

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

Fisiologia molecular da levedura *Dekkera bruxellensis*

Fernanda Cristina Bezerra Leite

Recife, Fevereiro de 2012.

Fernanda Cristina Bezerra Leite

Fisiologia molecular da levedura *Dekkera bruxellensis*

Tese de doutoramento apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, na Área de concentração Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Ardaillon Simões

Recife, Fevereiro de 2012.

Catálogo na Fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Leite, Fernanda Cristina Bezerra
Fisiologia molecular da levedura *Dekkera bruxellensis*/ Fernanda Cristina Bezerra Leite– Recife: O Autor, 2012.

94 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antonio de Moraes Júnior

Coorientador: Diogo Ardaillon Simões

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Leveduras 2. Fungos- aplicações industriais 3. Etanol I. Moraes Junior, Marcos Antonio de (orientador) II. Simões, Diogo Ardaillon III. Título**

579.563

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2012- 238

FERNANDA CRISTINA BEZERRA LEITE

Fisiologia molecular da levedura *Dekkera bruxellensis*

Tese de doutorado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte do requisito à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Biotecnologia.

Aprovada em _____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior (Presidente)
Departamento de Genética - UFPE

Prof. Dr. Diogo Ardaillon Simões (Membro externo)
Departamento de Bioquímica - UFPE

Profa. Dra. Monica MonteroLomeli (Membro externo)
Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ

Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert (Membro externo)
Engenharia Química – POLI-USP

Prof. Dr. Roberto Dias Lins Neto (Membro externo)
Departamento de Química Fundamental - UFPE

Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva (Suplente)
Departamento de Bioquímica – UFPE

Profa. Dra. Maria Teresa dos Santos Correia (Suplente)
Departamento de Bioquímica – UFPE
Recife, 29 de fevereiro de 2012.

DEDICATÓRIA

Ao meu grande amor, meu esposo, meu porto seguro...

George Inacio.

Aos meus pais e irmãos,
pela família que formamos e que nunca falta.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas possibilidades concedidas para a minha trilha profissional e pela serenidade com a qual consigo lidar no trajeto a ser trilhado.

Aos meus orientadores Prof. Marcos Morais e Prof. Diogo Simões, pelo conhecimento compartilhado, pela confiança e oportunidade de participar do Núcleo de Engenharia Metabólica onde obtive grande formação profissional. Muito obrigada!

Aos meus pais, Severino e Betânia, por todo o alicerce e apoio incondicional durante estes 4 longos anos de doutoramento. Os laços que formam nossa família nos tornam fortes para enfrentar qualquer que seja o desafio.

Aos meus irmãos, Flávia, Fernando e Flávio, por todas as alegrias e conquistas compartilhadas, esta é mais uma que tenho o prazer de dividir com vocês.

Ao meu esposo George Inacio, pelo amor incondicional, pela compreensão e paciência nos momentos de tribulações nestes anos. Poder contar com ele na minha caminhada, qualquer que seja, é sinônimo de segurança. ...e por me mostrar que “Nada resiste ao trabalho!”

Aos amigos do Núcleo de Engenharia Metabólica pela amizade e convivência diária, pelo conhecimento compartilhado e colaboração durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Andreas Gombert e seus alunos Thiago Basso e Bianca Eli Della Bianca, pelo conhecimento compartilhado durante treinamento em seu laboratório LEB-USP no período de setembro a dezembro de 2010, onde ensaios em reatores foram realizados. Agradeço ainda aos integrantes do Grupo de Engenharia de Bioprocessos pela amizade e convivência durante este estágio.

Aos amigos Karinna, Elainy, Helder, André Luiz, Júlia, Carla, Filipe, Larissa e Eliane pela amizade, pelas discussões profissionais (ou não!!!) e pela torcida para que esta etapa profissional pudesse ser concluída com êxito.

A FACEPE pela concessão de Bolsa de Pós-graduação durante os quatro anos de doutoramento e Auxílio a Mobilidade Discente que possibilitou o estágio no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, no Departamento de Engenharia Química, USP-SP.

RESUMO

A levedura *Dekkera bruxellensis* tem sido identificada como principal contaminante do processo industrial de produção de álcool combustível e em vinícolas, mas estudos recentes mostraram que linhagens desta espécie podem apresentar rendimentos em etanol comparáveis aos mostrados por *Saccharomyces cerevisiae*, o principal microrganismo fermentador. Apesar de ter se mostrado um microrganismo bastante atrativo para aplicações industriais, poucos trabalhos têm sido dedicados ao estudo de sua fisiologia. Este trabalho teve por objetivo descrever a fisiologia da linhagem industrial da levedura *D. bruxellensis* GDB 248 quanto ao seu metabolismo de açúcares e o efeito repressor que a glicose exerce sobre o metabolismo do carbono. Foram realizados cultivos em frascos em diferentes fontes de carbono e em quimiostatos limitados em glicose ou sacarose. Nos experimentos em frascos com hexoses ou dissacarídeos, valores para taxas de crescimento e rendimentos em etanol e acetato foram calculados e nenhuma formação de piruvato, succinato ou glicerol foi observada. A análise elementar da biomassa de *D. bruxellensis* resultou na composição elementar $\text{CH}_{1.754}\text{O}_{0.583}\text{N}_{0.149}$ e o grau de redução (Nox) para esta biomassa se mostrou muito próximo ao descrito para a biomassa de *S. cerevisiae*. Nos experimentos em regime de quimiostato, o metabolismo desta levedura foi completamente respiratório e todo o açúcar consumido (glicose ou sacarose) foi convertido em apenas biomassa atingindo rendimento cerca de 25% maior que o observado para *S. cerevisiae*. Além disso, pulsos de glicose foram aplicados aos quimiostatos limitados em glicose ou sacarose e os resultados mostraram que as células de *D. bruxellensis* apresentam o efeito *Crabtree* observado pela rápida produção de etanol, mesmo em presença de oxigênio. No pulso de glicose aplicado ao quimiostato limitado em sacarose, foi observado o acúmulo de sacarose no reator, indicando a presença de mecanismo de repressão catabólica por glicose nestas células. Para avaliar o efeito repressor da glicose, a expressão relativa do gene *DbFBP1* foi analisada por PCR em tempo real e foi observado que este gene está sujeito a uma forte regulação repressora exercida pela proteína quinase A em resposta a disponibilidade de glicose. Os dados deste trabalho possibilitaram uma melhor compreensão acerca da capacidade de conversão de diferentes açúcares a etanol, apesar da tendência ao metabolismo respiratório apresentado pelas células de *D. bruxellensis* e ainda foram gerados os primeiros dados a cerca do efeito repressor da glicose sobre o metabolismo destas fontes de carbono. Por fim, diante da escassez de dados genômicos para esta espécie, foi realizado um estudo para validar genes de referência para normalização de dados de ensaios de expressão gênica por PCR em tempo real. Os resultados mostraram que os genes *DbEFA1*, *DbEFB1* e *DbYNA1* são suficientemente estáveis para esta aplicação e que o método geNorm é, de fato, o mais adequado para esta análise.

Palavra-chave: *Dekkera bruxellensis*, fisiologia de levedura, cultivos em quimiostato, repressão catabólica por glicose, expressão gênica por PCR em tempo real.

ABSTRACT

The yeast *Dekkera bruxellensis* has been identified as a major contaminant of the industrial process to produce fuel alcohol and wine, but recent studies has shown that strains of this species can present ethanol yields comparable to those shown by *Saccharomyces cerevisiae*, the main microorganism fermentor. Despite having been showed a very attractive organism for industrial applications, few studies have been devoted to study of their physiology. This study aimed to describe the physiology of industrial strain GDB 248 of the yeast *D. bruxellensis* on the metabolism of sugars and the glucose catabolite effect on the metabolism of carbon. Cultivations were performed at shake flasks containing diverse carbon sources and at glucose or sucrose-limited chemostats. In the experiments at flasks, values for growth rates and ethanol and acetate yields were calculated and no formation of pyruvate, succinate or glycerol was observed. The elemental analysis of the biomass of *D. bruxellensis* cells resulted in the elemental composition $\text{CH}_{1.754}\text{O}_{0.583}\text{N}_{0.149}$ and the degree of reduction (Nox) for this biomass proved to be similar than that described for the biomass of *S. cerevisiae*. In the chemostats experiments, the metabolism of *D. bruxellensis* cells was completely respiratory and all sugar (glucose or sucrose) consumed was converted into biomass. This resulted in a biomass yield about 25% higher than that observed for *S. cerevisiae*. In addition, glucose pulses were applied to the glucose or sucrose-limited chemostats and these results showed that *D. bruxellensis* has a short-term *Crabtree* effect. This effect is observed by the rapid production of ethanol, even in the presence of oxygen. When glucose pulse was applied to the sucrose-limited chemostats, we observed the accumulation of sucrose in the reactor, indicative of the presence of the glucose catabolite repression mechanism in *D. bruxellensis*. To evaluate the repressive effect of glucose, the relative expression of the *DbFBP1* gene was analyzed by real-time PCR and it was observed that this gene is strongly repressed by kinase protein A in response to glucose availability. The data in this study allowed a better understanding about the capacity of conversion of different sugars to ethanol, despite the tendency to respiratory metabolism displayed by cells of *D. bruxellensis* and we released the first set of data about the glucose catabolite repression on the metabolism of these carbon sources. Finally, due to lack of genomic data for this species, a study was conducted to validate reference genes for normalization of data from trials of gene expression by real-time PCR. The results showed that genes *DbEFA1*, *DbEFB1* *DbYNA1* and are sufficiently stable for this application and that the method geNorm is indeed the most appropriate for this analysis.

Key words: *Dekkera bruxellensis*, yeast physiology, chemostat cultivation, glucose catabolite repression, gene expression by qPCR.

Lista de Figuras

Revisão bibliográfica	Página
Figura 1 - Árvore filogenética das espécies do gênero <i>Dekkera</i> baseada na sequência de DNA ribossomal 26S (Rozpedowska et al., 2011)	6
Figura 2 - Células da linhagem industrial de <i>Dekkera bruxellensis</i> GDB 248. Microscopia de contraste de fase	6
Figura 3 - Via de sinalização dependente da Proteína quinase A em células de <i>S. cerevisiae</i> (Thevelein, 1999)	14

Artigo 1

Figure 1 - Global distribution of Cq values for candidate reference genes.	38
Figure 2 - Effect of the normalization strategy on the expression ratios of <i>DbYNR1</i> , <i>DbUBA4</i> , <i>DbADH7</i> and <i>DbTPS1</i> genes of <i>Dekkera bruxellensis</i> .	39

Artigo 2

Figure 1 - Growth curve of <i>Dekkera bruxellensis</i> industrial strain GDB 248	53
Figure 2 - Flask cultivations of <i>Dekkera bruxellensis</i> industrial strain GDB 248.	56
Figure 3 - Residual glucose and production of ethanol and acetate (panels A and B) and rates of glucose consumption and ethanol and acetate production (panels C and D) following pulse of glucose to 50 mM of steady state chemostat on glucose.	63

Artigo 3

Figure 1 - Effect of 2-deoxy-glucose (2DG) and 6-deoxy-glucose(6DG) on metabolism of diverse carbon source in cells of <i>D. bruxellensis</i> .	81
Figure 2 - Relative quantification by RT-qPCR of <i>DbFBP1</i> gene at <i>D. bruxellensis</i> cells submitted to glycerol, ethanol or maltose supplemented with 2DG.	83
Figure 3 - Trehalase activity at <i>D. bruxellensis</i> cells submitted to fermentable and non-fermentable carbon source.	84

Lista de Tabelas

Artigo 1

Página

Table 1. Primers used for RT-qPCR assays.	36
---	----

Artigo 2

Table 1. Specific growth rates of <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 strain grown on different carbon sources.	54
Table 2. Chemical composition of <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 biomass.	57
Table 3. Data from aerobic, C-limited chemostat cultures of <i>D. bruxellensis</i> GDB248 industrial strain growing on glucose or sucrose at $D=0.1 \text{ h}^{-1}$.	58
Table 4. Measured and estimated conversion rates for <i>D. bruxellensis</i> cells in aerobic glucose-limited chemostat ($D=0.1 \text{ h}^{-1}$).	59
Table 5. Residual substrate at C-limited chemostat for <i>D. bruxellensis</i> and <i>S. cerevisiae</i> cells and invertases activity at sucrose-limited chemostat, at aerobic conditions ($D=0.1 \text{ h}^{-1}$).	62

Lista de abreviações

NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
ATP	Adenosina trifosfato, do inglês Adenosine triphosphate
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
PFGE electrophoresis	Eletroforese em gel de campo pulsátil, do inglês Pulsed field gel electrophoresis
CO ₂	Dióxido de carbono
pH	Potencial hidrogeniônico
YNB	YeastNitrogen Base
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês Deoxyribonucleic acid
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês Ribonucleic acid
mRNA	RNA mensageiro
cDNA	DNA complementar
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês Polymerase chain reaction
RT-qPCR	PCR quantitativa com transcrição reversa
qPCR	PCR quantitativa
pb	Pares de base
QR	Quantificação Relativa
OD	Densidade óptica, do inglês optical density

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1. A levedura <i>Dekkera bruxellensis</i>	15
1.1 Genômica da levedura <i>Dekkera bruxellensis</i>	17
1.2 - Fisiologia de levedura <i>Dekkera bruxellensis</i>	18
1.3 Regulação do metabolismo central em leveduras	23
1.4 <i>Dekkera bruxellensis</i> no contexto industrial de produção de álcool combustível	25
2. Método de cultivo para ensaios de fisiologia quantitativa	26
3. Expressão gênica por PCR em tempo real	27
OBJETIVOS	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ARTIGO 1	42
Validation of Reference Genes for a Quantitative Expression Analysis by RT-qPCR in the yeast <i>Dekkera bruxellensis</i>	42
ARTIGO 2	56
Quantitative aerobic physiology of the yeast <i>Dekkera bruxellensis</i> , a major contaminant in bioethanol production plants.	56
ARTIGO 3	84
Catabolite repression in the yeast <i>Dekkera bruxellensis</i>	84
ANEXOS COMPLEMENTARES	100

INTRODUÇÃO

A levedura *Dekkera bruxellensis* tem sido isolada de diversas destilarias de produção de álcool combustível no Nordeste do Brasil e em vinícolas em todo o mundo. Nos trabalhos inicialmente publicados, a *D. bruxellensis* despertou a atenção por ter sua presença, na maioria dos casos, associada à queda nos rendimentos em etanol nas destilarias e a mudanças no aroma e sabor de vinhos. Por este motivo, as primeiras publicações focaram em descrição de métodos moleculares de detecção e quantificação de linhagens de *D. bruxellensis* sendo um número muito restrito de publicações dedicadas ao estudo de sua fisiologia.

Apesar do longo histórico que associa a presença de *D. bruxellensis* a quedas nos rendimentos em etanol, atualmente alguns trabalhos tem demonstrado que isolados industriais desta espécie são capazes de produzir etanol a rendimentos atrativos apesar da produtividade ser menor, quando comparada a linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Diante disto, o interesse em estudar a fisiologia desta espécie tem crescido, mas o número de publicações com esta abordagem ainda é pequeno. Esses trabalhos tem descrito a produção de etanol e acetato para linhagens de *D. bruxellensis* em diferentes condições de cultivos, desde variação na fonte de carbono e sua concentração inicial até a disponibilidade de oxigênio, que está intimamente relacionada às taxas de produção de acetato como segundo principal subproduto da fermentação alcoólica.

No artigo intitulado “**Quantitative physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in the bioethanol fermentation process**” foi realizada a primeira caracterização fisiológica quantitativa de uma linhagem de *D. bruxellensis* em cultivos em frascos e em quimiostato limitado em carbono incluindo análise com balanço de massas, cálculo de rendimentos e descrição da composição elementar da biomassa.

Em 2007, foram divulgados os primeiros dados genômicos para a espécie *D. bruxellensis* com a publicação parcial de seu genoma. A partir desta publicação, dois principais trabalhos trataram de aplicar a técnica de expressão gênica por PCR em tempo real para estudar o comportamento desta espécie relacionado ao metabolismo central de carbono e assimilação de nitrato. A escassez destes dados genômicos nos motivou a realizar um estudo para facilitar a aplicação desta técnica. No artigo intitulado “**Validation of Reference Genes for a Quantitative Expression Analysis by RT-qPCR in the yeast *Dekkera bruxellensis***” foi realizado um estudo para avaliar a estabilidade do pequeno número de genes de referência disponíveis para esta espécie

quando utilizados para estudar expressão de genes referentes a diferentes metabolismos como metabolismo central do carbono, assimilação de nitrato e resposta a estresse. A validação deste grupo de genes de referência promoverá um avanço nos estudos de expressão gênica em *D. bruxellensis* diante da disponibilidade parcial do seu genoma.

Por fim, numa tentativa de melhor compreender a resposta celular a disponibilidade de glicose, propusemos um trabalho abordando o efeito repressor da glicose sobre o metabolismo de fontes alternativas de carbono. O artigo intitulado “**Catabolite repression at the yeast *Dekkera bruxellensis***” aborda aspectos de resposta e adaptação celular a presença de glicose no meio.

Embora a levedura *D. bruxellensis* tenha se mostrado um microrganismo bastante atrativo, seja para estudos em laboratório ou para aplicações industriais, apenas um pequeno número de grupos de pesquisa tem a ela se dedicado. Dentre estes grupos, destacam-se o grupo sueco coordenado pelo Prof. Jure Piskur, que tem coordenado o sequenciamento de seu genoma e desenvolvem estudos a cerca de relações filogenéticas entre espécies de leveduras; o grupo também sueco do Prof. Volkmar Passoth, que tem se dedicado a responder questões fisiológicas e de como esta levedura interage com outros microrganismos presentes em vinícolas como a *S. cerevisiae* e bactérias da espécie *Lactobacillus vini*; e o nosso grupo de pesquisa, coordenado pelo Prof. Marcos Morais, dedicado também a tratar da descrição fisiológica e genômica desta espécie com a particularidade de abordar situações miméticas ao processo industrial, o qual é caracterizado por ser um ambiente bastante adverso a sobrevivência destas células, na tentativa de compreender seus mecanismos de adaptação a este ambiente.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. A levedura *Dekkera bruxellensis*

A levedura *Dekkera bruxellensis* (anamorfo *Brettanomyces bruxellensis*) pertence à família Saccharomycetacea e é considerado um parente distante de *Saccharomyces cerevisiae*, ambos os gêneros fazendo parte do grupo dos hemiascomicetos e que divergiram há cerca de 200 milhões de anos. Os primeiros relatos desta levedura estão associados a sua presença em cervejarias inglesas sendo a elas atribuídas certas características aromáticas resultantes da fermentação secundária (CLAUSSEN, 1904).

Em 1940, o gênero *Brettanomyces* foi estabelecido e mais tarde, em 1964, foi criado o gênero *Dekkera* após a observação de formação de ascósporos em algumas linhagens de *Brettanomyces* (VAN DER WALT, 1964). Atualmente, esta levedura tem sido identificada como um importante contaminante da produção de vinho em vários países europeus e a ela tem sido atribuído aromas e sabores indesejáveis resultantes da produção de metabólitos secundários como os fenóis voláteis 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol produzidos a partir de ácidos fenólicos presentes no mosto de uva (CHATONNET et al., 1992). Trabalhos recentes tem identificado *D. bruxellensis* como sendo o principal contaminante do processo industrial para a produção de álcool combustível no Nordeste brasileiro (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; BASÍLIO et al., 2008) sendo sua presença associada à queda na produtividade de etanol.

A validação do gênero *Dekkera* (Figura 1, ROZPEDOWSKA et al., 2011), realizada a partir das análises de restrição dos genes que codifica a subunidade pequena do RNA ribossômico, estabeleceu a equivalência entre os gêneros *Brettanomyces* (anamorfo) e *Dekkera* (teleomorfo) e suas espécies (MOLINA et al., 1993). Atualmente, apenas cinco espécies são reconhecidas como pertencentes a este gênero: *D. bruxellensis*, *D. anomala*, *B. custersianus*, *B. nanus* e *B. naardenensis* (MITRAKUL et al., 1999; RÖDER et al., 2007).

A morfologia das células da levedura *D. bruxellensis* é bastante diversificada, podendo apresentar-se na forma elipsoidal a esférica, frequentemente ogival, e ainda cilíndrica a alongada (Figura 2). Frequentemente, é observada a formação de pseudomicélio (VAN DER WALT, 1964).

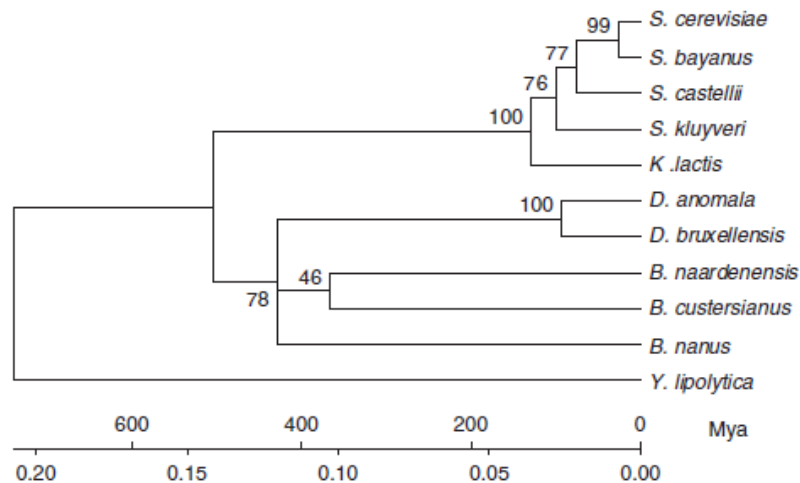


Figura 1 - Árvore filogenética das espécies do gênero *Dekkera* baseada na análise de restrição da sequência de DNA ribossomal 26S (ROZPEDOWSKA et al., 2011)

A linhagem industrial de *D. bruxellensis* GDB 248 (Figura 2) foi isolada durante um trabalho de descrição de espécies contaminantes não-*Saccharomyces* de amostras de dornas de fermentação de destilarias da região Nordeste (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007). Desde então, esta linhagem tem sido proposta como linhagem-padrão da fermentação alcoólica industrial para as pesquisas acerca da genética e da fisiologia desta espécie em virtude de sua alta adaptabilidade ao processo industrial quando comparada a células de *S. cerevisiae*.

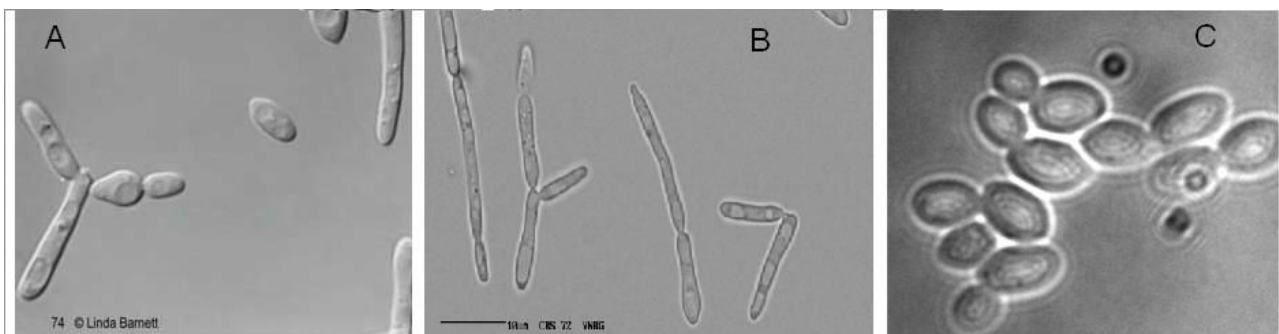


Figura 2 - Linhagens da espécie *Dekkera bruxellensis*. (A) Linhagem CBS 74 (<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/>); (B) Linhagem CBS 2499 (<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/>); (C) Linhagem industrial GDB 248 em meio YPD (Microscopia de contraste de fase).

