

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
TESE DE DOUTORADO**

**ANÁLISE DA CONSTITUIÇÃO GENÉTICA DE LINHAGENS
INDUSTRIAIS DA LEVEDURA *DEKKERA BRUXELLENSIS***

ANNA THERESA DE SOUZA LIBERAL

VIRTUS IMPAVIDA

**RECIFE
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
TESE DE DOUTORADO**

**ANÁLISE DA CONSTITUIÇÃO GENÉTICA DE LINHAGENS
INDUSTRIAIS DA LEVEDURA *DEKKERA BRUXELLENSIS***

ANNA THERESA DE SOUZA LIBERAL

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Genética
da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para
obtenção do grau de Doutora em
Genética pela UFPE

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior

**RECIFE
2010**

Liberal, Anna Theresa de Souza

Análise da constituição genética de linhagens industriais da levedura *Dekkera bruxellensis* Anna Theresa de Souza Liberal. – Recife: O Autor, 2010.

88 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antonio de Moraes Junior.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Genética, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Fermentação alcoólica 2. *Dekkera bruxellensis* (levedura) 3. Genética de fungos I. Título.

579.135

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2010-204

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA**

**Parecer da comissão examinadora da tese de:
Anna Theresa de Souza Liberal**

**intitulada:
Análise da constituição genética de linhagens industriais da levedura *Dekkera
bruxellensis***

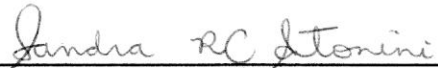
**A comissão examinadora considera o presente trabalho
[APROVADO]**

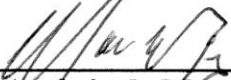
**Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Anna Theresa de Souza Liberal
faz jus ao grau de Doutora em Genética pela UFPE.
Recife, 27/09/2010**

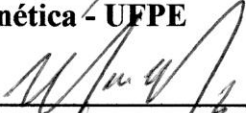

**1º Examinador: Prof. Dr. Valdir Queiroz Balbino
Departamento de Genética - UFPE**

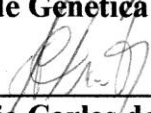

**2º Examinador: Prof. Dr. Tercílio Calsa Júnior
Departamento de Genética - UFPE**


**3º Examinador: Prof. Dra. Elaine Malosso
Departamento de Micologia - UFPE**


**4º Examinador: Prof. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini
Departamento de Tecnologia Agro-industrial e
Sócio-economia Rural – UFSCAR**


**5º Examinador: Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior
Departamento de Genética - UFPE**


**Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior
Departamento de Genética – UFPE**


**Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas
Departamento de Genética - UFPE**

Agradecimentos

Ao orientador deste trabalho, Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior, pela parceria na minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Gonçalo Amarantes Pereira e a Marcelo Carazzolle do Laboratório de Genômica e Expressão (LGE) da Universidade de Campinas (UNICAMP), pela colaboração neste trabalho.

Aos colegas de laboratório do Núcleo de Engenharia Metabólica: Fernanda Leite, Rute Gueiros, Luciana Pereira, Carolina Elsztein, Will Pitta, Giordani Cabral, André Ribas e Raquel Souza. Em especial a Brígida Luckwu de Lucena, Billy Santos, Rochane Baptista e Rodrigo Lucena.

Aos membros do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco.

Aos órgãos de fomento: CNPq, Capes, Capes-Cofecub e FACEPE.

À Lúcia Vasconcelos, representando os colegas e professores do Colégio Normal Estadual. À Goretty, pelos primeiros conhecimentos genéticos, representando os colegas e professores da Escola Dom Mota.

À família Pires, especialmente Tidinha, Beto e Glauco pela acolhida inesquecível.

À minha família, em especial à minha mãe, Aparecida Liberal e a minha Tia Evany Liberal.

A Deus, por permitir construir sonhos.

SUMÁRIO

Item	Página
Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	ii
Lista de Tabelas	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Introdução	1
1. Revisão da Literatura	2
1.1. Aspectos gerais da fermentação alcoólica industrial	2
1.2. Microbiologia da fermentação alcoólica	3
1.3. <i>Dekkera bruxellensis</i>	5
1.4. Genes de interesse no metabolismo fermentativo	13
1.4.1. Via metabólica da fermentação alcoólica	13
1.4.2. Piruvato Descarboxilase	14
1.4.3. Álcool Desidrogenase	15
1.4.4. Via de Erhlich	16
1.5. Técnicas Moleculares: detecção, identificação, cariotipagem e expressão gênica	17
1.5.1. Identificação por PCR	17
1.5.2. Eletroforese em Gel de campo pulsátil – PFGE	18
1.5.3. Análise genômica	18
1.5.4. Análise da expressão gênica através da PCR em Tempo Real	20
1.6. Considerações	22
2. Objetivos	23
3. Materiais e Métodos	24
3.1. Leveduras utilizadas, meios e iniciadores de identificação	24
3.2. Análise de sequências de genes cromossômicos e de genes homólogos duplicados em <i>S. cerevisiae</i>	26
3.3. Constituição cariotípica	28
3.4. Análise Computacional	29
3.5. Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real	30
3.6. Atividade Enzimática	31

4. Resultados	33
4.1. Constituição cariotípica	33
4.2. Análise da constituição genética e do status filogenético da <i>D. bruxellensis</i> em relação ao grupo ascomiceto	35
4.3. Descrição do banco de dados das sequências de <i>D. bruxellensis</i>	35
4.4. Identificação e análise estrutural dos genes codificantes do processo fermentativo em <i>D. bruxellensis</i>	37
4.4.1. Identificação das sequências	37
4.4.2. Alinhamento Múltiplo	37
4.4.3. Análise Filogenética	43
4.5. Análise da expressão gênica em Tempo Real - Padronizações	46
4.5.1. Padronização dos Gene de referências	46
4.5.2. Padronização dos Genes do metabolismo fermentativo utilizados em PCR Tempo Real	48
4.6. Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real	52
4.6.1. Análise da expressão gênica nos genes <i>dbARO10</i>	52
4.6.2. Análise da expressão gênica nos genes <i>dbADH</i>	53
4.6.3. Análise comparativa nos genes <i>dbPDC</i> e <i>dbADH</i>	54
4.6.4. Avaliação da resposta rápida (<i>short-term expression</i>) e da resposta tardia de expressão gênica (<i>long-term expression</i>)	57
4.7. Análise da atividade enzimática	59
5. Discussão	61
6. Conclusões	68
7. Referências Bibliográficas	69
8. Anexos	77
8.1. Anexo 1. Sequências de nucleotídeos e aminoácidos dos genes e proteínas ADH e ARO10 utilizadas neste trabalho	77
8.2. Anexo 2. Resumo- 54º Congresso Brasileiro de Genética	82
8.2. Anexo 3. Resumo- 54º Congresso Brasileiro de Genética	83
8.3. Anexo 4. Resumo- 54º Congresso Brasileiro de Genética	84
8.4. Anexo 5. Resumo- 26ª Reunião de Genética de Microrganismos	85
8.5. Anexo 6. Resumo- 26ª Reunião de Genética de Microrganismos	86
8.6. Anexo 7. Resumo- 55º Congresso Brasileiro de Genética	87
9. Memorial da aluna	88

Lista de abreviaturas

ADH – Álcool desidrogenase

BDP – Banco de Dados de Proteínas

BLAST – Alinhamento Local

CBS – Coleção Holandesa de Culturas

DDBJ – Banco de Dados de DNA do Japão

DNA –Ácido desoxirribonucléico

EBI – Instituto de Bioinformática Europeu

GEHY- Exploração Genômica das Leveduras de Hemiascomiceto

INSD – Banco de Dados de Seqüências de Nucleotídeos Internacional

ISRR – Regiões espaçadoras intergênicas repetidas

KEGG – Enciclopédia de Genes e Genoma de Kyoto

MEGA – Análises Genômicas da Evolução Molecular

NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NCBI – Centro nacional de Informações Biotecnológicas

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

PDB - Projeto *Dekkera bruxellensis*

PDC – Piruvato descarboxilase

PFGE – Eletroforese de Gel em Campo Pulsátil

rDNA – Ácido desoxirribonucléico ribossomal

SGB – Banco de Dados Genômico de *Saccharomyces*

TPP – Tiamina pirofosfato

Lista de Figuras

Figura 1: Avaliação da população de leveduras em amostras industriais.		4
Figura 2: Identificação e caracterização fenotípica da <i>D. bruxellensis</i> .		8
Figura 3: Padrões variantes de amplificação entre isolados <i>D. bruxellensis</i> .		11
Figura 4: Dados industriais do processo de fermentação.		12
Figura 5: Fermentação da glicose a etanol.		14
Figura 6: Via de Ehrlich para a produção de alcoóis superiores.		17
Figura 7: Sistema de detecção de leveduras em mosto industrial.		18
Figura 8: Eletroforese em campo pulsado para separação cromossômica.		34
Figura 9: Eletroforese em campo pulsado para separação cromossômica.		34
Figura 10: Eletroforese em campo pulsado para separação cromossômica.		34
Figura 11: Site do Projeto <i>Dekkera bruxellensis</i> .		36
Figura 12: Gene projects do Projeto <i>Dekkera bruxellensis</i> .		36
Figura 13: Alinhamento múltiplo das seqüências pelo programa Clustal W.		38
Figura 14: Gene Piruvato Descarboxilase dentro do grupo dos Ascomicetos.		44
Figura 15: Gene Álcool Desidrogenase dentro do grupo dos Ascomicetos.		46
Figura 16: Avaliação da eficiência do ensaio do gene de referência EFA1.		47
Figura 17: Avaliação da eficiência do ensaio para o <i>primer dbARO10-1</i> .		48
Figura 18: Avaliação da eficiência do ensaio para o <i>primer dbARO10-2</i> .		49
Figura 19: Avaliação da eficiência do ensaio para o <i>primer dbADH3</i> .		50
Figura 20: Avaliação da eficiência do ensaio para o <i>primer dbADH7</i> .		51
Figura 21: Produto da amplificação por PCR tempo real.		51
Figura 22: Comparação da expressão relativa dos genes <i>dbARO10</i> .		52
Figura 23: Expressão relativa dos genes <i>dbARO10</i> .		53
Figura 24: Expressão relativa dos genes <i>dbADH</i> .		54

Lista de Tabelas

Tabela 1: Diferenciação dos 30 padrões distintos de amostras industriais.	5
Tabela 2: Espécies, linhagens e coleção das leveduras utilizadas neste trabalho.	24
Tabela 3: Meios de crescimento utilizados para pré inoculo e cultivo celular.	25
Tabela 4: Iniciadores utilizados para identificação de espécies e distinção de linhagens.	26
Tabela 5: Relação de genes utilizados para determinar a posição filogenética da levedura <i>D. bruxellensis</i>	27
Tabela 6: Relação de genes utilizados para determinar os eventos de duplicação da levedura <i>D. bruxellensis</i>	28
Tabela 7: Protocolos de PFGE utilizados para separação, determinação do número e tamanho dos cromossomos.	29
Tabela 8: Genes codificantes e sequência dos iniciadores utilizados na análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real.	31
Tabela 9: Identificação das seqüências dos genes da família de <i>PDC</i> e seus genes homólogos das espécies do Filo Ascomycota.	39
Tabela 10: Identificação das seqüências dos genes da família <i>ADH</i> das espécies do Filo Ascomycota.	40
Tabela 11: Similaridade das Seqüências da Família <i>PDC</i> e Genes Homólogos no grupo dos Ascomicetos.	41
Tabela 12: Similaridade das Seqüências da Família <i>ADH</i> no grupo dos Ascomicetos.	42
Tabela 13: Comparação da expressão relativa dos genes <i>dbARO10</i> e <i>dbADH</i> cultivados em diferentes meios.	56
Tabela 14: Avaliação da resposta rápida de expressão (<i>short-term expression</i>) e da resposta tardia de expressão gênica (<i>long-term expression</i>).	58
Tabela 15: Atividade enzimática das culturas celulares de <i>D. bruxellensis</i> e de <i>S. cerevisiae</i> cultivadas em meio suplementado com Sulfato de amônia e fenilalanina como fonte de Nitrogênio.	60

Resumo

A levedura *Dekkera bruxellensis* vem se mostrando um importante microrganismo industrial, não apenas por causar eventos de contaminação em diversos processos fermentativos como também pela alta adaptação a esses processos. Este trabalho teve como objetivo principal identificar características genéticas básicas como composição genômica e cariotípica de linhagens industriais da levedura *Dekkera bruxellensis* a partir do uso de técnicas moleculares. Nesse trabalho, conseguimos visualizar o número e tamanho dos cromossomos das linhagens industriais de álcool combustível através da técnica de PFGE. Identificamos e analisamos estruturalmente os genes envolvidos na via do metabolismo central fermentativo através de busca no genoma seqüenciado, depositado no Banco de Dados do Projeto *Dekkera bruxellensis*. Analisamos a constituição genética e o status filogenético da *D. bruxellensis* em relação ao grupo ascomiceto através da análise dos genes piruvato descarboxilase (*PDC*) e álcool desidrogenase (*ADH*). Além disso, realizamos experimentos de expressão gênica por PCR em Tempo Real com os genes *dbARO10* e *dbADH* em diversos meios com diferentes fontes de Carbono e Nitrogênio, verificando a resposta dessa levedura e analisando sua atividade enzimática para a fenilpiruvato descarboxilase e a álcool desidrogenase. Este foi um trabalho prospectivo, que fornece um painel inicial sobre a constituição genética desta levedura. Entretanto, algumas perguntas foram respondidas a partir dos resultados obtidos. Nos nossos trabalhos anteriores foi verificada a presença de dois padrões distintos de “fingerprinting” dos isolados de fermentação alcoólica. Esta variação de perfis refletiu-se nas variações cromossômicas, tanto em número quanto em tamanho. Pelas análises filogenéticas foi possível também, posicionar a *D. bruxellensis* dentro do grupo dos ascomicetos para os genes estudados.

Palavras-chave: Fermentação alcoólica, *Dekkera bruxellensis*, ARO10, ADH.

Abstract

The yeast *Dekkera bruxellensis* has proved to be an important industrial microorganism, not only by causing contamination events in various fermentation processes but also by its high adaptability to these processes. This study aimed to identify basic genetic traits, such as genomic and karyotype composition of industrial strains of *Dekkera bruxellensis* yeast from the use of molecular techniques. In this work we could see the number and size of chromosomes in industrial strains of ethanol by the technique of PFGE. We identified and analyzed structural genes involved in fermentative central metabolism by searching the sequenced genome, which is deposited in the *Dekkera bruxellensis* Project Database. We analyzed the genetic makeup and the phylogenetic status of *D. bruxellensis* in group ascomycete genes through the analysis of pyruvate decarboxylase genes (*PDC*) and alcohol dehydrogenase genes (*ADH*). In addition, we conducted experiments of gene expression by Real Time PCR with genes *dbARO10* and *dbADH* in various media with different sources of carbon and nitrogen, verifying the response of this yeast and analyzing its enzymatic activity for phenylpyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase. This was a prospective study, which provided an initial panel on the genetic constitution of this yeast. However, some questions were answered from the results obtained. In our previous work we detected the presence of two distinct patterns of fingerprinting of isolates of alcoholic fermentation. This variation of profiles reflected in chromosomal variation, both in number and in size. By phylogenetic analysis was also possible to position *D. bruxellensis* within the group of ascomycetes for the genes studied.

Keywords: Alcoholic fermentation, *Dekkera bruxellensis*, ARO10, ADH.

Introdução

O processo fermentativo para a produção de álcool combustível é aberto e sem prévia esterilização, com poucas possibilidades de eliminação das leveduras selvagens provenientes do caldo de cana ou melaço. Desta forma, tem sido verificada freqüentemente a instalação de episódios de contaminação do processo por leveduras ditas selvagens que pertencem a espécies diferentes da *Saccharomyces cerevisiae*. Estas contaminações prejudicam o rendimento da fermentação, pois estas leveduras não possuem a capacidade fermentativa das linhagens inicialmente inoculadas. Estes episódios de contaminação só são percebidos nas destilarias pela queda do rendimento de etanol e retardo da fermentação, e muitas vezes esse problema só pode ser revertido com a total remoção da população invasora e a re-inoculação da linhagem original no processo fermentativo, o que resulta em aumentos no custo de produção.

A levedura *Dekkera bruxellensis* tem sido relacionada a diversos problemas em processos fermentativos na produção de vinhos, cidras e outras bebidas industrializadas. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa vêm mostrando que esta levedura pode ser encontrada em diferentes destilarias do Estado de Pernambuco e da Paraíba, causando problemas de rendimento industrial. Dados não publicados também mostram a presença desta levedura em destilarias de outros estados do Brasil. Contaminações severas por leveduras *D. bruxellensis* também tem sido relatadas em destilarias de álcool dos EUA, Canadá e Europa.

Apesar destas constatações industriais, pouco se sabe sobre a fisiologia desta levedura, e menos ainda sobre a genética desta espécie. Torna-se necessário, então, estudos genéticos mais aprofundados sobre a constituição genética desta espécie para que, em conjunto com os dados fisiológicos que estão sendo levantados no nosso grupo de pesquisa, seja possível entender os mecanismos de adaptação desta levedura aos processos fermentativos industriais.

Para obter um quadro genético inicial da *D. bruxellensis* foram utilizadas neste trabalho algumas técnicas moleculares tais como cariotipagem por Eletroforese em campo pulsado (PFGE), que permite a avaliação da diversidade cromossômica entre linhagens, seqüenciamento genético e análise filogenética para a identificação de genes de interesse biotecnológico e a análise da expressão gênica relativa por PCR em tempo real para avaliação do padrão de expressão desses genes em diferentes condições de cultivo. Os resultados mostraram uma importante variação genética entre as linhagens industriais e a identificação de genes envolvidos na via do catabolismo dos aminoácidos aromáticos que podem estar relacionados com a produção de compostos de importância organoléptica para a produção de bebidas fermentadas.

1. Revisão da Literatura

1.1. Aspectos gerais da fermentação alcoólica industrial

A fermentação alcoólica é baseada na capacidade metabólica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para converter os açúcares dos diferentes substratos (maltose, sacarose, amido) em glicose, e este em dióxido de carbono e etanol. A produção de álcool combustível no Brasil utiliza caldo de cana cru ou o melaço, cujo açúcar é a sacarose, para a fermentação por células de *S. cerevisiae* ao longo de toda a safra. O processo inicia-se com a chegada da cana de açúcar na indústria, que é lavada para retirar os detritos (areia, palha, etc.). A cana é cortada e esmagada nas moendas para retirada do caldo, que é filtrado e enviado para a produção de açúcar ou enviado diretamente para a produção de etanol. O caldo de cana ou o melaço proveniente da produção de açúcar é então diluído para formar o que se chama de mosto de alimentação. Esse mosto de alimentação é misturado na dorna com a biomassa de leveduras para que a fermentação ocorra. Ao final de cada fermentação, o chamado mosto fermentado é centrifugado para separação do vinho (parte líquida que contém o etanol) das células de levedura. O vinho é enviado para destilação e as células de levedura são bombeadas para o pré-fermentador, onde são tratadas com água, um pouco de açúcar e, às vezes, com ácido sulfúrico ou com antibióticos para controle da população das bactérias. As células de levedura são reutilizadas no processo por toda a safra, a menos que episódios severos de contaminação por bactérias ou leveduras ocorram. A alta concentração de açúcar no meio de fermentação, temperaturas de 33°C a 35°C e o ambiente anaeróbico contribuem para a maior eficiência na produção de etanol. O curto tempo de fermentação (6 a 10 h) permite a reutilização das leveduras até três vezes por dia, ao longo de aproximadamente 200 dias de atividade fermentativa (Wheals *et al.*, 1999).

O processo de fermentação alcoólica industrial é caracterizado por uma série de condições de estresse aos quais as células de levedura são expostas, desde condições de hiperosmolaridade, quando as células são introduzidas nas dornas juntamente com o substrato contendo sacarose entre 120 e 160 g.L⁻¹, passando por estresse térmico e etanólico ao longo da fermentação, até estresse oxidativo quando as células são recicladas nos pré-fermentadores que recebem aeração ou microaeração. Todas essas etapas influenciam diretamente na viabilidade e na capacidade fermentativa da população de células ao longo dos ciclos do processo. Por conta disso, linhagens que apresentam traços fisiogenômicos mais favoráveis devem apresentar maior adaptabilidade, o que deve explicar, ao menos em parte, a grande dinâmica populacional observada nas destilarias do Brasil (Silva-Filho *et al.*, 2005a; Basso *et*

al., 2008). Embora algumas linhagens tenham sido isoladas a partir dos resultados que indicam seu potencial de dominância do processo, parece que até o momento não há uma levedura que apresente características fenotípicas que permitam maior adaptação a todos esses tipos de estresses.

1.2. Microbiologia da fermentação alcoólica

As células de *S. cerevisiae* dominam o processo de fermentação alcoólica e já existem até linhagens comerciais específicas para esta fermentação (Lallemand Inc., Canadá; AEB Group, Brasil). Entretanto, episódios de contaminação ao longo da safra podem fazer com que outras espécies de leveduras provenientes do caldo de cana cru substituam o inóculo inicial. Além disso, pode ocorrer a instalação de bactérias neste processo. É possível que a presença de certas espécies bacterianas sejam responsáveis pela instalação de eventos de contaminação por várias espécies de leveduras que já foram detectadas no ambiente industrial (Basílio *et al.*, 2008), com especial atenção para *Dekkera bruxellensis* que foi identificada como a principal levedura contaminante das destilarias de álcool do Nordeste do Brasil (Souza-Liberal *et al.*, 2007). Estes problemas, embora em menor escala, também ocorrem em indústrias que possuem algum tratamento prévio do caldo. As causas deste grande crescimento das leveduras contaminantes na dorna de fermentação ainda não são conhecidas, mas suspeita-se que fatores abióticos como variações de pH, temperatura, osmolaridade, presença de ácidos orgânicos e a concentração de etanol devem contribuir para este processo. Portanto, informações sobre a dinâmica das leveduras do processo são fundamentais para o apropriado controle microbiológico (Granchi *et al.*, 1999; Silva-Filho *et al.*, 2005a), bem como para a identificação e seleção de novas linhagens com alta capacidade fermentativa e melhor adaptação ao processo fermentativo (Silva-Filho *et al.*, 2005b).

O método de tipagem molecular baseado na reação em cadeia de DNA polimerase (PCR) – PCR fingerprinting - utilizando um iniciador que amplifica regiões simples entre duas seqüências de microssatélites tem se mostrado uma técnica capaz de rotineiramente acompanhar o processo fermentativo e sua população de leveduras. Através do uso do marcador molecular (GTG)₅ padronizado por Lieckfeldt *et al.* (1993), os trabalhos do nosso grupo de pesquisa do Núcleo Interdepartamental de Engenharia Metabólica –NEM- (www.ufpe.br/nem/) possibilitaram a discriminação de linhagens *S. cerevisiae* em processos industriais de produção de álcool combustível (Figura 1A). Nos trabalhos de Silva-Filho *et al.* (2005a) e Santos *et al.* (2005) foi demonstrada a sucessão das leveduras ao longo do processo de fermentação que possibilitou a identificação de linhagens de *S. cerevisiae* dominantes no

processo (Figura 1B). Teve início, assim, a caracterização da dinâmica da população de leveduras ao longo do período de fermentação em diferentes destilarias dos Estados de Pernambuco e Paraíba. Adicionalmente leveduras contaminantes ditas não-*S. cerevisiae*, assim nomeadas por não apresentarem o padrão de amplificação típico da espécie *S. cerevisiae*, foram identificadas e quantificadas por este método.

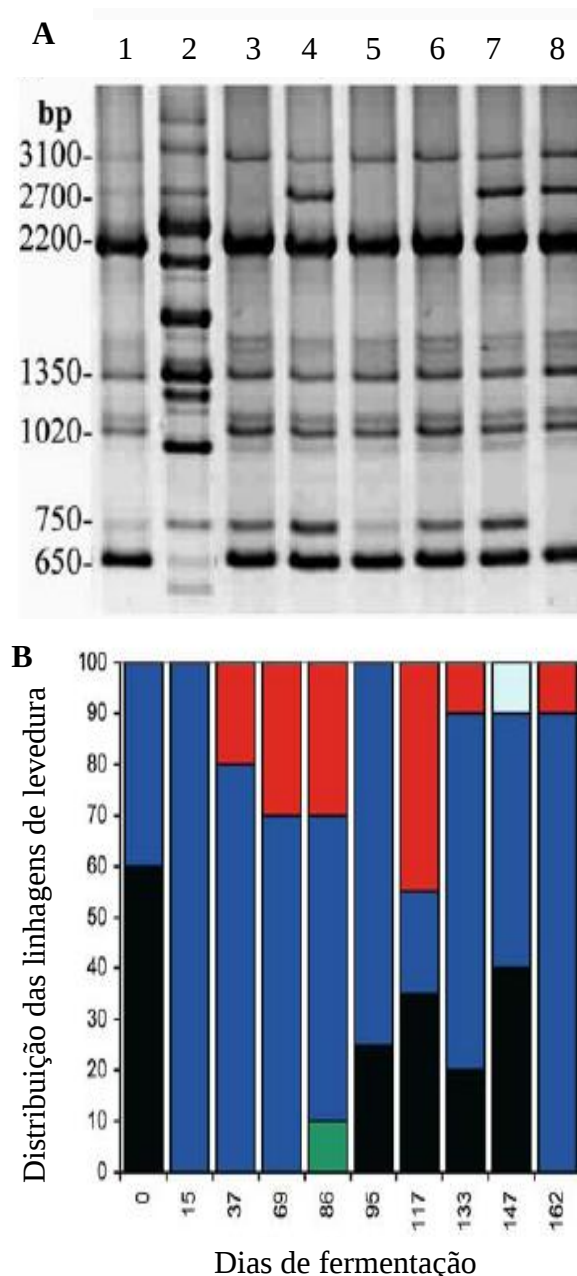


Figura 1: Avaliação da população de leveduras em amostras industriais. **Painel A:** Discriminação das linhagens industriais do processo de fermentação alcoólica através da técnica de PCR fingerprinting. Linha 1 e 3 a 8: *S. cerevisiae*, linha 2: Padrão não-*S. cerevisiae*. **Painel B:** Avaliação da dinâmica da população de leveduras ao longo da safra. As linhagens da levedura *S. cerevisiae* encontradas foram a P1 (preto), P4 (verde), P18 (azul escuro), P24 (azul claro). A levedura *D. bruxellensis* também foi identificada ao longo da safra (vermelho) (retirado de Silva-Filho *et al.*, 2005a).

O trabalho de Basílio *et al.* (2008) mostrou que a técnica de PCR fingerprinting com o primer (GTG)₅ foi capaz de diferenciar cerca de 30 padrões de bandas distintos para leveduras contaminantes. Estes isolados foram identificados pelo seqüenciamento dos domínios D1/D2 do gene que codifica o RNA ribossomal 26S. A levedura contaminante identificada como sendo da espécie *Dekkera bruxellensis* foi o padrão de amplificação não-*S. cerevisiae* mais freqüentemente encontrado no monitoramento, estando presente em 60% de todas as amostras com contaminação (Tabela 1). A levedura *D. bruxellensis* foi responsável também pela maior parte dos episódios de contaminação severa nas diferentes destilarias estudadas (Basílio *et al.*, 2005; Basílio *et al.*, 2008), bem como em destilarias da América do Norte (Abbott *et al.*, 2005).

1.3. *Dekkera bruxellensis*

A levedura da espécie *D. bruxellensis* é o objeto do presente estudo e apresenta a seguinte classificação taxonômica: Reino Fungi; Divisão Ascomycota (Saccaromycota); Filo Ascomycotina (Saccharomycotina); Classe Saccharomycetes; Ordem Saccharomycetales; Família Saccharomycetacea, Gênero *Dekkera*, Espécie *D. bruxellensis* (Barnett *et al.*, 1990).

Em 1960, van der Walt e van Kerken relataram a formação de esporos em linhagens de leveduras previamente classificadas no gênero *Brettanomyces*, tidas como não esporulantes, e propuseram um novo gênero para acomodar esta forma teleomorfa. Van der Walt propôs o nome *Dekkera* para o novo gênero e posteriormente Barnett *et al.* (1990) reconheceram quatro espécies neste gênero: *D. anomala*, *D. bruxellensis*, *D. custersiana* e *D. naardenensis*.

A validação do gênero *Dekkera* foi feita a partir das análises de restrição do DNA ribossomal, a qual estabeleceu inequivocamente a equivalência entre os gêneros *Brettanomyces* (anamorfo) e *Dekkera* (teleomorfo) e suas espécies (Molina *et al.*, 1993). Posteriormente a separação das duas espécies *D. bruxellensis* e *D. anomala* foi validada a partir das análises filogenéticas que se utilizaram do seqüenciamento do gene rDNA-18S (Cai *et al.*, 1996). Estudos posteriores se valeram destas informações para estabelecer padrões específicos de amplificação baseados nas divergências das seqüências do gene rDNA-18S para identificar as espécies *D. bruxellensis* e *D. anomala* (Cocolin *et al.*, 2003). Recentemente, análises filogenéticas de amostras do processo de fermentação alcoólica industrial pelo seqüenciamento da região D1/D2 do gene rDNA-26S mostraram que os isolados realmente correspondiam à espécie *D. bruxellensis* e não à *D. anomala*. Identificação também confirmada pelo tamanho do fragmento gerado com o uso dos primers ITS4/ITS5 e

Tabela 1: Diferenciação dos 30 padrões distintos de amostras industriais. Padrões gerados pela amplificação de PCR fingerprinting nos isolados de leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica industrial (retirado de Basílio *et al.*, 2008).

