

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de pós-graduação em genética

IRINA CHARLOT PEÑA MORENO

**INFLUÊNCIA DA DISPONIBILIDADE DE NITROGÊNIO NA EXPRESSÃO DE
GENES DO METABOLISMO CENTRAL DA LEVEDURA *DEKKERA*
BRUXELLENSIS CULTIVADA EM ANAEROBIOSE**

Recife
2017

IRINA CHARLOT PEÑA MORENO

**INFLUÊNCIA DA DISPONIBILIDADE DE NITROGÊNIO NA EXPRESSÃO DE
GENES DO METABOLISMO CENTRAL DA LEVEDURA *DEKKERA*
BRUXELLENSIS CULTIVADA EM ANAEROBIOSE**

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

Orientador: Dr. Will de Barros Pita
Co-orientador: Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior

Recife
2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Peña Moreno, Irina Charlot

Influência da disponibilidade de nitrogênio na expressão de genes do metabolismo central da levedura *Dekkera bruxellensis* cultivada em anaerobiose. / Recife: O Autor, 2017.

74 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Will de Barros Pitta

Coorientador: Marcos Antonio de Moraes Junior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Genética, Recife, 2017.

Inclui referências

- 1. Expressão gênica 2. Leveduras 3. Nitrogênio I. Pitta, Will de Barros (orient.) II. Moraes Junior, Marcos Antonio de (coorient.) III. Título**

572.86

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 551

IRINA CHARLOT PEÑA MORENO

**INFLUÊNCIA DA DISPONIBILIDADE DE NITROGÊNIO NA EXPRESSÃO DE
GENES DO METABOLISMO CENTRAL DA LEVEDURA *DEKKERA*
BRUXELLENSIS CULTIVADA EM ANAEROBIOSE**

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

Aprovada em: __23_/02_/2017__

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Will de Barros Pita / Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Tercilio Calsa Jr / Universidade Federal de Pernambuco

Prfa. Dra. Carolina Elsztein / Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

“Gracias a la vida que me ha dado tanto
Me ha dado el sonido y el abecedario
Con él las palabras que pienso y declaro
Madre, amigo, hermano, y luz alumbrando
La ruta del alma del que estoy amando”.

Violeta Parra, 1966

AGRADECIMENTOS

À energia espiritual que me guia e me trouxe até aqui para conseguir realizar meu trabalho de mestrado, e que faz com que não desista mesmo nos momentos difíceis.

À minha mãe, minhas irmãs e minhas cadelinhas que são o meu motor e meu apoio incondicional, por me fazer sentir que sua presença está sempre próxima a pesar da distância física.

Ao Alfonso, meu amor eterno e parceiro de muitos momentos especiais da minha vida. Por me acompanhar com paciência e determinação nesta etapa.

Ao meu orientador Will de Barros Pita pela oportunidade de ser sua orientada, pela ajuda continua e confiança para realizar cada etapa do meu trabalho. Por me ensinar com paciência e da melhor maneira para eu querer aprender cada dia mais a pesar das minhas inseguranças, perturbações, mesmo que nas horas mais inconvenientes.

Ao meu co-orientador Marcos Moraes pela oportunidade e ajuda continua desde minha chegada no Brasil, ao mesmo tempo que pelo aprendizado a longo do meu mestrado. Pela paciência e vontade para resolver minhas dúvidas.

Aos colegas de Laboratório, Denise Castro pela ajuda continua desde minha chegada no laboratório, Allison Andrade e todos os outros que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão do meu trabalho, ou até mesmo pela alegria e descontração no laboratório.

Ao Laboratório Multiusuário do Instituto de Ciências Biológicas da UPE pelo apoio técnico.

A CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Dekkera bruxellensis é uma espécie de levedura encontrada na produção de cerveja, vinhos e em destilarias de etanol combustível. Na maioria desses processos, incluindo a produção de bioetanol, é considerada uma levedura contaminante, pois compete com *Saccharomyces cerevisiae* pelos substratos industriais. Nesse cenário, a disponibilidade de nitrogênio é um dos principais fatores limitantes do crescimento microbiano. Estudos prévios mostraram que *D. bruxellensis* possui a habilidade de assimilar nitrato, uma fonte secundária de nitrogênio, apontada como um importante fator de adaptação desta levedura nestes ambientes. Desta forma, é necessário entender como fatores fisiológicos e genéticos tornam o nitrato um agente capaz de favorecer *D. bruxellensis* no cenário industrial. Com o objetivo descrever a influência da disponibilidade de fontes de nitrogênio na expressão gênica do metabolismo central em condições anaeróbias, foi avaliada a linhagem industrial *D. bruxellensis* GBD248 em três combinações de fontes de nitrogênio em micro-fermentação com anaerobiose controlada. Os resultados mostraram o perfil fisiológico da levedura é diferente nas três condições, mas os valores finais de produção de etanol são similares. Dados de expressão gênica mostraram que mesmo os genes do metabolismo do nitrato são regulados de maneira diferente em anaerobiose. Genes que codificam permeases e do metabolismo central do nitrogênio são principalmente regulados pela disponibilidade de nitrogênio em detrimento ao tipo de fonte. Genes da via glicolítica e fermentativa exibiram um perfil de expressão de acordo com o perfil de consumo de glicose e produção de etanol indicando que *D. bruxellensis* permanece pronta para metabolizar glicose. Genes envolvidos com produção de ATP foram expressos para uma eventual captação de oxigênio. O presente trabalho fornece os primeiros dados metabólicos sobre o comportamento da levedura *D. bruxellensis* cultivada em anaerobiose e em presença de um fator limitante do crescimento celular no cenário industrial.

Palavras-chave: *Dekkera bruxellensis*. fontes de nitrogênio nitrato. cinética de crescimento. expressão gênica.

ABSTRACT

Dekkera bruxellensis is a species of yeast found in brewing, wine and in ethanol fuel distilleries. In most of these processes, including the production of bioethanol, it is considered a contaminating yeast because it competes with *Saccharomyces cerevisiae* by the industrial substrates. In this scenario, the availability of nitrogen is one of the main limiting factors of microbial growth. Previous studies have shown that *D. bruxellensis* possesses the ability to assimilate nitrate, a secondary source of nitrogen, as an important adaptation factor of this yeast in these environments. Thus, it is necessary to understand how physiological and genetic factors make nitrate an agent capable of favoring *D. bruxellensis* in the industrial scenario. In order to describe the influence of the availability of nitrogen sources on the gene expression of the central metabolism under anaerobic conditions, the *D. bruxellensis* GBD248 industrial strain was evaluated in three combinations of nitrogen sources in micro-fermentation with controlled anaerobiosis. The results showed that the physiological profile of the yeast is different in the three conditions, but the final values of ethanol production are similar. Gene expression data showed that even the genes of nitrate metabolism are regulated differently in anaerobiosis. Genes encoding permeases and central nitrogen metabolism are mainly regulated by nitrogen availability rather than source type. Genes from the glycolytic and fermentative pathway exhibited an expression profile according to the glucose consumption profile and ethanol production indicating that *D. bruxellensis* remains ready to metabolize glucose. Genes involved with ATP production were expressed for eventual oxygen uptake. The present work provides the first set of data regarding the metabolism of *D. bruxellensis* in anaerobiosis and in presence of a growth limiting factor in the industrial scenario.

Keywords: *Dekkera bruxellensis*. nitrogen sources. nitrate. growth kinetic. gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Linhagens da espécie <i>Dekkera bruxellensis</i>	17
Figura 2 - Via glicolítica com duas possíveis vias: via fermentativa para produção de etanol ou via oxidativa para produção de acetato e ciclo de Krebs	20
Figura 3 - Efeito “ <i>Crabtree positivo</i> ” de <i>D. bruxellensis</i> Y879	21
Figura 4 - Metabolismo Central do Nitrogênio	23
Figura 5 - Via de assimilação de nitrato pela levedura <i>Dekkera bruxellensis</i>	26
Figura 6 - Equipamento para cultivo em anaerobiose	33
Figura 7 - Curvas de crescimento de <i>D. bruxellensis</i> GDB248 cultivadas em anaerobiose e em presença de glicose e diferentes fontes de nitrogênio	37
Figura 8 - Dados fisiológicos de <i>D. bruxellensis</i> em fontes de nitrogênio em anaerobiose	41
Figura 9 - Quantificação relativa (com respeito ao tempo 0 horas) de mRNA's dos genes envolvidos na via da assimilação do nitrato	44
Figura 10 - Quantificação relativa (com respeito ao tempo 0 horas) de mRNA's dos genes que codificam permeases em três fontes de nitrogênio	46
Figura 11 - Quantificação relativa (com respeito ao tempo 0 horas) de mRNA's dos genes que codificam proteínas do metabolismo central do nitrogênio em três fontes de nitrogênio	48
Figura 12 - Quantificação relativa (com respeito ao tempo 8 horas) de mRNA's do gene que codifica Fosfo fructoquinasa (<i>PFK1</i>) em três fontes de nitrogênio	49
Figura 13 - Quantificação relativa (com respeito ao tempo 8 horas)	

de mRNA's dos genes da via fermentativa em três fontes de nitrogênio	51
Figura 14 - Relação da expressão de genes <i>PDC1</i> , <i>ADH1</i> e <i>ALDs</i> e velocidade de produção de etanol em cultivos de <i>D. bruxellensis</i> em três condições	52
Figura 15 - Quantificação relativa (com respeito ao tempo 8 horas) de mRNA's de dois genes envolvidos na síntese de ATP e na cadeia respiratória mitocondrial em três fontes de nitrogênio	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Fontes de nitrogênio utilizadas e suas respectivas concentrações (g/L e M)	31
Tabela 2 Descrição dos genes alvo e Genbank IDs	35
Tabela 3 Parâmetros fisiológicos de cultivos de <i>D. bruxellensis</i> GDB248 em anaerobiose com amônio, nitrato ou ambas fontes de nitrogênio	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ADH1</i>	Álcool desidrogenase 1
<i>ACT1</i>	Actina
<i>ALD3</i>	Aldeído desidrogenase citoplasmática
<i>ALD5</i>	Aldeído desidrogenase mitocondrial
<i>ATP1</i>	Subunidade alfa do setor de F1 ATP sintase
CO ₂	Dióxido de carbono
cDNA	DNA complementar
<i>GAP1</i>	Permease geral de aminoácidos
<i>GDH1</i>	Glutamato desidrogenase dependente de NAD(P)+
<i>GLT1</i>	Glutamato sintetase (GOGAT) dependete de NAD+
Mb	Megabases
<i>MEP1</i>	Permeasse de amônio (alta afinidade)
mRNA	RNA mensageiro
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NO ₂ ⁻	Íon nitrito
NO ₃ ⁻	Íon nitrato
NH ₄ ⁺	Íon amônio
NIT	Genes da via de assimilação do nitrato

pb	Pares de base
<i>PDC1</i>	Isoenzima piruvato descarboxilase
<i>PFK1</i>	Subunidade alfa da fosfofrutoquinase heterooctamerica
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>PUT4</i>	Permease de Prolina
PCR	PCR quantitativa
QR	Quantificação Relativa
RCN	Repressão Catabólica do Nitrogênio
RPM	Rotações por minuto
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> /Ácido ribonucléico
<i>SDH1</i>	Flavoproteína subunidade de succinato desidrogenase
<i>TEF1</i>	Fator de alongamento translacional EF-1 alfa
μM	Micromolar
μl	Microlitro
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
<i>YNI1</i>	Enzima Nitrito redutase
<i>YNR1</i>	Enzima Nitrato redutase
<i>YNT1</i>	Proteína transportadora de nitrato
$Y_{p/s}$ etanol	Rendimento etanol
$Y_{x/s}$	Rendimento de biomassa
$Y_{p/s}$ CO ₂	CO ₂ estequiométrico

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	16
1.1.1 Aspectos gerais da levedura <i>Dekkera bruxellensis</i>	16
1.1.2 O papel industrial da levedura <i>Dekkera bruxellensis</i>	17
1.1.3 fisiologia de <i>Dekkera bruxellensis</i>	19
1.1.4 Metabolismo central do nitrogênio	22
1.1.5 Metabolismo do nitrato	25
1.1.6 genética de <i>Dekkera bruxellensis</i>	27
1.2 OBJETIVOS	30
1.2.1 Objetivo geral:	30
1.2.2 Objetivos específicos:	30
1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
1.3.1 Linhagens e meios de cultura	31
1.3.2 Ensaios de crescimento anaeróbico com diferentes fontes de N em <i>D. bruxellensis</i>	32
1.3.3 Determinação da produção de metabólitos extracelulares.....	33
1.3.4 Isolamento do RNA e síntese de cDNA.....	34
1.3.5 Ensaios de expressão gênica por PCR em Tempo Real	35
2 RESULTADOS	36
2.1 INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO ANAERÓBIO DE <i>D. BRUXELLENSIS</i>	36
2.2 INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DE INTERESSE INDUSTRIAL EM <i>D. BRUXELLENSIS</i> EM ANAEROBIOSE	38
2.3 INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO CENTRAL DE <i>D. BRUXELLENSIS</i> EM ANAEROBIOSE	42
2.3.1 Expressão dos genes da via de assimilação do nitrato (NIT)	42
2.3.2 Expressão dos genes que codificam permeases de fontes de nitrogênio	44
2.3.3 Expressão dos genes que codificam proteínas do metabolismo central do nitrogênio.....	47
2.3.4 Expressão de genes da via glicolítica e fermentação da glicose.....	48
2.3.5 Expressão de genes envolvidos na produção de ATP e cadeia respiratória mitocondrial	53
3 ANÁLISE DE RESULTADOS	54
3.1 INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO ANAERÓBIO DE <i>D. BRUXELLENSIS</i>	54

3.2 INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DE INTERESSE INDUSTRIAL EM <i>D. BRUXELLENSIS</i> EM ANAEROBIOSE	55
3.2.1 Influência da fonte de nitrogênio na expressão de genes da via de assimilação do nitrato (NIT).....	57
3.2.2 Influência da fonte de nitrogênio na expressão de genes que codificam permeases de fontes de nitrogênio	59
3.2.3 Influência da fonte de nitrogênio na expressão dos genes que codificam proteínas do metabolismo central do nitrogênio	61
3.2.4 Influência da fonte de nitrogênio na expressão de genes da via glicolítica e fermentação da glicose	63
3.2.5 Influência da fonte de nitrogênio na expressão de genes envolvidos na produção de ATP e cadeia respiratória mitocondrial.....	65
4 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

A levedura *Dekkera bruxellensis* é um micro-organismo frequentemente encontrado em processos de fermentação alcoólica industrial, principalmente na produção de bebidas alcoólicas e em destilarias de etanol combustível. Na produção de bioetanol, *D. bruxellensis* é considerada uma levedura contaminante, competindo com *Saccharomyces cerevisiae* pelos substratos industriais. Apesar disso, *D. bruxellensis* apresenta potencial de uso industrial, uma vez que produz etanol, mesmo que em menor rendimento e produtividade, em comparação com *S. cerevisiae*. Uma vez que estratégias de eliminação de *D. bruxellensis* são complexas, aproveitar o seu potencial de produção de etanol, em detrimento à sua eliminação do processo é uma estratégia que deve ser melhor explorada. Para isso, é fundamental entender o funcionamento de mecanismos regulatórios e os respectivos aspectos genéticos envolvidos, que podem contribuir para o sucesso adaptativo desta levedura no cenário industrial.

Nesse contexto, o nitrato, uma fonte secundária de nitrogênio, já foi apontada como um importante fator de adaptação para *D. bruxellensis* nesses substratos. Entretanto, é necessário entender quais fatores genéticos tornam o nitrato um agente capaz de favorecer *D. bruxellensis* na competição com *S. cerevisiae*. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo determinar a influência da disponibilidade de fontes de nitrogênio, incluindo o nitrato, no metabolismo de *D. bruxellensis* cultivada em condições de anaerobiose. Para isso, realizamos estudos fisiológicos e genéticos com intuito de avaliar o comportamento celular frente à ausência de oxigênio, característica do ambiente industrial, e diferentes combinações de fontes de nitrogênio. Os resultados gerados no presente trabalho devem complementar dados previamente produzidos pelo grupo, levando a uma melhor compreensão da influência desse nutriente no metabolismo fermentativo dessa levedura.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

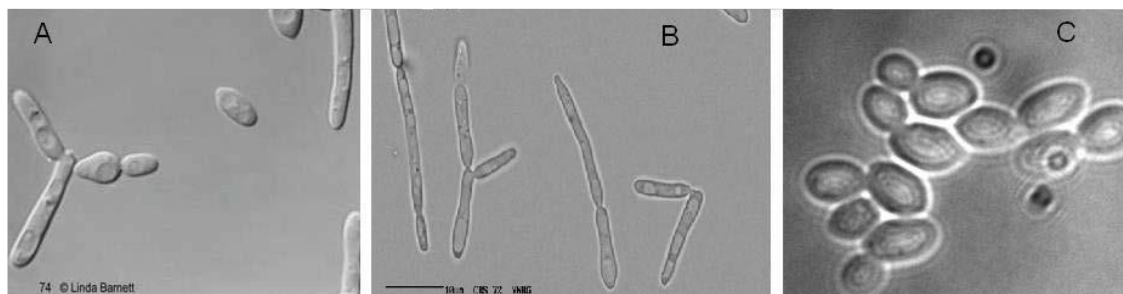
1.1.1 Aspectos gerais da levedura *Dekkera bruxellensis*

A levedura *D. bruxellensis* é considerada um parente distante de *S. cerevisiae*, com ambas as espécies pertencendo à família Saccharomycetacea (MOLINA et al., 1993). Sua primeira identificação ocorreu no começo do século passado (CLAUSSEN, 1904), quando foi isolada de cervejas britânicas, sendo então chamada de *Brettanomyces* (grego: “*brettano*” significa cervejaria britânica, “*myces*”: fungo). Em 1960, o gênero *Brettanomyces* foi reposicionado no gênero *Dekkera*, uma vez relatada a formação de ascósporos (VAN DER WALT & VAN KERKEN, 1960). O nome *Dekkera* foi escolhido em homenagem a Nellie Margaretha Stelling-Dekker, por sua contribuição a taxonomia de leveduras (VAN DER WALT, 1964). Curiosamente, os dois gêneros ainda são utilizados de maneira intercambiável. Além da *D. bruxellensis*, apenas 4 espécies foram reconhecidas até o presente, sendo elas (i) *D. anomala*, (ii) *B. custersianus*, (iii) *B. nanus* e (iv) *B. naardenensis* (MITRAKUL et al., 1999; RODER et al., 2007).