As espécies *Dekkera bruxellensis* e *Saccharomyces cerevisiae* compartilham semelhanças fisiológicas interessantes. Dentre estas, ambas são tolerantes a etanol, são microrganismos anaeróbicos facultativos, e são classificadas como *Crabtree* positivas, que diz respeito a capacidade e preferência pelo metabolismo fermentativo quando em presença de elevadas concentrações de glicose sob condição aeróbica (WOOLFIT et al., 2007). Outra semelhança também descrita para estas duas espécies é a característica *petite* positiva, a qual descreve a capacidade das células sobreviverem sem DNA mitocondrial. Pesquisas tem indicado que este conjunto de características evoluíram independentemente nestes dois grupos, possivelmente em resposta a pressões seletivas semelhantes.

1.1 Genômica da levedura *Dekkera bruxellensis*

Análises de cariotipagem por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) mostraram que o genoma de *Dekkera* possui um tamanho bastante variável sendo estimado um genoma compreendido na faixa de 20 a 30 Mb (SIURKUS, 2004). Nas linhagens isoladas da fermentação industrial de caldo de cana este número cromossômico parece variar entre 4 a 6 cromossomos possuindo tamanhos entre 0,67 Mb e 5,7 Mb (LIBERAL, 2010). Estes dados são semelhantes aos encontrados por Miot Sertier e colaboradores (2007) que caracterizaram o kariograma de linhagens de *D. bruxellensis* isoladas de vinícolas como sendo formado por um pequeno número de cromossomos e pela ausência de cromossomos pequenos e médios.

Em 2007, uma iniciativa de sequenciamento do genoma de um isolado de vinícolas da levedura *D. bruxellensis* resultou nas primeiras informações a cerca do seu genoma. De acordo com este estudo, o genoma de *D. bruxellensis* deve conter cerca de 7.340 genes, número este que se enquadra dentro da expectativa para o grupo dos hemiascomicetos (WOOLFIT et al., 2007). Foram identificadas 2.606 sequências completas ou parciais de genes codificadores de proteínas ortólogos a genes de *S. cerevisiae* e outros 277 não ortólogos *S. cerevisiae*, mas ortólogos a outras espécies Saccharomycetales, por exemplo, *Candida albicans*, *Hansenula polymorpha* e *Pichia pastoris* (WOOLFIT et al., 2007). As proteínas ortólogas entre *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* apresentam cerca de 48,8% de identidade em aminoácidos enquanto *S. cerevisiae* e *C. albicans* compartilham de 52,9% de identidade. De acordo com Woolfit et al. (2007), se considerarmos que a divergência entre estas três espécies é uma tricotomia na árvore filogenética, é plausível sugerir que *D. bruxellensis* possua uma taxa de evolução de aminoácidos maior que *C. albicans*.

Sequências do DNA ribossomal foram descritas em quase sua totalidade e compreendem regiões do 18S, 5.8S 25S e 5S (WOOLFIT et al., 2007). Estas sequências têm sido bastante utilizadas para construções de árvores filogenéticas como também em métodos de discriminação de linhagens de leveduras presentes em processos industriais (LOUREIRO et al., 2003; DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; BASÍLIO et al., 2008; JENSEN et al., 2009).

As diferenças no conteúdo gênico podem explicar as variações de comportamento fisiológico entre *D. bruxellensis* e outras leveduras. A partir deste sequenciamento parcial do genoma de *D. bruxellensis*, proteínas ortólogas em ascomicetos que participam de várias vias metabólicas foram descritas, várias destas ausentes em *S. cerevisiae*. Dentre estas vias, merecem destaques (Woolfit et al. 2007):

- (I) A via de assimilação de nitrato, ortólogos a *Hansenula polymorpha*, estando presentes genes codificadores de fatores de transcrição (2 genes), transportador (1 gene), redutase (2 genes) específicos para esta via. A posição relativa e orientação destes genes diferem entre estas duas espécies;
- (II) Metabolismo de fontes alternativas de carbono, como o gene *LAC4*, ortólogo em *Kluyveromyces lactis*, codificador da enzima β -galactosidase, conferindo capacidade de metabolizar a lactose.
- (III) Genes codificadores de subunidades do complexo I da cadeia respiratória, ortólogos a *Debaryomyces hansenii*.
- (IV) Genes envolvidos no metabolismo de lipídeos que poderiam estar envolvidos na alta tolerância a etanol apresentada por esta espécie.

Diante desta informação genética, alguns grupos de pesquisa deram início à garimpagem no banco de dados do genoma em busca de genes importantes relacionados ao metabolismo fermentativo (LIBERAL, 2010; NARDI et al., 2010), via de assimilação do nitrato (DE BARROS PITA et al., 2011) e resposta a estresse ambiental e choque térmico (NARDI et al., 2010). Estes foram os primeiros dados divulgados sobre expressão gênica em *D. bruxellensis* baseados na expressão relativa determinada por PCR em tempo real.

1.2 - Fisiologia de levedura *Dekkera bruxellensis*

1.2.1 – Assimilação de açúcares

A levedura *D. bruxellensis* é capaz de assimilar uma grande variedade de fontes de carbono como os monossacarídeos glicose, frutose e galactose, e dissacarídeos, como sacarose, maltose, celobiose e trealose (CONTERNO et al., 2006). A capacidade de assimilar outras fontes de carbono como a lactose, arabinose e rafinose parece ser uma característica linhagem-específica e não atribuída a espécie como um todo. Atualmente, alguns trabalhos têm relatado dados mais qualitativos quanto ao comportamento desta levedura frente a esta diversidade de substratos, porém, ainda há uma grande carência de dados fisiológicos sobre esta espécie uma vez que a grande maioria dos trabalhos já publicados concentra-se muito mais na identificação desta espécie como levedura contaminante e sua relação filogenética com outras espécies dentro do grupo ascomycetos.

Dentre estas fontes de carbono, glicose, frutose e sacarose apresentam relevância industrial por fazer parte da composição de meios industriais como o caldo-de-cana e o melaço. O metabolismo de dissacarídeos pode diferir em apenas algumas etapas do metabolismo de monossacarídeos, como por exemplo, transporte e hidrólise, e o comportamento de *S. cerevisiae* na presença destes açúcares já é bem descrito (DIJKEN et al., 1993; BASSO et al., 2011). Em *D. bruxellensis*, sabe-se apenas sobre sua capacidade de assimilação, não havendo informação sobre tipo de invertase nem efeito repressor exercido pela glicose sobre os genes envolvidos neste metabolismo, características estas bem definidas para *S. cerevisiae*.

A investigação da possibilidade de assimilação e/ou fermentação de celobiose, xilose e arabinose por estes microrganismos tem sido abordada frente ao crescente interesse em utilizar-se hidrolisados ligno-celulósicos para geração de etanol de 2^a geração. Galafassi e colaboradores (2011) analisaram cerca de 50 linhagens pertencentes ao gênero *Dekkera/Brettanomyces* quanto ao seu potencial fermentativo relativo a estas fontes de carbono e encontraram linhagens de *D. bruxellensis* capazes de assimilar celobiose e amido, mas não xilose e arabinose. Dentre as linhagens analisadas, apenas três isolados de *B. naardenensis* foram capazes de assimilar xilose e arabinose. Blomqvist e colaboradores (2010) realizaram experimentos em condições limitantes de oxigênio e demonstraram que q linhagem de *D. bruxellensis* CBS 11269 é capaz de assimilar e fermentar o dissacarídeo celobiose, porém mais lentamente e menos eficientemente que glicose. A partir destes experimentos, os autores calcularam rendimentos em etanol iguais a 0,29 g (g celobiose)⁻¹ comparado a 0,41 g (g glicose)⁻¹.

A habilidade de células de leveduras em assimilar e degradar açúcares a compostos formados por dois carbonos, em especial etanol, tem um papel competitivo importante no ambiente natural. Esta característica constitui a estratégia de sobrevivência “*Make-Accumulate-Consume*” e as espécies que apresentam esta estratégia são caracterizadas por rápido consumo de açúcares, alta

capacidade em produzir e acumular etanol e excelente tolerância a este composto, resultando num melhor desempenho competitivo frente a outras espécies. Rozpedowska e colaboradores (2011) estudaram a aquisição desta estratégia no grupo *Dekkera/Brettanomyces*, o qual ocupa um nicho semelhante ao do grupo *Saccharomyces*. Apesar de estes grupos terem divergido antes do desenvolvimento desta estratégia, os dados apontam para a teoria de que houve uma evolução paralela entre eles uma vez que foram submetidos a pressões seletivas semelhantes no mesmo nicho. O desenvolvimento evolutivo desta estratégia está relacionado à presença do motivo AATTTT conservado nas regiões promotoras dos genes associados ao rápido crescimento enquanto que, em genes relacionados à respiração, este motivo não se apresenta numa região conservada. Assim, a presença deste motivo explicaria a regulação diferencial de genes em células que apresentam metabolismo respiratório ou fermentativo.

1.2.2 - O efeito *Crabtree* em células *Dekkera bruxellensis*

Características fisiológicas relevantes para *D. bruxellensis* tem sido descritas quanto ao tipo de metabolismo relacionado à disponibilidade de açúcar e oxigênio e sua formação de metabólitos (AGUILAR USCANGA et al., 2003). Células de *D. bruxellensis* são capazes de produzir etanol, mesmo em presença de oxigênio, quando submetidas a elevadas concentrações de glicose caracterizando assim o efeito *Crabtree* positivo (PROCHÁZKA et al., 2010).

Em *S. cerevisiae* e outras leveduras, este comportamento fisiológico tem sido explicado pela saturação da capacidade respiratória em re-oxidar o NADH resultante da glicólise. Este “gargalo” formado no nível do metabolismo do piruvato faz com que este seja direcionado ao metabolismo fermentativo, possibilitando que o NADH seja re-oxidado via fermentação alcoólica (PRONK et al., 1996).

1.2.3 – O efeito *Custers* em células de *Dekkera/Brettanomyces*

O efeito *Custers* é também descrito para este gênero e diz respeito à inibição da fermentação alcoólica como resultado da condição anaeróbica (WIJSMAN et al., 1984). Este efeito está relacionado a um desbalanço redox nestas células resultado da tendência de produzir acetato e da baixa capacidade de restaurar o balanço através da produção de metabólitos reduzidos, como o glicerol (WIJSMAN et al., 1984).

Scheffers (1966) postulou que este efeito *Custers* poderia ser explicado pela escassez de NAD^+ causada pelo seu uso para a oxidação do acetaldeído a acetato. O NADH resultante diminui a razão NAD^+/NADH com a simultânea diminuição do fluxo glicolítico, visto que a conversão da

glicose a etanol envolve um balanço redox fechado, e o NADH resultante de biossíntese e produção de acetato não pode ser reoxidado por este processo. Em condições aeróbicas, o NADH é reoxidado via cadeia respiratória. Em condições anaeróbicas, a glicose é reduzida a glicerol com concomitante reoxidação do NADH e gasto de ATP. Em células de *D. bruxellensis*, que apresentam reduzida capacidade de produzir glicerol, o efeito *Custers* pode ser abolido pela adição de oxigênio ou um aceptor orgânico de elétron, por exemplo, acetoína, ao meio, possibilitando que o NADH formado via glicólise e formação de acetato seja re-oxidado via cadeia respiratória (CARRASCOSA et al., 1981).

Alguns trabalhos descrevem a produção de glicerol em células de *D. bruxellensis*, porém em baixas quantidades as quais não são suficientes para restabelecer o balanço redox celular em anaerobiose. Galafassi e colaboradores (2011) mediram a atividade enzimática da glicerol 3-fosfato desidrogenase durante crescimento celular e observaram que sua atividade pode ser observada apenas em condições limitantes de oxigênio.

1.2.4 - Produção de ácido acético por *D. bruxellensis*

A capacidade de produzir ácido acético como subproduto da assimilação da glicose em condições aeróbicas é uma característica marcante das linhagens de *D. bruxellensis*. Em leveduras, o ácido acético pode ser produzido a partir da oxidação do acetaldeído. Durante o crescimento celular em glicose, o acetaldeído pode ser formado a partir do piruvato, produto final da glicólise no ponto de ramificação para as rotas fermentativa ou respiratória, ou, quando o crescimento celular ocorre em etanol como fonte de carbono, como produto da reação enzimática da álcool desidrogenase (POSTMA et al., 1989). A formação de ácido acético por células de *D. bruxellensis* tem sido descrita em ambas as fontes de carbono, glicose e etanol (FREER, 2002; AGUILAR USCANGA et al., 2003; FREER et al., 2003; BLOMQVIST et al., 2010).

Foi sugerido que a produção de ácido acético pudesse caracterizar uma vantagem competitiva destas células de *D. bruxellensis* frente a *S. cerevisiae* (DE MINIAC, 1989), porém, trabalhos posteriores mostram que a concentração de ácido acético necessária para inibir o crescimento de células de *S. cerevisiae* dificilmente seria atingida numa condição industrial, onde a limitação de oxigênio é um importante fator (PHOWCHINDA et al., 1995; ABBOTT et al., 2005; BLOMQVIST et al., 2010).

Yahara e colaboradores (2007) mostraram que o ácido acético em concentração superior a 2 g/L interfere negativamente no crescimento e afeta a capacidade fermentativa de *D. bruxellensis*. Porém, em experimentos conduzidos em cultivos contínuos e com condição limitante de oxigênio

(aproximadamente 5% - oxigênio dissolvido), Blomqvist (2011) observou que *D. bruxellensis* produziu pouco ácido acético em quantidades inferiores a 1 g/L, o que não caracteriza concentração suficiente para inibir a capacidade fermentativa de nenhuma das leveduras envolvidas no processo industrial, *D. bruxellensis* ou *S. cerevisiae*. Por outro lado, em condições limitantes de oxigênio, nenhuma produção de ácido acético foi observada para linhagens de *D. bruxellensis* (PEREIRA et al., 2011).

1.2.5 – Assimilação de fontes de nitrogênio

Quanto à assimilação de fontes de nitrogênio, sabe-se que as leveduras podem utilizar diversos compostos nitrogenados, incluindo amônia, aminoácidos, uréia e bases nitrogenadas (CONTERNO et al., 2006; GODARD et al., 2007), sendo o uso de nitrato e/ou nitrito restrito a umas poucas espécies de alguns gêneros (SIVERIO, 2002). *D. bruxellensis* apresenta esta capacidade de assimilar nitrogênio na forma de nitrato e isto pode conferir a esta levedura uma vantagem adaptativa ao processo de fermentação industrial quando comparada a *S. cerevisiae* (DE BARROS PITA et al., 2011). A indisponibilidade de nitrogênio na forma assimilável por *S. cerevisiae* pode ser um fator limitante para seu crescimento e, conseqüentemente, para sua manutenção nas dornas de fermentação. Assim, células de *D. bruxellensis* conseguem suplantam a população de *S. cerevisiae* (comunicação pessoal).

Em células de *Dekkera bruxellensis*, a via de assimilação de nitrato é composta por transportadores de alta afinidade (*DbYNT1*) e duas enzimas redutases, a nitrato (*DbYNRI*) e nitrito redutase (*DbYNII*). Esta dupla redução da molécula de nitrato resulta em amônia e re-oxidação de 4 moléculas de NAD(P)H (SIVERIO, 2002). De Barros Pita e colaboradores (2011), a partir de estudos de competição entre *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* em condições miméticas as industriais, demonstraram que *D. bruxellensis* é capaz de superar a população de *S. cerevisiae* em meios contendo uma maior concentração de nitrato e que isto pode ser um importante fator de adaptação àquela condição industrial frente às células de *S. cerevisiae*.

1.2.5 – Outros fatores que afetam o crescimento e metabolismo de *D. bruxellensis*

Outros trabalhos descrevem ainda o comportamento de células de *D. bruxellensis* quanto à variação de oxigênio (AGUILAR USCANGA et al., 2003) e temperatura (BRANDAM et al., 2007) e como estes parâmetros influenciam na formação de metabólitos extracelulares e interferem na

taxa de crescimento para linhagens de *D. bruxellensis*. Com relação ao efeito da disponibilidade de oxigênio sobre o metabolismo celular de *D. bruxellensis*, Aguilar-Uscanga e colaboradores (2003) observaram que a concentração de oxigênio disponível tem um efeito sobre a drenagem do substrato para a produção de etanol ou ácido acético. Assim, quanto mais aerado for o sistema de cultivo, as células de *D. bruxellensis* tendem a drenar mais carbono para a produção de ácido acético do que para etanol. Assim, esta mudança da produção de ácido acético para etanol é um fenômeno progressivo no qual o aumento no consumo de oxigênio e a diminuição na produção de etanol são compensados pela síntese deste ácido.

Bradam e colaboradores (2007) avaliaram a influência da temperatura sobre a fermentação, formação de metabólitos e taxa de crescimento da linhagem IHEM 6037 de *D. bruxellensis* e foi observado que, na faixa de temperatura entre 15 e 32°C, a formação de biomassa foi muito semelhante e que a temperatura de 35° C causou uma queda de 65% na formação de biomassa e de 40% na viabilidade celular para a linhagem por eles testada. Consequentemente, nesta mesma condição de 35° C, houve uma queda nas taxas de produção de biomassa e metabólitos como etanol e ácido acético.

A capacidade de crescimento e tolerância a ambientes com pH baixo tem sido investigada para linhagens de *D. bruxellensis*. Em um recente estudo, Blomqvist (2011) investigou a influência do pH e temperatura sobre a taxa de crescimento e o rendimento em etanol para uma linhagem industrial de *D. bruxellensis* e observou que a faixa de pH (3 a 5) e temperatura (25 a 37° C) testados não afetou os parâmetros analisados levando a conclusão de que *D. bruxellensis* é bastante resistente a mudanças nas condições ambientais. A tolerância a pH foi analisada por Rozpedowska e colaboradores (2011) que observaram que uma linhagem de *D. bruxellensis* foi capaz de crescer em meio com pH 2.3.

1.3 Regulação do metabolismo central em leveduras

A regulação do metabolismo respiratório e fermentativo é crucial para o sucesso de vários processos industriais que exploram a aplicação destes microrganismos de acordo com suas características metabólicas. A otimização da respiração passa a ser fundamental em aplicações relacionadas à produção de biomassa enquanto a otimização da fermentação desperta interesse quando a produção de etanol é desejável, seja para produção de combustível ou para bebidas fermentadas (WALKER, 1998).

Um dos principais mecanismos de adaptação das células ao ambiente é utilizar processos de regulação da expressão de genes principalmente em nível transcricional. A análise de expressão gênica tem demonstrado que um grande número de genes é diferencialmente transcrito em resposta a diferentes níveis de disponibilidade de glicose (CARLSON, 1999). Esta regulação, se induzida ou reprimida, é dependente da necessidade de resposta celular. Alguns genes são induzidos por glicose, por exemplo, os genes que codificam transportadores de glicose de baixa afinidade, enzimas glicolíticas e proteínas ribossomais. Por outro lado, há genes que são reprimidos por glicose, por exemplo, genes envolvidos na utilização de fontes alternativas de carbono, na gliconeogênese e respiração (GANCEDO, 1998).

Em *S. cerevisiae*, este mecanismo de resposta à disponibilidade de glicose é bem descrito e envolve uma complexa cascata de sinalização celular. Nesta levedura, a via de sinalização dependente da proteína quinase A (PKA) é formada por uma cadeia de proteínas que desempenha importante função em resposta a estas condições ambientais. A glicose no meio extracelular é percebida por um sistema receptor formado pelas proteínas Gpr1 e Gpa2, acopladas a proteína G, e pela proteína Cdc25. A Cdc25 atua via GTPase RAS e junto a Gpa2 irão ativar a adenilato ciclase que sintetizará AMPc aumentando seu nível intracelular. Este aumento nos níveis de AMPc ativa a enzima PKA para desempenhar sua função fosforilando enzimas regulatórias de vias metabólicas como a glicólise e via fermentativa (Figura 3) (THEVELEIN et al., 1999). Portanto, a disponibilidade de fontes de carbono e no meio leva a indução dos processos metabólicos relacionados com crescimento e proliferação celular, bem como com o próprio metabolismo fermentativo pela indução dos genes da via glicolítica. Em *D. bruxellensis*, este mecanismo de resposta ainda não foi descrito e supõe-se que alguma diferença neste sistema de percepção e sinalização celular pudesse justificar o melhor desempenho competitivo desta levedura frente à *S. cerevisiae* no ambiente industrial.

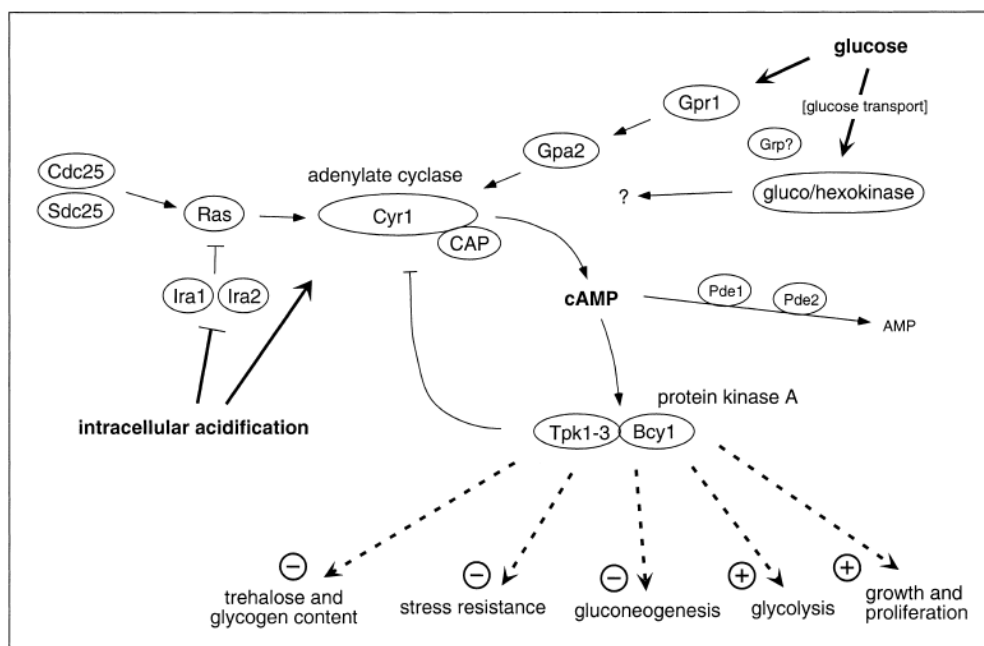


Figura 3 - Via de sinalização dependente da Proteína quinase A em células de *S. cerevisiae* (Thevelein, 1999). Sensores de membrana percebem a glicose disponível no meio e desencadeiam uma cascata de sinalização celular que resulta no aumento intracelular de cAMP e, conseqüente, na ativação da proteína quinase A. A PKA controla a expressão de genes envolvidos crescimento e proliferação celular, na gliconeogênese e na resistência a estresse.