Padrão (GTG) ₅	Leveduras Isoladas	GDB ^a	Amostras Positivas % ^b	Ribotipagem por PCR ^c			Identificação ^d	
				ITS	<i>DraI</i>	<i>MspI</i>		<i>HaeIII</i> + <i>HinfI</i>
C1	JPC5(10)	817	45.60	510	350 + 160	285 + 225	250 + 160 + 100	<i>D. bruxellensis</i>
C2	MI4	801	1.10	650	650	650	325 + 325	<i>Pichia anomala</i>
C3	MC8(6)	802	6.04	480	480	275 + 140 + 65	240 + 100 + 90 + 50	<i>P. galeiformis</i>
C4	JBC4(2)	818	12.09	510	350 + 160	285 + 225	250 + 160 + 100	<i>D. bruxellensis</i>
C5	JBC9(1)	803	1.10	650	650	650	350 + 230 + 70	<i>P. fabianii</i>
C6	JPCM(2)	804	1.65	430	310 + 120	430	200 + 200 + 40	<i>P. ohmeri</i>
C7	TC13(5)	805	0.55	400	400	280 + 120	190 + 190 + 20	<i>C. intermedia</i>
C8	MC3(5)	263	6.04	550	550	360 + 190	290 + 180 + 80	<i>C. tropicalis</i>
C9	JBC9(7)	267	2.20	450	450	450	220 + 220 + 10	<i>C. pararugosa</i>
C10	MC11(1)	270	0.55	770	440 + 330	770	770	<i>Saccharomyces ludwigii</i>
C11	MC14(5)	806	3.85	640	450 + 140 + 50	640	340 + 180 + 120	<i>Zygoascus hellenicus</i>
C12	TC3(5)	819	0.55	ND	ND	ND	ND	No amplification
C13	TC5(5)	271	1.10	400	300 + 100	280 + 120	170 + 170 + 60	<i>C. lusitaniae</i>
C14	TC4(5)	807	2.20	510	350 + 160	285 + 225	250 + 160 + 100	<i>D. bruxellensis</i>
C15	GC8(10)	808	0.55	770	770	240 + 180 + 180 + 180	250 + 250 + 200 + 70	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>
C16	MC8(1)	809	1.10	760	430 + 165 + 165	760	360 + 200 + 200	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
C17	TC4(1)	274	0.55	480	480	480	270 + 105 + 105	<i>C. xylopsoci</i>
C18	TC6(5)	810	1.10	850	470 + 420	740 + 130	300 + 300 + 180 + 30	<i>S. cerevisiae</i>
C19	TC4(7)	811	0.55	ND	ND	ND	ND	<i>Candida</i> sp.
C20	TC4(9)	820	1.10%	ND	ND	ND	ND	No amplification
C21	JBC10(1)	812	4.40	710	710	630 + 80	350 + 290 + 60	<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>
C22	UPL1A-1	717	0.55	650	650	400 + 150 + 60 + 40	240 + 240 + 140 + 30	<i>P. caribbica</i>
C23	MC3(10)	280	0.55	410	410	410	190 + 190 + 30	<i>Candida</i> sp. ^e
C24	MC2(4)	742	0.55	540	540	380 + 170	350 + 190	<i>P. fermentans</i>
C25	MC10(1)	813	0.55	520	520	280 + 240	240 + 120 + 80 + 80	<i>Issatchenkia orientalis</i>
C26	MC13(1)	814	0.55	660	660	265 + 265 + 130	300 + 140 + 140 + 80	<i>Exophiala dermatitides</i>
C27	MC3(1)	281	0.55	650	650	460 + 90	300 + 220 + 140	<i>P. guilliermondii</i>
C28	TC9(1)	821	0.55	ND	ND	ND	ND	No amplification
C29	TC13(9)	815	0.55	650	650	400 + 150 + 60 + 40	240 + 240 + 140 + 30	<i>P. caribbica</i>
C30	TC1(5)	816	1.65	550	510 + 40	560	280 + 160 + 160	<i>C. parapsilosis</i>

ND, não determinado

^a Genetech Data Base, Coleção de cultura da Genetech Bioprodutividade, Ltda. (<http://www.dine.ufpe.br/genetech>)^b Percentual de amostras de mosto que foram positivas para a presença da espécie de levedura^c Comprimento do fragmento de ITS intacto e digerido com enzimas de restrição^d Sequências depositadas no NCBI com os seguintes números de acesso: DQ409181, DQ409182 e EP554808 a EP554832^e Sequência de DNA completa de *Candida sp.* Linhagem NRRL Y-27698 e NRRL Y-27950

amplificação com o primer específico DB90F/DB394R (Figura 2) (Souza-Liberal *et al.*, 2007). Ainda não existem relatos sobre a definição completa do ciclo sexual dessa levedura (Hellborg e Piskur, 2009). Atualmente existem cerca de 31 linhagens depositadas na coleção Holandesa de culturas, CBS, que foram isoladas de diferentes processos fermentativos industriais, tais como vinhos, cervejas, cidras, e sucos industrializados (www.cbs.knaw.nl).

Existe na literatura um problema de uniformização da taxonomia relacionada a esta levedura e em muitos artigos pode-se encontrar a denominação composta *Dekkera/Brettanomyces* para designar linhagens deste táxon. Por questões de uniformização, utilizaremos neste texto apenas o gênero *Dekkera*, mesmo para referir os trabalhos que citam o gênero *Brettanomyces*.

Apesar dessas publicações de taxonomia, apenas alguns artigos relatam a análise da constituição genética, cariotípica e molecular desta espécie que possui grande importância industrial, seja como produtora de metabólitos de interesse seja como contaminante dos processos industriais. Entretanto, na última década foram publicadas dezenas de trabalhos com *D. bruxellensis* focando principalmente o crescimento desta levedura, meios de crescimento específico e identificação no processo fermentativo. Além disso, nos últimos anos aumentaram os trabalhos moleculares, principalmente após o sequenciamento parcial da *D. bruxellensis* (Woolfit *et al.*, 2007). Mas apesar do aumento de informações genéticas sobre a *D. bruxellensis*, pouco se sabe ainda sobre os mecanismos envolvidos na atividade desta levedura dentro do processo fermentativo.

Na tentativa de eliminar essa levedura do processo, tem sido relatada como tratamento na indústria de vinho, para a contaminação da *D. bruxellensis*, a inativação da levedura pelo uso de correntes elétricas e o efeito obtido com os choques foi o mesmo que é obtido com o uso de adição de SO₂, sendo que o SO₂ deixa resíduos tóxicos ao vinho. Este método serve para o tratamento em vinho, pois a contaminação é posterior e não existe a preocupação em manter intacta a levedura inicialmente inoculada (Lustrato *et al.*, 2010). Além disso, foi relatado que o mecanismo de resistência ao SO₂ está diretamente envolvido com a síntese de acetaldeído onde este se liga diminuindo suas propriedades antimicrobianas (Jensen *et al.*, 2009). Também como forma de controle foi relatado o controle microbiológico por choques em campo pulsado (Puértolas *et al.*, 2009), na tentativa de destruir a levedura no processo. O redirecionamento dos produtos secundários para evitar acúmulo de produtos tóxicos como o 4-etilfenol e o 4-vinilfenol, também são relatados como uma forma de tratamento da contaminação por *D. bruxellensis* (Benito *et al.*, 2009a). Segundo Barata *et al.* (2008), a presença de *Dekkera* no processo só afeta a produção se a quantidade de células contaminantes passar dos níveis celulares máximos permitidos. Também foi proposto o uso

do polímero polihexametil bisguanida, utilizado como desinfetante hospitalar e para tratamento por infecções microbianas, para o controle de *D. bruxellensis* na fermentação alcoólica (Elsztein *et al.*, 2008). Vários desses resultados mostram que talvez seja melhor controlar os níveis de quantidade de *Dekkera* do que tentar eliminá-la por completo. Apenas se o limite de concentração celular máximo for atingido é que deve se tomar providencia para eliminar a levedura contaminante. Além disso, os níveis mais altos de 4-etilfenol foram alcançados nas grandes quantidades de biomassa atingidas. Ou seja, a produção de 4-etilfenol depende da atividade de crescimento e da biomassa através do maior uso das fontes de carbono e conseqüentemente maior produção de 4-etilfenol. (Barata *et al.*, 2008). Todas essas formas de tratamento agem diretamente sobre a levedura, mas não resolvem a problemática do ambiente industrial que precisa realizar constantemente injeções do substrato nas dornas de fermentação e, conseqüentemente, reintroduzir os microorganismos contaminantes.

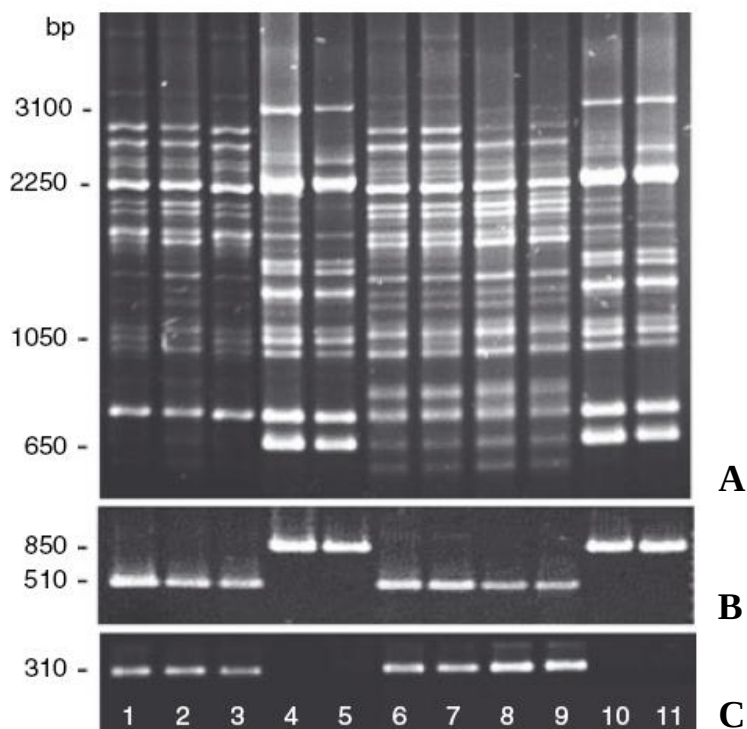


Figura 2: Identificação e caracterização fenotípica da *D. bruxellensis*. Uso de marcadores moleculares em diferentes isolados de *S. cerevisiae* (linhas 4, 5, 10 e 11) e *Dekkera bruxellensis* (linhas 1-3 e 6-9). **Painel A:** PCR fingerprinting, **Painel B:** ITS4/TS5 e **Painel C:** Marcador espécie específico DB90F/DB394R (retirado de Souza-Liberal *et al.*, 2007).

A levedura *D. bruxellensis* apresenta posição de destaque quando se trata de problemas na qualidade de vinhos e de contaminações dos processos fermentativos em geral (Mitrakul *et al.*, 1999). Os produtos metabólicos responsáveis pela contaminação do vinho

por *Dekkera* são principalmente os voláteis fenólicos, ácido acético e tetrahidropiridinas, que estão associados a grandes prejuízos econômicos em indústrias de bebidas fermentadas (Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003). A descoberta do papel desta levedura no desenvolvimento dos compostos fenólicos prejudiciais ao vinho renovou o interesse por este gênero por parte dos micologistas (Rodrigues *et al.*, 2001). Esta levedura representa também um importante componente microbiológico da fermentação de vinhos pela produção de 4-etilfenol, um importante metabólito do buquê do vinho (Chatonnet *et al.*, 1995, Costa *et al.*, 2007). Esta é considerada uma levedura acetogênica pela sua alta capacidade de produzir ácido acético em cultivos aeróbios a partir de glicose ou de etanol (Freer, 2002; Ciani *et al.*, 2003). E possui uma grande tolerância aos altos níveis de etanol dos processos fermentativos (Jensen *et al.*, 2009).

As leveduras do gênero *Dekkera* foram isoladas e descritas durante a produção de cerveja, no mosto de uva e em vinhos de vários países (Rodrigues *et al.*, 2001). Entretanto, pouco se sabe sobre a presença desta levedura em outros nichos ecológicos, que pode ser explicado pela dificuldade de sua recuperação devido ao seu crescimento lento. Isto faz com que em materiais altamente contaminados com outras leveduras ou fungos filamentosos a detecção de *Dekkera* seja dificultada. Para superar esta dificuldade alguns meios de cultura seletivos têm sido desenvolvidos para manipular o tipo e a concentração do agente antimicrobiano escolhido e fontes de carbono para suprimir o crescimento de outras espécies de leveduras e bactérias. Em adição, meios bacteriológicos têm sido descritos como essenciais na diferenciação de *Dekkera* de outras leveduras (Rodrigues *et al.*, 2001).

Problemas operacionais causados por leveduras podem conduzir a enormes perdas econômicas durante a produção, processamento, conservação e armazenagem de produtos que utilizam a fermentação em alguma etapa de seu processo (Hierro *et al.* 2004). Análises fisiológicas de isolados desta espécie mostraram que esta levedura apresenta uma reduzida capacidade fermentativa em relação à levedura do processo *S. cerevisiae*. Estas características fazem com que destilarias contaminadas com esta levedura apresentem tanto queda no rendimento em etanol quanto aumento no tempo de fermentação (Araújo *et al.*, 2005). Por essa razão as indústrias precisam rapidamente de métodos simples e confiáveis para detectar se essas leveduras estão causando estragos e rapidamente identificar possíveis rotas de contaminação (Hierro *et al.* 2004). Identificações de leveduras *D. bruxellensis* utilizando testes fisiológicos são obtidas em quatro semanas e três semanas para testes de assimilação. E mesmo utilizando linhagens tipo de coleção para avaliação os resultados foram ambíguos (Mittrakul *et al.*, 1999). Apesar de linhagens de leveduras selecionadas de vinho terem sido

estudadas por décadas, sua classificação inequívoca tem sido possível somente recentemente com o advento de técnicas moleculares (Pramateftaki *et al.*, 2000).

Além disso, da mesma forma que relatamos sua presença como episódios de contaminação das destilarias, as análises de laboratório nos mostraram que essa levedura também produz etanol em rendimentos comparáveis àqueles de *S. cerevisiae*, sendo seu maior problema a baixa produtividade que causa problemas operacionais na indústria (Souza-Liberal *et al.*, 2007). Passoth *et al.* (2007) mostrou a capacidade de *D. bruxellensis* de se estabelecer e produzir etanol em uma destilaria na Suécia que utiliza mosto de cereais, isto em associação com a bactéria *Lactobacillus vini*. Este é um exemplo de como a presença de uma determinada bactéria pode facilitar e estimular o desenvolvimento de uma levedura contaminante no processo.

Apesar da grande importância da levedura *D. bruxellensis* como contaminante de vários processos fermentativos pouco se sabe sobre suas características genéticas, e poucos trabalhos relatam a diversidade genética desta levedura. Entre os isolados de *D. bruxellensis* do processo de fermentação alcoólica foram identificados dois fenótipos muito distintos a partir do uso de marcadores de PCR do tipo ISSR (Inter Single Sequences Repeats), mostrando a existência de duas variantes dentro desta espécie (Figura 3) (Souza-Liberal *et al.*, 2007). Resultados similares mostraram a presença de três padrões distintos de restrição do DNA mitocondrial entre isolados da fermentação de vinho na Espanha (Martorell *et al.*, 2006) e dois padrões distintos de cariótipo molecular entre isolados da fermentação de vinho na Califórnia (Mitrakul *et al.*, 1999).

Como já foi dito anteriormente, o processo de fermentação alcoólica industrial para a produção de álcool combustível é realizada através da população de leveduras *S. cerevisiae* inoculadas no início e centrifugadas ao longo do processo fermentativo industrial. Entretanto são constantes as contaminações por leveduras não-*S. cerevisiae*, que levam a problemas operacionais de queda do rendimento e retardo na fermentação quando associados a contagens elevadas dessas leveduras contaminantes no processo. Um amplo trabalho de monitoramento em destilarias da região Nordeste mostrou que *D. bruxellensis* é a levedura contaminante mais freqüente nas destilarias que utilizam caldo de cana bruto em sistemas de fermentação contínua, sendo também a responsável pelos episódios de contaminação mais severos (Basílio *et al.*, 2008). Em tais episódios, a subpopulação de *D. bruxellensis* suplanta a de *S. cerevisiae*, e torna a aumentar mesmo quando toda a biomassa celular do processo é substituída por uma nova batelada de células de *S. cerevisiae*. Enquanto a população de *D. bruxellensis* está elevada, é perceptível uma diminuição do rendimento em etanol, acompanhada de significativo prejuízo econômico para a indústria (Souza-Liberal *et al.*, 2007) (Figura 4).

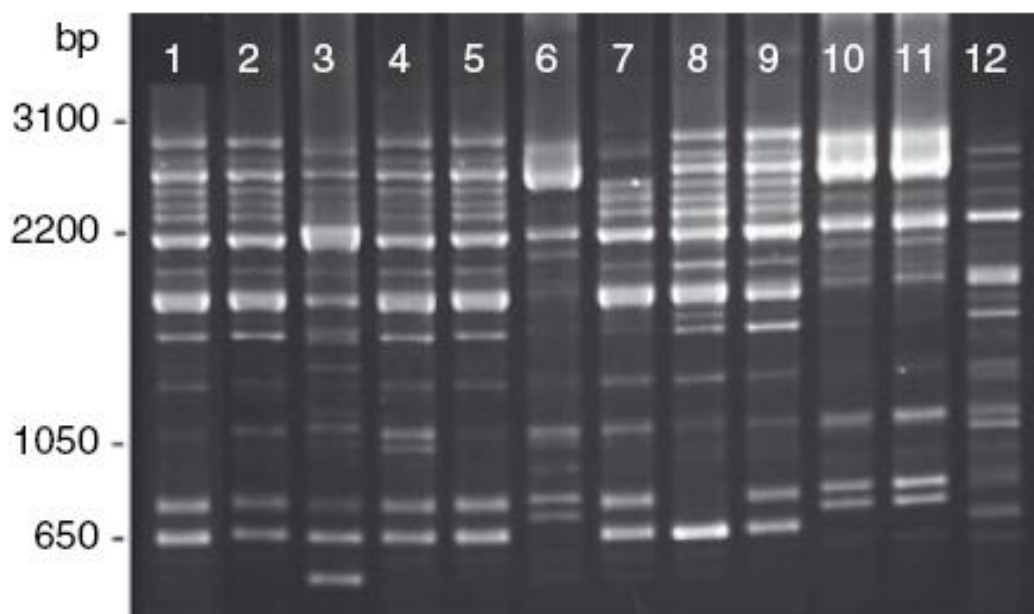


Figura 3: Padrões variantes de amplificação entre isolados *D. bruxellensis*. Uso de marcadores moleculares em diferentes isolados de *D. bruxellensis*, visualizando dois perfis distintos a partir do uso de marcadores do tipo IRSS (retirado de Souza-Liberal *et al.*, 2007).

O melhor desempenho competitivo de *D. bruxellensis* em relação ao de *S. cerevisiae* no ambiente industrial indica um elevado *fitness* daquela espécie ao ambiente da fermentação alcoólica, o qual se caracteriza por reunir uma série de condições de estresse para o crescimento celular (concentração elevada de etanol e presença de outras substâncias inibidoras como ácido acético, pH ácido, ausência de oxigênio, limitação nutricional do meio de cultura). Além disso, foi demonstrado que a *D. bruxellensis* é mais robusta e possui metabolismo energético mais eficiente quando sofre grandes alterações de pH e temperatura, quando comparada a *S. cerevisiae*, em meio com limitação de oxigênio (Blomqvist *et al.*, 2010). Para chegar a predominar na população total, as células de *D. bruxellensis* precisam crescer a uma velocidade maior que a das células de *S. cerevisiae*. Calculou-se que a diferença entre as velocidades de crescimento das duas leveduras no ambiente industrial é de $0,014 \text{ h}^{-1}$ a favor de *D. bruxellensis* (Souza-Liberal *et al.*, 2007). Dados recentes de competição em condições de laboratório utilizando mosto de uva mostraram que as células de *D. bruxellensis* podem suplantam a população de células de *S. cerevisiae* na fase final dos cultivos, provavelmente pela maior resistência da primeira espécie a altas concentrações de etanol que são atingidas na fase final do processo fermentativos (Renouf *et al.*, 2006).

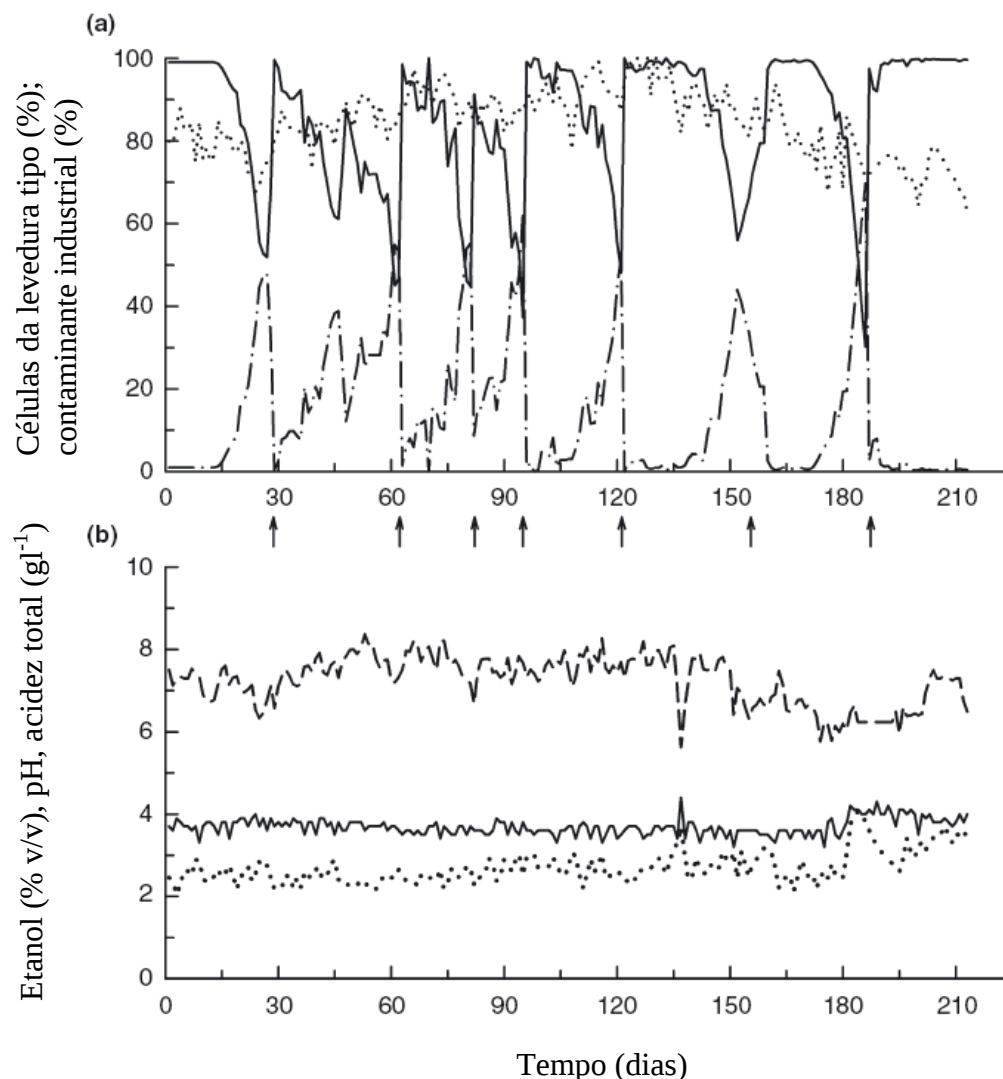


Figura 4: Dados industriais do processo de fermentação. **Painel A:** Dinâmica da população de leveduras *S. cerevisiae* (linha cheia) e *D. bruxellensis* (linha tracejada). Rendimento industrial (linha pontilhada). **Painel B:** Concentração de etanol (linha tracejada) e concentração de acidez total (linha pontilhada) ao longo da fermentação (retirado de Souza-Liberal *et al.*, 2007).

Das quatro espécies reconhecidas no gênero *Dekkera*, a levedura *D. bruxellensis* é capaz de crescer na ausência de oxigênio (Viser *et al.*, 1990), e apresenta metabolismo do tipo *Crabtree*-positivo, ou seja, fermenta hexoses produzindo etanol mesmo na presença de oxigênio (Renouf *et al.*, 2006). Estas características as tornam muito semelhante à espécie *S. cerevisiae*. De fato, na natureza apenas dois grupos de leveduras parecem ter desenvolvido a habilidade de se desenvolver na ausência de oxigênio: um deles pertence ao clado *Saccharomyces* e o outro ao clado *Dekkera/Brettanomyces* (Piskur e Langkjaer, 2004). Isto indica que o ancestral dos ascomicetos modernos deve ter sido completamente dependente da

presença de oxigênio para o crescimento. Após os eventos de especiação, algumas linhagens de leveduras foram diminuindo progressivamente a dependência do oxigênio pelo remodelamento de vias metabólicas e pelo aparecimento de novos genes. Para o grupo *Saccharomyces*, estudos de genômica comparativa com as várias outras espécies de hemiascomicetos com genomas já seqüenciados têm permitido situar os principais eventos desse processo. O mesmo não ocorre para o grupo *Dekkera/Brettanomyces*, que tem poucas seqüências publicadas.

Um evento crucial para viabilizar o crescimento anaeróbio parece ter sido a aquisição, por transferência horizontal, de um gene que permite a síntese de uracil independentemente do funcionamento da cadeia respiratória (Gojkovic *et al.*, 2004). Além disso, em *S. cerevisiae*, e em outros representantes do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, o processo de especiação foi precedido de um evento de duplicação genômica completa seguindo por rearranjos cromossômicos e perda gênica (Wong *et al.*, 2002). Estes genes duplicados parecem ter sido modificados de forma independente a partir da especialização, diferenciação ou deleção de uma das cópias. Mesmo assim, vários blocos de duplicações cromossômicas foram mantidos no genoma de *S. cerevisiae*. Além da duplicação gênica dependente da duplicação genômica, eventos de duplicação independentes parecem ter acontecido envolvendo genes que atuam nos mecanismos de captação e metabolização dos açúcares, tais como os genes *SUC* e *MEL* formando famílias gênicas que se localizam principalmente em regiões teloméricas (Greig e Travisano, 2003). Em paralelo, mecanismos eficientes de regulação metabólica, como os mecanismos de repressão catabólica por glicose, foram evoluindo à medida que se desenvolveu a adaptação ao metabolismo anaeróbio facultativo exibido por *S. cerevisiae* e seus parentes próximos, mas não por outras espécies de hemiascomicetos. Várias dessas características são responsáveis pela elevada adaptação demonstrada por *S. cerevisiae* em ambientes como o da fermentação alcoólica. Como já assinalado, o fato de *D. bruxellensis* possuir um metabolismo anaeróbio facultativo a aproxima evolutivamente de *S. cerevisiae*, embora este posicionamento ainda não seja bem definido.

1.4. Genes de interesse no metabolismo fermentativo

1.4.1. Via metabólica da fermentação alcoólica

No processo de produção do etanol e CO₂, a glicose é transformada por uma série de enzimas específicas até chegar ao produto final. A glicose passa pela via glicolítica, que é

uma sequência metabólica na qual a glicose vai ser oxidada até gerar duas moléculas de piruvato. O piruvato sofre descarboxilação pela ação da piruvato descarboxilase, formando o acetaldeído. Esse acetaldeído sofre redução re-oxidando o NADH produzido na glicólise a NAD⁺, formando o etanol (Figura 5).

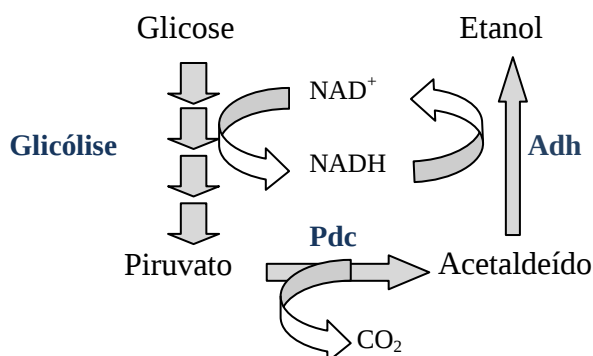


Figura 5: Fermentação da glicose a etanol. A glicose é convertida em piruvato pela glicólise. A piruvato sofre uma descarboxilação pela piruvato descarboxilase (Pdc) à acetaldeído e este é reduzido à etanol pela álcool desidrogenase (Adh).

1.4.2. Piruvato descarboxilase

A enzima piruvato descarboxilase (Pdc) (EC. 4.1.1.1) é o ponto chave no metabolismo fermentativo da glicose em *S. cerevisiae* (Kellermann *et al.*, 1986). Em leveduras, o piruvato é descarboxilado pela piruvato descarboxilase a acetaldeído e subseqüentemente, a etanol pela álcool desidrogenase no processo conhecido como fermentação alcoólica (Van Maris *et al.*, 2004).

A piruvato descarboxilase tem como coenzima a molécula de tiamina-pirofosfato (TPP) também chamada de tiamina-difosfato. A enzima utiliza a TPP porque a descarboxilação não catalisada de um α -cetoácido como o piruvato, requer o acúmulo de carga negativa no átomo de carbono da carbonila no estado de transição sendo uma situação instável. Essa transição pode ser estabilizada pela deslocalização da carga negativa. Os resíduos de aminoácidos não desempenham bem essa função, sendo necessária à atuação da coenzima TPP. O grupo funcional cataliticamente ativo da tiamina-pirofosfato é o anel tiazólico. A capacidade desse anel de adicionar-se a grupos carbonila e agir como poço de elétrons faz com que a TPP seja a coenzima mais utilizada em reações de descarboxilação especialmente no metabolismo de carboidratos.

O genoma da *S. cerevisiae* contém três genes codificantes da piruvato descarboxilase: *PDC1*, *PDC5* e *PDC6*. O gene *PDC1* codifica a isoforma que corresponde a cerca de 85% da atividade piruvato descarboxilase durante o cultivo celular em condições-padrão (Hohmann, 1991). Os genes *PDC* homólogos *ARO10/YDR380w* e *THI3/YDL080c* contribuem para o catabolismo dos aminoácidos ramificados ou dos aromáticos para a produção de alcoóis superiores (amílico, amílico ativado ou isoamílico) ou alcoóis aromáticos (vanílico ou fenil-etílico) (Vuralhan *et al.*, 2003; Vuralhan *et al.*, 2005). O gene *ARO10* é expresso apenas quando as células são cultivadas em meio contendo aminoácidos ramificados e principalmente aromáticos como fonte de nitrogênio (Vuralhan *et al.*, 2003)

1.4.3. Álcool desidrogenase

Álcool desidrogenase (Adh) (E.C. 1.1.1.1) representa uma família de enzimas funcionais que atuam na interconversão entre aldeídos e alcoóis com a utilização de equivalentes redutores NADH ou NADPH. No metabolismo fermentativo, essa enzima reduz o acetaldeído produzido pela Pdc a etanol com conseqüente oxidação de NADH. Esta reação serve, sobretudo, para reoxidar o NADH produzido pela glicólise sob condições de excesso de glicose e/ou em anaerobiose. Em *S. cerevisiae* estão descritos seis genes ADH (*ADH1* a *ADH7*) que têm funções biológicas diferentes. O gene *ADH1* codifica a principal isoenzima da família que é responsável pela redução de acetaldeído à etanol durante a fermentação alcoólica. A proteína Adh2 catalisa a oxidação de etanol a acetaldeído e encontra-se reprimida durante o ápice da fermentação. Essa reação é inversa àquela descrita para Adh1p e seu gene só é expresso em metabolismo respiratório. A *ADH3* está mais relacionada com a atividade de produção do etanol. As *ADH6* e *ADH7* são uma álcool desidrogenase de cadeia média NADPH dependente, membros da família cinnamyl álcool desidrogenases, apresentam 64% de identidade entre si e podem estar envolvidos na síntese de álcool ou na tolerância ao aldeído.

