettanomyces* seu aspecto é alterado apresentando-se turvo, com formação de filme e névoa, com o teor etanólico intensificado, o que leva a produção de aromas indesejáveis. O risco da degradação do vinho por microrganismos é particularmente alto em barris de madeira, devido à dificuldade de limpeza e desinfecção. Entretanto, o crescimento de *Dekkera/Brettanomyces* e a formação de etilfenóis podem ocorrer também em tanques de concreto ou ácido inoxidável (RODRIGUES et al., 2001) e até mesmo em garrafas (COULON et al., 2010).

Embora todos os vinhos estejam passíveis de contaminação, alguns fatores podem aumentar esses riscos, como por exemplo, quando são utilizadas uvas maduras com alto conteúdo de ácidos fenólicos e pH alto. Altas temperaturas e pH, oxigênio dissolvido e açúcar residual, bem como a concentração mais baixa de etanol e dióxido de enxofre são fatores que estão relacionados ao crescimento das leveduras *Dekkera/Brettanomyces* e ao aumento da concentração de etilfenóis em vinho (COULON et al., 2010).

Apesar do caráter contaminante, esta levedura possui a capacidade de produzir compostos aromáticos como álcoois superiores e ésteres quando o meio contém altas concentrações de aminoácidos (PARENTE et al., 2015). Um desses compostos de grande importância para a produção de vinhos é o 2-etilfenol, responsável pelo chamado aroma floral das bebidas. Este composto é sintetizado a partir do catabolismo de fenilalanina, tendo uma das enzimas chave a fenilpiruvato descarboxilase (Phe-PDC). O interessante é que *D. bruxellensis* parece ser o único representante da família Saccharomycetaceae a apresentar dois genes codificadores para esta enzima, produzindo duas isoformas da Phe-PDC, cujas expressões são diferentes dependendo da composição do meio de cultura (DE SOUZA LIBERAL et al., 2012). Dados recentes do laboratório de Genética de Microrganismos mostram a grande capacidade de assimilação e catabolização de aminoácidos relacionados com a produção desses aromas (dados não publicados), e isto mostra seu potencial para produção de compostos aromáticos que pode ser futuramente explorado.

2.3.2 Produção de etanol

As principais características dos microrganismos etanologênicos para serem empregados nas usinas são o alto rendimento de etanol (valores acima de 90% do rendimento máximo teórico), tolerância a etanol (>40 g/L), boa produtividade ($>1,0$ g/L/h), bom crescimento em meios simples e econômicos, habilidade de crescer em caldo de fermentação não diluído com resistência a inibidores, e capacidade para retardar o crescimento de contaminantes sob condições de crescimento com pH ácido ou alta temperatura (DIEN et al., 2003). Alguns microrganismos, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *S. diastaticus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kudriavzevii*, *Escherichia coli* cepa KO11 e *Klebsiella oxytoca* linhagem P2 e *Zymomonas mobilis* tem sido estudadas para produção de etanol a partir do caldo de cana-de-açúcar. Entre estes microrganismos produtores de etanol, *S. cerevisiae* é a opção mais atrativa para fermentação, devido à sua maior eficiência em converter açúcares a etanol e sua alta tolerância a etanol (OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1993). Diferentemente dos microrganismos desejados nos processos industriais, algumas espécies de leveduras e bactérias são consideradas contaminantes do processo de produção de etanol combustível por afetar o rendimento e produtividade de etanol (LIBERAL et al., 2007). Isolados da espécie da levedura *D. bruxellensis* foram descritos como principais contaminantes no processo de produção de etanol em destilarias do Nordeste brasileiro (BASÍLIO et al., 2008), e em destilarias de álcool do Canadá e dos EUA, onde a matéria-prima é o milho (ABBOTT et al., 2005), diferentemente do Nordeste do Brasil, cuja matéria-prima é a cana-de-açúcar, um meio que favorece o crescimento de diferentes leveduras e bactérias lácticas. A capacidade de *D. bruxellensis* em fermentar o melaço da cana de açúcar foi mostrada por PEREIRA et al. (2014).

D. bruxellensis tem sido estudada no contexto da produção industrial de etanol de segunda geração, no qual é frequente que os meios de cultura contenham misturas de hexoses e pentoses. GALAFASSI et al. (2011) realizou um estudo com 50 linhagens de gênero *Brettanomyces/Dekkera* isoladas na fabricação de cerveja, vinho e outras bebidas, explorando o potencial das mesmas para produção de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos sintéticos em cultivos com limitação de oxigênio e baixo pH. Sob essas condições foi evidenciada a produção de etanol e biomassa, com rendimento de etanol variando desde 0,2 a 0,3 g g⁻¹ de açúcar. Além disso, foi estudada a capacidade desse grupo de leveduras para

crescer em sacarose, celobiose, maltose, lactose, amido, xilose, galactose e arabinose como fontes de carbono.

Dentro do aspecto de produção de etanol de segunda geração, estudos com *D. bruxellensis* linhagem GDB 248 com base em diferentes fontes de carbono, tais como, glicose, sacarose, celobiose e hidrolisado de bagaço de cana pré-tratado sob limitação de oxigênio mostraram que essa linhagem é capaz de produzir etanol a partir de celobiose. De acordo com estes achados foi possível confirmar que *D. bruxellensis* linhagem GDB 248 é uma levedura promissora para a fermentação de substratos lignocelulósicos (REIS et al., 2014).

CAPÍTULO 2

Diversidade da assimilação de fontes carbono em isolados industriais de *Dekkera bruxellensis*

Trabalho a ser submetido a **FEMS Yeast Research**

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1567-1364](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1567-1364)

3 ARTIGO: DIVERSIDADE DA ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO EM ISOLADOS INDUSTRIAIS DE *DEKKERA BRUXELLENSIS*

Jackeline Maria da Silva¹, Gilberto Henrique Teles Gomes da Silva¹, Denise Castro Parente¹, Angélica Maria Ganga², Patrícia Valente da Silva³, Fernanda Cristina Bezerra Leite^{1,4}, Marcos Antonio de Moraes Junior^{1,5}, Diogo Ardaillon Simões^{1,6}

¹Núcleo interdepartamental de pesquisa em Engenharia Metabólica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50760-901, Brasil.

²Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade de Santiago, Chile.

³Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

⁵Departamento de Genética e ⁶Departamento de Bioquímica- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50760-901, Brasil.

Correspondência:

Diogo Ardaillon Simões

Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco

Av. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitaria, 50.670-901 Recife - PE/Brasil.

Phone/Fax: 00-55-81-21268522

E-mail: simoes.diogo.a@gmail.com

Web site: www.ufpe.br/nem

Resumo

Dekkera bruxellensis pertence à família Saccharomycetaceae e é considerado um parente distante de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura, principalmente na sua forma anamorfa *Brettanomyces bruxellensis*, é um importante contaminante da produção de vinho. O objetivo deste estudo foi comparar a fisiologia de linhagens da levedura *Dekkera bruxellensis* isoladas da produção de vinho e de álcool combustível quanto ao metabolismo de diferentes açúcares potencialmente utilizados como substrato industrial. Para isso, 30 isolados de *Dekkera bruxellensis* foram avaliados quanto à habilidade de assimilação respiratória e fermentativa de monossacarídeos e dissacarídeos, a diversidade fenotípica relacionada à repressão catabólica pela glicose e a assimilação de diferentes açúcares sob condição anaeróbia. Diferenças entre os perfis de assimilação respiratória foram observadas para cada isolado. Altas velocidades de crescimento foram encontradas em meio com glicose e sacarose $0,32\text{ h}^{-1}$ e $0,30\text{ h}^{-1}$, respectivamente, em aerobiose pelos isolados de destilaria. A presença do repressor catabólico 2-deoxiglicose no meio com galactose e maltose inibiu o crescimento de todos os isolados de vinho, diferentemente de alguns isolados de etanol que apresentaram resistência a este composto. A adição de Antimicina A nos meios de cultura alterou o crescimento apenas dos isolados de vinícola. Em anaerobiose estrita os isolados de destilaria alcançaram velocidades de crescimento iguais a $0,44\text{ h}^{-1}$; $0,40\text{ h}^{-1}$ e $0,26\text{ h}^{-1}$ em glicose, sacarose e celobiose, respectivamente. A capacidade de assimilação de diferentes açúcares pelos isolados de *D. bruxellensis* frente às diversas condições testadas mostram a diversidade fenotípica encontrada dentro desta espécie. Além disso, os dados podem colaborar para explicação da capacidade adaptativa dessa espécie em diferentes ambientes industriais cujas fontes alternativas de carbono estejam presentes.

Palavras-chave: *Dekkera bruxellensis*. Assimilação de carbono. Cultivo anaeróbio. Diversidade fisiológica. Repressão por glicose.

Abstract

Dekkera bruxellensis belongs to the family Saccharomycetaceae and is considered a distant relative of *Saccharomyces cerevisiae*. This yeast, mainly in its anamorphic form *Brettanomyces bruxellensis*, is an important contaminant of wine production. The objective of this study was to compare the physiology of strains *Dekkera bruxellensis* yeast isolated from the production of wine and ethanol to the metabolism of different sugars potentially used as industrial substrate. To this, 30 isolates of *Dekkera bruxellensis* were assessed for fermentative and respiratory assimilation ability monosaccharides and disaccharides, phenotypic diversity related to catabolite repression by glucose and assimilation of different sugars under anaerobic condition. Differences between the profiles of respiratory assimilation were observed for each isolate. High growth rates were found in glucose and sucrose medium 0.32 h^{-1} and 0.30 h^{-1} , respectively, in aerobiosis by distillery isolates. The presence of the 2-deoxyglucose catabolic repressor in the medium with galactose and maltose inhibited the growth of all the wine isolates, unlike some ethanol isolates that showed resistance to this compound. The addition of Antimycin A in the culture media altered the growth of only the wine isolates. In strict anaerobiosis, the distillery isolates reached growth rates equal to 0.44 h^{-1} ; 0.40 h^{-1} and 0.26 h^{-1} in glucose, sucrose and cellobiose, respectively. The capacity of assimilation of different sugars by *D. bruxellensis* isolates against the different conditions tested shows the phenotypic diversity found within this species. Moreover, the data can collaborate to explain the adaptive capacity of this species in different industrial environments whose alternative carbon sources are present.

Keywords: *Dekkera bruxellensis*. Carbon assimilation. Anaerobic cultivation. Physiological diversity. Glucose repression.

Introdução

A levedura *Dekkera bruxellensis* pertence à família Saccharomycetaceae e é considerado um parente distante de *Saccharomyces cerevisiae*, ambos os gêneros constituindo parte do grupo dos hemiascomicetos. Esta levedura, principalmente na sua forma anamorfa *Brettanomyces bruxellensis*, é um importante contaminante da produção de vinho (Sangorrin *et al.*, 2013). As espécies *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* comungam aspectos fisiológicos interessantes. Dentre estes, ambas são microrganismos anaeróbicos facultativos, tolerantes a etanol e *Crabtree* positivas, que se refere à habilidade e preferência pelo metabolismo fermentativo quando em presença de altas concentrações de glicose sob condição aeróbica (Woolfit *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2013).

Algumas linhagens de *D. bruxellensis* possuem a capacidade de assimilar diferentes fontes de carbono tais como, glicose, frutose, galactose, maltose, sacarose e trealose (Conterno *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2013; Crauwels *et al.*, 2015). Além disso, foi registrado que *D. bruxellensis* GDB 248 também é capaz de assimilar e fermentar celobiose, apesar de mais vagarosamente e menos eficientemente que a assimilação e fermentação de sacarose (Reis *et al.*, 2014). Entretanto, as características fisiológicas apresentadas por *D. bruxellensis* não parecem ser amplamente difundidos entre as linhagens clonais desta espécie encontrada em diferentes processos industriais, como na produção de vinho, de etanol combustível e num tipo de cerveja ácida da Bélgica chamada de Lambic. Isto decorre da grande variabilidade genética descrita para a espécie decorrente da sua instabilidade genômica (Hellborg e Piskur *et al.*, 2009). Esta variabilidade dificulta o entendimento da alta capacidade adaptativa desta espécie aos processos industriais.

Poucos estudos até o momento têm sido focados na capacidade de assimilação de fontes de carbono por diferentes linhagens de *D. bruxellensis* isoladas de processos industriais distintos. Em razão dessa limitação de informações, nosso estudo analisou a diversidade dos perfis de assimilação respiratória e fermentativa do carbono e os mecanismos de repressão catabólica exercidos pela glicose em diferentes linhagens de *D. bruxellensis* isoladas de destilaria do estado da Paraíba, e de vinícolas do Brasil e do Chile, bem como comparou as linhagens quanto à sua capacidade de metabolizar fontes de carbono de interesse industrial em condição anaeróbica.

Materiais e métodos

Linhagens e manutenção das células

Trinta isolados de *Dekkera bruxellensis* foram utilizados neste estudo (Tabela 1). Dentre eles, dez foram provenientes das destilarias de etanol Japungu e Tabú localizadas no estado da Paraíba, coletadas da água, da vinhaça ou do caldo misto em diferentes épocas do ano e identificadas por da Silva *et al.* (2016); e 20 dos isolados foram provindos de vinícolas brasileiras de Santa Catarina e Rio Grande do Sul e chilenas. As linhagens foram mantidas em meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona bacteriológica e 2% de ágar) com repique constante para novas placas para manter as colônias de células frescas (Leite *et al.*, 2013). Para os pré-cultivos, as células foram inoculadas em frascos de 250 ml contendo 100 ml de YPD e cultivadas a 30°C e 160 rpm por 48 h. Ao final as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com água destilada estéril para remoção de traços do meio de cultura e suspensas em solução salina estéril (9 g/L) para concentração de 0,1 unidade de absorvância a 600nm. A linhagem GDB 248 foi utilizada como cepa de referência (de Barros Pita *et al.*, 2011).

Microcultivos aeróbios

Os ensaios de crescimento aeróbio foram realizados no meio YNB w/o (sem aminoácidos e sem sulfato de amônio) a 1,7 g/L suplementado com diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, galactose, maltose, celobiose, sacarose ou lactose) na concentração de 20 g/L e com adição de sulfato de amônio (5 g/L). O volume de aproximadamente 10 µL da suspensão celular das pré-culturas foi utilizado para inocular 140 µL dos meios sintéticos contendo uma das fontes de carbono adicionada aos poços da placa de microtitulação estéril e, os cultivos foram realizados em multileitor de placas modelo Synergy HXT (Biotek, Suíça) a 30 °C sob agitação constante, com leitura automatizada do valor de absorvância a 600 nm a cada 30 minutos.

Teste de assimilação fermentativa das fontes de carbono

As células de cada linhagem foram cultivadas em microtubos de 2 mL contendo 1 mL de meio YPD (como mencionado acima) a 30 °C, 160 rpm por seis horas. Para avaliar a capacidade de assimilação fermentativa de cada fonte de carbono, 5 µL do cultivo foi adicionado a placas de Petri contendo YNB a 1,7 g/L, sulfato de amônio a 5 g/L, fonte de carbono (glicose, frutose, galactose, maltose, celobiose ou sacarose) a 20 g/L, ágar a 20 g/L e

antimicina A (Sigma-Aldrich®) a 1 $\mu\text{mol/L}$. O crescimento foi avaliado após 72 horas de incubação a 30 °C.

Teste de repressão catabólica

As células de cada linhagem foram cultivadas em microtubos de 2 mL contendo 1 mL de meio YPD (como mencionado acima) a 30 °C, 160 rpm por seis horas. Para avaliar o efeito repressor da glicose sobre o metabolismo de outras fontes de carbono, 5 μL do cultivo foi adicionado a placas de Petri contendo YNB a 1,7 g/L, sulfato de amônio a 5 g/L, fonte de carbono (glicose, frutose, galactose, maltose, celobiose ou sacarose) a 20 g/L, ágar a 20 g/L e 2-deoxi-D-glicose (Sigma-Aldrich®) a 10 mmol/L. O crescimento foi avaliado após 72 horas de incubação a 30°C.