Após o seu isolamento em cervejarias britânicas, *D. bruxellensis* já foi identificada em vários outros processos fermentativos, como na produção de vinho, cidra, kombucha, quefir, etc (CRAUWELS et al., 2015). No Brasil, esta levedura vem sendo consistentemente associada a episódios de contaminação da produção de bioetanol (DE SOUZA LIBERAL et al., BASÍLIO et al., 2007; DE BARROS PITA et al., 2011).

D. bruxellensis apresenta uma morfologia diversa (Figura 1), encontrando-se frequentemente na forma ogival ou ainda elipsoidal, esférica, cilíndrica e alongada (VAN DER WALT, 1964). Com relação às suas características metabólicas, *D. bruxellensis* possui anaerobiose facultativa, é *petite* positiva (capaz de sobreviver sem DNA mitocondrial) e *Crabtree* positiva, ou seja, apresenta metabolismo fermentativo quando altas concentrações de glicose estão presentes no meio mesmo em condições aeróbicas (PISKUR et al., 2006; WOOLFIT et al., 2007; DE BARROS PITA et al., 2013).

Figura 1. Linhagens da espécie *Dekkera bruxellensis*. (A) CBS 74; (B) CBS 2499; (C) GDB 248 (industrial) em meio YPD (Microscopia de contraste de fase).



Fonte: Leite (2012).

Assim como *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* apresenta crescimento em altas concentrações de etanol, valores de pH elevados e fontes de nitrogênio secundárias (ROZPEDOWSKA et al., 2011). Além disso, é capaz de metabolizar diferentes fontes de carbono dentre as quais glicose, frutose, sacarose e etanol são importantes no cenário industrial (CONTERNO et al., 2006). As principais fontes de nitrogênio utilizadas por *D. bruxellensis* são comuns à outras leveduras, com a assimilação preferencial de íons amônio (MAGASANIK, 2002). Entretanto, outras fontes de nitrogênio podem ser utilizadas, tais como aminoácidos e ureia (CONTERNO et al., 2006). Notavelmente, *D. bruxellensis* é capaz de utilizar nitrato como fonte de nitrogênio, uma vez que esta espécie possui em seu genoma os genes que codificam as proteínas da via de assimilação deste composto nitrogenado (WOOLFIT et al., 2007; PISKUR et al., 2012).

1.1.2 O papel industrial da levedura *Dekkera bruxellensis*

A levedura *D. bruxellensis* é frequentemente apontada como micro-organismo contaminante de processos fermentativos industriais. Este papel foi atribuído principalmente pela sua participação na produção de vinho, uma vez que é capaz de produzir compostos voláteis como o ácido acético, bem como etilfenóis, como 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol (CHATONNET et al., 1995; 1997). A produção destes

últimos compostos é bastante particular da espécie, sendo associada aos aromas desagradáveis encontrados em vinhos contaminados, e que recebem genericamente o nome de característica “*brett*”, levando a grandes perdas econômicas para os produtores (CHATONNET et al., 1995; 1997). Além dos aromas desagradáveis nos vinhos, o aumento na produção de ácido acético inibe o crescimento de *S. cerevisiae* (LEMA et al., 1996).

Apesar de ser conhecida mundialmente como contaminante de vinhos, *D. bruxellensis* também foi identificada como principal contaminante da produção de bioetanol no Nordeste do Brasil (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; BASÍLIO et al., 2007). Nesse cenário, quando as contagens celulares de *D. bruxellensis* estão aumentadas, observa-se uma diminuição da produtividade volumétrica do etanol, acompanhada de significativo prejuízo econômico (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007). É importante salientar que os papéis desempenhados por esta levedura nos dois processos fermentativos são diferentes. Na indústria vinícola, *D. bruxellensis* produz compostos voláteis que conferem odor desagradável ao vinho, enquanto que na produção de etanol combustível, a contaminação ocorre por competição pelo substrato, os açúcares presentes no caldo-de-cana, com *S. cerevisiae* (CHATONNET et al., 1995; 1997; DE SOUZA LIBERAL et al., 2007).

Embora esta levedura seja considerada contaminante, vários trabalhos já apresentaram sua capacidade de produção de etanol em rendimentos muito semelhantes àqueles alcançados por *S. cerevisiae* (BLOMQVIST et al. 2010; ROZPEDOWSKA et al., 2011). O grande problema observado é a sua reduzida produtividade que decorre da assimilação mais lenta dos açúcares, o que resulta em baixas produtividades volumétricas e atrasos na produção e no rendimento diário do processo (BASÍLIO et al., 2008; LEITE et al., 2012; Pereira et al., 2012). Ainda, *D. bruxellensis* é utilizada na produção de cervejas belgas do tipo Lambic, conhecidas pelo alto teor de ácido acético (GALAFASSI et al., 2013).

Apesar da sua importância industrial, vários aspectos do metabolismo de *D. bruxellensis* ainda não foram elucidados e a aquisição de dados fisiológicos e genéticos sobre esta levedura pode ajudar na compreensão dos motivos pelos quais ocorre o seu estabelecimento e a sua manutenção no ambiente industrial (CRAUWELS et al., 2015). Ainda nesse sentido, a maior parte dos trabalhos já

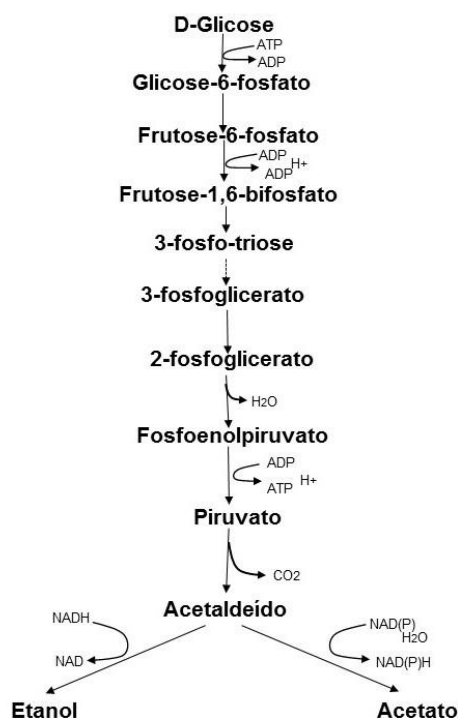
publicados concentra-se na identificação desta espécie como levedura contaminante e sua relação filogenética com outras espécies do grupo dos ascomicetos (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007).

1.1.3 fisiologia de *Dekkera bruxellensis*

D. bruxellensis é uma levedura com grande variabilidade genética e fisiológica. Estudos recentes têm sugerido uma correlação entre diferenças metabólicas e suas fontes de isolamento, no que se refere à assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (CRAUWELS et al., 2015). Com relação às fontes de carbono, esta levedura apresenta preferência pela assimilação de glicose, frutose e sacarose, açúcares capazes de apoiar altas taxas de crescimento. Essas fontes apresentam relevância industrial por fazerem parte da composição de substratos, como o caldo-de-cana e o melaço (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007). Além disso, *D. bruxellensis* também é capaz de utilizar galactose, maltose, celobiose e trealose (CONTERNO et al., 2006). Linhagens com potencial de serem empregadas na produção de etanol de segunda geração apresentam habilidade de assimilar celobiose, mas não xilose e arabinose (GALAFASSI et al., 2011).

O metabolismo do carbono em *D. bruxellensis* consiste primariamente na assimilação de açúcares, que como a glicose, são divididos em moléculas menores para se tornar uma fonte de energia e/ou síntese de outras moléculas. A glicólise é o principal processo de degradação do açúcar, na qual uma molécula de glicose é sequencialmente oxidada em duas moléculas de piruvato. Dependendo da condição de crescimento, as leveduras podem direcionar o piruvato para fermentação ou para a respiração (SCHIFFERDECKER et al., 2014).

Figura 2. Via glicolítica com duas possíveis vias: via fermentativa para produção de etanol ou via oxidativa para produção de acetato e ciclo de Krebs.



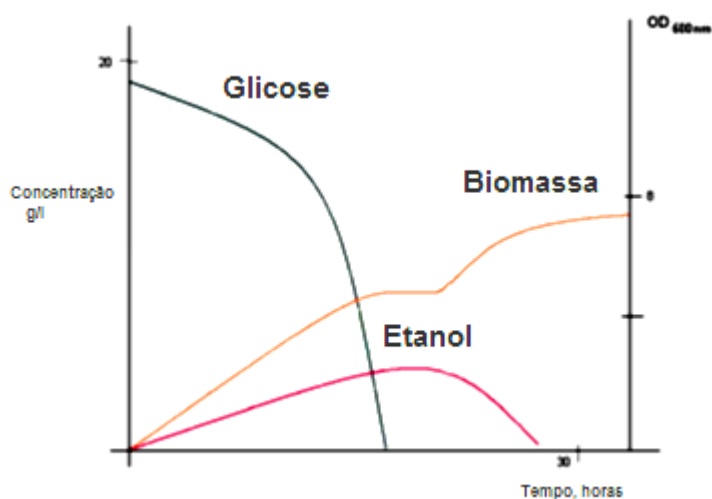
Fonte: Adaptado de Magasanik B & Kaiser CA (2002).

Uma vez que a respiração de açúcares é energeticamente mais favorável do que a fermentação, a maioria dos organismos utiliza a fermentação apenas quando a respiração é prejudicada, por exemplo, quando a disponibilidade de oxigênio diminui. Em outras espécies de leveduras, como *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae*, o destino metabólico do piruvato formado em taxas altas passa da respiração para a fermentação, mesmo quando o oxigênio é abundante (ROZPEDOWSKA et al., 2011).

A habilidade de fermentar, mesmo na presença de oxigênio, é chamada de efeito *Crabtree* (Figura 3), e teve como base a aquisição de diversas características genéticas que resultaram em uma estratégia evolutiva denominada “*make-accumulate-consume*” (“fazer-acumular-consumir”), na qual as leveduras possuem (i) grande capacidade de assimilação de açúcares, (ii) elevada taxa de produção, (iii) alta capacidade de acúmulo e tolerância ao etanol, (iv) bem como seu posterior consumo (ROZPEDOWSKA et al., 2011). O resultado fisiológico da aquisição desta

estratégia (Efeito *Crabtree*) é o favorecimento da fermentação em detrimento da respiração, sendo esse efeito frequentemente associado à saturação da capacidade celular em re-oxidar o NADH resultante da glicólise (PROCHÁZKA *et al.*, 2010; ROZPEDOWSKA *et al.*, 2011). Essa saturação faz com que o piruvato seja direcionado ao metabolismo fermentativo, possibilitando que o NADH seja re-oxidado via fermentação alcoólica. Apesar de a respiração apresentar maior eficiência energética, a estratégia “*make-accumulate-consume*” é vantajosa, pois proporciona um melhor desempenho competitivo frente a outras espécies (ROZPEDOWSKA *et al.*, 2011).

Figura 3. Efeito “*Crabtree positivo*” de *D. bruxellensis* Y879 (CBS 2499) em condições aeróbias.



Fonte: Adaptado de Rozpedowska *et al.* (2011)

Como mencionado acima, durante o crescimento aeróbio, as células de levedura podem produzir energia na forma de ATP tanto pelo direcionamento do piruvato para a cadeia respiratória, na mitocôndria, quanto pela via fermentativa (ROZPEDOWSKA *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2012). A preferência por um ou outro mecanismo depende, entre outros aspectos, da espécie e das condições nutricionais do meio, sendo que nesses casos, em geral, a produção de energia não é um fator limitante do crescimento celular (CURTIN *et al.*, 2014). Por outro lado, na ausência de oxigênio, um dos principais problemas enfrentados pelas leveduras é o baixo crescimento, devido à ausência de aceptores finais de elétrons na cadeia

respiratória (WEUSTHUIS et al., 1994; CURTIN et al., 2014). Nesse cenário, a produção de ATP é restrita à glicólise. Por sua vez, a glicólise utiliza o cofator NAD^+ para a oxidação de intermediários da via, gerando NADH (a forma reduzida do cofator), que deve ser posteriormente reoxidado (MAGASANIK B & KAISER CA, 2002). Na ausência de oxigênio, a fermentação é a principal via utilizada pelas leveduras para restaurar o balanço redox (SCHIFFERDECKER et al, 2014). Devido à menor eficiência energética da fermentação, o crescimento em anaerobiose é geralmente menor quando comparado à aerobiose (ESTELA-ESCALANTE et al., 2014).

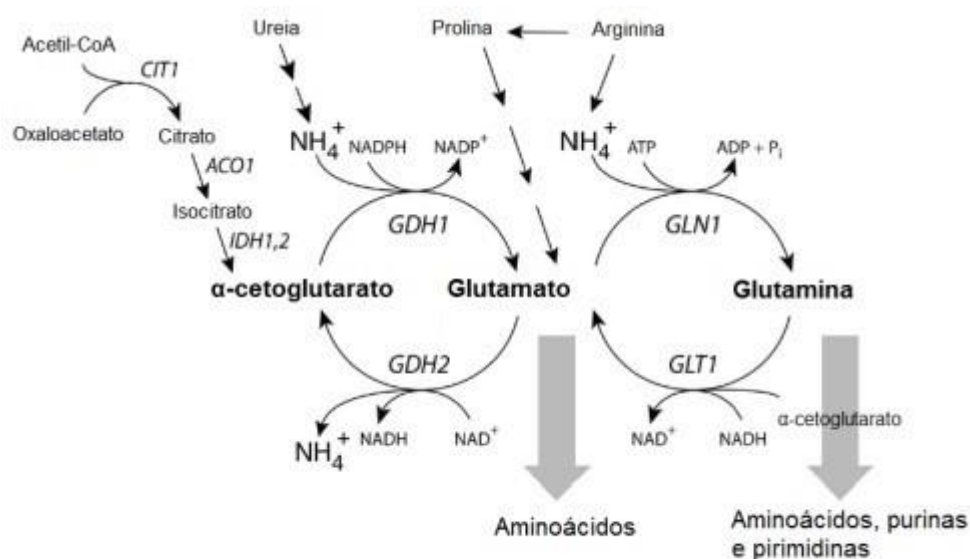
Outra característica fisiológica marcante de *D. bruxellensis* é o chamado efeito *Custers*, no qual ocorre a inibição temporária da fermentação alcoólica, como resultado da ausência de oxigênio (CUSTERS, 1940; WIJSMAN et al., 1984). Este efeito é ocasionado pela tendência das células de *D. bruxellensis* em produzir acetato, além da baixa capacidade de produção de glicerol, uma forma alternativa de restaurar o balanço redox celular (SCHEFFERS, 1966; WIJSMAN et al., 1984; DE BARROS PITA et al, 2013b). A escassez de NAD^+ causada pelo seu uso na oxidação do acetaldeído a acetato e consequente diminuição da razão NAD^+/NADH , resulta em diminuição do fluxo glicolítico.

1.1.4 Metabolismo central do nitrogênio

O nitrogênio é um nutriente vital para todos os organismos, podendo estar disponível no ambiente para ser assimilado em diferentes formas. A maioria das leveduras possui a habilidade de assimilar uma grande quantidade de fontes de nitrogênio, o que torna amplo o espectro de ambientes capazes de suportar o crescimento destes organismos (SIVERIO, 2002). Os compostos nitrogenados são transportados para dentro da célula geralmente através de proteínas transmembrana, como as permeases codificadas pelos genes *GAP1*, *MEP1* e *PUT4* (DE BARROS PITA et al, 2013b; MARINI et al., 2000; MAGASANIK & KAISER, 2002; CAIN & KAISER, 2011). Uma vez dentro da célula, são assimilados e direcionados para reações de biossíntese ou catabolizadas para a liberação de nitrogênio na forma de amônio intracelular e assim para a produção de glutamato e

posteriormente glutamina (MAGASANIK, 2002). Estes dois aminoácidos servem como doadores de nitrogênio para todos os outros compostos nitrogenados da célula e, juntamente com a amônia, formam a via do Metabolismo Central do Nitrogênio (Figura 4) (DE BARROS PITA et al., 2013b; MAGASANIK & KAISER, 2002, MAGSANIK, 2003).

Figura 4. Metabolismo Central do Nitrogênio. Os compostos nitrogenados são sintetizados a partir de glutamato ou glutamina. A principal via para a síntese de glutamato é através da combinação de amônia com o α -cetoglutarato, que é sintetizado a partir de acetil-CoA nos passos iniciais do ciclo do ácido cítrico. A glutamina é produzida pela combinação da amônia com glutamato.



Fonte: Adaptado de Barros Pita et al. (2013a).

Em *S. cerevisiae*, a síntese de glutamato ocorre pela ação da enzima glutamato desidrogenase dependente de NADP^+ , produto do gene *GDH1* (NADP-GDH , EC 1.4.1.4) através da combinação do íon amônio com o α -cetoglutarato (MAGASANIK & KAISER, 2002). Em seguida, o glutamato pode ser convertido a glutamina pela incorporação de outro íon amônio, pela glutamina sintetase produzida pelo gene *GLN1*. A única forma de sintetizar glutamina é mediante a glutamina sintetase e células que carecem desta enzima necessitam glutamina para crescer (SCHIFFERDECKER et al., 2014). No entanto, a perda de *GDH1* que codifica para glutamato desidrogenase somente reduz a taxa de crescimento em amônia

(MAGASANIK & KAISER, 2002; MAGASANIK, 2003). A habilidade de mutantes *gdh1* crescerem em amônia é devida a existência da enzima glutamato sintase (GOGAT, EC 1.4.1.14), produto do gene *GLT1* (MILLER & MAGASANIK, 1990; MAGASANIK & KAISER, 2002).

As leveduras podem assimilar uma ampla variedade de compostos nitrogenados classificados como fontes “preferenciais” ou “primárias” e “não-preferenciais” ou “secundárias” de acordo as diferentes taxas de crescimentos proporcionadas por estas fontes ao serem assimiladas (DE BARROS PITA et al., 2013b; MAGASANIK & KAISER, 2002). Compostos nitrogenados prontamente utilizáveis proporcionam taxas mais de crescimento mais altas do que fontes que necessitam de reações adicionais para serem assimiladas (CONTERNO et al., 2006; GODARD et al., 2007). No caso de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, as fontes preferenciais de nitrogênio incluem amônio, glutamato, glutamina e asparagina, enquanto leucina, prolina e metionina são fontes não-preferenciais (TER SCHURE, 1998; MAGASANIK & KAISER, 2002; MAGASANIK, 2003; BOER et al., 2007). Em geral, fontes inorgânicas de nitrogênio, tais como nitrato e nitrito, são classificadas como fontes secundárias e cuja capacidade de assimilação é restrita a algumas poucas espécies (SIVERIO, 2002). Desta forma, essas fontes são utilizadas apenas quando fontes preferenciais não estão disponíveis, a partir da expressão genes codificantes de proteínas envolvidas na sua assimilação (DE BARROS PITA et al., 2013b MAGASANIK & KAISER, 2002).