Esta família de ADHs forma um grupo que pode ser separado em três conjuntos quando analisamos a seqüência de aminoácidos. Esta separação tem relação com as diferentes propriedades de cada ADH, ou seja, as *ADH1*, *ADH2*, *ADH3* e *ADH5* estão relacionadas a fermentação/respiração da célula na transformação de acetaldeído/etanol/acetaldeído. As *ADH6* e *ADH7* estariam mais relacionadas à atividade de tolerância ao aldeído e não ao processo de redução/oxidação presente no conjunto de ADHs anterior. A *ADH4* seria um grupo externo em relação aos dois conjuntos anteriores e que estaria mais relacionada à sua atividade nos meios suplementados com zinco, específico para sua indução.

1.4.4.Via de Ehrlich

A levedura *S. cerevisiae* pode usar diferentes aminoácidos como fonte única de carbono, incluindo os três aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) e os aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina e valina). O catabolismo desses aminoácidos leva a produção de alcoóis de alto peso molecular, ou álcoois de fusel, a partir da chamada via de Ehrlich. Essa via inicia-se com a desaminação dessas moléculas a um 2-oxo-ácido catalizada pela álcool aminotransferase (Aat). Essas moléculas são descarboxiladas aos aldeídos correspondentes. No caso dos aminoácidos ramificados essa descarboxilação parece ocorrer pela atividade da enzima Pdc1 (Ter Schure et al 1998). Já no caso dos aminoácidos aromáticos, os aldeídos formados depois da reação de desaminação são descarboxilados principalmente pela enzima Aro10, mas também com a participação de Pdc1p e Pdc5p (Vuralhan et al., 2003; Dickinson et al., 2003). As moléculas de α -aldeídos formadas a partir dessas descarboxilações são reduzidos aos alcoóis correspondentes pela ação das diferentes isoenzimas da álcool desidrogenase.. No caso da fenilalanina, este aminoácido é desaminado ao ácido fenilpirúvico, que é então descarboxilado a fenilacetaldeído e este é reduzido a feniletanol. O álcool feniletanol é responsável pelo aroma de rosas das bebidas fermentadas e é também muito usado na indústria de cosméticos. Além disso, possui características organolépticas importantes que contribuem para a qualidade de bebidas e alimentos. O ponto principal para a formação do feniletanol é a etapa de formação do fenilacetaldeído a partir do ácido fenilpirúvico pela fenilpiruvato descarboxilase (Figura 6). Na *S. cerevisiae* o gene responsável por essa atividade é o homólogo ARO10/YDR380w da família das PDCs (Vuralhan et al., 2003).

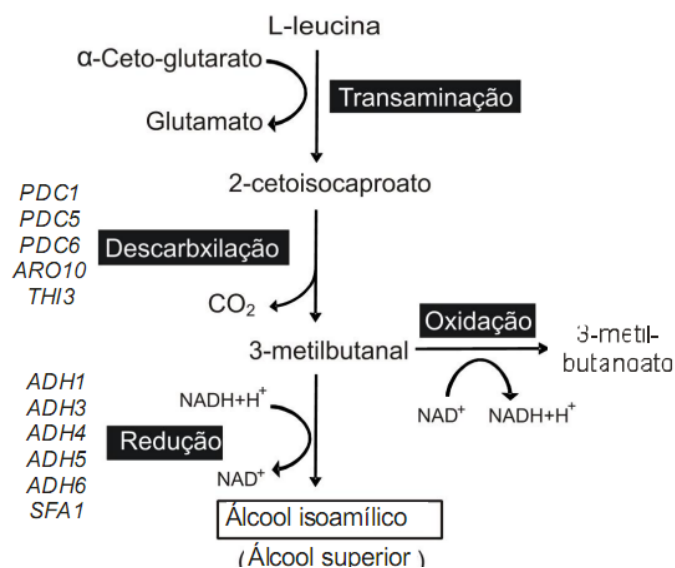


Figura 6: Via de Ehrlich para a produção de álcoois superiores. Exemplificando a formação de álcool isoamílico a partir do catabolismo da leucina (retirado de Vidal, 2008).

1.5. Técnicas moleculares: detecção, identificação, cariotipagem e expressão gênica

1.5.1. Identificação por PCR

Vários métodos moleculares de detecção de leveduras contaminantes têm sido desenvolvidos, se valendo principalmente das características de facilidade de execução e da rapidez e confiabilidade dos resultados. Reações de PCR utilizando os primers específicos DB90F e DB394R foram desenvolvidas para a discriminação entre *D. bruxellensis* e *D. anomalous* em diversas amostras (Cocolin *et al.*, 2003) ao mesmo tempo que o uso da PCR em tempo real foi proposto para detectar esta levedura em vinho (Phister and Mills, 2003). Detecções inespecíficas, mas indicadoras da presença de leveduras contaminantes em amostras industriais, podem se valer da diversidade de comprimento do *locus* ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal das leveduras (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Neste sentido, um sistema de detecção de leveduras contaminantes em amostras de mosto de fermentação alcoólica foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (Souza-Liberal *et al.*, 2005), o qual pode ser utilizado em conjunto com os primers DB90F e DB394R para detectar e quantificar a presença de *D. bruxellensis* nestas amostras de forma rápida, sensível e precisa (Figura 7).

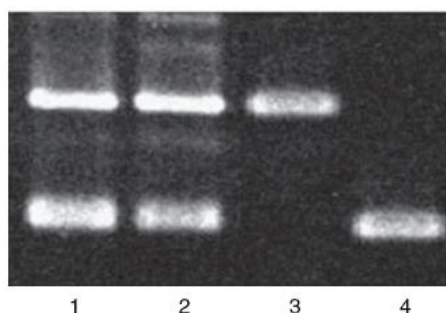


Figura 7: Sistema de detecção de leveduras em mosto industrial. Gel de agarose com amostra industrial em duplicata analisada pelo sistema de detecção de leveduras contaminantes (linhas 1 e 2), comparada com amostras puras da levedura do processo, *S. cerevisiae* (linha 3) e da levedura contaminante *D. bruxellensis* (linha 4), segundo Souza-Liberal *et al.* (2005).

1.5.2. Eletroforese em Gel de Campo Pulsátil - PFGE

A cariotipagem molecular por meio da eletroforese em campo pulsado – Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) - é usada para discriminação entre leveduras de diferentes espécies e estudos da variabilidade cromossômica entre linhagens de uma determinada levedura (Lucena *et al.*, 2007). Em adição, esta técnica presta-se a seleção de linhagens de interesse industrial e ao controle microbiológico de processos industriais. Em *S. cerevisiae* o número de cromossomos varia de 12 a 16 em linhagens industriais, com tamanhos variando entre 300 kb até 1,2 Mb (Lucena *et al.*, 2007). O estudo do cariótipo de 30 linhagens de *D. bruxellensis* isoladas de vinho indicou que o número de cromossomos variou de quatro a nove cromossomos, com o tamanho dos cromossomos variando entre pouco menos de 1 Mb a mais de 6 Mb (Hellborg e Piskur, 2009). Isto reflete uma importante diversidade genética nesta levedura, semelhante ao observado em *S. cerevisiae*.

1.5.3. Análise genômica

Em consequência da grande quantidade de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos produzidas em projetos Genoma, Proteoma e Transcriptoma, iniciaram-se a construção de dados públicos e privados. Os bancos de dados mais utilizados são o GenBank, banco de dados americanos de seqüências de DNA e proteínas; o European Bioinformatics Institute (EBI – Instituto de Bioinformática Europeu), banco de seqüências de DNA; o DNA Data

Bank of Japan (DDBJ – Banco de Dados de DNA do Japão); o Protein Data Bank (PDB – Banco de Dados de Proteínas), o qual armazena estruturas tridimensionais resolvidas de proteínas; o Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG – Enciclopédia de Genes e Genoma de Kyoto), com dados de seqüências de genomas de vários organismos diferentes e informações relacionadas as suas vias metabólicas. Os bancos de dados GenBank, DDBJ e EMBL compõem o International Nucleotide Sequence Databases (INSD – Banco de Dados de Seqüências de Nucleotídeos Internacional), que trocam dados para servir a comunidade científica com a mesma qualidade e quantidade de dados .

O GenBank é um abrangente banco de dados público de seqüências de nucleotídeos e proteínas com suportes bibliográficos e anotações biológicas construídos e distribuídos pela National Center for Biotechnology Information (NCBI – Centro nacional de Informações Biotecnológicas). Além das seqüências de nucleotídeos e proteínas, o NCBI disponibiliza informações sobre taxonomia, mapeamento, estrutura e domínio de proteínas e o jornal de literatura via Pubmed. O banco de dados ainda fornece a ferramenta BLAST (Basic local Alignment Search Tool – Ferramenta de Busca por Alinhamento Local) que proporciona buscas de seqüências similares no GenBank ou em outros bancos de dados.

O Saccharomyces Genome database (SGB – Banco de Dados Genômico de Saccharomyces) é um banco de dados do genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Esse banco coleciona, organiza e apresenta informações biológicas sobre genes e proteínas de *S. cerevisiae*, como a ferramenta de eMOTIF, a qual exibe motifs (elementos conservados de uma seqüência protéica referente a uma região estrutural ou funcional conhecida) compartilhados pela proteína.

O banco de dados Genolevures (GEHY- Genomic Exploration of the Hemiascomycete Yeasts – Exploração Genômica das Leveduras de Hemiascomiceto) é um projeto de comparação genômica em larga escala entre a espécie *Saccharomyces cerevisiae* e 14 outras leveduras representativas das leveduras hemiascomicetos. Esse banco de dados tanto seqüencia quanto cura manualmente os genomas completos e bibliotecas genômicas aleatórias. Quatro genomas encontram se totalmente seqüenciados (*Debaromyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluveromyces lactis* e *Candida glabrata*) e outros dez estão em andamento (*Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, *Kazachstania exigua* ou *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces servazzii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Lachancea kluyveri* ou *Saccharomyces kluyveri*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia angusta*, *Pichia farinosa* ou *Pichia sorbitophila*, *Candida tropicalis*).

O alinhamento de seqüências possui uma diversidade de aplicações na bioinformática, sendo considerada uma das operações mais importante desta área. Esse método de

comparação procura determinar o grau de similaridade entre duas ou mais seqüências. O alinhamento global é freqüentemente utilizado para determinar regiões mais conservadas de seqüências homologas. O princípio geral do programa Clustal W é o alinhamento múltiplo de seqüências de DNA ou proteínas produzindo significados biológicos para seqüências divergentes, determinando a melhor soma de pontos obtidos por cada unidade pareada (match) para as seqüências selecionadas e alinhá-las de forma que as identidades, similaridades e diferenças sejam vistas.

Desde o início da década de 90, o pacote computacional Molecular Evolutionary Genome Analysis (MEGA) tem sido muito utilizado para análises filogenéticas envolvendo alinhamento de seqüências, com estimação de divergência e reconstrução e visualização de árvores filogenéticas. Já o programa Bioedit é um editor de seqüências biológicas que foi planejado para procedimentos básicos na edição, alinhamento, manipulação e análise de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos. Este não é um programa poderoso de análises, mas oferece muitas funções rápidas e de fácil manuseio para anotações e manipulação das seqüências.

1.5.4. Análise da expressão gênica através da PCR em Tempo Real

A reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real é uma variação da PCR que permite a observação cinética da amplificação de um fragmento de DNA em tempo real. Os dados são coletados ao longo da reação ao invés de serem coletados apenas no final. Esta técnica permite identificar o momento do ciclo da reação no qual a amplificação de um alvo é detectada pela primeira vez de forma que quanto mais alto o número de cópias iniciais, mais rápido será observado o aumento significativo da fluorescência.

Existem dois sistemas de detecção de seqüências para detectar os produtos da PCR: o sistema SYBR Green e o sistema que utiliza sonda específica associada aos *primers*, como por exemplo o sistema TaqMan. O sistema SYBR Green utiliza o corante SYBR Green, que possui ligação altamente específica ao DNA dupla-fita. Quando este corante é colocado na amostra, ele imediatamente se liga a todo DNA dupla-fita presente. Durante a PCR em tempo Real, vai ocorrer a amplificação da seqüência alvo com formação dos produtos de PCR. E o corante SYBR Green irá se ligar a cada nova cópia de DNA dupla fita. O resultado é um aumento na intensidade da fluorescência proporcional à quantidade de produto gerado pela PCR. Da mesma forma, o sistema de sonda específica, que tem o sistema TaqMan como principal exemplo, utiliza o aumento na intensidade da fluorescência, que é proporcional a quantidade de produtos gerados, para medir a amplificação. Entretanto, o sinal fluorescente é

aumentado quando as sondas que estão nos locais específicos são clivadas liberando o sinal do corante fluorescente. Por utilizar sondas fluorescentes em conjunto com os primers, o sistema de sonda específica TaqMan é capaz de detectar somente produtos de amplificação específicos.

Os ensaios de quantificação podem ter como alvo o DNA, cDNA ou o RNA. A quantificação do RNA utiliza a reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa (RT-PCR).

Na quantificação por PCR em Tempo Real o *amplicon*, que é um segmento curto gerado pelo processo de PCR, é visualizado no gráfico de amplificação (*amplification plot*) através do sinal fluorescente que ele gerou ao longo dos ciclos de amplificação. Nos ciclos iniciais da reação somente é visualizado uma pequena alteração do sinal fluorescente, esta fase inicial é chamada de *baseline*. A amostra analisada vai ser visualizada como uma curva em crescimento exponencial, onde vai ser fixado o *threshold* (nível de fluorescência acima do *baseline* e dentro da fase exponencial). O CT (*threshold cycle*) é o número do ciclo da PCR no qual a fluorescência atingiu o *threshold*. O valor do CT será então usado para medir as quantificações por PCR em Tempo Real.

Para calcular os resultados das amplificações por PCR em Tempo Real pode-se usar a quantificação absoluta ou a quantificação relativa. O ensaio de quantificação absoluta é usado para quantificar amostras desconhecidas, utilizando uma curva padrão de valores conhecidos por métodos independentes, para estabelecer o valor da amostra analisada. Por outro lado na quantificação relativa são analisadas alterações na expressão gênica em uma determinada amostra relativa à outra amostra, que vai ser usada como referência. Os métodos de cálculo para quantificação relativa são: o método da curva padrão e o método do CT comparativo. No método da curva padrão não é necessário a validação da eficiência, mas é necessário a construção de curvas padrões em cada ensaio. No método do CT comparativo não precisa ser construída a curva padrão, mas é necessário a validação das eficiências dos ensaios do gene alvo e gene de referência, que devem ser semelhantes. Além disso, para atingir o resultado da quantificação relativa é utilizada a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

O gene de referência também denominado de controle endógeno de referência é utilizado para corrigir variações relacionadas à quantidade de amostra usada na reação, eficiência da extração de RNA, eficiência da transcrição reversa e da amplificação, quantificação, pipetagem e degradação do RNA/cDNA

1.6. Considerações

Pouco se tem encontrado sobre informações genéticas acerca da levedura *D. bruxellensis*. Do ponto de vista genético, a maioria dos artigos na literatura trata do desenvolvimento e/ou uso de métodos de detecção desta levedura por PCR específico ou PCR em tempo real em amostras industriais. Neste aspecto, o presente trabalho deve contribuir para a caracterização sistemática desta levedura proveniente do processo de produção de álcool combustível, nicho do qual tem sido isolada, mas com pouca confirmação da real identidade deste importante contaminante. Este trabalho visa comparar a estrutura genética de isolados de vinho e álcool combustível para elucidar questões filogenéticas e identificar os fatores que levam esta espécie a apresentar uma adaptabilidade tão relevante para estes contextos industriais das destilarias de álcool combustível. E assim, verificar se alguns dos traços evolutivos acumulados por *S. cerevisiae* são compartilhados por *D. bruxellensis* constituindo um importante avanço no conhecimento biológico e na história evolutiva desta espécie, além de lançar luz sobre os fatores determinantes da elevada adaptação exibida pelas duas espécies ao ambiente da fermentação alcoólica industrial.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Contribuir com a análise genômica de linhagens industriais da levedura *Dekkera bruxellensis* a fim de identificar marcadores genéticos relevantes para as análises fisiológicas e bioquímicas de importância para o contexto industrial,

2.2. Objetivos Específicos

- a) Analisar a constituição cariotípica de *D. bruxellensis*;
- b) Analisar a constituição genética e o status filogenético da *D. bruxellensis* em relação ao grupo ascomiceto;
- c) Identificar e analisar estruturalmente os genes codificantes *DbARO10* e *DbADH* do processo fermentativo a partir do genoma sequenciado da levedura *D. bruxellensis* depositado em banco de dados;
- d) Avaliar o padrão de expressão gênica dos genes identificados em resposta a diferentes condições de cultivo.

3. Materiais e Métodos

3.1. Leveduras utilizadas, Meios e Iniciadores de identificação

As linhagens da levedura *Dekkera bruxellensis* provenientes do processo de fermentação alcoólica estão disponíveis na coleção de leveduras do Laboratório de Genética de Microorganismos no Departamento de Genética da UFPE. A linhagem-tipo CBS 74 foi adquirida da Coleção Holandesa de Culturas – CBS (Tabela 2). Os meios utilizados nos diversos experimentos deste trabalho estão listados na Tabela 3. Todas as linhagens utilizadas neste trabalho tiveram sua identificação confirmada através de análises moleculares por (GTG)5, ITS4/ITS5, além do uso dos primers específicos DB90F/DB394R (Tabela 4) nas linhagens de *D. bruxellensis* segundo Souza-Liberal *et al* (2005, 2007).

Tabela 2. Espécies, linhagens e coleção das leveduras utilizadas neste trabalho.

Espécie	Linhagem	Coleção
<i>S. cerevisiae</i>	JP1	Genetech
<i>S. cerevisiae</i>	288C	LGE/UNICAMP
<i>D. bruxellensis</i>	CBS 74	CBS
<i>D. bruxellensis</i>	GDB237	Genetech
<i>D. bruxellensis</i>	GDB 239	Genetech
<i>D. bruxellensis</i>	GDB 240	Genetech
<i>D. bruxellensis</i>	GDB 242	Genetech
<i>D. bruxellensis</i>	GDB248	Genetech
<i>D. bruxellensis</i>	GDB 251	Genetech
<i>D. bruxellensis</i>	GDB 329	Genetech
<i>D. bruxellensis</i>	GDB 737	Genetech
<i>D. bruxellensis</i>	GDB 739	Genetech
<i>D. bruxellensis</i>	GDB JPC7(5)06/07	Genetech
<i>D. bruxellensis</i>	GDB MCE1(10)06/07	Genetech
<i>S. pombe</i>	Marcador de tamanho cromossômico bio rad	LGE/UNICAMP

Tabela 3. Meios de crescimento utilizados para pré inoculo e cultivo celular.

Reagentes	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6	Meio 7	Meio 8	Meio 9
	Pré inoculo	Pré inóculo	Fenilalanina	Sacarose	Etanol	Glicerol	Leucina	YPD	GYP
YNB completo	6,7g	-	-	-	-	-	-	-	-
YNB sem aa/sulfato	-	1,7g	1,7g	1,7g	1,7g	1,7g	1,7g	-	-
Glicose	20g	20g	20g	-	-	-	20g	20g	20g
Sulfato de amônia	-	5g	-	5g	5g	5g	-	-	-
Fenilalanina	-	-	3,06g	-	-	-	-	-	-
Sacarose	-	-	-	19g	-	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	19,5mL	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	16,3mL	-	-	-
Leucina	-	-	-	-	-	-	6g	-	-
Extrato de levedura	-	-	-	-	-	-	-	10g	5g
Peptona	-	-	-	-	-	-	-	20g	10g
Carbonato de Cálcio	-	-	-	-	-	-	-	-	5g
Ágar**	20g	-	-	-	-	-	-	20g	20g

*Valores utilizados para preparar 1 Litro de meio

** Adicionado para preparo de meio sólido

Tabela 4. Iniciadores para identificação de espécies e distinção de linhagens.

Iniciador	Sequência do iniciador (5' – 3')
GTG5	GTGGTGGTGGTGGTG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAA
DB90	F - GAYACTAGAGAGAGRRGGARGGC
DB394	R - ACGAGGAACGGGCCGCT

3.2. Análise de seqüências de genes cromossômicos e de genes homólogos duplicados em *S. cerevisiae*

A partir das seqüências de genes depositadas no Saccharomyces Genome database (SGD) foram construídos 10 pares de primers para genes não duplicados em *S. cerevisiae* (Tabela 5) e nove pares de primers para genes duplicados em *S. cerevisiae* (Tabela 6).

As culturas da levedura *D. bruxellensis* foram submetidas a amplificações por PCR com ciclagem de 94°C por 5' inicial; 94°C por 1', 45°C-50°C por 1', 72°C por 2' por 30 ciclos, com extensão final a 72°C por 7'. O material foi analisado em gel de agarose 1.3% 75v por 1 hora e 30 minutos e corado em brometo de etídio.

Tabela 5. Relação de genes utilizados para determinar a posição filogenética da levedura *D. bruxellensis*.

Genes		
cromossômicos	Função	Sequências (5' – 3')
não-duplicados		
HO	Endonuclease HO responsável pelo homotalismo	F -ATGCTTTCTGAAAACACGAC R - ACACATTTTAGCAGATGCG
URA1	Dihidroorotato desidrogenase (produção de uracil – sem O ₂)	F - CTTCCGTACCAAACATGACA R - CCGATAATTAAATGCTGTTCA
LEU2	2-aminoadipato redutase (metabolismo de lisina)	F - ACCATTCTAATGTCTGCCCCT R - GAGAATCTTTTTAAGCAAGGA
MIG1	Proteína repressora de genes regulados por de glicose	F – ATAGCCATGCAAAGCCCA R - TCAGCGTATCAGTCCATGTGT
SNF1	Proteína ativadora dos genes reprimidos por glicose	F- TCAACATGAGCAGTAACAACA R - CGTTCCACCATCAATTGCTT
TPK1	Proteína quinase A (sensor de nutrientes e do crescimento)	F - TTGGGTATGTCGACTGAAGAA R - CATTAGAAGTCCCGGAAAAGA
CTA1	Catalase A, reprimido por alta concentração de glicose	F - GATGTCGAAATTGGGACAAGA R - TGAGCGTTTCAAAATTTGGAG
ACS1	Acil-CoA sintetase, reprimido por alta concentração de glicose	F - ATTGCCCACTGTGCTATGT R - CATCATTACAACCTTGACCGAA
YAP1	Proteína ativadora de genes que respondem a estresse oxidativo	F - ATGAGTGTGTCTACCGCCAA R - TCCCGCTTTAGTTCATATGC
GPX2	Glutationa peroxidase	F - TTCAAAATGACCACATCTT R - CATTTACTTAACAGGCTTT

Tabela 6. Relação de genes utilizados para determinar os eventos de duplicação da levedura *D. bruxellensis*.

Genes homólogos duplicados	Cromossomo	Sequências (5' – 3')
BAP2	II	F - GCTTCAATAAAACTCAAGTGA R - TGTCCAGACCTGAGTGGTGTA
ARE1	III	F - CGCCAAAACAGATTGCAAGA R - ACACGTGGTATGGTGGCAGT
PDR15	IV	F - TCAAAAACCTATGTCATCAGA R - TCACTTCTTGGGTTTTTCGG
RPS24A	V	F - AGATTAAGCAGAAATGGTATG R - TTTGCTTAATCGGCGTTACG
GND2	VII	F - AAAAAAACACGAGGAACAGA R - GAAAACCTTGCCTTTAACTCC
DBF2	VII	F - CAGTATTCCTTGCTAAAGAAA R - GGCGAATGCAAGACAAGAAT
YCK1	VIII	F - TTTTCCTGCTCTCCTCCTCC R - CGGTAGTCTTGCAAAAAATG
YJR061W	X	F - GCGAAGCAAGATAACAATTCCA R - CCGAAGGATAAGGGAACGTTT
GFA1	XI	F - CGAGCAAATCAACAGCAACT R - TGGGGGACGAAGAGAAAGTAA

3.3. Constituição Cariotípica

Diversas linhagens da levedura *D. bruxellensis* foram submetidas a eletroforese em campo pulsátil (PFGE) sob diferentes condições e tempos de corrida, baseado nos protocolos do LGE-UNICAMP com modificações, na tentativa de obter uma melhor separação dos cromossomos desta espécie (Tabela 7). As células foram crescidas em meio YNB completo e 50mg das células foram misturadas com 25 mg de zymoliase dissolvidas em tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) pH7,5, misturados em agarose 0,5%. Os plugs de agarose foram deixados

durante 18 horas em solução de EDTA 500 mM e Tris 10 mM, pH7,5. Em seguida os plugs foram colocados em solução de sarcosyl 5%, 5 mg/mL de proteinase K em EDTA 500 mM pH7,5 e incubados por 5 horas a 50°C. Em seguida os plugs foram corridos em gel de agarose 0,5%.

Foram utilizadas diversas linhagens de *D. bruxellensis* que foram submetidas a eletroforese em campo pulsátil juntamente com linhagens de *S. cerevisiae* e *S. pombe* analisando a capacidade de extração do material da *D. bruxellensis*, além da quantidade de material a ser colocado em gel para a corrida verificando também a repetibilidade do protocolo e a eficiência de extração nas diferentes linhagens de *D. bruxellensis*.

Tabela 7. Protocolos de PFGE utilizados para separação, determinação do número e tamanho dos cromossomos.

Protocolo	Bloco 1			Bloco 2		
	Duração	amperagem	pulsos/segundo	Duração	pulsos/segundo	Duração
1	112 horas	1,5v.cm	1800	112 horas	-	-
2	240 horas	1,5v.cm	2500 - 4000	96 horas	1800	144 horas
3	240 horas	1,5v.cm	2500 - 4000	96 horas	1800	144 horas

3.4. Análise Computacional

As seqüências de aminoácidos das cinco enzimas da família piruvato descarboxilase (Pdc1, Pdc5, Pdc6, Aro10 e Thi3) e de sete enzimas da família álcool desidrogenase (adh1, Adh2, Adh3, Adh4, Adh5, Adh6 e adh7) foram coletadas no formato FASTA do Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>). O banco de dados do seqüenciamento parcial da *D. bruxellensis* fornecido pelos responsáveis pelo seqüenciamento (Woolfit et al 2007) está hospedado no site do LGE/Unicamp (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/dekkera/>) no Projeto *Dekkera bruxellensis* e pode ser acessado para diversos tipos de busca. As buscas por seqüências de genes da *Dekkera bruxellensis* foram realizadas pela ferramenta tBLASTn com aquelas seqüências de aminoácidos. Foram resgatados todos os *contigs* completos com e-value ≤ -20 . Cada contig de *D. bruxellensis* foi analisado com a ferramenta ORF Finder do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) para localizar o quadro de leitura da seqüência. Também foi realizada uma busca por seqüências homólogas aquelas dos genes *PDC* e *ADH*

de *S. cerevisiae* por meio da ferramenta BLAST no GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ou no GENOLEVURES (<http://cbl.labri.fr/Genolevures/>) e foram coletadas as seqüências no formato fasta de melhor e-value para cada gene das espécies de leveduras *Ashbya gossypii*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Debbaromyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* e *Yarrowia lipolytica*, que foram previamente utilizadas nas análises do trabalho de Woolfit *et al* (2007).

As seqüências das famílias gênicas dos diversos ascomicetos foram analisadas através da ferramenta de análise de similaridade do EMBL-EBI através do programa CLUSTALw (<http://www.ebi.ac.uk/>) e visualizado no programa BIOEDIT 7.0. Uma matrix de identidade de seqüência foi elaborada apresentando o percentual de similaridades entre as seqüências. Em seguida os arquivos dos alinhamentos foram exportados para análise no programa MEGA v4. Este foi utilizado para a construção e visualização das árvores filogenéticas geradas, aplicando o algoritmo Neighbour-Joining com testes estatísticos bootstrap com 1500 replicações.

3.5. Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real

O RNA foi extraído pelo Kit Total RNA isolation – NucleoSpin RNA II, com algumas modificações na fase inicial para quebrar a parede, com a adição de AE (Acetato de sódio e EDTA) e SDS10%. Este Kit possui a capacidade de extração de 100ug/60uL.

Para o desenho dos iniciadores foi utilizada a ferramenta *on-line Genscript primer design* no modo avançado (www.genscript.com/cgi-bin/tools) empregando os seguintes parâmetros: os tamanhos dos iniciadores entre 17 e 25 bases, valor de *T_m* em 59°C e tamanho dos *amplicons* entre 70 a 110pb. Os pares de iniciadores obtidos foram analisados com a ferramenta *Netprimer* para a determinação da formação de auto-híbridos, duplex, *hairpins* e *loops* ([www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch /netprlaunch.html](http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html)). Os pares de iniciadores que apresentaram um *ranking* maior do que 90% foram selecionados para os ensaios de *qPCR* (Tabela 8).

A expressão relativa desses genes de *D. bruxellensis* foi avaliada a partir de variações de cultivos em diferentes meios de cultura. Dois procedimentos foram utilizados. A avaliação da resposta rápida de expressão (*short-term expression*) foi realizada após uma hora de incubação nos diferentes meios de cultura. A resposta tardia de expressão gênica (*long-term expression*) foi avaliada depois da coleta de amostras durante os experimentos de cultivo celular nos meios específicos quando as culturas atingiram valores de densidade óptica

(DO_{600nm}) em torno de 0,1 (fase *lag* do crescimento), 1,0 (fase exponencial de crescimento) e 10 (final da fase exponencial de crescimento). Os meios de cultura estão descritos na Tabela 3.

Tabela 8. Genes codificantes e sequência dos iniciadores utilizados na análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real.

Iniciador	Tamanho do fragmento	Seqüências (5' – 3')
EFA1	71pb	F-CATGGGATGACGAGACCGAT R-CACCAAACCGTCCATCTTGAT
dbADH3	81pb	F-GTGCTGGAGGTGGTTTAGGT R-AGCCACCATCAATACCAACA
dbADH7	103pb	F-GGAAAGTGCTACAGGTGCAA R-ATCCTCCCTGAGTTTTGGTG
dbARO10-1	95pb	F-ACGGAACATGCAACGAATTA R-CACTCCCATCGTGGTAACAA
dbARO10-2	71pb	F-TGATGGATGTTCTTCCGAGA R-TGTGTATCGGACCGCATTAT

3.6. Atividade Enzimática

Células de *D. bruxellensis* cultivadas em diferentes meios foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em tampão Hepes 200 mM, pH 7,2 gelado. Foram adicionados o inibidor de proteases PMSF para concentração final de 100 mM e o mesmo volume em pérolas de vidro (Ø460-600 µm). A lise mecânica foi realizada por agitação do tipo vórtex em cinco a seis ciclos de 1 minuto de agitação intercalado por um minuto no gelo para evitar desnaturação protéica pelo calor. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi coletado.