Microcultivos em anaerobiose

As células selecionadas foram pré-cultivadas em frascos de 100 mL com 50 mL de YPD (1% de extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona bacteriológica) por 24 horas, a 30°C e 160 rpm. Posteriormente 3 mL da cultura foram coletados e colocados em tubos cônicos de 15 mL, centrifugada por 5 minutos a 4.000 rpm e as células lavadas com solução salina estéril (9 g/L) para retirada de restos do meio de cultura. Em seguida foi adicionado 10 ml de meio sintético YNB a 1,7 g/L, sulfato de amônio a 5 g/L, fonte de carbono (glicose, sacarose ou celobiose) a 20 g/L. Esse segundo pré-cultivo permaneceu em agitação constante a 160 rpm por 72h a 30 °C. A estratégia de utilizar no pré-cultivo a respectiva fonte de carbono que seria utilizada no cultivo foi minimizar a duração das células na fase de adaptação (lag). As células do segundo pré-cultivo foram utilizadas para inoculação de 1,5 mL dos mesmos meios em placas do tipo flowerplates em Micro Fermentador System Biolector (m2p-Labs, Alemanha) por 72h, a 30 °C e 800 rpm com fluxo constante de nitrogênio gasoso (99,99% de pureza). Para certificação da anaerobiose estrita, células de *S. cerevisiae* JP1 foram submetidas ao mesmo cultivo em meio contendo etanol como fonte de carbono.

Determinação da velocidade de crescimento

Para os microcultivos aeróbicos e anaeróbicos a fase de crescimento exponencial foi determinada a partir da porção linear da curva de crescimento no gráfico relacionando à densidade celular como $\ln(\text{OD}_{600})$ com o tempo (horas) de incubação. A velocidade

específica de crescimento (μ , h^{-1}) foi calculada como a inclinação da linha reta através da realização de uma regressão linear. Para cada linhagem, os valores das velocidades específicas de crescimento são resultantes de ensaios em duplicatas biológicas e triplicatas técnicas.

Tabela 2.1 Isolados de *Dekkera bruxellensis* utilizados neste estudo

Isolado	Nicho	Origem geográfica	Ano de isolamento
GDB248	Destilaria de etanol	Paraíba - BR	2006
JP249A	Destilaria de etanol	Paraíba - BR	2013
TB457A	Destilaria de etanol	Paraíba - BR	2014
JP258A	Destilaria de etanol	Paraíba - BR	2013
JP19M	Destilaria de etanol	Paraíba - BR	2013
JP206M	Destilaria de etanol	Paraíba - BR	2013
JP287V	Destilaria de etanol	Paraíba - BR	2014
JP184V	Destilaria de etanol	Paraíba - BR	2014
TB259V	Destilaria de etanol	Paraíba - BR	2013
TB283V	Destilaria de etanol	Paraíba - BR	2014
L1359	Vinícola	Chile	*
L2480	Vinícola	Chile	*
L2552	Vinícola	Chile	*
L1400	Vinícola	Chile	*
MRC181a	Vinícola	Santa Catarina - BR	*
MRC180a	Vinícola	Santa Catarina - BR	*
MRC172a	Vinícola	Santa Catarina - BR	*
MRC177a	Vinícola	Santa Catarina - BR	*
MRC117a	Vinícola	Santa Catarina - BR	*
MRC140a	Vinícola	Santa Catarina - BR	*
MRC190b	Vinícola	Rio Grande do Sul - BR	*
MRC172b	Vinícola	Rio Grande do Sul - BR	*
MRC178b	Vinícola	Rio Grande do Sul - BR	*
MRC117b	Vinícola	Rio Grande do Sul - BR	*
MRC78b	Vinícola	Rio Grande do Sul - BR	*
MRC86b	Vinícola	Rio Grande do Sul - BR	*
MRC180b	Vinícola	Rio Grande do Sul - BR	*
MRC177b	Vinícola	Rio Grande do Sul - BR	*
MRC80b	Vinícola	Rio Grande do Sul - BR	*

* Ano de isolamento desconhecido

Resultados e discussão

Habilidade de assimilação respiratória de diferentes fontes de carbono

Semelhanças e diferenças entre a ordem preferencial de assimilação das fontes de carbono foram encontradas nos isolados de etanol e de vinho (Figura S1). A preferência por glicose, frutose, sacarose e maltose, nesta ordem decrescente, foi observada entre os isolados dos dois nichos. A preferência por celobiose foi observada dentre os isolados de etanol, enquanto a utilização de galactose foi preferencialmente observada dentre os isolados de vinho. Para os isolados de ambos os nichos, a lactose foi o açúcar de menor preferência.

Monossacarídeos

No geral, glicose (100%), frutose (96,7%) e galactose (90%) foram assimiladas pela maioria das linhagens testadas. Esta também foi a ordem de preferência de assimilação como observado a partir dos valores médios de velocidades de crescimento considerando todas as linhagens testadas, como representado pela linhagem de referência GDB 248 para crescimento em glicose ($0,14 \text{ h}^{-1}$), frutose ($0,14 \text{ h}^{-1}$) e galactose ($0,07 \text{ h}^{-1}$). Nove entre os 10 isolados provenientes de destilarias cresceram nas sete fontes de carbono testadas (Figura S1). Dentre os 20 isolados de vinícola, apenas 10 apresentaram crescimento em todos os açúcares (Figura S2). Nos cultivos com glicose, quatro isolados (dois de destilaria e dois de vinícola do Chile) apresentaram características proeminentes, tais como fase de adaptação (lag) curta ou ausente e alta velocidade específica de crescimento na ordem de $0,32 \text{ h}^{-1}$ para os isolados TB457A e JP19M provenientes de destilarias. Esse valor representa o dobro do calculado para a linhagem de referência GDB 248 (Figuras 1A e B; 3A), semelhante ao descrito anteriormente (Leite *et al.*, 2013). Nos cultivos com frutose, os resultados foram muitos semelhantes àqueles obtidos com glicose (Figuras 1B), com a maior velocidade de crescimento alcançada pelo isolado JP19M, cujo valor foi 1,7 vezes maior que a velocidade exibida pela linhagem de referência GDB 248 (Figura 3, A). Em culturas com galactose, o isolado MRC 117A de vinícola de Santa Catarina apresentou velocidade específica de crescimento de $0,21 \text{ h}^{-1}$, que representa 5,4 vezes maior do que a linhagem de referência GDB 248 (Figuras 1C, 3A e B) e 3,8 vezes maior que *D. bruxellensis* CBS 2499 ($0,07 \text{ h}^{-1}$) (Moktaduzzaman *et al.*, 2014).

Dissacarídeos

Em relação aos dissacarídeos testados, todos os 10 isolados de destilaria foram capazes de assimilar aerobicamente maltose, celobiose e sacarose, e nove assimilaram lactose (Figura

S1). Dentre os 20 isolados de vinícola, 18 metabolizaram maltose, 18 sacarose, 16 celobiose e nove metabolizaram lactose, este último gerando perfis com baixas velocidades específicas de crescimento (Figura 3 A, B, C).

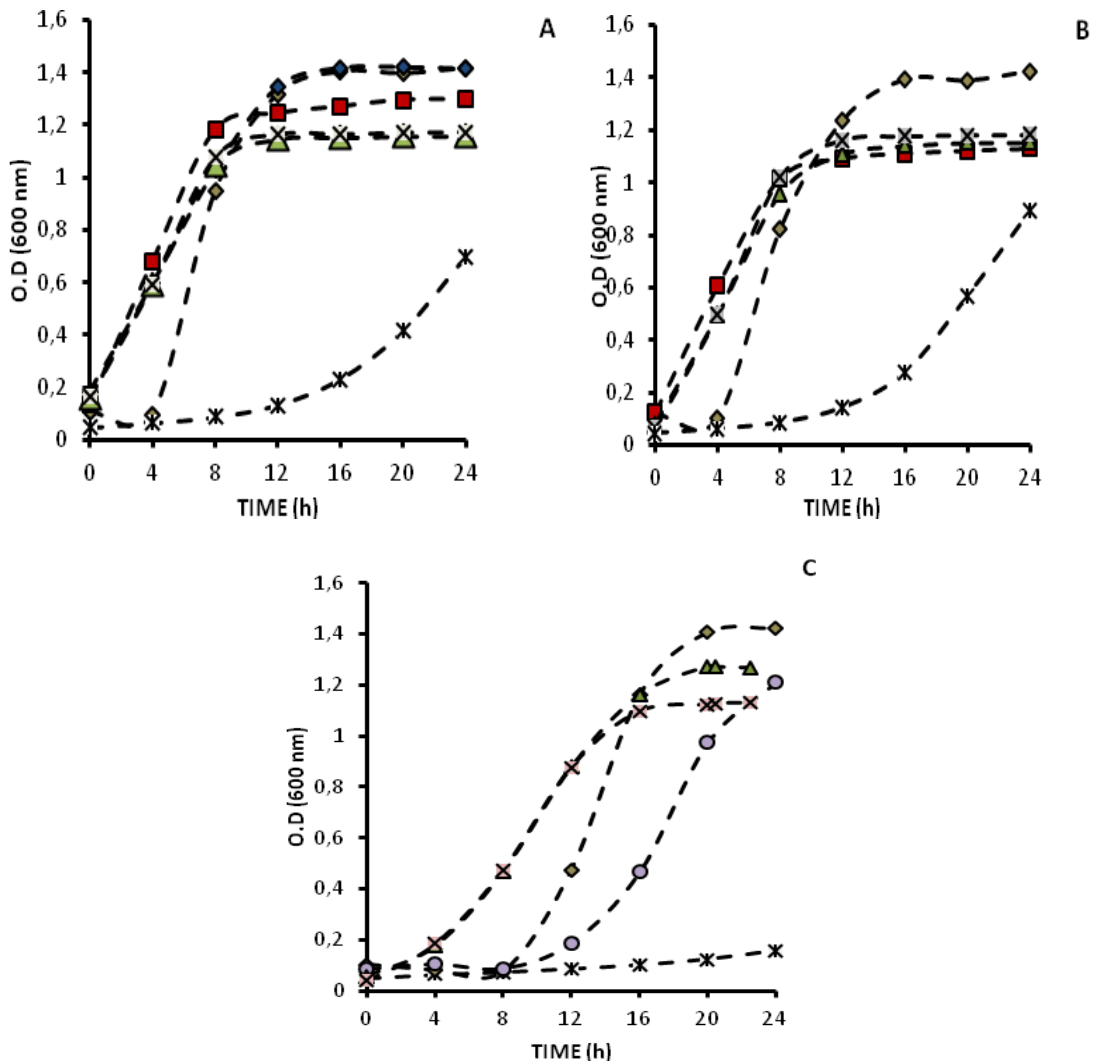


Fig. 2.1. Cinética de crescimento aeróbio de isolados de *D. bruxellensis* em monossacarídeos. Fontes de carbono: A, glicose; B, frutose; C, galactose. Isolados de destilaria: linhagem de referência GDB 248 (asterisco); JP19M (diamante azul); TB457A (quadrado vermelho); TB283V (asterisco amarelo); JP287V (círculo cinza); TB259V (quadrado cinza). Isolados de vinícolas: L2552 (triângulo verde); L1400 (xis rosa); MRC 117a (diamante marrom); MRC 177b (círculo lilás).

Em cultivo com maltose, dois isolados de destilaria e dois de vinícola chilena obtiveram os melhores perfis de crescimento, com fase lag curta ou ausente e velocidades de crescimento maiores em relação à linhagem de referência GDB 248 (Figura 2D e Figura 3A e B). Em meio com celobiose, os isolados de destilaria apresentaram melhores desempenhos

comparados aos de vinícola (Figura S1; Figura 2E), assim como também alcançaram velocidades de crescimento mais altas (Figura 3 A, B e C). A menor habilidade dos isolados de vinho de metabolizar a celobiose pode estar relacionada ao seu nicho, pois no processo de produção de vinho os principais açúcares envolvidos são sacarose e a frutose (Nadal *et al.*, 1999). Os isolados que exibiram os melhores desempenhos em meio com sacarose foram os mesmos que em meio com glicose e frutose, inclusive com velocidades de crescimento muito próximas (S1; Figura 2 F; 3A, B, C). A linhagem de referência GDB 248 apresentou maior velocidade de crescimento em sacarose ($0,17 \text{ h}^{-1}$) em relação à glicose, corroborando os dados reportados por Leite *et al.* (2013). Assim como em celobiose, os perfis de crescimento mais proeminentes em lactose também foram encontrados nos isolados de destilaria (Figura S1; Figura 2G); dentre eles, destaca-se o isolado JP206M que por sua vez alcançou velocidade de crescimento de $0,15 \text{ h}^{-1}$ que é 4,3 vezes maior que a linhagem GDB 248. A velocidade de crescimento de GDB 248 em lactose foi semelhante à apresentada por Leite *et al.* (2013) em meio mínimo ($0,04 \text{ h}^{-1}$). A lactose não é um açúcar comumente assimilado por células da espécie *D. bruxellensis* de tal forma que esta levedura é classificada como lactose negativa nos manuais de taxonomia. O fato de que este isolado de destilaria apresenta velocidade de crescimento em lactose nos níveis do que calculados para glicose sugere que existe um mecanismo de inibição do metabolismo da lactose nessa espécie e que está desregulado no isolado JP206M. Isto torna este isolado um modelo interessante para estudo de regulação metabólica. É importante ressaltar que esta inibição não se dá na assimilação da galactose, um dos produtos da hidrólise da lactose, considerando que os isolados testados foram capazes de utilizar essa hexose para crescimento aeróbio. Isto restringe futuros estudos de assimilação de lactose em *D. bruxellensis* às atividades de lactose permease e lactase (ou β -galactosidase) codificadas em *K. marxianus* pelos genes *LAC12* e *LAC4*, respectivamente.

Assim como *S. cerevisiae*, muitos dos isolados de *D. bruxellensis* são capazes de assimilar sacarose, glicose, e frutose de modo preferencial (Camargo, 2013). Além disso, ambas as espécies são capazes de assimilar maltose e galactose, mas linhagens selvagens de *S. cerevisiae* não são capazes de assimilar celobiose e lactose. *S. cerevisiae* não assimila lactose diretamente, devido à ausência do mecanismo de transporte desse açúcar através da membrana, sendo necessária uma hidrólise anterior deste açúcar gerando glicose e galactose para posterior metabolização (Stambuk *et al.*, 1999) e apenas linhagens engenheiradas de *S. cerevisiae* são capazes de assimilar celobiose (Li *et al.*, 2010). A capacidade de algumas linhagens de *D. bruxellensis* de metabolizar celobiose e sacarose pode conferir uma vantagem adaptativa em ambientes industriais nos quais essas fontes de carbono estejam presentes.