Em leveduras, o crescimento é frequentemente limitado pela disponibilidade de fontes primarias de nitrogênio (ATTFIELD, 1997; PRETORIUS, 2000). Para se adaptar as várias condições ambientais, as leveduras desenvolveram um complexo sistema regulatório do metabolismo do nitrogênio, capaz de garantir o uso da “melhor” fonte de nitrogênio disponível. Esta regulação, obtida primariamente por controle transcricional, é conhecida como Repressão pelo Catabólito do Nitrogênio (RCN) e consiste na indução de genes necessários e na repressão de genes dispensáveis em determinado momento (COOPER, 2002; MAGASANIK & KAISER, 2002). Este mecanismo é responsável por impedir ou reduzir a capacidade sintética das células para a formação de enzimas e permeases para a utilização de fontes secundárias, quando uma fonte preferencial está disponível (MARZLUF, 1997;

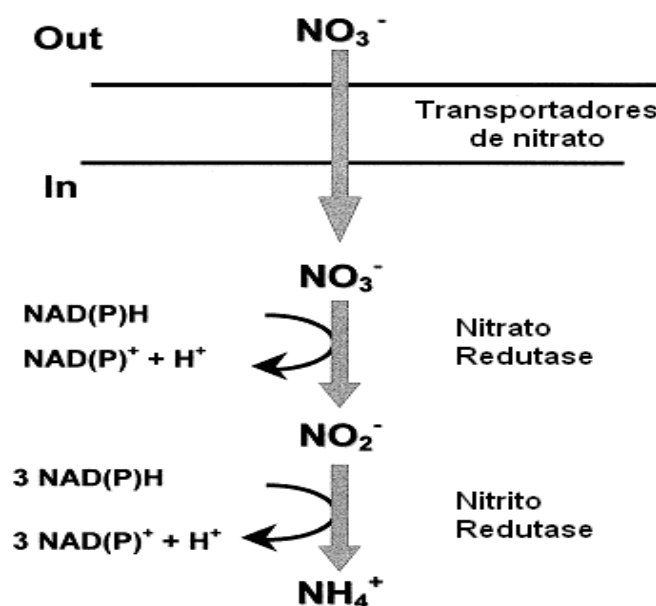
MAGASANIK & KAISER, 2002). No que se refere ao metabolismo central é fundamental o entendimento da regulação das vias de assimilação de nitrogênio, já que a disponibilidade deste nutriente influencia diversos aspectos do crescimento celular e da fermentação alcoólica.

1.1.5 Metabolismo do nitrato

Apesar de ser bem documentado em fungos filamentosos, o metabolismo do nitrato ainda é pouco estudado em leveduras (MARZLUF, 1997; SIVERIO, 2002). Um dos motivos que justificam esse fato é a ausência da via de assimilação deste composto nitrogenado em *S. cerevisiae*. Desta forma, os primeiros estudos moleculares sobre a assimilação do nitrato em leveduras foram conduzidos por ÁVILA et al., (1995) em *Hansenula polymorpha*, com a clonagem do gene de *YNR1*, codificante da enzima nitrato redutase. Posteriormente, com o sequenciamento do genoma de *D. bruxellensis*, a identificação dos cinco genes que compõem a via de assimilação de nitrato deu início aos estudos sobre o metabolismo deste composto nesta levedura (WOOLFIT et al., 2007).

O processo de assimilação do nitrato (Figura 5) ocorre pela entrada do ânion NO_3^- por meio do transportador de alta afinidade codificado pelo gene *YNT1*. Uma vez dentro das células, esse ânion é convertido em amônia por duas reações de redução consecutivas catalisadas pelas enzimas nitrato redutase (que converte NO_3^- a NO_2^-) codificada pelo gene *YNR1* e nitrito redutase (que converte NO_2^- a NH_4^+) codificada pelo gene *YNI1* (ÁVILA et al., 1995). Em *Hansenula polymorpha*, estes genes estão localizados em um cluster gênico e apresentam co-regulação induzida por nitrato (Figura 4).

Figura 5. Via de assimilação de nitrato pela levedura *Dekkera bruxellensis*.



Fonte: Adaptado de Siverio (2002).

Em *D. bruxellensis*, apesar de os genes estruturais também estarem dispostos em um cluster, pouco é conhecido acerca da regulação da expressão destes genes (CURTIN et al., 2014). Além dos genes estruturais (*YNR1*, *YNI1* e *YNT1*), *H. polymorpha* e *D. bruxellensis* possuem outros dois genes, *YNA1* e *YNA2*, que codificam fatores de transcrição do tipo $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ (ÁVILA ET AL., 1998; ÁVILA ET AL., 2002; WOOLFIT ET AL., 2007) e que estão relacionados com a regulação da expressão dos genes estruturais.

Em 2011, nosso grupo de pesquisa mostrou que a linhagem GDB248 da levedura *D. bruxellensis* era capaz de assimilar e metabolizar nitrato pela presença desse cluster gênico intacto, e que essa metabolização era concomitante à assimilação de amônia (DE BARROS PITA et al., 2011). A partir daí foi formulada a hipótese de que a capacidade de assimilar nitrato, ausente na levedura *S. cerevisiae*, conferiria uma vantagem seletiva a *D. bruxellensis* no processo industrial de produção de etanol a partir de caldo de cana que poderia explicar os episódios de crescimento da população deste contaminante no processo industrial (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007). De BARROS PITA et al., (2013a) mostraram que a co-

assimilação amônio-nitrato promovia o aumento da produção de etanol, provavelmente pela diminuição do chamado efeito *Custer*, fato que foi corroborado posteriormente (DE BARROS PITA et al., 2011; GALAFASSI et al., 2013). Dados fisiológicos e de expressão gênica mostraram que a assimilação de nitrato como única fonte de nitrogênio induz em *D. bruxellensis* o metabolismo respiratório (DE BARROS PITA et al 2013a; DE BARROS PITA et al., 2013b). Esses dados foram corroborados por análises proteômicas que mostraram a produção de proteínas do metabolismo oxidativo nos cultivos em nitrato (BARBOSA-NETO et al., 2014). Em conjunto, esses dados apontam para o nitrato como um importante fator que influencia o metabolismo energético de uma levedura intimamente associada com a fermentação alcoólica industrial.

1.1.6 genética de *Dekkera bruxellensis*

D. bruxellensis é uma levedura que possui uma grande diversidade genética. Os primeiros estudos moleculares foram conduzidos em 2007, ano em que um sequenciamento parcial do seu genoma foi publicado (WOOLFIT et al., 2007). Posteriormente, outros estudos foram realizados, visando principalmente a sua caracterização cromossômica, bem como análises de expressão gênica (HELLBORG & PISKUR, 2009; DE BARROS PITA et al., 2011). Com a utilização de técnicas clássicas de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado e *DNA fingerprinting*, diversos estudos reportaram uma alta variabilidade genética entre linhagens de *D. bruxellensis*, nos quais foi sugerida uma correlação entre grupos genotípicos de *D. bruxellensis* e seu meio de isolamento (CONTENDO et al., 2006; CRAUWELS et al., 2015).

As diversas linhagens estudadas de *D. bruxellensis* apresentam genoma poliploide, contendo entre quatro e nove cromossomos (HELLBORG & PISKUR, 2009). Além das diferenças de ploidia, em geral, aberrações cromossômicas como aneuploidia, inserções entre linhagens específicas, deleções e perda de heterozigotidade por conversão gênica têm sido descritas (CRAUWELS et al., 2014). Após o sequenciamento completo do seu genoma, em 2012, diversos aspectos genéticos de *D. bruxellensis* foram revelados. Curiosamente, duas

linhagens desta levedura (CBS2499 e AWRI1499) foram sequenciadas em paralelo e confirmaram a sua alta variabilidade intra-específica (PISKUR et al., 2012; CURTIN et al., 2012). A linhagem de *D. bruxellensis* AWRI1499 isolada de vinícolas australianas, possui genoma triploide com aproximadamente 5000 genes e 12,7 Mb de tamanho e provavelmente surgiu a partir de uma hibridização de duas espécies proximamente relacionadas possuindo consequentemente um genoma triploide (CURTIN et al., 2012). O genoma dessa linhagem é constituído de um “núcleo diploide”, com dois conjuntos cromossômicos heterozigotos e um terceiro conjunto haploide divergente (CURTIN et al., 2012). A outra linhagem, CBS2499, apresenta genoma com 13,4 Mb de tamanho e aproximadamente 5600 genes (PISKUR et al., 2012).

D. bruxellensis é um parente distante de *S. cerevisiae* e ambas são encontradas frequentemente nos mesmos habitats e compartilham várias características fisiológicas relacionadas com nutrição, produção de níveis elevados de etanol e capacidade de crescer sem oxigênio (PISKUR et al., 2012). Apesar das semelhanças, a partir do sequenciamento do genoma de *D. bruxellensis*, ao contrário do que se acreditava, foi relatado que *D. bruxellensis* é filogeneticamente mais próxima a *Pichia (Komagataella) pastoris*, uma levedura conhecida pela baixa produção de etanol em aerobiose (PISKUR et al., 2012). Ainda, *D. bruxellensis* não possui em seu genoma as principais características genéticas associadas ao alto desempenho fermentativo de *S. cerevisiae*. Por exemplo, três eventos cruciais que ocorreram durante o curso evolutivo de *S. cerevisiae*, (i) a duplicação total do genoma, seguida de (ii) perda massiva de blocos gênicos e enriquecimento de genes ADH e (iii) a transferência horizontal do gene *URA1*, responsável pela síntese *de novo* de pirimidinas em anaerobiose, não foram detectados em *D. bruxellensis* (PISKUR & LANGKJAER, 2004; PISKUR et al., 2006).

Apesar de um evento de duplicação total do genoma não ter sido encontrado em *D. bruxellensis*, em comparação com espécies próximas, essa levedura possui enriquecimento de genes que podem aumentar a sobrevivência no ambiente de fermentação, tais como genes codificantes de permeases de aminoácidos, além de álcool e aldeído desidrogenases (CURTIN et al., 2012; PISKUR et al., 2012). Ambas as linhagens sequenciadas possuem, por exemplo, genes ADH (álcool

desidrogenase) duplicados de forma independente, que são responsáveis pelo metabolismo de álcoois, incluindo etanol, e também uma gama de compostos aromáticos (PISKUR et al., 2012). O fato de o nível de segmentos duplicados no genoma de *D. bruxellensis* estar dentro do esperado para espécies que não sofreram eventos de duplicação do pode justificar a mais baixa capacidade fermentativa, em comparação com *S. cerevisiae* (DE BARROS PITA et al., 2013; ROZPEDOWSKA et al., 2011).

Análises recentes com ferramentas de bioinformática têm colocado a *D. bruxellensis* como membro de um grupo evolutivo “intermediário” compreendido por espécies como *Komagetalla pastoris*, *Kuraishia capsulata* e *Ogataea polymorpha* que parece ter divergido de um clado progenitor contendo um ancestral comum com *S. cerevisiae* (CURTIN & PRETORIUS 2014). Dados genômicos inferem outras adaptações próprias de *D. bruxellensis* não compartilhadas com *S. cerevisiae*. A expansão de genes chaves relacionados a *S. cerevisiae* ocorreram em ORFs que codificam proteínas de membrana celular envolvidas com o crescimento de pseudo-hifas e amino-permeases (CURTIN & PRETORIUS 2014). Este último é significativo porque a habilidade de algumas linhagens de utilizar nitrato como fonte de nitrogênio (BORNEMAN et al., 2014) junto com a eficiente assimilação de aminoácidos exógenos podem facilitar crescimento *B. bruxellensis* no vinho, apesar do esgotamento de fontes de nitrogênio favoráveis para *S. cerevisiae* (CURTIN & PRETORIUS 2014).

Estudos de expressão genica de *D. bruxellensis* vem sendo conduzidos em diferentes grupos de pesquisa do mundo, no intuito de verificar as capacidades metabólicas de *D. bruxellensis* em resposta à diferentes condições, com foco em seus traços nutricionais, resposta a estresse, entre outros (NARDI et al., 2011; DE BARROS PITA et al., 2011; DE BARROS PITA et al., 2013a,b). Por exemplo, a resposta a estresse e adaptação de *D. bruxellensis* ao ambiente de produção de vinho são devidas a mecanismos únicos para esta levedura (NARDI et al., 2011). Ainda, outros trabalhos de expressão gênica de *D. bruxellensis* identificaram dois genes *ARO10*, codificantes da enzima fenilpiruvato descarboxilase no genoma da levedura, uma característica única entre os hemiascomicetos (DE SOUZA LIBERAL et al., 2012; DE BARROS PITA et al., 2013).

Um estudo de transcriptômica global por RNA-Seq revelou a expressão do complexo respiratório I de NADH-ubiquinona embora *D. bruxellensis* seja uma levedura *Crabtree positiva*. A alta expressão de enzimas geradoras de NADH comparado como a geração de enzimas NAD⁺ pode ser a razão para o desequilíbrio NADH anteriormente observado e o resultante *efeito Custer* em *D. bruxellensis* (TIUKOVA et al., 2013). Também foi achado que o alto grau de expressão de genes transportadores de açúcar é consistente com a hipótese de que a competitividade de *D. bruxellensis* é devido a uma maior afinidade para o substrato limitante (TIUKOVA et al., 2013).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral:

Investigar a influência de fontes de nitrogênio no metabolismo central da levedura *Dekkera bruxellensis* em condições anaeróbias.

1.2.2 Objetivos específicos:

- a) determinar a influência da fonte de nitrogênio nos principais parâmetros fisiológicos de *D. bruxellensis* cultivada em anaerobiose;
- b) determinar a influência da fonte de nitrogênio no perfil de expressão de genes de vias metabólicas centrais de *D. bruxellensis* em condições anaeróbias.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 Linhagens e meios de cultura

A linhagem da levedura utilizada neste trabalho foi *D. bruxellensis* GDB 248 isolada do processo industrial (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007). Para os cultivos celulares, foram realizados pré-inóculos usando o meio sintético YNB (*Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate*) suplementado com glicose a 110 mM e com sulfato de amônio a 38 mM (75 mM final de nitrogênio), como fonte de nitrogênio. Durante os pré-inóculos, as células foram cultivadas em frascos de vidro de 125 mL, com 50 mL de volume final, em agitação constante de 150 rpm em agitador orbital durante 48 horas a 30 °C.

Com intuito de avaliar a influência da fonte de nitrogênio no crescimento e metabolismo da levedura cultivada em anaerobiose, células de *D. bruxellensis* com concentração de 10^7 células x mL (DO = 1), foram inoculadas em meios específicos (YNB), contendo glicose como fonte de carbono a 110 mM e uma de três possíveis combinações de fontes de nitrogênio (Tabela 1). Aos meios específicos foram adicionados (i) sulfato de amônio, (ii) nitrato de sódio ou (iii) uma mistura contendo ambas as fontes. Em todos os meios, a concentração final de nitrogênio foi de 75 mM. Adicionalmente, para garantir o crescimento celular em anaerobiose, os meios foram suplementados com Tween 80 e ergosterol (BLOMQVIST et al., 2012).

Tabela 1. Fontes de nitrogênio utilizadas, suas respectivas concentrações (g/L e M). As quantidades de cada fonte foram calculadas de modo que todos os meios apresentassem concentrações equimolares de nitrogênio.

Fonte de N	Composto	g/L	[] mM	[] mM de N
Amônio	Sulfato de Amônio	5	37,8	75,6
Nitrato	Nitrato de Sódio	6,43	75,6	75,6
Ambas as fontes	Sulfato de Amônio	2,5	37,8	37,8
	Nitrato de Sódio	3,21	37,8	37,8

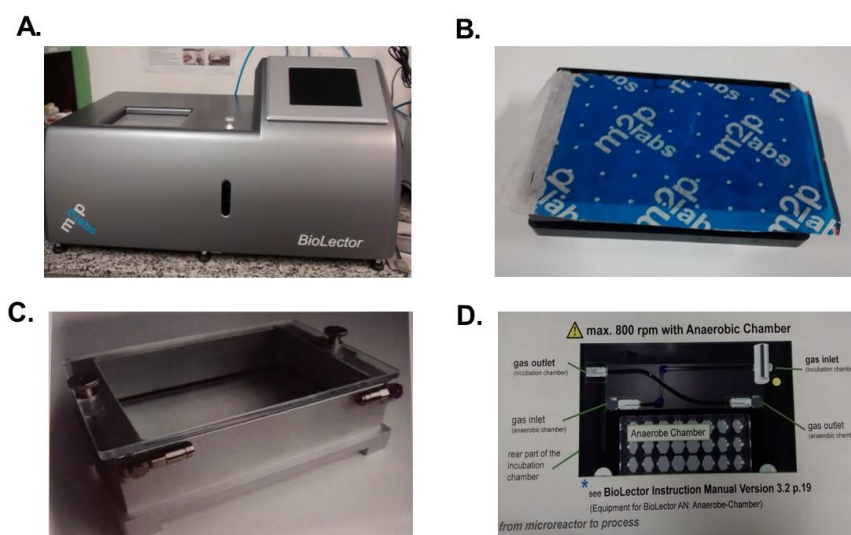
Fonte: Adaptado de Barros Pita et al. (2013a).

1.3.2 Ensaios de crescimento anaeróbico com diferentes fontes de N em *D.*

bruxellensis

Com o objetivo de realizar uma triagem inicial da influência da fonte de nitrogênio no metabolismo anaeróbico de *D. bruxellensis*, os ensaios de crescimento foram acompanhados por um período de 70h. Com este ensaio, foi possível determinar os períodos referentes aos diferentes estágios do crescimento, que refletem os diferentes estados metabólicos das células. Desta forma, a partir do pré-inóculo, as células foram coletadas e centrifugadas a 4000 rpm em tubos cônicos estéreis de 15 ml durante 5 min e posteriormente resuspendidas em solução salina NaCl 85%. Os inóculos foram realizados nos meios específicos descritos na Tabela 1 e ajustados para uma densidade celular inicial igual a 0,1 DO_{600nm} em um volume final de 1500 µL. Subsequentemente, os meios inoculados foram transferidos para placas (contendo 48 poços) do microfermentador Biolector (Micro Fermentation System Biolector AN, M2p Labs) (Figura 6A). Para cada meio específico, foram utilizados 7 poços como réplicas técnicas e um poço como controle interno (Figura 6B). O crescimento celular foi realizado em duplicatas biológicas com agitação de 800 rpm, a 30 °C e a leitura da DO obtida a cada intervalo de 30 minutos. O controle do crescimento anaeróbico foi mantido com o uso do kit de anaerobiose que faz parte do microfermentador Biolector e que contém uma câmara conectada a uma fonte de nitrogênio gasoso (Figura 6 C e D) com quantidade O₂ presente no nitrogênio: menor do que 1 ppm de O₂.