A atividade enzimática fenil-piruvato descarboxilase foi medida seguindo o procedimento descrito por Vuralhan et al (2003) e Vuralhan et al (2005). A mistura de reação continha 100 mM de tampão fosfato (KH₂PO₄/K₂HPO₄) pH 7, 0,2 mM de NADH, 0,2 U de álcool desidrogenase de fígado equino (Sigma-Aldrich), 2 mM de tiamina pirofosfato e 40 mM de fenil piruvato e diferentes volumes do extrato celular, no volume final de 1 mL. A reação foi preparada sem o substrato fenil-piruvato e estabilizada por alguns minutos, e

iniciada depois da adição do substrato e avaliação da variação da absorbância a 340 nm. Para determinação da atividade piruvato descarboxilase a reação enzimática continha 100 mM de tampão imidazol pH 6,5, 10 mM de MgCl_2 ; 2 mM de tiamina pirofosfato, 0,15 mM de NADH, 0,35 U de álcool desidrogenase de levedura comercial (Sigma-Aldrich) e diferentes volumes do extrato celular. A reação foi iniciada com adição de piruvato para 40 mM no volume final de 1 mL. Essas duas reações se baseiam na reação acoplada da conversão do substrato piruvato ou fenil-piruvato a seus aldeídos correspondentes pelas enzimas contidas nos extratos celulares e posterior redução desses aldeídos a seus alcoóis correspondentes pela Adh comercial adicionada. Portanto, mede-se a oxidação (consumo) de NADH com a estequiometria de 1 mol de NADH oxidado para cada mol de substrato consumido. Atividade álcool desidrogenase foi determinada a partir de reações contendo 100 mM de tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) pH 7, 40mM de NAD^+ e diferentes volumes do extrato celular. A reação foi iniciada com a adição de etanol para 2% no volume final de 1 mL. O cálculo da atividade enzimática foi realizado pela variação da absorbância ao longo do tempo, utilizando-se o coeficiente de extinção molar (ϵ_{340}) de $6,3 \times 10^6$ M/cm para o NADH.

A determinação da concentração protéica nos extratos foi feita pelo método de Lowry utilizando o reagente de Folin (seguindo as instruções descritas por Verduyin et al, 1990).

A velocidade da reação foi medida a partir da seguinte equação: $v = \left(\frac{\Delta A_{340}}{\Delta t} \right) / 6,3$

Donde: ΔA representa a variação da absorbância a 340 nm e um intervalo de tempo da curva de reação (Δt).

Para determinação da atividade específica, a velocidade de reação foi dividida pela quantidade em mg de proteínas do extrato celular que foi adicionada a reação. A unidade padrão utilizada (U) foi mol de NADH consumido ou produzido por minuto de reação por mg de proteína na amostra ($\text{mol NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$).

4. Resultados

4.1. Constituição cariotípica

As primeiras análises de cariotipagem molecular foram realizadas segundo o protocolo 1 de corrida (Tabela 7) utilizando as linhagens *S. cerevisiae* S288C e *D. bruxellensis* GDB 237. Foram preparadas suspensões celulares nas concentrações de 50 mg/mL para *S. cerevisiae* e de 25 mg/mL, 50 mg/mL, 75 mg/mL e 100 mg/mL para *D. bruxellensis* 237 (Figura 8). Como já estava bem definida para o grupo da Unicamp a concentração celular para a linhagem *S. cerevisiae* utilizada em corrida de PFGE, tivemos que padronizar a concentração celular adequada para a *D. bruxellensis*. Conseguimos visualizar os cromossomos em todas as concentrações testadas para a *D. bruxellensis*, mas verificamos que a capacidade de extração foi capaz de gerar resultados satisfatórios nas menores concentrações, 25mg/mL e 50 mg/mL. E, apesar da visualização dos cromossomos, não ficou bem definida a separação dos mesmos.

As análise seguintes apresentaram variações como a descrita no protocolo 2 de corrida (Tabela 7), utilizando o marcador *S. pombe* size marker bio rad (50 mg/mL), linhagens da levedura *D. bruxellensis* 237, 239, 240, 248, 251, 329, 737 e 739 (25 mg/mL) e a levedura *S. cerevisiae* S288C (50 mg/mL) (Figura 9). Nesse momento conseguimos verificar a repetibilidade da extração para os diferentes isolados da *D. bruxellensis*, mas ainda foi necessário aumentar o tempo de corrida para melhor visualização da separação cromossômica.

E finalmente o protocolo 3 de corrida (Tabela 7) foi testado com as linhagens *S. pombe*, *D. bruxellensis* 237, 239, 248 e 251 e *S. cerevisiae* S288C. As amostras continham a mesma concentração celular do resultado anterior e as linhagens de *D. bruxellensis* foram submetidas a tratamento com RNase. No gel foram colocadas as amostras de *D. bruxellensis* com e sem tratamento com RNase (Figura 10). Nesse momento já estava definido a concentração celular, 25mg/ml para a *D. bruxellensis*. Este último protocolo conseguiu separar os cromossomos da *D. bruxellensis*, e definir qual o tamanho dos mesmos, baseado nos valores conhecidos para os cromossomos da *S. pombe* e da *S. cerevisiae*. O número de cromossomos em *D. bruxellensis* variou de 4 a 6 cromossomos e o tamanho dos cromossomos variou entre 0,67Mb e 5,7Mb. O tratamento com RNase para limpar mais o rastro presente no final da corrida não gerou o resultado esperado, mas também não comprometendo o resultado.

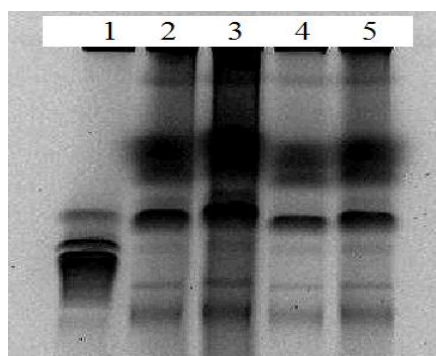


Figura 8. Eletroforese em campo pulsado para separação cromossômica. Linha 1: *S. cerevisiae* S288C (50 mg/mL), linha 2: *D. bruxelensis* 237 (75 mg/mL), linha 3: *D. bruxelensis* 237 (100 mg/mL), linha 4: *D. bruxelensis* 237 (25 mg/mL) e linha 5: *D. bruxelensis* 237 (50 mg/mL).

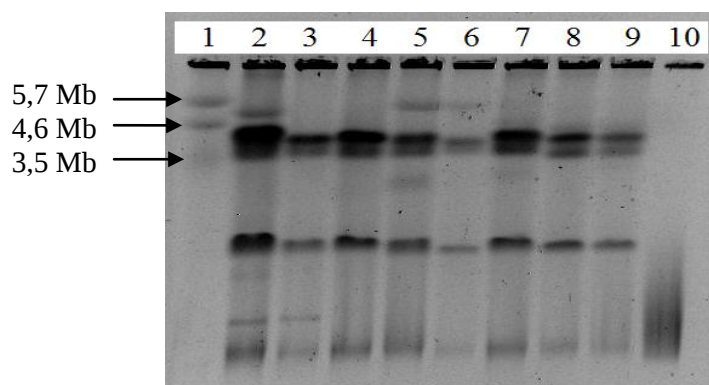


Figura 9. Eletroforese em campo pulsado para separação cromossômica. Linha 1: *S. pombe*; linhas 2 a 9: linhagens *D. bruxellensis* 237, 239, 240, 248, 251, 329, 737 e 739 respectivamente; linha 10: *S. cerevisiae* S288C.

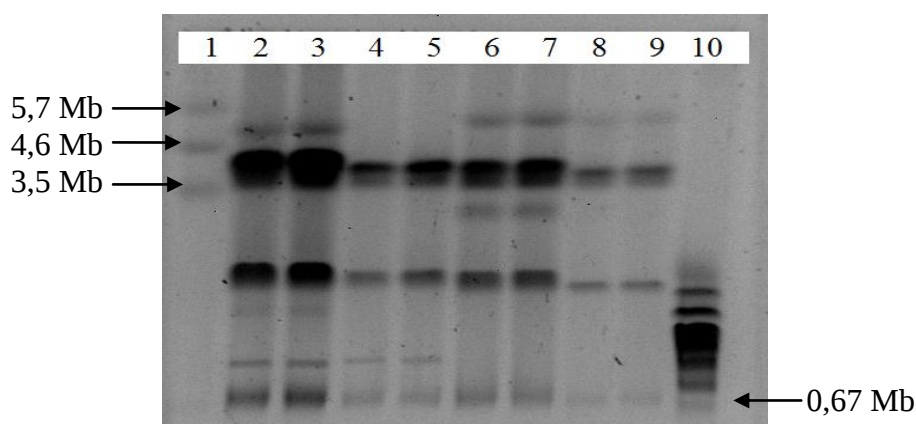


Figura 10. Eletroforese em campo pulsado para separação cromossômica. Linha 1: *S. pombe*; linhas 2 a 9: linhagens *D. bruxellensis*, 237, 239, 248 e 251 com e sem tratamento com Rnase, respectivamente; linha 10: *S. cerevisiae* S288C.

4.2. Análise da constituição genética e do status filogenético da *D. bruxellensis* em relação ao grupo ascomiceto

Para análise dos genes cromossômicos de *D. bruxellensis* foram escolhidos dez genes não repetidos em *S. cerevisiae* e para investigação dos eventos de duplicação no genoma em *D. bruxellensis* foram escolhidos nove genes homólogos duplicados em *S. cerevisiae*. A PCR com estes primers foi otimizada tendo como controle positivo a *S. cerevisiae*. Todas as amplificações por PCR conseguiram gerar o fragmento com tamanho esperado para as amostras de *S. cerevisiae*, entretanto não foram obtidos fragmentos para as amostras de *D. bruxellensis* para nenhum iniciador (primers).

A partir da disponibilidade de busca por seqüências no banco de dados do Projeto *Dekkera bruxellensis*, as seqüências de primers desenhadas para *S. cerevisiae* e utilizadas para amplificar amostras de *D. bruxellensis*, foram posteriormente confrontadas a partir da ferramenta BLAST contra o banco *Dekkera* e o resultado foi justamente o não reconhecimento dessas seqüências desenhadas a partir da *S. cerevisiae* (dados não apresentados).

4.3. Descrição do banco de dados das seqüências de *D. bruxellensis*

O banco de dados privado contendo as seqüências da levedura *D. bruxellensis*, disponibilizadas pelo Prof. Jure Piskur da Universidade de Lund, Suécia, foi criado e encontra-se hospedado no site <http://www.lge.ibi.unicamp.br/dekkera/> (Figura 11), do Laboratório de Genômica e Expressão (LGE), Instituto de Biologia da UNICAMP, como parte das atividades do projeto de pesquisa de parceria entre a UFPE e a UNICAMP com financiamento do CNPq. Este banco está disponível para acesso a partir de cadastro nos dois grupos de pesquisa envolvidos.

Através do Projeto *Dekkera bruxellensis* é possível acessar todas as seqüências através de buscas pela ferramenta BLAST, onde são obtidos os *contigs* referentes a cada busca; ou pelo *gene projects*, onde são realizadas buscas específicas para cada seqüência (Figura 12), com a possibilidade de criar pastas onde ficam armazenadas as informações de cada busca específica.

Os resultados das buscas no Projeto *Dekkera bruxellensis* são visualizados em seqüências de nucleotídeos e podem ser resgatados no formato FASTA.

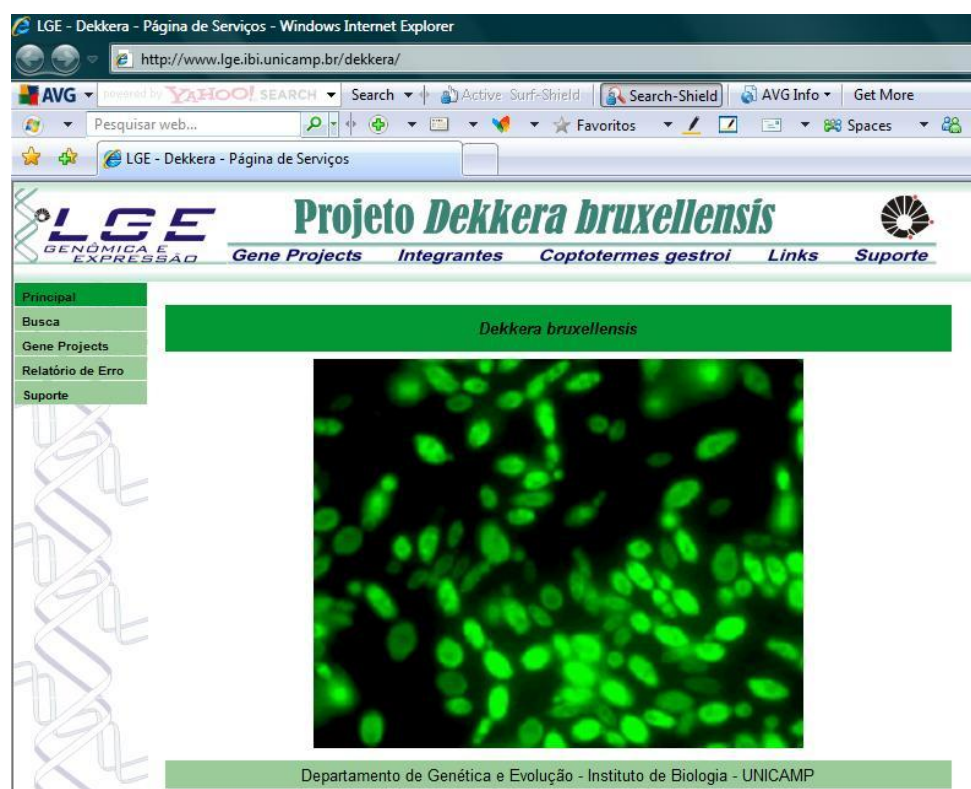


Figura 11. Site do Projeto *Dekkera bruxellensis*. Banco de dados de seqüências de nucleotídeos do genoma de *Dekkera bruxellensis*, hospedado no LGE-UNICAMP (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/dekkera/>).

Gene	Sequência	Data	Seleção
LEU2	clonados	2007-05-23	☐
SNF1	clonados	2007-07-09	☐
HO	clonados	2007-07-09	☐
TPK1	clonados	2007-07-09	☐
CTA1	clonados	2007-07-09	☐
ACS1	clonados	2007-07-09	☐
YAP1	clonados	2007-07-09	☐
PYK1	hibridizacao	2007-07-11	☐
BAP2	hibridizacao	2007-07-11	☐
ARE1	hibridizacao	2007-07-12	☐
PDR15	hibridizacao	2007-07-12	☐
RPS24A	hibridizacao	2007-07-12	☐
GND2	hibridizacao	2007-07-12	☐
DBF2	hibridizacao	2007-07-12	☐
YCK1	hibridizacao	2007-07-12	☐
UBP7	hibridizacao	2007-07-12	☐
YJR061W	hibridizacao	2007-07-12	☐

Figura 12. Gene projects do Projeto *Dekkera bruxellensis*. Sequências de primers para os genes não repetidos e genes homólogos duplicados em *S. cerevisiae*, usados para precisar a posição filogenética da levedura *D. bruxellensis* dentro da família Saccharomycetacea.

4.4. Identificação e análise estrutural dos genes codificantes do processo fermentativo em *D. bruxellensis*

4.4.1. Identificação das sequências

Para a identificação e análise dos genes codificantes das enzimas piruvato descarboxilase (*PDC*) e álcool desidrogenase (*ADH*) no genoma de *D. bruxellensis*, seqüências depositadas em banco de dados públicos como o Saccharomyces Genome Database, Genolevures Database e GenBank, foram resgatadas. No banco de dados Saccharomyces Genome Database as seqüências dos genes das famílias *PDC* (*PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *THI3* e *ARO10*) e *ADH* (*ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *ADH6* e *ADH7*) da levedura *S. cerevisiae* foram adquiridas pela busca a cada gene. A partir desses resultados, novas buscas foram feitas através de comparação nos bancos Genolevures e GenBank utilizando as ferramentas BLASTp. Foram resgatadas seqüências de aminoácidos das proteínas correspondentes que apresentavam e-value ≤ -20 nas espécies *A. gossypii*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *D. hansenii*, *K. lactis*, e *Y. lipolytica*. As seqüências da espécie *Dekkera bruxellensis* foram obtidas através do banco *Dekkera bruxellensis* utilizando a ferramenta tBLASTn onde apenas duas seqüências foram selecionadas por apresentarem ORFs completas para prováveis genes das famílias *PDC* (*dbARO10-1* e *dbARO10-2*) e *ADH* (*dbADH3* e *dbADH7*), cujos e-values eram menores que -20 (Tabelas 9 e 10).

4.4.2. Alinhamento múltiplo

Para determinar as similaridades e divergências dos genes da piruvato descarboxilase e da álcool desidrogenase entre as espécies de Hemiascomicetos: *C. glabrata*, *C. albicans*, *K. lactis*, *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *A. gossypii*, *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, foram realizados alinhamentos múltiplos das seqüências obtidas utilizando o programa Clustal W. A visualização desses alinhamentos foi efetuada a partir do programa Bioedit 7.0 (Figura 13) que permitiu a visualização de espaçamentos (gaps), regiões de consenso e regiões de divergências. Ainda no pacote Bioedit, foi utilizada a ferramenta matriz de identidade de seqüência (Sequence Identity Matrix) que fornece o percentual de similaridade entre os genes (Tabelas 11 e 12).

Os genes *dbARO10-1* e *dbARO10-2* apresentaram maiores valores de similaridade quando confrontados com os genes *ARO10* dos diferentes ascomicetos em comparação com os outros

genes da família *PDC* e o homólogo *THI3*. O maior valor encontrado para o *dbARO10-1* estava relacionado ao *ARO10* da *K. lactis* apresentando 0,335 de similaridade. A maior similaridade encontrada para o gene *dbARO10-2* foi para o gene *ARO10* da *D. hansenii* e o valor encontrado foi de 0,346 de similaridade.

Os genes de *ADH* encontrados na *D. bruxellensis* também foram analisados e o gene *dbADH3* apresentou maior similaridade com o grupo de genes *ADH3* dos diferentes ascomicetos, principalmente a *C. albicans* com o valor de 0,714 de similaridade. O gene *dbADH7* apresentou maior similaridade com os genes *ADH7* e *ADH6* dos diferentes ascomicetos mas com maior similaridade para os genes *ADH7*, apresentando maior similaridade com a *ADH7* da *C. glabrata* apresentando 0,430 de similaridade.

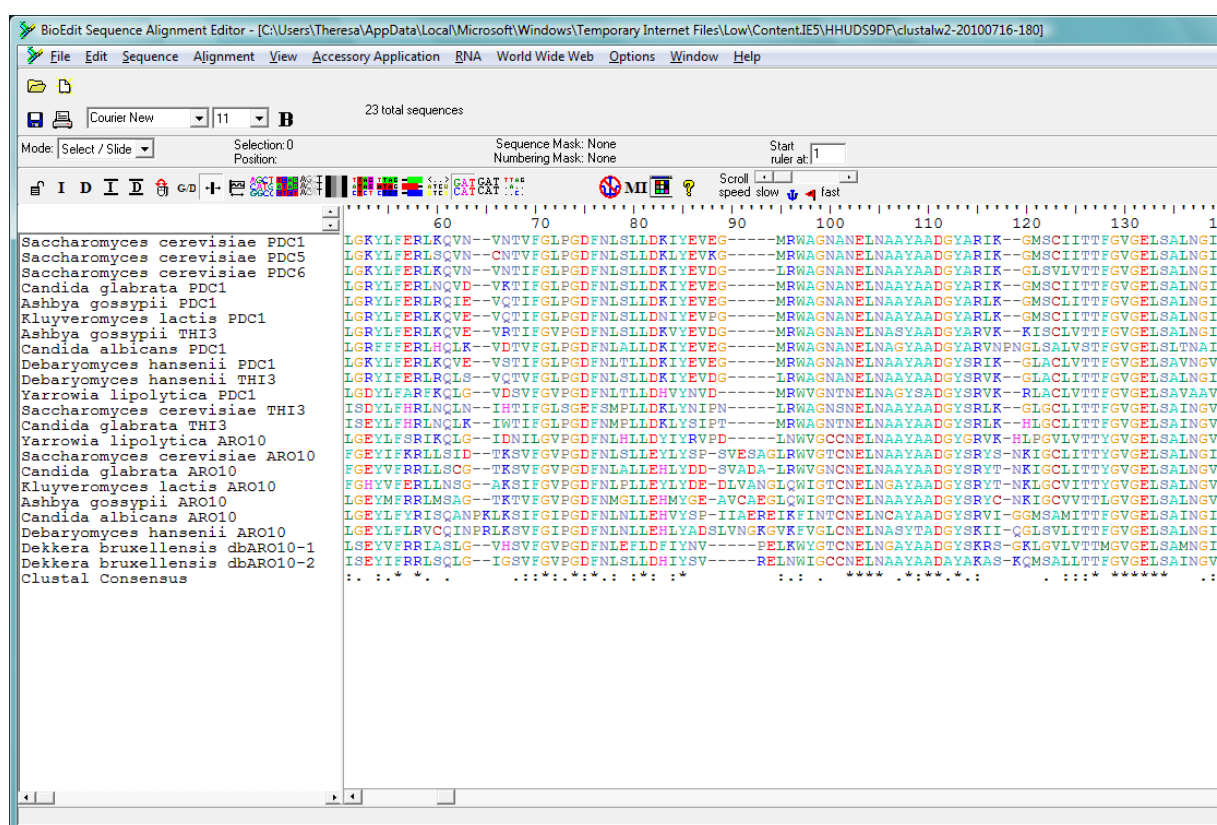


Figura 13: Alinhamento múltiplo das seqüências pelo programa Clustal W. A visualização desses alinhamentos foi efetuada a partir do programa Bioedit 7.0

Tabela 9. Identificação das seqüências dos genes da família de PDC e seus genes homólogos das espécies do Filo Ascomycota.

Espécie	score	e-value	Nº de acesso do SGD e/ou Genolevures	Nº de acesso do GenBank
<i>Saccharomyces cerevisiae PDC1</i>	ND	ND	PDC1/YLR004c	CAA54522
<i>Saccharomyces cerevisiae PDC5</i>	ND	ND	PDC5/YLR134	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae PDC6</i>	ND	ND	PDC6/YGR087c	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae ARO10</i>	ND	ND	ARO10/YDR380w	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae THI3</i>	ND	ND	THI3/ YDL080c	ND
<i>Ashbya gossypii PDC1</i>	940	0.0	ND	NP983270.1
<i>Ashbya gossypii ARO10</i>	634	5,00e-180	ND	NP983613.1
<i>Ashbya gossypii THI3</i>	699	3,00e-178	ND	NP982469.1
<i>Candida albicans PDC1</i>	812	0.0	ND	XP715589.1
<i>Candida albicans ARO10</i>	343	3,00e-92	ND	XP711076.1
<i>Candida glabrata PDC1</i>	986	0.0	CAGL0M07920g	AAN77243.1
<i>Candida glabrata ARO10</i>	724	0.0	CAGL0A03102g	XP444902.1
<i>Candida glabrata THI3</i>	796	0.0	CAGL0L06842g	XP449074.1
<i>Debaryomyces hansenii PDC1</i>	783	0.0	DEHA0G19525g	XP462338.2
<i>Debaryomyces hansenii ARO10</i>	341	1,00e-93	DEHA0D11066g	XP458905.2
<i>Debaryomyces hansenii THI3</i>	605	e-173	DEHA0B03784g	XP457131.2
<i>Kluyveromyces lactis PDC1</i>	955	0.0	KLLA0E16357g	XP454684.1
<i>Kluyveromyces lactis ARO10</i>	724	0.0	KLLA0E02662g	XP454068.1
<i>Yarrowia lipolytica PDC1</i>	618	e-177	YALI0D10131g	XP502647.1
<i>Yarrowia lipolytica ARO10</i>	374	e-104	YALI0D06930g	XP502508.1
<i>Dekkera bruxellensis dbARO10-1</i>	306	5,00e-84	ND	ND
<i>Dekkera bruxellensis dbARO10-2</i>	307	2,00e-84	ND	ND

ND – Não determinado

Tabela 10. Identificação das seqüências dos genes da família ADH das espécies do Filo Ascomycota.

Espécie	score	e-value	Nº de acesso do SGD e/ou Genolevures	Nº de acesso do GenBank
<i>Saccharomyces cerevisiae ADH2</i>	ND	ND	YMR303C	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae ADH3</i>	ND	ND	YMR083W	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae ADH4</i>	ND	ND	YGL256W	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae ADH5</i>	ND	ND	YBR145W	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae ADH6</i>	ND	ND	YMR318C	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae ADH7</i>	ND	ND	YCR105W	ND
<i>Ashbya gossypii ADH3</i>	473	e-131	ND	NP984892.1
<i>Candida albicans ADH3</i>	497	6,00e-139	ND	XP717649.1
<i>Candida albicans ADH7</i>	216	2,00e-54	ND	XP719199.1
<i>Candida glabrata ADH3</i>	492	2,00e-137	ND	XP447774.1
<i>Candida glabrata ADH7</i>	265	2,00e-69	ND	XP447094.1
<i>Debaryomyces hansenii ADH3</i>	470	8,00e-131	ND	XP462457.1
<i>Debaryomyces hansenii ADH7</i>	211	5,00e-53	ND	XP456979.1
<i>Kluyveromyces lactis ADH3</i>	496	e-138	ND	XP455689.1
<i>Kluyveromyces lactis ADH7</i>	248	4,00e-64	ND	XP454851.1
<i>Yarrowia lipolytica ADH3</i>	458	3,00e-127	ND	XP500127.1
<i>Dekkera bruxellensis dbADH3</i>	456	e -129	ND	ND
<i>Dekkera bruxellensis dbADH7</i>	245	8e -66	ND	ND

ND – Não determinado

Tabela 11. Similaridade das Sequências de aminoácidos da Família PDC e Genes Homólogos no grupo dos Ascomicetos

Espécies	C																					
	<i>S. cerevisiae</i> PDC1	<i>S. cerevisiae</i> PDC5	<i>S. cerevisiae</i> PDC6	<i>C. glabrata</i> PDC1	<i>A. gossypii</i> PDC1	<i>K. lactis</i> PDC1	<i>A. gossypii</i> THI3	<i>C. albicans</i> PDC1	<i>D. hansenii</i> PDC1	<i>D. hansenii</i> THI3	<i>Y. lipolytica</i> PDC1	<i>S. cerevisiae</i> THI3	<i>C. glabrata</i> THI3	<i>Y. lipolytica</i> ARO10	<i>S. cerevisiae</i> ARO10	<i>C. glabrata</i> ARO10	<i>K. lactis</i> ARO10	<i>A. gossypii</i> ARO10	<i>C. albicans</i> ARO10	<i>D. hansenii</i> ARO10	<i>D. bruxellensis</i> dbARO10-1	<i>D. bruxellensis</i> dbARO10-2
<i>S. cerevisiae</i> PDC1	ID	0,879	0,84	0,886	0,802	0,861	0,808	0,693	0,672	0,671	0,566	0,472	0,445	0,369	0,297	0,283	0,276	0,292	0,28	0,279	0,286	0,281
<i>S. cerevisiae</i> PDC5	ID	0,809	0,859	0,776	0,762	0,806	0,763	0,666	0,662	0,661	0,555	0,463	0,438	0,361	0,286	0,285	0,275	0,272	0,283	0,275	0,285	0,271
<i>S. cerevisiae</i> PDC6	ID	0,836	0,762	0,797	0,785	0,663	0,658	0,659	0,562	0,463	0,432	0,377	0,302	0,292	0,279	0,281	0,269	0,288	0,286	0,284		
<i>C. glabrata</i> PDC1	ID	0,834	0,857	0,825	0,707	0,699	0,682	0,573	0,477	0,443	0,379	0,297	0,294	0,281	0,289	0,274	0,272	0,285	0,281			
<i>A. gossypii</i> PDC1	ID	0,822	0,803	0,679	0,656	0,667	0,542	0,465	0,436	0,368	0,292	0,288	0,273	0,277	0,274	0,267	0,272	0,276				
<i>K. lactis</i> PDC1	ID	0,813	0,712	0,704	0,687	0,573	0,468	0,448	0,377	0,297	0,289	0,281	0,289	0,267	0,268	0,277	0,29					
<i>A. gossypii</i> THI3	ID	0,684	0,684	0,663	0,578	0,469	0,448	0,367	0,297	0,295	0,275	0,284	0,272	0,275	0,288	0,275						
<i>C. albicans</i> PDC1	ID	0,694	0,683	0,564	0,453	0,433	0,344	0,286	0,283	0,273	0,268	0,256	0,246	0,265	0,285							
<i>D. hansenii</i> PDC1	ID	0,669	0,548	0,448	0,429	0,354	0,275	0,281	0,264	0,27	0,255	0,254	0,264	0,271								
<i>D. hansenii</i> THI3	ID	0,544	0,468	0,443	0,368	0,289	0,285	0,28	0,279	0,272	0,272	0,277	0,28									
<i>Y. lipolytica</i> PDC1	ID	0,419	0,388	0,361	0,284	0,271	0,246	0,271	0,257	0,264	0,271	0,261										
<i>S. cerevisiae</i> THI3	ID	0,606	0,32	0,253	0,241	0,259	0,256	0,23	0,247	0,259	0,246											
<i>C. glabrata</i> THI3	ID	0,304	0,268	0,251	0,261	0,255	0,234	0,227	0,255	0,248												
<i>Y. lipolytica</i> ARO10	ID	0,32	0,319	0,327	0,326	0,334	0,314	0,322	0,333													
<i>S. cerevisiae</i> ARO10	ID	0,57	0,467	0,476	0,306	0,32	0,318	0,308														
<i>C. glabrata</i> ARO10	ID	0,466	0,45	0,304	0,323	0,315	0,308															
<i>K. lactis</i> ARO10	ID	0,471	0,321	0,3	0,335	0,289																
<i>A. gossypii</i> ARO10	ID	0,323	0,322	0,311	0,309																	
<i>C. albicans</i> ARO10	ID	0,453	0,327	0,341																		
<i>D. hansenii</i> ARO10	ID	0,318	0,346																			
<i>D. bruxellensis</i> dbARO10-1	ID	0,377																				
<i>D. bruxellensis</i> dbARO10-2	ID																					

Tabela 12. Similaridade das Sequências de aminoácidos da Família ADH no grupo dos Ascomicetos

[illegible]

4.4.3. Análise Filogenética

PDC

Foram identificados dois *contigs* inteiros para o gene *ARO10* na *D. bruxellensis*. Esses genes foram nomeados a partir dos *contigs* encontrados no banco de dados *Dekkera* e receberam as seguintes denominações: O *contig* 2774 do banco de dados *Dekkera* foi nomeado de *dbARO10-1* e o *contig* 3332 do banco de dados *Dekkera* foi nomeado de *dbARO10-2*.