1.4 *Dekkera bruxellensis* no contexto industrial de produção de álcool combustível

Isolados da espécie *D. bruxellensis* foram descritos como responsáveis pelos episódios de contaminação mais severos em destilarias do Nordeste do Brasil (BASÍLIO et al., 2008), mas também há relatos de severas contaminações em destilarias de álcool dos EUA e Canadá, onde a matéria-prima é o milho (ABBOTT et al., 2005), e ainda na Europa, onde o substrato é beterraba (DE MINAC, 1989; CIANI et al., 2003). A grande adaptabilidade desta levedura ao ambiente industrial tem induzido recentes estudos acerca da genética e fisiologia dos isolados industriais, além de estudos fisiológicos em condições controladas de laboratório utilizando condições que mimetizam o contexto industrial. Apesar dos trabalhos anteriores citarem esta espécie como contaminante industrial, este conceito tem mudado ao menos para o contexto de produção de álcool combustível. Dados atuais tem mostrado que a *D. bruxellensis* é capaz de produzir etanol a rendimentos atrativos próximos aos apresentados por *S. cerevisiae* (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; DE BARROS PITA et al., 2011) e foi proposta a utilização de linhagens de *D. bruxellensis*

em consórcio com *Lactobacillus vini* para a produção de etanol (PASSOTH et al., 2007). Por vezes, o problema associado a sua presença é a queda na taxa de produtividade uma vez que *D. bruxellensis* tende a fermentar mais lentamente que *S. cerevisiae* e, dependendo do processo, isto pode representar atraso na produção industrial (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007). Além disso, *D. bruxellensis* tem mostrado maior adaptação ao ambiente industrial quando comparada a *S. cerevisiae* e isto deve estar relacionado à maior tolerância a pH baixo e elevada resistência a etanol (ROZPEDOWSKA et al., 2011). Outra possível justificativa para este melhor desempenho industrial pode ser a capacidade para utilizar algum fator limitante do crescimento em competição direta com células de *S. cerevisiae*. Se *D. bruxellensis* é capaz de metabolizar um nutriente disponível mais eficientemente, ou se for capaz de captá-lo com maior afinidade do que *S. cerevisiae*, sua taxa de crescimento pode ser maior nesta condição particular (PITA, 2009).

2. Método de cultivo para ensaios de fisiologia quantitativa

A determinação do método de cultivo é uma etapa fundamental, seja em escala industrial ou de laboratório. A metodologia de cultivo em quimiostato foi desenvolvida como uma ferramenta para estudar aspectos quantitativos do crescimento e metabolismo microbiano e fornece a possibilidade de controle e manipulação de condições de cultivo como temperatura, disponibilidade de oxigênio, pH, nutrientes e taxa específica de crescimento, tornando a condição de cultivo bem definida. Este método permite estudos fisiológicos com apenas um parâmetro variável, sendo os demais mantidos constantes. Isto tem tornado o cultivo em quimiostato indispensável para estudos de fisiologia microbiana e biologia de sistemas (TER LINDE et al., 1999; WIEBE et al., 2008).

O sequenciamento massivo de vários genomas microbianos e o avanço tecnológico nas análises genômicas e fisiológicas, com técnicas que geram uma alta densidade de informação, a exemplo do *microarray* e proteômica, tornou-se notável a necessidade de um cuidadoso desenho experimental com alta reprodutibilidade uma vez que variações mínimas de parâmetros físico-químicos podem causar grandes mudanças na resposta celular a tais estímulos (PIPER et al., 2002). Em células de *S. cerevisiae*, estas mudanças na resposta celular já são, em parte, bem descritas. Por exemplo, dependendo da disponibilidade de oxigênio em culturas que utilizam glicose como fonte de carbono, a resposta fisiológica a variação deste parâmetro pode levar as células a apresentar metabolismo respiratório, respiro-fermentativo ou ainda apenas fermentativo (WIEBE et al., 2008; RINTALA et al., 2011). Assim, o cultivo em quimiostato possibilita o estudo do

crescimento microbiano sob condições físico-químicas constantes, induzindo uma taxa específica de crescimento constante. Por outro lado, o cultivo de microrganismos em batelada utilizando frascos agitados ou reatores biológicos é caracterizado como dinâmico e, assim, o crescimento microbiano acontece a uma taxa específica de crescimento máxima, ao menos nos intervalos de nos quais a disponibilidade dos nutrientes não é limitante, ou mesmo a concentração de compostos tóxicos está abaixo do limite de inibição celular. Entretanto, a condição de cultivo muda ao longo do tempo e, dependendo do sistema de cultivo, favorece o aparecimento de um gradiente de concentração temporal e/ou espacial (DARAN-LAPUJADE et al., 2008).

A metodologia de cultivos em quimiostatos pode ser definida por 5 principais características: (I) o ambiente é idealmente homogêneo; (II) o fluxo do meio de alimentação é contínuo; (III) a composição do meio de alimentação apresenta apenas um nutriente limitante para o crescimento celular, enquanto os demais estão em excesso; (IV) o fluxo de saída da cultura é contínuo e permite a eliminação dos metabólitos tóxicos; (V) o volume de trabalho é mantido constante no biorreator pela equidade dos fluxos de alimentação e de saída. Além das vantagens já descritas para este método de cultivo, há, ainda, a possibilidade de aplicação de pulsos ao quimiostato a fim de perturbar o estado constante da fisiologia celular para também avaliar a resposta celular a este estado transiente (BELLAYER et al., 2004; VISSER et al., 2004). Estes procedimentos produzem dados quantitativos robustos que podem ser utilizados em análises de fluxos metabólicos aplicáveis a procedimentos de engenharia metabólica com aplicação industrial.

3. Expressão gênica por PCR em tempo real

Análise de expressão por PCR em tempo real tem sido uma técnica bastante utilizada para descrição de perfis de expressão gênica e seu padrão de regulação devido ao seu alto nível de precisão, sensibilidade e facilidade de execução. Esta técnica é baseada na quantificação de amplicons em cada ciclagem de PCR através de sinais fluorescentes emitidos por moléculas sinalizadoras e detectados por termocicladores específicos (HIGUCHI et al., 1993). Para estudos de expressão relativa por PCR em tempo real, vários controles são necessários para garantir a validade e precisão dos dados obtidos. Isto inclui verificação da qualidade de extração, rendimento, grau de pureza e integridade do RNA, eficiência da transcrição reversa e da reação de PCR, quantidade uniforme de RNA adicionado em cada reação, entre outros (TESTE et al., 2009). Mesmo com todo

este ajuste refinado, a normalização entre as amostras biológicas continua a ser etapa crítica na utilização desta técnica, sendo, o tratamento mais comumente adotado, a normalização da quantidade de RNA total com relação a um gene referência.

Alguns modelos matemáticos já foram propostos para cálculo da expressão relativa de um determinado gene-alvo em relação ao gene referência sendo o mais comum entre eles o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK et al., 2001). Apesar de ter sido bastante aceito, este método de análise assume que as eficiências de amplificação dos genes teste e referência sejam ótimas e idênticas e que a expressão do gene referência seja perfeitamente estável para o conjunto de amostras em questão (LIVAK et al., 2001). Entretanto, há evidências de que mesmo estes genes, ditos estáveis, sofrem algum controle transcricional por menor que seja, reforçando a ideia de que não há um gene referência universal em que sua expressão seja constante qualquer que seja a condição (KUBISTA et al., 2006). Assim, Vandesompele e colaboradores (2002) desenvolveram um algoritmo matemático, denominado geNorm, baseado na média geométrica de um número de candidatos a genes de referência para uma determinada condição. Este método de análise resulta num fator de normalização (FN) para cada uma das amostras a serem testadas. Recentemente, Teste e colaboradores (2009) publicaram um estudo descrevendo um conjunto de genes de referência mais estáveis para a levedura *S. cerevisiae*.

A avaliação de expressão gênica por PCR em tempo real na levedura *D. bruxellensis* é bem recente e o sequenciamento parcial de seu genoma contribui para a dificuldade de validação de genes de referência para esta espécie. Apesar disso, dois trabalhos foram pioneiros nesta abordagem e têm utilizado os genes *DbACT1* e *DbTEF1* como genes de referência para normalização destes dados. Entretanto, apenas estes dois genes não são suficientes para uma melhor e ampla aplicação desta ferramenta de análise de expressão gênica nesta espécie visto que a instabilidade na expressão de qualquer destes dois genes, impossibilita a análise dos dados através do método geNorm, o qual calcula o fator de normalização para as amostras e tem se mostrado ser o método de análise de dados mais apropriado (VANDESOMPELE et al., 2002).

Nardi e colaboradores (NARDI et al., 2010) realizaram um estudo a cerca do mecanismo de adaptação de células de *D. bruxellensis* as condições de produção de vinho através da comparação da expressão gênica desta levedura a *S. cerevisiae*. Nesse trabalho foram estudados o perfil de expressão para genes envolvidos no metabolismo de carbono (*MSN4*, *SNF1*, *NTH1* e *TPS2*), genes de resposta a estresse térmico (*HSP82*, *SSA3/4*) e etanólico (*ATP1*, *VPS34* e *ERG6*). A partir destas

análises, foi visto que o padrão de regulação gênica em *D. bruxellensis* parece ser diferente do padrão de *S. cerevisiae* havendo uma diferença principalmente temporal desta resposta à condição ambiental. Os autores sugeriram, ainda, que devido às diferenças mais marcantes no padrão de alguns genes, deve haver mecanismos de regulação particulares a esta levedura que, juntamente com o sistema geral de resposta a estresse bastante conservado, podem explicar sua alta adaptabilidade à condição industrial.

Barros Pita e colaboradores (2011) publicaram o estudo da expressão de genes relacionados à assimilação de nitrato (*YNTI*, *YNRI*, *YNII*) em células de *D. bruxellensis* submetidas a condições variáveis de disponibilidade de nitrato e/ou amônia e demonstraram que ambas as fontes de nitrogênio podem ser co-consumidas por estas células uma vez que os genes de assimilação de nitrato são expressos mesmo em presença de amônia. Sabendo-se que a assimilação de 1 mol de nitrato consome 4 moles de NAD(P)H, estes autores formularam a hipótese de que o nitrato poderia atuar como uma alternativa para a re-oxidação do excesso de NADH, restaurando o balanço redox e contornando o efeito *Custers* nestas células. Esta capacidade atribuída às células de *D. bruxellensis* pode ser relevante e justificar, pelo menos em parte, o seu melhor desempenho competitivo em relação a *S. cerevisiae*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar a fisiologia da linhagem industrial GDB 248 da levedura *D. bruxellensis* quanto ao seu metabolismo de açúcares presentes em substratos industriais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever quantitativamente a fisiologia de células de *D. bruxellensis* submetidas a cultivos em quimiostatos limitados em carbono (glicose ou sacarose);
2. Avaliar a capacidade de assimilação de monossacarídeos (glicose e frutose) e dissacarídeos (sacarose, celobiose, maltose e lactose) por células de *D. bruxellensis*;
3. Avaliar o efeito repressor da glicose sobre o metabolismo de fontes alternativas de carbono;
4. Validar genes de referência para normalização de dados de expressão gênica por PCR em tempo real em células de *D. bruxellensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, D.; HYNES, S.; INGLEDEW, W. Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 66, n. 6, p. 641-647, 2005.

AGUILAR USCANGA, M.; DELIA, M. L.; STREHAIANO, P. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 61, n. 2, p. 157-162, 2003.

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

BASSO, T. O.; DE KOK, S.; DARIO, M.; DO ESPIRITO-SANTO, J. C. A.; MÜLLER, G.; SCHLÖLG, P. S.; SILVA, C. P.; TONSO, A.; DARAN, J. M.; GOMBERT, A. K., VAN MARIS, A.J., PRONK, J.T., STAMBUK, B.U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**, v.13, n. 6, p. 694-703, 2011.

BELLAVER, L. H.; CARVALHO, N. M. B.; ABRAHÃO NETO, J.; GOMBERT, A. K. Ethanol formation and enzyme activities around glucose 6 phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. **FEMS yeast research**, v. 4, n. 7, p. 691-698, 2004.

BLOMQVIST, J. *Dekkera bruxellensis* - a competitive yeast for ethanol production from conventional and non-conventional substrates. PhD thesis. 2011.

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

BRANDAM, C. B. C.; CASTRO-MARTÍNEZ, C. C. M. C.; MARIE-LINE DÉLIA, M. L. D.; RAMÓN-PORTUGAL, F. R. P. F.; STREHAIANO, P. S. P. Effect of temperature on *Brettanomyces bruxellensis*: metabolic and kinetic aspects. **Canadian journal of microbiology**, v. 54, n. 1, p. 11-18, 2007.

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

CARRASCOSA, J.; VIGUERA, M. D.; NÚÑEZ DE CASTRO, I.; SCHEFFERS, W. Metabolism of acetaldehyde and custers effect in the yeast. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 47, n. 3, p. 209-215, 1981.

CHATONNET, P.; DUBOURDIE, D.; BOIDRON, J.; PONS, M. The origin of ethylphenols in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 60, n. 2, p. 165-178, 1992.

CIANI, M.; MACCARELLI, F.; FATICHENTI, F. Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 419-422, 2003.

CLAUSSEN, N. H. On a method for the application of Hansen's pure yeast system in the manufacturing of well-conditioned English stock beers. **Journal of the Institute of Brewing**, 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, 2006.

DARAN-LAPUJADE, P.; DARAN, J. M.; VAN MARIS, A. J. A.; DE WINDE, J. H.; PRONK, J. T. Chemostat-based micro-array analysis in baker's yeast. **Advances in Microbial Physiology**, v. 54, p. 257-311, 414-417, 2008.

DE BARROS PITA, W.; LEITE, F. C. B.; DE SOUZA LIBERAL, A. T.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS, M. A. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *Saccharomyces cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, n. 1, p. 1-9, 2011.

DE MINIAC, M. Contamination des fermentations alcooliques industrielles par les levures du genre: *Brettanomyces*. **Industries alimentaires et agricoles**, v. 106, n. 7-8, p. 559-563, 1989.

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

DIJKEN, J. P.; WEUSTHUIS, R. A.; PRONK, J. T. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 63, n. 3, p. 343-352, 1993.

FREER, S. Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 271-275, 2002.

FREER, S.; DIEN, B.; MATSUDA, S. Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 101-105, 2003.

GALAFASSI, S.; MERICO, A.; PIZZA, F.; HELLBORG, L.; MOLINARI, F.; PISKUR, J.; COMPAGNO, C. *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n.8, p. 1079-1088, 2011.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 2, p. 334, 1998.

GODARD, P.; URRESTARAZU, A.; VISSERS, S.; KONTOS, K.; BONTEMPI, G.; VAN HELDEN, J.; ANDRÉ, B. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 8, p. 3065, 2007.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. **Nature Biotechnology**, v. 11, n. 9, p. 1026-1030, 1993.

JENSEN, S. L.; UMIKER, N. L.; ARNEBORG, N.; EDWARDS, C. G. Identification and characterization of *Dekkera bruxellensis*, *Candida pararugosa*, and *Pichia guilliermondii* isolated from commercial red wines. **Food microbiology**, v. 26, n. 8, p. 915-921, 2009.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.

LIBERAL, A. T. D. S. **Análise da constituição genética de linhagens industriais da levedura *Dekkera bruxellensis***. (Doutorado). Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

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.

LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. **International journal of food microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 23-50, 2003.

MIOT SERTIER, C.; LONVAUD FUNEL, A. Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 2, p. 555-562, 2007.

MITRAKUL, C.; HENICK-KLING, T.; EGLI, C. Discrimination of *Dekkera/Brettanomyces* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. **Food Microbiol**, v. 16, 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, 1993.

NARDI, T.; REMIZE, F.; ALEXANDRE, H. Adaptation of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces bruxellensis* to winemaking conditions: a comparative study of stress genes expression. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 88, n. 4, p. 925 - 937, 2010.

PASSOTH, V.; BLOMQVIST, J.; SCHNURER, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol process. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4354 – 4356, 2007.

PEREIRA, L. F.; BASSI, A. P. G.; AVANSINI, S. H.; NETO, A. G. B.; BRASILEIRO, B. T. R. V.; CECCATO-ANTONINI, S. R.; DE MORAIS, M. A. The physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 3, p. 529 - 539, 2011.

PHOWCHINDA, O.; DÉLIA-DUPUY, M.; STREHAIANO, P. Effects of acetic acid on growth and fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology letters**, v. 17, n. 2, p. 237-242, 1995.

PIPER, M. D. W.; DARAN-LAPUJADE, P.; BRO, C.; REGENBERG, B.; KNUDSEN, S.; NIELSEN, J.; PRONK, J. T. Reproducibility of oligonucleotide microarray transcriptome analyses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37001, 2002.

PITA, W. D. B. **Análise da expressão dos genes relacionados à assimilação do nitrato na levedura *Dekkera Bruxellensis*** (Mestrado). Genética, Univerdidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

POSTMA, E.; VERDUYN, C.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 55, n. 2, p. 468, 1989.

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

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

RINTALA, E.; JOUHTEN, P.; TOIVARI, M.; WIEBE, M. G.; MAAHEIMO, H.; PENTTILÄ, M.; RUOHONEN, L. Transcriptional Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to Shift from Respiratory and Respirofermentative to Fully Fermentative Metabolism. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 15, n.7, p. 461 -476, 2011.

RÖDER, C.; KÖNIG, H.; FRÖHLICH, 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.

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

SCHEFFERS, W. Stimulation of fermentation in yeasts by acetoin and oxygen. **Nature**, v. 210, p. 533-534, 1966.

SIURKUS, J. **Preliminary molecular biology studies of *Dekkera bruxellensis* yeast.** (M.Sc. thesis). Technical University of Denmark Lyngby, 2004.

SIVERIO, J. M. Assimilation of nitrate by yeasts. **FEMS microbiology reviews**, v. 26, n. 3, p. 277-284, 2002.

TER LINDE, J.; LIANG, H.; DAVIS, R.; STEENSMA, H.; VAN DIJKEN, J.; PRONK, J. Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 24, p. 7409, 1999.

TESTE, M. A.; DUQUENNE, M.; FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Molecular Biology**, v. 10, n. 1, p. 99, 2009.

THEVELEIN, J. M.; DE WINDE, J. H. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP–protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular microbiology**, v. 33, n. 5, p. 904 - 918, 1999.

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. 34, 2002.

VISSER, D.; VAN ZUYLEN, G. A.; VAN DAM, J. C.; EMAN, M. R.; PRÖLL, A.; RAS, C.; WU, L.; VAN GULIK, W. M.; HEIJNEN, J. J. Analysis of in vivo kinetics of glycolysis in aerobic *Saccharomyces cerevisiae* by application of glucose and ethanol pulses. **Biotechnology and bioengineering**, v. 88, n. 2, p. 157-167, 2004.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. Wiley, 1998.

WIEBE, M. G.; RINTALA, E.; TAMMINEN, A.; SIMOLIN, H.; SALUSJÄRVI, L.; TOIVARI, M.; KOKKONEN, J. T.; KIURU, J.; KETOLA, R. A.; JOUHTEN, P. 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.

WIJSMAN, M. R.; DIJKEN, J. P.; KLEEFF, B. H. A.; SCHEFFERS, W. A. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from

aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 50, n. 2, p. 183 - 192, 1984.

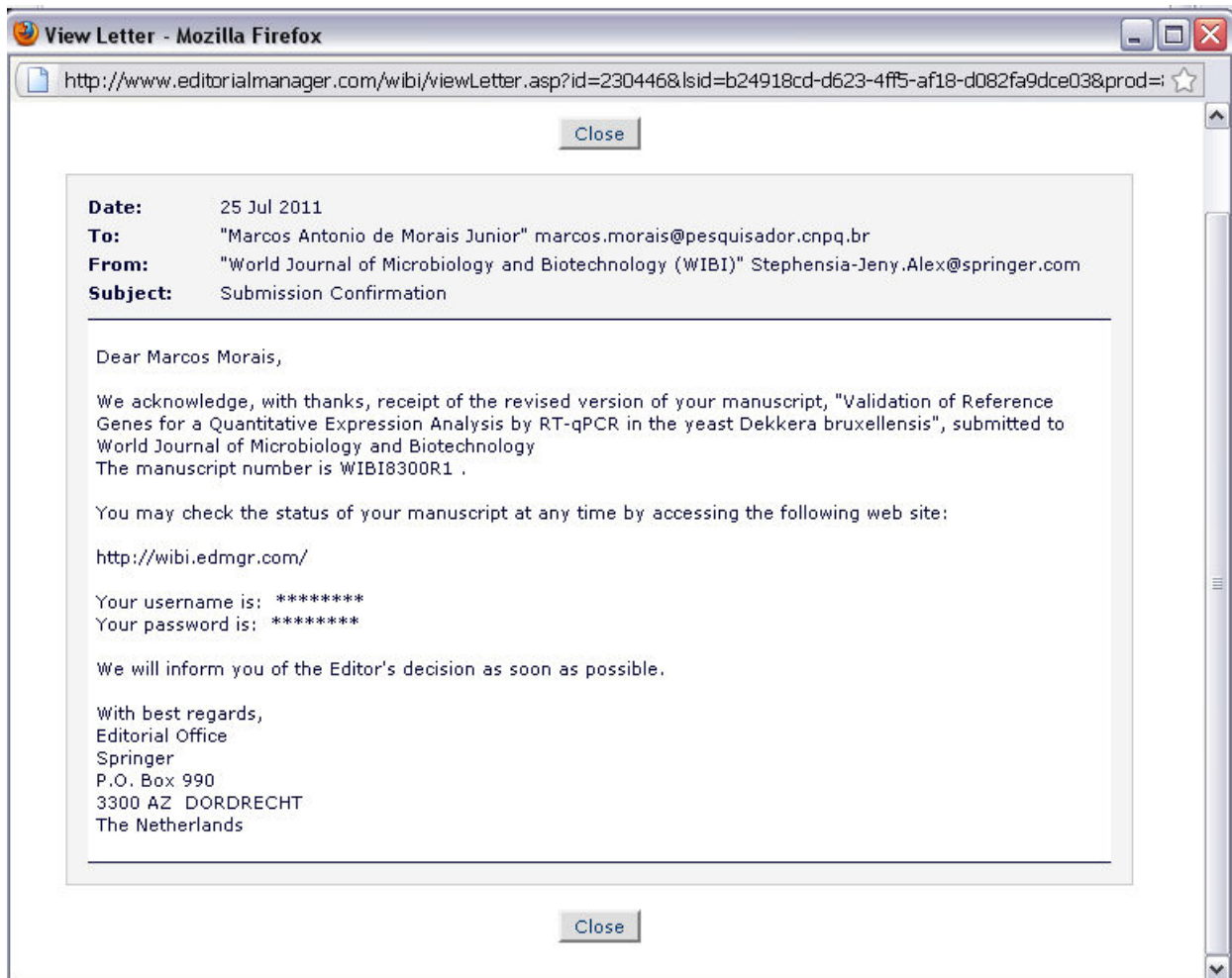
WOOLFIT, M.; ROZPEDOWSKA, E.; PISKUR, J.; WOLFE, K. H. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 4, p. 721, 2007.