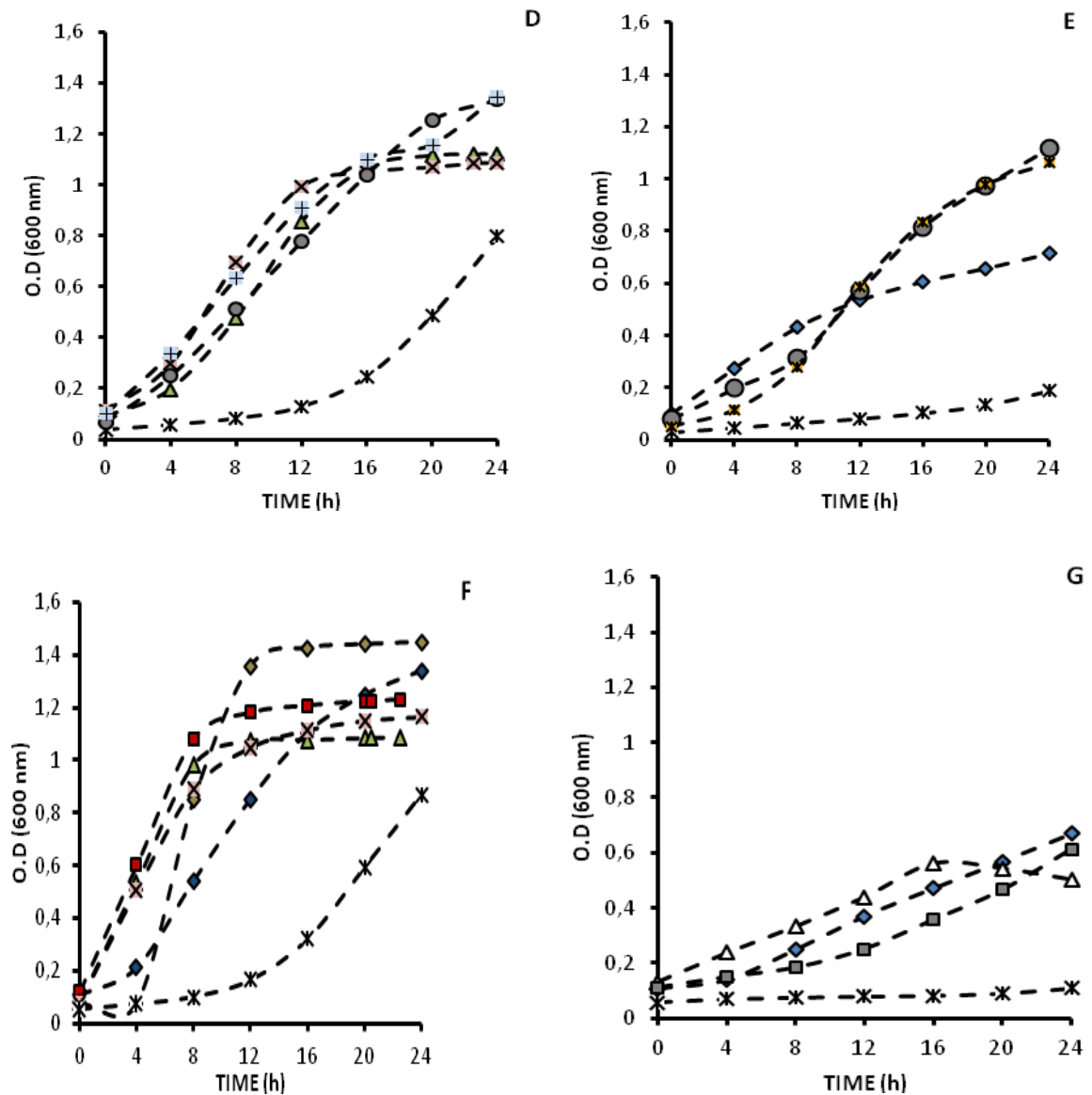
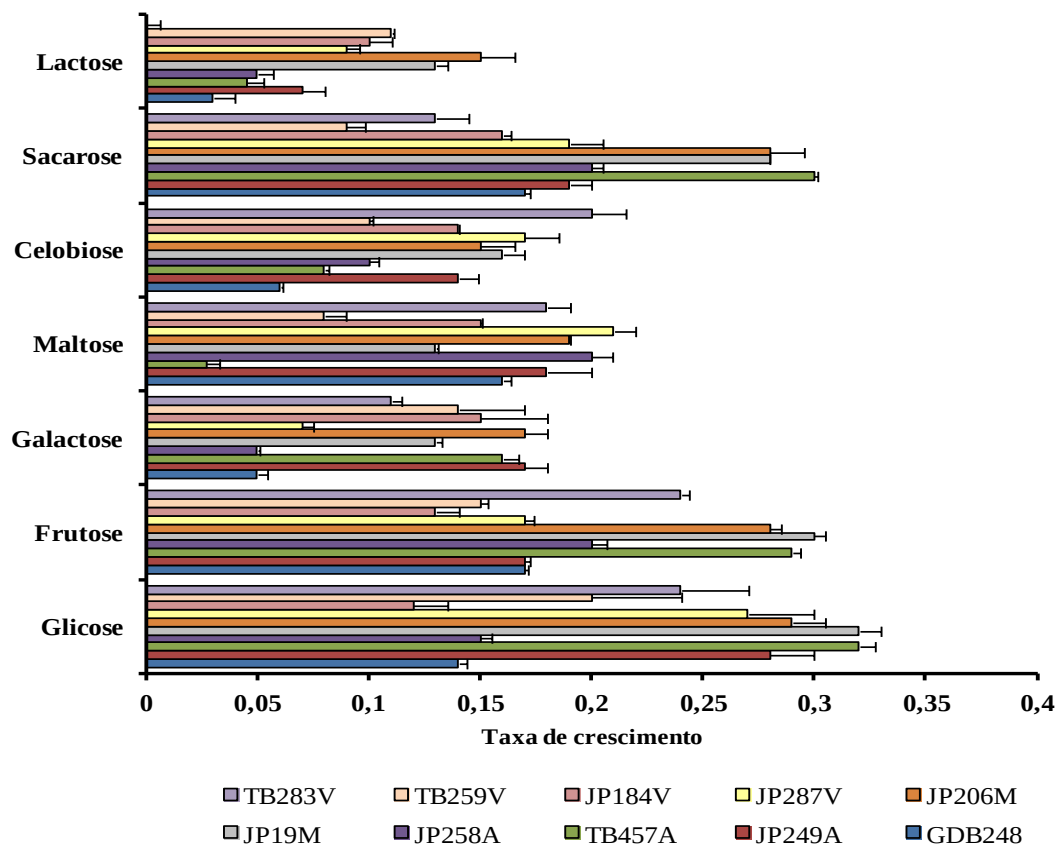
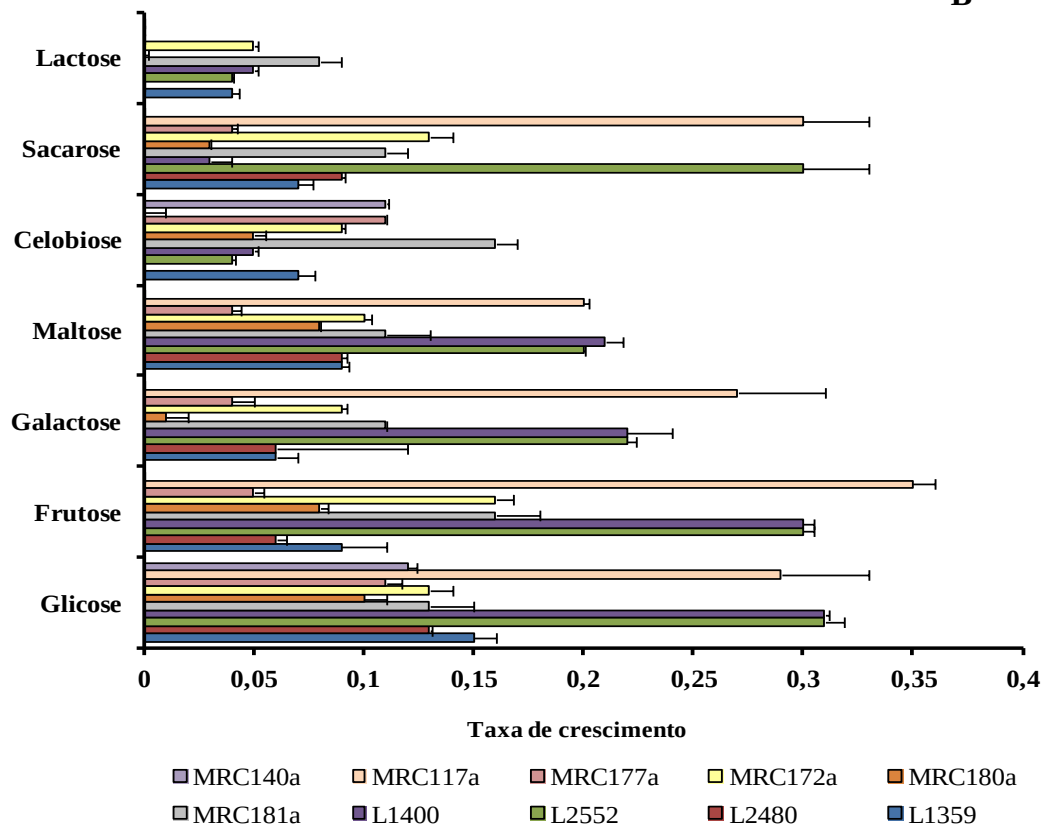


Fig. 2.2. Cinética de crescimento aeróbio de isolados de *D. bruxellensis* em dissacarídeos. Fontes de carbono: D, maltose; E, celobiose; F, sacarose e G, lactose. Isolados de destilaria: GDB 248 (asterisco); JP19M (diamante azul); TB457A (quadrado vermelho); TB283V (asterisco amarelo); JP287V (círculo cinza); JP206M (triângulo branco); JP258A (sinal positivo azul); TB259V (quadrado cinza). Isolados de vinícolas: L2552 (triângulo verde); L1400 (xis rosa); MRC 117a (diamante marrom).

A**B**

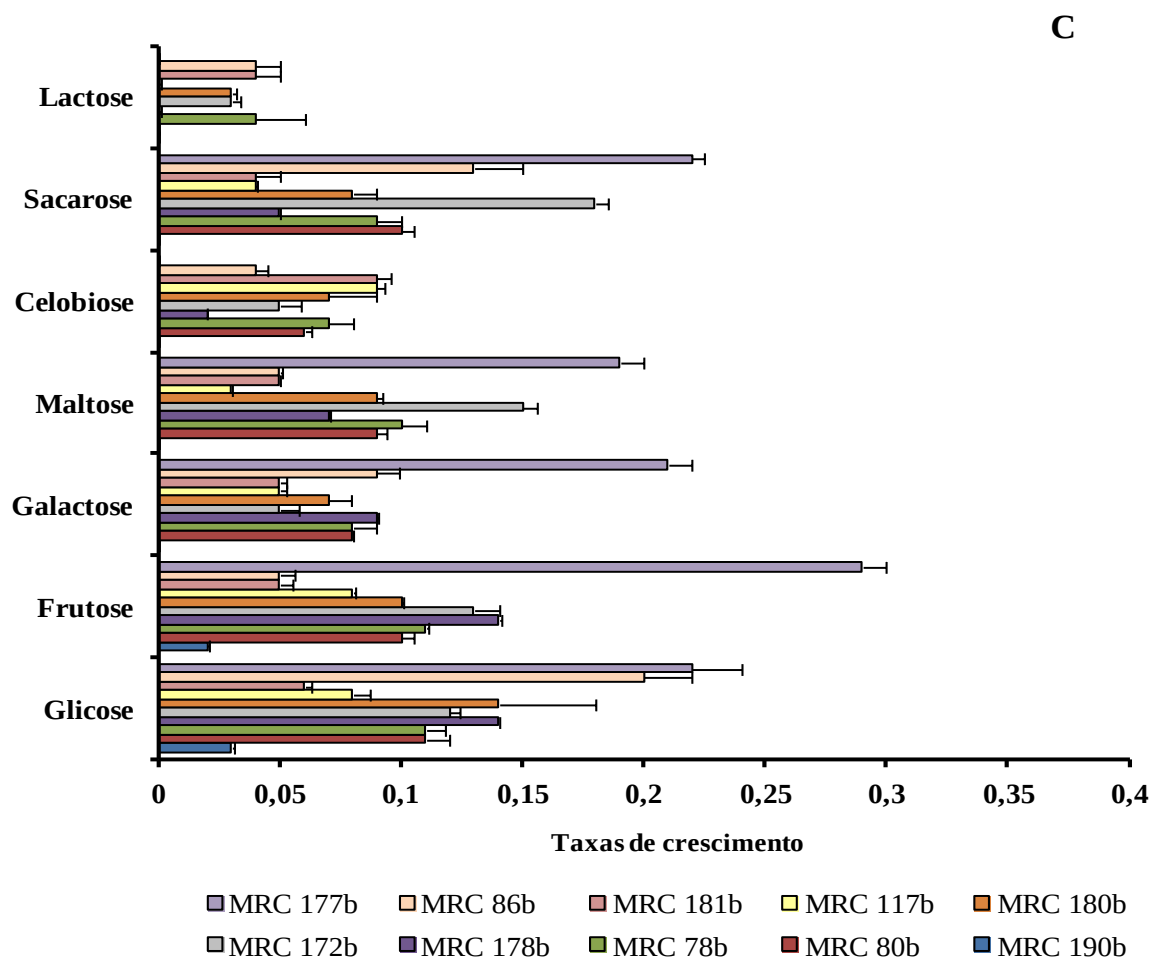


Fig. 2.3. Velocidades de crescimento de diferentes isolados de *D. bruxellensis* de destilaria de etanol e vinho em diferentes fontes de carbono. A, isolados de destilaria de etanol do estado da Paraíba – BR; B, isolados de vinícola de Santa Catarina – BR e Chile; C, isolados de vinícola do Rio Grande do Sul – BR.

Efeito da Antimicina A sobre o cultivo de isolados de *D. bruxellensis* em diferentes fontes de carbono

A antimicina A é bem conhecida por ser inibidora do complexo III da cadeia transportadora de elétrons (Turrens, 1997) através do bloqueio do transporte de elétrons da quinona para o citocromo C. Dos 30 isolados analisados, 22 não apresentaram alteração no crescimento com a presença de antimicina A no meio de cultivo nas fontes de carbono testadas (Figura 4). Isso significa que as diferentes linhagens de *D. bruxellensis* apresentam habilidade de metabolizar diferentes fontes de carbono unicamente através da via fermentativa. Essa capacidade de assimilação fermentativa parece estar difundida entre as espécies do complexo *Saccharomyces*. Merico *et al.* (2007) mostraram que dentro de um

grupo amostral com 49 espécies de leveduras deste complexo a adição de antimicina A em meio rico inibiu o crescimento de apenas duas das espécies testadas, e em meio mínimo sintético com altas concentrações de antimicina A, 29 dessas espécies foram capazes de crescer através do metabolismo fermentativo e muito provavelmente produzindo etanol.

Todos os dez isolados de destilaria foram resistentes à presença de antimicina A, contrastando com alguns isolados de vinho que apresentaram sensibilidade a esse composto. A inibição parcial ou total do crescimento desses isolados de vinícola ocorreu em maior escala quando as células foram cultivadas em galactose e em menor escala em meio com maltose, frutose, glicose, celobiose e sacarose (Figura 4). A inibição total do crescimento do isolado L2480 em meio com galactose e maltose na presença de antimicina A apresenta semelhança ao que ocorre com algumas linhagens de *Kluyveromyces lactis* e outras espécies de leveduras que possuem o efeito *Kluyver*. Essas leveduras são capazes de crescer em galactose e certos oligossacarídeos, tais como rafinose e maltose, quando em aerobiose, mas se mostram incapazes de crescer em anaerobiose ou na ausência de respiração. É importante ressaltar que o crescimento de *K. lactis* em meio contendo galactose e antimicina A é um traço linhagem-dependente, ou seja, algumas linhagens de *K. lactis* apresentam efeito *Kluyver* positivo e outras efeito *Kluyver* negativo. A variação linhagem-dependente do efeito *Kluyver* ocorre também em outras leveduras (Fukuhara, 2003). A introdução de genes adicionais que codificam a permease de galactose de *S. cerevisiae* em células de *K. lactis* que apresentam efeito *Kluyver* positivo, faz com que a *K. lactis* seja capaz de crescer em galactose mesmo na presença de antimicina, indicando que o transporte de açúcar é uma etapa importante no controle do fluxo fermentativo em leveduras (Goffrini *et al.*, 2002).

Repressão catabólica por 2-deoxi-D-glicose

A presença no meio de cultura da 2-deoxi-D-glicose (2-DG) promoveu a repressão parcial ou total do crescimento em pelo menos uma das seis fontes de carbono testadas de cada isolado de *D. bruxellensis* (Figura 5). É importante ressaltar que a presença deste composto promoveu diminuição do crescimento mesmo em glicose. No geral os isolados de vinho foram mais sensíveis a GCR do que os isolados de destilarias. Três dos 10 isolados de destilaria não sofreram repressão catabólica quando em meios com monossacarídeos, maltose e sacarose, mas apenas queda na velocidade de crescimento. Entretanto, praticamente nenhum crescimento foi observado para a maioria dos isolados em meio com celobiose (Figura 5).