Como conseguimos visualizar, correspondem a dois genes distintos, pois possuem diferenças na sequência de aminoácidos e possuem uma similaridade de apenas 0,377 quando confrontadas entre si.

Para verificar a evolução do gene da piruvato descarboxilase dentro do grupo dos Ascomicetos foram construídas árvores filogenéticas baseadas nas seqüências de aminoácidos do gene da *PDC1* e *ARO10* e agrupando todos os genes da família *PDC* (*PDC1*, *PDC5* e *PDC6*) e seus homólogos (*THI3* e *ARO10*). Podemos afirmar que os genes encontrados em *D. bruxellensis* correspondem aos genes *ARO10*, pois o agrupamento desses genes nas diferentes espécies do grupo ascomiceto formou um ramo distinto da família *PDC* e do homólogo *THI3*, mas agrupou com o homólogo *ARO10* dos diferentes ascomicetos, mostrando assim que os genes *dbARO10* correspondem a ortólogos do *ARO10* dessas espécies.

Com a finalidade de corroborar os resultados até então encontrados, foi gerada uma árvore filogenética que foi construída a partir das seqüências de aminoácidos dos três genes da família *PDC* (*PDC1*, *PDC5* e *PDC6*) mais os dois genes homólogos (*THI3* e *ARO10*) das espécies do grupo dos Ascomicetos *A. gossypii*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *D. bruxellensis*, *D. hansenii*, *K. lactis*, *S. cerevisiae* e *Y. lipolytica*. Como era de se esperar, os três genes da família *PDC* ficaram agrupados em clados próximos, com os genes *PDC1* e *PDC5* compartilhando um clado único, próximo ao clado do gene *PDC6*. Todas as seqüências do gene *ARO10* das espécies *A. gossypii*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *D. hansenii*, *K. lactis*, *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* incluindo os genes *dbARO* de *D. bruxellensis*, se agruparam a partir de um único braço da árvore filogenética. (Figura 14).

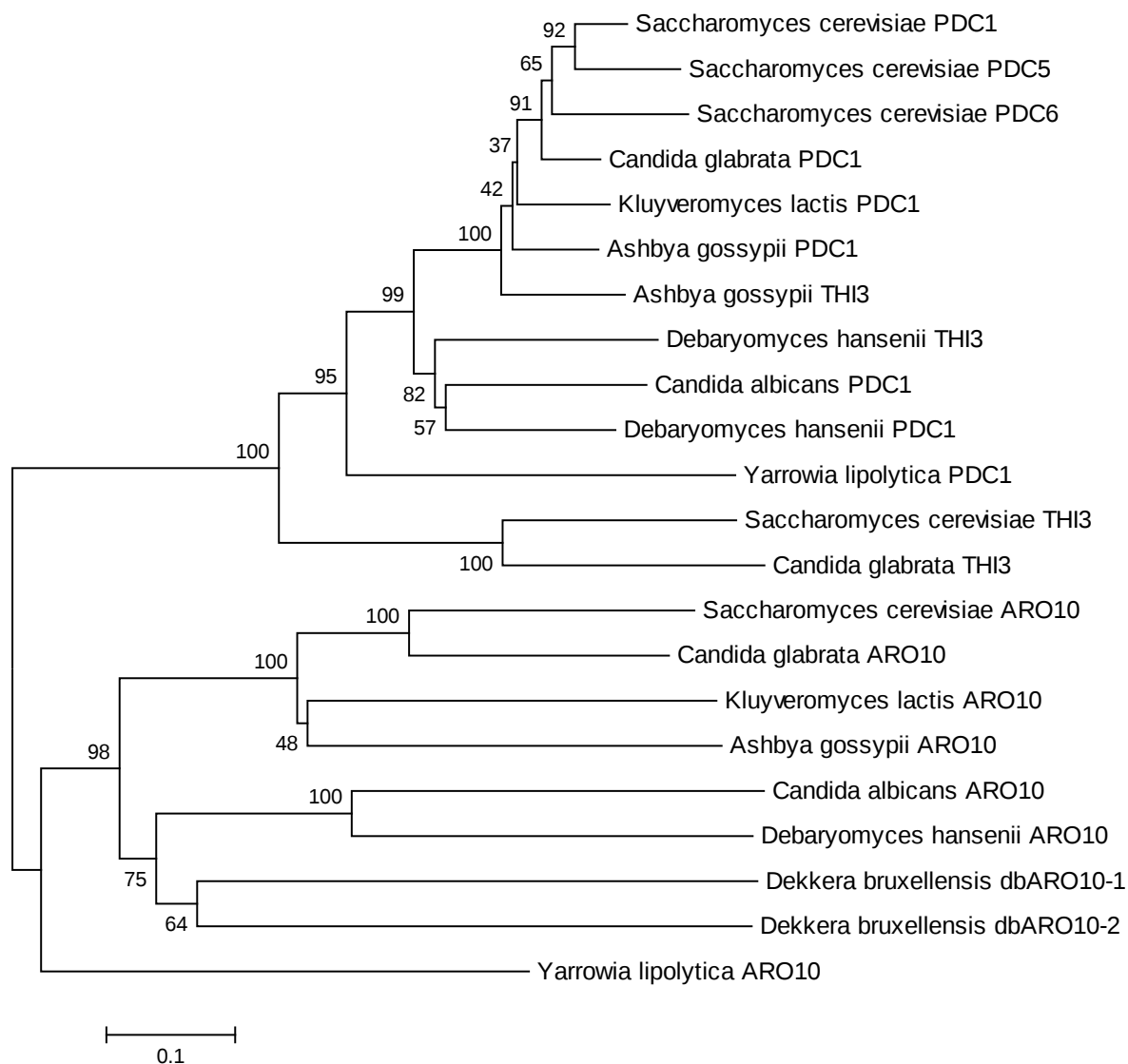


Figura 14. Gene Piruvato Descarboxilase dentro do grupo dos Ascomicetos. Árvore filogenética construída a partir das seqüências dos genes da família PDC e seus homólogos, ARO10 e THI3, com espécies do grupo dos Ascomicetos usando o agrupamento do tipo Neighbor Joining.

ADH

Foram identificados dois *contigs* inteiros para o gene *ADH* na *D. bruxellensis*. Esses genes foram nomeados a partir dos *contigs* encontrados no banco de dados *Dekkera* e receberam as seguintes denominações:

O contig 357 do banco de dados *Dekkera* foi nomeado de *dbADH7* e o contig 3093 do banco de dados *Dekkera* foi nomeado de *dbADH3*.

Para verificar a evolução do gene da álcool descarboxilase dentro do grupo dos Ascomicetos foram construídas árvores filogenéticas baseadas nas seqüências de aminoácidos

do gene da *ADH* Podemos afirmar que os genes encontrados em *D. bruxellensis* correspondem aos genes *ADH*, pois o agrupamento desses genes nas diferentes espécies do grupo ascomiceto formou um ramo distinto para cada *ADH* encontrada. Mostrando assim que os genes *dbADH* correspondem a ortólogos da *ADH* dessas espécies.

A família de *ADHs* de *S. cerevisiae* formaram três grupos: o primeiro grupo composto pela *ADH1*, *ADH2*, *ADH3* e *ADH5*, o segundo pela *ADH6* e *ADH7* e o terceiro pela *ADH4*. Todas as seqüências de *ADHs* de *S. cerevisiae* foram buscadas no banco de dados do projeto *D. bruxellensis*. O gene *dbADH3* foi selecionado como o representante do primeiro grupo de *ADHs* de *S. cerevisiae*, o gene *dbADH7* representando o segundo, enquanto nenhum contig foi encontrado relacionado a *ADH4*. Dentro de cada grupo buscou-se a *ADH* mais próxima de cada gene. Em relação ao gene *dbADH3*, a *ADH* mais próxima foi a *ADH3* e em relação ao gene *dbADH7* foi a *ADH7*.

Para confirmar a distinção entre dois grupos de *ADHs* representadas pelos *contigs* foi construída uma árvore filogenética com a presença de representantes do grupo dos Ascomicetos. Com essa construção foi possível verificar que dois ramos distintos são formados: um relacionado ao gene *dbADH3* que é mais próximo a *ADH3* dos outros ascomicetos e outro ramo relacionado ao gene *dbADH7* que é mais próximo a *ADH7* dos outros ascomicetos (Figura 15).

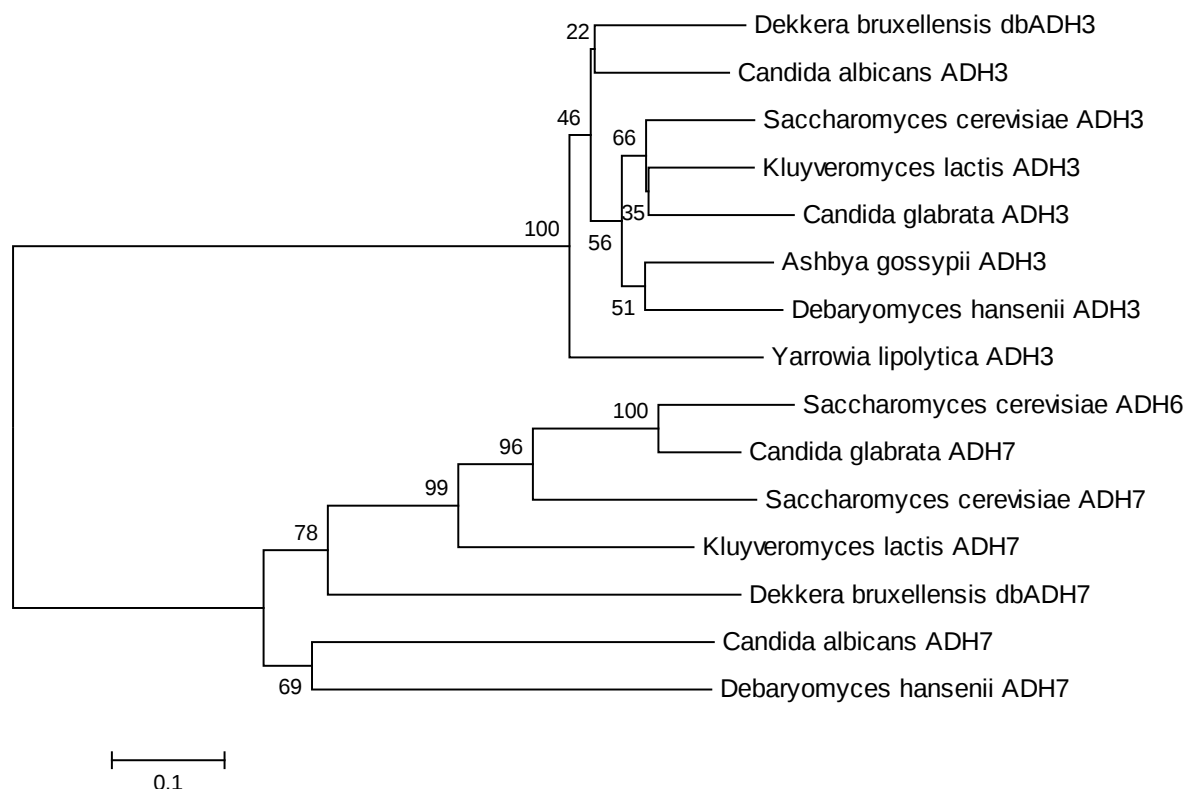


Figura 15. Gene Álcool Desidrogenase dentro do grupo dos Ascomicetos. Árvore filogenética construída a partir das seqüências dos genes ADH de *D. bruxellensis* com espécies do grupo dos Ascomicetos usando o agrupamento do tipo Neighbor Joining.

4.5. Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real - Padronizações

4.5.1. Padronização do Gene de Referência

Inicialmente foi utilizado o gene de referência já padronizado no laboratório para uso com leveduras *S. cerevisiae*, o ADK1 (Vidal, 2008), mas não foi possível estabelecer as curvas de eficiência para amostras de *D. bruxellensis*, pois a amplificação gerou apenas dímeros de primer com esse iniciador.

O gene EFA1 (fator de elongação alfa) foi escolhido para ser testado como gene de referência nos experimentos com *Dekkera bruxellensis*. Foram realizados todos os passos de otimização incluindo a titulação dos primers eficiência do ensaio e análise da curva de dissociação. A melhor concentração encontrada para uso dos primers foi de 200 nM, pois acima disso o Ct não apresentava diminuição, ou seja, aumento de amplificação, e passou a

detectar a presença de dímeros. Na curva de eficiência, baseado na concentração de oligos estabelecida no passo anterior, foi aplicada diluição seriada de uma amostra para avaliar a eficiência do experimento. Eficiência esta indicada pela inclinação da curva padrão. Foi obtida uma eficiência de 99% e um slop de -3,4, que são valores dentro do esperado para uma reação com boa eficiência (Figura 16A). Em relação à curva de dissociação apenas um pico foi obtido, bem definido e dentro do Tm esperado (Figura16B).

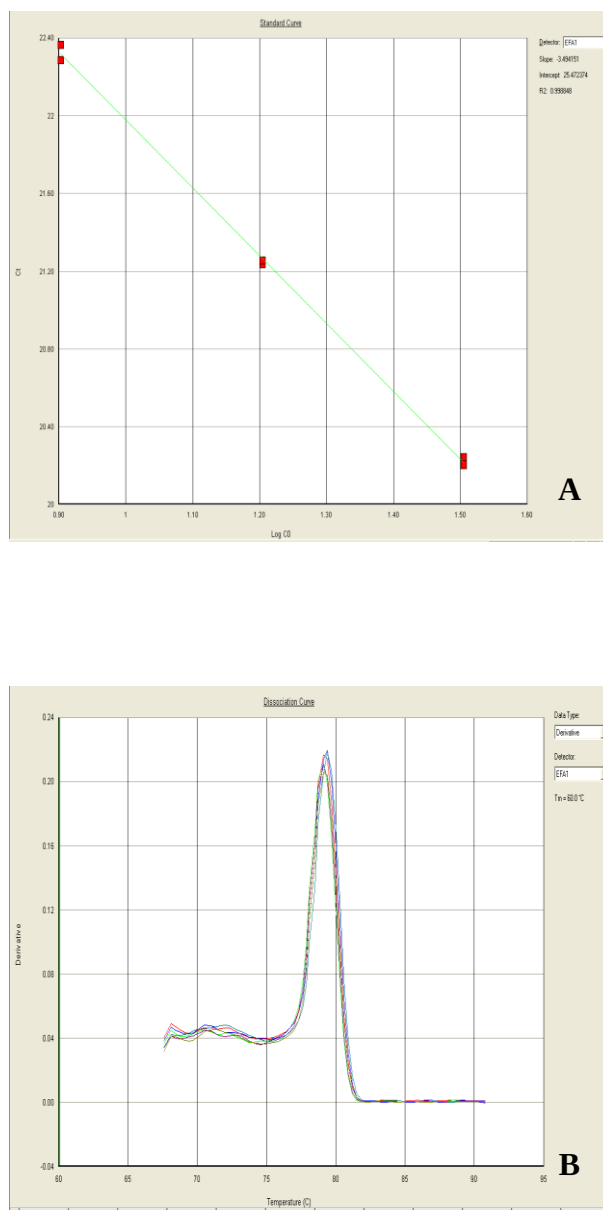


Figura 16: Avaliação da eficiência do ensaio para o gene de referência EFA1. **Painel A:** Curva Padrão com diluições de 1/10. **Painel B:** Curva de dissociação.

4.5.2. Padronização dos Genes do metabolismo fermentativo utilizados em PCR Tempo Real

PDC

Foram realizados todos os experimentos de otimização para os primers *dbARO10-1* e *dbARO10-2*, sendo encontrada a concentração de 200 nM como a que produzia melhores curvas de amplificação, sem a formação de dímeros. A curva padrão apresentou uma eficiência de 99% e um slop de -3,1 para ambos os primers (Figura 17A e 18A, respectivamente). A curva de dissociação apresentou um pico único e bem definido para ambos os primers (Figura 17B e 18B, respectivamente).

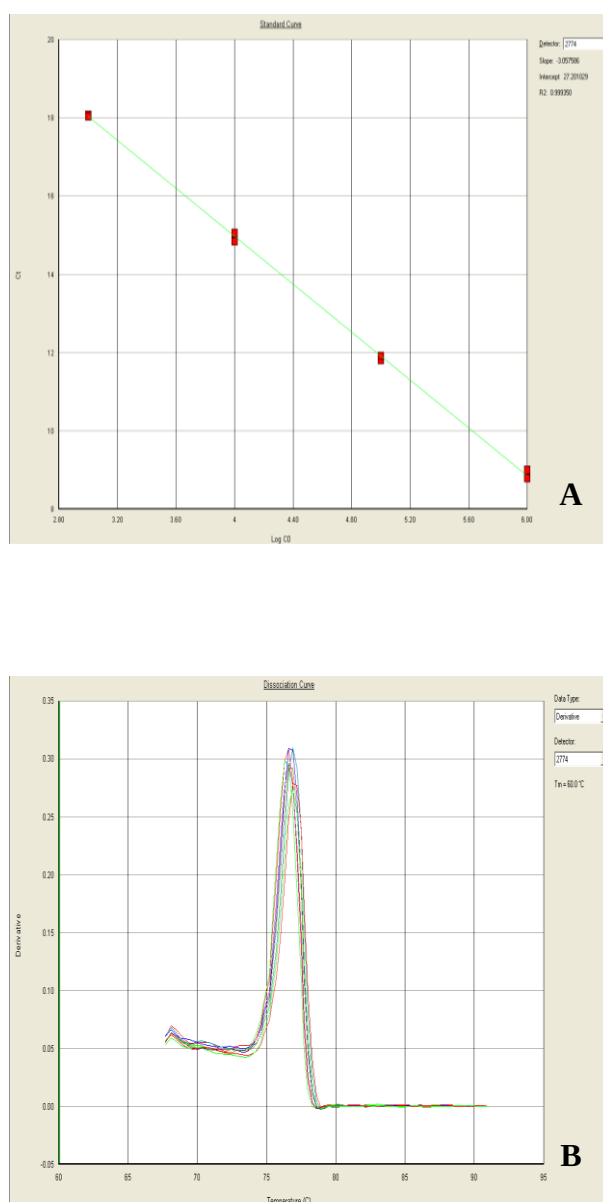


Figura 17: Avaliação da eficiência do ensaio para o primer *dbARO10-1*. **Painel A:** Curva Padrão com diluições de 1/10. **Painel B:** Curva de dissociação.

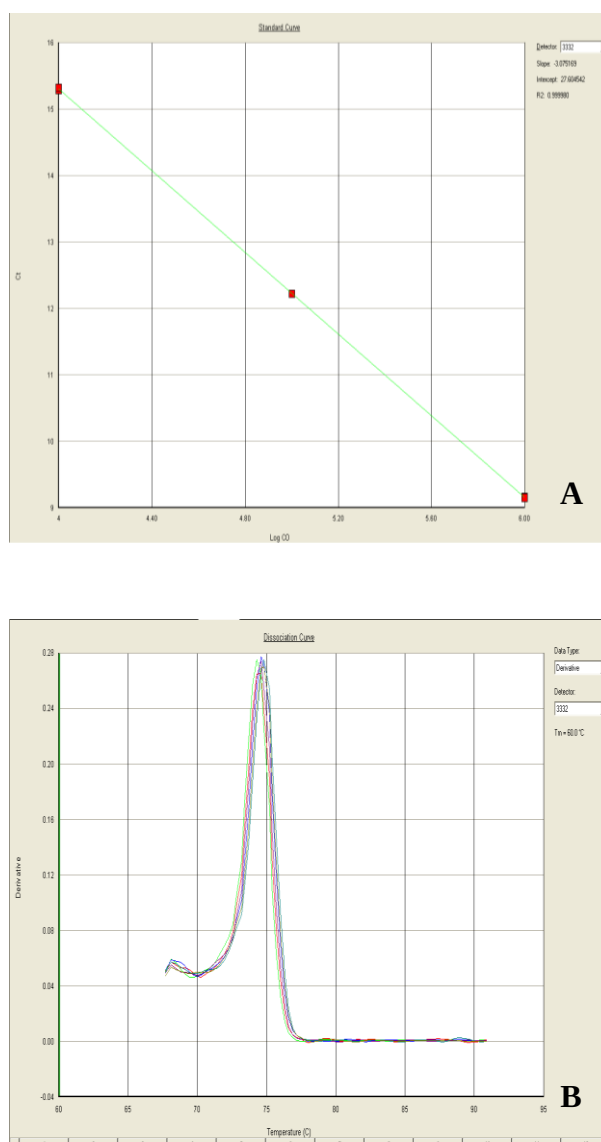


Figura 18. Avaliação da eficiência do ensaio para o *primer dbARO10-2*. **Painel A:** Curva Padrão com diluições de 1/10. **Painel B:** Curva de dissociação.

ADH

Todos os passos de otimização foram também realizados com os primers *dbADH3* e *dbADH7*, com a concentração ideal de primers estabelecida de 200 nM. A eficiência foi de 99% para ambos os primers e o slop de -3,1 e -3,2 respectivamente (Figura 19A e 20A, respectivamente). Entretanto a curva de dissociação para ambos os primers apresentou mais de um pico.

O primer *dbADH3* apresentou dois picos próximos e um pico com temperatura T_m mais baixa. Entretanto os dois picos mais fortes não apresentam T_m tão baixo que possa ser

considerado produto de dímero (Figura 19B). Quando aplicado em gel as amostras apresentaram um tamanho único de fragmento de acordo com o esperado, ou seja, 81 pb (Figura 21).

O primer *dbADH7* permitiu a visualização de dois picos bem distintos e sem a presença de um pico com T_m relacionado a dímeros (Figura 20B). Essas amostras também foram corridas em gel e apresentaram um único fragmento de 103 pb de acordo com o esperado (Figura 21). A formação dos dois picos em ambos os casos provavelmente está ocorrendo por diferença de conteúdo GC nos dois prováveis fragmentos que estão sendo detectados. Ou seja, é provável que a linhagem analisada seja heterozigota para os dois genes *ADH* analisados e que estes dois alelos estejam sendo detectados.

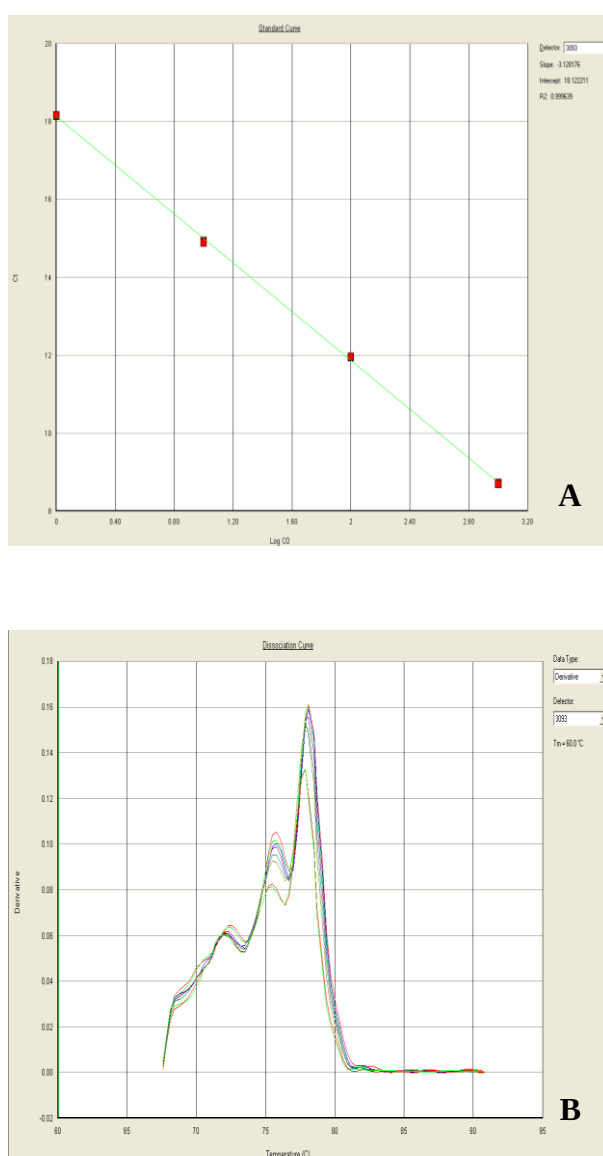


Figura 19. Avaliação da eficiência do ensaio para o primer *dbADH3*. **Painel A:** Curva Padrão com diluições de 1/10. **Painel B:** Curva de dissociação.

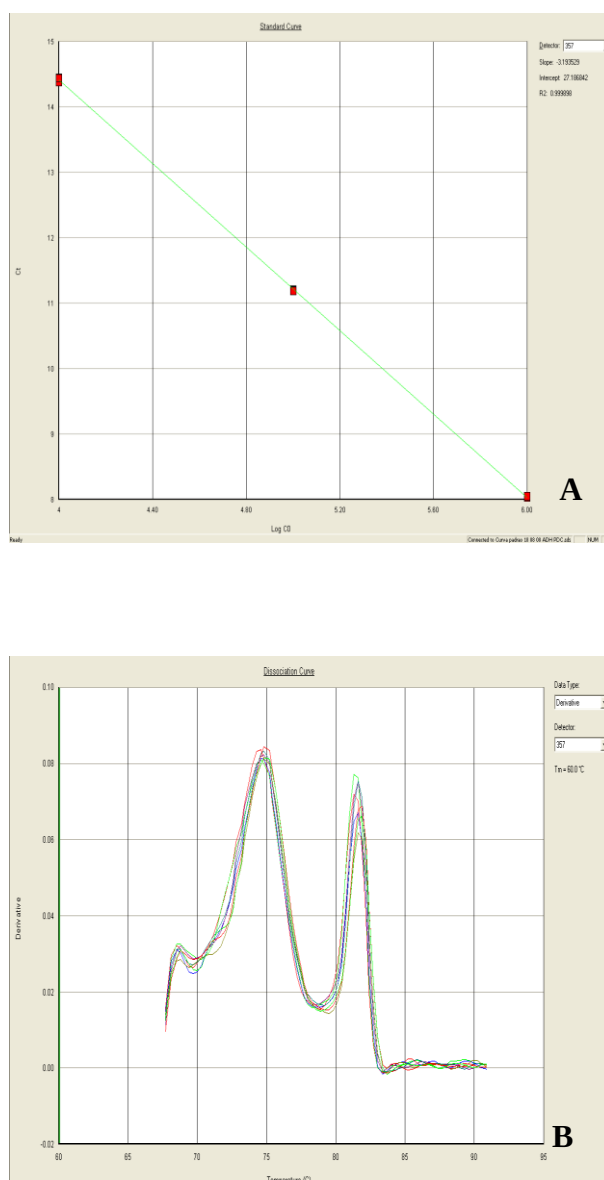


Figura 20. Avaliação da eficiência do ensaio para o *primer dbADH7*. **Painel A:** Curva Padrão com diluições de 1/10. **Painel B:** Curva de dissociação.

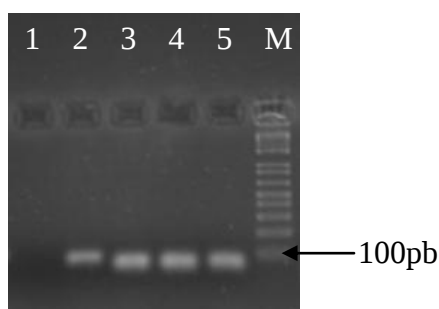


Figura 21: Produto da amplificação por PCR tempo real. Corrida em gel de agarose 1,3% para visualizar a banda única gerada após a amplificação. Linha1: branco, linha 2: *dbADH7* (103pb), linha 3: *dbADH3* (81pb), linha 4: *dbARO10-1* (95pb) e linha 5: *dbARO10-2* (71pb).

Finalizada, assim a padronização dos primers, incluindo desta forma o gene de referência e os genes de metabolismo fermentativo, que foram utilizados neste experimento de qPCR, iniciamos os experimentos de análise da expressão gênica em diferentes meios com diferentes fontes de carbono para verificar assim a variação de resposta apresentada pelas diferentes linhagens de *D. bruxellensis*.

4.6. Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real

4.6.1. Análise da expressão gênica nos genes *dbARO10*

Como era esperada a partir dos resultados da literatura relativos ao homólogo *ARO10*, a expressão dos dois genes *dbARO10* foi maior no meio de cultura contendo fenilalanina como fonte de nitrogênio do que no meio com amônia (Figura 22). Isto indica que realmente esses genes estão relacionados com o metabolismo de fenilalanina e que, então, deve corresponder realmente aos genes que codificam a enzima fenilpiruvato descarboxilase nas duas isoformas possíveis: Aro10-1p e Aro10-2p.

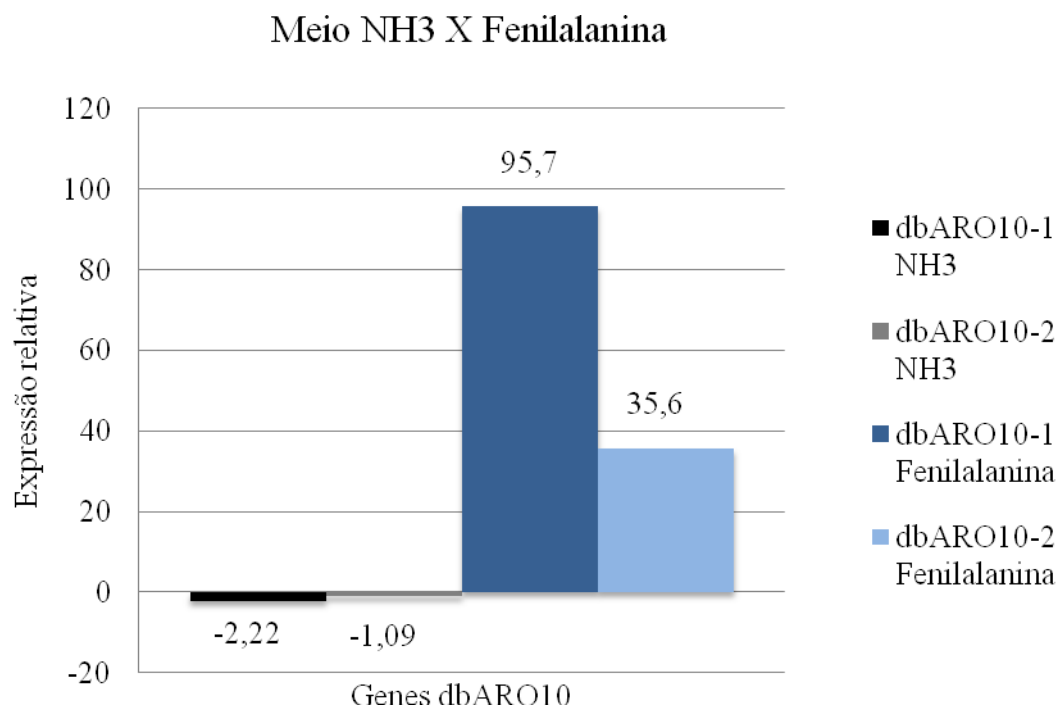


Figura 22. Comparação da expressão relativa dos genes *dbARO10*. Linhagem GDB248, cultivada nos meios NH3 e fenilalanina da tabela 2, ao atingir 1DO, tendo como referência o cultivo em 0,1DO.