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

Validation of Reference Genes for a Quantitative Expression Analysis by RT-qPCR in the yeast *Dekkera bruxellensis*

Submetido a: **World Journal of Microbiology and Biotechnology**

<http://www.springer.com/chemistry/biotechnology/journal/11274>



ARTIGO 1

Validation of Reference Genes for a Quantitative Expression Analysis by RT-qPCR in the yeast *Dekkera bruxellensis*

Will de Barros Pita¹, Fernanda Cristina Bezerra Leite¹, Anna Thereza de Souza Liberal¹, Luciana Filgueira Pereira¹, Marcelo Falsarella Carazzolle³, Gonçalo Amarante Pereira³ and Marcos Antonio de Moraes Jr.^{1,2*}

¹Interdepartmental Research Group on Metabolic Engineering and ²Department of Genetics, Federal University of Pernambuco. Av. Moraes Rego 1235, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

³Laboratory of Genomics and Expression, University of Campinas. Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-970, Campinas, SP. Brazil

*Corresponding author:

Prof. MA Moraes Jr

Departamento de Genética - Universidade Federal de Pernambuco

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

Phone/Fax: 00-55-81-21268522

E-mail: marcos.morais@pesquisador.cnpq.br

Web site: www.ufpe.br/nem

Abstract

The yeast *Dekkera bruxellensis* has been recently regarded as an important microorganism for bioethanol production, due to its ability to convert glucose, sucrose and cellobiose to ethanol. The aim of this work was to validate reference genes for gene expression analysis by RT-qPCR in this yeast. Three candidate reference genes *DbEFA1*, *DbEFB1* and *DbYNA1* were used in a quantitative analysis of four Genes of Interest (GOI), *DbYNR1*, *DbTPS1*, *DbADH7* and *DbUBA4*, based on an approach for calculating the Normalization Factors (NF) by means of the geNorm applet. Each of the reference genes was also individually used for a $2^{-\Delta\Delta C_q}$ calculation of the relative expression of GOI. The results showed that the three reference genes provide enough stability and were complementary to the NF method, especially because they can offset the effect of mutual growth-dependent variations in different culture conditions. This effect was observed when a single reference gene analysis was employed. As a result, this work is able to confirm the usefulness of a previously reported reference gene, *DbEFA1/DbTEF1*, and increases the set of possible reference genes in *D. bruxellensis* to four. Moreover, this can improve the reliability of the analysis of the regulation of gene expression in the industrial yeast *D. bruxellensis*.

Keywords: *Dekkera bruxellensis*; gene expression; geNorm; reference genes; RT-qPCR.

Introduction

Dekkera bruxellensis (the teleomorph of *Brettanomyces bruxellensis*), a hemiascomycete yeast, is regarded as an important yeast that is found in different industrial processes such as a contaminant of winery and bioethanol processes (Abbott et al. 2005; Snowden et al. 2006; Liberal et al. 2007; Basilio et al. 2008), and has been recommended as a fermenting yeast for bioethanol production (Passoth et al. 2007). The capacity of this yeast to supplement *Saccharomyces cerevisiae* cells in industrial fermentation has proved to be beyond expectations, partly on account of its very low specific growth rate in laboratory media and conditions (Liberal et al. 2007; Blomqvist et al. 2010). Given the fact that *S. cerevisiae* is a fermenting yeast, and that no other yeast has surpassed its qualities in any other industrial process (Pita et al. 2011), *D. bruxellensis* has some physiological adaptations to the industrial environment that makes it a very attractive object for physiological and genomic studies. Its genome was sequenced with the identification of approximately 3,000 genes and there was a close similarity of the gene products with *S. cerevisiae* and other yeast proteins (Woolfit et al. 2007). Our laboratory is now committed to understanding the mechanisms that govern the genetic regulation of the central metabolism and its response to environmental stresses. This is valuable information the molecular mechanism behind the industrial adaptation of *D. bruxellensis* (Blomqvist et al. 2010; Pita et al 2011).

Currently, RT-qPCR is being used as the preferred method for mRNA quantification and gene expression. Its use requires several internal controls to ensure that the calculations are reliable (Livak et al. 2001; Ståhlberg et al. 2008; Teste et al. 2009; Vandesompele et al. 2002). These reference genes are used to normalize mRNA quantification and avoid imprecise quantification data. They can be assumed to have an unchanged expression, whatever experimental conditions are adopted. Since small variations in expression levels of a reference gene may lead to inaccurate quantification data, validation experiments of candidate reference genes are essential to determine if their expression is in fact stable and also to normalize their possible variations. The mathematical approach based on the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ model has been used for a relative quantification of gene expression, but it is based on the assumption that target and reference genes provide both optimal and identical PCR efficiency (Livak and Schmittgen 2001). To overcome these problems with normalization, Vandesompele et al. (2002) employed a statistical algorithm called geNorm, to evaluate the expression stability of the candidate reference genes. This approach was recently adopted to outline

the use of *ACT1* and *TEF1* genes, and encode actin and EF1- α translational elongation factor, respectively, as a set of reference genes for RT-qPCR in *D. bruxellensis* (Nardi et al. 2010). However, recent work has shown that many genes that have been traditionally used as a reference-point for *S. cerevisiae*, are not completely unchangeable (Ståhlberg et al. 2008; Teste et al. 2009). This makes the inclusion of additional genes imperative to extend the RT-qPCR analysis to *D. bruxellensis* genes in various culture conditions. In the present work, the stability of the *TEF1* gene was reexamined, (which from now onwards, will be referred to as *DbEFA1*), together with two other genes, *DbEFB1* (encoding EF1- β translational elongation factor) and *DbYNA1* (encoding transcriptional regulatory factor of nitrate assimilation). The importance of the candidate reference genes was tested by the relative quantification of four unrelated *D. bruxellensis* genes of interest (GOI), each representing a different metabolism: nitrate assimilation (*DbYNR1*, encoding *Hansenula polymorpha* orthologous nitrate reductase), fermentation process (*DbADH7*, encoding *S. cerevisiae* orthologous NADPH-dependent medium chain alcohol dehydrogenase), storage carbohydrate (*DbTPS1*, encoding the *S. cerevisiae* orthologous synthase subunit of trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex) and oxidative stress and redox metabolism (*DbUBA4*, encoding the *S. cerevisiae* orthologous thiosulfate sulfutransferase). The results confirmed the stability and reliability of these genes for studies on the regulation of some metabolic pathways related to carbon and nitrogen assimilation and stress response genes in *D. bruxellensis*. As a result of this research study, the list of reference genes in *D. bruxellensis* was increased to allow the application of relative gene expression analysis in this yeast.

Materials and Methods

Yeast strains and growth conditions

Dekkera bruxellensis strain GDB248 is an industrial isolate (Liberal et al. 2007) that has been used as a reference strain in our laboratory. Cells were pre-grown at 30°C and 150 rpm in a rotator shaker for 24 hours in synthetic medium – SC (1.6 g Yeast Nitrogen Base, 5 g ammonium sulfate per liter) containing glucose at 20 g l⁻¹. Following this, the cells were transferred to 500 mL flasks containing 150 mL of following media: i) SC medium with glucose or sucrose (20 g l⁻¹); ii) SC medium with sodium nitrate (6.4 g l⁻¹) and glucose or sucrose; iii) SC with ethanol (16 g l⁻¹) and ammonium or nitrate. Cultures of initial OD₆₆₀ of 0.1 were incubated in the same condition outlined above to final OD₆₆₀ around one (full exponential growth phase). The cells were

harvested at 4°C for two minutes at 2,500g and submitted to total RNA extraction. Biological triplicates were collected from two independent cultivations. The growth media were sorted into different types of metabolisms: respiratory growth (ethanol) versus respirofermentative growth (glucose and sucrose) and high (nitrate) versus low (ammonium) redox demand for nitrogen assimilation.

RNA isolation and cDNA synthesis

For each culture, yeast total RNA was isolated with the aid of a NucleoSpin® RNA II kit and following the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel, USA), which includes a DNase digestion step. The RNA was quantified by means of a spectrophotometric method (Nanovue, GE HealthCare) and its integrity was evaluated by agarose gel 1% electrophoresis. RNA was stored at -80 °C until cDNA synthesis. An amount of 500 ng of total RNA was used for each reverse transcription reaction tube (40 µl) using ImProm-II™ Reverse Transcription System Promega II kit with oligo(dT) and in compliance with the manufacturer's instructions (Promega, USA). cDNA was stored at -20 °C until the qPCR assays.

Primer design

Sequences of the *D. bruxellensis* *DbEFA1*, *DbYNR1* (Yeast Nitrate Reductase) and *DbYNA1* (Yeast Nitrate Assimilation) genes are publicly available at the GenBank Nucleotide database. The sequence of the testing genes *DbEFB1*, *DbADH7*, *DbUBA4* and *DbTPS1* were obtained from the restricted *D. bruxellensis* database (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/dekkera>) after tBLASTn analysis by using their orthologous genes in the *S. cerevisiae* genome from the SGD database (<http://www.yeastgenome.org/>). The primers were designed with the aid of the Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, USA) and are described in Table 1.

RT-qPCR Assays

Experiments were optimized at a minimum material cost and a maximum efficiency by means of an experimental design, using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA). 96-wells plates were used and the parameters were as follows: SYBR Green (5 µl), primers 200 nM (0.4 µl each), H₂O (3.2 µl) and cDNA (1 µl). The temperature-time profile (95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min) was optimized for ABI Prism 7300 (Applied Biosystems) and Melting Curves were included at the end of each reaction. The amplification curves were analyzed with the aid of SDS v.2.0 software (Applied Biosystems). Negative PCR control (no

template) and negative RT control were run for quality control. All the samples were run in technical triplicates for each biological duplicate of cell cultivation (totalling 6 samples for each growth medium). The standard $2^{-\Delta\Delta C_t}$ approach was calculated on the basis of a previous report (Livak and Schmittgen 2001).

Table 1. Primers used for RT-qPCR assays.

Name	Nucleotide sequences 5'-3'	Amplicon Size (bp)	Accession Nr.
DbEFB1F	CATGGGATGACGAGACCGAT	71	--
DbEFB1R	CACCAAACCGTCCATCTTGAT		
DbYNA1F	TTTATATGGCGGGCATTGTA	109	EF364427
DbYNA1R	CCGTGAGCATTCAAGACATC		
DbEFA1F	GGATGGTCAGACCAGACAGCA	71	EF552481
DbEFA1R	TGACGGCAACAATAAGCTGC		
DbYNR1F	TGCTGGAAACAGGCGTAAAGA	71	EF364428
DbYNR1R	TCCCAGCAGAACCCCAATT		
DbTPS1F	GCTCTTCCGTATTCCACGGA	71	--
DbTPS1R	AAGTGAGTTTGCTGGTGCAGC		
DbADH7F	GGAAAGTGCTACAGGTGCAA	103	HQ693756
DbADH7R	ATCCTCCCTGAGTTTTTGGTG		
DbUBA4F	TGATGGCTGTGGAGGCATTA	74	--
DbUBA4R	AGCAAATCCCGAGTAAAGCG		

geNorm analysis

The mean cycle threshold (Cq) values for each growth medium were then plotted in Microsoft Excel 2007 worksheets so that a suitable input file could be compiled for geNorm, in accordance with the recommendations of Vandesompele et al. (2002) (GeNorm tool (<http://medgen.ugent.be/genorm>)). The first step in the geNorm analysis was to determine the stability measurement (termed “M”) for each candidate gene. The M value represents the gene expression stability as the average pairwise variation for that gene out of all the other tested references (Vandesompele et al. 2002). Stepwise exclusion of the gene with the highest M value

allows the tested genes to be ranked according to their expression stability (Vandesompele et al. 2002). geNorm is also able to provide the optimal number of reference genes needed to obtain precise normalization. This number represents the pairwise variation values ($V(n/n+1)$) between each combination of sequential normalization factors (NF). A cut-off value at 0.15 is recommended, as if it is below this, the inclusion of an additional gene does not result in a significant improvement of the normalization.

Results

Stability of expression levels of the candidate reference genes

The steps for RT-qPCR analysis followed recommendations of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real Time PCR Experiments (MIQE) guidelines described by Bustin et al. (2009). The efficiency of the amplification was 99.2% (slope of -3.34 and R^2 ranging from 0.991 to 0.998) and optimal concentration of 200 nM for all the pairs of primers. Data from Cq were first analyzed by making a direct comparison to determine the transcript abundance of the reference genes in the different culture conditions. This comparison is based on the assumption that Cq is equal to the transcript number, since all the RT-qPCR were performed with an equal amount of total RNA. The Cq values ranged from 20 to 25, except for the *DbEFB1* gene that showed lower Cq values than the other two genes for all of the conditions tested (Figure 1). The dispersion levels were very low for all the genes, except for *DbEFA1* and *DbEFB1* in nitrate-containing medium (<1 Cq). For respiro-fermentative metabolism in ammonium, all three genes *DbEFA1*, *DbEFB1* and *DbYNA1* were considered important ($V_{2/3} = 0.163$) to normalize the expression levels of the target genes. For respiro-fermentative metabolism in nitrate, the *DbEFB1* gene seemed to be unnecessary for the NF calculations and it was possible to exclude it in the subsequent analyses ($V_{2/3} = 0.05$). Similarly, for respiratory metabolism, the gene *DbYNA1* was not necessary for NF calculations, while *DbEFA1* and *DbEFB1* were the best reference genes ($V_{2/3} = 0.057$).

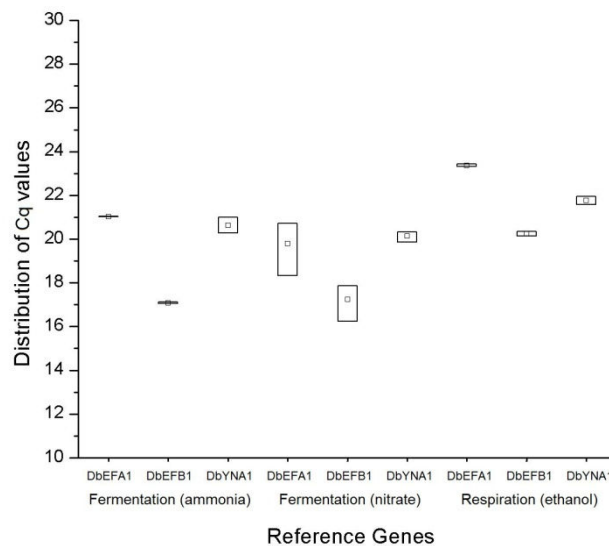


Figure 1 - Global distribution of Cq values for candidate reference genes. Boxplot representation of raw Cq values obtained from amplification curves. The mean Cq values are indicated by the squares inside the boxes.

Expression analysis of *D. bruxellensis* testing genes

Following MIQE guidelines, expression of GOI were tested using the reference genes above and comparing two methods. In a shift from respiro-fermentative to respiratory growth, the *DbUBA4*, *DbTPS1* and *DbADH7* genes showed five to six-fold induction when using NFs calculated from the geometric mean in the geNorm algorithm (Fig. 2). Similar results were observed when the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was applied, using *DbEFA1* or *DbEFB1* as single genes (Fig. 2). On the other hand, the induction of these three GOI was not observed when *DbYNA1* was used as a unique reference gene (Fig. 2). By adopting the NF approach, the expression of *DbYNR1* gene increased by nine-times when the yeast cells were changed from ammonium to nitrate medium (Fig. 2). It is noteworthy that different expression levels of the *DbYNR1* gene were observed when using the three single reference genes independently. In this case in particular, the use of NF seemed to be essential when measuring the expression level of nitrate assimilation genes. Similar results were found regarding the need for an NF approach to the three reference genes when *D. bruxellensis* cells were submitted to the following conditions: i) cultivation in phenylalanine as a single source of nitrogen, ii) incubation at different temperatures for thermal stress analysis, iii) and analysis of response to oxidative stress in the presence of hydrogen peroxide (data not shown).

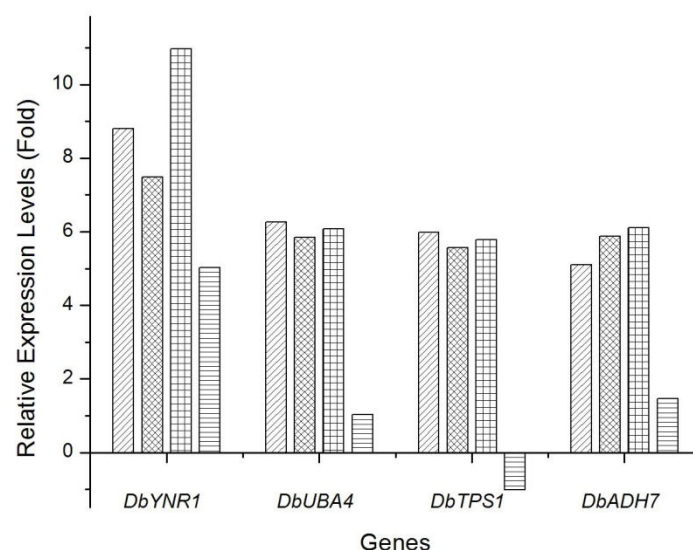


Figure 2 - Effect of the normalization strategy on the expression ratios of *DbYNR1*, *DbUBA4*, *DbADH7* and *DbTPS1* genes of *D. bruxellensis*. The fold induction was calculated by comparing the test and reference media for the following genes: *DbYNR1* (nitrate versus ammonia), *DbUBA4*, *DbADH7* and *DbTPS1* (ethanol versus sugar). The relative expression levels were calculated by means of the NF approach (oblique lines) or by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, using single reference genes - *DbEFA1* (crossed lines), *DbEFBI* (squared lines) or *DbYNA1* (horizontal lines).

Discussion

In this work, three candidates of reference genes for RT-qPCR in the yeast *Dekkera bruxellensis* were tested. In general, both the genes encoding translation elongation factors, *DbEFA1* and *DbEFBI*, showed enough stability to be used as reference genes in the NF approach, as well as single genes by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The *DbEFA1/TEF1* gene had been previously selected because of its high stability and was used together with the *ACT1* gene to calculate the expression of stress resistance genes in *D. bruxellensis* (Nardi et al. 2010). In addition, we have shown that *DbYNA1* gene was an important auxiliary reference gene when included in an analysis of target gene expression under conditions of high growth rates in medium containing glucose, but not for ethanol or when using N sources other than ammonium. The C_q values of *DbYNA1* gene ranged from 20 to 22 in all the conditions tested. This means that it is constitutively expressed even in nitrate-containing medium. Taking this into account, the constitutive expression of the *DbYNA1* gene could offset any putative effects arising from a high growth rate in the expression of growth-related reference genes, and thus possibly allow the relative expression analysis to be more robust.

Although *DbEFA1* and *DbEFB1* genes are functionally related, it should be possible to use one of them together with two other genes (*DbYNA1* and *ACT1*) in different culture conditions, as they produced different fold-change in the case of the *DbYNRI* target gene. This increases the range of candidate genes that can be considered for relative quantification of target genes in *D. bruxellensis*. The use of these genes as reference-points was tested with four target genes belonging to different metabolic pathways. The results show that choosing between the NF approach or the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method does not affect the relative number of *DbADH7*, *DbTPS1* and *DbUBA4* genes. This means that both methods can be used to normalize gene expression data, but NF seems to be more suitable, since there is a risk that using only one reference gene might lead to a misinterpretation of the data due to any possible change in its expression.

In conclusion, together with the previously discussed *ACT1* and *TEF1/ DbEFA1*, two other genes, *DbEFB1* and *DbYNA1*, showed enough stability and provided different combinations of reference genes, to allow normalization by the NF method. This occurred in a way that made it possible to overcome the variations normally observed during cell growth.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to Prof. Jure Piskur (Lund University, Sweden) for kindly providing the *Dekkera bruxellensis* genome database. This work was supported by grants and scholarships from the National Council for Scientific Development and Technology (CNPq); Brazilian Federal Agency for support of Post-Graduate Education (CAPES) and The State of Pernambuco Research Foundation (FACEPE)

References

- Abbott DA, Hynes SH, Ingledew WM (2005) Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 641-647
- Basílio ACM, Araújo PRL, Morais JOF, Silva-Filho EA, Morais Jr MA, Simões DA (2008) Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Curr Microbiol* 56: 322-326

- Blomqvist J, Eberhard T, Schnürer J, Passoth V (2010) fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains Appl Microbiol Biotechnol 87: 1487-1497
- Bustin SA, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem 55: 611-622
- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. Science 278: 680-686
- Garcia-Lugo P, Gonzalez C, Perdomo G, Brito N, Avila J, de la Rosa, Siverio JM (2000) Cloning, sequencing, and expression of HaYNR1 and HaYNI1, encoding nitrate and nitrite reductases in the yeast *Hansenula anomala*. Yeast 16: 1099-1105
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. Mol Biol Cell 11: 4241-4257
- Liberal AT, Basílio ACM, Resende AM, Brasileiro BTV, da Silva-Filho EA, de Moraes JOF, Simões DA, Moraes Jr MA (2007) Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation J Appl Microbiol 102: 538–547
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2-DeltaDeltaC(T) method. Methods 25: 402-408
- Nardi T, Remize R, Alexandre H (2010) Adaptation of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces bruxellensis* to winemaking conditions: a comparative study of stress gene expression. Appl Microbiol Biotechnol 88: 925-937
- Passoth V, Blomqvist J, Schnürer J (2007) *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol process. Appl Environ Microbiol 73: 4354-4356
- Pita WB, Leite FCB, Liberal ACS, Simões DA, Moraes Jr MA (2011) The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. Antonie van Leeuwenhoek (in press)

- Roberts GG, Hudson AP (2006) Transcriptome profiling of *Saccharomyces cerevisiae* during a transition from fermentative to glycerol-based respiratory growth reveals extensive metabolic and structural remodeling. *Mol Genet Genomics* 276: 170-186
- Ståhlberg A, Elbing K, Andrade-Garda JM, Sjögren B, Forootan A and Kubista M (2008) Multiway real-time PCR gene expression profiling in yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals altered transcriptional response of ADH-genes to glucose stimuli. *BMC Genomics* 16: 170
- Snowdon EM, Bowyer MC, Grbin PR and Bowyer, PK (2006) Mousy off-flavor: a review. *J Agric Food Chem* 54: 6465-6474
- Teste MA, Duquenne M, François JM, Parrou JL (2009) Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Molecular Biology* 10: 99
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: 00341
- Woolfit M, Rozpedowska E, Piskur J and Wolfe KH (2007) Genome Survey Sequencing of the Wine Spoilage Yeast *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis*. *Eukaryotic Cell* 6: 721– 733

Quantitative physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in the bioethanol fermentation process.