Figura 6. Equipamento para cultivo em anaerobiose. **A.** Sistema de micro fermentação BioLector. **B.** Placa para cultivo celular com selante. **C e D.** Câmara de anaerobiose com a entrada e saída de nitrogênio.



Fonte: Peña-Moreno et al. (2017).

A partir dos dados obtidos na triagem, foram determinados cinco pontos (durante o crescimento) para coleta de amostras visando a dosagem de metabólitos extracelulares e os estudos de expressão gênica (ver seção “Resultados”). Desta forma, foram subsequentemente realizados cinco ensaios de crescimento para cada meio específico utilizado, sendo um ensaio para cada ponto de coleta, que representa um estágio metabólico diferente durante o experimento. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições descritas para a triagem e permitiram coletas individualizadas de amostras nos tempos previamente estabelecidos. As amostras foram coletadas, centrifugadas a 4000 rpm durante 5 minutos e as células foram separadas dos sobrenadantes. As células foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o momento do isolamento do RNA. Os sobrenadantes foram armazenados em tubos cônicos de 15 ml a -20 °C até o momento da dosagem dos metabólitos extracelulares.

1.3.3 Determinação da produção de metabólitos extracelulares

Para a determinação da produção de metabólitos extracelulares, os sobrenadantes dos cinco pontos de coleta para cada meio descrito foram analisados

por HPLC para a quantificação dos seguintes metabólitos: glicose, frutose, sucrose, etanol, glicerol e acetato. Estes foram separados pela coluna Aminex HPX-87H BioRad a 60 °C, utilizando-se H₂SO₄ a 8 mM como fase móvel na vazão de 0,6 mL/min e detectados por um detector UV conectado em série a um detector do tipo índice de refração. As amostras foram preparadas como descrito por BLOMQVIST et al., (2010) por filtração do sobrenadante através de um filtro estéril de 0,22 µm e congelação a -20 °C até à análise. A biomassa foi determinada a partir da densidade óptica das culturas, utilizando uma curva padrão anterior e os parâmetros fermentativos calculados segundo descrito por LEITE et al., (2012).

1.3.4 Isolamento do RNA e síntese de cDNA

As células mantidas a -80 °C foram processadas para extração de RNA total usando o Kit Maxwell 16 LEV simply RNA Blood de acordo as instruções do fabricante (Promega Corporation, USA). Logo após a extração, as amostras foram quantificadas com auxílio do Nanodrop® (Thermo Fischer Scientific, EUA), com o objetivo de determinar a concentração de ácidos nucleicos e a qualidade das amostras no processo de extração. A integridade do RNA foi comprovada por eletroforese em gel de agarose 1%, corrido a 100V e 50 mA em tampão TE livre de nucleases.

A síntese do cDNA foi realizada num período de tempo máximo de 24 horas a partir do RNA total extraído com auxílio do Kit ImProm-II™ Reverse Transcription System Promega II (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A quantidade inicial de RNA foi padronizada para 0,5 µg de RNA total para sintetizar 20 µl de cDNA. O cDNA foi posteriormente armazenado em freezer a -20 °C. As etapas de isolamento do RNA e síntese de cDNA seguiram as recomendações propostas no *MIQE Guidelines* (BUSTIN et al., 2012).

1.3.5 Ensaios de expressão gênica por PCR em Tempo Real

Para a determinação da influência da fonte de nitrogênio no metabolismo anaeróbico de *D. bruxellensis*, um estudo cinético acerca da expressão de genes envolvidos no metabolismo central desta levedura foi conduzido por PCR em Tempo Real, utilizando o método de quantificação relativa da expressão gênica por fatores de normalização (geNorm). Os ensaios foram realizados no sistema de detecção ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, EUA), utilizando o kit SYBR Green PCR Master Mix, como descrito previamente (DE BARROS PITA et al., 2012). Os genes alvo e de referência utilizados no presente estudo estão descritos na Tabela 2. Adicionalmente, para o controle de qualidade das amostras, foram executados testes para a estimativa da contaminação com DNA genômico (RT negativo). Os genes *TEF1* e *ACT1* foram utilizados como genes de referência (DE BARROS PITA et al., 2013a), utilizando-se o cDNA de todas as amostras e observando a homogeneidade de sua expressão. Os procedimentos de validação dos genes alvo e análise dos dados foram realizadas segundo DE BARROS PITA et al., (2013a).

Tabela 2. Descrição dos genes alvo e Genbank IDs.

Gene	Genbank ID	Descrição
<i>YNT1</i>	EF364426	Proteína transportadora de nitrato
<i>YNR1</i>	EF364428	Enzima Nitrito redutase
<i>YNI1</i>	EF364429	Enzima Nitrito redutase
<i>MEP1</i>	EI017852	Permease de amônio (alta afinidade)
<i>GAP1</i>	EI011930	Permease geral e aminoácidos
<i>PUT4</i>	EI016538	Permease de prolina (alta afinidade)
<i>GLT1</i>	EI014757	Glutamato sintetase (GOGAT) dependente de NAD ⁺
<i>GDH1</i>	EI014207	Glutamato desidrogenase dependente de NAD(P) ⁺
<i>PFK1</i>	BK006941	Subunidade alfa da fosfofrutoquinase heterooctamerica
<i>FBP1</i>	BK006945	Frutose-1,6-bisfosfatase
<i>PDC1</i>	BK006945	Isoenzima piruvato descarboxilase
<i>ALD3</i>	BK006946	Aldeído desidrogenase citoplasmática
<i>ALD5</i>	BK006939	Aldeído desidrogenase mitocondrial
<i>ADH1</i>	BK006948	Álcool desidrogenase (isoenzima fermentativa)
<i>SDH1</i>	BK006943	Flavoproteína subunidade de succinato desidrogenase

<i>ATP1</i>	BK006936	Subunidade alfa do setor de F1 ATP sintase
<i>TEF1</i>	BK006949	Gene de referência. Fator de alongamento de tradução EF-1 alfa
<i>ACT1</i>	EF364427	Gene de referência. Actina.

Fonte: www.ncbi.org.com

Todos os experimentos foram realizados em duplicata biológica com triplicatas técnicas para cada tratamento. Para a quantificação da expressão gênica, os dados foram analisados no programa Microsoft® Excel® 2007 e os fatores de normalização calculados pelo algoritmo geNorm, que normaliza os dados de expressão quando mais de um gene de referência é utilizado (VANDESOMPELE et al., 2002). Todas as etapas dos ensaios de expressão gênica por PCR em Tempo Real seguiram as recomendações propostas no *MIQE Guidelines* (BUSTIN et al., 2009).

2 RESULTADOS

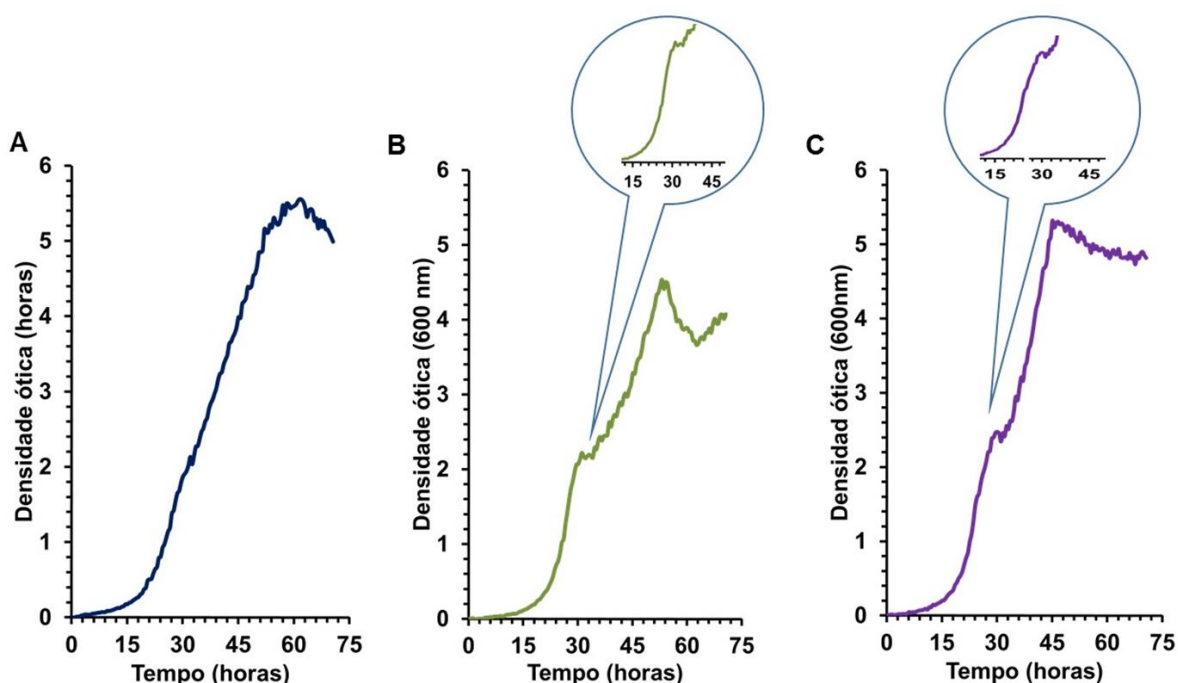
2.1 INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO ANAERÓBIO DE *D. BRUXELLENSIS*

O perfil de crescimento celular de *D. bruxellensis* apresentado no ensaio de triagem foi determinante para o estabelecimento dos pontos de coleta de amostras para dosagem de metabólitos extracelulares e para os ensaios de expressão gênica. Como pode ser observado na Figura 7, embora a fase *lag* tenha sido aproximadamente igual nas três diferentes combinações de fontes de nitrogênio utilizadas (12h), a cinética de crescimento exponencial apresentou diferenças significativas nos três meios.

Em meio contendo sulfato de amônio o crescimento anaeróbico das células de *D. bruxellensis* foi contínuo e os estágios observados na curva representam um modelo clássico de crescimento microbiano, com as fases *lag*, *log*, estacionária e de declínio bem delimitadas (Figura 7A). Por outro lado, quando as células de *D.*

bruxellensis foram submetidas a crescimento anaeróbio com o nitrato como fonte única (Figura 7B) ou concomitante à presença de amônio (Figura 7C), o perfil de crescimento apresentou interrupção temporária que acontece aproximadamente após 30 horas de cultivo que perdurou por aproximadamente cinco horas, sendo seguida por uma nova fase exponencial de crescimento. Esta segunda fase exponencial ocorreu por mais 15 e 10 horas nos meios contendo nitrato ou ambas as fontes de nitrogênio, respectivamente. Embora o comportamento celular nos meios contendo nitrato tenha sido similar (com duas fases exponenciais), a biomassa final foi menor no meio que continha apenas nitrato como fonte de nitrogênio.

Figura 7. Curvas de crescimento de *D. bruxellensis* GDB248 cultivadas em anaerobiose e em presença de glicose e diferentes fontes de nitrogênio: **A.** amônia, **B.** nitrato, **C.** meio misto.



Fonte: Peña-Moreno et al. (2017).

A partir desses perfis foram estabelecidos cinco pontos de coleta ao longo dos ensaios de crescimento subsequentes, nos seguintes tempos: (i) 0h, no início dos cultivos, (ii) 8 h, no meio da primeira fase *lag*, (iii) 24 h, no meio da primeira fase *log*, (iv) 30 h, no meio da fase de parada temporária e (v) 40 h, no meio da segunda

fase *log*. Para fins de comparação, o meio de referência (contendo apenas amônio) teve amostras coletadas nos mesmos períodos de tempo. Após a determinação dos pontos de coleta na triagem inicial, os ensaios de crescimento anaeróbio na presença de diferentes fontes de N foram repetidos para permitir que as amostras fossem coletadas em momentos específicos e que representassem os diferentes estágios metabólicos observados. Assim, para cada um dos três meios específicos utilizados no presente estudo, foram realizados cinco novos ensaios de crescimento, totalizando 15 amostras coletadas. Isso mostra que a parada observada representa um fenômeno biológico de transição metabólica e não um artefato experimental.

Os valores de velocidades de crescimento foram calculados a partir das médias de todos os ensaios realizados. No meio contendo amônio como fonte única, a taxa de crescimento foi de $0,20 \text{ h}^{-1}$ (± 0.01), enquanto nos meios contendo nitrato como fonte única ou a mistura das duas fontes os valores foram de $0,23 \text{ h}^{-1}$ (± 0.02) e $0,20 \text{ h}^{-1}$ (± 0.02). Dessa forma, não houve diferença estatisticamente significativa nesse parâmetro considerando a fonte de nitrogênio utilizada. No entanto é importante destacar que o tempo de entrada de *D. bruxellensis* na segunda fase *Lag* foi diferente para cada meio com conteúdo de nitrato, sendo mais rápido no meio misto com entrada em 28 horas e duração de 4 horas na fase *Lag*; e em contrapartida, células no meio contendo unicamente nitrato, começaram a segunda fase *Lag* em 30 horas e duração de 4 horas e meia antes de começar a segunda fase exponencial. Isto se vê refletido no comportamento fisiológico das células ao longo do tempo.

2.2 INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DE INTERESSE INDUSTRIAL EM *D. BRUXELLENSIS* EM ANAEROBIOSE

A resposta fisiológica de *D. bruxellensis* GDB 248 submetida a três fontes de nitrogênio em condições de anaerobiose foi determinada para cada momento fisiológico observado. A produção de etanol foi observada nos três meios de cultura assim que as células iniciaram a fase de crescimento (Tabela 3), indicando que para essa linhagem o efeito Custer não parece ser evidente.

Tabela 3. Parâmetros fisiológicos de cultivos de *D. bruxellensis* GDB248 em anaerobiose com amônio, nitrato ou ambas as fontes de nitrogênio

FONTE DE N	PARÂMETROS	TEMPO DE CULTIVO				
		8h	24h	30h	40h	70h
Amônio	Glicose consumida (%)	10,3 ($\pm 0,03$)	37,9 ($\pm 1,9$)	37,1 ($\pm 0,37$)	66,6 ($\pm 0,03$)	100 ($\pm 0,0$)
	Etanol (g/L)	0 ($\pm 0,0$)	2,08 ($\pm 0,07$)	3,41 ($\pm 0,2$)	5,567 ($\pm 0,54$)	9,25 ($\pm 0,02$)
	$Y_{p/s}$ etanol (g/g)	0 ($\pm 0,0$)	0,28 ($\pm 0,09$)	0,46 ($\pm 0,02$)	0,42 ($\pm 0,04$)	0,46 ($\pm 0,001$)
	$Y_{x/s}$ (g/g)	0 ($\pm 0,0$)	0,680 ($\pm 0,13$)	0,466 ($\pm 0,03$)	0,458 ($\pm 0,07$)	0,337 ($\pm 0,01$)
	$Y_{p/s}$ CO ₂ (g/g)	0 ($\pm 0,0$)	0,26 ($\pm 0,001$)	0,44 ($\pm 0,0$)	0,40 ($\pm 0,02$)	0,44 ($\pm 0,01$)
Nitrato	Glicose consumida (%)	8,05 ($\pm 0,03$)	25,35 ($\pm 0,66$)	35,95 ($\pm 0,5$)	79,35 ($\pm 0,1$)	100 ($\pm 0,0$)
	Etanol (g/L)	0 ($\pm 0,0$)	1,82 ($\pm 0,10$)	3,64 ($\pm 0,1$)	6,52 ($\pm 1,10$)	9,61 ($\pm 0,32$)
	$Y_{p/s}$ etanol (g/g)	0 ($\pm 0,0$)	0,36 ($\pm 0,03$)	0,51 ($\pm 0,1$)	0,41 ($\pm 0,01$)	0,48 ($\pm 0,01$)
	$Y_{x/s}$ (g/g)	0 ($\pm 0,0$)	0,601 ($\pm 0,07$)	0,415 ($\pm 0,04$)	0,446 ($\pm 0,02$)	0,311 ($\pm 0,003$)
	$Y_{p/s}$ CO ₂ (g/g)	0 ($\pm 0,0$)	0,34 ($\pm 0,002$)	0,48 ($\pm 0,0$)	0,39 ($\pm 1,9$)	0,46 ($\pm 0,05$)
Amônio + Nitrato	Glicose consumida (%)	9,75 ($\pm 0,5$)	30,0 ($\pm 0,07$)	67,6 ($\pm 0,20$)	80,02 ($\pm 0,20$)	100 ($\pm 0,0$)
	Etanol (g/L)	0 ($\pm 0,0$)	2,69 ($\pm 0,53$)	6,40 ($\pm 0,3$)	5,37 ($\pm 1,9$)	8,54 ($\pm 0,10$)
	$Y_{p/s}$ etanol (g/g)	0 ($\pm 0,0$)	0,45 ($\pm 0,02$)	0,40 ($\pm 0,05$)	0,40 ($\pm 0,04$)	0,43 ($\pm 0,005$)
	$Y_{x/s}$ (g/g)	0 ($\pm 0,0$)	0,540 ($\pm 0,21$)	0,388 ($\pm 0,1$)	0,546 ($\pm 0,05$)	0,388 ($\pm 0,001$)
	$Y_{p/s}$ CO ₂ (g/g)	0 ($\pm 0,0$)	0,43 ($\pm 0,00$)	0,38 ($\pm 0,0$)	0,38 ($\pm 0,33$)	0,41 ($\pm 0,001$)

Fonte: Peña-Moreno et al. (2017).

Entretanto, foi observado que mesmo na fase *lag* houve algum consumo de glicose possivelmente associado a um crescimento muito lento desacoplado da produção de etanol mesmo em anaerobiose (Figura 8A).