A análise da expressão relativa dos dois genes *ARO10* durante o crescimento celular utilizou como referência as células na fase lag de crescimento. Quando a cultura atingiu a fase exponencial (DO = 1), a expressão do gene *dbARO10-1* foi quase 3 vezes maior do que o gene *dbARO10-2*, independente da linhagem estudada (Figura 23). Verificou-se, além disso, que a expressão dos dois genes foi sempre maior na linhagem industrial GDB 248 do que na linhagem de coleção CBS 74 (Figura 23). As culturas celulares não conseguiram atingir DO igual a 10 no meio com fenilalanina, pois houve declínio da densidade celular em função da morte das células. É possível que haja acúmulo de metabólitos tóxicos, tal como fenil-acetaldeído, que não são eliminados apropriadamente pelas células de *D. bruxellensis* ao longo do crescimento celular. Portanto, não foi possível medir a expressão dos genes naquele momento do cultivo.

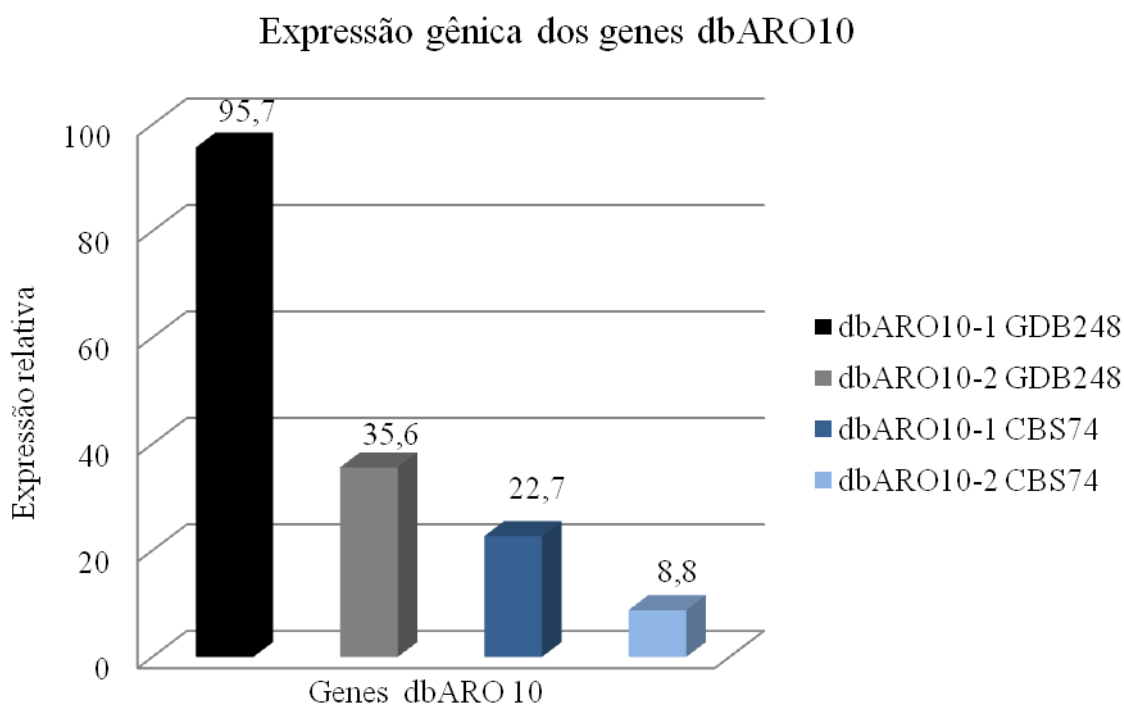


Figura 23. Expressão relativa dos genes *dbARO10*. Linhagens industriais GDB248 e CBS74, cultivadas no meio 3 da tabela 2, suplementado com fenilalanina. Expressão dos genes ao atingir 1DO com amostras de 0,1DO desse cultivo como referência.

4.6.2. Análise da expressão gênica nos genes *dbADH*

A expressão dos genes *dbADH* sempre foi maior ao ser atingida 1DO de crescimento celular, sendo que, a linhagem GDB248 apresentou maior expressão do gene *dbADH7* enquanto a linhagem CBS 74 apresentou maior expressão do gene *dbADH3* (Figura 24). O

gene *dbADH7* apresentou quatro vezes mais expressão na linhagem GDB248 que na CBS 74; enquanto que o gene *dbADH3* apresentou quinze vezes mais expressão na linhagem CBS 74 quando comparada à linhagem GDB248. Por serem linhagens de *D. bruxellensis* isoladas de processos fermentativos diferentes é esperado diferenças na expressão gênica. Esta diferença ocorre devido ao metabolismo diferenciado que é necessário em cada processo fermentativo específico e que podem estar relacionadas ao momento ou a intensidade da expressão. O gene *ADH7* está mais relacionado à síntese de álcool e tolerância ao aldeído, como a linhagem GDB248 foi isolada da produção de álcool, apresenta maior resposta ao seu meio utilizando esse gene. Entretanto a linhagem CBS 74 foi isolada da fermentação de cerveja, tendo assim maior expressão do gene *ADH3* que está relacionado à fermentação/respiração do metabolismo fermentativo. A análise de expressão dos dois genes permitiu verificar as diferenças nos dois momentos metabólicos estudados entre as duas linhagens de *D. bruxellensis*.

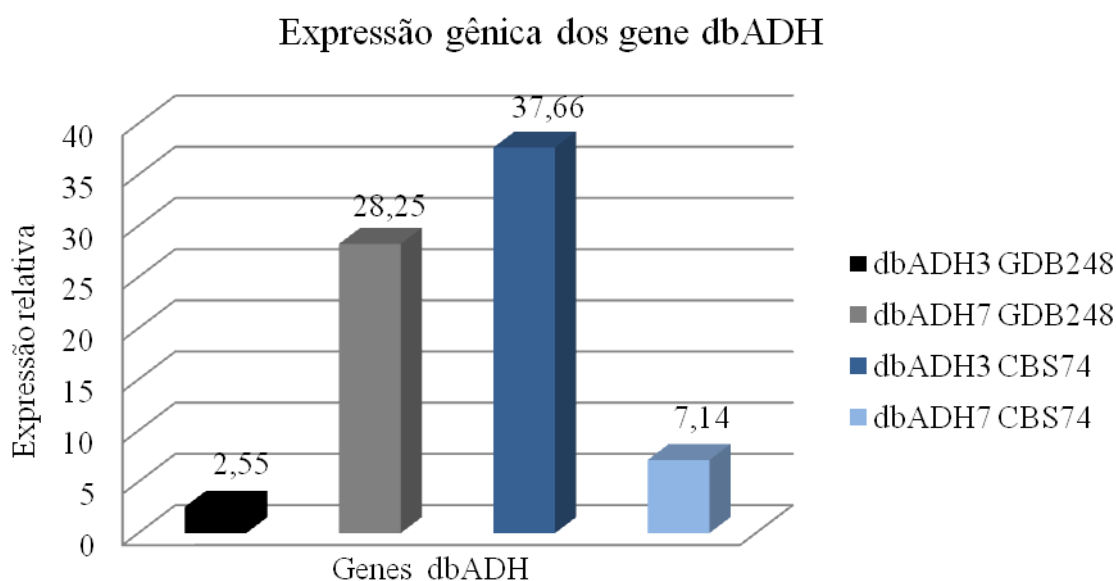


Figura 24. Expressão relativa dos genes *dbADH*. Linhagens industriais GDB248 e CBS74, cultivadas no meio 1 da tabela 2. Expressão dos genes ao atingir 1DO com amostras de 0,1DO desse cultivo como referência.

4.6.3. Análise comparativa da expressão gênica nos genes *dbPDC* e *dbADH*

Quando analisamos os resultados de uma forma geral, é possível verificar que nos diversos meio testados (Tabela 3), para a linhagem GDB248, tendo como referências o meio de sulfato de amônia, o maior aumento de expressão foi visualizada para o gene *dbADH7*. O único meio testado que apresentou aumento de expressão para o gene *dbARO10* foi o meio

suplementado com fenilalanina com aumento de expressão para o gene *dbARO10-1*. Já o gene *dbARO10-2* mostrou-se reprimido em todas as condições apresentadas. Nesse meio suplementado com fenilalanina o gene *dbADH7*, que apresentou maior expressão nos outros meios, não apresentou resposta. Em relação a linhagem CBS74, a principal diferença é o aumento de expressão para o *dbADH3* no meio com glicerol e o aumento da expressão das *dbADHs* no meio suplementado com fenilalanina. O uso do meio NH₃ como referência permite visualizar como os genes se comportam em relação a este meio NH₃ para cada meio analisado (Tabela 13).

Quando analisamos os diversos meios ao atingir 1DO de crescimento, utilizando como referência o próprio meio quando em 0,1DO de crescimento, podemos visualizar a resposta de cada gene no meio testado em relação ao próprio meio durante o crescimento. Verificamos assim que o gene *ADH7* ainda é o mais expresso para a linhagem GDB248 dentre as *dbADHs*, mas para a linhagem CBS 74, o gene *ADH3* é que se mostra mais expresso, exceto para o meio com etanol. Na linhagem GDB248 o aumento de expressão para os genes *dbARO10* só ocorre no meio suplementado com fenilalanina enquanto que na linhagem CBS74 esse aumento de expressão ocorre no meio com fenilalanina e no meio de etanol.

Tabela 13: Comparação da expressão relativa dos genes *dbARO10* e *dbADH* cultivados em diferentes meios.

Meios ^a	Genes				Linhagem	Referência ^b
	<i>dbARO10-1</i>	<i>dbARO10-2</i>	<i>dbADH3</i>	<i>dbADH7</i>		
Sacarose + Amônia	19	-4,78	3	197	GDB248	NH3 (1DO)
Etanol + Amônia	7	-2,02	3,2	262	GDB248	NH3 (1DO)
Glicerol + Amônia	10,41	-5,18	4,7	75,15	GDB248	NH3 (1DO)
Glicose + Fenilalanina	923	-2,69	1,16	0	GDB248	NH3 (1DO)
Sacarose + Amônia	1,41	1,45	1,19	1,27	CBS74	NH3 (1DO)
Etanol + Amônia	-2,87	15,40	2,43	18,83	CBS74	NH3 (1DO)
Glicerol + Amônia	-59,71	-1,87	5,35	1,5	CBS74	NH3 (1DO)
Glicose + Fenilalanina	-2,74	28,54	77,44	424,61	CBS74	NH3 (1DO)
Glicose + NH3	-2,22	-1,09	-2,28	3,05	GDB248	0,1 DO
Sacarose + Amônia	4,68	2,69	-6,63	4,32	GDB248	0,1 DO
Etanol + Amônia	-4,96	23,59	-15,22	1,59	GDB248	0,1 DO
Glicerol + Amônia	1,42	11,08	1,27	1,57	GDB248	0,1 DO
Glicose + Fenilalanina	95,7	35,6	2,55	28,25	GDB248	0,1 DO
Glicose + NH3	-2,1	1,68	3,46	1,25	CBS74	0,1 DO
Sacarose + Amônia	1,53	-1,04	7,19	-1,09	CBS74	0,1 DO
Etanol + Amônia	-2,04	23,26	2,34	7,73	CBS74	0,1 DO
Glicerol + Amônia	-45,57	-2,48	46,53	1,81	CBS74	0,1 DO
Glicose + Fenilalanina	22,7	8,8	37,66	7,14	CBS74	0,1 DO

a - Meios com diferentes fontes de carbono (etanol, glicerol, sacarose e Glicose) e de Nitrogênio (amônia e fenilalanina), tabela 2. Dados coletados ao atingir 1DO de crescimento.

b - Tendo como referência o cultivo dessa linhagem no meio 2 (glicose + amônia) ou o cultivo da linhagem no mesmo meio analisado, quando em 0,1DO de crescimento.

4.6.4. Avaliação da resposta rápida de expressão (*short-term expression*) e da resposta tardia de expressão gênica (*long-term expression*)

Nos experimentos de resposta rápida (indução) e resposta lenta que foram realizados na linhagem GDB248, os genes *dbARO10-1* e *dbARO10-2*, apresentaram maior expressão no meio suplementado com fenilalanina e repressão no meio suplementado com sulfato de amônia (Tabela 14). No experimento de resposta rápida o gene *dbARO10-2* foi 28 vezes mais expresso que o gene *dbARO10-1*. Enquanto que no experimento de resposta lenta o gene *dbARO10-1* é que foi 3 vezes mais expresso que o gene *dbARO10-2*. Os dois genes *dbARO10* encontrados na *D. bruxellensis* respondem positivamente ao meio com fenilalanina adicionada. Além disso, o gene *dbARO10-2* é responsável pela resposta rápida, enquanto o gene *dbARO10-1* é responsável pela resposta lenta, quando a *D. bruxellensis* é cultivada em meio suplementado com fenilalanina.

Os genes *dbADH* também apresentaram maior expressão no meio suplementado com fenilalanina, mas em valores menores que os encontrados para os genes *dbARO10*. Tanto na resposta rápida quanto na resposta lenta, o gene mais expresso foi o *dbADH7* apresentando 11 vezes mais expressão na resposta rápida e 3 vezes mais expressão na resposta lenta.

Tabela 14. Avaliação da resposta rápida de expressão (*short-term expression*) e da resposta tardia de expressão gênica (*long-term expression*).

Experimento	Genes <i>dbARO10</i>						Genes <i>dbADH</i>					
	<i>dbARO10-1</i>			<i>dbARO10-2</i>			<i>dbADH3</i>			<i>dbADH7</i>		
	Indução ^a	24 horas ^b		Indução	24 horas		Indução	24 horas		Indução	24 horas	
	<u>NH3^c</u>	<u>NH3</u>	<u>DO 0,1^d</u>	<u>NH3</u>	<u>NH3</u>	<u>DO 0,1</u>	<u>NH3</u>	<u>NH3</u>	<u>DO 0,1</u>	<u>NH3</u>	<u>NH3</u>	<u>DO 0,1</u>
Meios												
Glicose + amônia	1	1	-2,22	1	1	-1,09	1	1	-2,28	1	1	3,05
Glicose + Fenilalanina	2,95	923	95,7	82,7	-2,69	35,6	2,97	1,16	2,55	8,51	0	28,25
Glicose + Etanol	-1,65	7	-4,96	11,08	-2,02	23,59	11,63	3,2	-15,22	11,75	262	1,59
Glicose + Leucina	5,24	—	—	20,32	—	—	2,52	—	—	12,71	—	—

a – Experimento de indução celular, onde as células de levedura foram colocadas nos diferentes meios de cultura e retiradas após 1 hora de incubação.

b – Experimento de incubação durante aproximadamente 24 horas, onde as células foram inoculadas nos diferentes meios de cultivo e analisadas após atingir 0,1DO e 1DO de crescimento celular.

c – A referência utilizada para analisar a expressão relativa foi o crescimento celular em meio de glicose + amônia ao atingir 1DO de crescimento celular e os meios analisados estavam em 1DO de crescimento.

d – A referência utilizada para analisar a expressão relativa foi o crescimento celular no próprio meio, quando em DO 0,1 e os meios analisados estavam em 1DO de crescimento.

4.7. Análise da atividade enzimática

A análise da atividade enzimática foi realizada nas linhagens *S. cerevisiae* JP1 e *D. bruxellensis* GDB248 (Tabela 15). Essas leveduras foram cultivadas em meios com duas diferentes fontes de nitrogênio: amônia e fenilalanina, para assim medir a atividade das enzimas álcool desidrogenase e fenilpiruvato descarboxilase. Dessa forma foi possível verificar a variação da atividade enzimática na *D. bruxellensis* quando submetida ao crescimento onde a única fonte de nitrogênio foi a fenilalanina. Da mesma forma que a da análise da expressão dos genes *dbARO10* mostrou maior expressão no meio suplementado com fenilalanina, a maior atividade enzimática para a fenilpiruvato descarboxilase foi encontrada para este meio, quando comparado com o meio suplementado com amônia. E esta atividade foi observada para ambas as linhagens *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae*. Em relação a atividade da álcool desidrogenase, a maior atividade observada foi no meio suplementado com amônia, apresentado maior atividade para a linhagem *D. bruxellensis*.

Tabela 15. Atividade enzimática das culturas celulares de *D. bruxellensis* e de *S. cerevisiae* cultivadas em meio suplementado com Sulfato de amônia e fenilalanina como fonte de Nitrogênio.

Levedura	Fonte de N	Atividade álcool desidrogenase (Adh) [mmol NADH produzido/min/mg prt]	Fator de inibição Adh [Fenilalanina/amônia]	Atividade fenilpiruvato descarboxilase (FPdc) [nmol NADH produzido/min/mg prt]	Fator de indução FPdc [Fenilalanina/amônia]
S. cerevisiae JP1	Amônia	3,23 ± 0,2	-	27,43 ± 1	-
	Fenilalanina	0,97 ± 0,02	-3,33	69,35 ± 4	2,53
D. bruxellensis GDB248	Amônia	4,94 ± 0,14	-	15,54 ± 4	-
	Fenilalanina	0,18 ± 0,02	-27,4	42,15 ± 1	2,71

5. Discussão

A levedura *D. bruxellensis* apresenta grande adaptação ao ambiente industrial, apesar das condições de estresse para o crescimento celular encontradas neste processo. Além disso, compartilha com a *S. cerevisiae* a capacidade de se desenvolver na ausência de oxigênio. Baseado nestas características adaptativas em comum e levando em consideração a grande quantidade de informações disponíveis sobre *S. cerevisiae*, buscou-se analisar a *D. bruxellensis* a partir das informações disponíveis sobre a levedura modelo *S. cerevisiae*.

Para precisar a posição filogenética de *D. bruxellensis* dentro da família Saccharomycetacea foram escolhidas sequências de genes cromossômicos. Os genes foram escolhidos com base em informações sobre a evolução gênica nos ascomicetos relacionados aos mecanismos de reprodução sexuada, regulação catabólica exercida pela glicose, resposta a estresse oxidativo e evolução de vias metabólicas específicas. Em relação à investigação dos eventos de duplicação no genoma de *D. bruxellensis* a partir de genes homólogos duplicados em *S. cerevisiae* o objetivo foi verificar quais genes encontravam-se duplicados na *D. bruxellensis*. A existência nos fungos de eventos de duplicação gênica seguidos de deriva evolucionária diferencial de uma das cópias é considerada uma das principais forças para a adaptação a novos nichos ecológicos e especiação adicional (Gojkovic *et al.*, 2004). A constatação em *D. bruxellensis* de um padrão de redundância sugestivo de um evento de duplicação total do genoma ajudaria a situar a espécie na história evolutiva dos ascomicetos. Em *S. cerevisiae*, além desses genes dispostos em blocos gênicos duplicados, alguns genes sofreram duplicações independentes como parte de mecanismos celulares de adaptação a ambientes com alta disponibilidade de açúcar, baixa disponibilidade de fontes de nitrogênio e de oxigênio, tendo relação direta com processos fermentativos. Tais eventos independentes de duplicação ocorreram principalmente em regiões teloméricas e existe uma relação muito interessante entre o número de cópias destes genes e a capacidade fermentativa das células do grupo *Saccharomyces sensu stricto* (Gojkovic *et al.*, 2004).

Diversas linhagens da levedura *D. bruxellensis* foram submetidas a eletroforese em campo pulsátil (PFGE) sob diferentes condições e tempos de migração, na tentativa de obter uma melhor separação dos cromossomos desta espécie. Inicialmente a linhagem *D. bruxellensis* GDB237 foi submetida a eletroforese em campo pulsátil juntamente com uma linhagem de *S. cerevisiae*. Sabendo que os cromossomos da *D. bruxellensis* são grandes, foi feita uma migração eletroforética direcionada para a separação desses cromossomos maiores. Entretanto, apenas o uso da *S. cerevisiae* como controle não permitiu uma boa análise dos resultados, visto que seus cromossomos são menores e em maior quantidade. Além de servir

como teste inicial de condições de migração, foi analisada também a capacidade de extração das células da *D. bruxellensis*, além da quantidade de material a ser colocado em gel para a corrida. Uma vez estabelecido o procedimento de extração do material genômico de *D. bruxellensis* e em quantidade suficiente, foi realizada uma segunda migração eletroforética agora utilizando uma *S. pombe* que apresenta cromossomos de tamanhos grandes, mais semelhantes aos apresentados pela *D. bruxellensis*. Tentando separar ainda mais os cromossomos, foi utilizada uma corrida por mais tempo e com *switch* dividido em dois blocos para separar os cromossomos maiores que ainda permaneceram sobrepostos. Além disso, foram utilizadas diversas linhagens de *D. bruxellensis* para verificar a reprodutibilidade do protocolo e a eficiência de extração nas diferentes linhagens. Foi utilizado apenas metade dos plugs de 50 mg/mL, devido a extração eficiente apresentada na primeira corrida. Na terceira corrida foi utilizado a RNase na duplicata das amostras na tentativa de diminuir o rastro do final da corrida, entretanto nenhuma diferença foi verificada.

Segundo Miot-Sertier e Lonvaud-Funel (2007), *D. bruxellensis* apresenta um pequeno número de cromossomos com ausência de pequenos e médios cromossomos. Nossos resultados mostram que os isolados de fermentação alcoólica de *D. bruxellensis* desse processo também possuem cromossomos grandes, com ausência de pequenos cromossomos confirmando a literatura. Além disso, foi possível estabelecer que o número de cromossomos variou de quatro a seis dentre as linhagens da fermentação alcoólica utilizadas nesse trabalho, e que o tamanho destes cromossomos variou no intervalo entre 0,67 Mb e 5,7 Mb. Algumas bandas cromossômicas apresentaram-se mais intensas, provavelmente pela sobreposição de cromossomos de mesmo tamanho. Esses dados são bem similares aos encontrados recentemente na literatura a partir do estudo de 30 linhagens de *D. bruxellensis* isoladas de vinho (Hellborg e Piskur, 2009). Nas linhagens de vinho, o número de cromossomos variou de quatro a nove cromossomos, utilizando a mesma técnica de PFGE. O tamanho dos cromossomos variou de menos de 1 Mbp a mais de 6 Mbp. Em algumas linhagens, as bandas apresentaram maior intensidade sugerindo que alguns cromossomos tenham sobreposição devido ao tamanho. Um grau tão elevado de variação de cariótipo sugere que o genoma reformulou rapidamente a partir de uma linhagem única inicial (Hellborg e Piskur, 2009). Foi possível estabelecer assim, que os dados obtidos com a técnica de PFGE corroboram a alta variabilidade genética obtida a partir de técnicas de tipagem genética de isolados da fermentação de álcool combustível (Souza-Liberal, 2007) e da indústria vinícola (Martorell *et al.*, 2006; Mittrakul *et al.*, 1999). A situação atual, da grande diversidade quanto ao número e tamanho dos cromossomos, poderia ser explicada por um evento de hibridização em que dois genomas semelhantes, mas diferentes, recentemente se fundiram ou o progenitor diplóide de

todas as linhagens analisadas perdeu um ciclo sexual regular, e o genoma começou a acumular mutações (Hellborg e Piskur, 2009; Oelofse *et al.*, 2009).

O sequenciamento e a análise do genoma são ferramentas importantes para obter informações sobre o metabolismo e o desenvolvimento de organismos. Recentemente os bioinformatas e os geneticistas genômicos vem debatendo qual a real importância de se sequenciar por completo um organismo levando em consideração os custos e benefícios. Além do que, pode-se trabalhar com análise comparativa com outros organismos relacionados filogeneticamente que possuem mais informações disponíveis (Mondego *et al.*, 2008). O genoma da *D. bruxellensis* foi sequenciado por Woolfit *et al.*, 2007 e fornecido ao nosso grupo de pesquisa para acesso através do site do LGE/UNICAMP. Esse banco de dados é um exemplo de sequenciamento com cobertura parcial, pois apenas 40% do genoma foi sequenciado. Mas apesar da baixa cobertura, foi possível realizar as buscas e análises estruturais de diversos genes, principalmente aqueles relacionados à famílias gênicas, sempre usando a *S. cerevisiae* como organismo modelo devido a sua grande quantidade de informações disponíveis. A partir de buscas de genes envolvidos no metabolismo central de *D. bruxellensis* foram identificados *contigs* que codificariam enzimas da família da piruvato descarboxilase e da álcool desidrogenase.

O piruvato, produto da glicólise, está localizado em uma ramificação importante do metabolismo dos carboidratos. Durante a fermentação alcoólica, o piruvato é descarboxilado a acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase (Pdc) o qual é subsequentelemente reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase (Adh) (Pronk et al, 1996; Flikweert *et al.*, 1997). Os genes que codificam as diferentes isoformas da piruvato descarboxilase são *PDC1*, *PDC5* e *PDC6*. *PDC1* e *PDC5* formam os primeiros genes a serem descritos para essa atividade, sendo *PDC1* responsável por cerca de 85% da atividade piruvato descaboxilase em qualquer condição de cultivo (Hohmann *et al.*, 1990). O gene *PDC6* foi caracterizado por Hohmann (1991) como sendo um gene estruturalmente relacionado a *PDC1* e *PDC5*, porém sua expressão é verificada especificamente sob condições de cultivo em meio com limitação de enxofre (Boer *et al.*, 2003). Dois outros genes foram descritos como parte da família PDC. O gene *THI3* foi originalmente descrito como envolvido no metabolismo de tiamina e posteriormente foi sugerido que este gene codificaria uma descarboxilase que atuaria na descarboxilação de 2-oxoglutarato e outros 2-oxo-ácidos que resultariam do catabolismo de aminoácidos ramificados (Dickinson et al 2003). Já o gene *ARO10* foi descrito como codificador de uma descarboxilase que atuaria sobre os 2-oxo-ácidos provenientes do catabolismo dos aminoácidos ramificados (Dickinson *et al.*, 2003). Vuralhan *et al* (2003) identificaram o gene *ARO10* como responsável pela expressão da enzima fenilpiruvato

descarboxilase em *S. cerevisiae*. Esse gene está, portanto, envolvido no catabolismo dos aminoácidos aromáticos em *S. cerevisiae*. Vários organismos podem produzir o composto feniletanol. A fenilalanina é transformada em ácido fenilpiruvico, o qual é descarboxilado pela fenilpiruvato descarboxilase a fenilacetaldeído e finalmente reduzido a feniletanol. Esse produto final é responsável pelo aroma de rosas e é muito importante na indústria de cosméticos e de vinhos.

Nossos resultados de busca genômica permitiram a identificação de dois genes de *D. bruxellensis* com alta similaridade com os genes ARO10 dos diversos ascomicetos, formando um grupo bem definido quando comparado as outras PDCs. Estes genes foram classificados de *dbARO10-1* *dbARO10-2*. Encontramos no banco de dados da *Dekkera*, dois genes ARO10 que apresentaram matriz de similaridade de 0,264 quando comparado em nucleotídeos e de 0,60 quando comparado os aminoácidos, mostrando que apesar de ambos terem se mostrado como representantes do gene ARO10, são genes distintos. Provavelmente ocorreu um evento de duplicação gênica seguida de evolução diferencial que permitiu a distinção dos dois tipos de ARO 10 encontrado na *D. bruxellensis*. Dentro do grupo ascomicetos, a maior similaridade dos dois genes *dbARO10* foi verificada com seus ortólogos em *K. lactis* para o gene *dbARO10-1* e em *Debaryomyces hansenii* para o gene *dbARO-2*. A topologia encontrada dentro do grupo dos ascomicetos mostra-se semelhante aos dados da literatura onde Woolfit *et al.* (2007) descreve a topologia 2 que se mostra semelhante

Woolfit *et al* (2007) utilizaram os dados do seqüenciamento genômico de *D. bruxellensis* e construíram 396 árvores se baseando na seqüência protéica de genes ortólogos de *D. bruxellensis* e nove outras espécies de fungos (*S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *K. lactis*, *A. gossypii*, *C. albicans*, *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *S. pombe*, *A. nidulans*). Os autores calcularam o consenso network para quantificar o grau de incongruência entre as árvores. Do consenso, eles inferiram três topologias, presentes em mais de 25% das tentativas, que poderia explicar os dados do seqüenciamento. A árvore filogenética dita como topologia 2 do trabalho de Woolfit *et al* (2007), a qual apareceu em 27% das árvores, apresentou o melhor resultado para o teste Shimodaira-Hasegawa, mostrando, entretanto, uma diferença não significativa entre a primeira topologia.

O resultado encontrado no presente trabalho para o gene *dbARO10* se assemelhou com a árvore topologia 2 mostrado por Woolfit *et al* (2007), indicando que o gene *dbARO10* de *D. bruxellensis* seguiu o mesmo padrão evolutivo do genoma. A comparação entre as duas árvores mostrou que os representantes dos ascomicetos apresentaram a topologia para o gene ARO10, semelhante ao apresentado pela análise protéica de outros genes.

A análise de similaridade apresentada entre os genes *dbARO10* com outros genes *ARO10* de diferentes ascomicetos é um forte indício de que os dois genes *ARO10* identificados no presente trabalho devem realmente codificar para a enzima fenil-piruvato descarboxilase em *D. bruxellensis*. A síntese de 4-etilfenol em suco de uva e vinho encontra-se em baixas concentrações quando em baixa temperatura e a maior produção desses compostos ocorre em temperaturas acima de 21°C. Quanto maior a temperatura mais as linhagens conseguem manter o crescimento mesmo com aumento da porcentagem de etanol (Jensen *et al.*, 2009). A levedura *D. bruxellensis* apresenta produção de compostos fenólicos maiores do que *Pichia guilliermondii*, outra contaminante presente nos vinhos e que também produz compostos que alteram o sabor. Além disso, *D. bruxellensis* apresenta altos níveis de produção de 4-etilguaiaicol, 4-vinilfenol e 4-etilfenol (Lopes *et al.*, 2009). A produção do 4-etilfenol ocorre com a transformação do ácido p-coumarico em 4-vinilfenol pela atividade da Hidroxicinamato descarboxilase, e o 4-vinilfenol é transformado em 4-etilfenol pela atividade da vinilfenol redutase (Benito *et al.*, 2009a). As atividades das enzimas Hidroxicinamato Descarboxilase e Vinylfenol Redutase são inibidas presença de etanol em concentrações de 15% e 20% (Benito *et al.*, 2009b). Além disso, as atividades vinilfenol redutase e p-coumarato descarboxilase não estão presentes em todas as linhagens de *D. bruxellensis* (Godoy *et al.*, 2009; Oelofse *et al.*, 2009).

