

**Hélio Fernandes de Melo**

# **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial**

Recife/PE  
2006

**Hélio Fernandes de Melo**

# **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biologia de  
Fungos do Departamento de  
Micologia da Universidade Federal  
de Pernambuco como parte dos  
requisitos para a obtenção do título  
de doutor.

Orientador:  
Prof. Marcos Antonio de Morais Jr.

Recife/PE  
2006

**Melo, Hélio Fernandes de**

**Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial /**  
**Hélio Fernandes de Melo. \_ Recife: O Autor, 2006.**

**110 folhas: il.**

**Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB**

**1.Saccharomyces cerevisiae 2.Resposta ao estresse 3.Estresse ácido**  
**4.Fermentação alcoólica industrial I. Título**

**663.12  
579.563**

**CDU (2.ed.)  
CDD (22.ed.)**

**CCB – 2006 - 064  
UFPE**

Ata da Reunião de Prova Pública de Defesa de Tese do aluno HÉLIO FERNANDES DE MELO, da área de concentração em MICOLOGIA APLICADA, do Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos – nível DOUTORADO, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Às nove horas do dia dez de março de dois mil e seis, na sala de aulas práticas do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, realizou-se a prova pública de defesa de Tese apresentada pelo Doutorando HÉLIO FERNANDES DE MELO, sob a orientação do Prof. MARCOS ANTONIO DE MORAIS Jr., intitulada: **"RESPOSTA AO ESTRESSE EM LINHAGENS INDUSTRIALIS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE"**. Presentes professores, alunos e convidados. A Banca Examinadora aprovada pela Diretora de Pós-Graduação da PROPESEQ, Dra. Maria de Fátima Militão de Albuquerque em vinte e dois de fevereiro de dois mil e seis, foi composta pelos seguintes membros titulares: Prof. MARCOS ANTONIO DE MORAIS Jr., do Departamento de Genética da Universidade Federal do Pernambuco, Pós-Doutor em Microbiologia Industrial, pela Universidade de DELFT, Holanda, membro interno ao curso. Profa. LUSINETE ACIOLE DE QUEIROZ, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Doutora em Microbiologia e Imunologia, pela Universidade de São Paulo-USP, membro interno ao curso. A referida Professora passou de membro suplente para membro titular em substituição a Profa. NEIVA TINTI DE OLIVEIRA que não pode comparecer à sessão. Prof. DIOGO ARDAILLON SIMOES, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, Doutor em Microbiologia pela Universidade de Toulouse, INSAT, França, membro externo ao curso. Profa. BEATRIZ VAHAN KILIKIAN, do Departamento de Engenharia Química, da Universidade de São Paulo, Livre-docência em Engenharia Química pela Universidade de São Paulo, USP, membro externo ao curso. Prof. ANTONIO FERREIRA PEREIRA, do Departamento de Microbiologia Geral da Universidade do Rio de Janeiro, Pós-Doutor em Bioquímica pelo Institut Curie e Ecole Normale Supérieure, Paris e INSAT, França, membro externo ao curso. Como Membros Suplentes a Profa. NEIVA TINTI DE OLIVEIRA, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Doutora em Genética e Biologia Molecular, pela UNICAMP, membro interno ao curso e a Profa. JANETE MAGALI DE ARAÚJO, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Pós-Doutora em Genética Molecular e Microrganismos, pela USP, membro externo ao curso. A Profa. LEONOR COSTA MAIA iniciou a sessão apresentando os membros da Banca Examinadora, agradecendo a colaboração e a presença de todos, explicando que os trabalhos seriam dirigidos pelo Prof. MARCOS ANTONIO DE MORAIS FILHO, por ser orientador do aluno. Em seguida o Doutorando apresentou a sua Tese. A seguir, os membros da Banca Examinadora discutiram alguns pontos e fizeram sugestões sobre o trabalho. Procedida a avaliação, a Banca Examinadora atribuiu ao Doutorando **HÉLIO FERNANDES DE MELO** a menção:

APROVADO \*

Nada mais havendo a tratar, eu, Giovanna de Lima Guterres, lavrei, datei e assinei a presente ATA, que também assinam os

demais presentes. Recife, 09 de março de 2006. *Giovanna Guterres*

\* Em tempo, a homologação fica condicionada a entrega da tese corrigida de acordo com as recomendações dos examinadores, no prazo de sessenta dias. O parecer final da banca será emitido após análise da versão corrigida. *Giovanna Guterres Leonor Costa Maia*

*Hélio Fernandes de Melo*

*Beatriz Vahan Kilikian*  
*Neiva*

## Dedicatória

Aos meus avós e padrinhos (*in memoriam*).

Aos meus pais, José Fernandes e Maria da Luz.

A minha esposa Ésia Guerra

A classe trabalhadora brasileira

“A ciência pela ciência” é a última cilada que nos arma a moral – e é precisamente essa que envolve a todos inextricavelmente em sua rede.

Nietzsche

## AGRADECIMENTOS

Departamento de Micologia da UFPE

Coordenação do Programa de Pós-graduação de Biologia de Fungos da UFPE

Departamento de Genética da UFPE

Aos Profs. Marcos Morais Jr, Diogo Simões, Leonor Costa Maia, Norma Buarque, José Ferreira, Neide, Tânia Tassinari, Maurício, Rosilda e Antônio.

Aos funcionários do Dep. de Genética da UFPE

Aos meus colegas de laboratório

CAPES, CNPq, Japungu LTDA

## SUMÁRIO

Resumo .....	1
Abstract .....	2
1. Introdução .....	3
1.1 Características gerais das leveduras .....	3
1.2 Fermentação alcoólica industrial .....	4
1.2.1 Produção de glicerol durante a fermentação.....	7
1.3 Resposta ao estresse .....	11
1.3.1 Resposta ao estresse ácido .....	15
1.4 Resposta metabólica ao estresse .....	18
1.5 Expressão gênica em células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	20
2. Objetivos. ....	23
3. Materiais e métodos gerais .....	24
4. Referências bibliográficas.....	28
5. Artigos Científicos .....	36
a. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain with potential for genetic manipulation .....	37
b. Resposta fisiológica e expressão gênica de <i>S. cerevisiae</i> em baixo pH ajustado com ácido sulfúrico .....	43
c. Isolamento e caracterização fisiológica e genética de um mutante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> resistente a ácido inorgânico forte .....	64
4. Conclusões .....	87
5. Anexos .....	89

## RESUMO

O processo de fermentação alcoólica industrial é caracterizado por um intenso reciclo das células de leveduras, com constante exposição a baixos valores de pH tanto no mosto quanto no pré-fermentador. Isto induz um constante estresse ácido que leva a diminuição da viabilidade celular no processo. Este trabalho tem como objetivo o estudo dos fatores celulares responsáveis pela resistência ao estresse ácido a partir da identificação dos genes de *Saccharomyces cerevisiae* que respondem a este estresse e do isolamento e caracterização de mutantes resistentes a ácidos inorgânicos. Inicialmente a linhagem JP1 foi isolada do mosto de fermentação pela sua capacidade de dominância no processo fermentativo de diferentes destilarias. Esta linhagem apresentou a mesma resposta fenotípica às diferentes formas de estresse industrial (ácido e etanólico) que a linhagem comercial PE-2. As células da linhagem JP-1 foram posteriormente testadas para o crescimento celular e desempenho fermentativo em meio mineral acidificado e os resultados mostraram o baixo pH do meio não influenciou estes dois parâmetros. Adicionalmente, cerca de 1% dos genes da linhagem de laboratório JT-95 de *S. cerevisiae* apresentou modificação no padrão de expressão, sendo 35 genes reprimidos e 28 genes induzidos pelo ácido sulfúrico. Entretanto, não se observou uma relação direta entre o conjunto de genes modificados e os mecanismos conhecidos de resposta a estresse, o que sugere uma resposta multifatorial ao choque ácido em leveduras. E finalmente um mutante resistente a ácidos inorgânicos (sulfúrico e clorídrico) foi isolado a partir de células da linhagem JP-1. Este mutante foi capaz de crescer em meio ajustado para pH 2, mas semelhante ao parental não apresentou resistência a ácidos orgânicos (sorbato). Isto mostra que a resistência a estes dois tipos de ácidos deve ser mediada por mecanismos celulares diferentes. A análise de expressão gênica neste mutante deverá gerar informações mais precisas sobre este mecanismo de resistência.

**Palavras chave:** *Saccharomyces cerevisiae*, Resposta ao estresse, Estresse ácido, fermentação alcoólica industrial.

## ABSTRACT

Fuel-ethanol fermentation process includes a continuous recycle of the yeast biomass, with yeast cell being exposed to low pH values. It promotes acidic stress that leads to a decrease in cell viability. The aim of his work is to study the factors responsible for cell resistance to acid stress from the identification of yeast gene that are responsive to this stress and the isolation and characterization of inorganic acid-resistant mutant. In the first step, the *S. cerevisiae* strain JP1 was isolated from fermented must by its dominance in the process of several distilleries. This strain showed the same phonotypical response to industrial stresses (acidic and ethanolic) as the commercial strain PE-2. JP-1 cells were tested for growth and fermentation capacity in acidic mineral medium and the results showed that low pH did not affected those parameters. Further, by 1% of the yeast genes of the laboratory strain JT-95 presented modification in he expression pattern, 35 genes repressed and 28 genes induced by sulphuric acid. However, we did not observed any direct correlation between gene expression and the known mechanism of stress resistance. It suggests that acid stress might induce a multifactorial mechanism in yeast. At last, an inorganic acid-resistant mutant was isolated from JP-1 cells. This mutant grown in acidified medium at pH 2, but similar to its parental did not grow in the presence of organic acid (sorbate). This result shows that cell resistance for those two types of acids might be mediated by different mechanisms. Global gene expression analysis of this mutant can bring interesting clues on the celullar mechanism of resistance to inorganic acids.

**Keyword:** *Saccharomyces cerevisiae*, Stress response, Acid stress, Industrial fermentation

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Características gerais das leveduras

As leveduras são microrganismos eucariontes que vivem como sapróbios ou parasitas. Normalmente são encontradas na natureza associadas a vegetais, insetos, húmus e outros substratos (Phaff, 1990). De modo geral, as leveduras preferem usar glicose, frutose ou manose, porém são capazes de crescer em uma grande variedade de fontes de carbono (Carlson, 1988). Devido a sua capacidade fermentativa a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada na indústria de panificação, na produção industrial de cervejas, vinhos, aguardentes e outras bebidas fermentadas e na produção de etanol a partir de caldo de cana ou melaço (Nagashima, 1990). Além disso, *S. cerevisiae* é um organismo usado como modelo de organismos eucariotos em pesquisa científica (Oliver, 1996).

Aliadas às características morfológicas, as capacidades de assimilação e fermentação de determinados carboidratos podem ser utilizadas na classificação de espécies de leveduras (Barnett et al, 1992). A espécie *S. cerevisiae* pertence ao filo ascomycota, classe ascomycetes. O talo é predominantemente unicelular, reproduzindo-se geralmente por brotamento. Os ascosporos são produzidos em ascos livres originados de um zigoto ou por partenogênese a partir de uma célula somática (Menezes e Oliveira, 1995). Em meio YEDP-agar as colônias variam de brancas a creme, a reprodução vegetativa ocorre por brotamento, podendo formar pseudohifa. Os ascos podem conter de um a doze ascosporos lisos, ovais ou circulares (Barnett et al, 1992; Alexopoulos, 1996). As espécies de leveduras também podem ser

distinguidas pela seqüência de genes de RNA ribossomal. Linhagens de *S. cerevisiae* podem ser discriminadas por tipagem molecular através da análise de DNA microssatélite por PCR-fingerprinting (Silva-Filho et al, 2005).

As leveduras possuem cromossomos lineares de tamanhos diferentes, com DNA fita-dupla ligado às histonas H2, H3 e H4. Pelo fato de não possuírem a histona H1, possivelmente formam nucleossomos com um grau de empacotamento menor do que o dos eucariontes superiores (Perez-Ortin et al. 1989). Os cromossomos das leveduras são muito pequenos, não sendo possível a determinação do cariotípico através do bandeamento cromossômico, entretanto a cariotipagem pode ser realizada através da técnica de eletroforese em campo pulsado (Pataro et al, 2000). Células haplóides de *S. cerevisiae* possuem 17 cromossomos, sendo que o cromossomo 17 é muito pequeno e não está presente em todas as linhagens. Os outros 16 cromossomos variam em comprimento de 245 a 2200 Kpb, totalizando um genoma de 14 Mpb (Brock et al, 1984). O genoma de *S. cerevisiae* foi completamente seqüenciado, estando em progresso a análise funcional de seus genes (Winzeler et al, 1999)

## **1.2 Fermentação alcoólica industrial**

A formação de etanol em *Saccharomyces* e em outras leveduras ocorre pela via Embden-Meyerhof-Parnas, ou via glicolítica (Bellan de Oliveira e Silva, 1994). Nessa via a glicose é oxidada a gliceraldeído-3-fosfato e a diidroxiacetona fosfato. O gliceraldeído-3-fosfato é convertido a piruvato, o qual é descarboxilado a acetaldeído. Na reação subsequente o acetaldeído é reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase às custas de NADH<sup>+</sup>. Os dois NAD<sup>+</sup> formados são utilizados na oxidação de outra molécula de glicose,

mantendo-se assim o equilíbrio redox (redução-oxidação) na célula (Walker, 1998) A diidroxiacetona pode ser convertida a gliceraldeído-3-fosfato, e posteriormente a etanol, ou, alternativamente, reduzida a glicerol (Figura 1).

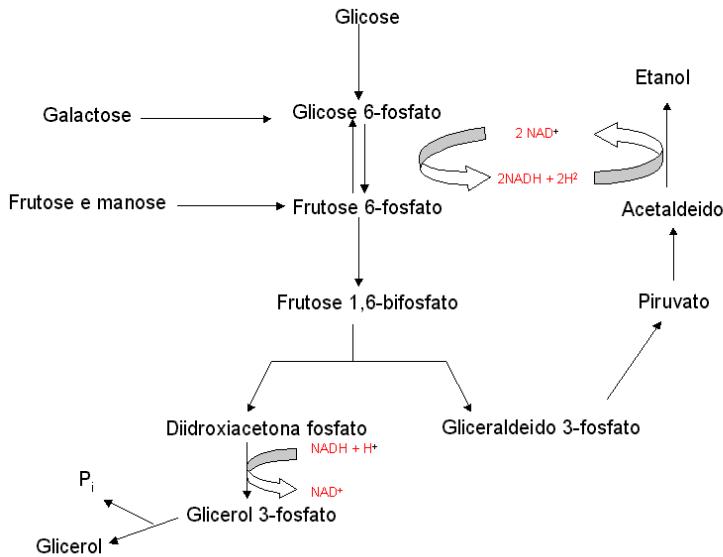


Figura 1. Metabolismo central mostrando a produção de etanol e de glicerol a partir da glicose.

O processo de produção de álcool combustível no Brasil utiliza a sacarose proveniente da cana de açúcar, na forma de caldo de cana ou de melaço, como substrato para a fermentação. Esta fermentação ocorre pela ação de células de *S. cerevisiae* que são re-utilizadas ao longo de toda a safra. Atualmente existem mais de 300 destilarias de álcool combustível no Brasil e várias outras estão projetadas devido ao aumento da demanda deste combustível (Figura 2).

Durante a fermentação industrial as leveduras passam por diversas formas de estresse (Banat et al, 1998; Ballesteros et al, 1993; Brosnan et al, 2000). Na fase de maior atividade metabólica da fermentação há uma significativa elevação da temperatura, sendo necessário o resfriamento do mosto para viabilizar a continuação do processo fermentativo, uma vez que o

fermento é reaproveitado em fermentações sucessivas (Nagashima, 1990; Wheals, 1990). Na indústria de álcool combustível o ambiente da fermentação é complexo, principalmente em processos que utilizam o caldo de cana-de-açúcar como matéria prima. Nesse tipo de processo ocorre uma sucessão intensiva de linhagens de *S. cerevisiae* no mosto de fermentação, quando o fermento original é substituído por linhagens selvagens, ou por leveduras contaminantes não produtoras de etanol durante a safra da cana-de-açúcar (Silva-Filho et al, 2005). Em alguns casos o fermento original é completamente substituído por linhagens selvagens de *S. cerevisiae*, embora não tenha sido verificada uma queda na produção. A estabilidade populacional no ambiente fermentativo depende do uso de linhagens bem adaptadas às condições do processo industrial (Silva-Filho et al, 2005).

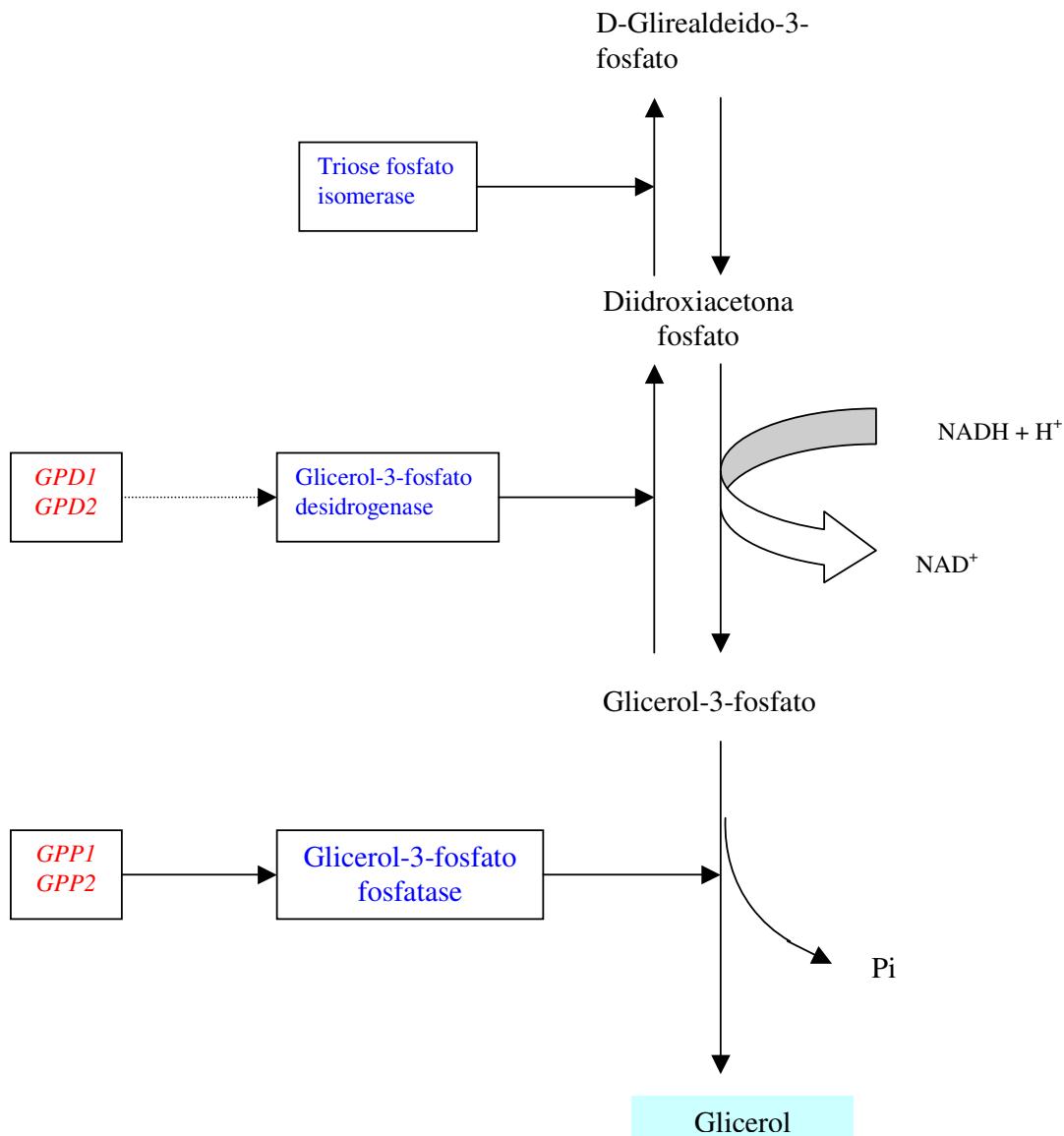
Nas destilarias de álcool combustível as leveduras são separadas do mosto por centrifugação. Em seguida o fermento é submetido a uma lavagem ácida (pH 2,0) com ácido sulfúrico comercial antes de ser submetido a uma nova fermentação (Silva-Filho et al, 2005). Esse procedimento pode comprometer a viabilidade das células e consequentemente provocar uma queda no rendimento da fermentação (Nagashima 1990, Brosnan et al. 2000), sendo necessária a utilização de um novo fermento para reiniciar o processo (Silva-Filho et al, 2005).



**Figura 2.** Destilaria Tabu localizada no município de Pitimbu, Paraíba, Brasil.

### 1.2.1 Produção de glicerol durante a fermentação

O glicerol é o principal subproduto da fermentação em *S. cerevisiae*. Em condições normais o glicerol é liberado para o meio extracelular, porém em condição de estresse osmótico acumula-se no citoplasma. O glicerol se acumula no meio intracelular devido a um aumento de sua síntese, retenção pela membrana plasmática ou absorção a partir do meio extracelular. O glicerol é sintetizado pela redução da diidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fostato, uma reação catalisada pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD), seguida pela defosforilação do glicerol-3-fosfato pela glicerol-3-fosfato fosfatase (GPP). Essas enzimas são produtos dos genes *GPD1* ou *GPD2* e *GPP1* ou *GPP2*, respectivamente. A diidroxiacetona fosfato pode ser formada a partir da quebra de frutose-1,6-difosfato ou alternativamente a partir de gliceraldeído-3-fosfato pela enzima triose-3-fosfato isomerase (figura 3). Essa via parece ser a única rota para a produção de glicerol em *S. cerevisiae*, uma vez que mutantes *gpd1/gpd2* não produzem glicerol. A produção de glicerol é maior em meio rico em glicose (Nevoigt e Stahl, 1998).