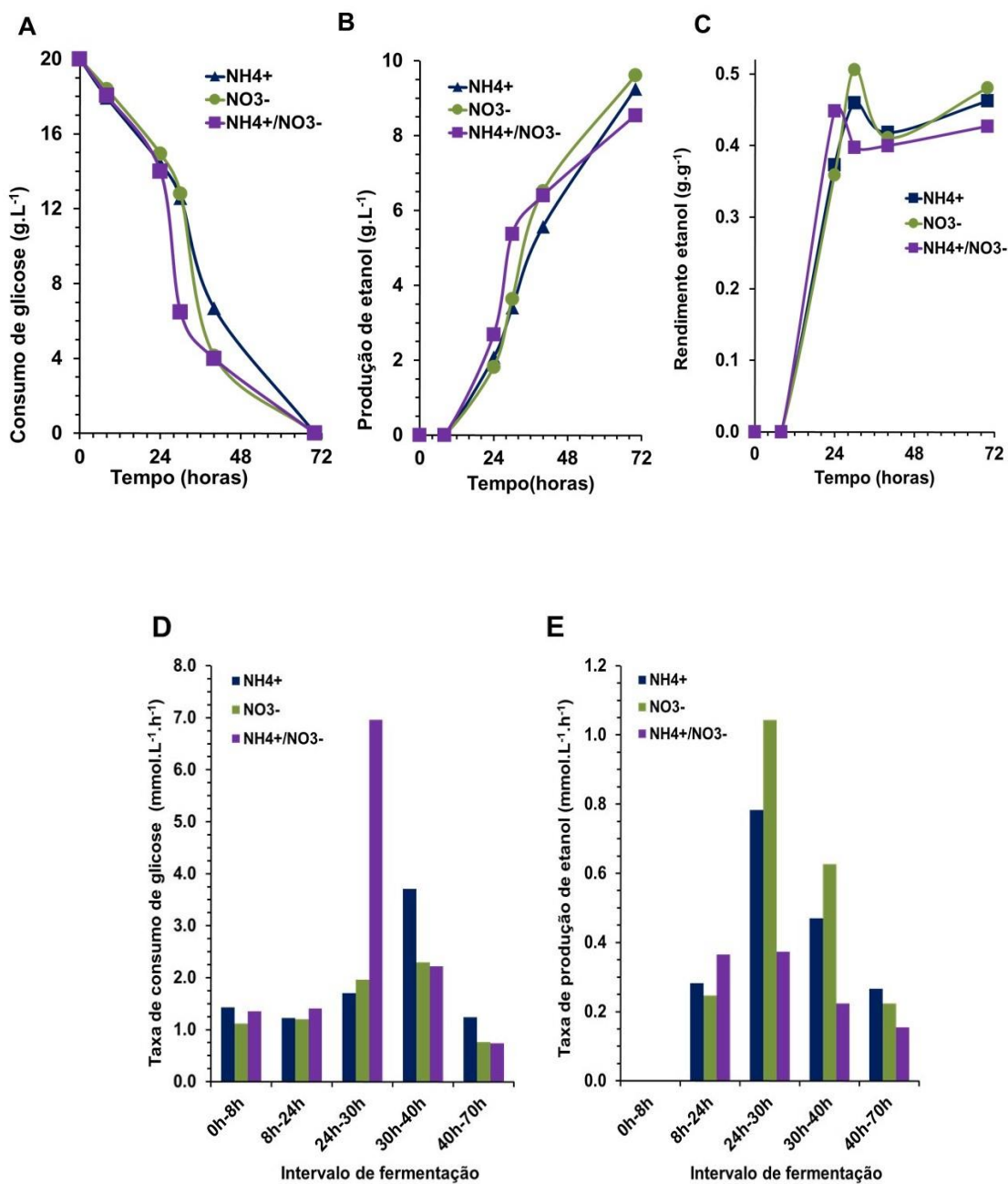
Nas três condições de cultivos celulares, o consumo de glicose foi parecido, sendo levemente maior no meio misto entre 24 e 30 horas, ao mesmo tempo que a produção de etanol aumenta (Figura 8B). Igualmente, a velocidade média de consumo de substrato no meio misto no mesmo intervalo do tempo, apresentou o maior pico em comparação com os outros meios (Figura 8D). Entretanto a velocidade média de produção de etanol neste mesmo intervalo é a mais baixa das três condições (Figura 8E), refletida na interrupção temporária que entre 24-30 horas onde a célula tem essa mudança metabólica.

Destaca-se também no meio unicamente com amônio, a velocidade média de consumo de glicose apresentou seu maior pico no intervalo 30-40 horas, onde o crescimento celular continua sendo exponencial, entretanto, as outras condições estão saindo da segunda fase *lag* e começando sua segunda fase exponencial.

Foi observado também que o rendimento de biomassa a partir de glicose ou outro metabólito foi maior nos meios contendo amônio comparado com o meio com nitrato como única fonte de nitrogênio. Finalmente, os valores de rendimento na produção de etanol foram similares nas três condições ao longo do tempo, mesmo tendo seu pico mais alto para cada meio, em horas diferentes, o que estaria relacionado com o consumo de glicose (Figura 8C).

Adicionalmente, ao serem analisadas as taxas de consumo de glicose e produção de etanol nos intervalos definidos a partir do formato da curva de crescimento para cada condição (Figura 8D e 8E), foi observado um perfil similar nas três condições ao longo do tempo com destaque nos intervalos 24-30 horas e 30-40 horas.

Figura 8. Dados fisiológicos de *D. bruxellensis* em anaerobiose em meios com três fontes de nitrogênio. **A.** Consumo de Glicose **B.** Produção de etanol **C.** Rendimento de produção de etanol **D.** Velocidade média de consumo de glicose **E.** Velocidade média de produção de etanol.



Fonte: Peña-Moreno et al. (2017).

2.3 INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO CENTRAL DE *D. BRUXELLENSIS* EM ANAEROBIOSE

Com o intuito de verificar a influência do nitrogênio na expressão de genes do metabolismo central de *D. bruxellensis*, as amostras de cDNA foram analisadas por PCR em Tempo Real para a determinação dos níveis de expressão dos genes descritos na Tabela 2 do item Materiais e Métodos. Estes genes estão relacionados com diferentes vias que compõem o metabolismo central de *D. bruxellensis*.

Para os estudos de cinética da expressão de genes do metabolismo central de *D. bruxellensis*, as amostras no tempo 0h de cada meio específico foram utilizadas como referência no caso dos genes *YNT1*, *YNR1*, *YNI1*, *MEP1*, *GAP1*, *PUT4*, *GLT1* e *GDH1* para que os níveis de expressão dos genes em todos os outros tempos de coleta fossem comparados. Entretanto, para os genes *PDC1*, *ALD5*, *ALD3*, *ADH1*, *PFK1*, *SDH1* e *ATP1*, os estudos cinéticos foram realizados utilizando como referência as amostras no tempo 8h de cada meio específico. Essa alteração foi necessária para evitar um erro de interpretação derivado da análise das amostras no tempo 0h, nas quais os níveis de expressão desses genes eram bastante elevados, resultando em queda substancial da expressão no tempo 8h. Para facilitar a análise dos dados de expressão, os genes foram agrupados em cinco categorias, de acordo com a sua função ou participação em uma determinada via metabólica. Os cinco grupos são descritos como a seguir: (i) genes da via do nitrato, (ii) genes que codificam permeases de fontes de nitrogênio e (iii) genes do metabolismo central do nitrogênio, (iv) genes da via glicolítica e fermentação da glicose e, (v) genes envolvidos na produção de ATP e cadeia respiratória mitocondrial.

2.3.1 Expressão dos genes da via de assimilação do nitrato (NIT)

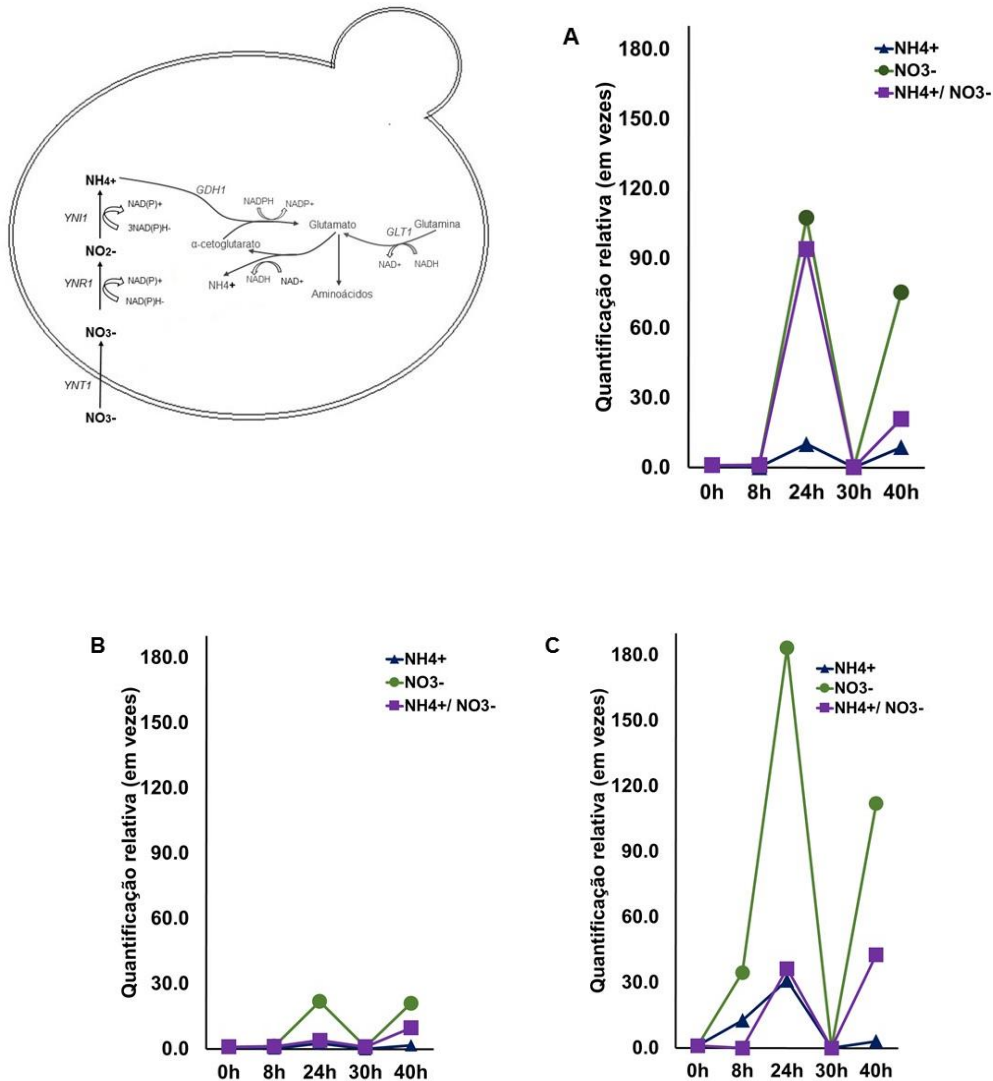
Os dados de quantificação relativa obtidos por RT-qPCR mostraram, como esperado, que os genes da via de assimilação de nitrato (genes NIT), *YNT1*, *YNR1*, *YNI1* sofrem maior indução quando células de *D. bruxellensis* estão expostas a esta

fonte de nitrogênio, especialmente após 24 horas de cultivo, onde foram detectados mRNA's correspondentes aos genes NIT. Curiosamente, no meio contendo amônio como fonte única de nitrogênio, apesar de apresentarem baixos níveis de expressão, os genes da via da assimilação do nitrato não estavam completamente reprimidos (Figura 9), como esperado pelo efeito da Repressão pelo Metabólito do Nitrogênio (RCN) (MAGASANIK, 2002). Os genes NIT apresentaram um perfil de expressão peculiar, com alternâncias entre altos e baixos níveis de mRNA.

O gene *YNT1*, que codifica o transportador de nitrato, é induzido em presença dessa fonte, principalmente após 24 horas de cultivo, onde o crescimento celular está em plena fase logarítmica (Figura 9A). Nesta condição, a expressão gênica é aumentada em quase 120 vezes. Após de 30 horas de cultivo, a expressão deste gene é sensivelmente reduzida (quantidade relativa próxima a zero), apresentando nova indução após 40 horas, especialmente no meio contendo nitrato como fonte única de nitrogênio. Curiosamente, em meio misto, o gene *YNT1* não foi reprimido pela presença de amônio, indicando que esse gene não é susceptível à RCN, pelo menos nas condições avaliadas.

Os demais genes NIT (*YNR1* e *YNI1*) apresentaram um perfil de indução pelo nitrato similar ao observado para *YNT1* (Figura 9B, 9C). O gene *YNI1* apresentou os maiores níveis de mRNA detectados enquanto que a expressão do gene *YNR1* foi a menor para esta via. Por outro lado, *YNR1* e *YNI1* tiveram seus níveis de expressão reduzidos em presença de amônio no meio misto, quando comparados com o meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio. Isto indica que *YNR1* e *YNI1* são regulados de maneira coordenada, porém distinta da observada no gene *YNT1*.

Figura 9. Representação esquemática da via de assimilação do nitrato. Quantificação relativa de mRNA's dos genes envolvidos na via da assimilação do nitrato com diferentes fontes de nitrogênio (condição de referência, tempo 0h). **A.** Gene que codifica o transportador de nitrato (*YNT1*) **B.** Gene que codifica a enzima nitrato redutase (*YNR1*) **C.** Gene que codifica a enzima nitrito redutase (*YNI1*).



Fonte: Peña-Moreno et al. (2017).

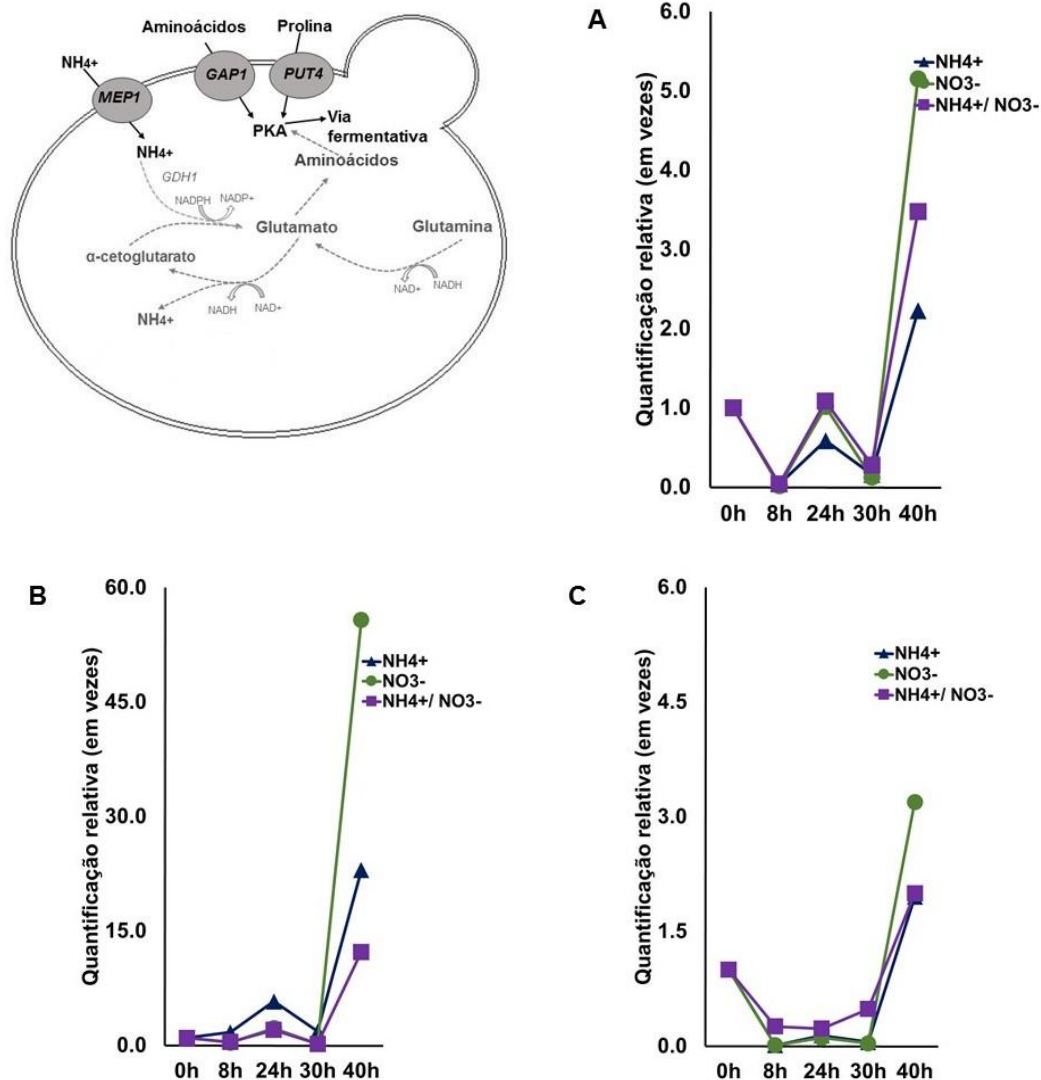
2.3.2 Expressão dos genes que codificam permeases de fontes de nitrogênio

Os níveis de expressão dos genes *MEP1*, *GAP1* e *PUT4*, que codificam permeases para amônio e aminoácidos foram avaliados em resposta à fonte de nitrogênio disponível (Figura 10). De maneira geral, os genes foram induzidos em *D.*

bruxellensis quando a disponibilidade de nitrogênio estava reduzida, seguindo um padrão de regulação susceptível à RCN. Os níveis de mRNA dos genes *MEP1*, *GAP1* e *PUT4* no tempo 0h foi relativamente maior comparado com o tempo 8h. Somente após 40h de cultivo, quando a concentração de nitrogênio no meio já estava provavelmente bastante reduzida, o nível de expressão desses genes foi significativamente induzido.

O gene *MEP1* (Figura 10A), que codifica a permease de alta afinidade para amônio teve um perfil de expressão parecida nos três meios, sendo sua expressão significativamente induzida no tempo 24h em presença de nitrato como fonte de nitrogênio. Em amônio, apesar da indução observada no tempo 24h, a expressão de *MEP1* foi inferior em comparação aos meios contendo nitrato. Após 40 horas de cultivo, a diferença na expressão (indução) do gene *MEP1* em meios contendo nitrato, em comparação ao meio de referência foi ainda maior. Destaca-se que estes genes estariam sendo desreprimidos pela ausência da fonte de nitrogênio.