Os dois genes *ARO10* identificados no genoma de *D. bruxellensis* foram induzidos quando as células foram cultivadas na presença de fenilalanina no meio de cultura, embora tendo apresentado padrões diferentes de expressão em diferentes linhagens. O gene *dbARO10-1* apresentou indução de cerca de 29 vezes quando as células da linhagem GDB 248 foram cultivadas em fenilalanina quando comparadas às células cultivadas em amônia no mesmo momento da fase de crescimento. Seu homólogo em *S. cerevisiae* apresentou indução de 30 vezes no meio com fenilalanina (Vurulhan *et al.* 2003). Portanto, os valores de indução de expressão dos homólogos *scARO10* e *dbARO10-1* são muito próximos, o que mostra que o padrão de indução desse gene pelo substrato de sua enzima foi mantido durante a evolução dessas duas espécies. Outro ponto relevante foi o aumento ainda maior verificado quando comparamos a expressão desse gene no início do cultivo em meio com fenilalanina com as células em fase exponencial nesse mesmo meio, com valores de 96 e 23 vezes para as linhagens GDB 248 e CBS 74, respectivamente. Já o gene *dbARO10-2* apresentou valores menores de indução quando as células foram submetidas a crescimento na presença de fenilalanina. Considerando o mesmo momento da fase exponencial de crescimento, a presença de fenilalanina induziu seis vezes este gene em comparação a amônia (Tabela 13). Já quando comparamos o nível de expressão desse gene no início e no meio da fase exponencial de

crescimento em fenilalanina, o gene *dbARO10-2* apresentou 36 e 9 vezes de indução em GDB 248 e CBS 74, respectivamente. Isso mostra que esses dois genes desempenham funções biológicas complementares. Para mostrar isso, procedemos com o experimento de indução gênica a partir da incubação na presença de fenilalanina de forma rápida, sem crescimento celular. Os resultados da tabela 13 mostram que o gene *dbARO10-2* parece responder imediatamente a presença de fenilalanina no meio de cultura, enquanto que o gene *dbARO10-1* parece estar relacionado com a resposta de longo prazo de exposição à fenilalanina. A atividade fenilpiruvato descarboxilase total foi determinada no extrato celular de *D. bruxellensis* cultivada em fenilalanina, tendo a levedura *S. cerevisiae* servido como referência. Os resultados de atividade enzimática específica obtidos foram em torno de 42 nmol.min⁻¹. (mg proteína)⁻¹ para *D. bruxellensis* e 69 nmol.min⁻¹. (mg proteína)⁻¹ para *S. cerevisiae*, contra 67 nmol.min⁻¹.(mg proteína)⁻¹ anteriormente determinado para *S. cerevisiae* (Vuralhan et al, 2005). A grande diferença foi a detecção de atividade enzimática para as duas leveduras cultivadas em meio contendo amônia (Tabela 14), o que não foi verificado para *S. cerevisiae* cultivada em amônia (Vuralhan et al. 2005). No entanto, deve-se levar em consideração que o nível de indução do gene *ARO10* de *D. bruxellensis* foi três vezes maior do que em células de *S. cerevisiae*. Mas quando este gene foi super-expresso em células de *S. cerevisiae* por meio de expressão em plasmídeo episomal sob controle de um promotor constitutivo forte foi possível se determinar a atividade fenil-piruvato descarboxilase na faixa de 62 nmol.min⁻¹.(mg proteína)⁻¹ mesmo em cultivos em amônia (Vuralhan et al 2005). O que leva a supor que a quantidade de transcritos nesta levedura quando cultivada em amônia é maior do que aquela em *S. cerevisiae* cultivada em amônia.

A presença de leucina também foi capaz de induzir a expressão dos dois genes *dbARO10*, a indução foi de 5,24 vezes para o gene *dbARO10-1* e de 20,32 vezes para o gene *dbARO10-2*. De maneira semelhante, apenas o gene *ARO10* foi induzido dentre aqueles da família PDC quando as células de *S. cerevisiae* foram cultivadas em leucina como fonte de nitrogênio. Este aminoácido também induziu em cerca de 30 vezes a expressão do gene *ARO10* em *S. cerevisiae* (Vuralhan et al 2005). A expressão também foi aumentada para os genes *dbADH*, entretanto com valores menores do que os encontrados para os genes *dbARO10*. A produção de alcoóis superiores com qualidades sensoriais importantes para as bebidas fermentadas tais como o álcool isoamílico (proveniente do catabolismo da leucina) e o feniletílico (proveniente do metabolismo da fenilalanina) depende da atividade descarboxilase sobre os α -cetoácidos produzidos pelo catabolismo de seus respectivos aminoácidos. Em *S. cerevisiae* essa atividade parece ser exercida majoritariamente pela proteína Pdc1p, embora para que essa proteína não seja essencial para a produção desses

alcoóis (Ter Schure et al 1998). Isso se deve ao fato de que a proteína Aro10p também é capaz de descarboxilar os 2-oxo-ácidos proveniente do catabolismo dos aminoácidos ramificados (Vuralhan et al 2005). Os dados apresentados neste trabalho mostram que os dois genes *ARO10* estudados devem ser os responsáveis pela produção desses compostos pelas células de *D. bruxellensis*, constituindo-se nos primeiros genes da chamada via de Erhlich encontrados nesta levedura. Isto abre um interessante caminho para trabalhos de engenharia metabólica para a produção de aromas industriais por esta levedura.

Duas seqüências distintas foram coletadas do banco de nucleotídeos de *D. bruxellensis* como similaridade aos genes da família *ADH* de *S. cerevisiae*., o *dbADH3* e o *dbADH7* que apresentaram matriz de similaridade de 0,223 para os nucleotídeos e de 0,037 para os aminoácidos. O gene *dbADH3* apresentou maior similaridade com o gene *ADH3* de *S. cerevisiae* enquanto o gene *dbADH7* apresentou maior similaridade com o gene *ADH7* de *S. cerevisiae*. Quando comparamos as árvores filogenéticas da *D. bruxellensis* com as espécies Ascomicetes com as árvores do trabalho de Woolfit et al (2007), verificamos que o gene *dbADH7* assemelha-se mais à topologia 3 enquanto o gene *dbADH3* apresenta maior semelhança com a tipologia 1 descrita no artigo, exceto pela posição da *ADH3* da *D. hanseni*, que diferiu do posicionamento normalmente encontrado na análise de outras proteínas.

Os diversos meios utilizados nesse trabalho, utilizando diferentes fontes de carbono tentam indicar qual caminho a *D. bruxellensis* percorre para ser tão eficiente no meio industrial. Diversos trabalhos têm buscado resposta nas fontes de carbono, etanol, ácido acético e produção de glicerol (Vigentini et al., 2008; Blomqvist et al., 2010).

Nos resultados de expressão gênica, na maioria das vezes encontramos valores diferentes para as diferentes linhagens analisadas. Por serem linhagens de *D. bruxellensis* isoladas de processos fermentativos diferentes é esperado diferenças na expressão gênica. Esta diferença ocorre devido ao metabolismo diferenciado que é necessário em cada processo fermentativo específico e que podem estar relacionadas ao momento ou a intensidade da expressão. O gene *dbADH7* está mais relacionado à síntese de álcool fusel e tolerância ao aldeído, como a linhagem GDB248 foi isolada da produção de álcool, apresenta maior resposta ao seu meio utilizando esse gene. Entretanto a linhagem CBS 74 foi isolada da fermentação de cerveja, tendo assim maior expressão do gene *dbADH3* que está relacionado à fermentação/respiração do metabolismo fermentativo. A análise de expressão dos dois genes permitiu verificar as diferenças nos dois momentos metabólicos estudados entre as duas linhagens de *D. bruxellensis*.

6. Conclusões

As linhagens industriais, isoladas do processo fermentativo de álcool combustível, analisadas através da técnica de PFGE, apresentam variação na quantidade e no tamanho dos cromossomos. Apresenta variação de 4 a 6 cromossomos, enquanto o tamanho dos cromossomos apresenta-se entre 5,7Mb e 0,67 Mb.

Duas sequências apresentam alta similaridade com os genes que codificam a enzima fenilpiruvato descarboxilase dos ascomicetos denominados de *dbARO10-1* e *dbARO10-2*. O maior grau de similaridade desses genes com seus ortólogos em *D. hansenii* e *K. lactis* reflete exatamente a filogenia de *D. bruxellensis* dentro dos ascomicetos.

O padrão de expressão gênica e a atividade enzimática indicam que esses dois genes exercem atividades biológicas complementares. O gene *ARO10-2* é responsável pelo metabolismo dos aminoácidos aromáticos quando as células são expostas ao ambiente contendo altas concentrações de fenilalanina, como a inoculação dessas células no mosto de uva. E o gene *ARO10-1* atua no catabolismo dos aminoácidos durante o crescimento celular.

A importância dessa via metabólica de catabolismo dos aminoácidos aromáticos para a espécie *D. bruxellensis* está bem evidenciada pela evolução e manutenção de dois parálogos que codificam a mesma enzima. Isto deve ser o reflexo da adaptação dessa espécie a ambientes ricos nesses aminoácidos, como a casca de uvas e de outras frutas.

Duas outras sequências apresentam similaridade com os genes *ADH* dos ascomicetos, mas representando duas subfamílias distintas. Uma das sequências apresenta similaridade com o gene *ADH3* que codifica a enzima álcool desidrogenase III, relacionada à produção de etanol e a outra apresenta similaridade com o gene *ADH7* que codifica a enzima álcool desidrogenase envolvida com a síntese dos alcoóis do fusel.

A filogenia desses dois genes *ADH* é semelhante aquela descrita para o grupo dos ascomicetos, com algumas pequenas divergências, que deve ser reflexo de um padrão evolutivo um pouco distinto daquele observado para os genes *ARO10*.

Os dados apresentados neste trabalho abrem um interessante caminho para trabalhos de engenharia metabólica para a produção de aromas industriais por esta levedura.

7. Referências Bibliográficas

Abbott DA, Hynes SH and Ingledew WM (2005) Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. *Applied Microbiology Biotechnology* 66: 641-647.

Araújo PRL, Basílio ACM, Simões DA, Morais Jr MA and Morais JOF (2005) Informações sobre algumas leveduras contaminantes da fermentação alcoólica industrial isoladas no Nordeste do Brasil. Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, Recife, Brasil (Trabalho completo).

Basílio ACM, Pinheiro W, Brasileiro B, Morais Jr MA and Simões DA (2005) Utilização do padrão de amplificação com o marcador (GTG)₅ para identificação rotineira de leveduras contaminantes da fermentação alcoólica industrial. Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, Recife, Brasil (Trabalho completo).

Basílio ACM, Araújo PRL, Morais JOF, Silva Filho EA, Morais Jr MA and Simões DA (2008) Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Current Microbiology* 56:322-326.

Barata A, Pagliara D, Piccininno T, Tarantino F, Ciardulli W, Malfeito-Ferreira M and Loureiro V (2008) The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol productions by *Dekkera bruxellensis* in wine. *FEMS- Federation of European Microbiological Societies* 8: 1097-1102.

Barnett JA, Payne W and Yarrow D (1990) *Yeast: characteristics and identification*. 2. Ed. Cambridge: University Press

Basso LC, Amorim HV, Oliveira AJ and Lopes ML (2008) Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research* 8(7):1155-63.

Benito S, Palomero F, Morata A, Uthurry C and Suárez-Lepe JA (2009a) Minimization of ethylphenol precursor in red wines via the formation of pyranoanthocyanins by selected yeast. *International Journal of Food Microbiology* 132: 145-152.

Liberal, A. T. S. Análise da constituição genética de linhagens industriais ...

Benito S, Palomero F, Morata A, Calderón F and Suárez-Lepe JA (2009b) Factors affection the Hydroxycinnamate Decarboxylase/Vinylphenol Reductase activity of *Dekkera/Brettanomyces*: application for *Dekkera/Brettanomyces* control in red wine making. *Journal of Food Science M: Food Microbiology and Safety* 74(1): M15-M22.

Blomqvist J, Eberhard T, Schnürer, J and Passoth V (2010) Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. *Applied Microbiology Biotechnology*

Boer VM, Winde JH, Pronk JT and Piper MDW (2003) The genome wide transcription responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus or sulfur. *Journal of Biological Chemistry* 278: 3265-3274.

Cai J, Roberts IN, Collins MD (1996) Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 542-9.

Chatonnet P, Dubourdieu D and Boidron JN (1995) The influence of *Brettanomyces/Dekkera* spp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am Journal Enol Vitic* 46: 463–468

Ciani M, Maccarelli F and Faticenti F (2003) Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 419–422.

Cocolin L, Rantsiou K, Iacumin L, Zironi R, and Comi G (2003) Molecular Detection and Identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in Spoiled Wines. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1347- 1355.

Costa A, Barata A, Malfeito-Ferreira M and Loureiro V (2008) Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiology* 25: 422-427.

Liberal, A. T. S. Análise da constituição genética de linhagens industriais ...

Dickinson JR, Harrison SJ, Dickinson JA and Hewlins MJ (2000) An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 275: 10937-10942.

Elsztein C, Menezes JAS and Morais Junior M A (2008) Polyhexamethyl biguanide can eliminate contaminant yeasts from fuel-ethanol fermentation process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35:967 - 973.

Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F and Querol A (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 329-337.

Flikweert M, Van Dijken J and Pronk J (1997) Metabolic responses of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* to glucose excess. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3399-3404.

Freer SN (2002) Acetic acid production by Dekkera/Brettanomyces yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 271-275

Godoy L, Garrido D, Martínez C, Saavedra J, Combina M and Ganga MA (2009) Study of the coumarate decarboxylase and vinylphenol reductase activities of *Dekkera bruxellensis* (anamorph *Brettanomyces bruxellensis*) isolates. *Letters in Applied Microbiology* 48: 452-457.

Gojkovic, Z.; Knecht, W.; Zameitat, E.; Warneboldt, J.; Coutelis, J.B.; Pynyaha, Y.; Neuveglise, C.; Møller, K.; Löffler, M. and Piskur, J. (2004) Horizontal gene transfer promoted the evolution of the yeast ability to propagate under anaerobic conditions. *Mol. Genet. Genomics* 271(4): 387-393.

Granchi L, Bosco M, Messini A and Vincenzini M (1999) Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Journal of Applied Microbiology* 87: 949-956.

Greig D and Travisano M (2003) Evolution. haploid superiority. *Science* 299(5606):524-525.

Liberal, A. T. S. Análise da constituição genética de linhagens industriais ...

Hellborg L and Piskur J (2009) Complex Nature of the Genome in a wine Spoilage Yeast, *Dekkera bruxellensis*. Eukaryotic Cell 8(11): 1739-1749.

Hierro N, Gonzalez A, Mas A, Guillamon JM (2004) New PCR-based methods for yeast identification. Journal of Applied Microbiology. 97(4): 792-801.

Hohmann S (1991) Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology 173: 7963-7969.

Hohmann S and Cederberg H (1990) Autoregulation may control the expression of yeast pyruvate decarboxylase structural genes PDC1 and PDC5. European Journal of Biochemistry 188: 615-621.

Jensen SL, Umiker NL, Arneborg N and Edwards CG (2009) Identification and characterization of *Dekkera bruxellensis*, *Candida pararugosa*, and *Pichia guilliermondii* isolated from commercial red wines. Food Microbiology 26: 915-921

Kellermann E, Seeboth PG and Hollenberg CP (1986) Analysis of the primary structure and promoter function of a pyruvate decarboxylase gene (PDC1) from *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Research 14(22): 8963-8977

Lieckfeldt E, Meyer W and Böner T (1993) Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. Journal of Basic Microbiology 33: 413-426.

Lopes CA, Jofré V and Sangorrín MP (2009) Spoilage yeast in Patagonian winemaking: molecular and physiological features of *Pichia guilliermondii* indigenous isolates. Revista Argentina de Microbiología 41: 177-184.

Loureiro V and Malfeito-Ferreira M (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. International Journal Food Microbiology 86: 23-50.

Lucena BTL, Silva-Filho, EA, Coimbra MRM, Morais JOF, Simões, DA and Morais Jr MA (2007) Chromosome instability in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* batch cultivated under laboratory conditions. Genetics and Molecular Research 6(4): 1072-1084

Liberal, A. T. S. Análise da constituição genética de linhagens industriais ...

Lustrato G, Vigentini I, De Leonardis A, Alfano G, Tirelli A, Foschino R and Ranalli G (2010) Inactivation of wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* using low electric current treatment (LEC). *Journal of Applied Microbiology*

Martorell P, Barata A, Malfeito-Ferreira M, Fernandez-Espinar MT, Loureiro V and Querol A (2006) Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology* 106: 79-84

Miot-Sertier C and Lonvaud-Funel A (2007) Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. *Journal of Applied Microbiology* 102: 555-562.

Mitrakul CM, Henick-Kling T and Egli CM (1999) Discrimination of *Brettanomyces* / *Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA finger-printing methods. *Food Microbiology* 16: 3-14.

Molina FI, Shen P, Jong SC (1993) Validation of the species concept in the genus *Dekkera* by restriction analysis of genes coding for rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 32-5.

Mondego JMC, Carazzolle MF, Costa GGL, Formighieri EF, Parizzi LP, Rincones J, Cotomacci C, Carraro DM, Cunha AF, Carrer H, Vidal RO, Estrela RC, García O, Thomazella DPT, Oliveira BV, Pires ABL, Rio MCS, Araújo MRR, Moraes MH, Castro LAB, Gramacho KP, Gonçalves MS, Moura Neto JP, Goes Neto A, Barbosa LV, Guiltinan MJ, Bailey BA, Meinhardt LW, Cascardo JCM and Pereira GAG (2008) A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BioMedCentral Genomics* 9:548-572.

Oelofse A, Lonvaud-Funel A and du Toit M (2009) Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiology* 26: 377-385

Passoth V, Blomqvist J and Schnürer J (2007) *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* Forma Stable Ethanol-Producing Consortium in a Commercial Alcohol Production Process. *Applied and Environmental Microbiology* 73(13): 4354–4356

Phister TG and Mills DA (2003) Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Applied and Environmental Microbiology* 69:7430- 7434.

Piskur, J. and Langkjær, R.B. (2004) Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics. *Molecular Microbiol.* 53(2): 381-389.

Pramateftaki PV, Lanaridis P and Typas MA (2000) Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *Journal of Applied Microbiology* 89(2): 236-48.

Pronk JT, Yde Steensma H and Van Dijken JP (1996) Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12(16):1607-33.

Puértolas E, López N, Condón S, Raso J and Álvarez I (2009) Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *International Journal of Food microbiology* 130: 49-55.

Renouf V, Falcou M, Miot-Sertier C, Perello MC, De Revel G, Lonvaud-Funel A. (2006) Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *Journal of Applied Microbiology* 100: 1208-1219

Rodrigues N, Goncalves G, Pereira-da-Silva S, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V (2001) Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera*/*Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology* 90(4): 588-99.

Santos SKB, Resende AM, Silva-Filho EA, Morais Jr MA and Simões DA (2005) Dinâmica da população de leveduras em destilarias de álcool do Nordeste do Brasil. *Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, Recife, Brasil (Trabalho completo)*.

Silva-Filho E A, Santos SKB, Resende AM, Morais JOF, Morais Jr MA and Simões DA (2005a) Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek* 88: 13-23.

Liberal, A. T. S. Análise da constituição genética de linhagens industriais ...

Silva-Filho EA, Melo HF, Antunes DF, Santos SKB, Resende AM, Simões DA and Morais Jr MA (2005b) Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32: 481-486.

Souza-Liberal AT, Silva-Filho EA, Morais JOF, Simões DA and Morais Jr MA (2005) Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. *Letters in Applied Microbiology* 40: 19–23.

Souza-Liberal AT, Basílio ACM, Monte Resende A, Brasileiro BTV, Silva-Filho EA, Morais JOF, Simões DA and Morais Jr MA (2007) Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 102: 538-547.

Ter Schure EG, Sillje HHW, Vermeulen EE, Kalhorn JW, Verkleij AJ, Boonstra J, Verrips CT (1998) Repression of nitrogen catabolic genes by ammonia and glutamine in nitrogen-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 144: 1451–1462.

Van Maris AJA, Geertman JMA, Vermeulen A, Groothuizen MK, Winkler AA, Piper DW, Dijken JP and Pronk JT (2004) Directed evolution of piruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*, yielding a C2-independent glucose-tolerant and pyruvate-hyperproducing yeast. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 159-166.

Vidal EE (2008) Análise transcricional numa linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* dos principais genes associados ao metabolismo de substâncias organolópicas dirigido na produção de cachaça artesanal. Dissertação (Genética) - Universidade Federal de Pernambuco.

Vigentini I, Romano A, Compagno C, Merico A, Molinari F, Tirelli A, Foschino R and Volonterio G (2008) Physiological and oenological traits of different *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions. *FEMS- Federation of European Microbiological Societies* 8:1087-1096.

Viser W, Scheffers WA, Batenburg-van der Vegte WH, van Dijken JP (1990) Oxygen requirements of yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 3785–3792

Vuralhan Z, Morias MA, Tai SL, Piper MDW and Pronk JT (2003) Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4534-4541.

Vuralhan Z, Luttik MAH, Tai SL, Boer VM, Morais MA, Schipper D, Almering JH, Kotter P, Dickinson, JR, Daran JM and Pronk JT (2005) Physiological characterization of the ARO10-dependent, broad-substrate –specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 71(6): 3276-3284.

Wheals EA, Basso LC, Alves DMG and Amorim HV (1999) Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnology* 17: 482-487.

Woolfit M, Rozpedowska E, Piskur J and Wolfe KH (2007) Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Eukaryotic Cell* 6(4): 721-733.

Wong S, Butler G and Wolfe KH (2002) Gene order evolution and paleopolyploidy in hemiascomycete yeasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9272-9277.

8. Anexos

8.1. Sequências de nucleotídeos e aminoácidos dos genes e proteínas ADH e ARO10 utilizadas neste trabalho

Sequência de nucleotídeos do gene *DbADH3*

ATGTTTCAGAAGCTTAACATCATTCAAAACACAGGGACCAGTTCTGTCCCGGA
 TGGCCCTAAGATTATACTCGACTATCCCAAAAACACAGAAAGCAATGGTGTT
 TTATAAAAATGGTGGACCTCTAAAGTATGAAGATATTCCAGTTCCTAAACCA
 AAGCCAAGCGAAATATTGATAAATGTCAGATATTCCGGTGTCTGTCACACAG
 ATTTGCATGCATGGAAGGGCGATTGGCCACTTCCAACAAAGCTACCCTTAGTT
 GGAGGTCATGAGGGTGCAGGAGTTGTTGTTGCGTGTGGTTCGGAAGTCAAAA
 ACTTTAAGGTTGGGGACTACGCCGGAATCAAGTGGTTGAATGGATCCTGTATG
 GGCTGTGAATACTGTATGCAGGGTGCAGAGCCAAATTGCCCAAAGGCAGATT
 TATCTGGTTACACTCATGATGGATCATTTTCAGCAGTACGCAACCGCTGATGCA
 GTTCAAGCTGCACATATTCCTCAGGGAACAGACTTAGCTGCGGCTGCCCCAAT
 TTTATGTGCTGGAGTCACAGTTTACAAAGCTTTGAAAACAGCTGATCTCAGAC
 CTGGTCAATGGGTGGCAATTTCTGGTGCTGGAGGTGGTTTAGGTTCCCTAGCA
 GTACAGTATGCCAAGGCTATGGGACTCAGAGTTGTTGGTATTGATGGTGGCTC
 TGAAAAGAAAGAACTTGCGACCAAGCTTGGAGCCGAAGAATTTATTGACTTC
 ACACAGGTTTCTGATGTCTGTCAGGAGATGCAAAATGTTACAAATGGAGGTC
 CACATGGTGTCATCAATGTCTCTGTTTCTCCTAGAGCAATGTCACAGTCTGTG
 GAGTACGTCCGCACTTTGGGTAAAGTTGTTCTTGTTGGCCTTCCAGCAGATGC
 TGTTGTCCAAACAAAGGTGTTTGACCATGTCATAAAATCCATTCAGATCAGAG
 GCTCCTATGTTGGAAATAGGGAGGACACTGCTGAGGCCTTGGATTTCTTTGAA
 AGAGGCCTCGTTCATTCTCCTATTAAGGTTGTGGGGCTCTCCGATCTTCCAAAG
 GTTTTCTCTTTGATGGAAAAGGGTAAGATTGCCGGTAGATATGTTTTGGACACA
 TCCAAATGA

Sequência de aminoácidos da proteína *DbAdh3*

MHCAKGDWGRAYTPLAVGHEIIGHVTHIGTEVDKSKFKIGDRVIGPECECCGK
 CYRCKHELESNCVSQALTYAYVYPDGTKTQGGYADNIRVNDKFVFQIPEGLETI
 HAAPLLCGGITGLRPLLDYGVKKGTVGVSGIGGIGHMTILFAKALGAEVTAISR
 NEKKKELSKKLGAADHYIATSDESQLKEGKDSLELIVNTASSFSQTHLESVMSLLK
 PNGRLIFITAPELKEKVEITPFFFLNNYSIGGSAGGSIRQIEYMLKLAAEKHIKPW
 VETIDISEKNVKEAWRRMEEGDVKFRFVLTGYDKYFGKKS

Seqüência de nucleotídeos do gene *DbADH7*

ATGCACTGTGCAAAGGGTGACTGGGGAAGAGCATACACTCCCTTGGCTGTTG
 GTCACGAGATCATCGGTCATGTGACCCATATTGGAACAGAGGTGGACAAGTC
 GAAGTTCAAGATTGGTGACAGAGTTGGAATCGGCCCGGAATGCGAATGCTGT
 GGAAAGTGCTACAGGTGCAAGCATGAGCTTGAGAGCAATTGCGTTTCGCAAG
 CCCTAACATACGCATATGTTTATCCTGATGGCACCAAACTCAGGGAGGATAT
 GCAGATAACATTCGTGTTAATGATAAATTCGTTTTCCAGATTCCAGAGGGATT
 GGAGACAATTCATGCTGCCCCTCTGCTTTGCGGTGGAATCACTGGATTAAGAC
 CACTTCTTGATTATGGCGTTAAGAAGGGTACCAAGGTTGGAGTTAGTGGAATA
 GGAGGAATTGGTCATATGACGATTCTTTTTGCGAAAGCATTGGGTGCAGAGGT
 GACGGCAATATCCAGAAATGAGAAGAAGAAGGAATTGTCGAAAAAACTAGG
 TGCAGATCATTACATTGCAACTTCTGACGAGTCCCAACTTAAAGAAGGAAAA
 GATAGTCTTGAATTGATCGTTAATACTGCATCTTCGTTCTCACAGACTCATCTT
 GAGAGTGTGATGTCATTGTTGAAACCAATGGAAGATTGATATTCATCACAGC
 TCCAGAACTAAAGGAGAAGGTCGAGATTACACCCTTCTTCTTTTTGCTCAACAA
 TTACTIONCATTTGGTGGATCGGCAGGCGGCTCTATTAGGCAAATCGAGTACATGC
 TCAAGTTGGCAGCAGAAAAGCACATCAAGCCATGGGTGAAACCATTGATATC
 AGTGAAGAAGAACGTGAAGGAAGCTTGGAGAAGAATGGAGGAGGGAGATGTG
 AAGTTTAGATTTGTTTTGACCGGGTATGACAAGTACTTTGGGAAGAAGAGTTAG

Seqüência de aminoácidos da proteína *DbAdh7*

MFRSLTSFKTQGPVLSRMALRLYSTIPKTQKAMVFYKNGGPLKYEDIPVPKPKPS
 EILINVRYSGVCHTDLHAWKGDWPLPTKLPLVGGHEGAGVVVACGSEVKNFKV
 GDYAGIKWLNGSCMGCEYCMQGAEPNCPKADLSGYTHDGSFQQYATADAVQA
 AHIPQGTDLAAAAPILCAGVTVYKALKTADLRPGQWVAISGAGGGLGSLAVQYA
 KAMGLRVVGIDGGSEKKELATKLGAEEFIDFTQVSDVVKEMQNVNNGGPHGVIN
 VSVSPRAMSQSVEYVRTLGKVVVLVGLPADAVVQTKVFDHVIKSIQIRGSYVGNRE
 DTAEALDFFERGLVHSPIKVVGSLDLPKVFSLMEKGKIAGRYVLDTSK

Seqüência de nucleotídeos do gene *DbARO10-1*

ATGGCACCTATAGCTTTGTCATCTTCCAAGGAGGAAAACAGAATCTCCTTATC
 CGAGTATGTCTTTAGAAAGGATTGCTTCTCTTGGGGTGCACTCCGTTTTTGGTGT
 TCCCGGAGATTTCAATTTGGAGTTTTTGGATTTCAATTTACAATGTTCCAGAGCT
 CAAATGGTACGGAACATGCAACGAATTAATGGTGCCTATGCTGCAGATGGC
 TATTCAAAAAGAAGTGGGAAATTAGGTGTTCTTGTTACCACGATGGGAGTGG
 GAGAATTGAGTGCCATGAATGGAATCAGTGGTAGCTATGCAGAATACGTTCC