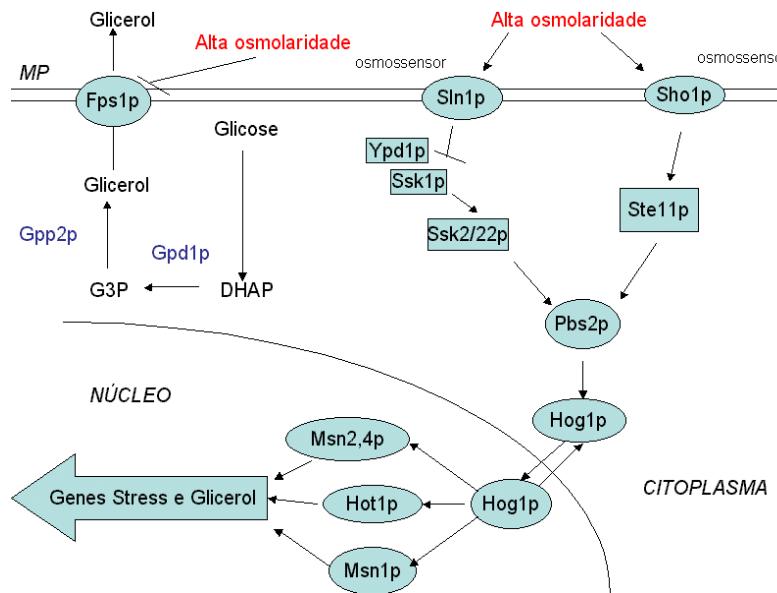


**Figura 3. Síntese de glicerol a partir de gliceraldeído-3-fosfato em *S. cerevisiae*. Genes que codificam a Glicerol-3-fosfato desidrogenase : *GPD1* e *GPD2*. Genes para a Glicerol-3-fosfato fosfatase: *GPP1* e *GPP2*.**

Em meios hipertônicos as leveduras sintetizam e acumulam glicerol para manter o equilíbrio osmótico na célula (Carvalheiro et al, 1999; Estruch, 2000; Mager e Siderius, 2002; Garay-Arroyo et al, 2004). Células de *S. cerevisiae*

quando incubadas em meio contendo 0,7 M de NaCl, por 40 minutos, produzem três vezes mais glicerol do que em condições normais de crescimento. O glicerol não é necessariamente responsável pela resistência da célula a um meio hipertônico, mas é essencial à restauração das atividades biológicas normais (Nevoigt e Stahl, 1998). Este aumento na produção de glicerol em condições hiperosmóticas está relacionado ao aumento da atividade das enzimas glicerol-3-fosfato desidrogenase e glicerol-3-fosfato fosfatase. Porém a diminuição da atividade de algumas enzimas da via glicolítica pode contribuir para o aumento da síntese de glicerol (Nevoigt e Stahl 1998).

O glicerol pode atravessar a membrana plasmática por difusão passiva ou ser transportado por difusão facilitada pela proteína Fps1 (Figura 4) (Dequin 2001). Na membrana plasmática duas proteínas Sln1p e Sho1p atuam como sensores de estresse osmótico, ativando uma via de sinalização que induz os genes envolvidos na síntese de glicerol (Estruch, 2000). A proteína Sho1 transmite o sinal através da proteína Ste11p, a qual ativa a proteína Pbs2 que por sua vez fosforila Hog1p. O osmossensor Sho1 transmite o sinal através do dímero Ssk1p-Ypd1p, seguido de Ssk2/22p o qual ativa Pbs2p. A proteína Hog1 fosforilada atravessa a membrana nuclear e se ligar aos fatores de transcrição Msn2/4p, Hot1p ou Msn1 no núcleo ativando a transcrição de genes de resposta ao estresse e dos genes da via do glicerol (Estruch, 2000). A condição hiperosmótica inibe diretamente a atividade do transportador de glicerol Fps1p, interrompendo o transporte desse metabólito para o meio extracelular (Nevoigt e Stahl, 1998).



**Figura 4.** Transmissão de sinal, através de uma cascata de fosforilação, a partir das proteínas Sln1p e Sho1p na membrana, para a ativação de genes de estresse, e repressão da atividade da Fps1p.

Linhagens de vinificação de *S. cerevisiae*, transformadas para sobre expressar o gene *GPD1*, apresentaram o dobro da produção de glicerol das células não transformadas e um pequeno decréscimo na produção de etanol durante a fermentação. Todas as linhagens transformadas, para a sobre-expressão do gene *GPD1*, produziram grandes quantidades de succinato e acetato e baixa produção de biomassa (Remize et al, 1999). Embora tenha sido possível aumentar a produção de glicerol através da transformação genética, pouco se sabe a respeito do controle da via de síntese de glicerol. Um modelo da cinética de síntese de glicerol envolvendo todas as reações dessa via foi construído. Os valores dos parâmetros cinéticos foram coletados de dados disponíveis na literatura. A análise dos valores de controle metabólico, calculados pelo modelo, para a atividade das enzimas da via de síntese de glicerol, indica que a glicerol-3-fosfato desidrogenase NAD-dependente possui

o maior coeficiente de controle ( $Cv1J = 0,85$ ), exercendo a maioria do controle da velocidade de síntese de glicerol (Cronwright et al, 2002).

### **1.3 Resposta ao estresse**

Os organismos unicelulares, para manter condições ótimas de crescimento e funcionamento, necessitam de um ambiente intracelular específico e balanceado. Qualquer flutuação no ambiente interno pode resultar em uma variedade de perturbações que podem reduzir a atividade enzimática, interromper o fluxo metabólico, danificar as estruturas celulares e alterar os gradientes químicos, levando a célula a uma condição de instabilidade. Porém as células são capazes de manter a homeostase interna mesmo diante de um ambiente externo variado. (Gasch, 2001). A resposta aos diferentes tipos de estresse é uma característica fundamental na adaptação dos organismos vivos às condições adversas do ambiente. As células de *S. cerevisiae*, quando submetidas à condição de estresse, desenvolvem uma rápida resposta molecular para reparar danos e proteger as estruturas celulares dos efeitos causados pelo estresse (Ruis e Schüller, 1995; Swan e Watson, 1998; Estruch, 2000). Essa resposta é caracterizada pela síntese de proteínas específicas, aumento do nível celular de trealose e glicerol, alteração da composição lipídica da membrana plasmática e da atividade da ATPase, modulação do processo de troca iônica e, no caso de estresse oxidativo, produção de glutationa e de enzimas superóxido dismutase (Birch e Walker, 2000).

Em leveduras, dois aspectos da resposta ao estresse têm sido bem analisados, a síntese de proteínas de resposta ao estresse e a acumulação de trealose (Swan e Watson, 1998). Em culturas de *S. cerevisiae* ocorre o acúmulo de trealose em resposta a uma mudança na temperatura de 30°C para 44°C, quando a concentração de trealose atinge valores intracelulares máximos (Carvalheiro et al, 1999). A resposta ao choque térmico é caracterizada pela síntese de proteínas específicas denominadas de proteínas de choque térmico ou Hsp (heat shock proteins), que funcionam como chaperonas nos processos de desnaturação e recuperação de proteínas danificadas (Jakobsen e Pelham, 1991; Maresca e Lindquist, 1991; Nover e Scharf, 1991; Craig, 1992; Morimoto, 1993). As Hsp são encontradas em células eucariontes e procariontes, são altamente conservadas e desempenham funções importantes em condições normais de crescimento (Kiang e Tsokos, 1998). Além de choque térmico, são induzidas por outras formas de estresses como altas concentrações salinas e de etanol, estresse oxidativo, baixos pHs, escassez de nutrientes e presença de metais pesados no meio (Kiang e Tsokos, 1998; Estruch, 2000).

Os genes que codificam as Hsp são divididos em famílias. Os genes da família HSP70 são divididos nos subgrupos A, B, C e D (Estruch, 2000; Baumann et al, 2000). O subgrupo A é o mais complexo, contendo quatro genes, *SSA1*, *SSA2*, *SSA3* e *SSA4* (Tabela 1). Embora os genes da família HSP70 codifiquem proteínas que desempenham funções semelhantes, eles diferem no grau de expressão em condições de estresse (Estruch, 2000).

Elevadas temperaturas são comuns em processo de fermentação industrial, constituindo fator de seleção de linhagens de leveduras termotolerantes. A resposta ao choque térmico pode variar entre linhagens industriais de *S. cerevisiae*, porém as leveduras industriais são geralmente mais termotolerantes do que as de laboratório (Lewis et al, 1997). Nas fermentações industriais, a necessidade de reduzir os custos de resfriamento do mosto, de obter altas taxas de sacarificação e fermentação, remoção contínua de etanol, e de se obter baixos níveis de contaminação tem estimulado a pesquisa com leveduras termotolerantes ou termofílicas (Banat et al, 1998; Estruch, 2000). Linhagens industriais de *S. cerevisiae* e *K. marxianus* crescem bem a 45°C quando previamente adaptada a temperaturas menores (Ballesteros et al, 1993).

Tabela 1: Principais membros da família HSP70

Gene	Proteína	Localização	Função
SSA1	Ssa1p	Citoplasma	Pocessamento e translocação de proteínas, regulação de choque térmico.
SSA2	Ssa2p	Citoplasma	Pocessamento e translocação de proteínas, regulação de choque térmico.
SSA3	Ssa3p	Citoplasma	Pocessamento e translocação de proteínas, regulação de choque térmico.
SSA4	Ssa4p	Citoplasma	Pocessamento e translocação de proteínas, regulação de choque térmico.
SSB1	Ssb1p	Ribossomos	Síntese de proteínas
SSB2	Ssb2p	Ribossomos	Síntese de proteínas
SSC1	Ssc1p	Mitocôndria	Transporte de proteína
SSD1/SSQ1	Ssd1p	Mitocôndria	Agregação e maturação de proteínas mitocondriais
KAR2	Kar2p	Lúmen do retículo endoplasmático	Agragação e transporte de proteínas

As leveduras quando expostas a um estresse osmótico perdem água, dando início a uma série de mecanismos, principalmente relacionados com a síntese de trealose e de glicerol, para resguardar as células da desidratação e proteger as estruturas celulares dos possíveis efeitos da condição de estresse (Estruch, 2000; Mager e Siderius, 2002). Em ensaios de resistência ao estresse causado por elevada concentração de sal no meio, linhagens de panificação de *S. cerevisiae* apresentaram resistência a 1,5 M de NaCl (Lewis et al, 1997), enquanto linhagens de vinificação foram resistentes a 3,0 M de KCl (Carrasco et al, 2001).

Durante a fermentação alcoólica industrial, o aumento da concentração de etanol reduz a velocidade específica de crescimento, a velocidade específica de produção de etanol e a viabilidade de células de leveduras (Van Uden, 1984; Nagashima, 1990; Carlsen, 1991; Zuzuarregui e Olmo, 2004). Altas concentrações de etanol, acima de 10% (v/v), constituem fator limitante nas fermentações industriais por *S. cerevisiae*, diminuindo a produção de CO<sub>2</sub>, mesmo em meio rico em glicose (Carlsen, 1991). *Saccharomyces cerevisiae* apresenta variabilidade intra-específica quanto à tolerância a etanol. Essa tolerância a etanol pode ser usada como critério para a seleção de linhagens de vinificação, uma vez que elevadas concentrações de etanol são comuns em processos de produção de vinho (Carrasco et al, 2001).

Células de leveduras crescendo em condições de aerobiose produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxilas e ânios superperóxidos, provenientes de processos metabólicos normais como respiração e β-oxidação de ácidos graxos (Gordon et al, 1999; Estruch, 2000; Costa e Moradas-Ferreira, 2001). Esses compostos constituem

fatores de estresse oxidativo, induzindo um grupo de genes que codificam proteínas antioxidantes (Estruch, 2000). Embora as linhagens industriais sejam normalmente resistentes ao estresse oxidativo, esse tipo de estresse pode afetar a produção de biomassa de leveduras de vinificação, processo realizado em aerobiose (Carrasco et al, 2001). Linhagens de *S. cerevisiae* tolerantes ao estresse oxidativo também apresentam tolerância a outras formas de estresse, porém essa co-tolerância não é comum a todas as linhagens e depende do tipo e da intensidade do estresse (Lewis et al, 1997).

### **1.3.1 Resposta ao estresse ácido**

A maioria das células dos eucariontes superiores possui altas concentrações de proteínas em seu citoplasma que funcional como ácidos ou bases orgânicas. Proteínas contendo histidina, por exemplo, tamponam o meio intracelular em pH próximo do neutro. Nucleotídios semelhantes a ATP, além de outros metabólitos de baixo peso molecular, contêm grupos ionizantes que também tamponam o citoplasma (Nelson e Cox, 2004).

A maioria das leveduras é capaz de crescer em meio com pH entre 4,5 e 6,5 (Walker, 1998), porém ácidos orgânicos como o ácido sórbico, o ácido benzóico e o ácido acético, os quais têm sido utilizados na preservação de alimentos, inibem o crescimento de leveduras em baixo pH (Piper et al, 1998; Piper et al, 2001). Ácidos orgânicos, quando não dissociados, são capazes de atravessar a membrana plasmática por difusão. Uma vez no citoplasma esses ácidos se dissociam gerando o próton  $H^+$  e o ânion correspondente. Quanto maior o pH do meio, maior o grau de dissociação do ácido. Um ácido orgânico quando se dissocia no meio intracelular diminui o pH citossólico. O acúmulo do

ânion no citoplasma pode aumentar a produção de radicais livres, em aerobiose, induzindo o estresse oxidativo (Piper et al, 2001). Embora os ácidos orgânicos constituam fatores de estresse, as leveduras são capazes de responder ao estresse causado por esses ácidos. Em *S. cerevisiae* a presença de ácido sórbico no meio de crescimento aumenta a atividade da enzima H<sup>+</sup>-ATPase, a qual catalisa a extrusão de prótons H<sup>+</sup>, e induz a síntese da proteína Pdr12, que age na membrana plasmática catalisando a extrusão do íon sorbato do meio intracelular as custas de ATP (Piper et al, 2001). Células de *S. cerevisiae* crescendo em pH 7,0 na ausência de sorbato, apresenta uma pequena quantidade de Pdr12 na membrana plasmática, porém a adição de sorbato ao meio de cultura aumenta o grau de expressão do gene *PDR12*. Mutantes *pdr12* são muito sensíveis a sorbato em baixo pH, indicando que a proteína Pdr12 exerce uma função essencial na adaptação dessa levedura à condição de estresse ácido (Piper et al, 1998). Esta levedura é resistente a 2 mM de sorbato em YEPD ajustado a pH 4,5 com HCl, porém essa resistência não depende exclusivamente da atividade de Pdr12. Várias proteínas envolvidas em diversas funções na célula são importantes na resposta ao estresse ácido. Células mutantes *pkf1* e *pkf2* (subunidades α e β da fosfofrutoquinase, respectivamente), *rpe1* (D-ribulose-5-fosfato 3-epimerase), *gdh3* (uma isoenzima da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e *tps2* (trealose-6-fosfato fosfatase) são sensíveis a 2 mM de sorbato no meio de crescimento.

Os ácidos orgânicos inibem a resposta ao estresse e aumentam a freqüência de mutações que causam deficiência no metabolismo respiratório de *Saccharomyces cerevisiae*, quando cultivada a elevada temperatura (Cheng et

al, 1999). O tratamento de células de *S. cerevisiae* com ácidos orgânicos inibe a síntese das Hsp e, consequentemente, a termotolerância (Piper et al, 1998). A presença de ácido acético na concentração de 50 mM no meio de crescimento (pH 3,5), semelhantemente ao ácido sórbico, diminui o pH citossólico e aumenta a atividade da H<sup>+</sup> ATPase na membrana plasmática de células de *S. cerevisiae* (Carmelo et al, 2005). Linhagens de panificação dessa levedura foram sensíveis a 0,4% de ácido acético (v/v) em meio YEP-agar (meio sem glicose). Nessas condições, a sobrevivência da maioria das linhagens testadas foi inferior a 10% do total de células inoculadas no meio (Lewis et al, 1997). Células de *S. cerevisiae* pré-adaptadas ao estresse ácido, quando crescem em meio mínimo, sem glicose, contendo 1 mM de ácido benzóico (pH 4,5), acumulam uma grande quantidade de benzoato no meio intracelular, porém quando a glicose é adicionada ao meio de cultura as células eliminam cerca de 90% do ácido benzóico presente no citoplasma. Isso mostra que a célula depende de glicose, ou de outra fonte de energia, para gerar ATP e fazer funcionar a H<sup>+</sup>-ATPase e a proteína Pdr12, restaurando a homeostase do pH intracelular (Henriques et al, 1997).

Embora a lavagem ácida utilizada na indústria alcoóleira seja um fator de estresse (Wheals et al, 1990; Borsnan, 2000), ainda não está claro como os ácidos inorgânicos afetam a viabilidade das células de leveduras (Cheng et al, 1999). *Saccharomyces cerevisiae* é mais sensível à temperatura de 47º C quando o ácido clorídrico está presente no meio, porém essa sensibilidade é maior na presença de ácido acético. O efeito do tratamento ácido na termotolerância depende do valor do pH, do tipo de ácido utilizado e da presença ou ausência de glicose no meio. A redução do pH intracelular é maior

na presença de ácido acético do que na presença de ácido clorídrico (Carmelo et al, 1998). A utilização de linhagens de *S. cerevisiae* resistente ao estresse ácido é uma característica importante para a indústria de álcool combustível.

#### **1.4 Resposta metabólica ao estresse**

As leveduras regulam seu metabolismo de acordo com as condições do meio de crescimento. *Saccharomyces cerevisiae* usa preferencialmente glicose como fonte de carbono e energia. Quando a glicose é limitada, as células utilizam o metabolismo respiratório, o qual exige a presença de oxigênio. O metabolismo respiratório apresenta um maior rendimento em ATP, quando comparado ao metabolismo fermentativo, e produz precursores de aminoácidos essenciais ao crescimento celular (Nagashima, 1990; Walker, 1998). Em meio rico em glicose *S. cerevisiae* fermenta. O etanol resultante da fermentação pode posteriormente ser reutilizado para o crescimento através da respiração, se o oxigênio estiver disponível. Portanto, fermentação e respiração são processos interligados que podem ser usados simultaneamente por *S. cerevisiae* (Walker, 1998). Essa dualidade metabólica fornece condições especiais à levedura para regular seu metabolismo em função da disponibilidade de glicose e de oxigênio.

Em *S.cerevisiae* o crescimento a elevadas temperaturas é uma condição desfavorável, envolvendo redistribuição do fluxo metabólico (Mensonides et al, 2002). A elevação da temperatura provoca um aumento instantâneo do matabolismo que em seguida diminui, alcançando um novo estado estacionário (Mensonides et al, 2002). A ocorrência de um pico inicial no metabolismo, com o aumento da temperatura, pode ser explicado por um efeito dual causado pelo

choque térmico. Inicialmente o metabolismo aumenta devido simplesmente a uma elevação da temperatura de todo o sistema, mas subsequentemente a resposta metabólica ao estresse ocorre, caracterizando adaptação, inativação ou morte celular (Mensonides et al, 2002). O aumento do metabolismo, sob choque térmico, pode estar relacionado com a ativação do sistema de resposta ao estresse através da síntese de proteínas de estresse e acúmulo de trealose, que exigem maior quantidade de energia. Embora a temperatura de estresse provoque uma redistribuição do metabolismo, essa redistribuição ainda não é bem conhecida (Mensonides et al, 2002).

Em culturas de *S. cerevisiae*, etanol em concentrações entre 5 e 20% inibe a fermentação anaeróbica da glicose. Essa inibição está correlacionada a um aumento no coeficiente de partição do álcool, sugerindo que a ação inicial do etanol ocorre em sítios hidrofóbicos, possivelmente na membrana plasmática. Em consequência, a permeabilidade da membrana é alterada, assim como o sistema de transporte de açucares. (Carlsen et al, 1991). O etanol pode interferir diretamente na atividade de várias enzimas do metabolismo, ocasionando a produção e o acúmulo de metabolitos tóxicos na célula (Carlsen et al, 1991). Além disso, o etanol altera a proporção entre ácidos graxos saturados e insaturados na membrana plasmática (Ingram e Buttke, 1984). A presença de benzoato em cultura de *S.cerevisiae* a baixa taxa de diluição ( $0,10 \text{ h}^{-1}$ ) induz uma grande mudança no fluxo catabólico da glicose (Verduyn, 1991). A concentração de glicose residual aumentou de 100 para 600  $\mu\text{M}$ , quando as células foram cultivadas na presença de benzoato. Ao mesmo tempo, observou-se uma redução na biomassa e um aumento no fluxo

de glicose, além de um aumento na velocidade específica de captação de oxigênio pela célula (Verduyn, 1991).

### **1.5 Expressão gênica em células de *Saccharomyces cerevisiae***

As diferentes vias metabólicas são coordenadas por uma série de genes que codificam as enzimas ou as proteínas reguladoras da expressão gênica. A integração entre as várias vias metabólicas, como apresentado anteriormente, mostra que muitos genes estão envolvidos em diferentes respostas celulares e regulados por um conjunto de proteínas regulatórias que atuam em mais de uma via. Portanto, atualmente existe a percepção de que o entendimento das chamadas redes metabólicas passa pela identificação do conjunto de genes que respondem a alterações em uma determinada via metabólica ou na condição de crescimento celular. Experimentos de análise da expressão gênica global, com a identificação do perfil de alteração na expressão de todos os genes do organismo alvo, levam em conta a disponibilidade de chips contendo microarranjos de DNA aos quais o conjunto de produtos diretos da expressão dos genes, os RNAs, pode ser confrontado. Esta técnica, chamada de *DNA microarray*, consiste na extração do conjunto de moléculas de RNA de um determinado organismo submetido à condição teste e do mesmo organismo submetido à condição dita controle. As duas populações de RNAs são utilizadas para a produção de DNA complementar (cDNA) marcados com fluorocromos distintos. As duas populações de cDNA são misturadas e utilizadas para hibridização com um chip contendo uma pequena seqüência de todos os genes do mesmo organismo. Assim, quanto maior a expressão de um

gene em uma dada condição experimental maior é a presença de RNA e consequentemente de cDNA correspondente aquele gene. Quando isto ocorre, a maior probabilidade de hibridização permite que o tipo de RNA mais abundante hibridize com o chip. Assim, após leitura do chip com um laser de alta precisão, o padrão de cores para cada gene é determinado pelo *scanner* e os valores de intensidade são utilizados para calcular se o gene é induzido, reprimido ou não apresentou variação na sua expressão. A seguir, verifica-se uma série de exemplos que utilizam estudos de DNA microarray em células de *S. cerevisiae* submetidas a diferentes tipos de estresse.