Figura 10. Representação esquemática de permeases de amônio e aminoácidos. Quantificação relativa (com respeito ao tempo 0 horas) de mRNA's dos genes que codificam permeases em três fontes de nitrogênio **A.** Gene que codifica a permease de alta afinidade para amônio (*MEP1*) **B.** Gene que codifica a permease geral de aminoácidos (*GAP1*) **C.** Gene que codifica a permease de alta afinidade específica de prolina (*PUT4*).



Fonte: Peña-Moreno et al. (2017).

Com relação ao gene *GAP1* (Figura 10B), o perfil de regulação transcricional foi similar nos três meios, como aconteceu com a expressão de *MEP1*. Após 24 horas de cultivo, o nível de expressão do gene foi apenas levemente induzido pelas fontes de nitrogênio empregadas. Somente após 40 horas, os níveis de expressão foram significativamente induzidos, principalmente no meio contendo nitrato como

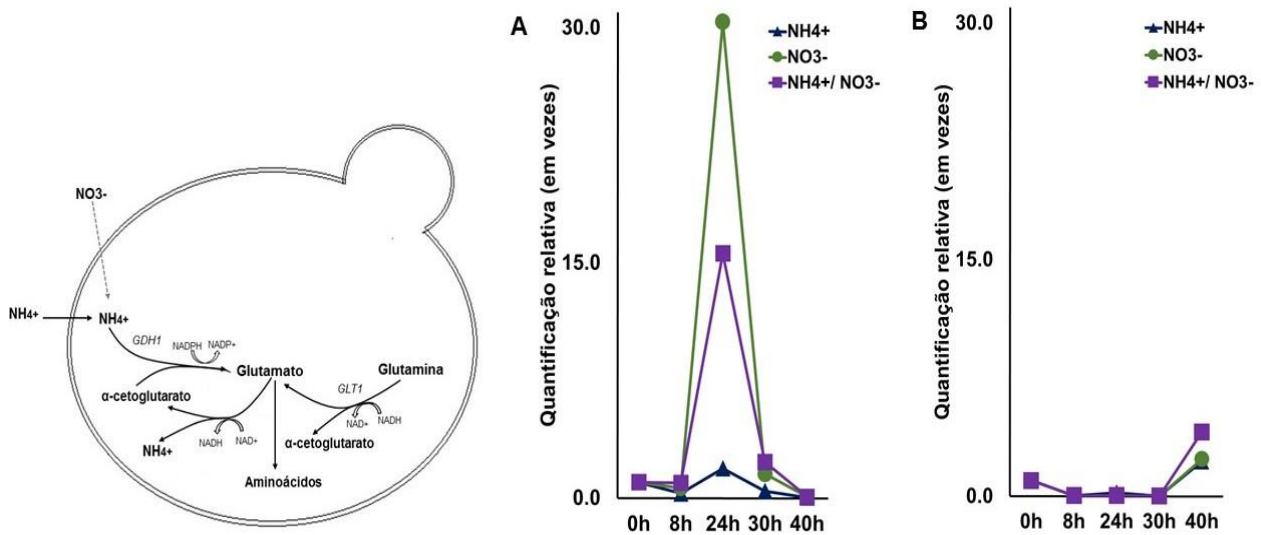
fonte única de nitrogênio. De maneira similar, a expressão do gene *PUT4* (Figura 10C) foi significativamente induzida apenas após 40h de cultivo. Esses perfis indicam que a regulação gênica nesses casos, é mais dependente da disponibilidade da fonte de nitrogênio do que da sua natureza.

2.3.3 Expressão dos genes que codificam proteínas do metabolismo central do nitrogênio

Para avaliar o efeito da fonte utilizada no metabolismo central do nitrogênio, o perfil de expressão de genes envolvidos na assimilação de amônio e biosíntese de glutamato foi determinado em anaerobiose. O gene *GDH1*, que codifica a enzima glutamato desidrogenase dependente de NADP^+ , responsável pela síntese de glutamato a partir de amônio e alfa-cetoglutarato, teve sua expressão induzida apenas após 24 horas de cultivo (Figura 11A). Essa indução ocorreu principalmente em meios contendo nitrato, em comparação com a referência. No cultivo realizado no meio misto, a indução do gene *GDH1* foi a metade da observada para o meio com nitrato como fonte única. É importante destacar que nos pontos de análise 0h e 8h, a expressão do gene *GDH1* já era elevada (dados não mostrados), originada a partir de um pré-cultivo em amônio como fonte de nitrogênio. Por outro lado, após 30 horas de cultivo, a expressão de *GDH1* foi sensivelmente reduzida, o que também foi observado após 40h.

Por outro lado, o gene *GLT1*, que codifica a enzima glutamato sintase, responsável por sintetizar glutamato a partir de glutamina e alfa-cetoglutarato, apresentou significativa redução na sua expressão após 8 horas de cultivo (Figura 11B). Esse gene permaneceu pouco expresso ao longo do tempo nos três meios e teve sua expressão aumentada apenas após 40 horas de cultivo.

Figura 11. Representação esquemática da via de assimilação do nitrogênio e produção de glutamato. Quantificação relativa (com respeito ao tempo 0 horas) de mRNA's dos genes que codificam proteínas do metabolismo central do nitrogênio em três fontes de nitrogênio. **A.** Enzima glutamato desidrogenase (*GDH1*) **B.** Enzima glutamato sintase (*GLT1*).

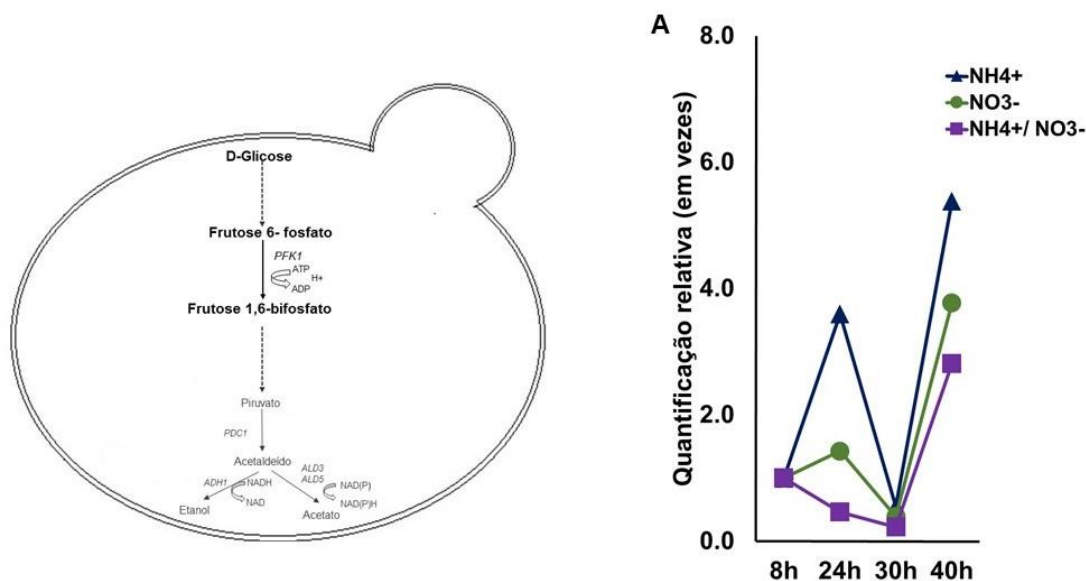


Fonte: Peña-Moreno et al. (2017).

2.3.4 Expressão de genes da via glicolítica e fermentação da glicose

Para avaliar os efeitos da fonte de nitrogênio na expressão de genes envolvidos com a glicólise e a via fermentativa, os genes *PFK1*, *PDC1*, *ADH1*, *ALD3* e *ALD5* foram analisados (Figuras 12 e 13). O perfil de expressão do gene *PFK1* que codifica a fosfofrutoquinase, enzima chave da glicólise é similar nos três meios testados, porém com maior indução em meio contendo apenas amônio como fonte de nitrogênio (Figura 12A). A indução na expressão do gene *PFK1* e posterior queda em 30 horas seria uma consequência do alto fluxo glicolítico, no qual, para controle da via, a célula diminui a expressão desse gene.

Figura 12. Representação esquemática resumida da via glicolítica. **A.** Quantificação relativa (com respeito ao tempo 8 horas) de mRNA's do gene que codifica Fosfo fructoquinase (*PFK1*) em três fontes de nitrogênio



Fonte: Peña-Moreno et al. (2017).

Após o final da glicólise e produção de piruvato, o NAD⁺ consumido durante a via glicolítica deve ser restaurado, em anaerobiose, majoritariamente pela fermentação. Desta forma, os genes da via fermentativa foram avaliados quanto à resposta a fonte de nitrogênio. Estes genes foram analisados utilizando-se o tempo 8h como referência, uma vez que seus altos níveis de expressão no tempo 0h (dados não mostrados) causavam uma distorção na análise quantitativa.

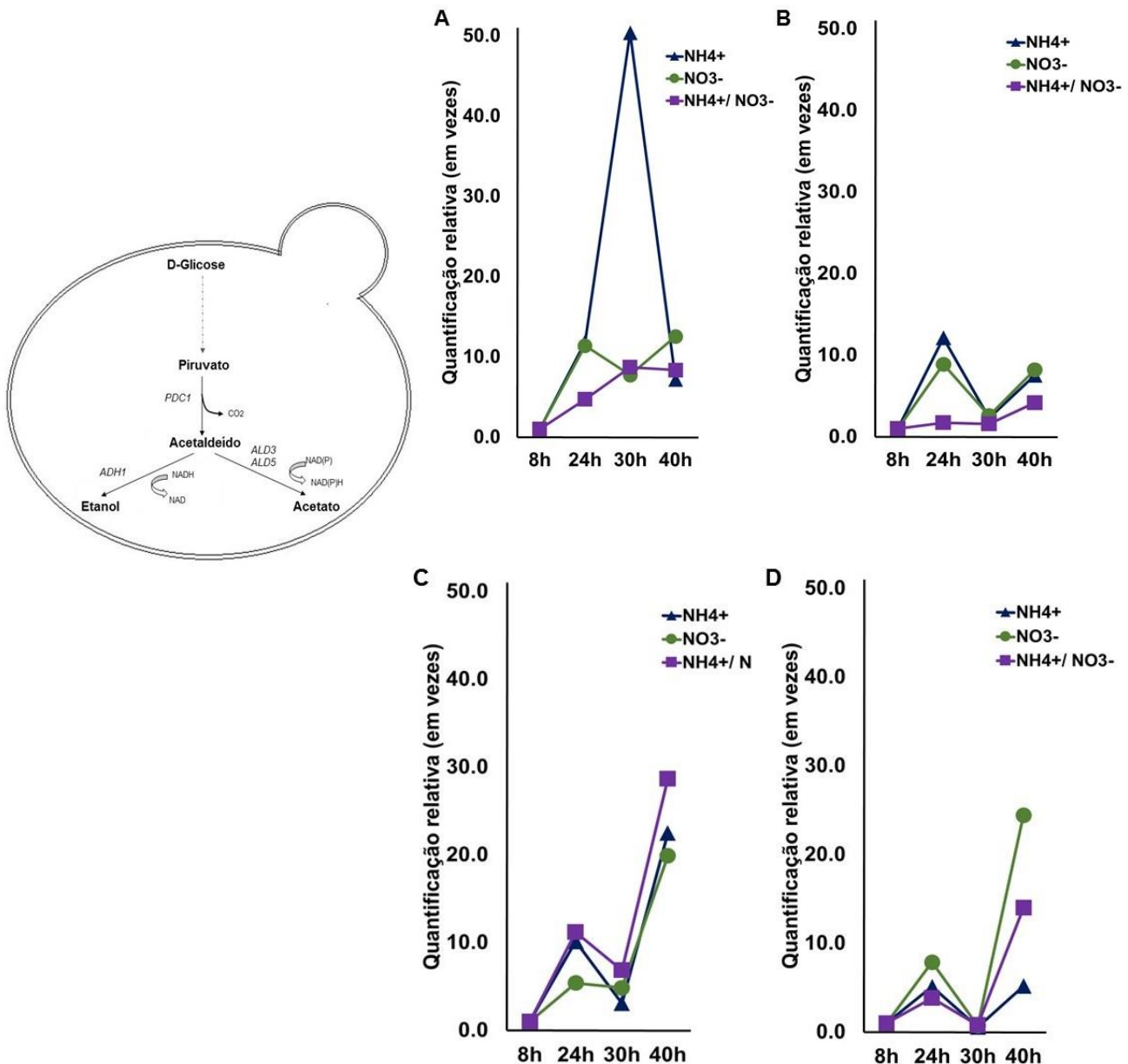
O gene *PDC1*, que codifica a enzima piruvato descarboxilase, primeira da via e responsável pela descarboxilação do piruvato a acetaldeído, apresentou um pico de indução em meio contendo amônio após 30 horas de cultivo (Figura 13A). Entretanto, para os demais tempos, todas as combinações de fontes de nitrogênio foram capazes de induzir a expressão do gene *PDC1*, porém com diferenças menores entre as fontes. Possivelmente, após 30 horas em meio contendo amônio, a célula continua com alto fluxo pela via glicolítica e consequentemente necessita converter piruvato a acetaldeído em altas taxas. Por outro lado, nos meios contendo nitrato, o tempo 30h coincide com a parada no crescimento observada nos ensaios pertinentes (Figura 7). A expressão deste gene diminui após 40h, no meio da

segunda fase *log* de crescimento, quando as fontes de carbono e nitrogênio estão começando a esgotar.

O gene *ADH1*, envolvido na redução de acetaldeído a etanol, foi induzido após 24 horas de cultivo, especialmente nos meios contendo amônio ou nitrato como fontes únicas de nitrogênio, indicando uma necessidade mais elevada do fluxo de piruvato pela via fermentativa nessas condições (Figura 13B). Por outro lado, em meio misto, a expressão desse gene permanece estável até o ponto 40h, quando ocorre o seu pico de indução.

Os genes *ALD5* e *ALD3* (aldeído desidrogenases mitocondrial e citoplasmática, respectivamente), que codificam enzimas envolvidas com a oxidação de acetaldeído a acetato, apresentaram perfil de expressão similar, porém, com algumas diferenças importantes. O gene *ALD5* (ALD mitocondrial) foi mais induzido em meios contendo amônio, enquanto que *ALD3* (ALD citoplasmática) foi mais induzido em meios contendo nitrato. Ambos os genes apresentaram indução após 24 e 40 horas e reduções significativas nos tempos 8 e 30h.

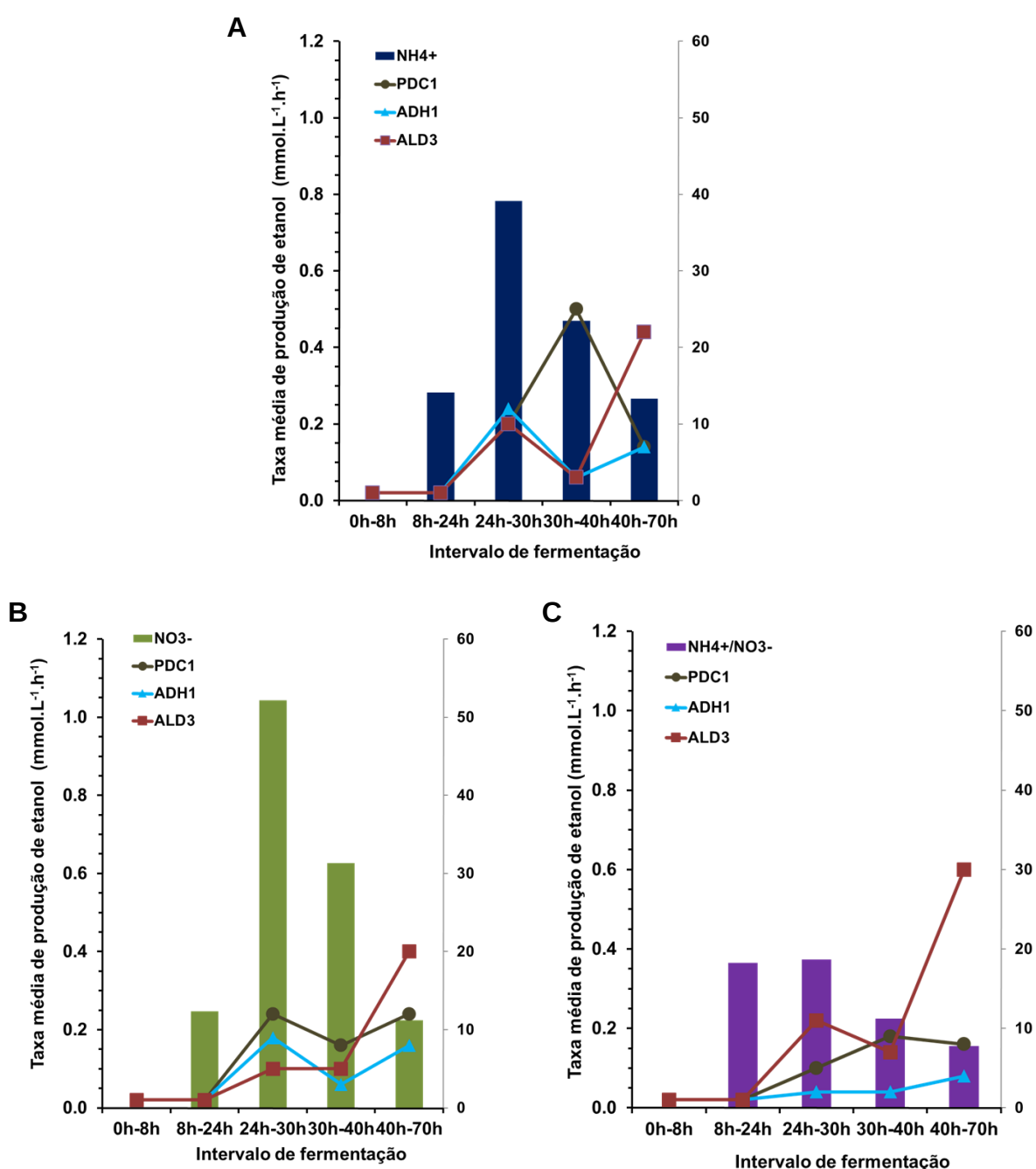
Figura 13. Representação esquemática da via fermentativa. Quantificação relativa (com respeito ao tempo 8 horas) de mRNA's dos genes da via fermentativa em três fontes de nitrogênio **A.** Gene que codifica a enzima piruvato descarboxilase (*PDC1*) **B.** Gene que codifica a enzima álcool desidrogenase (*ADH1*) **C.** Gene que codifica aldeído desidrogenase mitocondrial (*ALD5*) **D.** Gene que codifica aldeído desidrogenase citoplasmática (*ALD3*).