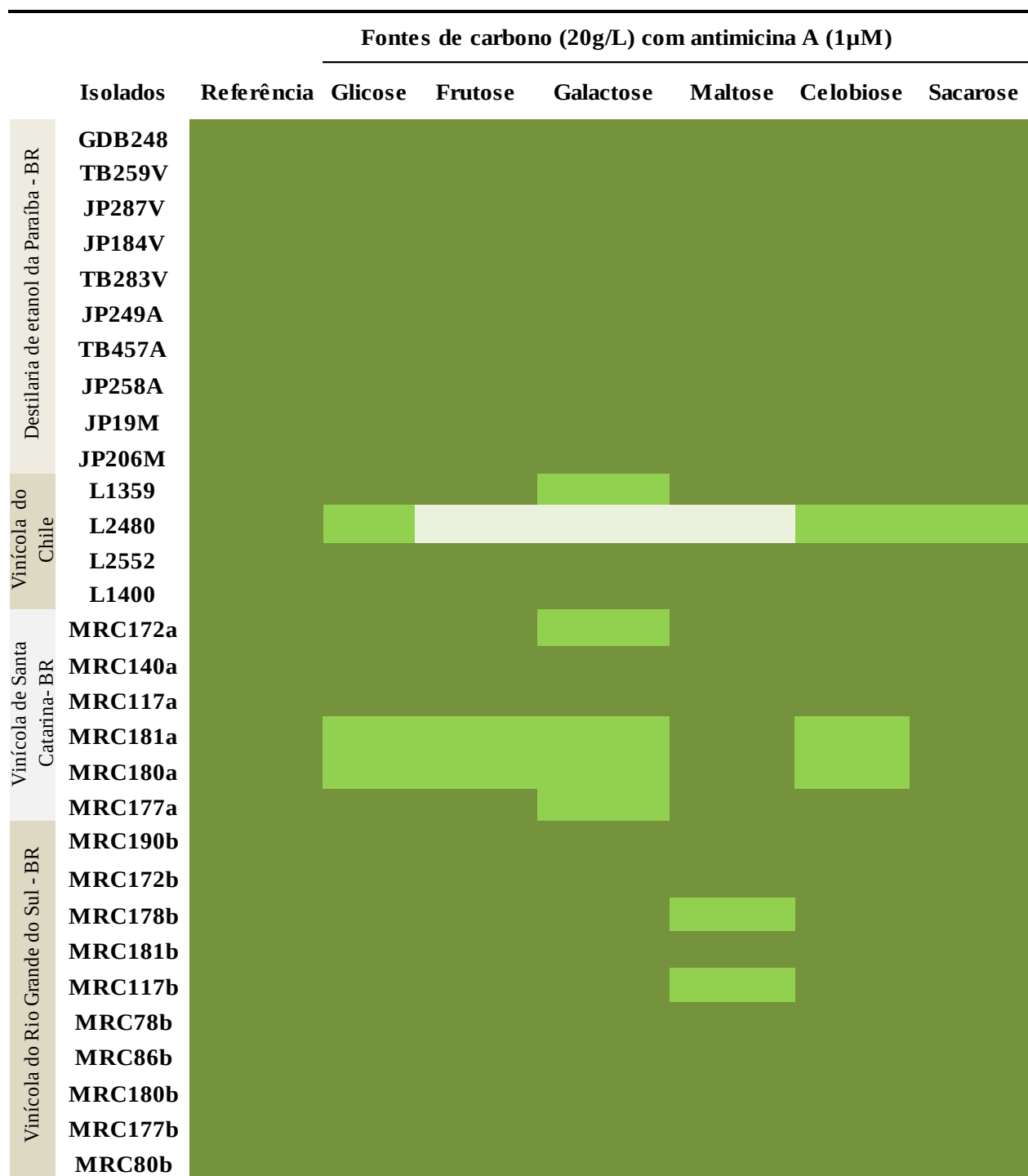


Fig. 2.4. Mapa de calor (*heat map*) do teste de crescimento qualitativo em placa de Petri de diversos isolados de *D. bruxellensis* em diferentes fontes de carbono e adição de Antimicina A (AA). Referência, sem adição de AA. ■ sem inibição; ■ inibição parcial; ■ inibição total do crescimento.



Fig. 2.5. Mapa de calor (*heat map*) do teste de crescimento qualitativo em placa de Petri de diferentes isolados de *D. bruxellensis* em diferentes fontes de carbono e adição de 2-deoxi-D-glicose (2-DG). Referência, sem adição de 2-DG. ■, crescimento semelhante à referência; ■ inibição parcial; ■ inibição total do crescimento.

Dos 20 isolados de vinho, apenas seis cresceram semelhante à referência e apenas em meio contendo glicose como fonte de carbono. Em meios com galactose ou maltose não foi observado nenhum crescimento, indicando que a 2-DG exerceu forte papel repressor. A repressão do crescimento em meio com maltose na linhagem GDB 248 também foi observada por Leite (2012). Em meios com frutose, e celobiose, apenas quatro isolados apresentaram crescimento, mesmo que inferior à referência. Em sacarose, apenas um isolado cresceu (figura 5).

O mecanismo de GCR atua na repressão da expressão de uma série de genes envolvidos, dentre outros processos, na metabolização de açúcares e outras fontes de carbono (Carlson, 1999), e a presença de 2-DG induz um estado permanente de GCR que priva as células de qualquer fonte de carbono e leva a morte celular (McCartney *et al.*, 2014). A variabilidade biológica observada em relação à tolerância ao 2-DG sugere variações nos mecanismos de ativação e desativação da GCR nesta levedura. Por exemplo, os isolados JP249A, JP19M e JP206M se mostraram muito tolerantes ao inibidor, mesmo em meio com celobiose. O isolado TB283V e a própria linhagem de referência GDB 248 são muito sensíveis ao composto. Conclui-se que estes isolados devem servir como excelentes modelos naturais no estudo do funcionamento da GCR em *D. bruxellensis*.

Metabolismo de glicose, sacarose e celobiose em anaerobiose

A partir dos resultados obtidos dos microcultivos aeróbios foram selecionados seis isolados de *D. bruxellensis* que apresentaram altas velocidades de crescimento em glicose, sacarose ou celobiose (Tabela 2.2), além da linhagem de referência GDB 248, para cultivos anaeróbios em meio sintético suplementado com Tween 80, ergosterol e diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose ou celobiose). Este é um importante parâmetro a ser testado visto que os processos de fermentação industrial são basicamente anaeróbios.

Tabela 2.2. Velocidades de crescimento (μ , h^{-1}) dos isolados de *D. bruxellensis* em microcultivo aeróbio. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de experimentos independentes.

Linhagem	Glicose	Sacarose	Celobiose
GDB 248	0,141 $\pm$ 0,004	0,172 $\pm$ 0,002	0,0628 $\pm$ 0,0001
JP287V	0,28 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,01
TB283V	0,24 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,01	0,208 $\pm$ 0,006
TB457A	0,326 $\pm$ 0,007	0,307 $\pm$ 0,001	0,091 $\pm$ 0,008
L1400	0,28 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,02
JP19M	0,32 $\pm$ 0,01	0,297 $\pm$ 0,002	0,16 $\pm$ 0,01

Todos os seis isolados de *D. bruxellensis* foram capazes de crescer em glicose, sacarose e celobiose sob condição anaeróbica (Tabela 2.3). Os perfis de crescimento de cada linhagem podem ser observados na figura 6. A capacidade de *D. bruxellensis* em crescer sob condições anaeróbicas tem sido relacionada à necessidade da adição de casaminoácidos (Rozpedowska *et al.*, 2011) ou extrato de levedura (Blomqvist *et al.*, 2011) no meio sintético. Entretanto, os isolados testados neste estudo apresentaram habilidade de crescer em meio sintético sem suplementação nutricional (Figura 6). Em contraste, a linhagem *D. bruxellensis* CBS 11270 não é capaz de crescer em anaerobiose em quaisquer fontes de carbono ou nitrogênio testadas (Blomqvist *et al.*, 2012).

Tabela 2.3. Velocidades de crescimento dos isolados de *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* JP1 em condição anaeróbica. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de experimentos independentes.

	μ (h ⁻¹)		
	Glicose	Sacarose	Celobiose
GDB 248	0,20 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01
JP287V	0,158 $\pm$ 0,009	0,15 $\pm$ 0,01	0,143 $\pm$ 0,002
TB283V	0,15 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,008
TB457A	0,44 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,001
L1400	0,33 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,02
JP19M	0,40 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,01
JP1*	0,34 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,02	NT

NT: não testado

**S. cerevisiae*

A habilidade de crescer em glicose (20 g l⁻¹) em anaerobiose foi mostrada em *D. bruxellensis* Y879 (Rozpedowska *et al.*, 2011). Entretanto a velocidade específica de crescimento alcançada por *D. bruxellensis* Y879 (0,070–0,075 h⁻¹) foi inferior a dos isolados aqui mostrados (Tabela 3). De modo geral, as velocidades de crescimento em meio com sacarose foram iguais ou superiores às obtidas em celobiose. Os melhores desempenhos e as mais altas velocidades de crescimento em meio com celobiose foram apresentadas pelos isolados GDB 248, JP19M e JP287V (Figura 2.6; Tabela 2.3). A habilidade para assimilar celobiose em algumas linhagens de *D. bruxellensis*, tal como GDB 248, em condição aeróbica já foi descrita anteriormente pelo nosso grupo (Leite *et al.*, 2013), bem como a capacidade de assimilar esse dissacarídeo em condições de limitação de oxigênio (Reis *et al.*, 2014). Agora, mostramos que alguns isolados de destilaria de etanol são capazes de assimilar celobiose em condição anaeróbia, o que pode apresentar vantagem para uso biotecnológico dessas

leveduras na produção de etanol de segunda geração, visto que *S. cerevisiae* é incapaz de assimilar a celobiose resultante do bagaço hidrolisado (Blomqvist *et al.*, 2011).

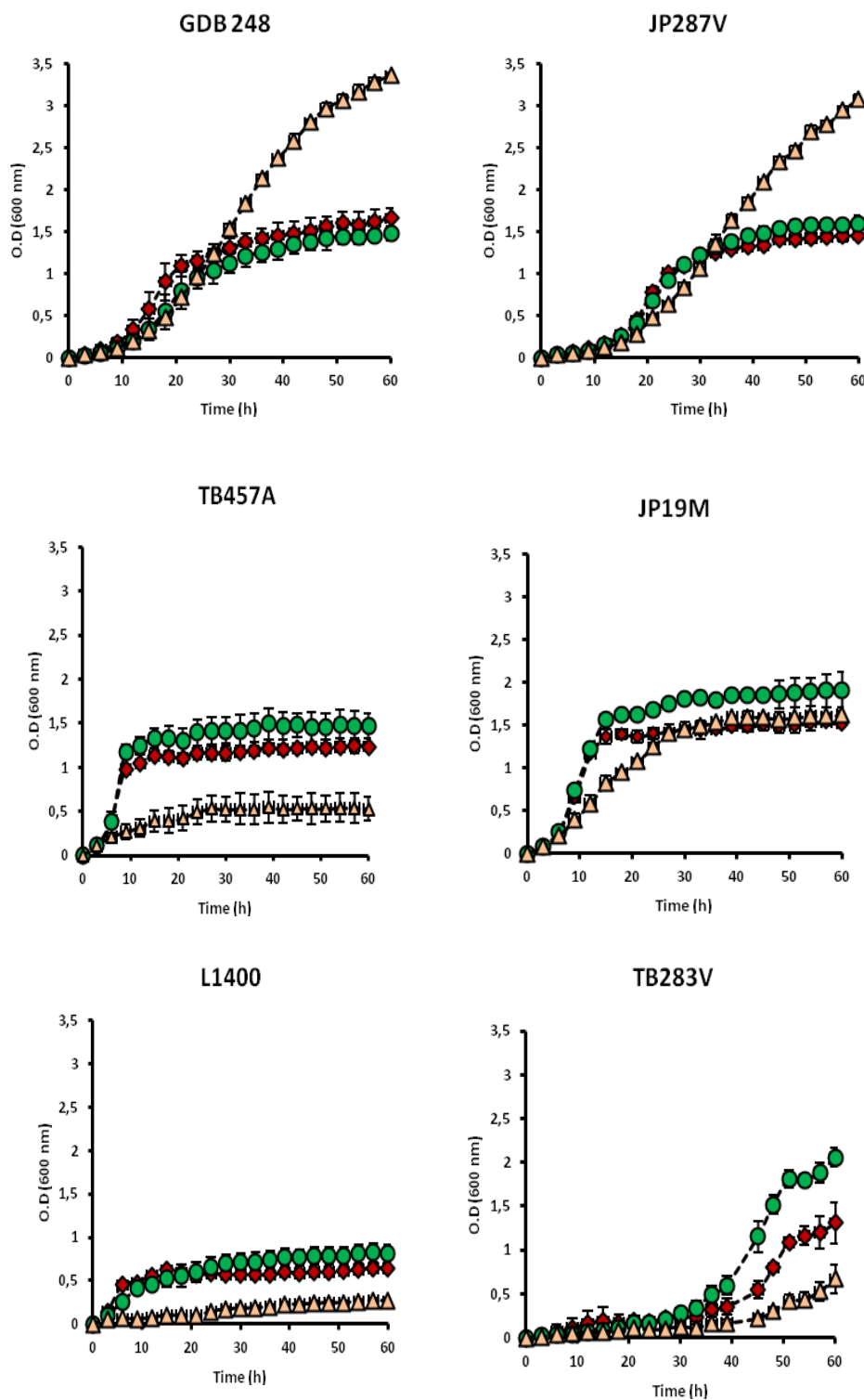


Fig. 2.6. Cinética de crescimento anaeróbico de diferentes linhagens de *D. bruxellensis* em meio com glicose (diamante), sacarose (círculo) ou celobiose (triângulo) como fonte de carbono.

Conclusão

D. bruxellensis é considerada a principal levedura contaminante nos processos industriais de produção de vinho e etanol combustível. Devido a sua capacidade de se adaptar em condições industriais, estudos têm sido realizados para elucidar os aspectos fisiológicos que conferem adaptação a tais ambientes. Os resultados obtidos neste trabalho fornecem conhecimentos sobre a diversidade de assimilação do carbono por diversos isolados *D. bruxellensis* de vinho e de etanol, bem como a habilidade desses isolados em resistir à presença de repressores catabólicos e inibidores da cadeia transportadora de elétrons, e a capacidade de assimilar glicose, celobiose sacarose em anaerobiose. Quando as células foram cultivadas em diferentes fontes de carbono, as maiores taxas de crescimento foram alcançadas em glicose, seguida de frutose, sacarose e maltose para os isolados de ambos os nichos. A habilidade de assimilar celobiose e lactose foi mostrada pelas linhagens de destilaria, e em menor proporção, pelas linhagens de vinícolas, apresentando distinção com linhagens selvagens de *S. cerevisiae* que não são capazes de metabolizar esses açúcares. Além disso, a presença do repressor catabólico exerceu influências contrastantes entre os isolados analisados, mostrando que esses isolados podem ser utilizados como modelos naturais para compreensão da GCR em *D. bruxellensis*. O estudo da assimilação de açúcares potencialmente utilizados como substratos industriais em condições anaeróbicas pode abrir campo para posterior aplicação biotecnológica da levedura *D. bruxellensis*, visto que os processos de fermentação industrial são essencialmente anaeróbios.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, Pernambuco, Brasil) pelo fomento. Este trabalho foi patrocinado pela Rede de Pesquisas do Bioetanol no estado de Pernambuco (programa CNPq-FACEPE/PRONEM, concessão nº APQ-1452-2.01/10).

Referências

Blomqvist J, South E, Tiukova I, et al. (2011) Fermentation of lignocellulosic hydrolysate by the alternative industrial ethanol yeast *Dekkera bruxellensis*. *Lett Appl Microbiol* **53**: 73–78.

- Blomqvist J, Nogué VS, Gorwa-Grauslund M, Passoth V (2012) Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygenlimited or anaerobic conditions. *Yeast* **29**: 265–274.
- Carlson M (1999) Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* **2**: 202-207.
- Camargo JZ (2013) Estudo da fisiologia de diferentes leveduras industriais e isoladas na região centro-oeste. 92 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados – MS.
- Conterno L, Joseph CML, Arvik TJ, Henick-Kling T, Bisson LF (2006) Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *The J. Enol. Vitic* **57**: 139–147.
- Crauwels S, Van Assche A, Jonge R, Borneman AR, Verreth C, Troels P, Samblanx G, Marchal K, Van de Peer Y, Willems KA, Verstrepen KJ, Curtin CD, Lievens B (2015) Comparative phenomics and targeted use of genomics reveals variation in carbon and nitrogen assimilation among different *Brettanomyces bruxellensis* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 9123–9134.
- da Silva TCD, Leite FCB, De Moraes MA (2016) Distribution of in a sugarcane-based fuel ethanol fermentation plant. *Lett Appl Microbiol* **62**: 354-358.
- de Barros Pita W, Leite FCB, de Souza Liberal AT, Simões DA & de Moraes MA (2011) 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* **100**: 99–107.
- Diniz RHS (2009) Metabolismo de lactose em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Kluyveromyces lactis* JA6. 62 f. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, UFV.
- Fukuhara H (2003) The Kluyver effect revisited. MiniReview. *FEMS Yeast Res* **3**:327-31.
- Goffrini P, Ferrero I, Donnini C (2002) Respiration-Dependent Utilization of Sugars in Yeasts: a Determinant Role for Sugar Transporters. *J Bacteriol* **184**: 427–432.
- Leite FCB (2012) Fisiologia molecular da levedura *Dekkera bruxellensis*. 94 f. **Tese** (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Ciências Biológicas, Biotecnologia, PE.
- Leite FCB, Basso TO, de Barros Pita W, Gombert AK, Simões DA, de Moraes Jr, MA (2013) Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. *FEMS Yeast Res* **13**: 34–43.