O perfil da expressão gênica global em células de *S. cerevisiae* cultivadas em meio contendo dimetilssulfóxido (DMSO) mostrou que 1.338 genes foram significantemente regulados pela presença deste composto (Zhang et al, 2003). Entre esses, 400 foram identificados como genes do sistema de resposta geral ao estresse, como choque térmico, escassez de aminoácidos e nitrogênio (Zhang et al, 2003). Os genes regulados pela presença de DMSO estão envolvidos em uma variedade de funções celulares, incluindo o metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídios, além do sistema de resposta ao estresse e do metabolismo energético. Na presença de DMSO a maioria dos genes envolvidos na biossíntese dos lipídios foi induzida. Porém, de modo contrário, a maioria dos genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos foi reprimida (Zhang et al, 2003). Em *S. cerevisiae* FY834, mais de 70% dos genes envolvidos na biogênese de ribossomos foram reprimidos após a adição de 0,5 M NaCl ao meio de crescimento, porém vários genes envolvidos no metabolismo de glicose, no transporte de elétrons e na resposta ao estresse foram induzidos. A redução da expressão gênica dos genes envolvidos na

biogênese dos ribossomos resulta em uma redução na síntese protéica. Essa redução na síntese de proteínas é importante para que a célula redirecione seus fluxos metabólicos em resposta à condição de estresse (Hirasawa et al, 2005). Em resposta ao cádmio, como agente de estresse, o aumento na síntese de glutationa, a qual é essencial para a detoxificação de metais pesados pôde ser confirmado por uma queda da síntese de proteínas que contem enxofre e pelo aumento da síntese de glutationa a partir de sulfato (Lafaye et al, 2005). Os dados do fluxo metabólico apresentaram correlação positiva com os dados obtidos da análise proteômica, indicando uma correlação entre proteoma e metaboloma, embora essa correlação não exista para todo tipo de estresse (Lafaye et al, 2005).

A análise transcricional da resposta de *S. cerevisiae* a desidratação e posterior re-hidratação revelou que a expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos e no ciclo do glioxilato aumentou durante a desidratação, permanecendo alta durante a fase de re-hidratação (Singh et al, 2005). Linhagens de vinificação de *S. cerevisiae* apresentam diferenças no comportamento fermentativo devido a diferenças nos perfis de mRNA e proteínas envolvidas, principalmente, no metabolismo de carboidratos, repressão por catabólitos de nitrogênio e resposta ao estresse (Zuzuarregui et al, 2006). Em linhagens de *S. cerevisiae* de melhor comportamento fermentativo pode-se observar um aumento na quantidade da Hsp26p e da Ald6p, proteínas envolvidas na resposta ao estresse e na via fermentativa, respectivamente. Em outras linhagens de vinificação, altos níveis de enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos sulfurados foram observados, principalmente das enzimas Cys4p, Hom6p e Met22p, as quais podem estar

relacionadas com a produção de substâncias responsáveis por certas propriedades organolépticas do vinho ou aos processos de desintoxicação da célula (Zuzuarregui et al, 2006).

## 2. OBJETIVOS

Durante os reciclos nas fermentações industriais, as células de *S. cerevisiae* são expostas a tratamentos com ácido sulfúrico no pré-fermentador. A utilização desse ácido é quase que imprescindível, já que se constitui em uma maneira muito eficiente de combater contaminações bacterianas no processo. Nesse momento, a viabilidade celular pode ser afetada, principalmente quando as células são expostas a outros fatores como elevação da temperatura, presença de etanol residual e, possivelmente, a formação de substâncias oxidativas. Praticamente não existe dados sobre a ação dos ácidos inorgânicos sobre a fisiologia das células de levedura, o que contrasta com a vasta literatura encontrada sobre a ação de ácidos orgânicos fracos, utilizados principalmente como conservantes alimentares. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo determinar os efeitos fisiológicos e genéticos do ácido sulfúrico sobre células de *S. cerevisiae* como base para a seleção e desenho de linhagens industriais cada vez mais resistentes a este estresse.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS**

Meios de Cultura

#### **Meio YEPD**

Extrato de Levedura.....10 g  
Peptona.....20 g  
Glicose.....20 g  
Água destilada para.....1000 ml

#### **Meio YEPD-agar**

Extrato de levedura.....10 g  
Peptona.....20 g  
Glicose.....20 g  
Agar.....20 g

#### **Meio Mineral para Crescimento (MC)**

Glicose.....20,00 g  
Sulfato de amônia.....7,50 g  
Fosfato de potássio.....14,4 g  
Sulfato de magnésio.....0,50 g  
Solução de elementos traços.....2,0 ml  
Solução de vitaminas.....1,0 ml  
Água destila para .....1.000 ml

#### **Meio Mineral para Fermentação (MF)**

Sacarose.....120,00 g  
Sulfato de amônia.....5,00 g

Fosfato de potássio.....3,00 g  
Sulfato de magnésio.....0,50 g  
Solução de elementos traços.....1,00 ml  
Solução de vitaminas..... 1,00 ml  
Água destilada para.....1.000 ml

As soluções de vitaminas e de elementos traços foram preparadas segundo descrito por Verduyn et al. (1992).

### **Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas**

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*: JT95 (MAT $\alpha$  *ura3Δ0/ura3Δ0 his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/ leu2Δ0 MET15/met15Δ0 LYS2/lys2Δ0*), a linhagem industrial JP1, isolada na destilaria de álcool Japungu e a linhagem comercial PE2.

### **Ensaios de crescimento em meio YEPD ácido.**

As células de JP1 e da linhagem selecionada em meio ácido, a qual foi denominada JP1M, foram cultivadas em YEPD a 30º C até a fase estacionária. Em seguida foram inoculadas em meio YEPD-pH 2,5 ( $DO_{600}=0,1$ ), incubadas a 30ºC até a fase exponencial, quando foram re-inoculadas em novo meio YEPD-pH 2,0 ou YEPD-pH 2,5 e incubadas a 30ºC por 24 horas. As culturas foram iniciadas com  $DO_{600}$  de 0,1. A  $DO_{600}$  foi monitorada a cada 2 horas durante o crescimento.

A resistência cruzada a ácidos orgânicos fracos foi avaliada pela determinação da velocidade de crescimento de células de JP1M em meio YEPD-pH 2,5 suplementado com sorbato de potássio a 0,5 mmol.l<sup>-1</sup>. Os valores

apresentados de crescimento celular e viabilidade celular representam médias de experimentos com diferentes colônias destas linhagens em diferentes cultivos.

### **Ensaio de crescimento em meio MC ácido.**

As células, na fase exponencial de crescimento, foram inoculadas em meio MC-pH 2, ajustado com ácido sulfúrico ou pH 6, ajustado KOH, para uma densidade ótica inicial a 600nm (DOI<sub>600</sub>) de 0,1, e incubadas a 30 °C sob agitação por 6 horas para a determinação da taxa específica de crescimento.

### **Curva de sobrevivência em pH ácido.**

Para determinar a viabilidade celular a baixos valores de pH, as células foram inoculadas em YEPD-pH 2,5 ajustado com ácido sulfúrico, e incubadas a 30°C até fase estacionária de crescimento, quando foram lavadas com água destilada e centrifugadas. Em seguida foram feitas suspensões celulares (10% v/v) em água destilada acidificada a pH 2,0 com ácido sulfúrico. As suspensões foram incubadas a 37°C e 42°C por 120 min. A cada 30 min alíquotas foram coletadas, diluídas para uma concentração final de 10<sup>3</sup> células/ml, plaqueadas (200 µl de suspensão celular) em YEPD-agar e incubadas a 30 °C por 72 horas para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Pelo menos três placas foram utilizadas para cada ponto.

### **Ensaio de fermentação.**

As linhagens JP1 e JP1M foram cultivadas em meio MC e em seguida inoculadas em meio MF, pH 2,0 ajustados com ácido sulfúrico, com uma

concentração celular de 10% (v/v). Ensaios de fermentação em pH 5,0 (ajustado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ou 6,0 (ajustado com KOH) foram feitos como controle. Durante 4 horas de fermentação amostras foram coletadas, centrifugadas e o sobrenadante recolhido e estocado a -20º C para análises quantitativas posteriores de etanol por cromatografia gasosa em equipamento Varian 3600 e de glicerol por kit enzimático de glicerol oxidase (GPO-PAP, Laborlab, Brasil).

### **DNA-microarray**

Células da linhagem JT95 foram coletadas após 90 minutos de fermentação em meio MF-pH 2 foram coletadas e submetidas a extração de RNA total utilizando o reagente Brazol (LGC Ltda, São Paulo), segundo as instruções do fabricante. As amostras foram enviadas para o *Microarray Facility VIB* da Universidade de Leuven (Bélgica) (<http://www.microarrays.be/>) para serem analisadas a partir da plataforma Affymetrix GeneChip®. Os resultados são apresentados em termos de variação linear positiva (indução) ou negativa (repressão) da expressão gênica.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexopoulos, C.J., Mims, C.M. and Blackwell, M. (1996) *Introductory Mycology*. pp. 272-293 . New York: John Wiley & Sons Inc

Ballesteros, I., Oliva, J.M., Ballesteros, M. and Carrasco, J. (1993) Optimization of the simultaneous saccharification and fermentation process using thermotolerant yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **30/40**, 201-211.

Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R. and McHale, A.P. (1998) Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – Yeasts in general. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **13**, 809-821.

Baumann, F., Milisav, I., Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2000) Ecm10, a novel Hsp70 homolog in the mitochondrial matrix of the *S. cerevisiae*. *FEBS Letters* **487**, 307-312.

Birch, R.M. and Walker, G.M. (1999) Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* **26**, 678-687.

Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (1984) *Biology of Microorganisms*. pp. 237-286. London: Prentice-Hall international Inc.

Brosnan, M.P., Donnelly, D., James, T.C. and Bond, U. (2000) The stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. *Journal of Applied Microbiology*. **88**, 746-755.

Carlsen, H.N., Degn, H. and Lloyd, D. (1991) Effects of alcohols on the respiration and fermentation of aerated suspensions of baker's yeast. *Journal of General Microbiology* **137**, 2879-2883.

Carlson, M. (1998) Regulation of glucose utilization in yeast. *Current Opinion in Genetics & Development*. **8**, 560-564.

Carmelo, V., Santos, R., Viegas and C.A. and Sá-Correia, I. (1998) Modification of *Saccharomyces cerevisiae* thermotolerance following rapid exposure to acid stress. *International Journal of food Microbiology*. **42**, 225-230.

Carvalheiro, F., Roseiro, J.C. and Gírio, F.M. (1999) Interactive effects of sodium chloride and heat shock on threalose accumulation and glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* **16**, 543-550.

Cheng, L., Moghraby, J. and Piper, P.W. (1999) Weak organic acid treatment causes a trehalose accumulation in low-pH cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, not displayed by the more preservative-resistant *Zygosaccharomyces baillii*. *FEMS microbiology Letters*. **170**, 89-95.

Chung, K.S., Hoe, K.L., Kim, K.W. and Yoo, H.S. (1998) Novel heat shock protein 70 like gene, *pss1<sup>+</sup>* of *Schizosaccharomyces pombe* homologus to Hsp110/SSE subfamily. *Gene*. **210**, 143-150.

Ciechanover, A. and Schwartz, A.L. (1998) The ubiquitina-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* **95**, 2727-2730

Costa, V. and Moradas-Ferreira, P. (2001) Oxidative stress and signal transduction in of *S. cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects in Medicine* **22**, 217-246

Craig, E.A. (1992) The heat-shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces* ed. Jones, E.W., Pringle, J.R. and Broach, J.R. pp. 501-537 Berlin: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Dequin, S. (2001) The potential of genetic engineering for improving, wine-making and baking yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**, 577-588.

Estruch, F. (2000) Stress-controlled transcription factor, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 469-486.

Garay-Arroyo, A., Covarrubias, A.A., Clark, I., Niño, I., Gosset, G. and Martinez, A. (2004) Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**, 734-741.

Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Camel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D. and Brown, P.O. (2001) Genomic expression programs in response of yeast to environmental changes. *Molecular and Cell Biology* **11**, 4241-4257

Gordon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.M., Kieffer, S., Perrol, M., Boucherie, H., Toledano, M.B. and Laberre, J. (1999) The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 22480-22489.

Hack, C.J. and Marchant, R. (1998) Characterisation of novel thermotolerante yeast, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*,: development of an ethanol fermentation process. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **20**, 323-327.

Henriques, M., Quintas, C. and Loureiro-Dias, M. (1997). Extrusion of benzoic acid in *Saccharomyces cerevisiae* by an energy-dependent mechanism. *Microbiology* **143**, 1877-1883.

Hirasawa, T., Nakakura, Y., Yoshikawa, K., Ashitani, K., Nagahisa, K., Furusawa, C., Kataura, Y., Shimizu, H. and Shioya, S. (2005) Comparative analysis of transcriptional responses to saline stress in laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* with DNA microarray. *Applied Microbiology and Biotechnology* **11**, 1-12.

Ingram, L.O.N. and Buttke, T.M. (1984) Effects of alcohols on micro-organism. In: *Advances in microbial physiology* ed. Rose, A.H., Tempest, D.W. pp. 254-300. London: Academic press.

Jakobsen, B.K. and Pelham, H.R.B. (1991) A conserved heptapeptide restrains the activity of the yeast heat shock transcription factor. *The EMBO Journal* **10**, 369-375.

Jentsch, S., Seufert, W., Jungmann, J. and Klingner, B. (1991) Ubiquitin conjugating enzymes mediate essential functions of the stress response. In: *Heat Shock* ed. Maresca, B., Lindquist, S., pp 77-93. Berlin: Springer-Verlag.

Keszenman, D.J., Santos, J.F., Boeira, J.M., Saffi, J. and Henriques, J.A.P. (1994). Heat shock changes the response of the *pso 3* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to 8-methoxysoralen photoaddition. *Current Genetic* **26**, 100-104.

Kiang, J.G. and Tsokos, G.C. (1998) Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology Therapeutics* **80/2**, 183-201.

Kuchler, K. and Piper, P. W. (2004). Screening the yeast deletant mutant collection for hypersensitivity and hyper-resistance to sorbato, a weak organic acid food preservative. *Yeast* **21**, 927-946.

Lafaye, A., Junot, C., Pereira, Y., Lagniel, G., Tabet, J.C., Ezan, E. and Labarre, J. (2005) Combined Proteome and Metabolite-profiling Analyses Reveal Surprising Insights into Yeast Sulfur Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **280 (26)**, 24723-24730.

Lewis, J.G., Learmonth, R.P., Attfield, P.V. and Watson, K. (1997) Stress co-tolerance and trehalose content in baking strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **18**, 30-36.

Mager, W.H. and Siderius, M. (2002) Novel insights into osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Research* **2**: 251-257.

Maresca, B. and Lindquist, S. (1991) *Heat Shock*. pp. 320. Berlin: Springer-Verlag.

Martínez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. and Estruch, F. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins

Msn2 and Msn4 are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *The EMBO Journal* **15**, 2227-35.

Menezes, M. and Oliveira, S.M.A. (1993) *Fungos fitopatogênicos*. pp 277. Recife: Imprensa Universitária UFRPE.

Mollapour, M., Fong, D., Balakrishnan, Harris, N., Thompson, S., Schüller, C., Kuchler, K. and Piper, P. W. (2004) Screening the yeast deletant mutant collection for hypersensitivity and hyper-resistance to sorbato, a weak organic acid food preservative. *Yeast* **21**, 927-946.

Morimoto, R.I. (1993) Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* **259**, 1409-1410.

Moskvina, E.M. and Ruis, H. (1999) Stress factor actin at the level of the plasma membrane induce transcription via the stress response element (STRE) of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **32**, 1263-1272.

Nagashima, M. (1990) Progress in ethanol production with yeasts. In: *Yeast: Biotechnology and Biocatalysis* ed. Verachtert, H. and De Mot, R. pp. 3-84. New York: Marcel Dekker Inc.

Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2004) Buffering against pH changes in biological systems. In: *Principles of biochemistry* ed. Lehninger, A.L. pp 47-74. New York: W.H. Freeman and Company.

Nevoigt E., Stahl U. (1998). Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Review* **21**:231-41.

Nover, L. and Scharf, K.D. (1991) Heat shock proteins. In: *Heat Shock Response* ed. Nover, L. pp. 41-127. Boston: CRC Press.

Oliver, S.G. (1996) From DNA sequence to biological function. *Nature* **379**, 596-600.

Palhano, F.L., Orlando, M.T.D. and Fernandes, P.M.B. (2004) Induction of baroresistance by hydrogen peroxide, ethanol and cold-shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* **233**, 139-145.

Perez-Ortin, J.E., Matallana, E. and Franco L (1989) Cromatin structure of yeast genes. *Yeast* **5**, 219-238.

Phaff, H.J. (1990) Isolation of yeast from natural source. In: *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*. pp. 53-59. New York: Labeda US McGraw-Hill Inc.

Pataro C., Guerra, J.B., Petrillo-Peixoto M.L., Mendonça-Hagler, L.C., Linardi, V.R. and Rosa, C.A. (2000). Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associate with artisanal fermentation in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* **89** 24-31.

Piper, P., Calderon, C.O., Hatzixanthis, K. and Mollapour, M. (2001) Weak acid adaptation: the stress response that confers yeast with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology* **147**, 2635-2642.

Piper, P., Mahé, M., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Mühlbauer, M., Coote, P. and Kuchler, K. (1998) The Pdr12 ABC transporter is required for development of weak organic acid resistance in yeast. *The EMBO Journal* **17**, 4257-4265.

Remize, F., Roustan, J. L., Sablayrolles, J. M., Barre, P., and Dequin, S. (1999) Glycerol Overproduction by Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains Leads to Substantial Changes in By-Product Formation and to a Stimulation of Fermentation Rate in Stationary Phase. *Applied and Environmental Microbiology* **65** 143-149.

Ruis, H. and Schüller, C. (1995) Stress signalling in Yeast. *Bioassays* **17/11** 959-65.

Sampedro, J.G., Cortés, P. and Muñoz-Clares RA (2001) Thermal inactivation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Kluyveromyces lactis*. Protection by trehalose. *Biochimica et Biophysica Acta* **1544**, 64-73.

Silva-Filho, E.A., Santos, S.K.B., Resende, A.M., Morais, J.O.F., Morais Jr, M.A. and Simões D.A. (2005) Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek* **88**, 13–23.

Singh, J., Kumar, D., Ramakrishnan, N., Singhal, V., Jervis, J., Garst, J.F., Slaughter S.M., De Santis, A.M., Potts, M. and Helm, R.F. (2005) Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to desiccation and rehydration. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 8752-63.

Stephen, D.W.S., Rivers, S.L., Jamieson, D.J. (1995). The role of the *YAP1* and *YAP2* genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **16**, 415-423.

Swan, T.M. and Watson, K. (1998) Stress tolerance in yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiology Letters* **169**, 191-197.

Thevelein, J.M., Winde, J.H. (1999) Novel sensing mechanisms and targets for cAMP-protein Kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **33**, 904-918.

Verduyn, C. (1991) *Energetic Aspects of Metabolic Fluxes in Yeast.*, pp. 85-103. Delft: Delft University of technology.

Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A., Van Duken, J.P. (1992) Effects of benzoic acids on metabolic fluxes in yeast: a continues-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* **8**, 501-517.

Walker, G.M. (1998) Yeast: physiology and biotechnology. pp. 203-264. Chichester: John Wiley & Sons Ltda.

Winzeler, E., Shoemaker, D.D., Astromoff, A. and Liang, H. (1999) Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**, 901-906.

Yaguchi, S. and Tsurugi, K. (2003) Gts1p activates SNF1-dependent derepression of HSP104 and TPS1 in the stationary phase of yeast growth. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 29760-8.

Zhang, W., Needham, D.L., Ciffin, M., Rooker, A., Hurban, P., Tanzer, M.M. and Shuster JR (2003). Microarray analyses of the metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* to organic solvent dimethyl sulfoxide. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **30**, 57-69.

Zuzuarregui, A., Monteoliva, L., Gil, C. and Del Olmo ML (2006) Transcriptomic and Proteomic Approach for Understanding the Molecular Basis of Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to Wine Fermentation. *Applied Environmental Microbiology* **72**, 836-47.

Zuzuarregui, A. and Olmo, M. (2004) Analyses of resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **85**, 271-280.

## 5. ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1. 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**. 2005.

5.2. Resposta fisiológica e expressão gênica de *S.cerevisiae* em baixo pH, ajustado com ácido sulfúrico. **Letters in Applied Microbiology (a ser enviado)**

5.3. Isolamento e caracterização fisiológica e genética de um mutante de *Saccharomyces cerevisiae* resistente a ácido inorgânico forte **Journal of Applied Microbiology (a ser enviado)**

Eurípedes Alves da Silva Filho

Hélio Fernandes de Melo · Daiane Felberg Antunes

Scheila Karina Brito dos Santos

Alecsandra do Monte Resende · Diogo Ardaillon Simões

Marcos Antonio de Moraes Jr

## Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation

Received: 8 April 2005 / Accepted: 31 July 2005 / Published online: 21 September 2005

© Society for Industrial Microbiology 2005

**Abstract** Fuel ethanol fermentation process is a complex environment with an intensive succession of yeast strains. The population stability depends on the use of a well-adapted strain that can fit to a particular industrial plant. This stability helps to keep high level of ethanol yield and it is absolutely required when intending to use recombinant strains. Yeast strains have been previously isolated from different distilleries in Northeast Brazil and clustered in genetic strains by PCR-fingerprinting. In this report we present the isolation and selection of a novel *Saccharomyces cerevisiae* strain by its high dominance in the yeast population. The new strain, JP1 strain, presented practically the same fermentative capacity and stress tolerance like the most used commercial strains, with advantages of being highly adapted to different industrial units in Northeast Brazil that used sugar cane juice as substrate. Moreover, it presented higher transformation efficiency that pointed out its potential for genetic manipulations. The importance of this strain selection programme for ethanol production is discussed.

**Keywords** Ethanol fermentation · Molecular typing · Strain selection · Stress tolerance · Yeast transformation

### Introduction

Bioethanol is now considered a profitable commodity by its increasing use as renewable energy source and car fuel. Brazil is the biggest world producer, with over 15 billions liters per year produced by more than 300 distilleries concentrated in southern and northeast regions. This last region presents over 70 distilleries and represents one of the most important ethanol-producing region the world. Sugar cane juice and sugar cane molasses are the substrates for yeast fermentation in Brazil that can last for 6 months [1]. An important characteristic of the process is its non-sterile condition, which makes it susceptible to contamination by non-*Saccharomyces cerevisiae* yeasts. Moreover, the incoming of wild strains of *S. cerevisiae* produces a succession in the yeast population, where high genetically and physiologically adapted strains tend to dominate [2].