Fonte: Peña-Moreno et al. (2017).

Destaca-se que ao observar a quantificação relativa dos genes que compõem a via fermentativa, nas três condições testadas em anaerobiose, foi determinado que a expressão desses genes ocorria de maneira coordenada e a taxa de produção de etanol ($\text{mmol.L}^{-1}\text{.h}^{-1}$) também estava relacionada com a expressão desses genes. Por tanto foi estabelecido uma relação entre a expressão dos *ADH*, *ALD* e *PDC* e os dados de velocidade de produção de etanol em diferentes intervalos de crescimento anaeróbico da figura 8E (Figura 14).

Figura 14. Relação da expressão de genes *PDC1*, *ADH1* e *ALDs* e velocidade de produção de etanol em cultivos de *D. bruxellensis* em três condições **A.** Sulfato de Amônio **B.** Nitrato de sódio e **C.** Meio misto

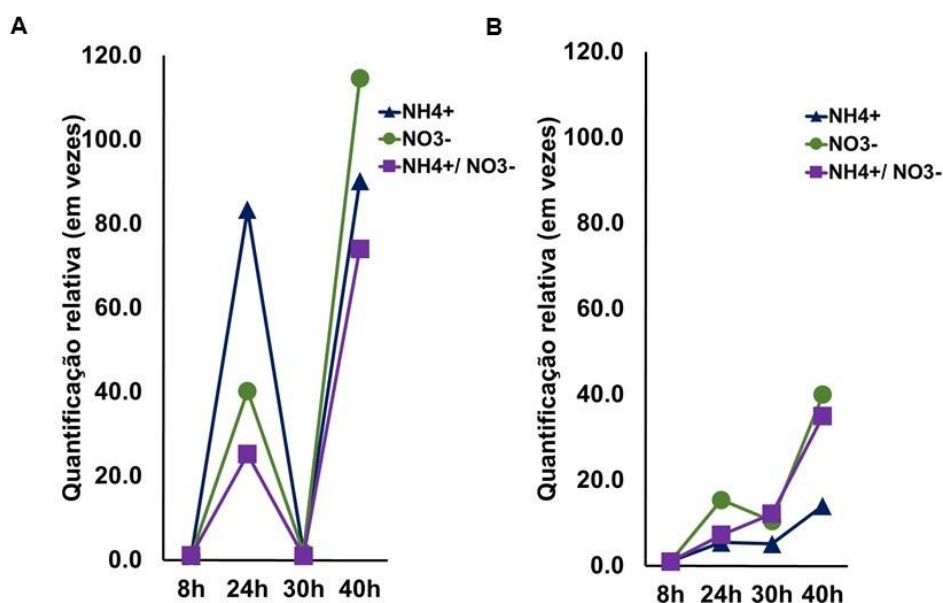


Fonte: Peña-Moreno et al. (2017).

2.3.5 Expressão de genes envolvidos na produção de ATP e cadeia respiratória mitocondrial

O gene *SDH1*, que codifica a subunidade flavoproteína da enzima Succinato desidrogenase apresentou um perfil de expressão similar para as três fontes testadas (Figura 15A), com picos de indução após 24 e 40 horas de cultivo. Para o gene *ATP1*, que codifica uma subunidade do complexo F1F0 da ATP sintase, os maiores índices de expressão foram observados em meio contendo nitrato (como fonte única ou misto), indicando uma maior necessidade de produção de ATP nessas condições (Figura 15B).

Figura 15. Quantificação relativa (com respeito ao tempo 8 horas) de mRNA's de dois genes envolvidos na síntese de ATP e na cadeia respiratória mitocondrial em três fontes de nitrogênio **A.** Gene que codifica a subunidade flavoproteína da enzima Succinato desidrogenase (*SDH1*) **B.** Gene que codifica uma subunidade do complexo F1F0 da ATP sintase (*ATP1*).



Fonte: Peña-Moreno et al. (2017).

3 ANÁLISE DE RESULTADOS

3.1 INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO ANAERÓBIO DE *D. BRUXELLENSIS*

A levedura *D. bruxellensis* foi capaz de crescer nos três meios com diferentes combinações de fontes diferentes de nitrogênio em anaerobiose. O uso de nitrato como fonte de nitrogênio pode conferir a *D. bruxellensis* vantagem seletiva de crescimento e fermentação quando comparado com *S. cerevisiae* (DE BARROS PITA et al., 2013a). Com relação ao crescimento celular, não houve diferença significativa nas velocidades de crescimento nos três meios. Entretanto, curiosamente, as velocidades de crescimento exibidas por *D. bruxellensis* em anaerobiose são maiores do que as observadas em aerobiose (DE BARROS PITA et al., 2011; DE BARROS PITA et al., 2013a; LEITE et al., 2013). A partir dos resultados encontrados por de Barros Pita e colaboradores em 2013, experimentos realizados com diferentes linhagens de *D. bruxellensis*, com condições de carbono e nitrogênio parecidos ou não (dados ainda não publicados) exibiram que o crescimento desta levedura é diferente entre linhagens. Estudos de diversidade genética tem revelado uma alta variabilidade entre as linhagens de *D. bruxellensis*, que pode resultar em alta diversidade fenotípica nesta levedura (CRAUWELS et al., 2015).

Em contrapartida, a curva de crescimento nos meios contendo nitrato apresentou um perfil bastante peculiar. Nesses meios, o crescimento celular não foi

contínuo, sendo temporariamente interrompido por um período aproximado de cinco horas e seguido por um novo ciclo de crescimento. Desta forma, nos meios contendo nitrato, a curva de crescimento apresentou duas fases exponenciais, em um comportamento tipicamente diáuxico. O conceito de diauxia se refere a um crescimento em duas fases, geralmente associado à presença ou metabolismo de duas fontes de carbono diferentes, sendo as duas fontes utilizadas em uma ordem de preferência pela célula (GALDIERI et al., 2010). Em *S. cerevisiae*, a diauxia é vinculada ao metabolismo respiro-fermentativo, no qual a glicose é oxidada a piruvato na glicólise, que é subsequentemente direcionado para a via fermentativa para a produção de etanol. Após o esgotamento da glicose, ocorre a troca diáuxica, na qual o etanol é metabolizado em um processo dependente de oxigênio (GALDIERI et al., 2010). Nesse sentido, o etanol é geralmente classificado como uma fonte de carbono respirável, pois necessita da cadeia respiratória para reoxidar o NADH formado durante a sua utilização (SCHIFFERDECKER et al., 2014).

3.2 INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DE INTERESSE INDUSTRIAL EM *D. BRUXELLENSIS* EM ANAEROBIOSE

A levedura *D. bruxellensis* apresentou perfis de crescimento diferentes em resposta à fonte de nitrogênio no meio, o que em geral, reflete em diferentes painéis de metabólitos secundários produzidos ao longo do tempo. O perfil de crescimento observado para essa levedura em presença de nitrato (fonte única e em combinação com amônio), com duas fases de crescimento exponencial, sugeria a possibilidade de ocorrência de uma troca diáuxica incomum em *D. bruxellensis*. Visto que as

células de *D. bruxellensis* foram cultivadas em ambiente livre de oxigênio e, por consequência, impeditivo da utilização da cadeia respiratória, essa troca diáuxica envolveria o consumo do etanol, mesmo na ausência de oxigênio, o que seria permitido pela assimilação do nitrato, mesmo em presença de amônio (DE BARROS PITA et al., 2011). Para que uma eventual diauxia fosse induzida pela assimilação de nitrato, *D. bruxellensis* deveria ser capaz de direcionar o NADH produzido pelo consumo de etanol para a redução do nitrato a amônio, pelas enzimas nitrato e nitrito redutase. O nitrato presente no meio poderia, em princípio, permitir a reoxidação do NADH gerado a partir do metabolismo do etanol, mesmo em anaerobiose. Isso acontece pelo fato de que para que ocorra a assimilação de 1 mol de nitrato, ou seja, sua redução à amônio, há o consumo de 4 mols de equivalentes redutores, NADH ou NADPH (GALDIERI et al., 2010, DE BARROS PITA et al., 2013b). No meio contendo amônio, o NADH gerado a partir do consumo do etanol não teria como ser reoxidado em anaerobiose. Isto significa que o nitrato seria o maior contribuinte para restaurar essa taxa de crescimento do meio misto em anaerobiose (SCHIFFERDECKER et al., 2014). Essa hipótese poderia ser confirmada pela análise dos dados de dosagem de metabólitos extracelulares por HPLC.

Entretanto, após análise do consumo de açúcares e produção de metabólitos secundários nesses meios, a possibilidade de diauxia induzida pelo nitrato em *D. bruxellensis* foi refutada. Para suportar a hipótese, o etanol produzido durante a fermentação (primeira fase *log* do crescimento) deveria ser gradativamente consumido pelas células após a troca diáuxica (segunda fase *log*), o que não pôde ser comprovado. Ainda, no período da interrupção do crescimento, a glicose ainda não havia sido completamente consumida. Nesse sentido, outros estudos são

necessários para determinar as causas e efeitos das duas fases *log* do crescimento anaeróbico de *D. bruxellensis* em presença de nitrato. Ainda, é importante notar que, diferente do observado em anaerobiose, *D. bruxellensis* exibe elevadas quantidades de ácido acético em condições aeróbias por meio da via NAD⁺ aldeído-desidrogenase (DE BARROS PITA et al., 2013).

3.2.1 Influência da fonte de nitrogênio na expressão de genes da via de assimilação do nitrato (NIT)

Os dados de análise de expressão gênica mostram que os genes NIT não são completamente reprimidos pela presença de íons amônio. Quando o nitrato é internalizado, a sua assimilação é dependente de duas reações de redução, que envolvem o consumo de equivalentes redutores (NADH ou NADPH) e resultam na liberação de amônio (DE BARROS PITA *et al.*, 2011; MAGASANIK & KAISER, 2002). Embora a RCN seja desencadeada pela presença de amônio sinalizando alta disponibilidade de nitrogênio (MAGASANIK & KAISER, 2002), nos cultivos em anaerobiose, há um escape, ainda que parcial, dos efeitos da RCN. Está aparente “indução” da expressão dos genes NIT, mesmo em crescimento em meio contendo apenas amônio, é provavelmente o resultado do consumo destes íons pelas células de *D. bruxellensis*, o que resulta em queda da concentração intracelular do repressor. A diminuição da concentração de amônio intracelular é um sinal de que a célula precisa captar fontes alternativas de nitrogênio, através do alívio da RCN (ÁVILA et al., 2002; DE BARROS PITA et al., 2011). Desta forma, genes que codificam proteínas necessárias ao metabolismo de fontes secundárias de nitrogênio podem ser expressos, na maior parte das vezes associada à presença de um indutor

(DE BARROS PITA et al., 2011). A expressão detectada dos genes NIT foi transiente, uma vez que após 40 horas de cultivo, o nível de expressão do gene *YNI1* foi novamente reduzido, indicando que na ausência do indutor da via (nitrato), a expressão dos genes NIT é apenas basal.

Os genes *YNR1* e *YNI1* apresentaram uma regulação coordenada, uma vez que seus perfis de expressão foram similares ao longo dos experimentos. Esses genes foram induzidos por nitrato e susceptíveis à RCN. Esse padrão coordenado da expressão dos genes *YNR1* e *YNI1* foi previamente descrito para *D. bruxellensis* em condições de limitação de oxigênio (DE BARROS PITA et al., 2013b). Por outro lado, o gene *YNT1*, que codifica o transportador de nitrato, apresentou um perfil diferente. Esse gene não foi submetido à RCN, sendo expresso mesmo na presença de amônio no meio misto, similar ao encontrado para condição de aerobiose (DE BARROS PITA et al., 2011). Dessa forma, apesar de clusterizados, os genes NIT apresentam padrões diferentes de regulação, dependendo das condições impostas pelo meio.

De fato, em presença de oxigênio, os genes NIT não foram submetidos à RCN (DE BARROS PITA et al., 2011). Por outro lado, em limitação de oxigênio, os genes NIT foram reprimidos pela presença de amônio no meio misto (DE BARROS PITA et al., 2013b). Essas observações sugerem que a regulação dos genes NIT em *D. bruxellensis* é sensível à disponibilidade de oxigênio no meio. O consumo de nitrato, mesmo em presença de amônio, parece ser um desperdício energético, uma vez que há utilização de 4 mols de equivalentes redutores (NADH ou NADPH) para a sua assimilação (Siverio, 2002). Esses equivalentes redutores poderiam ser, de outra forma, direcionados para a síntese de ATP. Entretanto, em condições nas

quais o oxigênio é abundante, as células de *D. bruxellensis* podem utilizar a cadeia respiratória para a geração eficiente de energia na forma de ATP (DE BARROS PITA et al., 2011). Assim, a co-assimilação de nitrato e amônio não resultaria necessariamente em diminuição do crescimento celular.

Em contrapartida, com a escassez ou ausência completa de oxigênio, *D. bruxellensis* pode apenas gerar energia pela utilização da glicólise e subsequente fermentação, um processo bem menos eficiente do ponto de vista energético. Nesse cenário, a repressão da utilização de nitrato, uma fonte de nitrogênio com alto custo energético de assimilação, parece ser razoável (DE BARROS PITA et al., 2013b). Os resultados do presente trabalho, em conjunto com dados anteriores obtidos pelo grupo de pesquisa indicam que a disponibilidade de oxigênio é importante na regulação da expressão dos genes NIT. O fato de o gene *YNT1* ter escapado ao controle da RCN no presente trabalho é motivo para estudos mais aprofundados sobre a regulação dos genes NIT em *D. bruxellensis*.

3.2.2 Influência da fonte de nitrogênio na expressão de genes que codificam permeases de fontes de nitrogênio

Os compostos nitrogenados são transportados usualmente através de proteínas transmembrana, entre elas aquelas codificadas pelos genes *GAP1*, *MEP1*, e *PUT4* genes (DE BARROS PITA et al., 2013b, MARINI et al., 2000; MAGASANIK & KAISER, 2002). No presente trabalho, os níveis de expressão desses genes, que codificam permeases para amônio e aminoácidos foram avaliados em resposta à fonte de nitrogênio disponível. Em *S. cerevisiae*, esses genes são submetidos à

RCN, o que significa que não devem ser expressos em presença de fontes preferenciais de nitrogênio (MAGASANIK, 2002). Em *D. bruxellensis* cultivada em aerobiose, esses genes foram de fato, induzidos quando a disponibilidade da fonte preferencial, amônio, estava reduzida (DE BARROS PITA et al, 2013b). No presente trabalho, o perfil de expressão desses genes foi similar ao previamente descrito para condições aeróbias, indicando pouca ou nenhuma influência do oxigênio na expressão desses genes (DE BARROS PITA et al., 2013b).

Na presença de altas concentrações (início dos cultivos) da fonte preferencial, amônio, a expressão dos genes das permeases é baixa, devido à RCN. Em meio contendo nitrato como fonte única de nitrogênio, a expressão dos genes também permanece baixa, nesse caso, provavelmente pela ausência de indutores apropriados. A utilização de nitrato, aparentemente com um baixo fluxo de liberação de amônio (resultado de sua assimilação), mantém o gene das permeases desreprimidos e passíveis de indução ao longo dos ensaios. O gene *MEP1* é um transportador de alta afinidade para íons amônio e, em *S. cerevisiae*, esse gene somente é expresso em baixas concentrações de amônio (BELTRAN et al., 2004). No presente trabalho, após 8 horas de cultivo em meio contendo amônio, o gene *MEP1* foi reprimido em relação ao tempo 0h. Essa repressão se deve, provavelmente à uma expressão elevada no meio de referência. Com o passar do tempo e consequente diminuição da concentração de amônio no meio, *MEP1* passar a ser induzido, devido ao alívio da RCN (BELTRAN et al., 2004).

Tanto a síntese como a atividade de *GAP1* e *PUT4* são rigorosamente reguladas de acordo com a qualidade da fonte de nitrogênio no meio, sendo que fontes preferenciais e/ou níveis elevados de aminoácidos reprimem Gap1 tanto

transcricional como pós-traducionalmente (MAGASANIK & KAISER, 2002). A transcrição desses genes também é regulada positivamente pela RCN. Além da sua função de transporte, o gene *GAP1* desempenha um papel como um sensor de aminoácidos na rápida ativação da via PKA após a adição de aminoácidos às células que carecem do nitrogênio (DONATON, 2003). Curiosamente, no presente trabalho, *GAP1* foi o gene que apresentou o maior pico de indução, principalmente em presença de nitrato. Essa indução foi mais significativa ao final dos cultivos, quando a concentração de nitrogênio já deve ser muito baixa e a célula precisa dispor de várias possibilidades de captação de compostos nitrogenados (DONATON, 2003).

Em geral, os genes para permeases em *D. bruxellensis* são sensíveis à natureza e disponibilidade da fonte de nitrogênio em anaerobiose (DE BARROS PITA et al., 2013b) e o consumo preferencial de amônio pelas células no início dos cultivos resulta na redução da concentração dessa fonte, aliviando os efeitos da RCN. Por outro lado, nos cultivos contendo ambas as fontes, a assimilação de nitrato deve contribuir para uma liberação de amônio em baixas velocidades, mantendo os genes das permeases desreprimidos e passíveis de indução ao longo do ensaio.

3.2.3 Influência da fonte de nitrogênio na expressão dos genes que codificam proteínas do metabolismo central do nitrogênio

Os genes envolvidos na assimilação de amônio e produção de glutamato e glutamina compõem o chamado metabolismo central do nitrogênio e são de

fundamental importância para a célula (MAGASANIK & KAISER, 2002). O perfil de expressão do gene *GLT1* foi bastante similar para os três meios testados, indicando que a regulação gênica é principalmente dependente da disponibilidade de nitrogênio em detrimento à natureza da fonte. Esse gene foi induzido apenas no final dos cultivos, quando a concentração de nitrogênio era provavelmente muito baixa. Em cultivos realizados com células de *D. bruxellensis* em aerobiose, o gene *GLT1*, que codifica a enzima glutamato sintase, apresentou perfil de expressão similar ao encontrado no presente trabalho, indicando que *GLT1* apresenta um papel secundário na assimilação do amônio (DE BARROS PITA et al., 2013b). Em *S. cerevisiae*, *GLT1* também é apontado como um gene secundário na produção de glutamato (MAGASANIK & KAISER, 2002). Por outro lado, a maior expressão do gene *GDH1* em meios contendo nitrato, após 24 horas de cultivo poderia estar relacionada com o consumo de NADP(H) e a alta demanda energética que precisa esta fonte para ser assimilada.