Submetido a **FEMS Yeast Research**

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



<http://mc.manuscriptcentral.com/fems>

**Quantitative physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*
GDB 248, a major contaminant in the bioethanol
fermentation process**

Journal:	<i>FEMS Yeast Research</i>
Manuscript ID:	FMSYR-11-12-0161
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	06-Dec-2011
Complete List of Authors:	Leite, Fernanda; Federal University of Pernambuco, Biochemistry Basso, Thiago; University of São Paulo, Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia Pita, Will; Federal University of Pernambuco, Genetics Gombert, Andreas; University of São Paulo, Chemical Engineering Simoes, Diogo; Federal University of Pernambuco, Biochemistry de Moraes, Marcos; Federal University of Pernambuco, Genetics; CETENE, Biofuel
Keywords:	acetate production, carbon-limited chemostat, Crabtree effect, Custer effect, ethanol fermentation

SCHOLARONE™
Manuscripts

ARTIGO 2

Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants.

Fernanda Cristina Bezerra Leite¹, Thiago Olitta Basso^{4,5}, Will Barros Pita¹, Andreas Karoly Gombert⁴, Diogo Ardaillon Simões^{1,3}, Marcos Antonio de Moraes Júnior^{1,2}.

¹Interdepartmental Research Group in Metabolic Engineering, ²Department of Genetics and

³Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, PE 50760-901, Brazil.

⁴Department of Chemical Engineering, University of São Paulo, São Paulo, SP, 05424-970, C.P. 61548, Brazil.

⁵PPG Interunidades em Biotecnologia, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. [Post-graduate Courses in Bio-technology]

Correspondence:

Marcos A. Moraes Jr

Departamento de Genética - Universidade Federal de Pernambuco

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

Phone/Fax: 00-55-81-21268522

E-mail: marcos.morais@pesquisador.cnpq.br

Web site: www.ufpe.br/nem

Abstract

Dekkera bruxellensis has been described as the major contaminant yeast of industrial ethanol production, although little is known about its physiology. The aim of this study was to investigate the growth of this yeast in diverse carbon sources and involved conducting shake flasks and glucose or sucrose-limited chemostats experiments, and from the chemostat data the stoichiometry of biomass formation during aerobic growth was established. As a result of the shake flask experiments with hexoses or disaccharides, the specific growth rates were calculated and a different behavior in rich and mineral medium was observed concerning to profile of acetate and ethanol production. In C-limited chemostats conditions, the metabolism of this yeast was completely respiratory and the biomass yields reached values of 0.62 gDW.gS⁻¹. In addition, glucose pulses were applied to the glucose or sucrose-limited chemostats. These results showed that *D. bruxellensis* has a short-term Crabtree effect. While the glucose pulse was at the sucrose-limited chemostat, sucrose accumulated at the reactor, indicating the presence of a glucose repression mechanism in *D. bruxellensis*.

Keywords: *Dekkera bruxellensis*, yeast physiology, carbon-limited chemostat, Crabtree effect, ethanol and acetate yields.

Introduction

The yeast *Dekkera bruxellensis* has been described as the main contaminant in fuel ethanol production in the North-East of Brazil (de Souza Liberal *et al.*, 2007; Basílio *et al.*, 2008) and in winemaking processes worldwide (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003; Jensen *et al.*, 2009). In 2007, Passoth and coworkers (2007) described this yeast as an organism that could potentially be employed for industrial ethanol production together with *Lactobacillus vini*. Recently, there have been a few studies devoted to studying the physiological responses of this yeast to different carbon sources (Blomqvist *et al.*, 2010; Conterno *et al.*, 2006). In addition, the effect of temperature (Brandam *et al.*, 2007), pH and oxygen (Aguilar Uscanga *et al.*, 2003; Galafassi *et al.*, 2010) on its metabolism and growth kinetics have also been studied.

So far, three main physiological characteristics of the *Dekkera/Brettanomyces* genus have been clearly defined: first, the Crabtree-positive effect regarding its ability to produce ethanol even in the presence of oxygen, as long as high sugar concentrations are present (van Dijken & Scheffers, 1986; Rozpedowska *et al.*, 2011); second, the Custer effect characterized by the inhibition of alcoholic fermentation under anaerobic conditions due to a redox imbalance in the cell (Wijsman *et al.*, 1984); and finally, the production of acetic acid and ethanol as a result of glucose metabolism under aerobic conditions (Aguilar Uscanga *et al.*, 2003).

Our group recently described the ability of this yeast to assimilate nitrate as a nitrogen source suggesting a possible explanation for its competitive success, compared with *Saccharomyces cerevisiae*, under industrial fermentation conditions (de Barros Pita *et al.*, 2011). However, in these studies the carbon balance was rarely closed and make difficult to understand the reactions in the cell metabolism and the degree of physiological adaptation to certain specific conditions

In view of the limited amount of physiological information available, this study seeks to provide valuable data on this yeast under well-defined culture conditions, using glucose or sucrose as the sole carbon source. Experiments were carried out with batch cultures and C-limited chemostats in aerobiosis. Additionally, a glucose pulse was applied to the chemostats to evaluate the extent of the Crabtree effect on this yeast. The dataset from the production of extracellular metabolites, biomass, substrate consumption and respiratory parameters allowed us to describe the physiological profile of *D. bruxellensis*, and it is expected that this can be used for further studies on this potential industrial yeast.

Materials and Methods

Strains and maintenance

Dekkera bruxellensis industrial strain GDB 248 (de Barros Pita *et al.*, 2011) was used in this study. Stock cultures were grown in shake flasks containing YP medium (1% yeast extract, 2% bacteriological peptone) with 20 g L⁻¹ glucose. After overnight growth, 20% (v/v) glycerol was added and 1 mL aliquots were stored at -80°C. Stock cultures were used to prepare pre-cultures for both the shake flasks and chemostat experiments.

Shake-flask cultivations

Baffled Erlenmeyer flasks of 500 mL containing 100 mL of culture medium were used to perform aerobic batch cultures in an orbital shaker (New Brunswick, modelo C24 (Edison, New Jersey, USA) at 200 rpm and 30°C. Each flask contained an immersed silicone tubing connected to a sterile sampling device outside the shaker, allowing the collection of culture samples without interrupting the agitation. For shake-flask cultures, cells were grown in YP medium (1% yeast extract, 2%

bacteriological peptone) or in mineral medium (MM) as described by Verduyn *et al* (1992) containing (g L⁻¹): (NH₄)₂SO₄, 5.0; KH₂PO₄, 3.0; MgSO₄·7H₂O, 0.5; and trace elements solution consisting of (mg L⁻¹): EDTA, 15, ZnSO₄·7H₂O, 4.5, MnCl₂·2H₂O, 0.84; CoCl₂·6H₂O, 0.3; CuSO₄·5H₂O, 0.3; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.4; CaCl₂·2H₂O, 4.5, FeSO₄·7H₂O, 3.0, H₃BO₃, 1.0, KI, 0.1. A solution containing vitamins was filter-sterilized and added to the mineral medium to a final concentration of (mg L⁻¹): d-biotin, 0.05, calcium pantothenate, 1.0, nicotinic acid, 1.0, myo-inositol, 25, thiamine.HCl, 1.0; pyridoxine.HCl, 1.0, and para-aminobenzoic acid, 0.20. Glucose, fructose, lactose (all heat-sterilized), cellobiose, maltose or sucrose (filter-sterilized) were added to a final concentration of 10 g L⁻¹ for shake-flask experiments and the initial pH was adjusted to 6.0 by addition of 4 M KOH.

Growth rates

In order to calculate growth rates, the optical density of the *D. bruxellensis* cultures growing on different media in shake flask experiments was measured at 600 nm (OD₆₀₀) in samples taken every hour. The exponential growth phase corresponded to the linear portion of the growth curve in a plot of ln(OD₆₀₀) against time. Specific growth rates were calculated as the slope of that straight line by performing a linear regression. For a given culture medium, the specific growth rate presented in this work is the mean of the rate values obtained from two independent experiments.

Elemental composition of cell biomass

D. bruxellensis cells were cultivated in rich medium (YPD) or mineral medium (MM) supplemented with nitrate or ammonium sulfate, as nitrogen source. Samples of the culture were collected at exponential growth phase and centrifuged at 17,000 g for 10 min. The cell pellet was washed twice with sterile distilled water and stocked at -20°C, before lyophilization. The C, H and N contents of the freeze dried samples were measured with an Elemental Analyzer CE

INSTRUMENTS EA 1110. An ash content of 7% of the yeast biomass was considered, based on the value found for *S. cerevisiae* cells grown in the same media. The oxygen content was calculated by subtracting the C, H, N and ash contents from the total.

Chemostat cultivations and glucose pulses

Precultures for chemostat cultivation were grown overnight at 30°C and 200 rpm in 500 mL shake flasks containing 100 mL mineral medium (as described above) with 20 g L⁻¹ glucose or sucrose in a New Brunswick incubator. The chemostat experiments were conducted in a BioFlo III bioreactor (New Brunswick Scientific), as described elsewhere (Basso *et al.*, 2010), using a mineral medium with 7.5 g L⁻¹ glucose or sucrose supplemented with 0.2 g L⁻¹ anti-foam Emulsion C (Sigma, St. Louis, USA). Cultivations were carried out under the following conditions: working volume of 1 L, pH controlled at 5.0 by automatic addition of 2 M KOH and constant temperature of 30°C. Agitation was set at 600 rpm and the air flow into the reactor was 0.5 L min⁻¹ (0.5 v.v.m.); these conditions kept the dissolved O₂ concentration always above 65% of air saturation (full aerobiosis), as indicated by an O₂ electrode. The chemostats were preceded by batch cultivations maintained under the same conditions as those described above. After the glucose or sucrose had been exhausted, the cultivations were switched to continuous mode at a dilution rate (*D*) of 0.10 h⁻¹. The cultures were assumed to be in steady-state when, after at least five volume changes, the dry weight and the specific carbon dioxide production rate varied less than 2% over 2 volume changes. Continuous cultures were performed in duplicate, and results are presented as the average and the deviation of the mean. Glucose pulses were performed by injection of a sterile concentrated glucose solution (450 g L⁻¹) in the bioreactor which resulted in an initial concentration of 50 mM glucose. During the pulse experiments, both the feeding and removal pumps remained switched on.

The exhaust gas from the bioreactor was cooled in a condenser (2°C) to minimize ethanol evaporation and subsequently dried in silica-filled flasks, before being conveyed into the off-gas analyzer (Applikon Biotechnology, Schiedam), which detected the molar fractions of O₂ and CO₂.

Determination of biomass dry weight and extracellular metabolites

The dry weight of the biomass was determined gravimetrically by filtration of 5 mL of the sample through pre-weighted 0.45 µm filter membranes (Olsson & Nielsen, 1997). The filters were washed with water, dried in a microwave oven and weighted. Culture supernatants were obtained by centrifugation and used for the determination of sugars (glucose, fructose and sucrose), organic acids, ethanol and glycerol. In the case of the analysis of residual sugar concentration, rapid sampling with cold-steel beads was employed, as described by Mashego *et al.* (2003). The compounds were separated by HPLC using a HPX-87H ion exchange column (BioRad, USA) at 60°C, with 5 mM H₂SO₄ as the mobile phase at 0.6 L min⁻¹. Glucose, ethanol, acetate, glycerol, succinate and lactate were detected by a Waters 2414 refractive index detector; pyruvate was detected by a 2487 UV detector at 214 nm. For supernatants containing sucrose, sugars were analyzed using a Shodex SP-0810 column at 85°C, using water as the mobile phase at 0.5 mL min⁻¹ and detected by a Waters 2414 refractive index detector.

Extracellular and intracellular invertase activity

To measure invertase activity, cells were collected at steady-states, washed twice with cold water and re-suspended in distilled water. Extracellular invertase activity was determined in cells that had been previously treated with sodium fluoride, in 50 mM Tris-succinate buffer (pH 5) with 150 mM sucrose at 30°C (Silveira *et al.*, 1996). To determine the highest activity of total invertase, cells were permeabilized according to the instructions of Stambuk (1999) using a permeabilization solution containing ethanol, 10% (v/v) Triton X-100 and toluene (1:4:1), and incubated in 50 mM Tris-

succinate buffer (pH 5.0) with 100mM sucrose at 30°C. In both cases glucose formation was determined by enzymatic kit, following the manufacturer's instructions (Cat No. 10716260035, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Consistency analysis

Fermentation data consistency analysis was performed by using the software Macrobal 2.02, obtained from the Delft University of Technology (Hellings, 1992).

Results and Discussion

Shake-flask experiments

The growth rates of *D. bruxellensis* strain GDB 248 were calculated during the exponential growth phase on glucose or sucrose, in aerobic cultivations performed either in a minimal mineral medium or in a rich medium at 30°C and pH 5.0 (Fig. 1 and Table 1). Aerobic growth rates were significantly higher on sucrose as compared to glucose, on either rich or minimal media. The similar growth rates between mineral and rich medium showed that mineral medium is likely to have all the nutrients required for this yeast to grow in an unrestricted way. These results correspond with those reported earlier by our group, as we found a specific growth rate of 0.14 h⁻¹ for this yeast when it was grown in YNB (de Barros Pita *et al.*, 2011). It is noteworthy that oxygen transfer was more efficient in the present study, due to the use of baffled flasks, in contrast with our previous study. However, since the results obtained in both studies are very similar, it seems that oxygen transfer is not a limiting factor during shake-flask cultivations of *D. bruxellensis* (at least when carried out at 200 rpm and within the range of cell concentration employed here). This can be attributed to its fairly low growth rate compared with that of other yeasts, which in turn is

proportional to the oxygen consumption rate. The aerobic growth rates of about 0.15 h^{-1} found for *D. bruxellensis* GDB 248 growing on glucose are significantly lower than the growth rates of $0.4\text{--}0.5\text{ h}^{-1}$ typically found for industrial and laboratorial *Saccharomyces cerevisiae* strains in similar conditions (da Silva-Filho *et al.*, 2005; Jansen *et al.*, 2005).

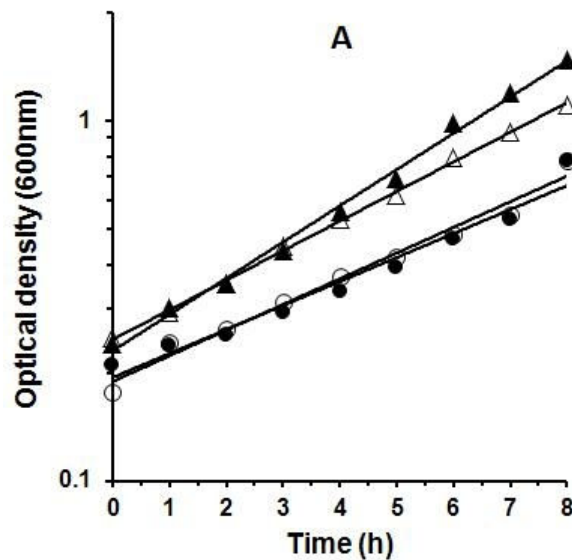


Figure 1. Growth curve of *Dekkera bruxellensis* industrial strain GDB 248 in rich medium containing glucose - YPD (▲) or sucrose - YPS (△) or mineral medium containing glucose - MMD (●) or sucrose - MMS (○) (panel A).

Cells of *D. bruxellensis* GDB248 strain were also tested on fructose, glucose plus fructose, and the disaccharides, maltose, cellobiose and lactose in mineral medium. On fructose, the growth rate was lower than in glucose. When cells were grown on glucose plus fructose, there was a slight co-consume of these sugars and the growth rate for this condition was similar to glucose medium. When sucrose was the sole carbon source, growth rates of 0.19 h^{-1} and 0.23 h^{-1} were found in mineral medium (MMS) and complex medium (YPS), respectively (Table 1), which is similar to the growth rate of 0.18 h^{-1} achieved by GDB 248 cells in sugar cane juice, a substrate that contains

sucrose (de Barros Pita *et al.*, 2011). These data show that, regardless of the medium type (mineral or complex), the GDB 248 strain grows faster in sucrose than in glucose (Table 1). The difference observed between the growth rates at sucrose or glucose plus fructose can be due to a higher intracellular invertase activity presented by *D. bruxellensis*, which will be discussed later. Cells of *D. bruxellensis* are described as unable to assimilate lactose, however the strain GDB 248 was able to assimilate this carbon source although the very low growth rate of 0.04 h^{-1} . This seems to be a specific-strain characteristic, as reported by Conterno *et al.*, 2006.

Table 2. Specific growth rates of *D. bruxellensis* GDB 248 strain grown on different carbon sources. Data are presented as average $\pm$ average deviation of two independent experiments.

Media	Carbon source	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$
Rich	Glucose	0.16 ± 0.00
(YP)	Sucrose	0.23
Mineral	Sucrose	0.19
(MM)	Glucose	0.15 ± 0.00
	Fructose	0.10 ± 0.00
	Glucose/Fructose	0.16 ± 0.00
	Lactose	0.04 ± 0.00
	Maltose	0.11 ± 0.00
	Cellobiose	0.13 ± 0.00

In aerobic shake flask experiments on glucose or sucrose, the substrate was fully consumed in less than 24 hours (Figure 2). Besides cell biomass, ethanol and acetate were always produced, while pyruvate, succinate and glycerol were never detected, irrespective of the carbon source or medium type. Either on glucose or on sucrose, acetate was the main metabolite produced in the rich medium (YP), and its concentration at the end of the cultivation in this medium was three times higher than in the minimal medium. These results can be explained by the fact that in rich media, the energy requirement for biosynthetic reactions is lower than in a mineral medium, due to the availability of preformed cell precursors. As a result, during cell growth in rich media the partition of the intracellular carbon flow will result in a reduced flux through the energy yielding reactions of the Krebs cycle, and the excess pyruvate is conveyed to the production of acetate, with a reduced energy yield. This pattern of aerobic production of acetate corresponds to an overflow metabolism, occurring when growth is not limited by the substrate availability (Vemuri *et al.*, 2006).

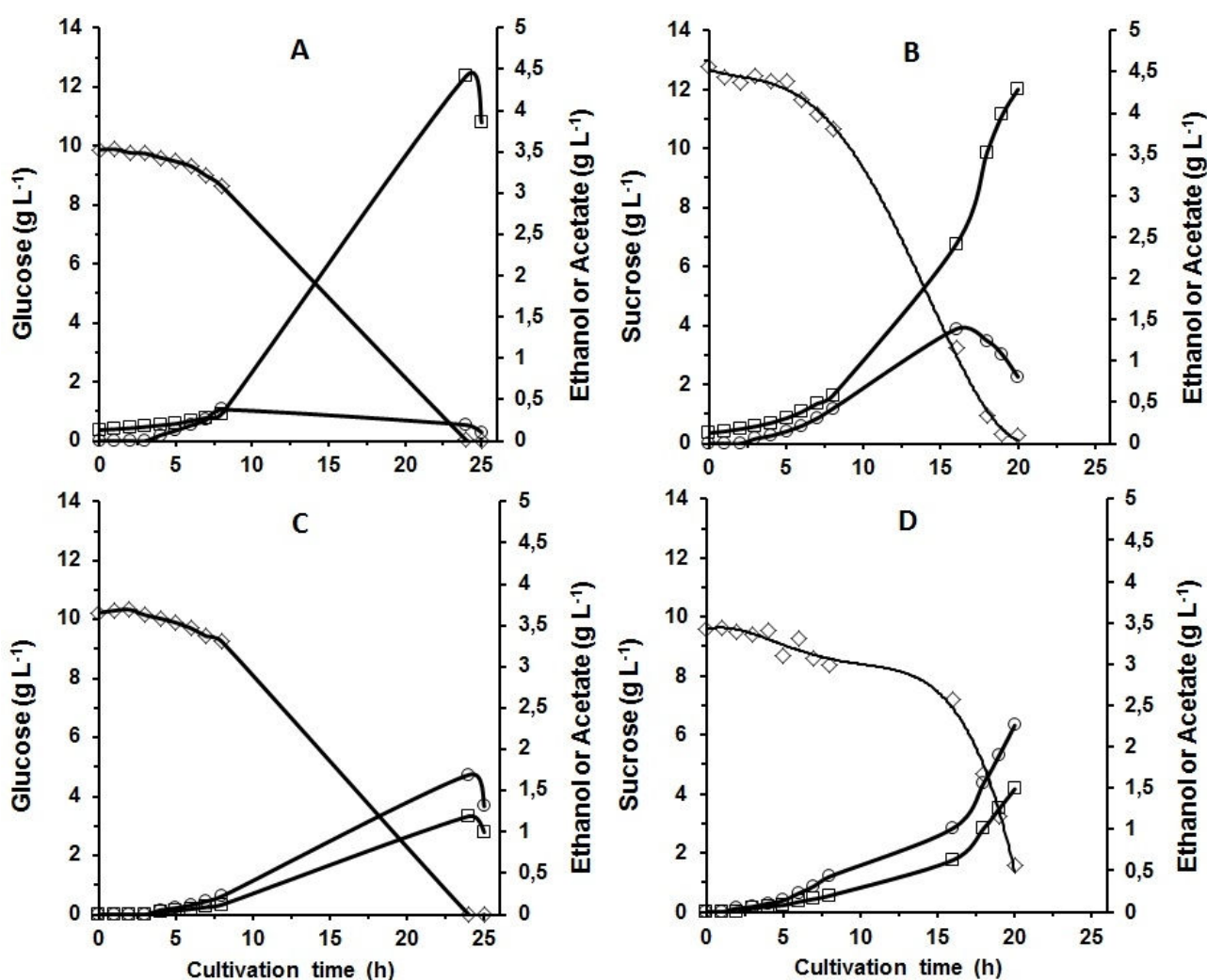


Figure 2. Flask cultivations of *Dekkera bruxellensis* industrial strain GDB 248. Growth curves (□) and metabolic profile of sugar consumption (□) and ethanol (□) and acetate (•) production of GDB 248 strain on YPD (panel A), YPS (panel B), MMD (panel C) or MMS (panel D).

Chemical analyses of *D. bruxellensis* GDB 248 biomass were conducted with cells grown in rich medium (YPD) and mineral medium (MMD), supplemented with either nitrate or ammonium sulfate as the nitrogen source. The elemental composition of the ash-free yeast biomass showed low

variability among the three media tested, and can be expressed by the average formula $\text{CH}_{1.754}\text{O}_{0.583}\text{N}_{0.149}$ (Table 2). Overall, the elemental composition found in this work for the ash-free biomass of *D. bruxellensis* GDB 248 is very similar to that published for *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D (Lange & Heijnen, 2001). However, it differs from the biomass composition published by Aguilar Uscanga *et al.* (2003) for the *D. bruxellensis* strain IHEM 6037, which shows a much higher oxygen content, corresponding to a rather low value of the reducing degree of the biomass (3.56), as compared to the values usually reported for fungal biomasses, which are in the range 4.05-4.25 (Lange & Heijnen, 2001, 2001; Carnicer *et al.*, 2009).

Table 2. Chemical composition of *D. bruxellensis* GDB 248 biomass.