AATCCTTAGCATAGTTGGTACAACACCAACAACCGCAAAAATGCAAGGTCTT
 CCAAGTCATCACCTCATTACACAAATGAATCCATTGGAAAAAATGATCATT
 ATGTTTATCAAAAGATGGCCGCAAGCATTTCTTGTAATGTTACCAGTATTGAT
 GACCCATTTGAAGCACCAGATATGATTGATAACTTGATACGTGATATATTGAA
 AGAAAAGAAGCCTGGCTATCTTTATATACCATGCAATCTGGCAAGTGTTCTG
 TTTCTGATTTGAACTTGAGAACAAACATCTGGAAAATGCTTCTTCGAGAAAGAA
 TTGTGCTGTGACCAGGTCATGGTTCAAAATCTTGCCGCAAAGATTTTGGATCT
 GATTTATATGTTCGCATAAACCATTTGTTTTATCTGATTGTCTAGTGGATAGATTG
 CGCATTTACATGAAATTCAGGAGTTTGTGGACAAAGCAAAATTACCAAATT
 CATGTACACAAATGGGAAAGTCCACATTGAATGAGCAGAGTTCATATTATAT
 TGGAGATTATAGCGGAGATGAACTTCAATAAAGACAATGAACTATGTCTCT
 TCTTGTGATTTGATGATTCACATGGGAAATTTTGACAATGAAACGAACTCTGG
 GCATTTTAGTATTCATAAGGAATTCGATGACAAGAAATCAGGAAAGACTCTTA
 TTATTCTTAATCACAAGTATATTA AAAATTGGATCAGAGCTTTTCTATGGGTATT
 CAATTTTAGACGTGCTTCCAGAAATGCTTTCGAATGTTGGATACTTCAAAACTT
 CCTCAAGTACCAGCACCATGTATCCAGAATATAATTCCAGCACATAAATCAT
 CGACACCGATTTCAGAAACTGATGTATTGAAAGGGATTCAAACCTCTTTTAAA
 ACCAAATGACACGTTGATCGTTGATACCGGTTCAATTTTGTACGGAATTTTCAG
 ACATTAGGTTACCAAAAGGATGTAAGGTTCTCACACAGCCATTTTATCTTTCT
 ATTGGAATGGGGTTACCTTGCTCATTGAGCAAGTGTAGCCAATAGAGAGC
 TCGGAAATAAGGGAAGAATCATTCTTGTTGAAGGAGACGGAGCTGCTCAAAT
 GACTATTCAAGAGTTTTCAAACCTTCAACAGAGAAGGGTTGAACCCACTTATTC
 TTCTATTGAACAACGAAGGTTACACAGTTGAGAGAGCAATTAAGGGACCGAC
 AAGAGGTTATAATGATATTAGACCAAATTGGAAGTGGACACAGCTTTTTGAC
 ACTTTCGGCATGAATGATTATAAATGCCAAAGAGTTGATACACCAGATGAAC
 TATCAAAAACCTTAAAAGAATTTGGCAGTGACAACCTCATGCTCTAGAATGATC
 GAAATCGGTCTAGCTAAGTTGGATGTTCCATGGAGAATCAACGGT
 ATGGTTTCTCACAAGAAATAG

Seqüência de aminoácidos da proteína DbAro10-1

MAPIALSSSKEENRISLSEYVFRRIASLGVHSVFGVPGDFNLEFLDFIYNVPELKW
 YGTCNELNGAYAADGYSKRSGKLGVLVTTMGV GELSAMNGISGSYAEYVPILS
 IVGTTPTTAKMQGLPSHHLITQMNPLEKNDHYVYQKMAASISCNVTSIDDPFEA
 PDMIDNLIRDILKEKKPGYLYIPCNLASVPVSDNLNLRRTTSGKCFEKEKELCCDQVM
 VQNLA AKILDLIYMSHKPFVLS DCLVDRLRISHEIQEFVDKAKLPNSCTQMGKST

LNEQSSYYIGDYSGDETSIKTMNYVSSCDLMIHMGNFNETNSGHFSIHKEFDDK
 KSGKTLIILNHKYIKIGSELFYGYSDVLPPEMLRMLDTSKLPQVPAPCIQNIIPAH
 KSSTPISETDVLKGIQTLLKPNDTLIVDTGSILYGISDIRLPKGCKVLTQPFYLSIGM
 GLPCSFSGASVANRELGNKGRIILVEGDGAAQMTIQEFSNFNREGLNPLILLNNEG
 YTVERAIKGPTRGYNDIRPNWKWTQLFDTFGMNDYKCQRVDTPDELSKTLKEFG
 SDNSCSRMIEIGLAKLDVPWRINGMVSHKK

Seqüência de nucleotídeos do gene *DbARO10-2*

ATGGCACCTATTAGATTAGAGCAAAACACAATTGATGAGTCGGATGAGTTA
 AGACTGAGACAGAATGGATTGATTACCATTCTCTGAATACATATTTAGGAGG
 CTTTCCCAGTTGGGTATAGGATCCGTGTTTGGAGTCCCGGGAGACTTCAATT
 TATCGCTATTAGATCACATATACTCTGTGAGAGAGTTGAACTGGATTGGATG
 CTGTAATGAGTTAAATGCAGCATATGCAGCAGATGCATATGCAAAGGCTTC
 AAAGCAAATGTCGGCACTTTTGACCACGTTTGGTGTGGAGAGCTTAGTGCA
 ATAAACGGAGTTGCAGGCGCTTACTCTGAGTTTGTTCGTTAGTTCACATAG
 TGGGGACAAGCTCTTTAAAGGAGAAGGAAACTCGGAGCCAAAGAATTTTC
 ATCATTGTTGGTGGCAAATAGGAAGATTTATGAAAAACCAAACCATTACATAT
 ATCAGAATATTGCAACAACTTCTCTGTTTCATGTGCTTCTGTTAATACAGA
 TGTCGAATCTTCGTGTGACGAGATCGATAAACTTTGGAAGCCATTTGGGA
 ACAATCTCGTCCCGGTTATATATTTGTTCCATGTGATTTAACAGAGATGCCG
 GTTAATGCCAGTCGGCTAGTGGAGAAGCCACTCCAGCTTAAATATACATCA
 AAATGCACCAGCGATGAAGTTGAACAGATCAGCAACCAGATATTGGATTC
 GATATACCAGTCGCAGAATGTTTCTCTACTAGGAGATGTGTTTCATATCTAAA
 TTCCGGATGAACGAGGTATTTGGTAAGTTTGTGAACTTATTGAAGGAAAAA
 GTGAACTTCTTCGACACACCGATGTCGAAAGGTATAATAGATGAGAGTTTG
 AGTCGGTTTGTGGAACATATTATGGTAGGGCTGGCGATGATCGGATTGCT
 GACGCAATTGAGGCTTCTGATCTCATACTTAGGATTGGAACTTCGATAAT
 GAGATAAATTCGGGTTTTTTCTCTGCACGCTTGCCTAAAGATAAGACCATTG
 ATGTCAACCCGCAGTACATTCGGATTGGAAATGGCCCGTTGTTACAAATGT
 AACCATGATGGATGTTCTTCCGAGATTGGTTTCACTTGTGGACACAAGTAAG
 GTTAATAATGCGGTCCGATACACAAACATTCCAAAACAAACAGTCAGGAGT
 ATCAGAAACAGGATGCGGGCACCATTGACAGAATGCGATGTGGGATCCTCA
 TTGGAACTTTACTCCAACCAAATGACATATTGGTTGTTGAACTTGCTCAT
 TCATGGTTGCTGCCACACGTTTACAGATGAATGGAGCCAGTATACTAAATC
 AATGTTTCTGGGGATCTATCGGATACGCTTTGCCAGCAACATTAGGTGCTGC

CTTGGCATTAAAGAGACTTTCATCTCCCCGAAAAGTGATCACGATTGAGGG
 TGATGGATCAGCACAAATGAGCATTCAGGAACTCGGAACCATGCTCAGATA
 CAGCATAAGCGCCATATTGTTTATTCTAAATAACTCCGGATATACGATTGAA
 AGAGCCATCAAGGGTCCATACAGATCGTACAATGATATATGTCCAAACATCC
 AATGGACGCAACTACTAAAGACGTTTGGAGATGTGTGCGAAAGAAGATCGC
 GTTCTCAAATTATTGATAATGCTAAAAGTCTGAATTCGTTAGCCAGGTCTGA
 ATTCTTTCATAACGACAAACGCTTGCAATTGGTGGAGCTTCATCTTCCA
 AAGTTTGATGTTCCAAATAGTGACAGCTTCGTTTGA

Seqüência de aminoácidos da proteína DbAro10-2

MAPIRLEQNTIDESDELRLRQNGLITISEYIFRRLSQLGIGSVFGVPGDFNLSLLD
 HIYSVRELNWIGCCNELNAAYAADAYAKASKQMSALLTTFGVGELSAINGVA
 GAYSEFVPLVHIVGTSSLKEKENSEPKNFHHLVANRKIYEKPNHYIYQNIATNF
 SVSCASVNTDVESSCDEIDKTLEAIWEQSRPGYIFVPCDLTEMPVNASRLVEKP
 LQLKYTSKCTSDEVEQISNQILDSIYQSQNVSLGDFISKFRMNEVFGKFVNL
 LKEKVNFFDTPMSKGIIDESLSRFVGTYYGRAGDDRIADAIEASDLILRIGNFDN
 EINSGFFSARLPKDKTIDVNPQYIRIGNGPLFTNVTMMDVLPRLVSLVDTSKVN
 NAVRYTNIPKQTVRSIRNRMRAPLTECDVGSSLETLLQPNDILVVETCSFMVA
 ATRLQMNGASILNQCFWGSIGYALPATLGAALALRDFHLPKGKVTIEGDGSAQ
 MSIQELGTMLRYSISAILFILNNSGYTIERAIKGPYRSYNDICPNIQWTQLLKTFG
 DVCERRSRSQIIDNAKSLNSLARSEFFHNDKRLQLVELHLPKFDVPNSDSFV

8.2. Resumo – 54º Congresso Brasileiro de Genética



Identificação e análise estrutural do gene codificante da enzima álcool desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* em *Dekkera bruxellensis*

Liberal, ATS¹; Pita, WB¹; Torres, RRNB¹; Carazzolle, MF²; Pereira, GAG²; Moraes Jr, MA¹

¹Lab. de Genética de Microorganismos, Departamento de Genética, UFPE

²Lab. de Genômica e Expressão, Departamento de Genética, UNICAMP
theresaliberal@yahoo.com.br

Palavras-chave: Fermentação alcoólica, *Dekkera bruxellensis*, ADH

A levedura *Dekkera bruxellensis* tem sido recentemente detectada como principal contaminante em diversos processos fermentativos; inclusive na fermentação das destilarias de álcool combustível, causando problemas de rendimento industrial. Apesar destas constatações industriais, pouco se sabe sobre a fisiologia e genética desta levedura. Portanto, são necessários estudos sobre a constituição genética desta espécie para que, em conjunto com os dados fisiológicos, possamos entender os mecanismos de adaptação desta levedura aos processos fermentativos industriais. Recentemente, nosso grupo de pesquisas iniciou a análise do genoma desta levedura, com o objetivo de identificar genes responsáveis pelas vias do metabolismo central e genes relacionados com a adaptação dessa levedura ao processo industrial. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi o de identificar os genes *ADH* que codificam enzimas da família álcool desidrogenase, enzima que cataliza a conversão de acetaldeído a etanol na última etapa da via do metabolismo fermentativo. Sequências de nucleotídeos do genoma parcial de *D. bruxellensis* obtidas da Universidade de Lund (Suécia) foram utilizadas para a construção de um banco de dados genéticos (www.lge.ibi.unicamp.br/dekkera). Estas sequências foram coletadas a partir da similaridade com os genes de *S. cerevisiae* usando a ferramenta de alinhamento local, sendo considerado apenas os contigs com *e*-value menor do que -20. Os contigs 3093 e 357 foram escolhidos por representar dois dos três conjuntos presentes na *S. cerevisiae*. Essas sequências foram submetidas à análise de BLAST dentro dos bancos de dados do NCBI, de *S. cerevisiae* (SGD) e de leveduras ascomicetos (*Genolevures*). Dentro de cada grupo buscou-se o gene *ADH* de *S. cerevisiae* mais próxima de cada contig de *D. bruxellensis*. O contig 3093 apresentou maior semelhança com o gene *ADH3*, enquanto o contig 357 ao gene *ADH7*. Para confirmar a distinção entre os dois grupos de genes *ADH* representados pelos contigs de *D. bruxellensis* foi construída uma árvore filogenética com a presença de representantes do grupo dos Ascomicetos relacionados a cada contig. No grupo do contig 357/*ADH7* foram agrupadas as leveduras *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida glabrata* e *S. cerevisiae* que formaram uma topologia semelhante à topologia descrita no artigo de Woolfit et al (2007), enquanto que no grupo do contig 3093/*ADH3* foram agrupadas as leveduras *Candida albicans*, *Yarrowia lipolytica*, *Asbya gossypii*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida glabrata* e *S. cerevisiae* que formaram uma topologia não descrita no artigo. A topologia encontrada mostrou a correlação desses genes nos diferentes ascomicetos, mas as diferenças tipológicas nas árvores filogenéticas desses dois genes provavelmente indicam uma diferença quanto à origem desses genes na *D. bruxellensis*.

Apoio Financeiro: CNPq, Capes.

8.3. Resumo – 54º Congresso Brasileiro de Genética



Expressão dos genes *YNR1*, *YNI1*, *YNT1* e *YNA1*, associados ao metabolismo do nitrato na levedura *Dekkera bruxellensis* através de qPCR

Pita, WB; Liberal, ATS; Alecrim, FM; Morais JR., MA

Laboratório de Genética de Microorganismos, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco
will.barros@gmail.com

Palavras-chave: Metabolismo do Nitrato, *Dekkera bruxellensis*, qPCR

A levedura *Dekkera bruxellensis* está sendo continuamente identificada como principal contaminante dos sistemas de fermentação alcoólica no Brasil e em diversos outros países. Contagens elevadas desta levedura nestes processos podem resultar em diminuição da produção de etanol e conseqüente prejuízo econômico. Recentemente, esta levedura teve seu genoma parcialmente seqüenciado e foram identificadas seqüências correspondentes a genes do metabolismo do nitrato. A presença de tais genes indica que *D. bruxellensis* possa usufruir deste composto como fonte de nitrogênio, ao contrário de *Saccharomyces cerevisiae*, durante o processo fermentativo. Como estas duas leveduras competem no ambiente industrial, a presença de nitrato poderia ser um fator diferencial na adaptação de *D. bruxellensis*. Entretanto, isto depende da regulação da expressão dos genes desta via metabólica durante o processo fermentativo. A qPCR (PCR quantitativa) é uma técnica bastante sensível, capaz de determinar a variação dos níveis de expressão gênica em diversas condições. Os genes do metabolismo do nitrato em *Dekkera bruxellensis* foram avaliados quanto à sua expressão em dois diferentes meios: um contendo amônia (YNB) e o outro contendo amônia e nitrato como fontes de nitrogênio. A fonte de carbono em ambos foi a glicose. As células foram cultivadas nestes meios e coletadas quando as culturas atingiram o valor de DO_{660nm} igual a 1 (um), representando células no meio da fase exponencial de crescimento. Nesta fase, o RNA foi extraído e utilizado para a síntese de cDNA, o qual foi analisado pela técnica de qPCR. Os *primers* foram desenhados a partir das seqüências dos genes *YNR1* (Nitrato Redutase), *YNI1* (Nitrito Redutase), *YNT1* (Permease) e *YNA1* (Fator de transcrição), de *D. bruxellensis*, disponíveis no banco de dados do NCBI. O método utilizado para análise da expressão gênica foi o $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e o gene escolhido como controle endógeno foi o *EFB1*, codificador da cadeia beta do fator de alongamento de tradução. Os experimentos foram realizados com repetição. Todos os quatro genes estudados apresentaram indução de sua expressão na presença de nitrato. Em comparação com o meio sem esta fonte, a expressão do gene *YNR1* foi 5,17 vezes maior. O gene *YNI1* apresentou uma indução de 3,91 vezes. O gene *YNT1* mostrou uma expressão aumentada em 2,15 vezes e o *YNA1* demonstrou apenas uma leve indução de 1,33 vezes. Este estudo comprova que os genes da assimilação do nitrato em *Dekkera bruxellensis* são induzidos em presença deste composto. Entretanto, maiores estudos acerca da expressão destes genes em outros meios e no caldo de cana ainda são necessários para correlacionar esta indução com a adaptação de *D. bruxellensis* no meio de fermentação alcoólica.

Apoio Financeiro: CNPq.

8.4. Resumo – 54º Congresso Brasileiro de Genética



Identificação e análise estrutural do gene da levedura *Dekkera Bruxellensis* ortólogo a família dos genes que codificam a enzima piruvato descarboxilase em *Saccharomyces cerevisiae*

Torres, RRNB¹; Liberal, AT¹; Balbino, VQ¹; Carazzolle, MF; Pereira, GAG, Morais Jr, MA¹

¹Departamento de Genética, UFPE
²Departamento de Genética, Unicamp
rochanebaptista@hotmail.com

Palavras-chave: Fermentação Alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae*, *Dekkera bruxellensis*, Piruvato Descarboxilase, YDR380w/ARO10

Na produção industrial de álcool, o fermento torna-se totalmente vulnerável à contaminação microbiana que acompanha a matéria-prima, acarretando reduções significativas na eficiência industrial. A espécie *Dekkera bruxellensis* tem sido associada a contaminações nas indústrias de vinho, cerveja e na produção de álcool combustível causando queda no rendimento fermentativo e na qualidade do produto. Recentemente, iniciamos a análise do genoma desta levedura com vistas a identificar genes importantes do metabolismo central e genes relacionados com a adaptação células ao ambiente industrial. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo identificar genes que codifiquem a enzima piruvato descarboxilase, o ponto chave do metabolismo fermentativo da glucose pela descarboxilação de piruvato a acetaldeído. Os genes PDC1, PDC5, PDC6, ARO 10 e THI3, de *S. cerevisiae* e seus ortólogos em diferentes ascomicetos selecionados dos bancos de dados Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>), GENOLEVRES (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>) e NCBI foram utilizados para a busca de genes homólogos no banco de dados *Dekkera bruxellensis* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/dekkera/>) usando as ferramentas do BLAST, com limite de e-value -20 ou menor. Os resultados revelaram que os dois contigs, 3332 e 2774, de *D. bruxellensis*, encontrados a partir do alinhamento tBLASTn de seqüências de aminoácidos do gene PDC1 de *S. cerevisiae*, foram muito semelhantes ao gene YDR380w/ARO10. Para corroborar os resultados, uma árvore filogenética foi construída a partir das seqüências obtidas mostrando que o contig 3332 tem relação mais próxima com ARO10 de *D. hansenni* e o contig 2774 é mais próximo de *A. gossypii*. Todas as seqüências do gene ARO10 das espécies *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* e Ascomicetes ficaram agrupadas em um grupo distinto. A árvore filogenética obtida neste trabalho se assemelhou com a árvore de topologia 2 quando comparado com o trabalho de Woolfit *et al* (2007), indicando que o gene ARO10 de *D. bruxellensis* seguiu com o mesmo padrão evolutivo do genoma. Análises comparativas entre os contigs e as seqüências de aminoácidos dos genes PDC1, PDC5, PDC6, THI3, ARO10 de *S. cerevisiae* mostraram um percentual de aminoácidos conservados de apenas 11%, entretanto 31,7% das variações apresentaram semelhanças químicas entre os aminoácidos divergentes.

Apoio Financeiro: CNPq.

8.5. Resumo – 26ª Reunião de Genética de Microrganismos

26^a Reunião de Genética de Microrganismos
15 e 16 setembro 2008
Bahia Othon Palace Hotel
Salvador - Bahia

Identificação e análise estrutural do gene codificante da enzima álcool desidrogenase de *saccharomyces cerevisiae* em *dekkera bruxellensis*.

Liberal, ATS¹; Pita, WB¹; Torres, RRNB¹; Carazzolle, MF²; Pereira, GAG²; Moraes Jr, MA¹

¹ Lab. de Genética de Microorganismos, Departamento de Genética, UFPE.

² Lab. de Genômica e Expressão, Departamento de Genética, UNICAMP.

theresaliberal@yahoo.com.br

Palavras-chave: Fermentação alcoólica, *Dekkera bruxellensis*, ADH.

A levedura *Dekkera bruxellensis* tem sido recentemente detectada como principal contaminante em diversos processos fermentativos; inclusive na fermentação das destilarias de álcool combustível, causando problemas de rendimento industrial. Apesar destas constatações industriais, pouco se sabe sobre a fisiologia e genética desta levedura. Portanto, são necessários estudos sobre a constituição genética desta espécie para que, em conjunto com os dados fisiológicos, possamos entender os mecanismos de adaptação desta levedura aos processos fermentativos industriais. Recentemente, nosso grupo de pesquisas iniciou a análise do genoma desta levedura, com o objetivo de identificar genes responsáveis pelas vias do metabolismo central e genes relacionados com a adaptação dessa levedura ao processo industrial. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi o de identificar os genes *ADH* que codificam enzimas da família álcool desidrogenase, enzima que cataliza a conversão de acetaldeído a etanol na última etapa da via do metabolismo fermentativo. Sequências de nucleotídeos do genoma parcial de *D. bruxellensis* obtidas da Universidade de Lund (Suécia) foram utilizadas para a construção de um banco de dados genéticos (www.lge.ibi.unicamp.br/dekkera). Estas sequências foram coletadas a partir da similaridade com os genes de *S. cerevisiae* usando a ferramenta de alinhamento local, sendo considerado apenas os contigs com *e*-value menor do que -20. Os contigs 3093 e 357 foram escolhidos por representar dois dos três conjuntos presentes na *S. cerevisiae*. Essas sequências foram submetidas à análise de BLAST dentro dos bancos de dados do NCBI, de *S. cerevisiae* (SGD) e de leveduras ascomicetos (*Genolevures*). Dentro de cada grupo buscou-se o gene *ADH* de *S. cerevisiae* mais próxima de cada contig de *D. bruxellensis*. O contig 3093 apresentou maior semelhança com o gene *ADH3*, enquanto o contig 357 ao gene *ADH7*. Para confirmar a distinção entre os dois grupos de genes *ADH* representados pelos contigs de *D. bruxellensis* foi construída uma árvore filogenética com a presença de representantes do grupo dos Ascomicetos relacionados a cada contig. No grupo do contig 357/*ADH7* foram agrupadas as leveduras *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida glabrata* e *S. cerevisiae* que formaram uma topologia semelhante à topologia descrita no artigo de Woolfit et al (2007), enquanto que no grupo do contig 3093/*ADH3* foram agrupadas as leveduras *Candida albicans*, *Yarrowia lipolytica*, *Ashbya gossypii*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida glabrata* e *S. cerevisiae* que formaram uma topologia não descrita no artigo. A topologia encontrada mostrou a correlação desses genes nos diferentes ascomicetos, mas as diferenças tipológicas nas árvores filogenéticas desses dois genes provavelmente indicam uma diferença quanto à origem desses genes na *D. bruxellensis*.

Apoio Financeiro: CNPq, Capes

8.6. Resumo – 26ª Reunião de Genética de Microrganismos



Identificação e análise estrutural do gene da levedura *Dekkera Bruxellensis* ortólogo a família dos genes que codificam a enzima piruvato descarboxilase em *Saccharomyces cerevisiae*.

Torres, RRNB¹; Liberal, AT¹; Balbino, VQ¹; Carazzolle, MF; Pereira, GAG, Moraes Jr, MA¹

¹ Departamento de Genética, UFPE; 2- Departamento de Genética, Unicamp
rochanebaptista@hotmail.com

Palavras-chave: Fermentação Alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae*, *Dekkera bruxellensis*, Piruvato Descarboxilase, YDR380w/ARO10

Na produção industrial de álcool, o fermento torna-se totalmente vulnerável à contaminação microbiana que acompanha a matéria-prima, acarretando reduções significativas na eficiência industrial. A espécie *Dekkera bruxellensis* tem sido associada a contaminações nas indústrias de vinho, cerveja e na produção de álcool combustível causando queda no rendimento fermentativo e na qualidade do produto. Recentemente, iniciamos a análise do genoma desta levedura com vistas a identificar genes importantes do metabolismo central e genes relacionados com a adaptação células ao ambiente industrial. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo identificar genes que codifiquem a enzima piruvato descarboxilase, o ponto chave do metabolismo fermentativo da glucose pela descarboxilação de piruvato a acetaldeído. Os gene PDC1, PDC5, PDC6, ARO 10 e THI3, de *S. cerevisiae* e seus ortólogos em diferentes ascomicetos selecionadas dos bancos de dados Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>), GENOLEVRES (<http://cbl.labri.fr/Genolevures/>) e NCBI foram utilizados para a busca de genes homólogos no banco de dados *Dekkera bruxellensis* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/dekkera/>) usando as ferramentas do BLAST, com limite de e-value -20 ou menor. Os resultados revelaram que os dois contigs, 3332 e 2774, de *D. bruxellensis*, encontrados a partir do alinhamento tBLASTn de seqüências de aminoácidos do gene PDC1 de *S. cerevisiae*, foram muito semelhantes ao gene YDR380w/ARO10. Para corroborar os resultados, uma árvore filogenética foi construída a partir das seqüências obtidas mostrando que o contig 3332 tem relação mais próxima com ARO10 de *D. hansenni* e o contig 2774 é mais próximo de *A. gossypii*. Todas as seqüências do gene ARO10 das espécies *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* e Ascomicetes ficaram agrupadas em um grupo distinto. A árvore filogenética obtida neste trabalho se assemelhou com a árvore de topologia 2 quando comparado com o trabalho de Woolfit *et al* (2007), indicando que o gene ARO10 de *D. bruxellensis* seguiu com o mesmo padrão evolutivo do genoma. Análises comparativas entre os contigs e as seqüências de aminoácidos dos genes PDC1, PDC5, PDC6, THI3, ARO10 de *S. cerevisiae* mostraram um percentual de aminoácidos conservados de apenas 11%, entretanto 31,7% das variações apresentaram semelhanças químicas entre os aminoácidos divergentes.

Apoio Financeiro: CNPq

8.7. Resumo – 55º Congresso Brasileiro de Genética



Análise da expressão gênica através de PCR em tempo real da enzima álcool desidrogenase em linhagens industriais da levedura *Dekkera bruxellensis*

Liberal, ATS; Morais Jr, MA

Laboratório de Genética de Microorganismos, Departamento de Genética, UFPE
theresaliberal@yahoo.com.br

Palavras-chave: Fermentação alcoólica, *Dekkera bruxellensis*, ADH

A levedura *Dekkera bruxellensis* é a principal contaminante de diversos processos fermentativos, inclusive na fermentação das destilarias de álcool combustível. Nosso grupo de pesquisa vem identificando e analisando genes responsáveis pelas vias do metabolismo central e genes relacionados com a adaptação dessa levedura ao processo industrial a partir do banco de dados do seqüenciamento desta levedura. Identificamos recentemente dois genes na *D. bruxellensis*, ADH3Db e ADH7Db ambos relacionados ao gene *ADH* que codifica enzimas da família álcool desidrogenase, enzima que catalisa a conversão de acetaldeído a etanol na última etapa da via do metabolismo fermentativo. O objetivo deste trabalho foi o de analisar a expressão gênica dos dois genes *ADH* identificados na *D. bruxellensis*, através da PCR em tempo real. Foram utilizadas duas linhagens da levedura *D. bruxellensis*: a 248, isolada da fermentação alcoólica, e a CBS 74, isolada da fermentação de cerveja. Estas leveduras foram inoculadas em meio Yeast Nitrogen Base (YNB) com glicose 2% a 37°C. Foram coletadas alíquotas do cultivo em 0,1DO e 1DO de concentração celular, que foram submetidas à extração de RNA (Kit Total RNA isolation – NucleoSpin RNA II). A partir do RNA extraído foi sintetizado o cDNA (kit ImProm-II™ Reverse Transcription System Promega II). Os ensaios de PCR em Tempo Real foram realizados na plataforma *ABI Prism 7300* Applied Biosystems (kit SYBR Green PCR Master Mix). A expressão dos genes *ADH*Db sempre foi maior ao ser atingida 1DO de crescimento celular, sendo que, a linhagem 248 apresentou maior expressão do gene *ADH7Db* enquanto a linhagem CBS 74 apresentou maior expressão do gene *ADH3Db*. O gene *ADH7Db* apresentou quatro vezes mais expressão na linhagem 248 que na CBS 74; enquanto que o gene *ADH3Db* apresentou quinze vezes mais expressão na linhagem CBS 74 quando comparada à linhagem 248. Por serem linhagens de *D. bruxellensis* isoladas de processos fermentativos diferentes é esperado diferenças na expressão gênica. Esta diferença ocorre devido ao metabolismo diferenciado que é necessário em cada processo fermentativo específico e que podem estar relacionadas ao momento ou a intensidade da expressão. O gene *ADH7* está mais relacionado à síntese de álcool e tolerância ao aldeído, como a linhagem 248 foi isolada da produção de álcool, apresenta maior resposta ao seu meio utilizando esse gene. Entretanto a linhagem CBS 74 foi isolada da fermentação de cerveja, tendo assim maior expressão do gene *ADH3* que está relacionado à fermentação/respiração do metabolismo fermentativo. A análise de expressão dos dois genes permitiu verificar as diferenças nos dois momentos metabólicos estudados entre as duas linhagens de *D. bruxellensis*.

Apoio Financeiro: CNPq, Capes

9. Memorial da aluna

Anna Theresa de Souza Liberal [theresaliberal@yahoo.com.br], nascida em 20 de julho de 1981, Bacharel em Ciências Biológicas, título obtido em 03 de março de 2004, pela Universidade Federal de Pernambuco, com o trabalho de conclusão de curso intitulado: Utilização da região ITS do locus de rDNA para a discriminação de leveduras em culturas mistas. Este trabalho foi publicado na Letters in Applied Microbiology em 2005 com o título Contaminat yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. Mestre em Genética, pela UFPE, com colação de grau em 26 de junho de 2006 com a dissertação intitulada: Identificação molecular da levedura *Dekkera bruxellensis* como principal contaminante do processo de fermentação alcoólica industrial. Dissertação esta, publicada no Journal of Applied Microbiology em 2007 com o título Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminat yeast in continuous fuel ethanol fermentation. Em resumos de Congresso publicou como primeira autora os seguintes trabalhos: Análise da expressão gênica através de PCR em tempo real da enzima álcool desidrogenase em linhagens industriais da levedura *Dekkera bruxellensis* (55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009), identificação e análise estrutural do gene codificante da enzima álcool desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* em *Dekkera bruxellensis* (54º Congresso Brasileiro de Genética e 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008), Identificação de leveduras dentro do complexo *Saccharomyces* “sensu strictu” por PCR-fingerprinting (53º Congresso Brasileiro de Genética, 2007), Identificação molecular da levedura *Dekkera bruxellensis* como principal contaminante do processo de fermentação alcoólica industrial (52º Congresso Brasileiro de Genética, 2006), Utilização do primer específico DB90F/DB394R para a detecção de *Dekkera bruxellensis* em amostras de mosto de destilarias de álcool combustível (XVII Encontro de Genética do Nordeste, 2006), Utilização da região ITS do locus de rDNA para a detecção de leveduras contaminantes em amostras de mosto de destilarias de álcool combustível (51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005), Utilização da região ITS do locus de rDNA para a discriminação de leveduras em culturas mistas (50º Congresso Brasileiro de Genética, 2004), Utilização Determinação do limite de detecção de DNA de leveduras contaminantes em culturas mistas por amplificação da região ITS do locus de rDNA (49º Congresso Brasileiro de Genética, 2003). Como doutoranda realizou parte dos experimentos no Laboratório de Genômica e Expressão do Departamento de Genética da UNICAMP, em 2007, implementando o banco de dados de seqüenciamento parcial da levedura *D. bruxellensis* intitulado Projeto *Dekkera bruxellensis*. Como parte da formação técnica, participou do treinamento de PCR em Tempo Real oferecido pela Applied Biosystems em 2008, São Paulo.