Destaca-se que os genes *GDH1* e *GLT1* apresentaram padrões de regulação inversos. *GDH1* estava mais expresso no tempo 0h, enquanto que *GLT1* tinha baixos níveis de expressão, indicando que *GDH1* é a principal enzima de síntese de glutamato em *D. bruxellensis*, quando o amônio não é limitante. Ao longo do crescimento e com o consumo de amônio, *GDH1* teve sua expressão bastante reduzida, enquanto que *GLT1* passou a ser o principal gene expresso, assumindo o papel de principal enzima responsável pela síntese de glutamato nessas condições. Um perfil de expressão bastante similar foi obtido com esses genes, em cultivos de *D. bruxellensis* em aerobiose (DE BARROS PITA et al., 2013b). Essa troca de papéis entre *GDH1* e *GLT1* pode ser justificada pelas diferentes afinidades das enzimas pelos substratos (PROCHÁZKA et al., 2010)

3.2.4 Influência da fonte de nitrogênio na expressão de genes da via glicolítica e fermentação da glicose

Uns dos genes chaves na via glicolítica, o gene *PFK1* foi analisado segundo seu perfil de expressão em anaerobiose, evidenciando que este gene poderia se adaptar à necessidade da célula. No início dos cultivos quando o meio possui alta quantidade de glicose, o gene foi expresso em menor quantidade comparado com o tempo 40 horas, nas três condições. No tempo 40h quando há pouca disponibilidade de glicose nos cultivos, o gene tenta se expressar possivelmente para tentar captar a pouca glicose. Do mesmo modo, essa adaptação pode se evidenciar que no tempo 30 horas apresentou uma queda que poderia refletir o controle da via glicolítica.

Estudos sobre a regulação de genes glicolíticos sugerem que a glicose induz fortemente a síntese de mRNA de *PFK1* (MOORE et al., 2005). Isso facilita a produção de fosfofrutoquinase durante uma mudança de glicólise gliconeogênese. Ainda, a atividade fosfofrutoquinase está sujeita ao controle alostérico (RODICIO et al., 2000).

O gene *PDC1* foi induzido de forma crescente nas três condições, com número maior de transcritos no meio contendo amônio, indicando que, de fato, o piruvato é direcionado para o metabolismo fermentativo da célula em anaerobiose (DICKINSON JR et al., 2003). De maneira similar, o gene *ADH1* apresentou indução acompanhando o perfil de *PDC1*. Um estudo prévio mostrou que os genes *PDC1* e

ADH1 estão mais expressos em condições anaeróbias. Além disso, *Adh1* é a única isoforma de álcool desidrogenase capaz de transformar eficientemente o acetaldeído para etanol durante o crescimento em glicose independentemente da disponibilidade de oxigênio (WIEBE et al., 2008).

Os genes *ALD5* e *ADL3*, apresentaram perfis de expressão similar nos três meios a partir do tempo 24 horas mesmo sem presença de acetato no meio (WANG X et al., 1998). As acetaldeído desidrogenases (ALDH) tem um papel importante no metabolismo do acetaldeído e uma das condições de estresse que a levedura pode encontrar é a presença deste composto. No caso dos genes *ALD3* e *ALD2* são enzimas citosólicas muito próximas, são induzidas em resposta ao etanol ou estresse e repressão pela glicose. Em um estudo realizado por Aranda e del Olmo (2003) em *S. cerevisiae*, a adição de acetaldeído ou etanol em cultivos de leveduras, induziu a expressão de alguns genes de *ALD* e levou a um aumento na atividade de ALDH. Apesar disso, eles também sugerem que mecanismos pós-transcricionais e/ou pós-traducionais estão envolvidos na regulação da atividade dessas enzimas (ARANDA & DEL OLMO, 2003).

É possível identificar a expressão coordenada destes genes de maneira que quanto maior foi a expressão de *ADH1* maior foi a velocidade de produção de etanol. De maneira antagônica, quanto maior foi a expressão de *ALD* (representada pela média da expressão entre *ALD3* e *ALD5*) menor foi a velocidade de produção de etanol. A relação do nível de expressão do gene *PCD1* com este parâmetro fisiológico foi menos direta, e parece depender da relação entre *ADH1* e *ALD*. Esta análise fornecerá subsídio para que se possa estabelecer a proporcionalidade de expressão

entre os três genes e definir as razões de expressão que induzem preferencialmente a produção de etanol ou preferencialmente de acetato.

3.2.5 Influência da fonte de nitrogênio na expressão de genes envolvidos na produção de ATP e cadeia respiratória mitocondrial.

Os genes *SDH1* e *ATP1* estão relacionados com o metabolismo respiratório e, em princípio, não deveriam estar expressos em ausência de oxigênio (OYEDOTUN & LEMIRE, 2004). Entretanto, ambos os genes apresentaram indução ao longo dos cultivos em anaerobiose, indicando que de certa forma, principalmente em presença de nitrato, as células de *D. bruxellensis* possuem alta demanda energética. Essa alta demanda faz com que a célula continue produzindo transcritos para esses genes, em uma tentativa de permanecer pronta para um eventual surgimento de oxigênio com subsequente aproveitamento da cadeia respiratória. Um estudo recente do nosso grupo de pesquisa encontrou resultados similares para cultivos em anaerobiose com presença de magnésio com *S. cerevisiae* (DE SOUZA LIBERAL et al., 2012). Adicionalmente, um perfil similar de expressão do gene *ATP1* foi encontrado em cultivos de *D. bruxellensis* em limitação de oxigênio (DE BARROS PITA et al., 2013a).

4 CONCLUSÃO

- *Dekkera bruxellensis* possui alta capacidade de crescimento em anaerobiose, com velocidades superiores às observadas em aerobiose;
- *D. bruxellensis* é capaz de crescer em anaerobiose mesmo com fontes secundárias de nitrogênio de maneira similar ao que acontece com fontes primárias;
- O comportamento fisiológico de *D. bruxellensis* em anaerobiose apresentou um perfil próximo no consumo de glicose e na produção de etanol independente da fonte de nitrogênio;
- Os genes do metabolismo do nitrato de *D. bruxellensis* são induzidos na presença do seu indutor. No entanto, em meios contendo amônio os genes não são completamente reprimidos, permitindo uma eventual expressão e escape da RCN;
- Apesar de clusterizados, os genes da via de assimilação de nitrato não estão regulados de igual maneira em anaerobiose;
- Os genes que codificam permeases e do metabolismo central do nitrogênio em *D. bruxellensis* cultivada em anaerobiose são principalmente regulados pela disponibilidade de nitrogênio em detrimento da fonte;
- Genes da via glicolítica e fermentativa foram expressos de maneira coordenada nos meios de amônio e de nitrato, onde o fluxo glicolítico é alto e a célula estabelece um controle na expressão desses genes como consequência desse fluxo;

- Os genes da cadeia respiratória podem ser expressos mesmo em anaerobiose, como controle para um eventual surgimento e aproveitamento do oxigênio;
- Em conjunto, foi estabelecido que em anaerobiose, a regulação dos genes NIT acontece de maneira diferente ao observado em aerobiose, sendo o oxigênio um fator importante na expressão desses genes. Conjuntamente, a expressão não esperada dos genes *SDH1* e *ATP1* nas condições descritas anteriormente forneceram novos dados para esclarecer o metabolismo da nossa linhagem industrial.

REFERÊNCIAS

ARANDA, A. & DEL OLMO, M.I.M. Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several ALD genes and is mediated by the general stress response pathway. **Yeast**, v. 20, n.8, p. 747-59, 2003.

ATTFIELD, P.V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nature Biotechnol**, v.15, n.1, p.1351–1357, 1997.

ÁVILA, J.; GONZÁLEZ, C.; BRITO, N.; SIVERIO, J.M. Clustering of the *YNA1* gene encoding a Zn(II)₂Cys₆ transcriptional factor in the yeast *Hansenula polymorpha* with the nitrate assimilation genes *YNT1*, *YNI1* and *YNR1*, and its involvement in their transcriptional activation. **Biochemical Journal**, v 335, n.1, p.647–652, 1995.

ÁVILA, J.; GONZALEZ, C.; BRITO, N.; MACHIN, F.; PÉREZ, M.D.; SIVERIO, J.M. A second Zn(II)₂Cys₆ transcriptional factor encoded by the *YNA2* gene is indispensable for the transcriptional activation of the genes involved in nitrate assimilation in the yeast *Hansenula polymorpha*. **Yeast**, v.19, n.6, p. 537-544, 2002.

BARBOZA-NETO, A.G.; PESTANA-CALSA, M.C.; DE MORAIS, M.A. JR; CALSA, T. JR. Proteome responses to nitrate in bioethanol production contaminant *Dekkera bruxellensis*. **Journal of. Proteomics**. v.104, n. 2, p. 104-111, 2014.

BASÍLIO, A.C.M.; ARAÚJO, P.R.L.; MORAIS, J.O.F.; SILVA-FILHO, E.A.; MORAIS, M.A. JR; SIMÕES, D.A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 322–326, 2008.

BELTRAN, G.; NOVO, M.; ROZÈS, N.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 6, p. 625-632, 2004.

BLOMQVIST, J; EBERHARD, T.; SCHNURER, J.; PASSOTH, V. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Applied Microbial and Physiology**, v. 87, p. 1487–1497, 2010.

BORNEMAN, A.R.; ZEPPEL, R.; CHAMBERS, P.J.; CURTIN, C.D. Insights into the *Dekkera bruxellensis* genomic landscape: comparative genomics reveals variation in

ploidy and nutrient utilization potential amongst wine isolates. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 2, p. 1004161, 2014.

BUSTIN, S.A.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009

CHATONNET, P.; DUBOURDIE, D.; BOIDRON, J. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeast and lactic acid bacteria on the ethyl phenol content of red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 46, p. 463-468, 1995.

CHATONNET, P.; VIALA, C.; DUBOURDIEU, D. Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 48, p. 443-448, 1997.

CLAUSSEN, N.H. On a method for the application of Hansen's pure yeast system in the manufacturing of well-conditioned English stock beers. **Journal of Institute of Brewing**, v. 10, p. 308-331, 1904.

CONTERNO, L.; JOSEPH, C.; ARVIK, T.J.; HENICK-KLING, T.; BISSON, L.F. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, n. 2, p. 139-146, 2006.

COOPER, T.G. Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. **FEMS Microbiology. Reviews**, v. 26, n.3, p. 223–38, 2002.

CRAUWELS, S.; VAN ASSCHE, A.; DE JONGE, R.; BORNEMAN, A.R.; VERRETH, C.; TROELS, P.; DE SAMBLANX, G.; MARCHAL, K.; VAN DE PEER, Y.; WILLEMS, K.A.; VERSTREPEN, K.J.; CURTIN, C.D.; LIEVENS, B. Comparative phenomics and targeted use of genomics reveals variation in carbon and nitrogen assimilation among different *Brettanomyces bruxellensis* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 9, n. 21, p. 9123-9134, 2015.

CURTIN C.D.; AND PRETORIUS, I.S. Genomic insights into the evolution of industrial yeast species *Brettanomyces bruxellensis*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 7, p. 997-1005, 2014.

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

DE BARROS PITA, W.; CASTRO SILVA, D.; SIMÕES, D.A.; PASSOTH, V.; DE MORAIS M.A JR. DE SOUZA LIBERAL A.T.; *ET AL.* Physiology and gene expression profiles of *Dekkera bruxellensis* in response to carbon and nitrogen availability. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 104, p. 855-868, 2013a.

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 Research**, v. 30, p. 111–117, 2013b.

DE SOUZA LIBERAL, A.; BASILIO, A.; DO MONTE RESENDE, A.; BRASILEIRO, B.; DA SILVA FILHO, E.; DE MORAIS, J.; SIMÕES, D.; DE MORAIS, M.A. JR. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal Applied Microbiology**, v.102, n. 2, p. 538-547, 2007.

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 Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 2473–2478, 2012.

DICKINSON, J. R.; SALGADO, L. E.; HEWLINS, M.J. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8028-34, 2003.

DONATON, M.C.; HOLSBECKS, I.; LAGATIE, O.; VAN ZEEBROECK, G.; CRAUWELS, M.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J.M. The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 911–929, 2003.

ESTELA-ESCALANTE, W.D.; RYCHTERA, M.; MELZUCH, K.; TORRES-IBÁÑEZ, F.; CALIXTO-COTOS, R.; BRAVO-ARANÍBAR, N.; MEMENZA-ZEGARRA, M.E.; CHÁVEZ-GUZMÁN, Y.M. Efecto de la aireación en la producción de compuestos volátiles por cultivo mixto de *Brettanomyces intermedius* y *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación de sidra. **TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas**, v. 17, n.1, p. 5-14, 2014.

GALAFASSI, S.; MERICO, A.; PIZZA, F.; HELLBORG, L.; MOLINARI, F.; PIŠKUR, J.; COMPAGNO, C. *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 1-10, 2011.

GALAFASSI, S.; CAPUSONI, C.; MOKTADUZZAMAN, M.; COMPAGNO, C. Utilization of nitrate abolishes the "Custers effect" in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n.3-4, p. 297-303, 2013.

GALDIERI, L.; MEHROTRA, S.; YU, S.; VANCURA, A. Transcriptional Regulation in Yeast during Diauxic Shift and Stationary Phase. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 14, n. 16, p. 1089-1099, 2010.

LEITE, F.C.B.; BASSO, T.O.; DE BARROS PITA, W.; *et al.* Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. **FEMS Yeast Research**, v.13, n.1, p. 34-43, 2013.

LEMA, C.; GARCIA-JARES, C.; ORRIOLS, I.; ÂNGULO, L. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.47, p. 206-216, 1996.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **METHODS**, v.25, n.4, p. 402-408, 2001

MAGASANIK, B.; KAISER, C.A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **GENE**, v.290, n.1-2, p. 1-18, 2002.

MARZLUF, G.A. Genetic Regulation of Nitrogen Metabolism in the Fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n.1, p. 17-32, 1997.

MILLER, S.M.; MAGASANIK, B. Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v.172, n. 9, p. 4927-35, 1999.

MITRAKUL, C.; HENICK-KLING, T.; EGLI, C. Discrimination of *Dekkera/Brettanomyces* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. **Food Microbiology**, v.16, n.5, p. 3-14, 1999.

MOLINA, F.I.; SHEN, P.; JONG, S.C. Validation of the species concept in the genus *Dekkera* by restriction analysis of genes coding for rRNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, n. 1, p.32-35, 1993.

MOORE, P.A.; SAGLIOCCO, F.A.; WOOD, R.M.; BROWN, A.J. Yeast glycolytic mRNAs are differentially regulated. **Molecular and Cellular Biology**, v.11, n.10, p. 5330-5337, 1991.

OYEDOTUN, K.S.; LEMIRE, B.D. The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n.10, p. 9424-31, 2004.

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

PIŠKUR, J.; ROZPEDOWSKA, E.; POLAKOVA, S.; MERICO, A.; COMPAGNO, M.A. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends in Genetics**, v. 22, n.4, p. 183–186, 2006.

PIŠKUR, J.; LING, Z.; MARCET-HOUBEN, M.; ISHCHUK, O.P.; AERTS, A.; LABUTTI, K.; COPELAND, A.; LINDQUIST, E.; BARRY, K.; COMPAGNO, C.; LINDA BISSON, L.; GRIGORIEV, I.V.; GABALDÓN, T.; PHISTER, T. The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, n. 2, p. 202-209, 2012.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **YEAST Review**, v.16, n. 8, p. 675–729, 2000.

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

RITCHIE, M.E.; SILVER, J.; OSHLACK, A.; HOLMES, M.; DIYAGAMA, D.; HOLLOWAY, A.; SMYTH, A. G. A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. **Bioinformatics**, v. 23, n. 20, p. 2700–2707, 2007.

RÖDER, C.; KÖNIG, H.; FRÖHLIC, J. Species specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. **FEMS Yeast Research**, v 7, n. 6, p. 1013-1026, 2007.

RODICIO, R.; STRAUSS, A.; HEINISCH, J. J. Single point mutations in either gene encoding the subunits of the heterooctameric yeast phosphofructokinase abolish allosteric inhibition by ATP. **Journal of Biological Chemistry**, 52, 40952-60, 2000

ROZPEDOWSKA, E.; HELLBORG, L.; ISHCHUK, O.P.; ORHAN, F.; GALAFASSI, S.; MERICO, A.; WOOLFIT, M.; COMPAGNO, C.; PISKUR, J. Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. **Nature Communications**, v. 2, n. 302. p. 1-7, 2011.

SCHIFFERDECKER, A.J.; DASHK, S.; ISHCHUK, O.P.; PIŠKUR, J. The wine and the beer yeast *Dekkera bruxellensis*. **YEAST**, v. 31, n. 9, p. 323-332, 2014.

SCHEFE, J.H.; LEHMANN, K.E.; BUSCHMANN, I.R.; UNGER, T. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. **Journal of Molecular Medicine**, v. 84, n. 11, p. 901-910, 2006.

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

SMYTH, G.K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, v.3, n. 1, p. 1-25, 2004.

VAN DER WALT, J. *Dekkera*, a new genus of the Saccharomycetaceae. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 30, n. 1, p. 273-280, 1964.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n.7, p. 034, 2002.

VAN ZEEBROECK, G.; BONINI, B.M.; VERSELE, M.; THEVELEIN, J.M. Transport and signaling via the amino acid binding site of the yeast Gap1 amino acid transceptor. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 1, p. 45–52, 2009.

WANG, X.; MANN, C.J.; BAI, Y.; NI, L.; WEINER, H. Molecular cloning, characterization, and potential roles of cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases in ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 4, p. 822-830, 1998.

WANG, J.; NYGAARD, V.; SMITH-SORENSEN, B.; HOVIG, E.; MYKLEBOST, O. MArray: analysing single, replicated or reversed microarray experiments. **Bioinformatics**, v.18, n. 8, p. 1139–1140, 2002.

WIEBE, M.G.; RINTALA, E.; TAMMINEN, A.; SIMOLIN, H.; SALUSJARVI, L.; TOIVARI, M.; KOKKONEN, J.T.; PENTTILA, M. Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic, oxygen-limited and fully aerobic steady-state conditions and following a shift to anaerobic conditions. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 1, p. 140-154, 2008.

WEUSTHUIS, R.A.; VISSER, W.; PRONK, J.T.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. **Microbiology**, v. 140, n. 4, p. 703-715, 1994.

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