Yeast	Reference	Elemental composition				Molar		%N	Protein content	H/O ratio	Degree of reduction
		C	H	O	N	Mass	%C				
<i>D. bruxellensis</i> GDB248 ^a	This work	1	1.754	0.583	0.149	25.17	48	8.3	52%	3.01	4.14
<i>D. bruxellensis</i> IHEM 6037	Aguilar Uscanga <i>et al.</i> (2003)	1	1.54	0.83	0.11	28.32	42	5.3	33%	1.86	3.56
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	Lange & Heijnen (2001)	1	1.748	0.596	0.148	25.35	47	8.2	51%	2.93	4.11

^a Elemental composition calculated considering an ash content of 7%

Chemostats experiments

Steady-state aerobic continuous cultivations of *D. bruxellensis* GDB 248 were conducted in mineral medium, using glucose or sucrose as carbon sources in C-limited conditions at a dilution rate of 0.1 h^{-1} , and the results are shown in Table 3, together with data from a glucose-limited chemostat of *S. cerevisiae* taken from Diderich *et al.* (1999). No extracellular metabolites such as acetate, ethanol or glycerol were detected in *D. bruxellensis* cultures, when either glucose or sucrose was used as carbon sources. Since the carbon recovery ranged from 95 to 99% in our experiments, it was assumed that the metabolism was completely respiratory and the sugar consumed was fully converted to cell biomass and CO_2 . A biomass yield of 0.62 gDW.gS^{-1} was

found for both carbon sources, which is 20% higher than that observed for the glucose-limited chemostat culture of *S. cerevisiae* carried out under identical conditions. This higher biomass yield of *D. bruxellensis* is accompanied by a much lower production of CO₂ in both substrates as compared to *S. cerevisiae* chemostat-cultures on glucose at the same dilution rate.

Table 3 - Data from aerobic, C-limited chemostat cultures of *D. bruxellensis* GDB248 industrial strain growing on glucose or sucrose at D=0.1 h⁻¹. Data of a similar culture of *S. cerevisiae* laboratory reference strain CEN.PK 113-7D on glucose are shown for comparison. The data presented are the average of two independent experiments.

	<i>D. bruxellensis</i>		<i>S. cerevisiae</i>
	GDB 248		CEN.PK 113-7D
	Glucose	Sucrose	Glucose
Biomass			
X (g/L)	4.59 ± 0.01	4.72 ± 0.08	3.64 ± 0.04
Y _{x/s} (g DW/gS) ^a	0.62 ± 0.00	0.62 ± 0.00	0.49 ± 0.01
Kinetics			
rS (mmol/L.h)	4.35 ± 0.20	2.44 ± 0.00	4.00 ± 0.1
rCO ₂ (mmol/L.h)	6.01 ± 0.15	6.32 ± 0.07	9.83 ± 0.10
rX (mmol/L.h) ^b	18.86 ± 0.95	20.30 ± 0.08	14.08 ± 0.04
Carbon recovery (%)	99.18 ± 1.09	94.71 ± 1.05	> 96
Reference	This work	This work	Diderich <i>et al.</i> (1999)

^a Y_{x/s}, biomass yield from substrate (glucose or sucrose)

^b Calculated with the ash content and biomass composition given in Table 2.

For the experiment using glucose as substrate, the data consistency of the measured rates of substrate consumption, cell growth and CO₂ production, together with the elemental composition of GDB 248 *D. bruxellensis* cell biomass, was checked with the program Macrobal (Helinga, 1992). The statistical hypothesis testing performed by the software showed no evidence of error in the experimental data set. As the amount of measured conversion rates are in excess to the degree of freedom of the system of equations (degree of redundancy = 1), this allows the calculation of unmeasured rates, and also the estimation of rate values with a reduced variance as compared to the experimental ones (Van der Heijden *et al.*, 1994). The measured rates and the estimated values calculated with the software Macrobal are shown at Table 4.

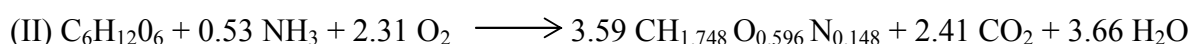
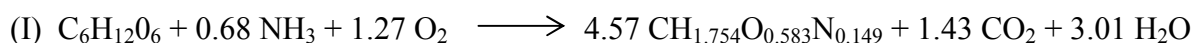
Table 4 – Measured and estimated conversion rates for *D. bruxellensis* cells in aerobic glucose-limited chemostat (D=0.1 h⁻¹).

Substrate/product	Conversion rates (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	
	Measured	Estimated
Biomass	18.86 ± 0.95	19.33 ± 0.75
Glucose	– 4.35 ± 0.20	– 4.23 ± 0.13
CO ₂	6.01 ± 0.15	6.02 ± 0.15
O ₂	-	– 5.34 ± 0.15
Ammonia	-	– 2.88 ± 0.11
Water	-	12.84 ± 0.29

The oxygen consumption rate calculated from the mass balance was 5.34 mmol L⁻¹ h⁻¹. Together with a CO₂ evolution rate of 6.02 mmol L⁻¹ h⁻¹, this corresponds to a respiratory quotient (RQ) of 1.13, which is very similar to that described by van Urk *et al.* (1990) for *Brettanomyces*

intermedius (presently referred as *D. bruxellensis* CBS 1943), and also to the value found for *S. cerevisiae* by Diderich *et al.* (1999).

Based on the data presented in Table 4 and using the biomass compositions given in Table 2, the aerobic growth of *D. bruxellensis* (equation I) and *S. cerevisiae* (equation II) on glucose can be described by the following stoichiometric equations:



The higher biomass yield and lower CO₂ production of *D. bruxellensis* as compared to *S. cerevisiae* are well represented in equations I and II. It is noteworthy that the production of 1 g of *D. bruxellensis* biomass requires about two times less oxygen than the production of 1 g of *S. cerevisiae* biomass.

The fact that *D. bruxellensis* is more efficient than *S. cerevisiae* in converting glucose to biomass could be explained by differences in the structure of the respiratory chain in these yeasts. It is well known that the complex I of the mitochondrial respiratory chain is absent in *S. cerevisiae*, but there is growing evidence from the partial sequencing of the nuclear and mitochondrial genomes of *D. bruxellensis* that the NADH dehydrogenase complex is present in this yeast (Woolfit *et al.*, 2007; Procházka *et al.*, 2010). It follows that, compared to *S. cerevisiae*, more ATP can be produced from the oxidation of one reducing equivalent in the respiratory chain of *D. bruxellensis*, implying that less glucose must be oxidatively dissimilated in order to produce the energy required for *D. bruxellensis* cell growth.

A theoretical analysis of growth yields of yeasts shows that cell yields of 0.5 g (g glucose)⁻¹ glucose found for *S. cerevisiae* cells growing aerobically correspond to an energetic yield of

approximately 1.0 ATP being produced per reducing equivalent oxidized at the respiratory chain (“effective” P/O ratio = 1.0) (Verduyn *et al.*, 1990; Verduyn *et al.*, 1991). The same analysis shows that a yeast cell yield of 0.62 g (g glucose)⁻¹ would require an “effective” P/O ratio of approximately 2.0, which can only be achieved by a respiratory chain having additional proton pumps as compared to *S. cerevisiae*, like those of *Candida utilis* and, presumably, *D. bruxellensis*.

Residual sugars and invertase activity

During the sucrose-limited chemostat cultures of *D. bruxellensis* and *S. cerevisiae*, the substrate concentration was below the detection limit (0.5 mg L⁻¹), implying that both yeasts uptake sucrose using high affinity transport systems. However, either in sucrose or in glucose-limited chemostats, the residual glucose and fructose concentrations were about 10 and 4 times lower in *D. bruxellensis* cultures than in *S. cerevisiae* cultures (Table 5). This suggests that a higher affinity for both hexoses exists in *D. bruxellensis* as compared to *S. cerevisiae* cells. In the *D. bruxellensis* genome, Woolfit *et al.* (2007) described the presence of a sequence orthologous to *Candida albicans* *HGT1* gene that encodes a high affinity H⁺-symport glucose transporter, which is absent in the genome of *S. cerevisiae*. This may be one possible explanation for the higher affinity of *D. bruxellensis* for hexoses. Such system requires the expense of 1 mol of ATP for each mol of glucose transported, but this extra ATP could be provided by the high P/O-ratio referred to above.

The extracellular and intracellular invertase activities were measured in sucrose-limited chemostats (Table 5). Differently from *S. cerevisiae*, the extracellular activity accounts for less than 10% of the total invertase found in *D. bruxellensis* cultures (Table 5). This indicates that in this yeast most of the sucrose hydrolysis may occur within the cells, in contrast to the sucrose hydrolysis in cultures of *S. cerevisiae*, which is mainly extracellular.

Table 5 – Residual substrate at C-limited chemostat for *D. bruxellensis* and *S. cerevisiae* cells and invertases activity at sucrose-limited chemostat, at aerobic conditions ($D=0.1\text{h}^{-1}$).

	<i>D. bruxellensis</i> GDB 248		<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK 113-7D	
	Glucose	Sucrose	Glucose	Sucrose
S residual				
Glucose (g L^{-1})	0.003 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.030 ± 0.005	0.036 ± 0.005
Fructose (g L^{-1})	NA	0.015 ± 0.000	NA	0.062 ± 0.014
Sucrose (g L^{-1})	NA	< 0.0005	NA	< 0.0005
Invertase [U (mg DW)^{-1}]				
Total	-	0.15 ± 0.00	-	0.96^a
Extracellular	-	0.01 ± 0.00	-	0.46^a
Reference	This work	This work	Diderich <i>et al.</i> (1999)	Basso <i>et al.</i> (2010)

^a This work

NA – not applicable

Glucose pulse experiments

Glucose pulses to 50 mmol L^{-1} were performed in either glucose or sucrose-limited chemostats cultures of *D. bruxellensis* GDB 248 at steady-state, and the metabolite formation kinetics was followed (Fig. 3). In both cultures, the glucose was fully consumed after four hours of cultivation. During this period, ethanol and acetate accumulated in the medium, and ethanol was re-consumed following glucose exhaustion (Fig. 3a,b).

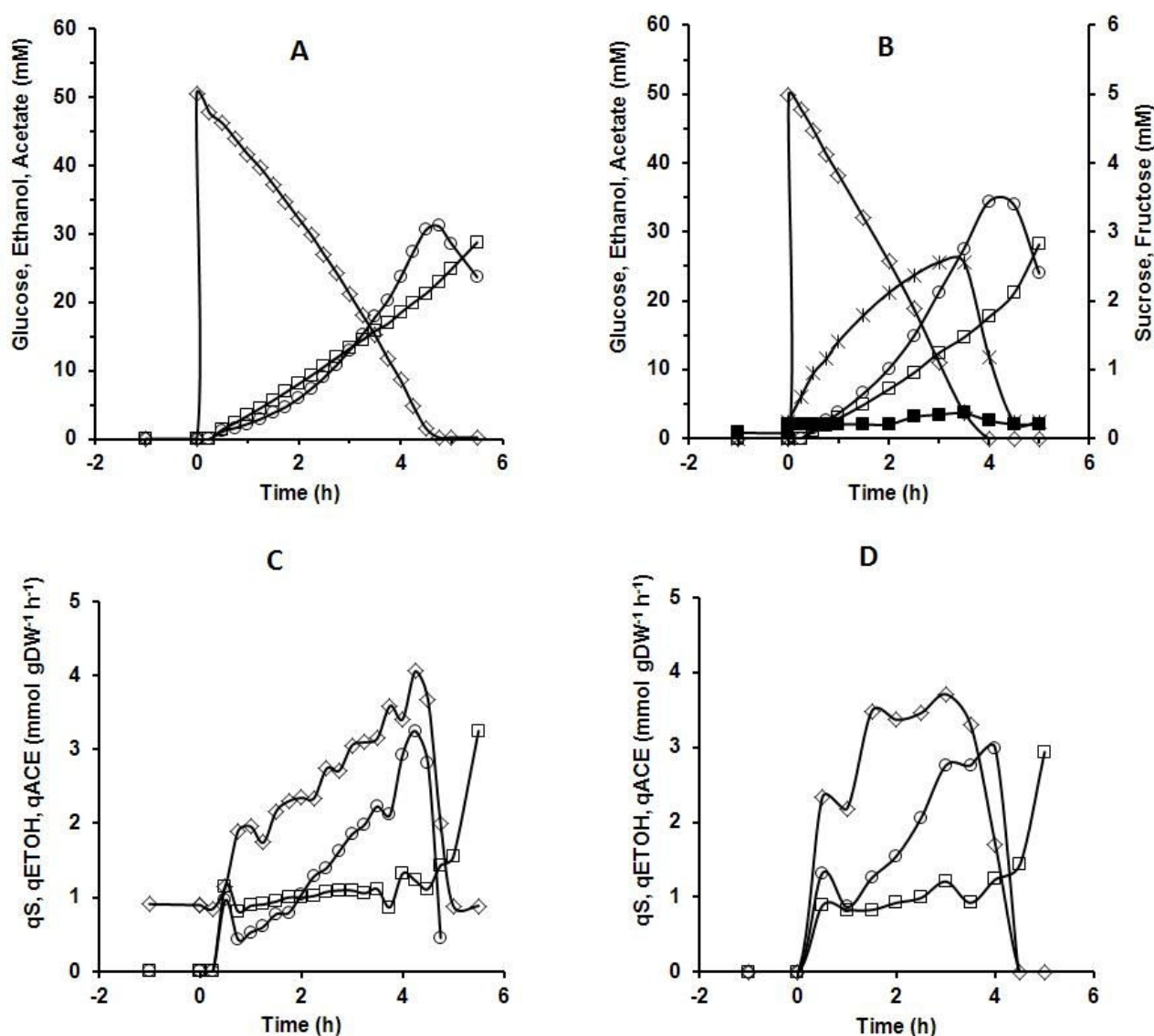


Figure 3. Residual glucose (□) and production of ethanol (□) and acetate (•) (panels A and B) and rates of glucose consumption (qS - □) and ethanol (qETOH - □) and acetate (qACE - •) production (panels C and D) and following pulse of glucose to 50 mM of steady state chemostat on glucose (panels A and C) or sucrose (panels B and D). Sucrose (□) and fructose (□) accumulation after pulse are also shown (panel B).

The specific glucose consumption rate increased immediately after the pulse and reached 3.2 and 3.6 mmol gDW⁻¹ h⁻¹ in glucose- and sucrose-limited cultures, respectively (Fig. 3c,d). The

release of the C-limited condition was accompanied by a short-time switch from respiratory to respiro-fermentative metabolism that led to an accumulation of ethanol, detected 15 minutes after pulsing (Fig. 3a,b). This response is characteristic of yeasts having a Crabtree positive metabolism, similar to *S. cerevisiae* (Van Urk *et al.*, 1988; van Maris *et al.*, 2003; Visser *et al.*, 2004). These results suggest that both *S. cerevisiae* and *D. bruxellensis* have a short-term Crabtree effect. These yeasts differ from *Kluyveromyces lactis*, which produces ethanol only after 40 minutes following a glucose pulse in aerobic C-limited chemostat, showing a behavior of delayed transient fermentative response (Kiers *et al.*, 1998). On the other hand, *K. marxianus* is referred to as a Crabtree-negative yeast owing to the lack of ethanol production following a glucose pulse in aerobic C-limited chemostat, which indicates that even under a glucose excess *K. marxianus* employs a fully respiratory metabolism leading only to the production of biomass and CO₂ (Bellaver *et al.*, 2004).

The metabolic transition during the glucose pulse experiment with *D. bruxellensis* also led to the overflow production of acetate, similarly to what was observed in shake flask experiments (Fig. 1). At the end of the glucose pulse, the ratio between the concentrations of ethanol (30.6 mM) and acetate (21.3 mM) was about 1.5:1. Is noteworthy that with *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D cells, a much higher proportion of ethanol to acetate (5:1) was observed in a similar pulse experiment performed in a glucose-limited chemostat culture (van Maris *et al.*, 2003). In the pulse experiment with *D. bruxellensis* GDB 248, the acetate production rate was practically constant during the period of glucose consumption (Fig. 3c,d). On the other hand, the ethanol production rate showed an increase throughout the period of glucose consumption and the maximal rates were obtained near the end of the glucose pulse. This behavior of GDB 248 is different from that described by van Urk *et al.* (1990) for the strain CBS 1943 (previously referred to as *B. intermedius*), which produced ethanol and acetate at equimolar amounts.

In sucrose-limited chemostats of *D. bruxellensis* GDB 248, accumulation of sucrose was observed just after the glucose pulse was applied, and reached a maximal concentration of 0.9 g

sucrose L^{-1} (Fig. 3b). Fructose concentration remained very low all along the glucose pulse, confirming that sucrose is not hydrolyzed in the medium but only after its uptake by the cells. The sucrose accumulated in the medium corresponds to almost all the sucrose fed to the system during the pulse, meaning that its uptake by *D. bruxellensis* cells was nearly vanished during this period. This may be an indicative of the action of a short term catabolic (or glucose) repression mechanism similar to what is found in *S. cerevisiae* (Kresnowati *et al.*, 2006). As soon as the glucose concentration fell below the repressive level ($\sim 0.7 \text{ g L}^{-1}$ in this study), the sucrose consumption was triggered, with an uptake rate of $1 \text{ mmol gDW}^{-1} \text{ h}^{-1}$, which is the double of the sucrose uptake rate during the C-limited steady state preceding the glucose pulse, and is equivalent, in mass terms, to the glucose consumption rate observed just after the pulse ($2.0 \text{ mmol gDW}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Therefore, either in the case of the addition of a glucose pulse to a C-limited culture or when the repression of the sucrose consumption was relieved, the initial unrestricted uptake rate was the same.

Concluding remarks

In the last few years, the number of studies on the physiology of the yeast *D. bruxellensis* has increased, owing to its key role as a contaminant in important industrial fermentative processes (wine and ethanol fuel). These studies have been mainly driven by the remarkable ability of *D. bruxellensis* cells to adapt to the industrial environment and its potential use in ethanol production from sugarcane or lignocellulose hydrolysate, as previously reported (Pereira *et al.*, 2012; Blomqvist *et al.*, 2010). In the present work, we have sought to extend the knowledge of the aerobic physiology of this yeast, including the kinetics of the cell growth on different carbon sources of industrial relevance, the dynamics of metabolite formation during respiro-fermentative metabolism, some physiological traits regarding sucrose dissimilation and the quantitation of the stoichiometry of its growth on glucose, based on data obtained from well-defined chemostat conditions.

Our results have shown that aerobic, C-limited cultures of *D. bruxellensis* on glucose or sucrose produce 20% more biomass than an equivalent culture of *S. cerevisiae*, and require less than half the amount of oxygen consumed by *S. cerevisiae*. As a consequence, the mass production of *D. bruxellensis* biomass would need not only less carbon substrate, but also a much less power consumption in order to ensure the necessary oxygen transfer rate. Therefore, the production of *D. bruxellensis* cell biomass as an industrial starter for fermentation processes or as a source of single cell protein may well prove to be economically advantageous as compared to *S. cerevisiae*.

This study has also confirmed that *D. bruxellensis* can be regarded as short-term Crabtree-positive yeast, the formation of ethanol starting immediately in response to glucose excess.

Acknowledgements

This work was sponsored by the Bioethanol Research Network of the State of Pernambuco (CNPq-FACEPE/PRONEM program). FCBL and TOB would like to express their gratitude for the grant and Ph.D. scholarships provided by Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, Pernambuco, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, Brazil), respectively. AKG is grateful for the research funding provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil).

References

- Aguilar Uscanga M, Delia ML & Strehaiano P (2003) *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Appl Microbiol Biot* **61**: 157-162.
- Basílio ACM, de Araújo PRL, de Moraes JOF, da Silva Filho E, de Moraes M & Simões D (2008) Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Curr Microbiol* **56**: 322-326.

- Basso TO, Dario MG, Tonso A, Stambuk BU & Gombert AK (2010) Insufficient uracil supply in fully aerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* leads to respiro-fermentative metabolism and double nutrient-limitation. *Biotechnol Lett* **32**: 973-977.
- Bellaver LH, Carvalho NMB, Abrahão Neto J & Gombert AK (2004) Ethanol formation and enzyme activities around glucose 6 phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. *FEMS Yeast Res* **4**: 691-698.
- Blomqvist J, Eberhard T, Schnürer J & Passoth V (2010) Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. *Appl Microbiol Biot* **87**: 1487-1497.
- Brandam CBC, Castro-Martínez CCMC, Marie-Line Délia MLD, Ramón-Portugal FRPF & Strehaiano PSP (2007) Effect of temperature on *Brettanomyces bruxellensis*: metabolic and kinetic aspects. *Can J Microbiol* **54**: 11-18.
- Carnicer M, Baumann K, Töplitz I, Sánchez-Ferrando F, Mattanovich D, Ferrer P & Albiol J. (2009) Macromolecular and elemental composition analysis and extracellular metabolite balances of *Pichia pastoris* growing at different oxygen levels. *Microb Cell Fact* **8**: 65.
- Conterno L, Joseph CML, Arvik TJ, Henick-Kling T & Bisson LF (2006) Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *Am J Enol Viticult* **57**: 139–147.
- da Silva Filho EA, de Melo HF, Antunes DF, dos Santos SK, do Monte Resende A, Simões DA & de Moraes MA Jr (2005) Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *J Ind Microbiol Biot* **32**(10): 481-486.

- de Barros Pita W, Leite FCB, de Souza Liberal AT, Simões DA & de Morais MA (2011) The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek* **100**(1): 99-107.
- de Souza Liberal A, Basilio A, do Monte Resende A, *et al.* (2007) Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *J Appl Microbiol* **102**: 538-547.
- Diderich JA, Schepper M, Van Hoek P *et al.* (1999) Glucose uptake kinetics and transcription of HXT genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**: 15350–15359.
- Galafassi S, Merico A, Pizza F, Hellborg L, Molinari F, Piskur J & Compagno C (2011) *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygenlimited and low-pH conditions. *J Ind Microbiol Biot* **38**: 1079–1088.
- Helinga, C. (1992) Macrobal 2.02, Delft University of Technology, The Netherlands.
- Jansen ML, Diderich JA, Mashego M, Hassane A, de Winde JH, Daran-Lapujade P & Pronk JT (2005) Prolonged selection in aerobic, glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* causes a partial loss of glycolytic capacity. *Microbiology* **151**: 1657-1669.
- Jensen SL, Umiker NL, Arneborg N & Edwards CG (2009) Identification and characterization of *Dekkera bruxellensis*, *Candida pararugosa* and *Pichia guilliermondii* isolated from commercial red wines. *Food Microbiol* **26**: 915-921.
- Kiers J, Zeeman AM, Luttik M, *et al.* (1998) Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. *Yeast* **14**: 459-469.
- Kresnowati MT, van Winden WA, Almering MJ, ten Pierick A, Ras C, Knijnenburg TA, Daran-Lapujade P, Pronk JT, Heijnen JJ & Daran JM (2006) When transcriptome meets metabolome: fast cellular responses of yeast to sudden relief of glucose limitation. *Mol Syst Biol* **2**: 49.