The most important aspect of the fuel-ethanol fermentation is ethanol yield, or more generally the industrial yield. It is dependent, among many factors, on the fermentative capacity of the yeast population [3] and the resistance of those industrial cells to stress conditions [4, 5]. After being exposed to different types of stress, yeast cells build up a rapid cellular response that aims to protect cell components against damages, which involves production of protective proteins, like heat shock proteins, and synthesis or degradation of metabolites, such as glutathione and threalose [6–8]. Thermotolerant yeasts have been identified and their potential for fermentation process reported, although a few of them have been selected for industrial use [4, 9].

The isolation and selection of yeast strains takes advantage of the many DNA-based typing methods already available [10]. Microsatellite-based primers are

E. A. da S. Filho · D. F. Antunes · D. A. Simões

M. A. de Moraes Jr. (✉)

Setor de Biologia Molecular/LIKA, Recife, PE, Brazil

E-mail: morais@lika.ufpe.br

Fax: + 55-81-2718522

H. F. de Melo · S. K. B. dos Santos · A. do M. Resende  
M. A. de Moraes Jr.

Departamento de Genética,

Universidade Federal de Pernambuco Av. Moraes Rego, s/n,  
Cidade Universitária, 50732-970 Recife, PE, Brasil

D. A. Simões

Departamento de Bioquímica,  
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

wide spread on this subject due to their potential to generate fingerprinting patterns with well-accepted intraspecific discriminatory power. The (GTG)<sub>5</sub> primer was successfully used to discriminate wine and brew [11] and fuel-ethanol [2] isolates of *S. cerevisiae*, while primers like (GACA)<sub>4</sub> failed in this field [11, 12].

In this work, we report the selection of a yeast strain with high dominance in yeast population of industrial fuel-ethanol production and its molecular identity by the use of three PCR-fingerprinting markers. This strain, named JP1, showed the same stress resistance than the most used commercial strain in Brazil, and high stability to the process. Together with its potential for genetic manipulation, the physiological characteristics of JP1 accredit it to be used as a new industrial strain for bio-ethanol production.

## Material and methods

### Strains and cell maintenance

Commercial *S. cerevisiae* strains PE-2, SA-1 and BG-1 were kindly provided by Lallemand, Inc. (Canada) through its representative in Brazil. *S. cerevisiae* IA1238 strain was kindly provided by Department of Antibiotics Culture Collection (UFPE) and the industrial strains were isolated from distillery Japungu Agroindustrial (Santa Rita-PB, Brazil). Must samples were plated onto WLN medium containing nalidixic acid and ampicillin (both at 50 µg ml<sup>-1</sup>) after appropriate dilutions. Individual colonies were typed by their morphology and genotyped by PCR-fingerprinting as recently described [2]. The strains were maintained in YPD plates. *E. coli* strain DH5 $\alpha$  was used as host for genetic manipulations [13].

### Physiological analysis

Specific growth rates were calculated from cell growth in mineral medium containing 2% glucose [14] or in diluted molasses medium containing glucose to 69 g l<sup>-1</sup> and ammonium sulphate to 5 g l<sup>-1</sup>. Cells from late log phase cultures were diluted to fresh medium to OD<sub>660 nm</sub> of 0.1 and incubated at 30°C. Samples were withdrawn each 60 min to measure OD at 660 nm. The slope of the exponential curve defined maximum specific growth rate ( $\mu$ , h<sup>-1</sup>). Each experiment was performed twice and the mean values were shown.

To test the fermentative capacity of the *S. cerevisiae* strains, cells from late log phase cultures were collected by centrifugation, washed with sterile distilled water and suspended to 20% (w/v) in saline. The cell suspensions were used to inoculate mineral medium containing 12% sucrose (final concentration) to a final biomass concentration of 10% (w/v). The suspensions were incubated at 34°C under slow agitation. The brix was measured with a manual refractometer and the fermentation was considered finished by repeating the brix between

samples. At the end of the fermentation, the cell suspensions were harvested and the supernatants were used for further analysis. Ethanol was determined by gas chromatography at Japungu distillery, while glycerol and sucrose were determined by triglycerides analysis kit (Biobras, Brazil) and by DNSA method [15], respectively. Each experiment was performed twice and the mean values were shown.

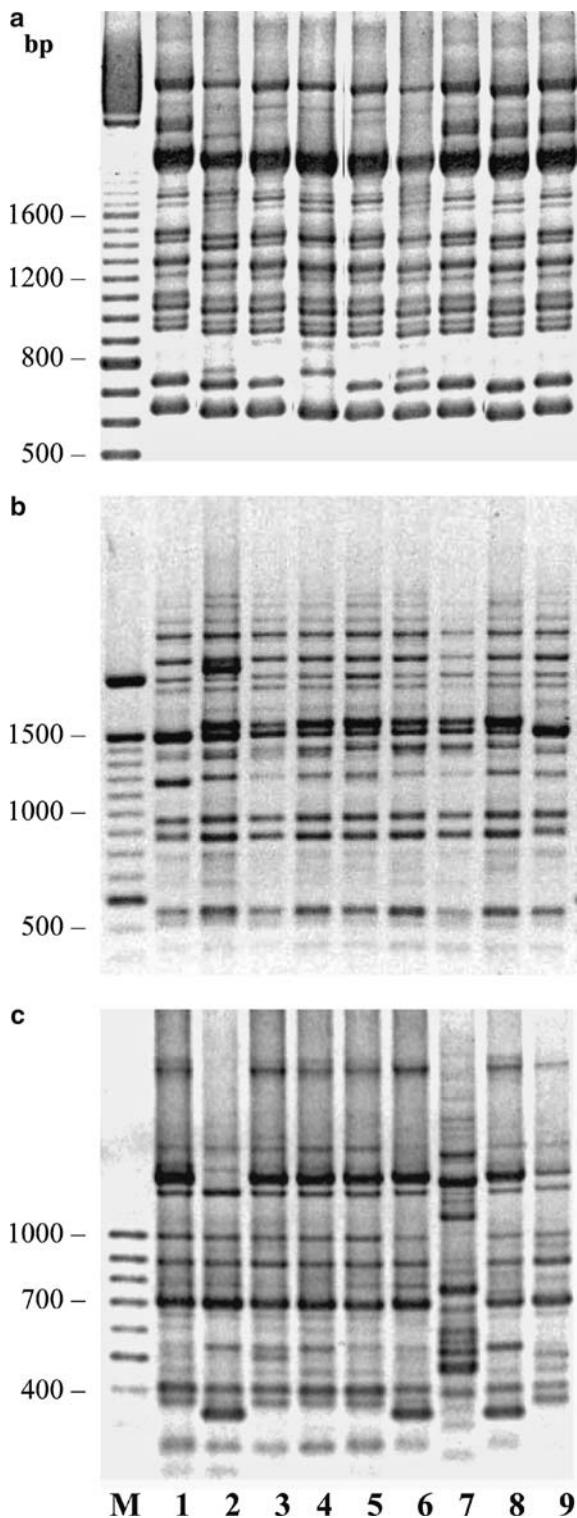
To test for stress resistance, late log phase yeast cells were suspended at 1×10<sup>8</sup> cell ml<sup>-1</sup> in water or 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution (acidic water at pH 2). Cell suspensions were incubated at 37 or 42°C in the presence or absence of ethanol to 7% (v/v) final, in different combinations. At defined periods, samples were withdrawn and yeast cells spread onto YPD-containing plates after appropriated dilutions. The number of colony forming units was determined and the percentage of cell survivor was calculated by using untreated cells as control (100%). Each experiment was performed twice and the mean values were shown.

### Molecular methods

DNA extraction and PCR-fingerprinting analysis were performed as described by Silva-Filho et al. [2]. Plasmids pUG6 and pNatCre have been described elsewhere [16, 17]. The primers EDPf1 and EDPRev1 contained a 40 bp sequences downstream of the 5'-ATG and upstream of the 3'-TAA termini of the *S. cerevisiae* *GDH1* gene, respectively, followed by 20 bp nucleotide sequences used to amplify the 1.6 kb integrative cassette *loxP*-Kan<sup>r</sup>-*loxP* from pUG6, similar to that described by Steensma and Ter Linde [17]. Yeast cell transformations were performed by lithium acetate method [18], with some modifications. The transformed cells were suspended in YPD and cultivated for 2 h at 30°C before plating onto YPD supplemented with Geneticin (200 µg ml<sup>-1</sup>) for integrative transformation or Clonat (50 µg ml<sup>-1</sup>) for pNatCre. The plates were incubated at 30°C until colony appearance. Each experiment was performed three times and the mean values were shown.

## Results and discussion

Samples were collected from the fermentation must at Japungu Agroindustrial distillery during the harvesting period 2000–2002 and plated onto WLN medium. Cells from individual colonies were typed by PCR-fingerprinting [2] and for molecular karyotyping for strain discrimination (data not shown). One of the most frequent microsatellite primer (GTG)<sub>5</sub> amplification patterns was classified as P18 [2] and one of its isolate, MF114(2), was named JP1 strain. Further fingerprinting analysis was done to compare the genetic background of JP1 strain to the commercial *S. cerevisiae* strains used for industrial ethanol

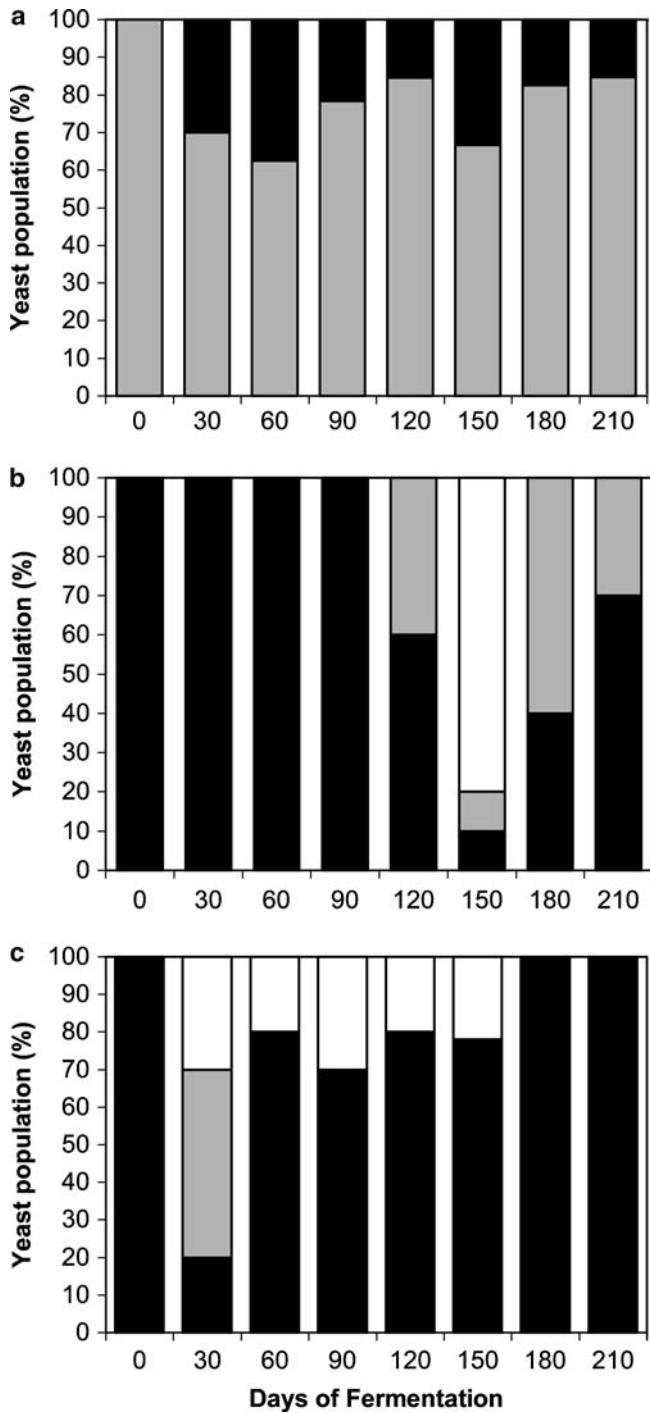


**Fig. 1** PCR-fingerprinting with primers  $(GTG)_5$  (a), intron E-1 (b) and  $(GACA)_4$  (c) of the industrial yeast strains IA1238 (lane 1), JP1 (lane 2), VR-1 (lane 3), CAT-1 (lane 4), CR-1 (lane 5), SA-1 (lane 6), PE-2 (lane 7), BG-1 (lane 8) and FT-001 (lane 9). Molecular weight ( $M$ ) of commercial standards is given at the left side in base pairs (bp)

production to date (Fig. 1). The concomitant use of the three PCR primers  $(GTG)_5$ , intron E1 and

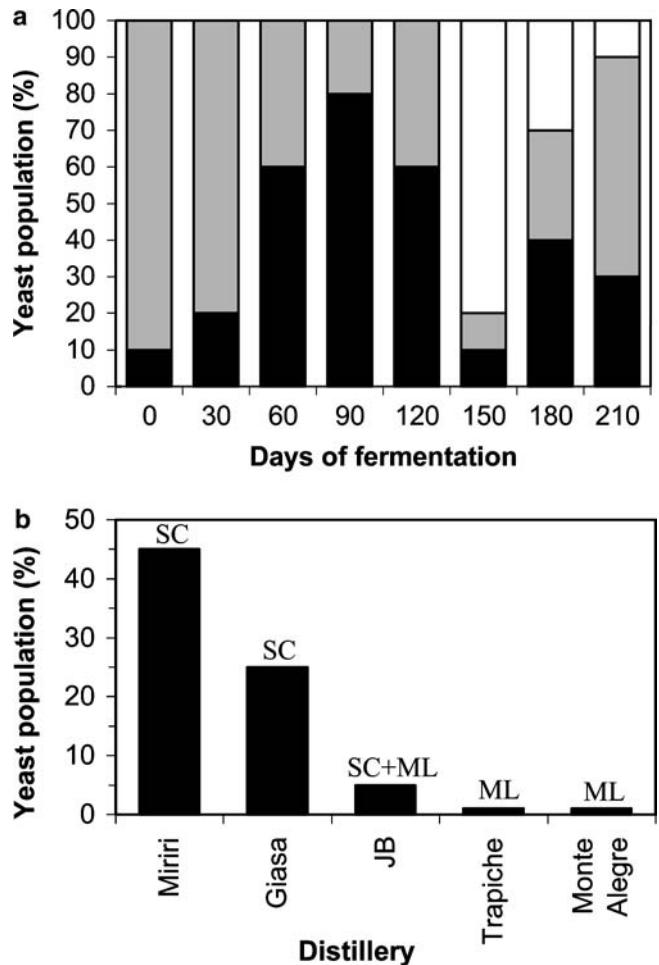
$(GACA)_4$  was able to unequivocally discriminate all yeast strains. It was especially true for VR-1 and CR-1 and for JP1 and FT-001 industrial strains. Both VR-1 and CR-1 strains showed the same  $(GTG)_5$  classified as P28A [2], but differed in their amplification patterns by the use of intron E1 and  $(GACA)_4$  primers (Fig. 1, lines 3 and 5). In the second case, JP1 and FT-001 were discriminated by all three primers (Fig. 1, lines 2 and 9). The microsatellite primer  $(GTG)_5$  has been successfully used to discriminate yeast strains [2], while the microsatellite primer  $(GACA)_4$  did not succeed in this subject. This last primer showed lower discriminatory power than  $(GTG)_5$  when applied to *S. cerevisiae* [11] and to *Cryptococcus neoformans* [12]. The intron splice site primer E11 produced species-specific amplification patterns useful for species but not strain discrimination, due to its low degree of polymorphism [19]. However, in this work both the primers were important to differentiate industrial yeast strains when  $(GTG)_5$  failed to do so. It is in accordance with the necessity of using more than one molecular marker to a complete differentiation of yeast strains [10, 20].

We have previously shown that different strains are adapted to a particular industrial process [2]. For example, our previous work on microbiological control of the fermentation process revealed that some baker's strains and the PE-2 strain, the most used commercial strain in Southern Brazil, are not adapted to industrial conditions in Northeast Brazil (unpublished results). In the harvesting period 2001–2002, JP1 strain accounted for 12.5% of the yeast population in the whole fermentation process (Fig. 2a). Thus, Japungu distillery used this strain as starter in the crop harvesting period 2002–2003 for bioethanol production and industrial samples were typed to follow the fate of the yeast population. As it can be seen from Fig. 2b, the industrial yeast population started with 100% JP1 cells, which remained unaltered for over 3 months. Even after a severe contamination episode, JP1 sub-population recovered to dominate the whole population at the end of fermentation. The overall sugar-conversion efficiency was around 93% at the distillery, which is normally considered high for the fermentation conditions used in Northeast Brazil distilleries. In the following harvesting period 2003–2004, again the distillery used JP1 as started strain. JP1 cells, contaminant cells and new-coming *S. cerevisiae* strains composed the yeast population at the end of the first 30 days. However, JP1 strain recovered its dominance in the course of the fermentation process (Fig. 2c), with the overall sugar-conversion efficiency around 92% at that period. That surveillance of the yeast population over three consecutive harvesting periods showed the robustness of JP1 strain in the Japungu fermentation plant. In another distillery nearby, Miriri distillery, JP1 cells were detected at high frequency in the fermentation must (Fig. 3a). Both distilleries are less than 20 km faraway and share crop fields, which may explain the common origin of JP1 strain. On the other hand, this strain was not found at



**Fig. 2** Frequency of JP1 cells (black columns) in the yeast population of Distillery Japungu in the course of fermentation process at 2001–2002 (a), 2002–2003 (b) and 2003–2004 (c) harvesting periods. The sum of other *S. cerevisiae* strains (grey columns) and the presence of non-*S. cerevisiae* contaminant yeasts (white columns) were also plotted

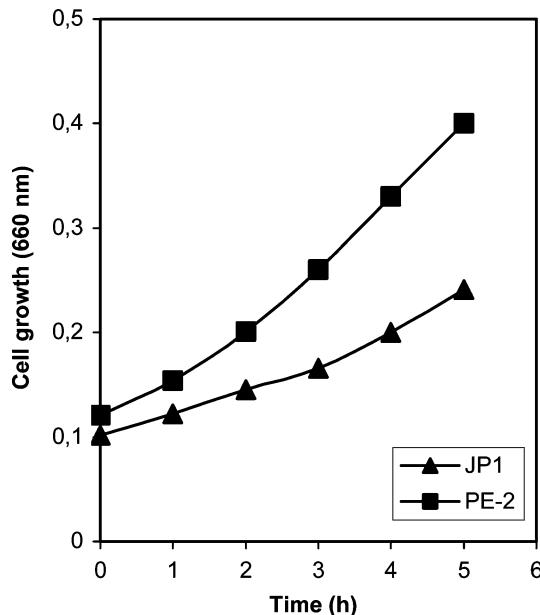
high frequency in distilleries that used molasses as fermenting substrate (Fig. 3b). That substrate-specificity has been previously shown by our group [2], and may be a consequence of differences in yeast tolerance to toxic compound found in molasses, formed during sugar



**Fig. 3** Frequency of JP1 cells in the yeast population of different distilleries in the course of fermentation process of the crop harvesting period 2002–2003. a Frequency of JP1 cells at Distillery Miriri. b Average of JP1 cells in the whole fermentation process in the crop harvesting period 2002–2003 at distilleries that uses sugar cane juice (SC), molasses (ML) or a mixture of both substrates (SC+ML)

production that generates molasses as by-product. Growing yeast cells on molasses medium tested this characteristic and the results showed that JP1 strain growth ( $0.16 \text{ h}^{-1}$ ) was half of that observed for PE-2 ( $0.23 \text{ h}^{-1}$ ) (Fig. 4), a strain originally isolated from molasses-using distillery in São Paulo state. However, they showed almost the same growth rate when using diluted sugar cane juice containing 5% sucrose (c.a.  $0.3 \text{ h}^{-1}$ ). It reinforced the specificity of JP1 for sugar cane using distilleries.

Thermotolerant yeast strains have been selected from an enrichment and isolation program in sugar cane molasses distillery in Egypt [21]. The heat-resistant isolate was used for bioethanol production with economical advantages for the distillery. Together, those results demonstrate that continuous selection program to isolate more adapted autochthonous strains may be an efficient way to achieve higher ethanol production. Such dominant strains are natural target for future genetic



**Fig. 4** Growth curve of JP1 and PE-2 strains in shake flask containing molasses diluted to 5% sugar concentration

manipulations, which ensures that the recombinant strain will stay in the process. Further experiments were done to test the resistance of JP1 cells to industrial stressing conditions. Almost no difference was detected between JP1 and PE-2 strains to heat, ethanol and acid tolerance (Fig. 4). Only a slight higher resistance of JP1 was observed when combining low pH with high temperature (Fig. 4), without major significance. This behaviour is especially important to fermentation processes at hot areas such as Northeast Brazil and Central America [1]. The results showed that the toxic effect of low pH or the presence of ethanol was magnified by increasing the temperature from 37 to 42°C. The cell viability dropped to 90% after incubation at 42°C for both the strains and practically no killing affect was observed after incubation at 37°C (data not shown).

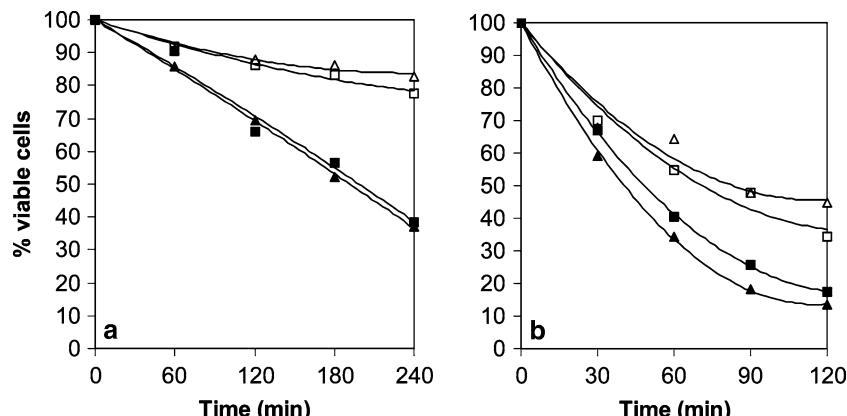
By its performance at the industrial yeast population, JP1 was considered a promising strain to be used as

starter yeast for industrial processes that use sugar cane juice as substrate and it has been used by some distilleries in Northeast Brazil thenceforward. The most used fuel-ethanol commercial yeast strain in Brazil to date, PE-2 strain, has been used as starter strain in some distilleries in Northeast Brazil, two of which (Monte Alegre and Giasa) have been accompanied by our work on industrial microbiological control by PCR-fingerprinting. In both distilleries, the population of PE-2 cells decreased from 100% to less than 10% in 30 days of fermentation, without recovering later on. This phenomenon was observed for two consecutive harvesting periods (data not shown).