- Li S, Du J, Sun J, Galaska JM, Glass NL, Cate JHD, Yang X, Zhao H (2010) Overcoming glucose repression in mixed sugar fermentation by co-expressing a cellobiose transporter and a β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol BioSystems* **6**: 2129-2132.
- Loureiro V, Malfeito-Ferreira M (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. *Int J Food Microbiol* **86**: 23–50.
- González-Siso MI (1996) The Biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresour Technol* **57**: 1-11.
- Hellborg, L, Piškur, J (2009) Complex Nature of the Genome in a Wine Spoilage Yeast, *Dekkera bruxellensis*. *Eukaryot Cell* **8**: 1739-1749.
- Kratky Z, Biely P, Bauer S (1975) Mechanism of 2-deoxy-D-glucose inhibition of cell-wall polysaccharide and glycoprotein biosyntheses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **54**: 459-467.
- Merico A, Sulo P, Piskur J, Compagno C (2007) Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS J* **274**: 976-989.
- Mccartney RR, Chandrashekarappa DG, Zhang BB, Schmidt MC (2014) Genetic analysis of resistance and sensitivity to 2-deoxyglucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **198**: 635-646.
- Moktaduzzaman Md, Galafassi S, Capusoni C, Vigentini I, Ling Z, Piskur J. Compagno C (2015) Galactose utilization sheds new light on sugar metabolism in the sequenced strain *Dekkera bruxellensis* CBS 2499. *FEMS Yeast Res* **15**, 2.
- Nadal D, Carro D, Fernandez-Larrea J, Pina, B (1999) Analysis and dynamics of the chromosomal complements PF wild sparkling-wine yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1688-1695.
- Reis ALS, Souza RFR, Torres RRNB, Leite FCB, Paiva PMG, Vidal EE, De Moraes Jr MA (2014) Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain. *SpringerPlus* **3**: 38.
- Rozpedowska E, Hellborg L, Ishchuk OP et al. (2011) Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nat Commun* **2**: 302.
- Rubio-Teixeira MAA (2005) Comparative analysis of the *GAL* genetic switch between not-so distant cousins – *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* **5**: 1115-1128.
- Sangorrín MP, García V, Lopes CA, Sáez JS, Martínez C, Ganga MA (2013) Molecular and physiological comparison of spoilage wine yeasts. *J Appl Microbiol* **114**: 1066–1074.

- Stambuk BU, Silva MA, Panek AD, Araujo OS (1999) Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Lett* **170**: 105-110.
- Turrens JF (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* **17**: 3–8.
- Woolfit M, Rozpedowska E, Piskur J, Wolfe H (2007) Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Eukaryot. Cell* **6**: 721–733.

4 CONCLUSÃO

- Os isolados de *D. bruxellensis* apresentam diversidade no perfil de assimilação das fontes de carbono testadas.
- Altas taxas de crescimento são encontradas pelos isolados de vinho e destilaria em glicose, frutose e sacarose.
- As linhagens de destilaria TB457A, JP249A, JP206M e JP19M ganham destaque devido à habilidade de assimilar diversas fontes de carbono mesmo na presença do repressor catabólico análogo a glicose.
- Isolados de destilaria são resistentes à presença de antimicina A, diferentemente dos de vinícola.
- Cultivos em condições anaeróbias com seis isolados de *D. bruxellensis* mostram a capacidade dessa levedura em assimilar açúcares utilizados como substratos industriais.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M. A.; JEFFRIES, T. W.; **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n 2, 1990.

BADOTTI, F.; DÁRIO, M. G.; ALVES, S. L. JR.; CORDIOLI, M. L.; MILETTI, L. C.; DE ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Cell Factories**, v. 7, n. 4, 2008.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; & YARROW, D. Yeast: characteristics and identification, 2nd edn. Cambridge: **Cambridge University Press**, 1990.

BERTHEL, N. J.; OTERO, R. R. C.; BAUER, F. F.; PRETORIUS, I. S.; THEVELEIN, J. M. Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 77, n. 5, p. 1083–1091, 2008.

BEZERRA, R. M.; DIAS, A. A. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis: inhibition by ethanol and cellobiose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 126, n. 1, p. 49-59, 2005.

BHAT, P. J; MURTHY, T. V. Transcriptional control of the *GAL/MEL* regulon of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of galactose-mediated signal transduction. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1059–66, 2001.

BIELY, P.; KRATKY, Z.; KOVARIK, J.; BAUER, S. Effect of 2-deoxyglucose on cell wall formation in *Saccharomyces cerevisiae* and its relation to cell growth inhibition. **Jounay of Bacteriology**, v. 107, v. 1, p. 121–129, 1971.

BLOMQVIST, J.; EBERHARD, T.; SCHNURER, J.; PASSOTH, V. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1487-1497, 2010.

CARLSON, M. Glucose repression in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 202-207, 1999.

CONTERNO, L.; JOSEPH, C. M. L.; ARVIK, T. J.; HENICK-KLING, T.; BISSON, L. F. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **The American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, n. 2, p. 139-147, 2006.

COULON, J.; PARELLO, M. C.; LONVAUD-FUNEL, A.; REVEL, G.; RENOUF, V. *Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatile phenols production in red wines during storage in bottles. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 4, p. 1450 – 1458, 2010.

DA SILVA, T. C. D.; LEITE, F. C. B.; DE MORAIS, M. A. Distribution of in a sugarcane-based fuel ethanol fermentation plant. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 354-358, 2016.

DASHTBAN, M; SCHRAFT, H; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residuos; opportunities & perpectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578-595, 2009.

DE BARROS PITA, W.; TIUKOVA, I.; LEITE, F. C. B.; PASSOTH. V.; SIMÕES D. A.; DE MORAIS, M. A. JR. The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. **Yeast**, v. 30, n. 3, p. 111–117, 2013.

DE SOUZA LIBERAL, A. T.; CARAZZOLLE, M. F.; PEREIRA, G. A.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS, M. A. JR. The yeast *Dekkera bruxellensis* genome contains two orthologs of the *ARO10* gene encoding for phenylpyruvate decarboxylase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 2473–2478, 2012.

DIEN, B. S; COTTA, M. A., AND JEFFRIES, T.W. “Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status,” **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 3, p. 258–266, 2003.

ESPOSITO, E. O.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2. Ed. Caxias do Sul: **Educs**, 2010.

FREER, S. N. Kinetic Characterization of β -glucosidase from a Yeast, *Candida wickerhamii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 13, p. 9337-9342, 1993.

FUGELSANG, K. C.; OSBORN, M. M.; MULLER, C. J. *Brettanomyces* and *Dekkera*. Implications in wine making, p. 110–131. In B. H. Gump (ed.), *Beer and wine production, analysis, characterization, and technological advances*. **American Chemical Society**, Washington, D.C. 1993.

GALAFASSI, S.; MERICO, A.; PIZZA, F.; HELLBORG, L.; MOLINARI, F.; PISKUR, J.; COMPAGNO, C. *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable

sources under oxygen-limited and low-pH conditions. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1079-1088, 2011.

GILLILAND, R. B. Brettanomyces. I. Occurrence, characteristics and effects on beer flavour. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 67, n. 3, p. 257–261, 1961.

GODARD, P.; URRESTARAZU, A.; VISSERS, S.; KONTOS, K.; BONTEMPI, G.; van HELDEN, J.; ANDRE, B. Effect of 21 different nitrogen sources on Global Gene Expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 8, p. 3065-86, 2007.

GOMES, K. N. Isolamento e caracterização de um mutante de *Saccharomyces cerevisiae* com características fenotípicas opostas à cepa *pkcD*. **Dissertação**. Universidade Federal de Ouro Preto. 95 p. Ouro Preto, 2004.

GUIMARAES, P. M., TEIXEIRA, J. A., & DOMINGUES, L. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 1, n. 3, p. 164-71, 2010.

HAGMAN, A. (2013). Evolution of Yeast Respiro-Fermentative Lifestyle and the Underlying Mechanisms Behind Aerobic Fermentation. **Doctoral dissertation**. Department of Biology, Lund University.

HELLBORG, L.; PIŠKUR, J. Complex Nature of the Genome in a Wine Spoilage Yeast, *Dekkera bruxellensis*. **Eukaryotic Cell**. v. 8, n. 11, p. 1739-1749, 2009.

HULL, C. R. Yeast physiology - a micro synopsis. **Bioprocess Engineering** v. 6, n. 5, p. 195-203, 1991.

JACOBY, J.; HOLLENBERG, C. P.; AND HEINISCH, J. J. Transaldolase mutants in the yeast *Kluyveromyces lactis* provide evidence that glucose can be metabolized through the pentose phosphate pathway. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 867-876, 1993.

KOKKILIGADDA, A.; BENIWAL, A.; PRIYANKA, S.; VIJ, S. Utilization of Cheese Whey Using Synergistic Immobilization of β -Galactosidase and *Saccharomyces cerevisiae* Cells in Dual Matrices. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 179, n. 8, p. 1469–1484, 2016.

KRATKY, Z; BIELY, P; BAUER, S. Mechanism of 2-deoxy-D-glucose inhibition of cell-wall polysaccharide and glycoprotein biosyntheses in *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v. 54, n., p. 459–467, 1975.

LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology**, v. 104, n. 3-4, 1107-1112, 1993.

LEI, H., et al., Fermentation performance of lager yeast in high gravity beer fermentations with different sugar supplementations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 122, n. 5, p. 583-588, 2016.

LEITE, F. C. B. (2012) Fisiologia molecular da levedura *Dekkera bruxellensis*. 94 f. **Tese** (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Ciências Biológicas, Biotecnologia, PE, 2012.

LEITE, F. C. B.; BASSO, T. O.; DE BARROS PITA, W.; GOMBERT, A. K.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS JR, M. A. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. **FEMS Yeast Research**, v. 13, p. 34–43, 2013.

LEITE, F. C. B.; LEITE, D. V. R.; PEREIRA, L. F.; DE BARROS PITA, W.; DE MORAIS JR, M. A. High intracellular trehalase activity prevents the storage of trehalose in the yeast. **Letters in Applied Microbiology**, v. 63, p. 210-214, 2016.

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

LIN, Z.; GUICHUN, H.; LIFENG, L.; CHEN, C.; XUECHENG, C.; JINFANG, C. Protective effect of α -lipoic acid against antimycin A cytotoxicity in MC3T3-E1 osteoblastic cells. **Cell Stress and Chaperones** v. 22, p. 5–13, 2017.

LIU, Z.L.; WEBER, S.A.; COTTA, M.A.; LI, S. A new β -glucosidase producing yeast for lower-cost cellulosic ethanol production from xylose-extracted corncob residues by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 410-416, 2012.

MCCARTNEY, R. R.; CHANDRASHEKARAPPA, D. G.; ZHANG, B. B., AND SCHMIDT, M. C. Genetic Analysis of Resistance and Sensitivity to 2-Deoxyglucose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 198, p. 635–646, 2014.

MERICO, A.; SULO, P.; PISKUR, J.; COMPAGNO C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **FEBS Journal**, v. 274, n. 4, p. 976–989, 2007.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6. ed. Porto Alegre: **Artmed** 1328 p. 2014.

OLSSON, L. AND HAHN-HÄGERDAL, B. "Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysates." **Process Biochemistry**, v. 28, n. 4, p. 249–257, 1993.

OZCAN, S.; JONHSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 3, p. 554–559, 1999.

PACKER, M. Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. **Energ Policy**, v. 37, n. 9, p. 3428–37, 2009.

PARENTE, D. C.; VIDAL, E. E.; LEITE, F. C. B.; PITA, W. B.; AND MORAIS JR, M. A. Production of sensory compounds by means of the yeast *Dekkera bruxellensis* in different nitrogen sources with the prospect of producing cachaça. **Yeast**, v. 32, n. 1, p. 77–87, 2015.

PELICANO, H.; MARTIN, D. S.; XU, R. H.; HUANG, P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. **Oncogene**, v. 25, p. 4633–4646, 2006.

PEREIRA, L. F.; BASSI, A. P. G.; AVANSINI, S. H.; NETO, A. G. B.; BRASILEIRO, B. T. R. V.; CECCATO-ANTONINI, S. R.; DE MORAIS, M. A. The physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 101, p. 529–539, 2012.

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

PEREIRA, V. J.; FERNANDES, D.; CARVALHO, G.; BENOLIEL, M. J.; SAN ROMÃO, M. V.; BARRETO CRESPO, M. T. Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. **Elsevier**, v. 44, n. 17, p. 4850–4859, 2010.

REIS, A. L. S.; SOUZA, R. F. R.; TORRES, R. R. N. B.; LEITE, F. C. B.; PAIVA, P. M. G.; VIDAL, E. E.; DE MORAIS JR, M. A. Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain. **SpringerPlus**, v. 3, n. 38, 2014.

SANGORRÍN, M. P.; GARCÍA, V.; LOPES, C. A.; SÁEZ, J. S.; MARTÍNEZ, C.; GANGA, M. A. Molecular and physiological comparison of spoilage wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, v. 114, n. 4, p. 1066–1074, 2013.

PRONK, J. T.; STEENSMA, H. Y.; VAN DIJKEN, J. P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 12, n. 16, p. 1607-1633, 1996.

RASIMUS-SAHARI, S.; MIKKOLA, R.; ANDERSSON, M. A.; JESTOI, M.; SALKINOJA-SALONEN, M. Streptomyces strains producing mitochondriotoxic antimycin A found in cereal grains. *International Journal of Food Microbiology*, v. 21, p. 78-85, 2016.

RETTORI, D.; VOLPE, P. L. O. Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *Saccharomyces cerevisiae*. *Química nova*, v. 23, n. 2, p. 257-261, 2000.

RODRIGUES, N.; GONÇALVES, G.; PEREIRA-DA-SILVA, S.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 90, n. 4, p. 588 – 599, 2001.

ROUWENHORST, R. T.; VISSER, L. E.; VAN DER BAAN, A. A.; SCHEFFERS, W. A.; & VAN DIJKEN JP. Production, distribution and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces lactis*. *Applied & Environmental Microbiology*, v. 54, n. 5, p. 1131 – 1137, 1991.

SANTANA, N. B. (2007) Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol. 115 f. **Dissertação**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

S´ANCHEZ, O. J.; AND CARDONA, C. A. “Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks,” *Bioresource Technology*, v. 99, n. 13, p. 5270–5295, 2008.

SCHIFFERDECKER, A. J.; DASHKO, S.; ISHCHUK, O. P.; AND PIŠKUR, J. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. *Yeast*, v. 31, n. 9, p. 323–332, 2014.

SERRANO, R. Energy requirements for maltose transport in yeast. *European Journal of Biochemistry*, v. 80, n. 1, p. 97–102, 1977.

SILVA-FILHO, E. A. 2003. Caracterização genética de populações de leveduras em destilarias de álcool combustível com vistas a seleção de linhagens promissoras para

expressão heteróloga de genes de interesse industrial. **Tese (Doutorado)**. UFPE - Biologia de Fungos. 120p.

SILVA, J. S (2007) Produção de álcool na fazenda e em sistema cooperativo. Viçosa, MG., vi, 168p.

SIMS, A. P.; BARNETT, J. A. The requirement of oxygen for the utilization of maltose, cellobiose and D-galactose by certain anaerobically fermenting yeast. **Journal of General Microbiology**, v. 166, p. 277–288, 1978.

SONG, Y. S., LEE, J. H., KANG, S. W., & KIM, S. W. Performance of β -galactosidase pretreated with lactose to prevent activity loss during the enzyme immobilisation process. **Food Chemistry**, v. 123, n. 1, p. 1-5, 2010.

THEVELEIN, J.M. Signal transduction in yeast. **Yeast**, v. 10, n. 13, p. 1753-1790, 1994.