- Lange HC & Heijnen JJ (2001) Statistical reconciliation of the elemental and molecular biomass composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **75(3)**: 334-344.
- Loureiro V & Malfeito-Ferreira M (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. *Int J Food Microbiol* **86**: 23-50.
- Mashego M, Van Gulik W, Vinke J & Heijnen J (2003) Critical evaluation of sampling techniques for residual glucose determination in carbon limited chemostat culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol and bioeng* **83**: 395-399.
- Olsson L & Nielsen J (1997) On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. *Trends Biotechnol* **15**: 517-522.
- Passoth V, Blomqvist J & Schnurer J (2007) *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol process. *Appl Environ Microb* **73**: 4354-4356.
- Pereira LF, Bassi AP, Avansini SH, Neto AG, Brasileiro BT, Ceccato-Antonini SR & de Moraes MA Jr (2012) The physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek* **101(3)**: 529-539.
- Procházka E, Poláková S, Piškur J & Sulo P (2010) Mitochondrial genome from the facultative anaerobe and petite positive yeast *Dekkera bruxellensis* contains the NADH dehydrogenase subunit genes. *FEMS Yeast Res* **10**: 545-557.
- Rozpedowska E, Hellborg L, Ishchuk OP, *et al.* (2011) Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nat Commun* **2**: 302.
- Silveira M, Carvajal E & Bon E (1996) Assay for in vivo yeast invertase activity using NaF. *Anal Biochem* **238**: 26-28.

- Stambuk BU (1999) A simple experiment illustrating metabolic regulation: Induction versus repression of yeast α -glucosidase. *Biochem Educ* **27**: 177-180.
- Van der Heijden R, Romein B, Heijnen J, Hellinga C & Luyben K (1994) Linear constraint relations in biochemical reaction systems: II. Diagnosis and estimation of gross errors. *Biotechnol Bioeng* **43**: 11-20.
- van Dijken JP & Scheffers WA (1986) Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 199-224.
- van Maris AJA, Luttik MAH, Winkler AA, van Dijken JP & Pronk JT (2003) Overproduction of threonine aldolase circumvents the biosynthetic role of pyruvate decarboxylase in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microb* **69(4)**: 2094–2099.
- Van Urk H, Mark PR, Scheffers WA & Van Dijken JP (1988) Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621 upon transition from glucose limitation to glucose excess. *Yeast* **4**: 283-291.
- Van Urk H, Voll WS, Scheffers WA & Van Dijken JP (1990) Transient-state analysis of metabolic fluxes in crabtree-positive and crabtree-negative yeasts. *Appl Environ Microb* **56(1)**: 281-287.
- Vemuri GN, Eiteman MA, McEwen JE, Olsson L & Nielsen J (2007) Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104(7)**: 2402-2407.
- Verduyn C, Postma E, Scheffers WA & van Dijken JP (1990) Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J Gen Microbiol* **136(3)**: 405-412.
- Verduyn C, Stouthamer AH, Scheffers WA & Dijken JP (1991) A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* **59**: 49-63.

Verduyn C, Postma E, Scheffers WA & Van Dijken JP (1992) Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* **8**: 501-517.

Visser D, van Zuylen GA, van Dam JC, *et al.* (2004) Analysis of in vivo kinetics of glycolysis in aerobic *Saccharomyces cerevisiae* by application of glucose and ethanol pulses. *Biotechnol Bioeng* **88**: 157-167.

Wijsman MR, Dijken JP, Kleeff BHA & Scheffers WA (1984) Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). *Antonie van Leeuwenhoek* **50**: 183-192.

Woolfit M, Rozpedowska E, Piskur J & Wolfe KH (2007) Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Eukaryot cell* **6**: 721.

Catabolite repression in the yeast *Dekkera bruxellensis*

Trabalho a ser submetido a **Antonie van Leeuwenhoek**

<http://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/10482>

ARTIGO 3

Catabolite repression in the yeast *Dekkera bruxellensis*

Fernanda Cristina Bezerra Leite¹, Will Barros Pita¹, Diogo Ardaillon Simões^{1,3}, Marcos Antonio de Moraes Júnior^{1,2}.

¹Interdepartmental Research Group in Metabolic Engineering, ²Department of Genetics and

³Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, PE 50760-901, Brazil.

Correspondence:

Marcos A. Moraes Jr

Departamento de Genética - Universidade Federal de Pernambuco

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

Phone/Fax: 00-55-81-21268522

E-mail: marcos.morais@pesquisador.cnpq.br

Web site: www.ufpe.br/nem

Abstract

Dekkera bruxellensis is able to assimilate and metabolize a variety of carbon sources. Like other yeasts, glucose is the preferred carbon source and also acts as a signaling molecule regulating the cellular response to nutrient availability in the environment and adjusting it to this condition, an effect named glucose catabolite repression. This study aimed to evaluate the effect of glucose catabolite repression at yeast cells of *D. bruxellensis* on carbon metabolism. Experiments were performed using 2-deoxy-glucose and 6-deoxy-glucose and their effects on assimilation of diverse carbon source were evaluated by growth cells, relative expression of *DbFBP1* gene and trehalase activity. The results showed that *D. bruxellensis* has a refined system that responds to glucose available and that this response is similar to *S. cerevisiae* but different of *K. marxianus*.

Key words: *Dekkera bruxellensis*, glucose catabolite repression, 2-deoxy-glucose, trehalase activity.

Introduction

Glucose is the preferred source of carbon and it is also an important signaling molecule for a series of metabolic events and regulatory mechanisms within cells, including degradation of some enzymes (PORTELA et al., 2006) and alterations in the stability of mRNA molecules of genes involved at alternative carbon source and respiratory pathways (KRESNOWATI et al., 2006). This effect is called glucose catabolite repression. When in the presence of glucose, the cell triggers the necessary adjustments to cellular metabolism and gene expression appropriate to the condition of carbon and energy availability in the environment.

The yeast *Dekkera bruxellensis* has been identified as the main contaminant of the industrial process to produce ethanol but, recently, studies has showed that this yeast is able to produce ethanol at interesting yields (BLOMQVIST et al., 2010; DE BARROS PITA et al., 2011; PEREIRA et al., 2011). Its competitive performance in regards to *Saccharomyces cerevisiae* has stimulated interest in identifying the mechanisms that justify this adaptive advantage. Differences between the regulatory mechanisms of glucose signaling pathway may explain the remarkable fitness of *D. bruxellensis* relative to *S. cerevisiae*, besides the low sugar assimilation kinetics and low ethanol productivity reported (Basilio et al 2008; Pereira et al 2011).

The compounds such as 2-deoxy-D-glucose (2DG) and 6-deoxy-D-glucose (6DG) are stable glucose analogues that are taken up by the yeast cells through the hexose transporters but cannot be further metabolized by glycolytic pathway. These analogues have been utilized to evaluate the repressor effect of glucose on the metabolism of other sugars. The cells of *D. bruxellensis* are able to grow on several carbon sources, however not known about the effect of glucose on the metabolism of the other carbon sources (BLOMQVIST et al., 2010; GALAFASSI et al., 2011).

Thus, this study aimed to evaluate the effect of glucose catabolite repression at yeast cells of *D. bruxellensis* through the analysis of relative expression of the gene *DbFBP1* that encodes fructose 1,6-bisphosphatase, an irreversible enzyme of the gluconeogenic pathway and by the trehalase activity of cells submitted to those glucose analogues. The results showed that *D. bruxellensis* presents the glucose catabolic repression similar to that found *S. cerevisiae*.

Materials and Methods

Strains and culture media

Dekkera bruxellensis type-strain CBS 74 and industrial strain GDB 248 (de Barros Pita, *et al.*, 2011), *Saccharomyces cerevisiae* JP1 industrial strain and *Kluyveromyces marxianus* type-strain CBS 6556 were used in this study. Stock cultures were grown in shake flasks containing YP medium (1% yeast extract, 2% bacteriological peptone) with 20 g L⁻¹ glucose. After overnight growth, 20% (v/v) glycerol was added and 1 mL aliquots were stored at -80°C. Plates experiments were carried with mineral medium (MM) containing 0.67% of YNB (Yeast nitrogen base, HIMEDIA), 2% of carbon source (maltose, lactose, raffinose, sucrose or glycerol) and 2% of agar.

Agar plate experiments

Yeast cells were grown at agar plate containing appropriate carbon source and incubated for 3 days at 30°C. Afterwards, yeast cells were transferred to plate containing the same carbon source and 2-deoxy-D-glucose (2-DG) or 6-deoxy-D-glucose (6-DG) to a final concentration of 6 and 2 mM, respectively. The plates containing yeast cells were incubated for 5 days at 30 °C.

Induction by glucose experiments

Cells were pre-grown at 30°C and 150 rpm in a rotator shaker for 24 hours in shake flasks containing medium MM glycerol. When cells reached an optical density (A600nm) of around 1.0, they were transferred to appropriated medium for induction experiments and incubated for one hour at 30°C. Cells were collected for RNA total and protein total extraction.

Gene expression by RT-qPCR

Samples were collected after one hour of incubation and immediately frozen with dry ice and ethanol and stored at -80°C. Total RNA was isolated using the NucleoSpin RNA II extraction kit, (following the manufacturer's instructions) and cDNA was synthesized by reverse transcriptase ImProm II kit (Promega) using 1 µg of total RNA for each reverse transcription reaction tube (40 µL) with Oligo(dT), (in accordance with the manufacturer's instructions). cDNA was stored at -20 °C until submitted to the qPCR assays. RT-qPCR reactions were performed using SYBR Master Mix (Applied Biosystems) and the parameters were as follows: SYBR Green (5 µL), primers 200 nM (0.4 µL each), H₂O (3.2 µL) and cDNA (1 µL). The temperature-time profile (95 °C for 10 min and 40 cycles of 95 °C for 15 sec and 60 °C 6 for 1 min) was optimized for ABI Prism 7300 (Applied Biosystems). *DbACT1*, *DbYNA1* and *DbEFA1* were tested and subsequently validated as reference genes for data analysis by geNorm algorithm, as recommended by Nardi *et al* (2010) and de Barros Pita *et al* (2011). Relative quantities of *DbFBP1* gene in all the samples were analyzed by means of normalization factors calculated by geNorm applet. The sample collected from MM glucose medium was used as a reference condition. Primers for RT-qPCR were designed with the aid of Primer Express software (Applied Biosystems): *Db_FBP1for* (5'-CATCGATCGGGTCACAGCAAC) and *Db_FBP1rev* (5'-GCTATGCGGGCTTCTGATAA). Primers for *DbACT1* gene were designed by Nardi *et al* (2010) and those for *DbYNA1* and *DbEFA1* by de Barros Pita *et al* (2011). The optimization of assays, including the concentration of primers and amplification efficiency were performed as described by de Barros Pita *et al* (2011).

Trehalase activity and protein determination

Trehalase activity was determined in 10 μ L crude cell extracts protein. Extract was incubated with 50 μ L substrate buffer (250 mM trehalose in 25 mM MOPS buffer, pH 7, with 50 μ M CaCl_2) for 30 min at 30 $^{\circ}\text{C}$. The reaction was stopped by boiling for 3 min at 100 $^{\circ}\text{C}$ and cooled on ice, as described previously (PERNAMBUCO et al., 1996). The glucose liberated was assayed by the glucose oxidase/oxidase method using a commercial kit Glucose PAP Liquiform (LABTEST). Protein was determined according to Lowry procedure using bovine serum albumin as the standard. The specific activity of trehalase is expressed as nmol glucose liberated min^{-1} (mg protein) $^{-1}$.

Results and Discussion

Effect of 6-deoxy-glucose and 2-deoxy-glucose on carbon metabolism

The presence of the 6DG did not inhibit assimilation and metabolization of the carbon sources tested by *D. bruxellensis* cells, similar to observed for *S. cerevisiae* and *K. marxianus* cells (Figure 1). *Kluyveromyces lactis*, a budding yeast related to *Saccharomyces cerevisiae*, can grow on a wider variety of substrates and shows less sensitivity to glucose repression than does *S. cerevisiae*. Many genes that are subject to glucose repression in *S. cerevisiae* are repressed only weakly or not at all in *K. lactis* (GEORIS et al., 1999). The compound 6DG can be transported into the cell but cannot be phosphorylated by hexokinase to form glucose-6-phosphate. In cells of *S. cerevisiae*, only the transport of glucose is not sufficient to trigger the glucose signaling to active the cascade of cAMP-dependent PKA pathway. The RAS GTPase, involved in the activation of adenylate cyclase pathway, appears to be activated by intracellular phosphorylated glucose but not by extracellular glucose (ROLLAND et al., 2002; SANTANGELO, 2006). The results obtained with *D. bruxellensis*

suggest that this species, as well as *S. cerevisiae*, depends on intracellular phosphorylated glucose to trigger the glucose signaling.

On the other hand, glucose repression effect on carbon metabolism was observed when the cells of *D. bruxellensis* were cultivated at presence of 2DG (Figure 1). The compound 2DG is transported into the cell and phosphorylated by hexokinase, but it cannot be further metabolized through the glycolytic pathway at the isomerization step to fructose-6-phosphate. Therefore, this compound simulates the presence of phosphorylated glucose into the cell and its effect can be observed. When yeast cells were cultivated at plate containing sucrose and 2DG, the assimilation of sucrose was completely inhibited in *D. bruxellensis* cells, but not in *K. marxianus* cells, which is known to have an attenuated glucose repression (Lertwattanasakul et al 2011). The weak growth of *S. cerevisiae* cells that can be observed at sucrose supplemented with 2DG can be explain by major extracellular invertase activity in this cells. As sucrose is hydrolyzed extracellular, glucose is available for assimilation, wherever, it is not sufficient to support a rapid and robust growth since there is also the assimilation of 2DG, which has repressor effect on invertases (SUC genes). In cells of *D. bruxellensis*, the invertase activity is about 90% intracellular (manuscript submitted) and this discrete effect of the hydrolysis of sucrose cannot be observed.

These results suggest that *D. bruxellensis* has a glucose repression system quite similar to *S. cerevisiae*. Most of the downstream targets genes under the PKA control are identified as enzymes involved in growth and proliferation cellular, glycolysis, gluconeogenesis, stress response and metabolism of glycogen and trehalose (THEVELEIN et al., 1999).

To assimilate maltose, *S. cerevisiae* cells require *MAL locus* and transcription of structural genes of maltose permease (MALT) and maltase (MALS) and these genes are subject to catabolite (glucose) repression (RINCON et al., 2001). In the assays using this carbon source supplemented

with 2DG, *D. bruxellensis* cells were inefficient to assimilate maltose, a similar behavior to *S. cerevisiae* cells. Then, it is likely there are similarities between the control of assimilation of maltose for *S. cerevisiae* and *D. bruxellensis* cells.

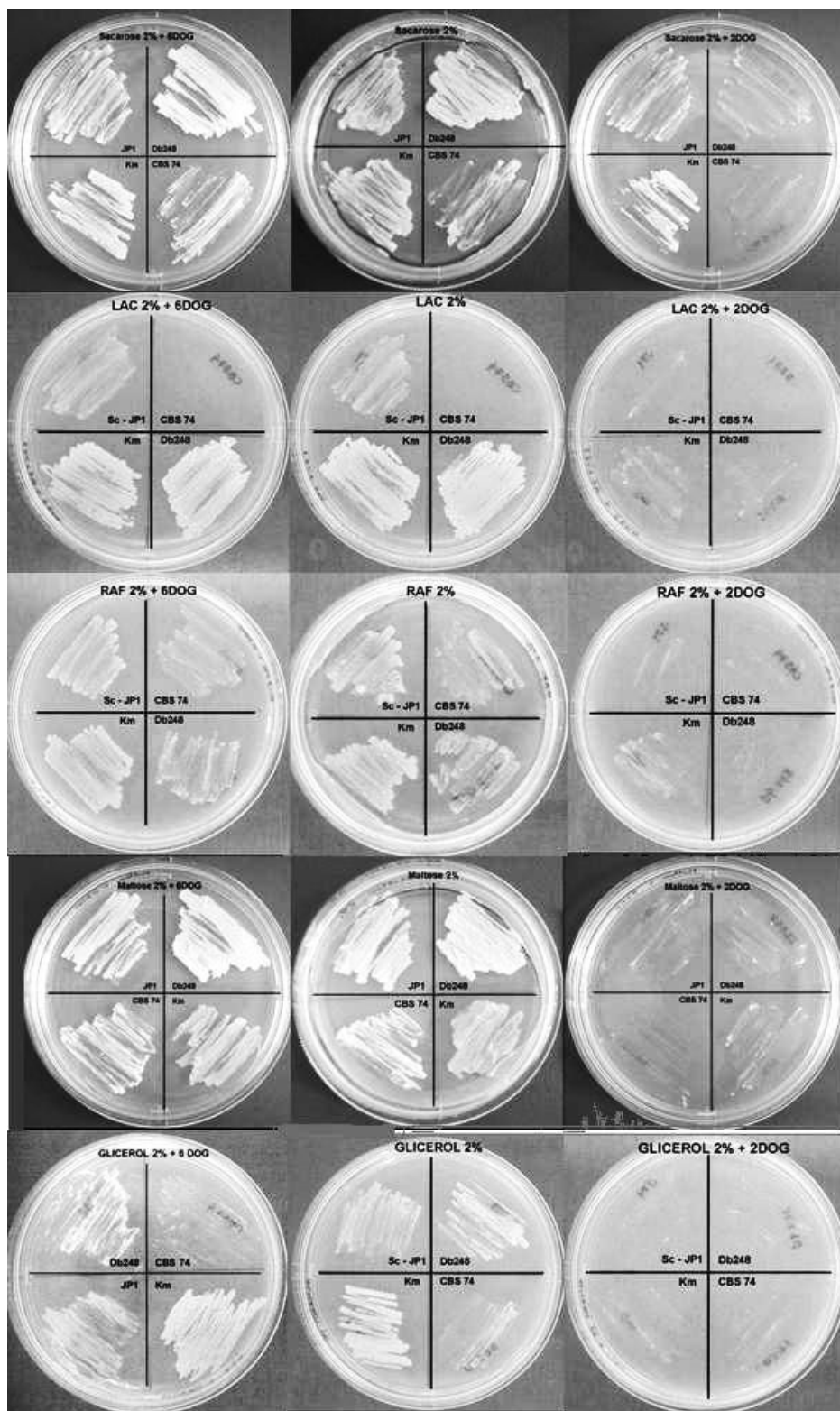


Figure 1 – Effect of 2-deoxy-glucose (2DG) and 6-deoxy-glucose(6DG) on metabolism of diverse carbon source in cells of *D. bruxellensis*. SUC, sucrose; LAC, lactose; RAF, raffinose; MAL, maltose; JP1, *S. cerevisiae* strain; Km, *K. maxianus* strain; Db248 and CBS 74, *D. bruxellensis* strain.

DbFBP1* gene expression and trehalase activity in cells of *D. bruxellensis

Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) is an irreversible enzyme of gluconeogenesis and its inactivation by glucose has been most extensively studied. In *S. cerevisiae* cells, it has been shown that glucose causes a very rapid phosphorylation of FbPase and a proteolytic degradation of the enzyme (GANCEDO, 1998). Its coding gene is also submitted to catabolic repression in the presence of glucose (Belinchón et al 2007), which amplifies the signal of metabolic repression of the gluconeogenesis by this sugar. While the *FBP1* mRNA is not detectable in *S. cerevisiae* cells growing in glucose, the level of *FBP1* mRNA in *K. lactis* is reduced about only 2 to 4 times due to the presence of glucose (Zaror et al 1993).

D. bruxellensis cells were submitted to induction experiments using several carbon sources and the *DbFBP1* expression gene and trehalase activity were investigated. Results showed that *DbFBP1* gene is strongly regulated by glucose availability and that glucose is fast enough to avoid extensive catabolite inactivation on this gene (Figure 2). When cells are transferred from fermentative (glucose) to respiratory (ethanol or glycerol) condition, the relative expression was increased around 400 times. The catabolite repression was also observed when the cells were cultivated in ethanol in the presence of 2DG. In this condition, the relative expression of *DbFBP1* gene was quite similar to cells growing at glucose media, showing that phosphorylated glucose is required to trigger the catabolite repression. On the other hand, the results showed that maltose also had a repressor response on the relative expression of *DbFBP1* gene in *D. bruxellensis* cells. Hydrolysis of maltose results at two molecules of glucose and that glucose must plays this effect repressor. In *S. cerevisiae* cells, structural genes of gluconeogenesis driven by CSRE (carbon-source responsive element) motifs are similarly repressed by glucose and maltose (SCHÖLER et al., 1993). Then, it is probable that *D. bruxellensis* has this CSRE motif too or a similar systems of regulation of gene expression.

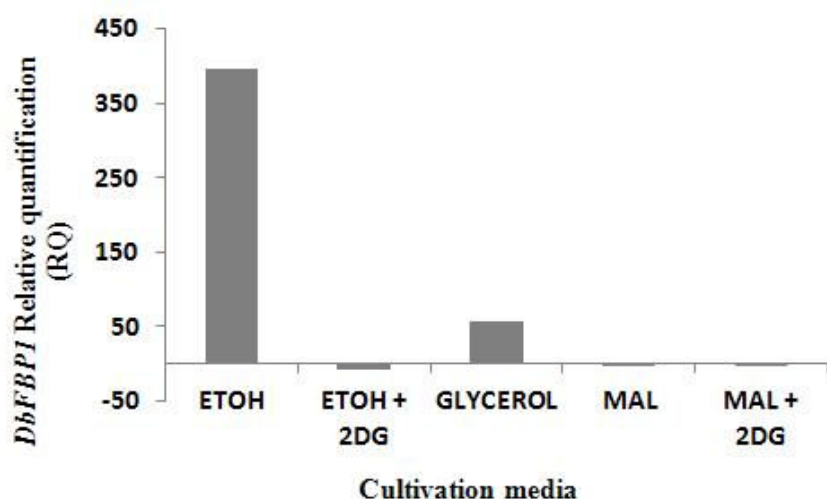


Figure 2 – Relative quantification by RT-qPCR of *DbFBPI* gene at *D. bruxellensis* cells submitted to glycerol, ethanol or maltose supplemented with 2DG. Glucose medium was used as reference condition.

The neutral trehalase enzyme degrades trehalose resulting at two glucose molecules. In *S. cerevisiae* cells, trehalase presents high activity during exponential growing at glucose medium as a result of activation of the cAMP-dependent PKA pathway. This activity is decreased when the cells are reaching the stationary phase and the cAMP concentration falls (FRANÇOIS et al., 1987). PKA is the only protein kinase known to directly phosphorylate and activate neutral trehalase (*NTH1*) (UNO et al., 1983) and it has been used to evaluate the PKA activity. The activity of trehalase enzyme measured in the *D. bruxellensis* cell-free extracts showed that this yeast present a refined system of response to carbon available at the medium. As shown at the Figure 3, only five minutes at presence of glucose was sufficient to trigger the trehalase activity as response to this carbon source. In cells growing in others carbon sources, fermentable or non-fermentable, the trehalase activity showed a minimal basal activity (< 4 mM Glucose/min.mg PTN) while in glucose condition the trehalase activity was about 100 times higher than glycerol or ethanol condition, after one hour

of incubation. When the *D. bruxellensis* cells were incubated in ethanol or maltose supplemented with 2DG, the inducing effect by glucose was not observed.