The most important aspect at industrial level, ethanol yield, was tested for industrial and commercial strains in laboratory conditions. The yeast strain IA1238 was also analysed because it was used for a long time as the starter strain in Japungu Distillery (Table 1). All the strains tested presented fermentation time around 3 h, leaving residual sugar at 0.3–0.5 g l<sup>-1</sup>. JP1 strain did not show the highest ethanol production and yield, probably due to its high growth rate that led to high glycerol production (Table 1). Anyway, its sugar-ethanol conversion-efficiency in laboratory medium was 92%. However, its high fitness-industrial process pointed it as a good platform for future genetic manipulation to increase ethanol production.

Recent experimental evidences showed that genetic manipulation of the nitrogen assimilation pathway in *S. cerevisiae* has consequences to increase ethanol production while decreasing glycerol formation [22]. It involved both cell transformation with episomal plasmid and genetic integration of linear DNA for gene disruption. Additionally, *S. cerevisiae* cells can be modified to ferment xylose to ethanol by expressing plasmid-based or genome integrated heterologous genes [23]. To test JP1 for genetic manipulations, yeast cells were assayed for cell transformability. The results showed JP-1 strain with transformation efficiency with both episomal plasmid and integrative DNA higher than all commercial strains tested (Table 1). The transformation efficiency shown by JP-1 strain was over 10<sup>4</sup> and 10<sup>2</sup> transfor-

**Fig. 5** Yeast cell resistance to ethanolic (a) and acidic (b) stresses. Late log phase cells of JP1 (square) and PE-2 (triangle) strains were suspended in 7% ethanol or 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solutions and incubated at 37°C (open symbols) or 42°C (closed symbols) as described in Materials and Methods



**Table 1** Physiological parameters and genetic transformation efficiency of industrial *S. cerevisiae* strains

<sup>a</sup>Cell transformation with the episomal plasmid pNatCre [17]

<sup>b</sup>Cell transformed with the integrative cassette *loxP*-Kan-MX-*loxP* [16] ND Not done

Strain	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Ethanol (g l <sup>-1</sup> )	Glycerol (g l <sup>-1</sup> )	Ethanol yield Y <sub>Et/suc</sub>	CloNat <sup>r</sup> transf. <sup>a</sup> (μg DNA) <sup>-1</sup>	G-418 <sup>r</sup> transf. <sup>b</sup> (μg DNA) <sup>-1</sup>
BG-1	0.44	59.3	7.19	0.49	0.18×10 <sup>4</sup>	0.01×10 <sup>2</sup>
CR-1	0.47	60.3	7.76	0.50	0.64×10 <sup>4</sup>	ND
PE-2	0.45	56.4	6.76	0.47	ND	ND
SA-1	0.45	60.3	6.40	0.50	0.25×10 <sup>4</sup>	0.33×10 <sup>2</sup>
IA1238	0.45	54.8	7.22	0.46	0.39×10 <sup>4</sup>	ND
JP1	0.49	56.2	7.30	0.47	1.37×10 <sup>4</sup>	2.85×10 <sup>2</sup>

ments per microgram of plasmid and linear DNA, respectively, which is enough for the majority of the desired genetic manipulation procedures [18].

The strain JP1 is now being commercialised as a new fermentative strain for bioethanol production in Brazil in addition to the up-to-date six strains PE-2, CAT-1, BG-1, VR-1, SA-1 and CR-1 used so far for that purpose. Moreover, this strain has been deposited at the Department of Mycology Culture Collection (URM-Recife), Federal University of Pernambuco, which is part of the World Directory of Collections of Culture of Microorganisms (WFCC) under the nr.604, and can be released for research purpose upon request.

**Acknowledgements** The authors thank to Japungu Agroindustrial distillery for the industrial data. This work was supported by grants from BNB/Fundeci funding program, RHAE/CNPq scholarship program and PPP-Facepe program.

## References

1. Wheals EA, Basso LC, Alves DMG, Amorim HV (1999) Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol* 17:482–487
2. Silva-Filho EA, dos Santos SKB, Resende AM, de Moraes JOF, de Moraes Jr MA, Simões DA (2005) Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek* 88:13–23
3. Hack CJ, Marchant R (1998) Characterisation of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*: development of an ethanol fermentation process. *J Ind Microbiol Biotechnol* 20:323–327
4. Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R, McHale AP (1998) Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I—Yeast in general. *World J Microbiol Biotechnol* 13:809–821
5. Brosnan MP, Donnelly D, James TC, Bond U (2000) The stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. *J Appl Microbiol* 88:746–755
6. Swan TM, Watson K (1998) Stress tolerance in yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiol Lett* 169:191–197
7. Estruch F (2000) Stress-controlled transcription factor, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 24:469–486
8. Mager WH, Siderius M (2002) Novel insights into osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Res* 2:251–257
9. Ballesteros I, Oliva JM, Ballesteros M, Carrasco J (1993) Optimization of the simultaneous saccharification and fermentation process using thermotolerant yeast. *Appl Biochem Biotech* 30:201–211
10. Schuller D, Valero E, Dequin S, Casal M (2004) Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol Lett* 231:19–26
11. Lieckfeldt E, Meyer W, Böner T (1993) Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J Basic Microbiol* 33:413–426
12. Meyer W, Mitchell TG (1995) Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. *Electrophoresis* 16:1648–1656
13. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning, a laboratory manual, vols. 1, 2 and 3, 2nd edn. Cold Spring Harbour laboratory Press, Cold Spring Harbour
14. Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP (1990) Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J Gen Microbiol* 136:395–403
15. Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–428
16. Güldener U, Heck S, Fiedler T, Beinhauer J, Hegeman JH (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucl Acids Res* 24:2519–2524
17. Steensma HY, Ter Linde JJ (2001) Plasmids with the Cre-recombinase and the dominant *nat* marker, suitable for use in prototrophic strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 18:469–472
18. Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by the Liac/SS carrier DNA/PEG method. *Methods Enzymol* 350:87–96
19. De Barros-Lopes M, Soden A, Martens AL, Henschke PA, Langridge P (1998) Differentiation and species identification of yeast using PCR. *Int J Syst Bacteriol* 48:279–286
20. Fernandez-Espinat MT, López V, Ramón D, Bartra E, Querol A (2001) Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int J Food Microbiol* 70:1–10
21. Abdel-Fattah WR, Fadil M, Nigam P, Banat IM (2000) Isolation of thermotolerant ethanologenic yeasts and use of selected strains in industrial scale fermentation in an Egyptian distillery. *Biotechnol Bioeng* 68:531–535
22. Nissen TL, Kielland-Brandt MC, Nielsen J, Villadsen J (2000) Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. *Metabol Eng* 2:69–77
23. Kuyper M, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT (2004) Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Res* 4:655–664

Resposta fisiológica e expressão gênica de *S.cerevisiae* em baixo  
pH ajustado com ácido sulfúrico.

Hélio Fernandes de Melo<sup>1</sup>, Diogo Ardaillon Simões<sup>2</sup>, Johan Thevelein<sup>3</sup> e  
Marcos Antonio de Morais Jr<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética e <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade  
Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto de Microbiologia e Botânica, Universidade Católica de Leuven,  
Leuven, Bélgica.

Autor para correspondência:

M.A. de Morais Jr

Departamento de Genética – Universidade Federal de Pernambuco

Av. Moraes Rego, s/n Cidade Universitária 50640-901 Recife PE

Fone/fax: +558121268569

E-mail: [marcos.morais@pesquisador.cnpq.br](mailto:marcos.morais@pesquisador.cnpq.br)

---

Artigo a ser enviado para publicação no *Letters in Applied Microbiology*  
(Blackwell Publishing, USA). ISSN: 0266-8254. Fator de impacto (JCR-2004):  
1,461

## RESUMO

**Objetivos:** Neste trabalho testamos a influência do ácido sulfúrico sobre a velocidade específica de crescimento, produção de etanol e expressão gênica em células de *Saccharomyces cerevisiae*. **Métodos e Resultados:** Células das linhagens JT-95 e JP-1 foram cultivadas em meio mineral pH 2 ajustado com ácido sulfúrico, ou pH 6, ajustado com KOH. A linhagem JP1 apresentou velocidade específica de crescimento maior do que JT-95 em pH 2. A produção de etanol foi menor em pH 2 para ambas as linhagens, porém JP1 produziu mais etanol do que JT95. A análise da expressão gênica de JT95, na presença de ácido sulfúrico, utilizando a técnica de DNA microarray, mostrou que a maioria dos genes do metabolismo de assimilação de sulfato e da biossíntese de aminoácidos sulfurados foi reprimida, porém não se verificou a repressão dos genes envolvidos no metabolismo fermentativo. Apenas três genes de resposta ao estresse, *SSB1*, *ALD6* e *ALD3* foram induzidos. Os genes *ERR1* e *ERR3* apresentaram o maior grau de expressão em pH 2, ambos codificando proteínas de funções desconhecidas. **Conclusões:** Apesar de causar problemas para o crescimento celular, o ambiente ácido não parece interferir significativamente na capacidade fermentativa de *S. cerevisiae*, embora JT95 tenha levado mais tempo para se adaptar ao meio de fermentação com pH2. A indução dos genes da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*ADL6* e *ADL3*) indica que as isoenzimas Adl6p e Adl3p desempenham um papel muito importante na resposta ao estresse por ácido inorgânico. A resposta fisiológica ao estresse ácido foi correlacionada à mudança do perfil de expressão gênica de *S. cerevisiae*. **Significância e impacto do estudo:** A falta de correlação do estresse ácido com o aumento da expressão de outros genes da resposta geral

ao estresse e as ORFs não caracterizadas dificultam a identificação de um sistema específico de resposta ao estresse causado por ácido inorgânico forte. Portanto, o futuro isolamento de mutantes resistentes a ácido deve ser a melhor opção para a identificação dos genes de resistência a este tipo de estresse.

**Palavras-chave:** estresse ácido, levedura, fermentação alcoólica, microarray.

## INTRODUÇÃO

Durante a fermentação alcoólica industrial por *Saccharomyces cerevisiae* as células são submetidas a diversos tipos de estresses como choque térmico, pressão osmótica, presença de etanol e baixo pH, que podem afetar o crescimento e a viabilidade celular, sendo importante à seleção de linhagens de leveduras resistentes ao estresse industrial (Silva-Filho et al. 2005a). Linhagens comerciais de *S. cerevisiae* têm sido selecionadas com base em suas características fisiológicas para uso em processos de fermentação industrial, porém pouco é conhecida a resposta molecular à condição de estresse durante a fermentação (Zuzuarregui et al. 2006).

A presença de ácidos orgânicos em meio com baixo pH constitui fator de estresse para *S. cerevisiae*. O ácido orgânico não dissociado penetra no meio intracelular por difusão passiva, onde se dissocia, diminuindo o pH citosólico. A homeotase do pH intracelular pode ser restaurada através da extrusão de prótons H<sup>+</sup>, pela enzima H<sup>+</sup>-ATPase, e do íon correspondente, pela proteína Pdr12 (Piper et al 2001). O mecanismo de extrusão é dependente de ATP e a

falta de uma fonte de energia, como a glicose, em meio ácido pode reduzir o pH citossólico, comprometendo a ação de enzimas envolvidas nas diferentes vias metabólicas na célula e de proteínas de extrusão de ácidos orgânicos (Henriques *et al* 1997, Mollapour *et al* 2004). Em meio rico em glicose os efeitos do baixo pH extracelular são minimizados, possibilitando o funcionamento da via glicolítica e a produção de etanol por *S. cerevisiae* (Piper *et al* 1998, Piper *et al* 2001). A análise da resposta fisiológica ao estresse em linhagens mutantes de leveduras tem sido eficaz na identificação de genes envolvidos na resposta ao estresse ácido. Mollapour *et al* (2004) identificaram 237 mutantes de *S. cerevisiae* incapazes de crescer na presença de 2 mM de sorbato em pH 4,5 e 34 mutantes mais resistentes a sorbato do que o tipo selvagem parental. Os mutantes sensíveis a sorbato apresentavam mutações em genes envolvidos na glicólise, na via da pentose-fosfato, na proteção antioxidante, no metabolismo mitocondrial, na transcrição e na remodelagem da cromatina (Mollapour *et al* 2004).

A função gênica de resistência ao estresse também pode ser analisada através da técnica de DNA-microarray. Em condições de estresse por dimetilsulfoxido (DMSO), a análise de DNA-microarray mostrou que 1.338 genes de *S. cerevisiae* foram significativamente regulados, sendo 400 deles envolvidos na resposta geral ao estresse (Zhang *et al.* 2003). Em resposta ao cádmio, células de *S. cerevisiae* utilizam o sulfato assimilado para sintetizar a glutationa, uma proteína essencial na desintoxicação de metais pesados. Além disso, a síntese de proteínas sulfuradas é diminuída, havendo uma correlação positiva entre síntese protéica e conteúdo de metabólitos sulfurados na célula (Lafaye *et al.* 2005). Em células crescendo em meio com metionina como fonte

de enxofre não houve correlação entre expressão gênica e acúmulo de metabólitos, indicando a existência de mecanismos diferentes de regulação gênica na via de assimilação do sulfato (Lafaye et al. 2005).

Neste trabalho nos analisamos a resposta molecular ao estresse ácido, através de DNA microarray, e a resposta fisiológica de duas linhagens de *S.cerevisiae*, uma industrial e outra de laboratório, ao estresse causado por ácido inorgânico forte.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Linhagens utilizadas**

Foram utilizadas a linhagem diplóide de *S. cerevisiae* JT95 (MAT $\alpha$ / $ura3\Delta 0/ura3\Delta 0$ ,  $his3\Delta 1/his3\Delta 1$ ,  $leu2\Delta 0/leu2\Delta 0$ ,  $MET15/met15\Delta 0$ ,  $LYS2/lys2\Delta 0$ ) derivada da linhagem S288c utilizada para o seqüenciamento do genoma de *S. cerevisiae* e a linhagem industrial JP1, isolada em destilaria de álcool combustível (Silva-Filho et al 2005b).

### **Crescimento celular em baixo pH**

As células, na fase exponencial de crescimento, foram inoculadas em meio mineral para crescimento descrito por Verduyn et al (1992), ajustado para pH 2 com ácido sulfúrico ou para pH 6 com KOH, na densidade óptica inicial de 0,1 a 600nm (DOI<sub>600</sub>), e incubadas a 30 °C sob agitação. Amostras foram tomadas regularmente ao longo do cultivo para a determinação da densidade óptica e determinação da velocidade específica de crescimento.

## **Fermentação alcoólica em baixo pH**

A fermentação alcoólica foi realizada em meio para fermentação segundo Verduyn et al (1992). O pH foi ajustado para 2,5 com ácido sulfúrico ou para pH 6 com KOH e o inóculo celular consistiu de uma concentração celular inicial de 10% (v/v). Durante a fermentação alíquotas foram coletadas para a determinação da concentração de etanol por cromatografia gasosa em equipamento Varian 3600 e de glicerol por kit de dosagem enzimática (GPO-PAP, Laborlab, Brasil).

## **DNA-microarray**

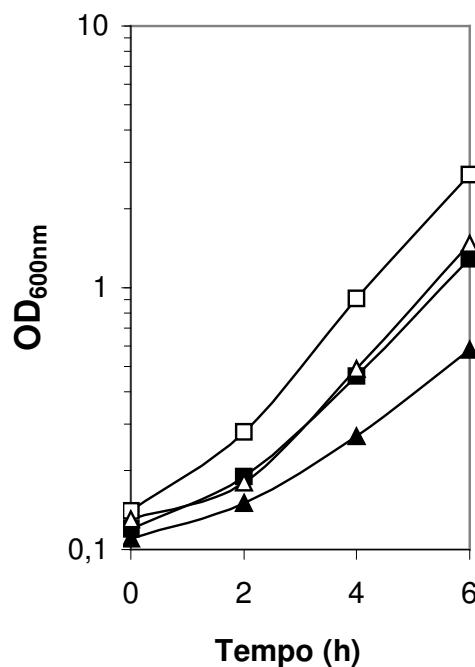
Células da linhagem JT95 foram coletadas após 90 minutos de fermentação em meio com pH 2 foram coletadas e submetidas à extração de RNA total utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante. As amostras foram enviadas para o *Microarray Facility VIB* da Universidade de Leuven (Bélgica) (<http://www.microarrays.be/>) para serem analisadas a partir da plataforma Affymetrix GeneChip®. Os resultados são apresentados em termos de variação linear positiva (indução) ou negativa (repressão) da expressão gênica.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Crescimento celular em baixo pH**

O crescimento em baixo pH das linhagens de *S. cerevisiae* foi avaliado e mostrou que a linhagem JP1 apresentou velocidade específica de crescimento de  $0,48 \text{ h}^{-1}$ , 30% superior à da linhagem de laboratório JT95 que cresceu a

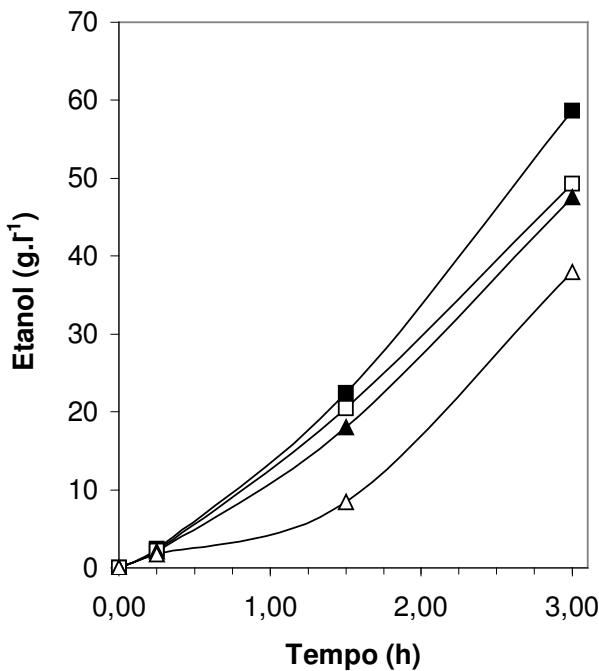
uma velocidade de  $0,34\text{ h}^{-1}$  (Figura 1). Entretanto, a linhagem JP1 já apresenta uma velocidade específica de crescimento 20% maior do que a de JT-95, em condições normais de crescimento. Este resultado mostra que o baixo pH extracelular em si não é o maior responsável pela queda do crescimento celular, mas sim a própria constituição genética da linhagem. As linhagens industriais de *S. cerevisiae*, geralmente, são mais tolerantes ao estresse do que as linhagens de laboratório (Carrasco et al 2001, Hirasawa et al 2005). Os resultados de crescimento em baixo pH, obtidos neste trabalho, confirmam uma grande tolerância de JP1 ao estresse ácido, como mostrado anteriormente (Silva-Filho et al 2005b).



**Figura 1.** Curvas de crescimento das linhagens JP1 (quadrados) e JT-95 (triângulos) em meio mineral ajustado para pH inicial de 6 (símbolos abertos) com KOH ou 2 (símbolos fechados) com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

## Fermentação alcoólica em baixo pH

A linhagem JP1 apresentou produção de etanol maior em relação a JT-95 quando o meio de cultura foi ajustado para pH inicial de seis. Esta produção foi reduzida em torno de 18% para ambas as linhagens quando o pH inicial do meio foi ajustado para 2,5. Em baixo pH inicial a linhagem JP1 produziu mais etanol (49,3 g/L) do que JT95 (38 g/L). Entretanto, nos primeiros 90 minutos de fermentação a linhagem JT95 apresentou uma baixa produção de etanol (8,4 g/L) em pH 2, cerca de 40% menor do que JP1 (20,5 g/L) (Figura 2).



**Figura 2.** Produção de etanol das linhagens JP1 (quadrados) e JT-95 (triângulos) em meio mineral ajustado para pH inicial de 6 (símbolos abertos) com KOH ou 2 (símbolos fechados) com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Esta baixa produção pode estar relacionada à falta de uma resposta celular imediata à condição de baixo pH. Linhagens de *S. cerevisiae*

apresentam diferenças no padrão de resposta ao estresse. Segundo Hirasawa et al. (2005), após a adição de 1 M de NaCl no meio de cultura de células na fase exponencial de crescimento, a linhagem de laboratório FY834 retomou o crescimento após 4 horas de cultivo na presença do sal, enquanto a linhagem de cervejaria IFO2347 levou a metade desse tempo para recuperar o crescimento. A análise da expressão gênica em vários intervalos durante a primeira hora da fermentação poderia fornecer resultados mais consistentes para a uma melhor compreensão da dinâmica de resposta ao estresse ácido dessas leveduras durante a fermentação alcoólica em baixo pH.

### **Expressão gênica em baixo pH**

A análise da expressão gênica através da técnica de DNA-microarray mostrou que menos de 1% dos genes da linhagem JT95 de *S. cerevisiae* apresentou mudança no grau de expressão após 90 minutos de fermentação em pH 2 quando comparado à condição padrão da fermentação a pH inicial de 6. Nessa condição, trinta e cinco genes foram reprimidos, entre eles seis ORFs ainda não caracterizadas, sendo a maioria dos genes codificadores de proteínas da via de assimilação do sulfato e da síntese dos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína (Tabela 1). O possível bloqueio na via de síntese dos aminoácidos sulfurados poderia gerar uma situação de auxotrofia parcial para metionina e cisteína. Por conta disso, as células de JT-95 foram cultivadas em meio mineral suplementado com estes dois aminoácidos. No entanto, os resultados mostraram que não houve retomada da velocidade de crescimento em pH 2 na presença desses aminoácidos (dados não mostrados).

Isto mostra que a redução no crescimento celular não tem relação com a inibição dos genes destas vias metabólicas.