VAN DIJKEN, P., VAN DEN BOSCH, E., HERMANS, J. J., RODRIGUES DE MIRANDA, L. & SCHEFFERS, W. A. Alcoholic fermentation by 'non-fermentative' yeasts. **Yeast**, v. 2, n. 2, p. 123-127, 1986.

VAN OEVELEN, D. F.; I'ESCAILLE, D. E.; VERACHTERT, D. Synthesis of aroma components during the spontaneous fermentation of lambic and gueuze. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 82, n. 6, p. 322-326, 1976.

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

WOOLFIT, M.; ROZPEDOWSKA, E.; PISKUR, J. AND K. H. WOLFE. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 4, p. 721–733, 2007.

ZEEMAN, A. M. (2000). Pyruvate metabolism in the yeast *Kluyveromyces lactis* (**Doctoral dissertation**, TU Delft, Delft University of Technology).

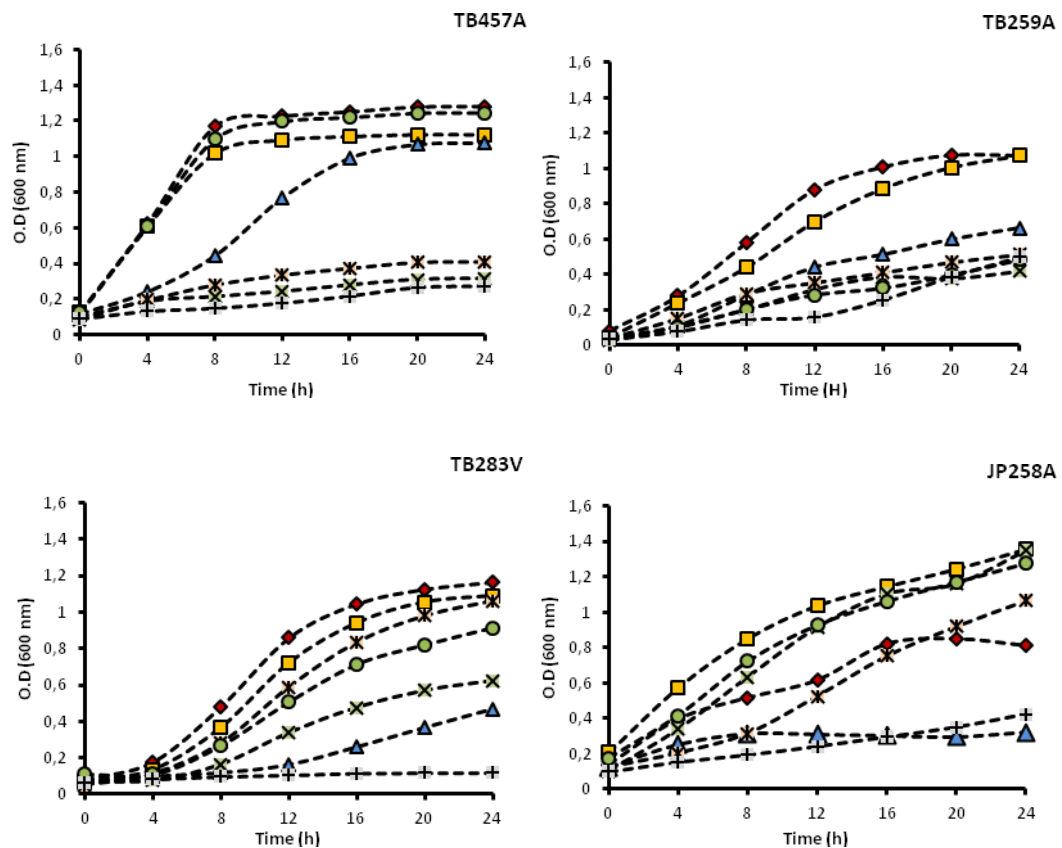
ROSANA, Bem. Metabolismo da Frutose e Galactose. 2012. <http://rosanabem.blogspot.com.br/2012/06/metabolismo-da-frutose-e-galactose.html> Acesso em: 12 de ago. de 2016.

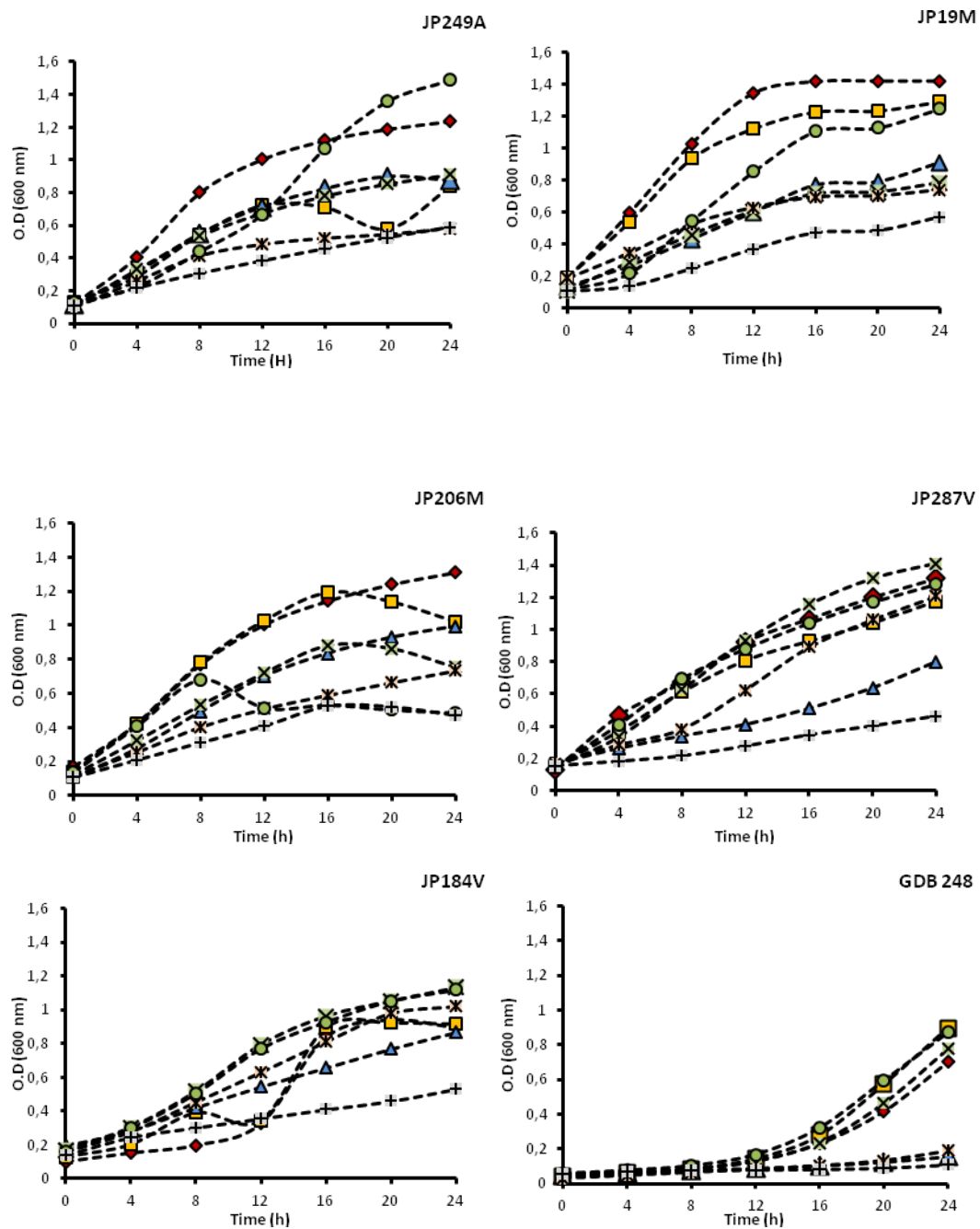
ANEXO A – Material suplementar do artigo

Diversidade da assimilação de fontes carbono em isolados industriais de *Dekkera bruxellensis*

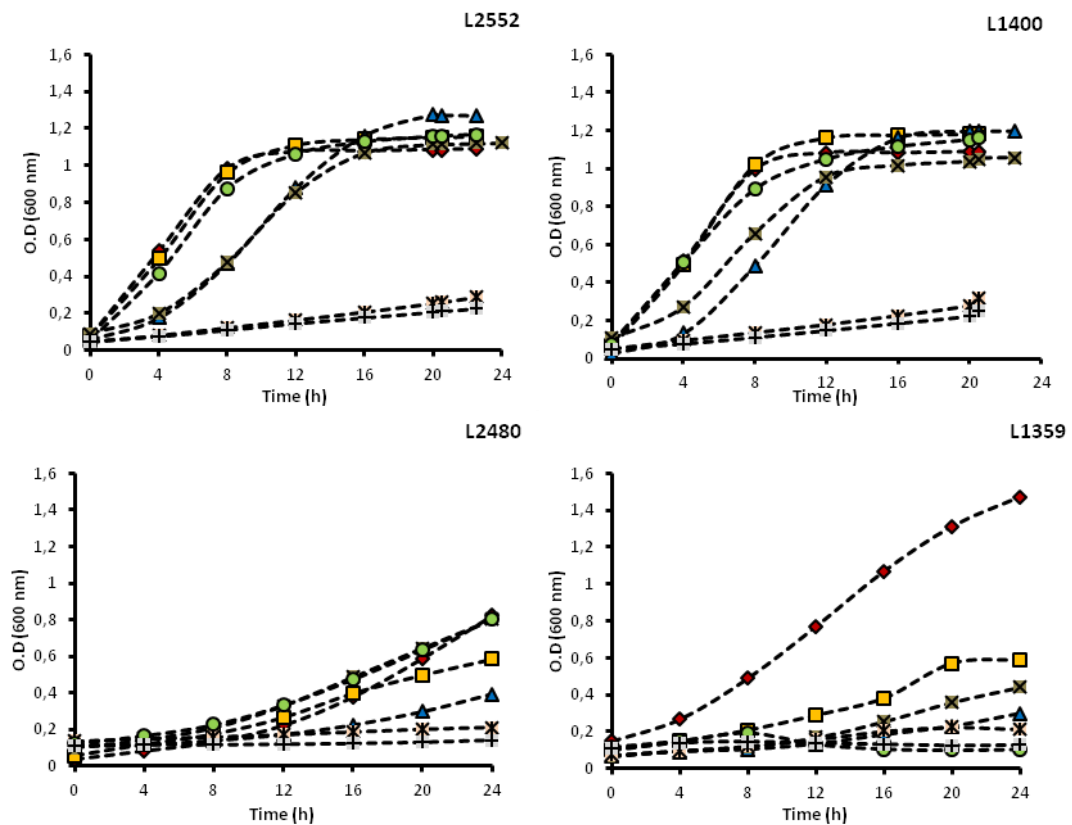
Jackeline Maria da Silva¹, Gilberto Henrique Teles Gomes da Silva¹, Denise Castro Parente¹, Angélica Maria Ganga², Patrícia Valente da Silva³, Fernanda Cristina Bezerra Leite^{1,4}, Marcos Antonio de Moraes Junior^{1,5}, Diogo Ardaillon Simões^{1,6}

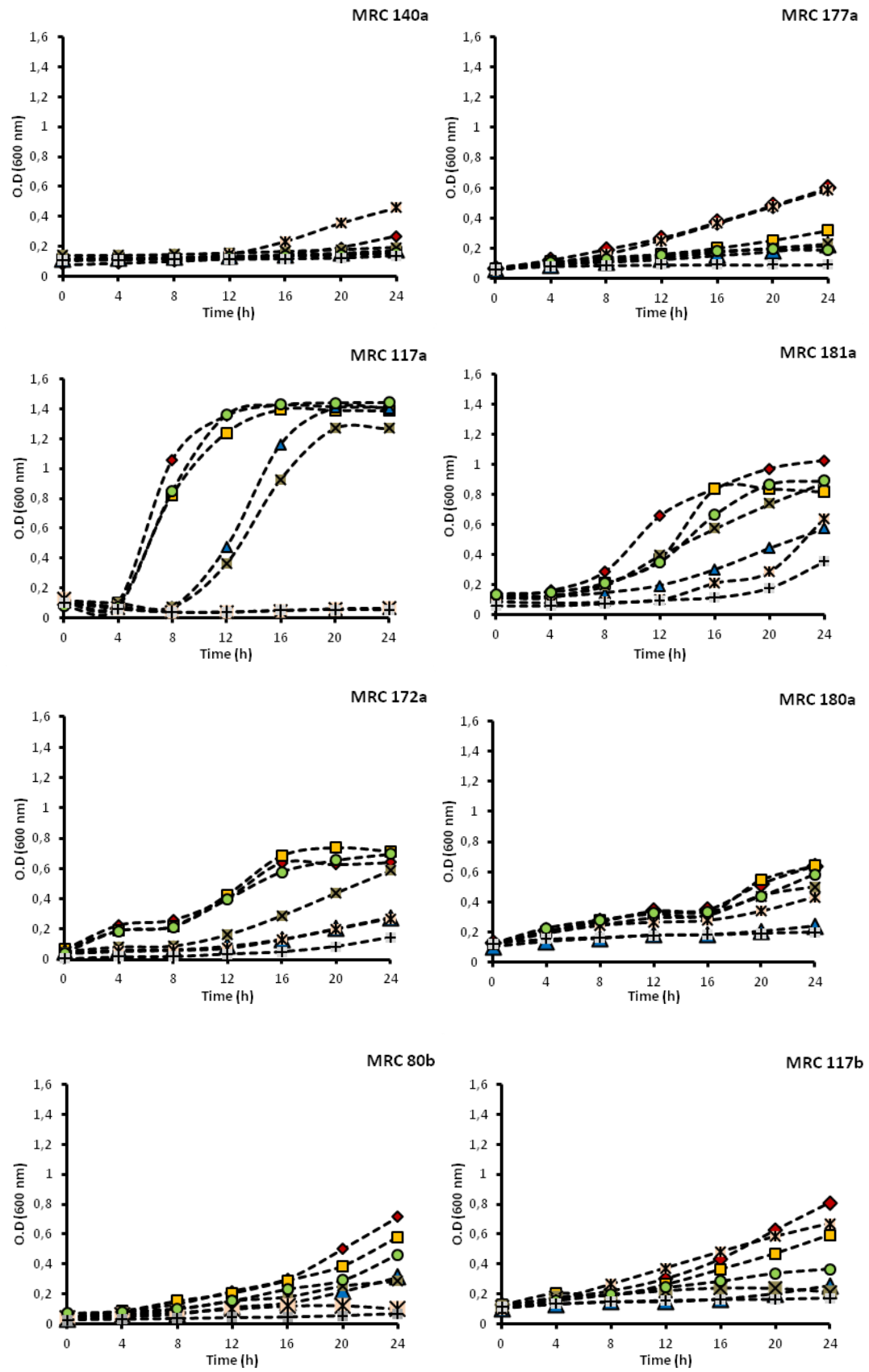
S1: Cultivo aeróbio de diferentes linhagens de *D. bruxellensis* isoladas de destilaria de etanol do estado da Paraíba/BR em diversas fontes de carbono. Fontes de carbono: glicose (diamante vermelho ◆-); frutose (quadrado amarelo ■-); galactose (triângulo azul ▲-); maltose (xis ✕-); celobiose (asterisco ✱-); sacarose (círculo verde ●-); e lactose (sinal positivo +).