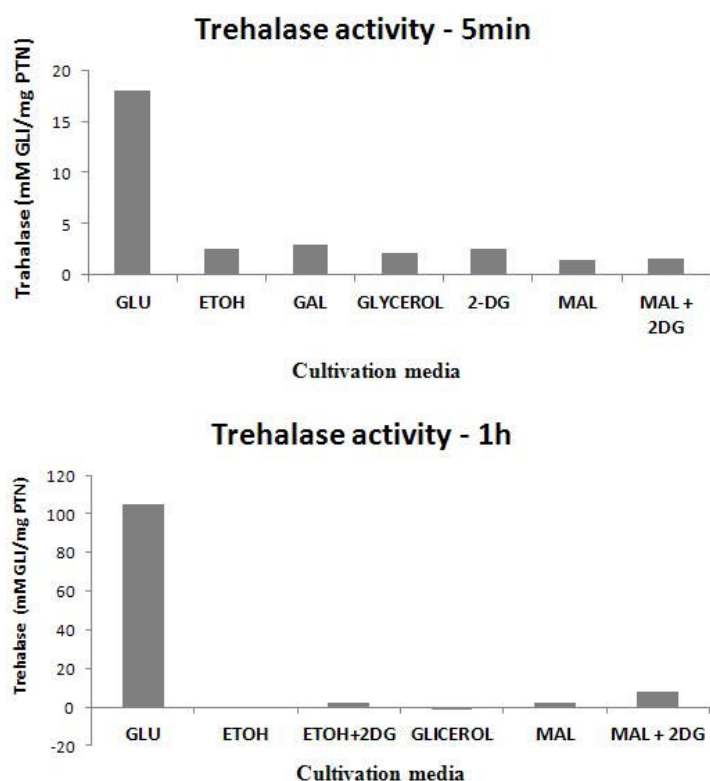


Figure 3 – Trehalase activity at *D. bruxellensis* cells submitted to fermentable and non-fermentable carbon source.

Conclusion

These results provide an insight into the mechanism of glucose repression on assimilation of raffinose, lactose, maltose, sucrose and glycerol in cells of *D. bruxellensis* which can efficiently utilize this carbon sources. As stated, when the medium is supplemented with 2DG, a mimic glucose, no growth can be observed because the effect of presence of glucose. This response is similar to *S. cerevisiae* but different of *K. marxianus* response, which no presents any detectable effect of glucose repression on sucrose assimilation. The expression of *DbFBP1* gene strongly

repressed by glucose can be an indicative of a more refined system of this response of glucose-dependent gene expression. Finally, data of trehalase activity showed that quinase protein A is the signaling pathway involved in this response to glucose available since is known that PKA is only protein able to activate trehalase enzyme. Taken together, these results provide the first outlook on the glucose repression mechanism in cells of *D. bruxellensis* and we suggest the DbFBP1 gene as marker gene for studies of glucose repression.

Reference

- Blomqvist J, Eberhard T, Schnürer J, Passoth V (2010) Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. *Applied microbiology and biotechnology* 87 (4):1487-1497
- de Barros Pita W, Leite FCB, de Souza Liberal AT, Simões DA, de Morais MA (2011) The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek*:1-9
- François J, Eraso P, Gancedo C (1987) Changes in the concentration of cAMP, fructose 2, 6-bisphosphate and related metabolites and enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose. *European Journal of Biochemistry* 164 (2):369-373
- Galafassi S, Merico A, Pizza F, Hellborg L, Molinari F, Piškur J, Compagno C (2011) *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*:1-10
- Gancedo JM (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and molecular biology reviews* 62 (2):334
- Georis I, Cassart JP, Breunig K, Vandenhoute J (1999) Glucose repression of the *Kluyveromyces lactis* invertase gene *KIINV1* does not require Mig1p. *Molecular and General Genetics* MGG 261 (4):862-870
- Kresnowati M, Van Winden W, Almering M, Ten Pierick A, Ras C, Knijnenburg T, Daran-Lapujade P, Pronk J, Heijnen J, Daran J (2006) When transcriptome meets metabolome: fast

- cellular responses of yeast to sudden relief of glucose limitation. *Molecular Systems Biology* 2 (1)
- Pereira LF, Bassi APG, Avansini SH, Neto AGB, Brasileiro BTRV, Ceccato-Antonini SR, de Moraes MA (2011) 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*:1-11
- Pernambuco MB, Winderickx J, Crauwels M, Griffioen G, Mager WH, Thevelein JM (1996) Glucose-triggered signalling in *Saccharomyces cerevisiae*: different requirements for sugar phosphorylation between cells grown on glucose and those grown on non-fermentable carbon sources. *Microbiology* 142 (7):1775
- Portela P, Moreno S (2006) Glucose-dependent activation of protein kinase A activity in *Saccharomyces cerevisiae* and phosphorylation of its TPK1 catalytic subunit. *Cellular signalling* 18 (7):1072-1086
- Rincon AM, Codon AC, Castrejon F, Benitez T (2001) Improved properties of baker's yeast mutants resistant to 2-deoxy-d-glucose. *Applied and environmental microbiology* 67 (9):4279
- Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM (2002) Glucose sensing and signalling mechanisms in yeast. *FEMS yeast research* 2 (2):183-201
- Santangelo GM (2006) Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* 70 (1):253
- Schöler A, Schüller HJ (1993) Structure and regulation of the isocitrate lyase gene ICL1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* 23 (5):375-381
- Thevelein JM, De Winder JH (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP–protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* 33 (5):904-918
- Uno I, Matsumoto K, Adachi K, Ishikawa T (1983) Genetic and biochemical evidence that trehalase is a substrate of cAMP-dependent protein kinase in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 258 (18):10867

CONCLUSÃO

- Os genes *DbTEF1/DbEFA1*, *DbEFB1* e *DbYNA1* demonstraram estabilidade suficiente para sua aplicação como genes de referência na normalização de dados em ensaios de expressão gênica por PCR em tempo real em diferentes combinações, dependente do metabolismo em estudo;
- A levedura *Dekkera bruxellensis* é mais eficiente em converter açúcar em biomassa que em etanol, ou seja, seu metabolismo é preferencialmente respiratório e não fermentativo;
- O rendimento em etanol é variável de acordo com a fonte de carbono e acetato é o segundo principal subproduto da assimilação de açúcares fermentáveis;
- Em quimiostatos limitados em carbono (glicose ou sacarose), células de *D. bruxellensis* apresentaram um rendimento em biomassa cerca de 25% maior quando comparada a células de *S. cerevisiae*;
- O quociente respiratório para células de *D. bruxellensis* foi cerca de 45% menor (RQ=0.62) que o descrito para *S. cerevisiae* (RQ=1.03) devido a menor taxa de produção de CO₂ e maior eficiência em incorporar carbono a biomassa celular;
- Células de *D. bruxellensis* apresenta maior taxa de crescimento em sacarose que em glicose e a sacarose é transportada para o interior da célula e então hidrolisada por invertases intracelulares, as quais representam cerca de 90% da atividade total de invertases;
- A composição elementar da biomassa para a linhagem GDB 248 de *D. bruxellensis* foi assim determinada C H_{1.76} O_{0.72} N_{0.10} sendo seu grau de redução (Nox) menor que o descrito para a biomassa de células de *S. cerevisiae*;
- A levedura *D. bruxellensis* possui um refinado sistema de repressão catabólica por glicose sobre o metabolismo de fontes de carbono, tanto respiráveis quanto fermentáveis, e o gene *DbFBP1*, codificador da enzima gliconeogênica frutose 1,6-bisfosfatase, demonstrou ser um interessante gene marcador para estudos com esta finalidade.

- Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para uma melhor compreensão a cerca do metabolismo fermentativo das células de *D. bruxellensis* e podem contribuir para uma melhor aplicação tecnológica desta espécie a produção industrial de álcool.

ANEXOS COMPLEMENTARES

1. Fermentação de celobiose pela levedura *D. bruxellensis*

A crescente busca por leveduras capazes de produzir bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica motivou-nos a iniciar a investigação acerca da capacidade fermentativa da linhagem industrial GDB 248 referente a estes substratos. No Brasil, o substrato mais abundante para esta finalidade é o bagaço da cana-de-açúcar que pode ser considerado um resíduo industrial das usinas. Em 2010, estimou-se que a produção nacional atingiu 186 milhões de toneladas de bagaço (Soccol et al, 2010). Sua composição é caracterizada por conter 19–24% de lignina, 27–32% de hemicelulose e 32–44% de celulose (Jacobsen and Wyman, 2002) e há uma estimativa promissora de que para cada 10 milhões de toneladas de biomassa seca de bagaço, 600 milhões de galões de bioetanol sejam produzidos, considerando apenas a fatia celulósica do bagaço.

A celobiose é um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose unidas por uma ligação glicosídica β -1,4 e sua clivagem é catalisada por enzimas β -glicosidases. Este dissacarídeo é produzido pela hidrólise parcial da celulose. A descrição da espécie *D. bruxellensis* por van der Walt (1904) relata que esta espécie não é capaz de assimilar ou fermentar celobiose. Entretanto, linhagens desta espécie isoladas posteriormente demonstraram ser capazes de fermentar este açúcar (Blomqvist et al, 2010; Barnett et al, 2000). Em trabalho realizado por Blomqvist e colaboradores (2010), células da linhagem CBS 11269 da levedura *D. bruxellensis* foram submetidas a condições limitantes de oxigênio e em presença de celobiose e foi observado que essa linhagem pode assimilar e fermentar este dissacarídeo, apesar de ter sido mais lenta e menos eficientemente que a assimilação e fermentação de glicose. Os rendimentos em etanol obtidos foram de 0,29 g (g celobiose)⁻¹ e 0,41 g (g glicose)⁻¹, nas mesmas condições. Spindler e colaboradores (1992) utilizaram uma linhagem da espécie *Brettanomyces custersii* e obtiveram rendimento em etanol igual a 0,40g (g celobiose)⁻¹ apesar de longo tempo de fermentação, cerca de 72h, e então sugeriram o uso desta espécie no processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF).

Para avaliar a capacidade de assimilação de açúcares presentes em hidrolisados lignocelulósicos pela linhagem GDB 248 de *D. bruxellensis*, foram realizados cultivos em frascos em meio mineral contendo YNB (0,67%) e sacarose, celobiose ou uma mistura na proporção de 1:1 de glicose e frutose. A taxa de crescimento e a formação de metabólitos foram analisadas. Foi observado que a linhagem GDB 248 é capaz de assimilar os açúcares testados e que as taxas de crescimento de glicose e sacarose foram comparáveis, enquanto foi mais lenta em frutose e

celobiose (Figura 1). Em todos os casos, todo o açúcar consumido foi convertido em biomassa, acetato e etanol, não sendo detectada nenhuma formação de glicerol nestes cultivos (Figura 2). Dentre os açúcares testados, a assimilação da celobiose foi mais lenta. A baixa produção de etanol obtida neste cultivo com relação ao descrito por Blomqvist e colaboradores (2010) pode ser explicada pela diferença na condição de cultivo, sendo neste nosso caso, aerobiose, o que estimula preferencialmente o metabolismo respiratório, característica esta já descrita para *D. bruxellensis* em virtude da sua alta eficiência na conversão de açúcar a biomassa (Pereira et al, 2011).

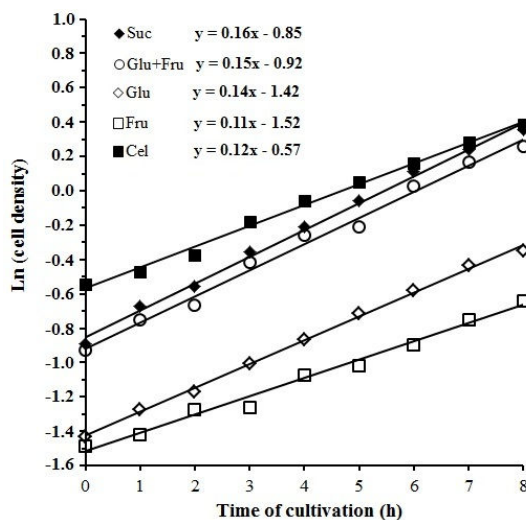


Figura 1. Cinética de crescimento de *Dekkera bruxellensis* GDB 248 em meio mineral contendo diferentes fontes de carbono a 20 g/L (glicose e frutose foram misturadas na proporção de 1:1).

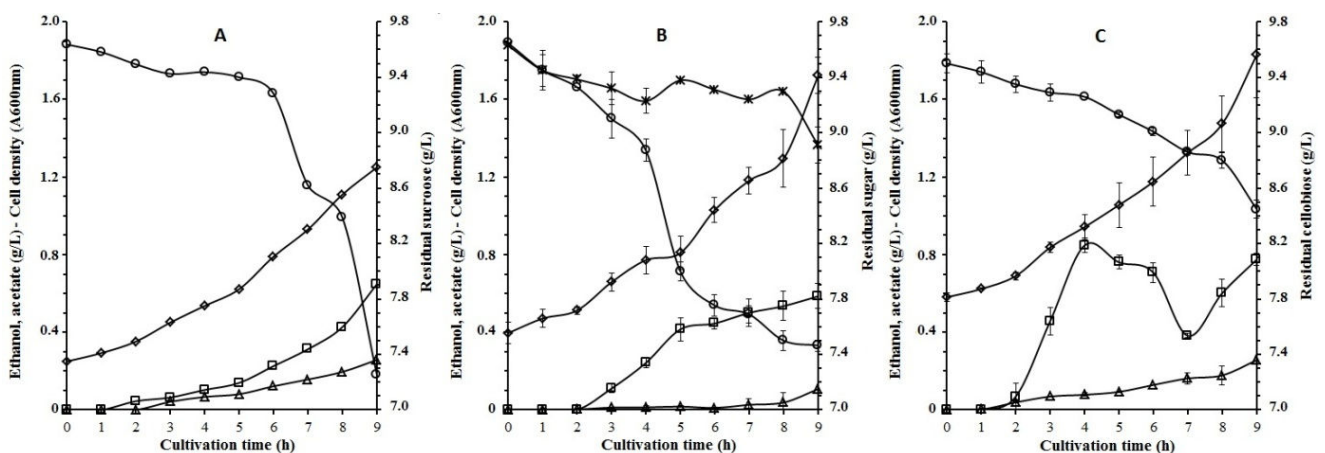


Figura 2. Parâmetros fisiológicos do cultivo em frasco de *Dekkera bruxellensis* GDB 248 em meio mineral contendo sacarose (painel A), glicose e frutose (painel B) ou celobiose (painel C). Crescimento celular foi medido pela densidade óptica a 600 nm ($\diamond$); o consume de sacarose,

glicose, celobiose (○) e frutose (*) ou a produção de etanol (□) e acetato (△) foram medidos por HPLC.

Para avaliar a capacidade fermentativa da linhagem GDB 248, foram realizados ensaios de fermentação de sacarose ou celobiose em condições de alta concentração de açúcar e biomassa e condição limitante de oxigênio. O lento consumo de açúcares pela levedura *D. bruxellensis* quando comparada a *S. cerevisiae* já uma característica marcante desta espécie. A fermentação de celobiose e sacarose por *D. bruxellensis* resultou na formação de etanol e acetato (Figura 3). Os rendimentos foram calculados no intervalo de 3 a 8 horas de fermentação e os resultados foram semelhantes para os dois açúcares: $0,29 \text{ g (g celobiose)}^{-1}$ e $0,28 \text{ g (g sacarose)}^{-1}$, apesar do consumo de celobiose ter sido mais lento do que o de sacarose. O rendimento em etanol a partir de celobiose foi igual ao descrito para a linhagem CBS 11269, em condições limitantes de oxigênio (Blomqvist et al, 2010). Quanto à produção de acetato, foi observado que a linhagem GDB 248 apresentou rendimento muito maior em celobiose, $0,47 \text{ g (g celobiose)}^{-1}$, que em sacarose, $0,1 \text{ g (g sacarose)}^{-1}$. Depois da exaustão dos açúcares do meio de fermentação, foi observado que as células de *D. bruxellensis* consumiram o etanol produzido, resultando na formação de acetato a partir deste consumo. Apesar de estes ensaios terem sido realizados utilizando em alta concentração de biomassa (10%) e o oxigênio disponível ser rapidamente consumido, a condição limitante em oxigênio estabelecida é ainda suficiente para suportar o crescimento em etanol e a produção de acetato a partir desta fonte.

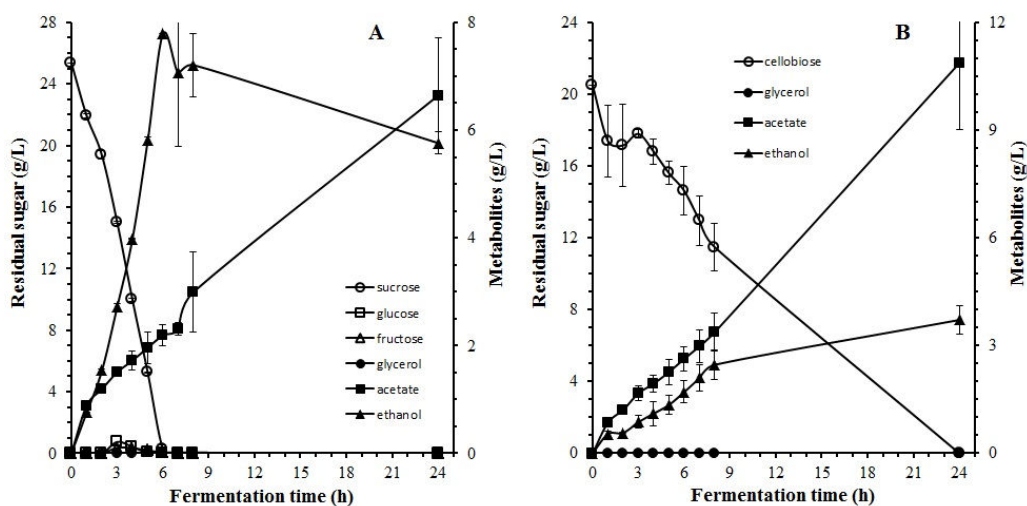


Figura 3. Cinética da fermentação de sacarose (painel A) ou de celobiose (painel B) por células de *Dekkera bruxellensis* GDB 248 em meio mineral.

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi proveniente da destilaria Miriri SA (Santa Rita, PB) e submetido a dois tratamentos: explosão a vapor na própria unidade industrial e hidrólise enzimática com preparação comercial FibrenzymeTM (USA) na proporção de 1 mL da enzima para cada 10 g de bagaço em tampão citrato pH 4,6. O protocolo seguiu as instruções do fabricante e do NRRL (USA) e a hidrólise foi realizada no Laboratório de Bioprocessos do CETENE/MCT. O hidrolisado foi então utilizado para ensaios de fermentação com as linhagens JP1 de *S. cerevisiae* e GDB 248 de *D. bruxellensis*. A concentração inicial de açúcares redutores foi calculada em 22 g/L pelo método do DNSA. Os rendimentos em etanol para a linhagem de *S. cerevisiae* e de *D. bruxellensis* foram de 0,49 g (g açúcares fermentáveis)⁻¹ e de 0,25 g (g açúcares fermentáveis)⁻¹, respectivamente (Figura 4). Nesta condição, células de *D. bruxellensis* produziram acetato em igual proporção de etanol, o que representa desvio de carbono e revela que a condição limitante de oxigênio não foi atingida. Apesar do menor rendimento em etanol e do maior tempo de fermentação para *D. bruxellensis*, ambas as leveduras consumiram a mesma quantidade de açúcares fermentáveis, sendo o açúcar residual semelhante para as duas espécies. Dois trabalhos complementares estão sendo realizados pelo nosso grupo de pesquisa neste período. No primeiro, uma sequência de nucleotídeos que codifica para uma proteína com 61% de similaridade em aminoácidos com a β -glicosidase da levedura *Kluyveromyces marxianus* foi identificada no banco de dados do genoma parcial de *D. bruxellensis* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/dekkera>). A proteína teórica codificada apresenta dois dos três domínios característicos da família das hidrolases, os quais estão relacionados como a correta configuração espacial do sítio ativo. Na região identificada como sítio ativo foram também identificados os resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico que são responsáveis pela reação de hidrólise da ligação glicosídica β -1,4 da celobiose (Torres, RRNB. Análise do gene codificante da enzima beta-glicosidase da levedura *Dekkera bruxellensis*. Dissertação de Mestrado em Genética, UFPE. 2012). O segundo trabalho tem como objetivo a purificação e a análise das características cinéticas da celobiase de *D. bruxellensis*

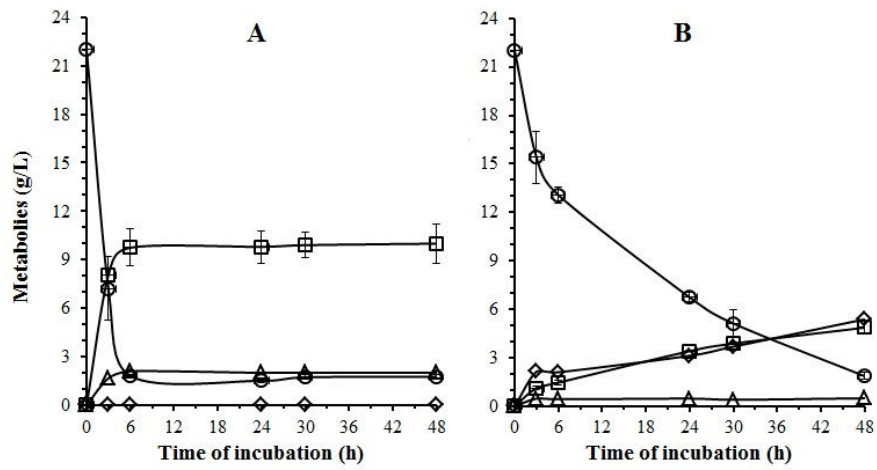


Figura 4. Cinética da fermentação do hidrolisado do bagaço de cana por células de *Saccharomyces cerevisiae* JP1 (painel A) ou *Dekkera bruxellensis* GDB 248 (painel B). O consumo dos açúcares (○) e a produção de etanol (□), glicerol (△) ou acetato (◇) foram avaliados por HPLC.

2. Artigos completos publicados em periódicos

Barros Pita, Will ; **Leite, Fernanda Cristina Bezerra**; Souza Liberal, Anna Theresa ; Simões, Diogo Ardaillon; Morais, Marcos Antonio . The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek (Gedrukt)*, v. 100, p. 99-107, 2011.

3. Resumos publicados em anais de congressos

Leite, Fernanda Cristina Bezerra; Barros Pita, Will; Morais Junior, Marcos Antonio. Estudo da Repressão Catabólica por glicose na levedura *Dekkera bruxellensis* por PCR em Tempo Real. In: 27ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2010, Guarujá-SP.

Barros Pita, Will; **Leite, Fernanda Cristina Bezerra**; Souza Liberal, Anna Theresa; Pereira, Luciana Filgueira; Morais Junior, Marcos Antonio. Validação de genes de referência para análises de expressão gênica por PCR em Tempo Real em *Dekkera bruxellensis*. In: 27ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2010, Guarujá-SP.

Miranda, André. Ribas; Anjos, Rute Salgues Gueiros; **Leite, Fernanda Cristina Bezerra**; Schuller, Alexandre R. P; Morais Junior, Marcos Antonio. Fermentação etanólica de xilose por linhagens selecionadas de *Pichia stipitis* e *Candida shehatae*. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal-RN.

4. Co-orientação a trabalho de conclusão de curso

Raquel de Fátima R. de Souza. Determinação do rendimento fermentativo em linhagens da levedura *Spathaspora passalidarum* utilizando xilose como fonte de carbono. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Licenciatura em Química - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Orientador: Marcos Antonio de Morais Junior, Co-orientador: **Fernanda Cristina Bezerra Leite**.