Os genes envolvidos no metabolismo do sulfato que apresentaram os maiores graus de repressão em pH 2 foram *MET3* (-17,09), o qual codifica a ATP sulfurlase, *MET10* (-11,1) e *ECM17* (-12,21), que codificam as subunidades alfa e beta da enzima sulfito redutase, respectivamente (Figura 3). A ATP sulfurlase catalisa o primeiro passo da ativação intracelular do íon sulfato (Cherest et al. 1985). O gene *MET16* que codifica a enzima 3'-fosfo adenosina 5'-fosfossulfato redutase, a qual catalisa a redução de 3'-fosfoadenosilfosfossulfato (PAPS) a sulfito, também foi reprimido (-5,68). Esses genes são regulados pelo produto do gene *MET28*. A proteína Met28 atua como regulador dos genes do metabolismo do sulfato (Kuras et al. 1996; Blaiseau et al. 1997). O gene *MET28* foi significativamente reprimido (-3,17). Nas etapas de síntese, propriamente dita, dos aminoácidos sulfurados os genes que apresentaram maior grau de repressão foram *MET32* (-6,72) que codifica uma proteína reguladora de genes envolvidos na síntese de metionina, *MET6* (-4,77) que codifica a metionina sintetase, *SAM2* (-2,99) que codifica S-adenosilmetionina sintetase e *CYS4* (-3,28) para cistationina beta-sintetase, a qual catalisa a primeira reação de síntese de cisteína. A função da proteína Met32p varia de acordo com gene envolvido na síntese da metionina. Ela se liga à região promotora do gene *MET17*, reprimindo a sua transcrição (Blaiseau et al. 1997). Entretanto, esta mesma proteína funciona como ativador dos genes *MET3*, *MET14* e *MET30* (Blaiseau et al. 1997; Thomas e Surdin-Kerjan, 1997; Rouillon et al. 2000). Em resposta ao cádmio, Met32 induz a expressão do gene *GSH1*, que codifica a gama-glutamilcisteína sintetase, a qual catalisa a

primeira reação de síntese de glutationa (Dormer et al. 2000). Na presença de cádmio o sulfato assimilado é utilizado para a síntese de glutationa, a qual funciona na resposta ao estresse oxidativo e na desintoxicação de metais pesados (Dormer et al 2000). Além disso, Met32 pode estar envolvida na regulação de genes do metabolismo do cobre e do ferro (Moler et al. 2000). Em pH 2 o gene *GSH1* foi reprimido (-2,91), o que pode indicar uma deficiência na resposta ao estresse oxidativo nesse pH. Porém o gene *OXR1* foi induzido (2,8), o qual codifica uma proteína que ainda não está bem caracterizada, mas que pode ser importante na reparação de danos causados pelo estresse oxidativo (Volkert et al 2000).

Dos 28 genes induzidos em meio com pH ácido, *ERR3* e *ERR1*, ambos codificando proteínas de funções desconhecidas, mas que são semelhantes as enolases (Pryde et al 1995), apresentaram os maiores graus de expressão, 10,08 e 9,1, respectivamente (Tabela 2). Dos oito genes envolvidos na biogênese de ribossomos, *SKI1* foi o mais induzido (3,38). Quatro genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos foram induzidos: *THI4* (3,55) o qual codifica uma proteína de função desconhecida necessária à síntese de tiamina, *ALD3* (4,12), para uma isoenzima acetaldeído desidrogenase citoplasmática (Ald3) envolvida na síntese de beta alanina (Navarro-Avino et al 1999), *GCV1* (2,25) que codifica a subunidade T do complexo mitocondrial glicina descarboxilase e *SER3* (2,01) que codifica a isoenzima 3-fosfoglicerato desidrogenase (Ser3p) responsável pela primeira reação de síntese de serina e glicina. O gene *SER33*, para uma 3-fosfoglicerato desidrogenase (Ser33p) com a mesma função de Ser3p, foi reprimido (-5,92). Portanto a indução de *SER3* pode compensar a repressão do gene *SER33* em pH 2. O gene *ALD3* é

induzido por diferentes tipos de estresses e reprimido pela glicose (Navarro-Avino et al 1999). Neste trabalho, a alta concentração de glicose no meio ajustado com ácido sulfúrico não reprimiu o gene *ALD3* da linhagem JT95 durante os primeiros 90 minutos de fermentação. Esse resultado indica que, independente da presença de glicose, o gene *ALD3* é induzido pelo estresse ácido. O gene *ALD6* também foi induzido, mas, diferente de *ALD3*, codifica uma isoenzima acetaldeído desidrogenase (Ald6) envolvida na conversão de acetaldeído a acetato.

O estresse ácido causa danos à membrana plasmática, alterando a sua estrutura e consequentemente a sua permeabilidade, além de desnaturar proteínas presentes na bicamada lipídica. Como consequência, o metabolismo celular é alterado, resultando em adaptação, inativação ou morte celular (Nagashima, 1990). As Hsps atuam em condições de estresse, protegendo as estruturas celulares e restaurando proteínas danificadas (Brosnan et al. 2000; Estruch, 2000). Curiosamente, apenas o gene *SSB1* da família HSP70 foi induzido (2;48) em pH 2 (Tabela 2). A proteína Ssb1p encontra-se associada a ribossomos no citoplasma, desempenhando um papel importante na síntese de proteínas (Estruch, 2000). Além disso, o gene *YOR1*, o qual codifica uma proteína de transporte dependente de ATP, da família do cassete ABC presente na membrana plasmática, foi reprimido. Os genes da via glicolítica e da via do glicerol, além dos genes das enzimas acetaldeído desidrogenase e piruvato descarboxilase, não mudaram o seu grau de expressão durante os primeiros noventa minutos de fermentação em baixo pH. De qualquer forma a produção de etanol foi baixa nesse período, comparada à produção em pH elevado. Embora menos de 0,5% dos genes de *S. cerevisiae* tenham sido

induzidos em pH 2, essa indução foi suficiente para a adaptação das células ao baixo pH, tendo em vista que a velocidade de produção de etanol foi retomada durante os 90 minutos finais da fermentação.

Os resultados obtidos neste trabalho não apresentam um quadro conclusivo sobre a relação entre o baixo pH extracelular, o fenótipo metabólico e a regulação gênica global de células de *S. cerevisiae* em condições fermentativas, mas mostra claramente que o estresse ácido não impõe mudanças drásticas no padrão de expressão gênica da levedura. Portanto, quaisquer propostas de modificação genética deve levar em consideração uma relação muito intrínseca entre diferentes tipos de genes, e neste aspecto a busca de linhagens resistentes à ácido parece mais promissor do ponto de vista de isolamento de células a partir de procedimentos de adaptação genética induzida, e não por uma simples intervenção genética.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado com verbas de pesquisas das agências de fomento CNPq, Facepe e Capes e da empresa AEB Bioquímica S/A.

## BIBLIOGRAFIA

Blaiseau, P.L., Isnard, A.D., Surdin-Kerjan, Y. and Thomas, D. (1997) Met31p and Met32p, two related zinc finger proteins, are involved in transcriptional

regulation of yeast sulfur amino acid metabolism. *Molecular and Cell Biology*. **17**, 3640-8.

Brosnan, M.P., Donnelly, D., James, T.C. and Bond, U. (2000) The stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. *Journal of Applied Microbiology*. **88**, 746-755.

Carrasco, P., Querol, A. and del Olmo, M. (2001). Analysis of the resistance of commercial wine yeast strains. *Archives in Microbiology* 175: 450-457.

Cherest, H., Nguyen, N.T., Surdin-Kerjan, Y. (1985) Transcriptional regulation of the MET3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. **34**, 269-81.

Dormer, U.H., Westwater, J., McLaren, N.F. and Kent, N.A. (2000) Cadmium-inducible expression of the yeast GSH1 gene requires a functional sulfur-amino acid regulatory network. *Journal of Biological Chemistry*. **275**, 32611-6.

Estruch, F. (2000) Stress-controlled transcription factor, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews*. **24**, 469-486.

Henrique, M., Quintas, C. and Loureiro-Dias, M. (1997) Extrusion of benzoic acid in *Saccharomyces cerevisiae* by an energy-dependent mechanism. *Microbiology*. **143**, 1877-1883.

Hirasawa, T., Nakakura, Y., Yoshikawa, K., Ashitani, K., Nagahisa, K., Furusawa, C., Kataura, Y., Shimizu, H. and Shioya, S. (2005) Comparative analysis of transcriptional responses to saline stress in laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* with DNA microarray. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **11**, 1-12.

Kuras, L., Barbey, R. and Thomas, D. (1997) Two divergent MET10 genes, one from *Saccharomyces cerevisiae* and one from *Saccharomyces carlsbergensis*, encode the alpha subunit of sulfite reductase and specify potential binding sites for FAD and NADPH. *Journal of Bacteriology*. **176**, 6050-8.

Kuras, L., Cherest, H., Surdin-Kerjan, Y. and Thomas, D. (1996) A heteromeric complex containing the centromere binding factor 1 and two basic leucine zipper factors, Met4 and Met28, mediates the transcription activation of yeast sulfur metabolism. *The EMBO Journal*. **15**, 2519-29.

Lafaye, A., Junot, C., Pereira, Y., Lagniel, G., Tabet, J.C., Ezan, E. and Labarre, J. (2005) Combined Proteome and Metabolite-profiling Analyses Reveal Surprising Insights into Yeast Sulfur Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. **280**, 24723-24730.

Mollapour, M., Fong, D., Balakrishnan, Harris, N., Thompson, S., Schüller, C., Kuchler, K. and Piper, P. W. (2004) Screening the yeast deletant mutant collection for hypersensitivity and hyper-resistance to sorbato, a weak organic acid food preservative. *Yeast*. **21**, 927-946.

Moler, E.J., Radisky, D.C. and Mian, I.S. (2000) Integrating naive Bayes models and external knowledge to examine copper and iron homeostasis in *S. cerevisiae*. *Physiology Genomics*. **4**, 127-135.

Nagashima, M. (1990) Progress in ethanol production with yeasts. In: *Yeast: biotechnology and biocatalysis* ed. Verachtert, H. and De Mot, R. pp. 3-84. New York: Marcel Dekker Inc.

Piper, P., Calderon, C.O., Hatzixanthis, K. and Mollapour, M. (2001) Weak acid adaptation: the stress response that confers yeast with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology*. **147**, 2635-2642.

Piper, P., Mahé, M., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Mühlbauer, M., Coote, P. and Kuchler, K. (1998) The Pdr12 ABC transporter is required for development of weak organic acid resistance in yeast. I *The EMBO Journal*. **17**, 4257-4265.

Rouillon, A., Barbey, R., Patton, E.E., Tyers, M. and Thomas, D. (2000) Feedback-regulated degradation of the transcriptional activator Met4 is triggered by the SCF (Met30) complex. *EMBO Journal*. **19**, 282-94.

Silva-Filho, E.A., Santos, S.K.B., Resende, A.M., Morais, J.O.F., Morais, Jr. M.A. and Simões, D.A. (2005a). Yeast population dynamics of industrial fuel-

ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek* **88**, 13–23.

Singh, J., Kumar, D., Ramakrishnan, N., Singhal, V., Jervis, J., Garst, J.F., Slaughter, S.M., DeSantis, A.M., Potts, M. and Helm, R.F. (2005) Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to desiccation and rehydration. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 8752-63.

Zuzuarregui, A., Monteoliva, L., Gil, C. and Del Olmo, M.L. (2006) Transcriptomic and Proteomic Approach for Understanding the Molecular Basis of Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to Wine Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 836-47.

Tabela 1. Genes de *S. cerevisiae* induzidos durante a fermentação em baixo pH.

ORF	Gene	Grau de indução	Função ou atividade da proteína codificada
YMR323W	ERR3	10,08	Proteína similar as enolases
YOR393W	ERR1	9,10	Proteína de função desconhecida similar às enolases
YHR139C	SPS100	6,01	Proteína requerida para maturação da parede do esporo
YMR169C	ALD3	4,12	Acetaldeído desidrogenase citoplasmática envolvida na síntese de beta alamina
YBR117C	TKL2	3,91	Transcetolase similar aTkl1p
YDL196W	OXR1	2,80	Proteína de função desconhecida requerida para reparar danos oxidativos
YGR144W	THI4	3,55	Proteína requerida para a síntese de tiamina
YLR197W	SIK1	3,38	Proteína nucleolar do box C/D snoRNP
YDR222W		2,97	ORF não caracterizada
YCL030C	HIS4	2,94	Polipeptídio multifuncional: fosforribosil-ATP pirofosfatase, fosforribosil-AMP cicloidrolase e histidinol desidrogenase.
YHR094C	HXT1	2,59	Transportador de glicose de baixa afinidade
YDL229W	SSB1	2,48	Proteína da família HSP70
YNL002C	RLP7	2,46	Proteína nucleolar constituinte da partícula pré-ribossomal 66S
YLR175W	CBF5	2,37	Proteína componente do box H/ACA snoRNP
YDR019C	GCV1	2,25	Subunidade T do complexo mitocondrial glicina descarboxilase
YPL217C	BMS1	2,24	Proteína nucleolar envolvida na síntese do ribossomo 40S
YEL026W	SNU13	2,20	Proteína do complexo U3 snoRNP e do complexo U4/U6-U5 tri-snoRNP
YIR035C		2,20	ORF não caracterizada
YNL308C	KRI1	2,17	Proteína nucleolar envolvida na síntese do ribossomo 40S
YDL141W	BPL1	2,05	Biotina apoproteína ligase
YHL042W		2,02	ORF não caracterizada
YER081W	SER3	2,01	3-fosfoglicerato desidrogenase
YPL061W	ALD6	1,97	Acetaldeído desidrogenase citoplasmática envolvida na conversão de acetaldeído a acetato
YPL266W	DIM1	1,92	Dimetilase do rRNA 18S
YMR305C	SCW10	1,92	Proteína da parede celular similar às glicanases
YPL278C		1,95	ORF não caracterizada
YGR146C		1,85	ORF não caracterizada

Tabela 2. Genes de *S. cerevisiae* reprimidos durante a fermentação em baixo pH.

ORF	GENE	Grau de repressão	Função ou atividade da proteína codificada
YEL065W	SIT1	-2,06	Transportador da ferrioxamina B
YER140W		-2,04	ORF não caracterizada
YNL191W		-2,52	ORF não caracterizada
YHL036W	MUP3	-2,03	Metionina permease de baixa afinidade
YJL060W	BNA3	-3,88	Arilformamidase
YGL229C	SAP4	-2,6	Proteína com atividade serina/treonina fosfatase na transição da fase G1 para a fase S do ciclo de divisão celular
YGL184C	STR3	-2,85	Cistationina beta-liase
YHR176W	FMO1	-4,36	Monoxigenase contendo flavina
YJR010W	MET3	-17,09	ATP sulfúrilase
YLR438W	CAR2	-2,02	L-ornitina transaminase
YDR497C	ITR1	-1,99	Transportador do mio-inositol
YLR179C		-1,89	ORF não caracterizada
YPR194C	OPT2	-1,98	Proteína transportadora de oligopeptídio
YDR502C	SAM2	-2,99	S-adenosilmetionina sintetase
YFR030W	MET10	-11,1	Subunidade alfa da sulfito redutase
YIL074C	SER33	-5,92	3-fosfoglicerato desidrogenase
YDL059C	RAD59	-5,33	Proteína envolvida no reparo do DNA
YOR049C	RSB1	-2,2	Proteína supressora de esfingolipídios decadeia longa na membrana plasmática
YCL025C	AGP1	-2,21	Aminoacido permease de baixa afinidade
YER091C	MET6	-4,77	metionina sintetase cobalamina-independente
YHR137W	ARO9	-2,66	Aminotransferase
YFR015C	GSY1	-3,63	Glicogênio sintetase
YJL101C	GSH1	-2,91	Gama glutamilcisteína sintetase
YBR208C	DUR1,2	-2,09	Urea amidoliase
YGR281W	YOR1	-1,99	Proteína de transporte na membrana plasmática ATP-dependente da família do cassete ABC
YGR155W	CYS4	-3,28	Cistationina beta sintetase
YIR017C	MET28	-3,17	Fator de transcrição membro do complexo Cbf1-Met4-Met28
YLR161W		-3,04	ORF não caracterizada

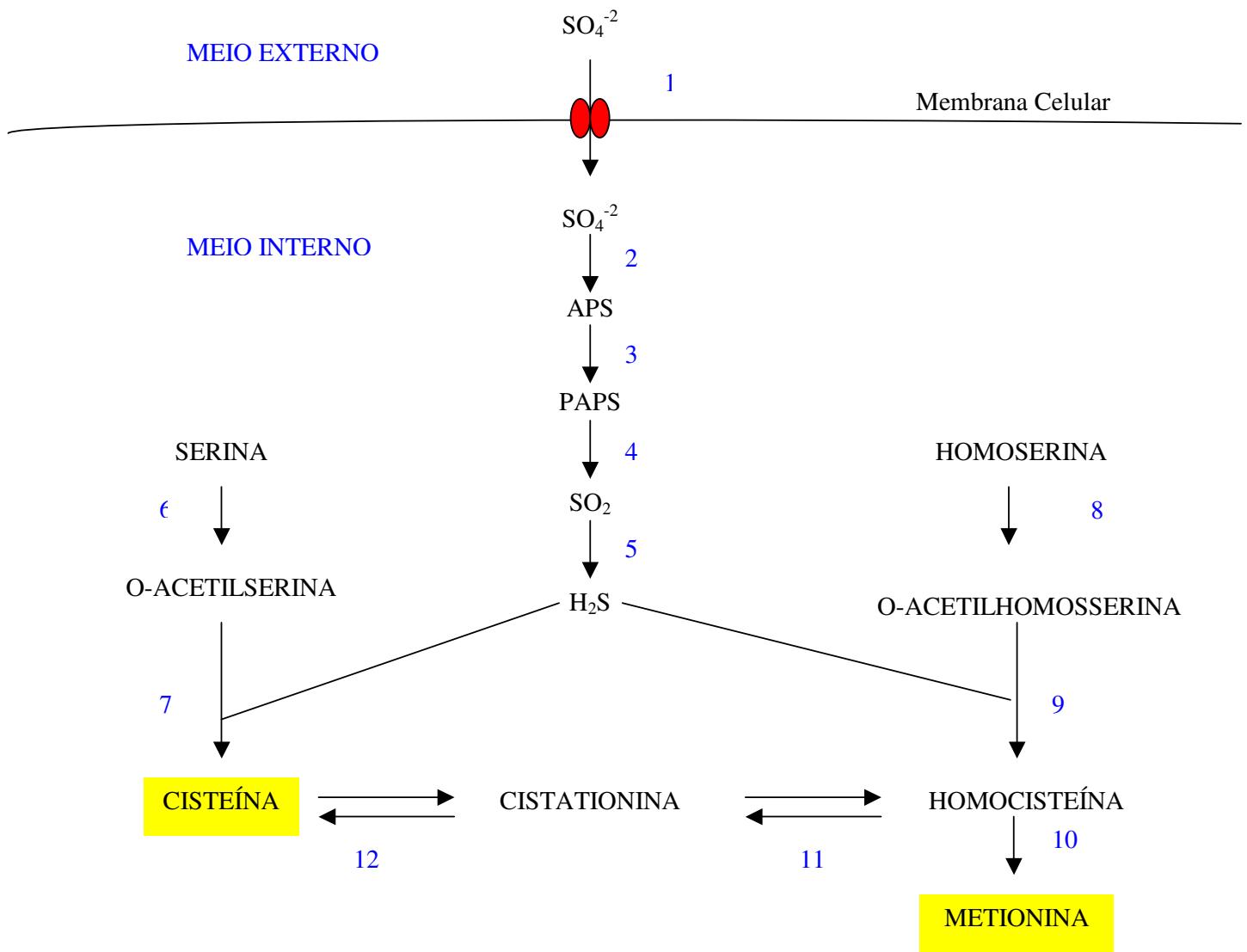
---

---

YDR253C	MET32	-6,72	Proteína de ligação ao DNA (dedo de zinco) envolvida na regulação de genes da via de síntese de metionina
YPL265W	DIP5	-2,11	Aminoacido dicarbílico permease
YPR167C	MET16	-5,68	3-fosfoadenosil redutase
YPR169W		-1,85	ORF não caracterizada
YJR137C	ECM17	-12,21	Subunidade beta da sulfito redutase
YJR139C	HOM6	-1,84	<i>Homoserina desidrogenase</i>
YPL250C		-3,27	ORF não caracterizada

---

VIA DO METABOLISMO DO SULFATO EM *S. cerevisiae*



**Figura 3.** Via do metabolismo do sulfato. Genes e enzimas: 1. *SUL2* (-6,29): Sulfato pernease. 2. *MET3* (-17,09): ATP sulfurlase. 3. *MET14* (sm): APS quinase. 4. *MET16* (-5,70): PAPS redutase. 5. *MET10* (-11,10) e *ECM17* (-12,25), codificando as subunidades alfa e beta da enzima Sulfito redutase, respectivamente. 6. *MET2*: L-serina-O-acetiltransferase 7. *MET25* (sm): O-acetilhomosserina sulfidrilase e 9. O-acetilserina sulfidrilase. 8. *MET2* (sm): L-homosserina-O-acetiltransferase. 10. *MET6* (-4,77): Metionina sintetase. 11 e 12. *CYS4* (-3,29): Cistationina β-sintetase. Números entre parentese: mudança no Grau de expressão gênica; sm = sem mudança. Siglas: APS: Adenosina 5'-fósfo sulfato; PAPS: 3'-fósfo Adenosina 5'-fósfo sulfato.

**Isolamento e caracterização fisiológica e genética de um mutante de  
*Saccharomyces cerevisiae* resistente a ácido inorgânico forte**

Hélio Fernandes de Melo<sup>1</sup>, Diogo Ardaillon Simões<sup>2</sup>, Johan Thevelein<sup>3</sup> e  
Marcos Antonio de Morais Jr<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética e <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. <sup>3</sup>Instituto de Microbiologia e Botânica, Universidade Católica de Leuven, Leuven, Bélgica.