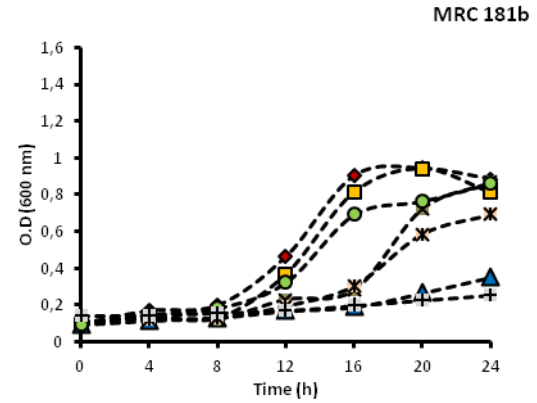
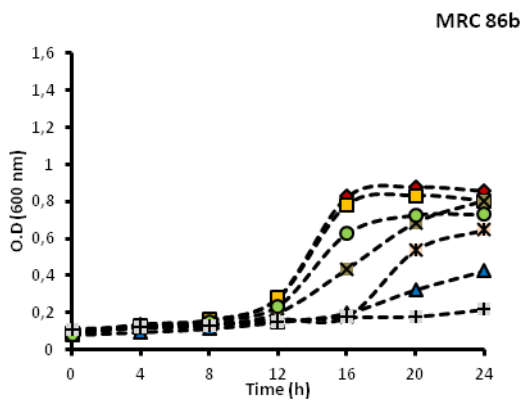
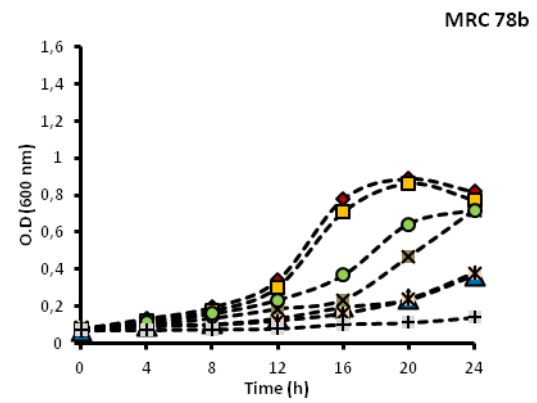
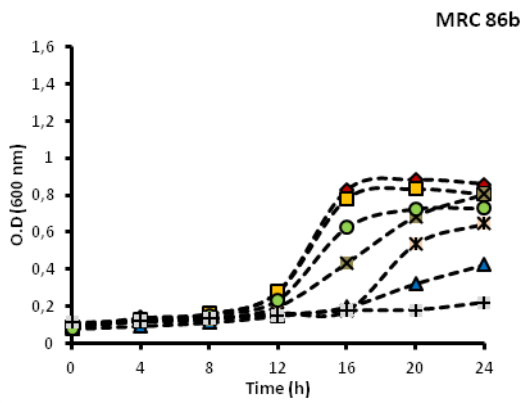
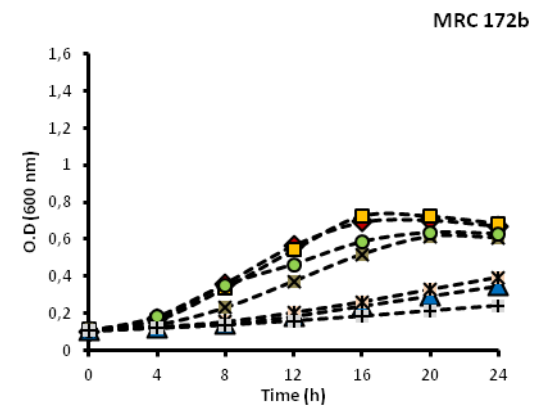
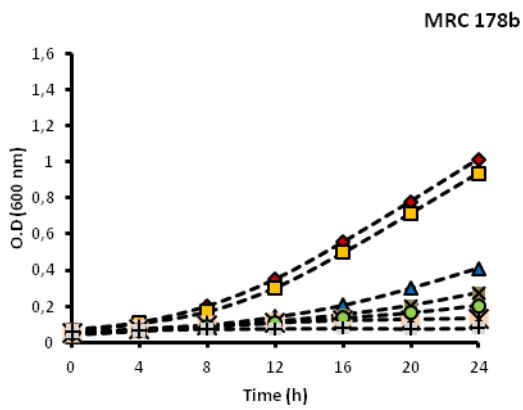
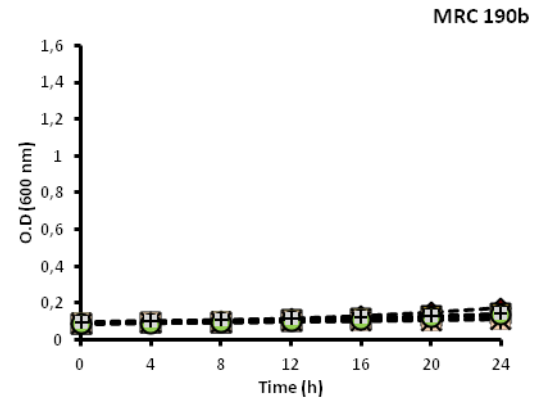
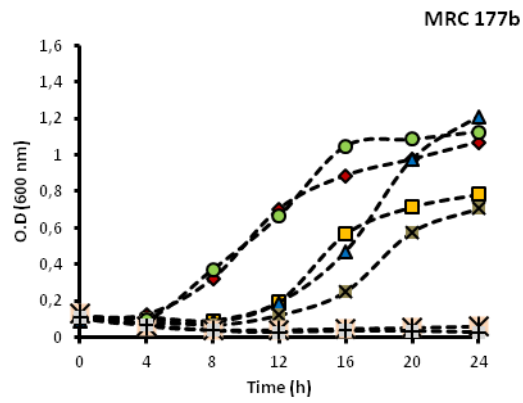




S2: Cultivo aeróbio de isolados de *D. bruxellensis* de vinícolas em diferentes fontes de carbono. Fontes de carbono: glicose (diamante vermelho -♦-); frutose (quadrado amarelo -■-); galactose (triângulo azul -▲-); maltose (xis -✕-); celobiose (asterisco -*-); sacarose (círculo verde -●-); e lactose (sinal positivo -⊕-).







ANEXO B – Atividade complementar

Resumos apresentados em congresso:

Silva, Jackeline Maria; Silva, Gilberto Henrique Teles Gomes; Parente, Denise Castro; De Moraes Junior, Marcos Antonio. Kinetic growth of different strains of the yeast *Dekkera bruxellensis* isolated from fuel ethanol distilleries face to different carbon source. 5º Jornada Sul Americana de Biologia e Biotecnologia de Leveduras, 2015, Recife – PE.

Parcerias com Laboratórios externos a UFPE:

Estágio voluntário junto ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) no período entre janeiro a fevereiro de 2017, sob supervisão da pesquisadora Jaciane Lutz Lenczak.

ANEXO C – Guia de autores para submissão do artigo



Fems Yeast Research

Online ISSN: 1567-1364

Impact factor 3.299

MANUSCRIPT PREPARATION INSTRUCTIONS

SUBMISSION

Quick links

Please read these instructions carefully and follow them closely to ensure that the review and publication of your paper is as efficient and quick as possible. The Editors reserve the right to return manuscripts that are not in accordance with these instructions.

All material to be considered for publication in ***FEMS Yeast Research*** should be submitted in electronic form via the journal's [online submission system](#). Once you have prepared your manuscript according to the instructions below, instructions on how to submit your manuscript online can be found by [clicking here](#).

All manuscripts must be accompanied by a cover letter, which should include a short statement, in 3 – 4 sentences, describing:

how the work related to the scope of journal i.e. why it should be published in this journal?

the aims of the study and their significance with regard to previously published work

the novelty and originality of the findings.

Manuscripts for MiniReviews may be submitted directly, solicited from international leading investigators or proposals for reviews may be sent to the Chief Editor.

Nominated Reviewers

When suggesting reviewers for manuscripts, members of the Editorial Board and/or suitably qualified scientists should have no close affiliation with the authors and should give an objective review of the manuscript. Professional e-mail addresses must be provided, if available, rather than private e-mail addresses. The Editors retain the right to use their discretion to select reviewers they deem appropriate, which may or may not include those nominated by authors.

Revised Manuscripts

Manuscripts may be returned to authors for modification of the scientific content and/or for shortening and language corrections. Revised versions must be submitted online through ScholarOne Manuscripts by clicking on the link to upload a revised manuscript provided in the authors' decision letter. This can also be achieved by clicking on the "create a revision" button in the corresponding author's submitting author centre. A source file is required with text and tables (.doc, .docx or .rtf format, but not .pdf). Information must be provided on responses to Editor's and referees' comments through a cover letter. A clear indication is also required of changes that have been made. Authors must also upload a file as a supporting document in which original and revised text are compared using the 'Track Changes' facility.

Figures should be uploaded in separate files and at sufficient resolution (see section on Preparation of data). All obsolete files of the previous version should be deleted from the revised submission. If a paper that is returned to the authors for amendment is not resubmitted in revised form within one month after minor and two months after a major revision, the paper will be regarded as withdrawn, unless request for extension is made to the Editor dealing with the paper. Any revised version received after this deadline will be treated as a new, resubmitted manuscript.

Resubmitted Manuscripts

If extensive revision is required, including a requirement for additional experimental work or analysis, the manuscript may be rejected but with a recommendation to resubmit a substantially revised manuscript. A resubmitted manuscript should be submitted as a new

manuscript but should include a letter outlining the revisions that have been made in response to the major criticisms of the original article. The article will be treated as a new submission, will typically be edited by the Editor who dealt with the original manuscript, but may not necessarily be reviewed by the same referees.

PRE-SUBMISSION LANGUAGE EDITING

Manuscripts must be written in English (consistent with either UK or US spelling) and should be clear and grammatically correct. Authors whose native language is not English should consider having their manuscript read by an English speaking colleague or have it professionally edited. This is not a mandatory step, but may help to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication but manuscripts that are not written in clear and legible English may be rejected without peer review.

There are a number of pre-submission language editing services available. Peerwith allows you to find language experts specialised in your field of research. You can use the following link to request a Peerwith quotation within 24 hours without obligation: <https://www.peerwith.com/fems/request/femsmicrobiologyyeastresearch>.

ONLINE SEARCH ENGINE OPTIMIZATION (SEO)

You can improve the online accessibility of your paper by writing optimized copy that is highly indexable across all search engines. A large number of readers find articles online by using search engines such as Google. Most searching is done using keywords or key phrases. Including key phrases that people searching are likely to use should make your article more discoverable. By taking some simple steps to optimize your article for search engines it will help your work to be discovered and read. This may in turn lead to the work being cited in others' work and will further raise the visibility of your article. Future measures, which assess the value of journals and of individual articles based on the number of times they are downloaded, are currently being developed and tested (see <http://www.uksg.org/usagefactors/> and <http://www.cranfieldlibrary.cranfield.ac.uk/pirus2/tiki-index.php>).

MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

FEMS politely requests you compile your manuscript in MS Word and save it as a .doc or .docx file (not a .pdf file), using the following layout.

Main Document incorporating: Title page, the abstract, main text in one single column with references located at the end.

A separate file containing all Tables, each on a separate page.

A separate file containing Figure legends.

Individually uploaded Figures, ensuring that each figure is at least twice the size it will be in the published document. Include the figure number (e.g. Fig. 1) and optionally including the figure legend well outside the boundary of the space occupied by the figure. ScholarOne Manuscripts will combine your separately uploaded figure files and the manuscript main body into one online file. Please ensure that you upload the figures only once.

Include page and line numbering (continuous).

The right-hand margin justification should be switched off. Artificial word breaks at the end of lines must be avoided.

If you do not use MS Word then save in MS Word format in the word processor that you use. Rich text (.rtf) format may also be used.

Use standard fonts (Arial, Times New Roman, Symbol, Helvetica, Times). In your Word document, on the Tools menu, click Options, select the Embed TrueType fonts check box and then click the Save tab.

In assessing whether the manuscript falls within the recommended maximum length, one journal page is equivalent to approximately three manuscript pages, each table is approximately 0.3 of a printed page and each figure is approximately 0.25 of a printed page.

There is no maximum length for papers, but the length should be justified by the content and authors are urged to be concise. Excessively long reference lists should be avoided. Repetition of information in the text and illustrations should not occur.

Please also include the files for any other supplementary material to be submitted with your manuscript. It is recommended that authors spell-check all files before submission.

Please use short, simple filenames when saving all your documents, and avoid special characters, punctuation marks, symbols (such as &), and spaces.

Other helpful hints are: (i) use the TAB key once for paragraph indents; (ii) where possible use Times New Roman for the text font and Symbol for any Greek and special characters; (iii) use the word processing formatting features to indicate **Bold**, *Italic*, Greek, Maths, Superscript and Subscript characters; (iv) please avoid using underline: for emphasis use bold; (v) clearly identify unusual symbols and Greek letters; (vi) where there might be confusion, differentiate between the letter O and zero, and the letters I and l and the number 1.

Title, authors and keywords

The manuscript should not form part of a numbered series but should be headed by a concise, informative title. Authors are reminded that titles are widely used in information-retrieval systems. The name, full postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address of one corresponding author should be provided in a footnote. FEMS journals only accept one corresponding author.

Article titles should not contain unidentified abbreviations. For genes/proteins, please state the full name if known, with the accepted abbreviation in brackets.

Six informative keywords should be provided by the authors.

General organisation of manuscripts

Materials and Methods and Results are normally written in the past tense and the present tense is occasionally used in the Introduction and Discussion.

Abstract. This should be a single paragraph of less than 200 words and must be intelligible without reference to the full paper. Ideally, references are not cited. Abbreviations should be avoided, but if necessary, they must be defined the first time they are used in the main text. Do not abbreviate genus in the title, keywords, or at first use in the Abstract and Introduction. It is important that the abstract contains a clearly stated hypothesis, a concise description of the approach and a clear statement of the major novel findings of the study and their significance.

Introduction. This should place the work in the context of current knowledge, should indicate the novelty of the study and should conclude with a clear statement of the aims and objectives, but should not contain a summary of the results.

Materials and Methods. Sufficient detail must be provided to allow the work to be repeated. Suppliers of materials and a brief address should be mentioned if this might affect the results. Specific reference must be given for reagents (e.g. plasmids, strains, antibodies) that were not generated in the study.

Results. Presentation of data is described below.

Discussion. This should not simply repeat the Results. Combined Results and Discussion sections are encouraged when appropriate.

Acknowledgements. These can include funding agencies, colleagues who assisted with the work or the preparation of the manuscript and those who contributed materials or provided unpublished data.

References.

FUNDING

Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled 'Funding'. This should appear before the 'Acknowledgements' section. The following rules should be followed:

The sentence should begin: 'This work was supported by ...'

The full official funding agency name should be given, i.e. 'the National Cancer Institute at the National Institutes of Health' or simply 'National Institutes of Health' not 'NCI' (one of the 27 subinstitutions) or 'NCI at NIH' ([full RIN-approved list of UK funding agencies](#))

Grant numbers should be complete and accurate and provided in brackets as follows: '[grant number ABX CDXXXXXX]'

Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: '[grant numbers ABX CDXXXXXX, EFX GHXXXXXX]'

Agencies should be separated by a semi-colon (plus 'and' before the last funding agency)

Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number 'to [author initials]'.

An example is given here: ‘This work was supported by the National Institutes of Health [P50 CA098252 and CA118790 to R.B.S.R.] and the Alcohol & Education Research Council [HFY GR667789].

Acknowledgements

Acknowledgements and details of non-financial support must be included at the end of the text before references and not in footnotes. Personal acknowledgements should precede those of institutions or agencies. Please note that acknowledgement of funding bodies and declarations regarding conflicts of interest should be given in separate Funding and Conflicts of interest sections, respectively.

References

If you use EndNote and Reference Manager to facilitate referencing citations (not required for submission), this journal's style is available for use. If an automatic referencing system has been used in the preparation of the paper, the references must not be left embedded in the final text file submitted.

For reference style please consult the mini style checklist.

Article types

Research Articles describe original experimental work leading to significant advances within the scope of the journal. There is no maximum length for papers, but the length should be justified by the content and authors are urged to be concise. Excessively long reference lists should be avoided. Repetition of information in the text and illustrations should not occur.

MiniReviews are concise articles reviewing topics of current interest or controversial aspects of subjects within the scope of the journal. Articles providing new concepts, critical appraisals and speculation are welcomed. The style for MiniReviews is the same as for research papers, except that the maximum length of the text is about 7,000 words, with a maximum combined total of six figures and tables. There is no rigid format for MiniReviews but they should generally include an Abstract and a brief Introduction in which the background to the article is presented. The remainder of the text should be arranged under a single, or a maximum two levels of subheading, finishing with a Conclusion or Outlook section that highlights the novelty of the MiniReview.

Current Opinion, Perspective and Commentary articles enable authors to present their views on important topical issues, to discuss new conceptual approaches and to consider, critically, future developments. Their format is flexible but follows that of MiniReviews, with similar maximum length.

Letters to the Editor are brief communications focusing on an article that has been published in the journal within the previous six months. They should focus on some aspect(s) of the paper that is, in the author's opinion, incorrectly stated or interpreted, controversial, misleading or in some other way worthy of comment. All Letters to the Editor must address a scientific issue in an objective fashion, should be fewer than 1000 words, and will be externally refereed. If acceptable for publication, they will be offered to the original authors for comment. Please choose the manuscript type 'Letter to the Editor' when uploading through the online submission system.