Autor para correspondência:

M.A. de Morais Jr

Departamento de Genética – Universidade Federal de Pernambuco  
Av. Moraes Rego, s/n Cidade Universitária 50640-901 Recife PE  
Fone/fax: +558121268569

E-mail: [marcos.morais@pesquisador.cnpq.br](mailto:marcos.morais@pesquisador.cnpq.br)

---

Artigo a ser enviado para publicação no *Journal of Applied Microbiology* (Blackwell Publishing, USA). ISSN: 1364-5072. Fator de impacto (JCR-2004): 1,835

## RESUMO

**Objetivos:** O processo de produção industrial de álcool combustível impõe um estresse ácido às células de levedura que contribui para a queda da viabilidade celular. O objetivo deste trabalho foi isolar células derivadas de linhagens industriais que sejam mais resistentes a este estresse. **Métodos e Resultados:** Para a adaptação a ácido, células da linhagem industrial JP1 foram cultivadas em bateladas sucessivas em meio YPD ajustado para pH 2 com ácido sulfúrico. Uma linhagem mutante resistente a baixo pH foi isolada (JP1M). Em pH 2, ajustado com  $H_2SO_4$  ou HCl, tanto a velocidade específica de crescimento quanto a viabilidade celular do mutante foram maiores que aquelas apresentadas pela linhagem parental JP1. O tipo de ácido utilizado não influenciou os resultados. As duas linhagens foram submetidas a ensaios de fermentação em pH 5 ou 2. Em pH 2 JP1 apresentou uma diminuição na produção de etanol, concomitantemente a um aumento na produção de glicerol. O mutante praticamente não produziu etanol tanto em pH 5 quanto em pH2, porém produziu duas vezes mais etanol em baixo pH. **Conclusões:** O sistema de batelada sucessiva em meio seletivo foi capaz de produzir o aparecimento de células de levedura resistentes ao estresse causado pela diminuição do pH do meio. Entretanto, este mutante também apresentou decréscimo na sua capacidade fermentativa, provavelmente causado pelo acúmulo de mutações ocorridas, provavelmente, durante a fase de adaptação a ácido. **Significância e impacto do estudo:** A partir deste mutante poderemos identificar os genes responsáveis pelo aumento da resistência ao estresse ácido e construir linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*, com modificações

em genes específicos, que apresentem essa resistência sem ter a capacidade fermentativa afetada.

**Palavras-chave:** evolução adaptativa, expressão gênica global, fermentação alcoólica, resistência a estresse.

## INTRODUÇÃO

O ambiente da fermentação etanólica para a produção industrial de álcool combustível é complexo, apresentando uma intensa sucessão de linhagens de leveduras (Silva-Filho et al. 2005a). Nesse ambiente a estabilidade da população depende do uso de linhagens capazes de se adaptarem às condições de estresse do processo, uma vez que na indústria o fermento é reutilizado durante o período de produção sendo submetido a um tratamento com ácido sulfúrico, no intervalo entre as fermentações, para minimizar a contaminação por bactérias. Esse procedimento pode comprometer a viabilidade das células e consequentemente o rendimento da fermentação (Nagashima, 1990; Brosnan et al. 2000; Zuzuarregui et al. 2006). Portanto, o uso de leveduras tolerantes a ácido é importante em processos de fermentação industrial, podendo aumentar o rendimento e diminuir os custos da produção (Nagashima, 1990; Brosnan et al. 2000). Nas leveduras, a resistência ao estresse varia de acordo com a linhagem, o tipo de estresse e o tempo de exposição ao fator de estresse (Lewis et al. 1997; Carrasco et al. 2001; Garay-Arroyo, 2004). A condição de estresse induz a síntese de proteínas de choque

térmico, as Hsps, e o acúmulo de trealose, os quais protegem a célula contra os danos causados pelo estresse (Jakobsen e Pelham, 1991; Craig, 1992; Morimoto, 1993; Birch e Walker, 2000). A tolerância pode ser adquirida pela alteração no estado redox da célula, aumento da síntese de Hsp e outras proteínas de estresse como a glutationa e do acúmulo de trealose (Craig, 1992, Ueom et al, 2003). Em *S. cerevisiae* foi observado o fenômeno da co-tolerância, no qual as linhagens que apresentaram resistência ao estresse oxidativo parecem ser mais resistentes a outras formas de estresse (Lewis et al. 1997).

A condição de estresse pode alterar o perfil de expressão gênica global, ocorrendo a indução ou repressão de genes específicos envolvidos em diferentes vias metabólicas (Brosnan et al. 2000; Lafaye et al. 2005; Hirasawa et al. 2005; Zuzuarregui et al 2006). Em *S. cerevisiae*, o cheque osmótico induzido por cloreto de sódio em concentrações entre 0,5 e 1,0 M no meio de crescimento altera o grau de expressão de cerca de 70% dos genes, principalmente de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídios, além de genes envolvidos na biogênese de ribossomos, síntese de proteínas e resposta ao estresse (Hirasawa et al. 2005). Outros fatores de estresse como choque térmico, agentes oxidativos, solventes orgânicos, metais pesados e falta de nutrientes podem alterar a expressão gênica global nas leveduras (Brosnan et al. 2000; Lafaye et el. 2005; Hirasawa et al. 2005; Singh et al. 2005; Zuzuarregui et al. 2006).

A linhagem industrial JP1 foi isolada e selecionada devido a sua capacidade de predominar em processos fermentativos industriais (Silva-Filho et al. 2005b). O perfil de resistência a estresse desta linhagem é semelhante

àquele da linhagem PE-2, a linhagem industrial mais comercializada até o momento para a produção de álcool combustível no Brasil (Silva-Filho et al. 2005b). Neste trabalho isolamos a partir de cultivos da linhagem JP1 em bateladas sucessivas uma linhagem mutante resistente a baixos valores de pH. As características de crescimento e de resistência a baixos valores de pH por adição de ácidos inorgânicos fortes foram investigadas. O mutante obtido pode contribuir para a identificação de genes relacionados com a resposta fisiológica e molecular ao estresse ácido e nortear a construção de linhagens recombinantes com resistência aumentada a ácido.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Linhagens e meios de cultura utilizados**

A linhagem industrial JP1 (Silva-Filho et al, 2005b) foi utilizada para os experimentos de isolamento de um mutante resistente a ácido. Foram utilizados os seguintes meios: YPD (glicose 20 g.l<sup>-1</sup>, peptona 20 g.l<sup>-1</sup> e extrato de levedura 10 g.l<sup>-1</sup>), meio mineral para crescimento (20 g.l<sup>-1</sup> glicose, 7,5 g.l<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 14,4 g.l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,5 g.l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) e meio mineral para fermentação (120 g.l<sup>-1</sup> sacarose, 5 g.l<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 g.l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,5 g.l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O). Os meios minerais foram suplementados com solução de vitaminas e elementos traço segundo Verduyn et al. (1992).

### **Adaptação das células de JP1 a baixo pH**

As células da linhagem JP-1 foram cultivadas em bateladas sucessivas e repicadas a cada 24 horas. Inicialmente, células na fase exponencial de

crescimento foram inoculadas em frascos de 250 ml, contendo 50 ml meio YPD-pH 2,5 (meio YPD ajustado para pH 2,5 com ácido sulfúrico) para uma densidade óptica inicial ( $DO_{i600}$ ) de 0,1. A cultura foi incubada a 30°C por 24 horas, sem agitação. Após esse período, a densidade óptica final ( $DO_{f600}$ ) foi determinada e as células foram utilizadas para uma nova cultura nas condições descritas anteriormente. Ao final de nove dias de sucessivos cultivos em baixo pH (nove cultivos), a concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas em YPD-agar (100 células por placas) e as 20 maiores colônias resultantes, após 72 horas de incubação a 30°C, foram testadas para o crescimento em tubos de 5,0 ml, contendo 1,0 ml de YPD-pH 2,0 (meio YPD ajustado para pH 2,0 com ácido sulfúrico) a 30°C por 24 horas, sem agitação. A colônia cuja cultura apresentou a maior diferença entre a densidade óptica final e inicial ( $DO_f - DO_i$ ) foi selecionada para posterior caracterização.

### **Caracterização da linhagem JP1 por PCR-fingerprinting**

A linhagem JP1 e seu derivado resistente a baixo pH foram inoculados em meio YPD líquido e incubados a 30°C por 16 horas a 150rpm. Amostras de 1,0 ml de cada cultura foram utilizadas para extração de DNA total e tipagem por PCR-fingerprinting como descrito por Silva-Filho et al (2005a).

### **Caracterização de linhagem tolerante a ácido**

Para determinar a taxa de crescimento em baixo pH, as células de JP1 e JP1M foram cultivadas em YPD a 30 °C até a fase estacionária. Em seguidas foram inoculadas em meio YPD-pH 2,5 ( $DO_{600}=0,1$ ), incubadas a 30°C até a

fase exponencial, quando foram re-inoculadas em novo meio YPD-pH 2,0 ou YPD-pH 2,5 e incubadas a 30°C por 24 horas. As culturas foram iniciadas com DO<sub>600</sub> de 0,1. A DO<sub>600</sub> foi monitorada a cada 2 horas durante o crescimento.

Para determinar a viabilidade celular a baixos valores de pH, as células foram inoculadas em YPD-pH 2,5 ajustado com ácido sulfúrico, e incubadas a 30°C até fase estacionária de crescimento, quando foram lavadas com água destilada e centrifugadas. Em seguidas foram feitas suspensões celulares (10% v/v) em água destilada acidificada a pH 2,0 com ácido sulfúrico. As suspensões celulares foram incubadas a 37°C e 42°C por 120 min. A cada 30 min alíquotas foram coletadas, diluídas apropriadamente e semeadas (200 µl de suspensão celular) em YPD. Após incubação a 30 °C por 72 horas o número de colônias formadas foi determinado. Pelo menos três placas foram utilizadas para cada ponto e os experimentos foram feitos em duplicata.

A tolerância a ácidos orgânicos fracos foi avaliada pela determinação da velocidade de crescimento de células de JP1M em meio YPD-pH 2,5 suplementado com sorbato de potássio a 0,5 mmol.l<sup>-1</sup>. Os valores apresentados de crescimento e viabilidade celular representam médias de experimentos com diferentes colônias destas linhagens em diferentes cultivos.

### **Produção de etanol em baixo pH**

Células das linhagens JP1 e JP1M foram cultivadas em meio mineral e em seguida inoculadas para concentração celular de 10% (v/v) em meio de fermentação ajustado para pH 2,5 com ácido sulfúrico. Ensaios de fermentação em pH 5,0 foram feitos como controle. A fermentação foi interrompida após 4 horas, o meio foi centrifugado e o sobrenadante recolhido e estocado a -20°C

para análises quantitativas posteriores de etanol (cromatografia gasosa) e glicerol (kit enzimático de glicerol oxidase).

## RESULTADOS

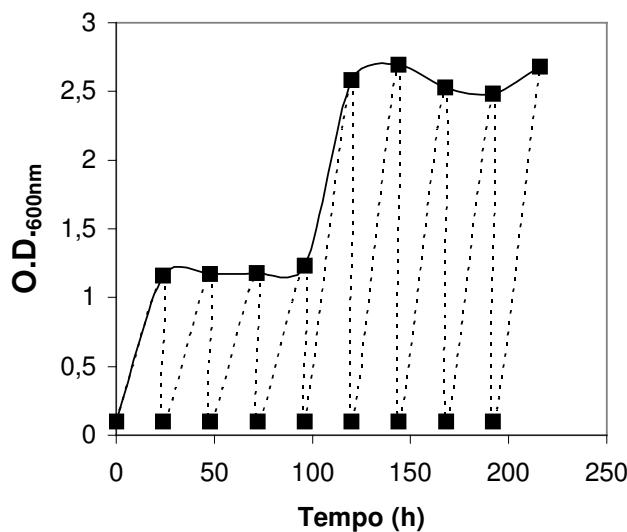
### **Isolamento de linhagem tolerante a ácido**

Células de JP1 foram cultivadas em bateladas sucessivas em meio YPD-pH2,5 por nove cultivos para adaptação a condição de baixo pH. Nos quatro primeiros cultivos o valor final da densidade óptica foi de 1,3. A partir do quinto cultivo, a densidade óptica final da cultura aumentou para 2,6. Os cultivos subseqüentes apresentaram crescimento similar, indicando estabilidade da cultura (Fig. 1). As células desta cultura foram então semeadas em placas YPD e incubadas por 72 horas a 30ºC. As colônias resultantes foram inoculadas em tubos contendo meio YPD-pH 2,0. A cultura que apresentou a maior densidade óptica final após 24 horas (em torno de 0,928) foi denominada JP1M e selecionada para análises posteriores. A análise de DNA fingerprinting mostrou que a linhagem mutante JP1M apresenta o perfil de amplificação do tipo P18, semelhante ao seu parental JP1 (Fig. 2), confirmando que JP1M é efetivamente derivada de JP1.

### **Caracterização da linhagem tolerante a ácido**

A linhagem JP1M foi testada para a capacidade de crescer em meio YPD-pH 2 ou YPD-pH 2,5 (Fig. 3). Em pH 2,5 a velocidade específica de crescimento de JP1M foi de  $0,17 \text{ h}^{-1}$ , cerca de 24% maior do que a do parental JP1, que foi de  $0,13 \text{ h}^{-1}$ . Além disso, JP1M apresentou velocidade de

crescimento de  $0,14\text{ h}^{-1}$  em pH 2, condição que impediu o crescimento do parental JP1. Por outro lado, o crescimento de JP1M foi muito menor do que o da linhagem parental JP1 quando cultivadas em meio com pH inicial em torno de cinco a seis. Nesta condição, a velocidade específica de crescimento de JP1M ficou em torno do mesmo valor de  $0,17\text{ h}^{-1}$  observado em pH 2,5, enquanto que JP1 apresentou velocidade específica de crescimento de  $0,4\text{ h}^{-1}$ .

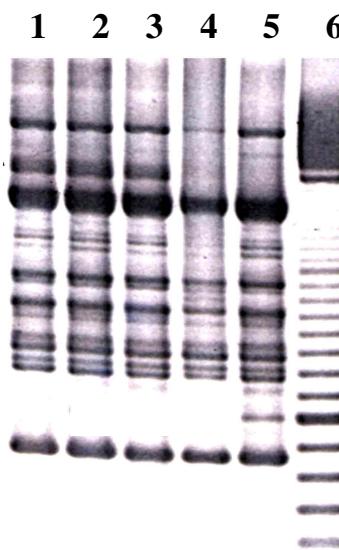


**Figura 1.** Evolução dirigida em bateladas sucessivas na seleção de células capazes de crescer em meio rico ajustado para pH 2,5 com ácido sulfúrico. As linhas pontilhadas representam a variação da densidade óptica da cultura em ciclos de 24 h, enquanto a linha cheia representa a densidade óptica no final de cada ciclo de cultivo.

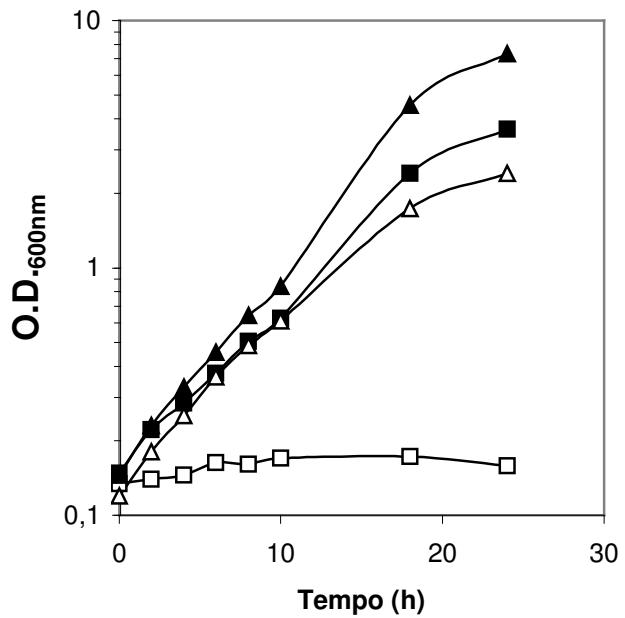
O próximo passo foi determinar se este fenótipo era específico para o ácido sulfúrico testando o crescimento celular em meio ajustado para pH 2 com ácido clorídrico. Os resultados obtidos tanto para JP1 como para JP1M em ácido clorídrico foram semelhantes àqueles apresentados para as duas linhagens em ácido sulfúrico (dados não mostrados). Isto mostra que a resistência do mutante JP1M deve se relacionar ao valor de pH em si e não ao

tipo de ácido inorgânico utilizado. Em seguida, A linhagem JP1M foi testada para a resistência cruzada a ácidos orgânicos. Os resultados mostraram que tanto o parental JP1 quanto o mutante JP1M não foram capazes de crescer em YPD-pH 3,5 ajustado com ácido sulfúrico contendo 0,5 mM de sorbato (Fig. 4), mostrando que a resistência do mutante JP1M é específico para ácidos inorgânicos.

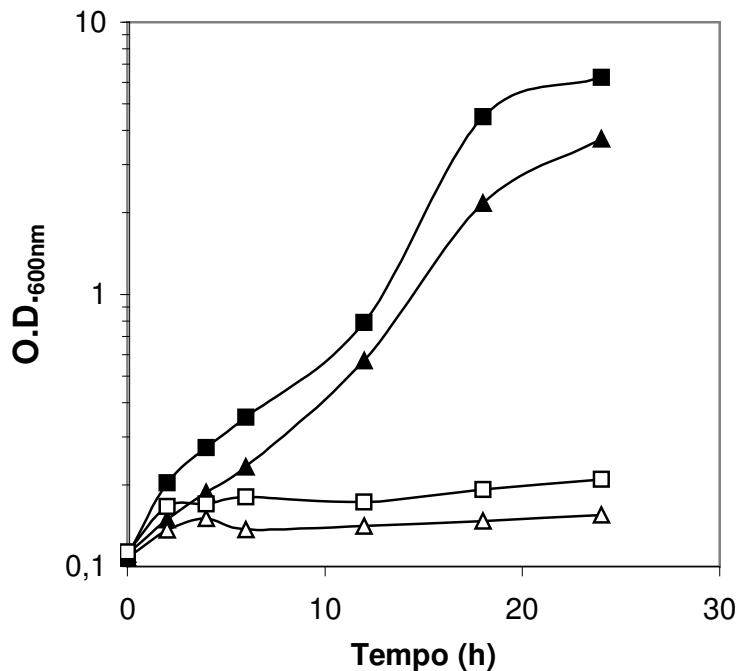
Posteriormente, a viabilidade das células de JP1 e JP1M em fase exponencial de crescimento foi testada a pH 2 nas temperaturas de 37°C e 42°C. De modo geral, a viabilidade das células a 42°C foi menor do que a 37°C em ambas as linhagens, indicando a ocorrência de um efeito sinergístico do ácido e da temperatura. Além disso, a linhagem JP1M foi mais resistente do que o seu parental JP1 aos efeitos letais do ácido sulfúrico em ambas temperaturas (Fig. 5). Este efeito foi mais pronunciado na temperatura de 37°C.



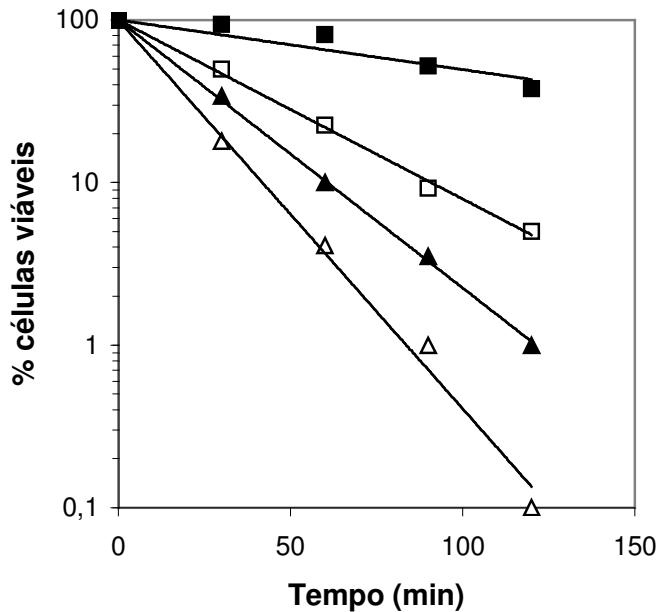
**Figura 2.** Perfil genético da linhagem JP1 (linha 1) e de duas colônias do mutante JP1M (linhas 2 e 3) comparadas com as linhagens P5 (linha 4) e P23 (linha 5). O marcador de peso molecular 100-bp ladder (Invitrogen) foi utilizado (linha 6).



**Figura 3.** Curva de crescimento de células da linhagem parental JP1 (símbolos abertos) e da linhagem mutante JP1M (símbolos fechados) nos meios YPD-2,5 (triângulos) e YPD-2,0 (quadradinhos) ajustados com ácido sulfúrico.



**Figura 4.** Curva de crescimento de células da linhagem parental JP1 (quadradinhos) e mutante JP1M (triângulos) em meio YPD-3,5 ajustados com ácido sulfúrico na ausência (símbolos cheios) ou presença (símbolos vazios) de sorbato de potássio a  $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ .



**Figura 5.** Curvas de viabilidade de celulas na fase exponencial de crescimento da linhagem parental JP1 (símbolos abertos) e da linhagem mutante JP1M (símbolos fechados) em solução salina ajustada para pH 2,5 com ácido sulfúrico após a incubação a 37°C (quadrados) e 42°C (triângulos).

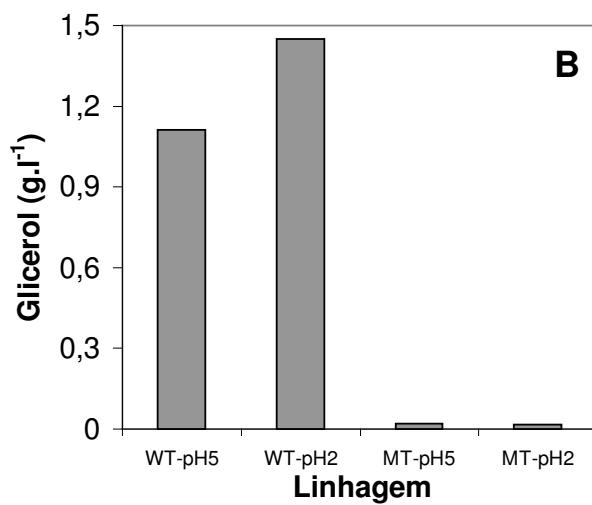
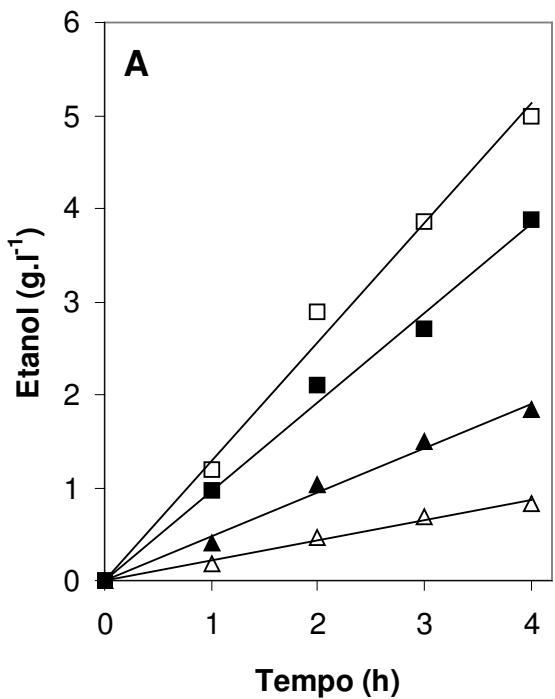
Esses resultados de crescimento e viabilidade celular confirmam o caráter ácido-tolerante da linhagem JP1M derivada de JP1. Esse fenótipo pode ser geneticamente definido, uma vez que diferentes colônias das linhagens, mutante e parental, foram testadas, apresentando os mesmos resultados.