JOURNAL COPYEDITING STYLE

This journal follows our standard Oxford SciMed style. By following the mini style checklist you can ensure that your manuscript follows the major style points.

Reproducibility of results and statistical tests

Authors should state how many times experiments were repeated and whether mean or representative results are shown. Variability should be indicated statistically wherever possible as part of, but not in place of, a proper statistical analysis. If results are expressed as percentages, the absolute value corresponding to 100% must be stated. Avoid values with unjustified numbers of significant figures; in most cases three significant figures is consistent with the accuracy attained in microbiological experiments.

Results of statistical tests should be presented wherever possible as evidence for conclusions reached. Such information must be presented concisely to illuminate the results, but not to dominate them. The tests used should be briefly described in the Materials and Methods section. Details of the diagnostic checks made for the assumptions of the statistical tests and for the validity of any transformations used should be stated clearly.

Description of New Species

Papers describing the isolation of new bacterial strains or species will be considered for publication providing they meet the standards specified for such descriptions as outlined in: B.J. Tindall, R. Rosselló-Móra, H.-J. Busse, W. Ludwig, and P. Kämpfer, Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010 60: 249-266 (see <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/60/1/249>), and that the strain is deposited in two recognised public culture collections.

In the submission letter the authors should state why the description merits publication in a FEMS journal, rather than publication in a specialized taxonomic journal such as *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* or *Systematic and Applied Microbiology*.

Nomenclature, abbreviations and units

Authors should follow internationally accepted rules and conventions. Authors should provide evidence for the thorough identification of new isolates and use the most recent acceptable name. For genes/proteins, please state the full name if known, with the accepted abbreviation in brackets.

Bacteria and Archaea

The spelling of bacterial names should follow the list of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature <http://www.bacterio.cict.fr/>. If there is a reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the name should be printed in roman type and enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example, see *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1980) 30: 547–556).

Fungi

The authors should use recently accepted binomials controlled by the International Code of Botanical Nomenclature (<http://www.bgbm.fu-berlin.de/iapt/nomenclature/code/SaintLouis/0000St.Luistitle.htm>). Scientific names of yeasts can be found in: *The Yeasts: a Taxonomic Study*, 4th ed. (C. P. Kurtzman and J.W. Fell, ed., Elsevier B.V., Amsterdam, The Netherlands, 1998). Taxonomic texts should cite nomenclatural authorities at the first time a name is mentioned. For abbreviation of authors' names, see <http://www.indexfungorum.org/AuthorsOfFungalNames.htm>. All taxa should be italicized.

Viruses

Names used for viruses should be those approved by the International Committee on taxonomy of Viruses (ICTV) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>. If desired, synonyms may be added parenthetically when the name is first mentioned. Approved generic (or group) and family names may also be used.

Enzymes

For enzymes, please use the Recommended Name (or Common Name) and the Enzyme Commission (EC) number (as defined by the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) upon first use in the body text and on first use in the Abstract. Do not use the EC number in titles or subheadings though they may be appropriate to use in a table if a large number of enzymes are being assayed for, for example. Names and numbers should be taken from the latest iteration of the BRENDA database (www.brenda-enzymes.org). For not yet classified enzymes, use a ‘preliminary BRENDA supplied EC number’. As an example, “thiosulfate dehydrogenase (EC 1.8.2.2)” or, if preliminary “EC 1.8.2.B2”. It may at times be appropriate to list older/alternative names of the enzyme if there is much inconsistency in the literature as this will help readers to find your content – for instance in the case of the above mentioned enzyme, “thiosulfate oxidising enzyme” and “tetrathionate synthase” are still in use in some papers.

Genes

Genetic nomenclature should essentially follow the recommendations of Demerec et al. (Genetics (1966) 54: 61–76), and those given in the instructions to authors of the Journal of Bacteriology and Molecular and Cellular Biology (January issues). Biochemical compounds. Consult the European Journal of Biochemistry or the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>).

Abbreviations

Abbreviations should only be used as an aid to the reader and their use should be strictly limited. Define each abbreviation and introduce it in parentheses the first time it is used: e.g. ‘cultures were grown in Eagle minimal essential medium (MEM)’. Eliminate abbreviations that are not used at least six times in the manuscript. In addition to abbreviations to the international system of units of measurements, other common units (e.g., bp, kb, Da), chemical symbols for the elements, and the standard biochemical abbreviations (see Eur. J.

Biochem.) should be used without definition. Standard chemical symbols and trivial names or their symbols (folate, Ala, Leu, etc.) may be used for terms that appear in full in the neighbouring text. Abbreviations other than those recommended by the IUPAC-IUB (Biochemical Nomenclature and related Documents, 1978) should be used only when a case can be made for necessity, such as in tables and figures.

Reporting numerical data

The international system of units (SI) should be used; mL is acceptable in place of cm³ for liquid measures. The form for units is mg mL⁻¹ and not mg/mL, parentheses should be used to improve clarity, e.g. mL (g dry wt soil)⁻¹ h⁻¹. The prefixes k, m, m μ, n, and p should be used in combination with the standard units for reporting length, weight, volume and molarity for 10³, 10⁻³, 10⁻⁶, 10⁻⁹, and 10⁻¹², respectively. Use mg mL⁻¹ or mg g⁻¹ instead of the ambiguous ppm. Units of temperature are presented as follows: 37°C or 324 K

FIGURES AND ILLUSTRATIONS

Please create your figures and illustrations with reference to the OUP guidelines available at <http://www.oxfordjournals.org/en/authors/figures.html>

Please be aware that the requirements for online submission and for reproduction in the journal are different: (i) for online submission and peer review, please upload your figures either embedded in the word processing file or separately as low-resolution images (.jpg, .tif, .gif or. eps); (ii) for reproduction in the journal, you will be required after acceptance to supply high-resolution .tif files. Minimum resolutions are 300 d.p.i. for colour or tone images, and 600 d.p.i. for line drawings. We advise that you create your high-resolution images first as these can be easily converted into low-resolution images for online submission.

Figures will not be relettered by the publisher. The journal reserves the right to reduce the size of illustrative material. Any photomicrographs, electron micrographs or radiographs must be of high quality. Wherever possible, photographs should fit within the print area or within a column width.

For useful information on preparing your figures for publication, go to <http://cpc.cadmus.com/da>.

Colour figures are encouraged and free of charge.

Specifications

Figures should be supplied at twice their final size with wide margins. A single column figure is 80 mm, two-thirds page width is 114 mm and two-column width is 168 mm.

For line art:

All lines should be drawn at 1.5 point (0.5 mm wide), broken line styles may be used to differentiate multiple plot lines if desired.

Letters and numbers should be 16 point (capitals 4 mm high) non- serif (e.g. Windows: Arial, Trebuchet MS, Verdana, Century Gothic and Lucida Sans Unicode; Mac and Unix: Helvetica, Lucida, Avant Garde).

Symbols in the figure itself should be 3 mm in diameter. Lines drawn to accompany the points should not go through hollow symbols.

Numbers used as axis labels should have minimum significant figures; amounts less than unity must carry a preceding zero (e.g. 0.5 not .5).

Larger composite figures may be designed to occupy two columns when this can achieve an overall saving in space. The character, line and symbol sizes should be adjusted accordingly to achieve the same sizes on the printed page.

Magnification should be indicated where appropriate by inclusion of a bar marker.

Photographs of electropherograms, etc., in which there is poor contrast may be better replaced by line drawings, but in this case the photographs should be submitted for scrutiny by the Editor.

If photographs have been digitally processed to enhance their quality, this should be stated.

Figure legends should consist of a preliminary sentence constituting a title, followed by a brief description of the way the particular experiment was carried out, and any other necessary description of symbols or lines. All abbreviations must be defined.

Graphical Abstract and One-Sentence Summary

FEMS uses Graphical Abstracts to promote articles via email content, social media, newsletters and online search results.

"Graphical Abstract": image which is not necessarily linked to the original manuscript, but either summarizes the text, fits to the text and is very appealing or is one of the key images/figures/graphs of the article.

Tips: Keep it simple / Short legible text / Avoid saturated and distracted colours / Image resolution should be a minimum of 300dpi and the aspect ratio should be 4:3 to make sure that your image is optimized in our 'click and expand' feature.

"One-sentence Summary": short non-technical summary stating the novelty of the article. The language used should be understood by a non-specialist. Please ensure you use the third person, not first person (i.e. do not use 'I' or 'we')

Please check that your Graphical Abstract is clear and eye-catching. This will help to attract readers to your publication. For examples of how this is displayed please visit <http://www.fems-microbiology.org/journals/graphical-abstract.html>.

Videos

Authors may now include videos with their submissions which will be published in the online article (ie: no longer as supplementary data). *Please see below for further details*. Authors must also submit a still image that can be used in the print article. Videos should be numbered in the order they appear in the text. All figures and videos require a legend. The total playback time for the two videos should not exceed 5 minutes.

Recording

Use the highest possible resolution when creating the original. The use of a standard thoracoscopic camera (digital preferred) fixed on the table and manipulated by an assistant gives excellent magnification and high quality recording. Filming with a head-mounted recording camera is not recommended.

Audio

To improve the understanding of the procedure described, short and clear commentaries can be incorporated into the video file. Commentaries should supplement the complete description given in the legend of the video.

Format

Videos can be submitted in any standard format: wmv, avi, mpeg, mov, etc. Videos must be of high quality and must have a minimum size of 640x480 (preferably higher as we will convert all videos to MP4 to ICVTS specifications). The aspect ratio can be: 4:3 or 16:9.

For full video preparation guidelines, go to

<http://www.oxfordjournals.org/en/help/faq/authors/video-and-media-guidelines.html>

Tables

All tables should be on separate pages and accompanied by a title, and footnotes where necessary. The tables should be numbered consecutively using Arabic numerals. Units in which results are expressed should be given in parentheses at the top of each column and not repeated in each line of the table. Ditto signs are not used. Avoid overcrowding the tables and the excessive use of words. The format of tables should be in keeping with that normally used by the journal; in particular, vertical lines, coloured text and shading should not be used. Please be certain that the data given in tables are correct.

PERMISSION TO REPRODUCE FIGURES AND EXTRACTS

Permission to reproduce copyright material, for print and online publication in perpetuity, must be cleared and if necessary paid for by the author; this includes applications and payments to DACS, ARS and similar licensing agencies where appropriate. Evidence in writing that such permissions have been secured from the rights-holder must be made available to the Editors. It is also the author's responsibility to include acknowledgements as stipulated by the particular institutions. Please note that obtaining copyright permission could take some time. Oxford Journals can offer information and documentation to assist authors in securing print and online permissions: please see the Guidelines for Authors section at http://www.oxfordjournals.org/access_purchase/rights_permissions.html. Should you require copies of this then please contact the Editorial office of the journal in question or the Oxford Journals Rights department on journals.permissions@oup.com.

Third-Party Content in Open Access papers

If you will be publishing your paper under an Open Access licence but it contains material for which you **do not** have Open Access re-use permissions, please state this clearly by supplying the following credit line alongside the material:

Title of content

Author, Original publication, year of original publication, by permission of [rights holder]

This image/content is not covered by the terms of the Creative Commons licence of this publication. For permission to reuse, please contact the rights holder.

SUPPORTING INFORMATION AND SUPPLEMENTARY DATA

Electronic Supporting Information may be included, free of charge, to support and enhance your manuscript with, e.g. supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets or sound clips. Supporting information will be subject to critical review and this facility should be used prudently. Supporting information should not contain data that are critical to the paper. Supporting files will be published, subject to editorial approval, online alongside the electronic version of your article. Authors should submit the Supporting Information at the same time as the manuscript, but in separate file(s). Select ‘Supplemental files’, or ‘MultiMedia’ for the file designation when uploading through the online submission system. Upload a separate .doc or .docx file listing concise and descriptive captions for each file uploaded as Supporting Information. Please indicate that you have uploaded these files in your cover letter and state clearly whether they are intended for eventual online publication as Supporting Information, or are for peer review purposes only.

Supporting material that is not essential for inclusion in the full text of the manuscript, but would nevertheless benefit the reader, can be made available by the publisher online, linked to the online manuscript. The material should not be essential to understanding the conclusions of the paper, but should contain data that is additional or complementary and directly relevant to the article content. Such information might include more detailed methods, extended data sets/data analysis, or additional figures. Select ‘Supplemental files’, or ‘MultiMedia’ for the file designation when uploading through the online submission system. Upload a separate .doc or .docx file listing concise and descriptive captions for each file uploaded as Supporting Information. Please indicate that you have uploaded these files in your cover letter and state clearly whether they are intended for eventual online publication as Supporting Information, or are for peer review purposes only.

It is standard practice for appendices to be made available online as supplementary data. All text and figures must be provided in suitable electronic formats. All material to be considered as supplementary data must be submitted at the same time as the main manuscript for peer review. It cannot be altered or replaced after the paper has been accepted for publication, and will not be edited. Please indicate clearly all material intended as supplementary data upon submission and name the files e.g. 'Supplementary Figure 1', 'Supplementary Data', etc. Also ensure that the supplementary data is referred to in the main manuscript where necessary, for example as '(see Supplementary data)' or '(see Supplementary Figure 1)'.

COPYRIGHT AND LICENCE

It is a condition of publication for all Oxford Journals that authors either assign copyright or grant an exclusive licence to Oxford University Press or the sponsoring Society. This ensures that all of the rights needed for publication of the article are in place and that any requests from third parties to reproduce content from the Journal is handled efficiently and consistently by OUP, enabling the content to be as widely disseminated as possible. No article will be published unless the signed licence has been received at Oxford Journals. Upon receipt of accepted manuscripts at Oxford Journals authors will be asked to complete an online copyright licence to publish form, and the Publisher will provide further instruction at that point. Any queries about the licence form should be sent as soon as possible to [Rights and Permissions](#) so that any issues can be resolved quickly and to avoid any delay in publication.

Details of how to sign the licence using our online system will be sent after acceptance. Work submitted for publication must be original, previously unpublished, and not under consideration for publication elsewhere. If previously published figures, tables, or parts of text are to be included, the copyright-holder's permission must have been obtained prior to submission. For more information on how to obtain permissions, please consult [Rights and Permissions](#).

Oxford Open

FEMS Yeast Research authors have the option to publish their paper under the [Oxford Open](#) initiative; whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication. After your manuscript is accepted the corresponding author will be required to accept a mandatory license to publish agreement. As part of the licensing process you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for open access. If you

do not select the open access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will not be charged.

Oxford Open articles are published under Creative Commons licences: Creative Commons Attribution licence (CC-BY), Creative Commons Attribution Non-Commercial licence (CC-BY-NC) or Creative Commons Attribution Non-Commercial No Derivatives licence (CC-BY-NC). [Please click here for more information about the Creative Commons licences.](#)

Charges for CC BY-NC and CC BY-NC-ND:

Regular charge: £1,850 / \$3,000 / €2,450

Reduced Rate Developing country charge: £925 / \$1,500 / €1,225

Free Developing country charge: Free

Charges for CC-BY:

Regular charge: £2,000 / \$3,200 / €2,600

Reduced Rate Developing country charge: £1,000 / \$1,600 / €1,300

Free Developing country charge: Free

Discounted rates are available for authors based in some developing countries (click [here](#) for a list of qualifying countries).

Crossref Funding Data Registry

In order to meet your funding requirements authors are required to name their funding sources, or state if there are none, during the submission process. For further information on this process or to find out more about the CHORUS initiative please click [here](#).

PROOFS

Authors are sent page proofs by Email. These should be checked immediately and corrections, as well as answers to any queries, returned to the publishers within 3 working days (further

details are supplied with the proof). It is the author's responsibility to check proofs thoroughly.

ADVANCE ACCESS

Advance Access articles are published online soon after they have been accepted for publication, in advance of their appearance in the main journal. Appearance in Advance Access constitutes official publication, and the Advance Access version can be cited by a unique DOI (Digital Object Identifier). When an article appears in an issue, it is removed from the Advance Access page.

Articles posted for Advance Access are published online as they have been submitted. This is before they have been copy edited, paginated and published online in a specific issue of the journal. Once an article appears in an issue, both versions of the paper continue to be accessible and citable.