Uma caracterização morfológica foi realizada por inspeção microscópica das células após o crescimento em baixo pH. De forma semelhante à linhagem parental JP1, o mutante JP1M não apresentou variação em sua morfologia quando submetida a pH 2 em cultivo agitado. Entretanto, JP1M apresentou formação de pseudo-hifa em YPD-pH 2 quando cultivada em tubos sem agitação. Por outro lado, a morfologia celular voltou ao normal quando as essas células retornaram ao cultivo em frasco agitado (dados não mostrados).

## Produção de etanol em baixo pH

A capacidade fermentativa do mutante JP1M foi comparada com o parental JP1 em meios com diferentes valores iniciais de pH (Figura 6a). O parental JP1 apresentou maior uma maior velocidade de produção de etanol no meio com pH 5 ( $1,28 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) do que no meio com pH 2 ( $0,98 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Em ambos os valores de pH inicial, o mutante JP1M produziu muito menos etanol do que o parental. Entretanto, diferentemente do que aconteceu com a linhagem parental, a produtividade do mutante JP1M foi duas vezes maior no meio com pH 2 ( $0,47 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) do que no meio com pH 5 ( $0,21 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ).

O glicerol é um importante subproduto tanto do crescimento celular quanto da fermentação etanólica em *S. cerevisiae*. A produção deste metabólito foi medida durante os experimentos de fermentação das duas linhagens nos diferentes valores de pH. Em termos gerais, a produção de glicerol foi cerca de 70 vezes mais baixa na linhagem mutante em relação à parental, independentemente do pH do meio (Figura 6b). A linhagem JP1 produziu 28% a mais de glicerol em meio com pH 2 do que em meio pH 5. Isto demonstra que a maior resistência do mutante JP1M a baixos valores de pH não está relacionada como o aumento da concentração intracelular deste osmólito.



**Figura 6.** Perfil fermentativo de células das linhagens JP1 e JP1M. **A.** Produção de etanol de JP1 (quadrados) e JP1M (triângulos) em meio mineral ajustado para pH inicial 5 (símbolos vazios) e 2 com ácido sulfúrico (símbolos cheios). **B.** Produção de glicerol ao final de quatro horas de fermentação das linhagens JP1 (wt) e JP1M (mt) nos diferentes valores de pH inicial.

## DISCUSSÃO

A exposição de células de leveduras a baixos valores de pH é uma condição de estresse que afeta o metabolismo celular (Carmelo et al. 1998). Em *S.cerevisiae*, a exposição por 60 minutos ao estresse ácido com HCl (pH 2) a temperatura de 47ºC resulta em perda de 99% da viabilidade celular, principalmente em meio suplementado com glicose (Carmelo et al, 1998). Durante o processo de fermentação alcoólica industrial as células de levedura são recicladas na etapa do pré-fermentador onde são tratadas com ácido sulfúrico com a finalidade de controla a contaminação bacteriana. Este tratamento ácido e o baixo pH entre 2,5 a 3,5 do mosto de fermentação constituem uma constante fonte de estresse celular. Aliado a isto, a temperatura do processo, principalmente na região Nordeste do Brasil, varia em torno de 33ºC a 37ºC. Estes dois parâmetros físico-químicos contribuem de forma sinergística para a perda da viabilidade, com consequências no rendimento alcoólico industrial. A linhagem industrial JP1 foi isolada pela sua dominância na população de levedura de diferentes processos industriais e apresenta a mesma resistência celular aos efeitos destes agentes (Silva-Filho et al., 2005b). As populações de células das linhagens industriais podem apresentar diminuições na viabilidade da ordem de 50% em meio ácido a 37ºC, chegando a mais de 80% quando a temperatura é elevada a 42ºC (Silva-Filho et al., 2005b). Estes resultados dependem do estado fisiológico das células, já que a linhagem JP1 apresentou maior sensibilidade na fase exponencial de crescimento (Fig. 4) do que na fase estacionária (Silva-Filho et al., 2005b).

Normalmente observam-se valores de viabilidade média de 88% em processos que apresentam temperaturas médias em torno de 33°C (dados industriais não mostrados). No presente trabalho apresentamos o isolamento de uma linhagem mutante que apresenta valores de viabilidade superiores aos do parental quando incubados em soluções de pH ácido. Isto sugere a aquisição de mutações que induzem os mecanismos de resistência celular ao abaixamento do pH do meio, seja ele promovido pelo ácido sulfúrico ou pelo ácido clorídrico. Entretanto, este mutante não foi capaz de crescer em meio na presença de sorbato de potássio, em pH abaixo do pKi (4,1) do ácido sórbico. Isso significa que o mecanismo da bomba de ATP-H<sup>+</sup>, controlado pelas proteínas Pdr5 e Pdr12 na membrana plasmática, o qual é responsável pela resistência a ácidos orgânicos (Kolaczkowska and Goffeau, 1999), não deve estar relacionado à resistência a ácidos inorgânicos. A dissociação dos ácidos orgânicos fracos diminui em pH abaixo de seu pKi. Um ácido orgânico, em estado não dissociado no meio extracelular, se difunde através da membrana plasmática para o citoplasma das células onde se dissocia, reduzindo o pH intracelular (Piper et al 1998). Linhagens de *S. cerevisiae* se mostram tolerantes a sorbato em YPD ajustado para pH 4,5 com HCl (Piper et al 1998). Esta resistência depende da expressão dos genes do sistema de extrusão de ácido do meio intracelular e de cerca de 270 outros genes envolvidos em diversas funções do metabolismo celular (Mollapour et al 2004). Recentemente, experimentos de microarranjos de DNA mostraram que menos de 1% dos genes de *S. cerevisiae* apresentaram modificações no padrão de expressão quando as células foram submetidas à fermentação em meio ácido (Melo et al, submetido para publicação). No entanto, não se pode relacionar nenhum gene

ou família de genes ao baixo pH do meio. Portanto, a resposta de adaptação ao meio ácido parece ser bastante complexa, envolvendo ajustes finos na regulação da expressão gênica da levedura. Deste ponto de vista, a caracterização genética e a análise da expressão gênica de JP1M podem revelar quais os alelos mutantes responsáveis pela resistência ao baixo pH e pela sensibilidade da linhagem a ácido orgânico fraco.

As linhagens industriais de *S.cerevisiae* são normalmente resistentes a alta temperatura (Brosnan et al. 2000), mas este fator interfere na viabilidade celular quando em sinergia com a presença de etanol ou meio com baixo pH (Silva-Filho et al. 2005b). A resistência a ácido apresentada por JP1 e JP1-M diminuiu com o aumento da temperatura de 37º C para 42º C, confirmando a sinergia desses fatores de estresse e mostrando que o fenótipo de resistência a ácidos inorgânicos não tem reflexo na resistência a choque térmico. Tem sido mostrado que a presença de ácidos orgânicos em culturas a elevada temperatura inibe a resposta ao estresse e induzem mutações que causam deficiência no metabolismo respiratório (Cheng et al. 1999). A presença de etanol também potencializa o efeito letal da elevação da temperatura (Silva-Filho et al., 2005b), diminuindo a temperatura máxima de crescimento das células (Van Uden, 1984). Os ensaios com o mutante JP1M também revelaram que os mecanismos de resistência a etanol e a ácidos inorgânicos são distintos (dados não mostrados).

Embora a produção de etanol do mutante JP1-M tenha sido muito inferior a JP1, a redução do pH do meio de fermentação aumentou a produção final de etanol após 4 horas de fermentação, indicando que essa levedura produz mais álcool em meio com valores baixos de pH. A presença de ácido acético no

meio aumenta a velocidade específica de produção de etanol em linhagens de laboratório de *S.cerevisiae*, porém em três linhagens industriais essa velocidade diminuiu (Garay-Arroyo et al. 2004), revelando uma variação intra-espécifica no comportamento fermentativo em resposta a ácidos orgânicos. Não existem relatos na literatura sobre o efeito dos ácidos inorgânicos sobre a produção de etanol. O aumento da velocidade específica de produção de etanol na presença de ácido acético para algumas linhagens pode ser explicado pelo aumento na produção de ATP, necessário para manter o pH intracelular constante (Garay-Arroyo et al. 2004). Porém, neste trabalho, a redução do pH do meio de fermentação, através da adição de um ácido inorgânico (ácido sulfúrico), diminuiu a produção de etanol de JP1. Esse resultado pode indicar que a presença de um ácido inorgânico no meio extracelular não afeta o pH interno, como ocorre com o ácido acético (Garay-Arroyo et al. 2004), possivelmente porque o ácido sulfúrico não atravesse passivamente a membrana plasmática, se dissociando em  $2\text{H}^+$  e  $(\text{SO}_4)^{2-}$  no meio extracelular. Por outro lado, a produção de etanol de JP1M, embora muito inferior a JP1, foi duas vezes maior em pH 2 do que em pH 5. Em *S. cerevisiae*, o sulfato é transportado através da membrana plasmática pela enzima sulfato permease (Dequin, 2001) codificada pelo gene *SUL2* (Cherest H, et al. 1997). Uma vez no citoplasma o sulfato é ativado pela ATP sulfatase, formando adenosina 5'-fosfossulfato (APS) (Dequin, 2001). Portanto, a assimilação do íon sulfato dissociado do ácido ocorre às custas de ATP. O aumento na produção de etanol é coerente com uma maior necessidade de ATP, tanto para manter constante o pH intracelular como para metabolizar o íon sulfato. Ainda

não está claro qual a estratégia utilizada pela levedura para minimizar os efeitos do ácido sulfúrico.

Os resultados apresentados aqui mostram que foi possível o isolamento de um mutante capaz de crescer em meio com baixo pH, apesar da indicação de que a resistência ao estresse ácido deve estar relacionada com um mecanismo complexo envolvendo possivelmente mais de um gene. Portanto, a partir de exposição contínua de células de *S. cerevisiae* a ácido sulfúrico por várias gerações foi possível isolar um mutante resistente (JP1M) a ácido inorgânico em valores extremos de pH. Embora esse mutante apresente uma grande fase lag em condições normais de crescimento, o que indica um grande número de mutações presentes, o perfil de PCR-fingerprinting foi igual a do seu parental JP1, confirmando a sua origem genética.

A análise da expressão gênica de JP1 e JP1M, em condições normais e de estresse, possibilitará a comparação do perfil de expressão gênica global dessas linhagens e a identificação de mudanças no grau de expressão de genes específicos, envolvidos nas diversas vias metabólicas na célula. Ainda, é importante fazer a caracterização genética do mutante através da análise de tétrades e segregação de esporos para identificação de alelos mutantes recessivos. Desta forma será possível a identificação de alelos responsáveis pela resistência a ácido da linhagem JP1M.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado com recursos financeiros das agências de fomento à pesquisa CNPq, Capes e Facepe.

## REFERÊNCIAS

- Ballesteros, I., Oliva, J.M., Ballesteros, M. and Carrasco, J. (1993) Optimization of the simultaneous saccharification and fermentation process using thermotolerant yeasts. *Applied Biochemistry Biotechnology*. **30/40**, 201-211.
- Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R. and McHale, A.P. (1998) Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I: Yeasts in general. *World Journal Microbiology Biotechnology*. **13**, 809-821.
- Birch, R.M. and Walker, G.M. (1999) Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial technology*. **26**, 678-687.
- Brosnan, M.P., Donnelly, D., James, T.C. and Bond, U. (2000) The stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. *Journal of Applied Microbiology*. **88**, 746-755.
- Carmelo, V., Santos, R., Viegas, C.A. and Sá-Correia, I. (1998) Modification of *Saccharomyces cerevisiae* thermotolerance following rapid exposure to acid stress. *International Journal of food Microbiology*. **42**, 225-230.
- Carrasco, P., Querol, A. and Del Olmo, M. (2001) Analysis of stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch.Microbiology*. **175**, 450-457.
- Cheng, L., Moghraby, J. and Piper, P.W. (1999) Weak organic acid treatment causes a trehalose accumulation in low-pH cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, not displayed by the more preservative-resistant *Zygosaccharomyces baillii*. *FEMS microbiology Letters*. **170**, 89-95.

Cherest H, et al. (1997) Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **145**, 627-35

Dequin, S. (2001). The potential of genetic engineering for improving, wine-making and baking yeast. *Applied microbial biotechnology*. **56**, 577-588

Craig, E.A. (1992). The heat-shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces* ed. Jones E.W., Pringle J.R. and Broach JR., pp. 501-537. Berlin: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Garay-Arroyo, A., Covarrubias, A.A., Clark, I., Niño, I., Gosset, G. and Martinez, A. (2004). Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied Microbiology Biotechnology*. **63**, 734-741.

Hirasawa, T., Nakakura, Y., Yoshikawa, K., Ashitani, K., Nagahisa, K., Furusawa, C., Katakura, Y., Shimizu, H. and Shioya, S. (2005) Comparative analysis of transcriptional responses to saline stress in laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* with DNA microarray. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **11**:1-12.

Jakobsen, B.K. and Pelham, H.R.B. (1991) A conserved heptapeptide restrains the activity of the yeast heat shock transcription factor. *The EMBO Journal*. **10**, 369-375.

Kolaczkowska, A. and Goffeau, A. (1999) Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. *Drug Resistance Updates*. **2**, 403-414.

- Lafaye, A., Junot, C., Pereira, Y., Lagniel, G., Tabet, J.C., Ezan, E. and Labarre, J. (2005) Combined Proteome and Metabolite-profiling Analyses Reveal Surprising Insights into Yeast Sulfur Metabolism. *Journal Biology and Chemistry*. **280**, 24723-24730.
- Lewis, J.G., Learmonth, R.P., Attfield, P.V. and Watson, K. (1997) Stress co-tolerance and trehalose content in baking strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **18**, 30-36.
- Mollapour, M., Fong, D., Balakrishnan, Harris, N., Thompson, S., Schüller, C., Kuchler, K. and Piper, P. W. (2004) Screening the yeast deletant mutant collection for hypersensitivity and hyper-resistance to sorbato, a weak organic acid food preservative. *Yeast*. **21**, 927-946.
- Morimoto, R.I. (1993) Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*. **259**, 1409-1410.
- Nagashima, M. (1990) Progress in ethanol production with yeasts. In: *Yeast: Biotechnology and Biocatalysis* ed. Verachtert, H. and De Mot, R. pp. 3-84. New York: Marcel Dekker Inc.
- Piper, P., Mahé, M., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Mühlbauer, M., Coote, P. and Kuchler, K. (1998) The Pdr12 ABC transporter is required for development of weak organic acid resistance in yeast. I *The EMBO Journal*. **17**, 4257-4265.
- Silva-Filho, E.A., Santos, S.K.B., Resende, A.M., Morais, J.O.F., Morais Jr, M.A. and Simões, D.A. (2005a) Yeast population dynamics of industrial fuel-

ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*. **88**, 13–23.

Silva-Filho, E.A., Melo, H.F., Antunes, D.F., Dos Santos, S.K.B., Resende M.A., Simões, D.A. and Morais Jr, M.A. (2005b) Isolation by genetics and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *Journal Industrial Microbiol. Biotechnol.* **32**, 481-486.

Singh, J., Kumar, D., Ramakrishnan, N., Singhal, V., Jervis, J., Garst, J.F., Slaughter, S.M., DeSantis, A.M., Potts, M. and Helm, R.F. (2005) Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to desiccation and rehydration. *Applied Environment Microbial.* **71**, 8752-63.

Van Uden, N. (1984) Temperature profiles of yeast. In: *Advances in Microbial Physiology* ed. Rose, A.H. and Tempest, D.W. pp.195-248. London: Academic Press.

Zuzuarregui, A., Monteoliva, L., Gil, C. and Del Olmo, M.L. (2006) Transcriptomic and Proteomic Approach for Understanding the Molecular Basis of Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to Wine Fermentation. *Applied Environment Microbiologyl.* **72**, 836-47.

## 6. CONCLUSÕES

A utilização da técnica de PCR-fingerprinting usando o primer (GTG)<sub>5</sub> possibilitou a diferenciação de linhagens de *S.cerevisiae* dominantes do processo fermentativo em destilarias de álcool combustível do Nordeste do Brasil. A partir dessas análises, uma nova linhagem industrial de *S.cerevisiae* foi selecionada e denominada JP1. Essa levedura apresentou capacidade fermentativa e resistência a estresse semelhantes às linhagens comerciais normalmente usadas nesse processo. Além disso, essa linhagem mostrou alta eficiência de transformação, indicando o seu potencial para manipulações genéticas. A linhagem JP1 é capaz de crescer em YPD pH 2,5 com ácido sulfúrico, porém quando cultivada em meio mineral essa linhagem foi capaz de crescer em pH 2.

A caracterização genética de JP1, através da análise tétrades mostrou que essa levedura é diplóide, porém não formando tétrades completas, possivelmente devido a aneuploidia ou presença de alelo letal ou ambas as características.

Através do cultivo em bateladas sucessivas em YPD-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, tanto em pH 2,5 quanto em pH 2,0, foi possível isolar uma linhagem mutante derivada de JP1 resistente a baixos valores de pH. A linhagem mutante se mostrou mais resistente a ácido do que a linhagem selvagem, porém a resistência desse mutante a ácido inorgânico foi suprimida pela adição de 0,5 mM de sorbato ao meio de cultura, indicando que esses dois tipos de ácido apresentam mecanismos de ação diferentes e, consequentemente, desencadeiam respostas fisiológicas independentes.

Nos ensaios de fermentação, JP1 apresentou uma maior produção de etanol em pH 6 em relação à linhagem de laboratório JT95. Porém, a redução do pH do meio para 2 reduziu a produção de etanol em cerca de 20% para ambas as linhagens. A linhagem JT95 apresentou uma taxa específica de crescimento reduzida em meio mineral pH 2. A determinação do perfil de expressão gênica de JT-95 durante a fermentação etanólica em baixo pH através da técnica de DNA microarray revelou que os principais genes envolvidos na assimilação de enxofre e no metabolismo dos aminoácido sulfurados metionina e cisteína foram reprimidos. Esse resultado poderia indicar uma condição de auxotrofia para esses aminoácidos, porém quando estes foram adicionados ao meio de cultura a taxa de crescimento não foi restaurada. É possível que o íon sulfato não entre na célula, uma vez que o gene da sulfato permease é reprimido em pH 2. Além disso, a ativação do sulfato no meio intracelular ocorre a custa de ATP. Uma vez que o ácido sulfúrico causa danos à célula, é possível que a esta economize ATP para restaurar as estruturas celulares. Para se ter uma idéia mais concreta dos efeitos do pH do meio externo na fisiologia celular é necessário se fazer um estudo relacionando expressão gênica, síntese de proteínas e acúmulo de metabolitos na célula.

## 7 ANEXOS

### 7.1 Letters in Applied Microbiology

Part of Journal of Applied Microbiology, the Official Journal of the Society for Applied Microbiology **Edited by:J.-Y. Maillard**

**ISI Journal Citation Reports® Ranking:** 2004: 62/133 (Biotechnology & Applied Microbiology); 56/84 (Microbiology)

**Impact Factor:** 1.461

#### **The preparation and presentation of manuscripts**

Page charges are only incurred with respect to pages requiring colour printing (see below). Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in *Letters* is at a premium, individual papers have a limit of approximately 4000 words, including figures and tables (N.B. a half page figure is equivalent to 450 words). The Editors reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscript. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard. By submission of a manuscript to the journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere.

**Format of papers** Manuscripts should be prepared using a word-processor. Text must be double-spaced, and the right hand margin justification should be switched off. Similarly, artificial word breaks at the end of lines must be avoided. A margin of at least 2.5 cm should be left around the text. The pages of the manuscript must be numbered consecutively, and should have line numbers. Do not use the carriage return (enter) at the end of lines within a paragraph.

Turn the hyphenation option off.

The first page should show: (a) the title; (b) name(s) of author(s) and place(s) where the work was done; (c) an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; (d) the name, complete mailing address, email address, telephone and fax numbers of the author to whom all correspondence should be addressed and who will check the proofs.

**Submissions** Authors are invited to suggest at least three reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them. Conversely, authors may identify, with appropriate justification, reviewers or institutions that they would prefer were not approached. Authors are advised that Editors reserve the right to select reviewers of their choice. Authors are advised to submit their manuscripts online at <http://appliedmicrobiology.manuscriptcentral.com/>. If you experience difficulties submitting your manuscript online you should first contact the Editorial Assistant [lam@oxon.blackwellpublishing.com](mailto:lam@oxon.blackwellpublishing.com). A helpline for technical support is accessible on the online submission site. Save your complete manuscript as a Word document (.doc), Rich Text Format (.rtf), Portable Document Format (.pdf)

or PostScript (.ps) file. The file will be converted to a PDF when uploaded. All original files that you upload will be available and can be accessed by the Editorial Office if necessary.

**1. Full-length papers** The paper should have as its aim the development of concepts as well as the recording of facts. The manuscript should be prepared for a wide readership. As far as possible the paper should present the results of a substantial programme of research. Sequential publication of numbered papers will not be permitted. The paper will have the following sections: (a) ABSTRACT: A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added; (b) INTRODUCTION: A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject; (c) MATERIALS AND METHODS: Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 96(2):221; available at <http://www.blackwellsynergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-2672.2003.02188.x/full>); (d) RESULTS: Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study; (e) DISCUSSION: This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section; (f) ACKNOWLEDGEMENTS; and (g) REFERENCES: Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones et al. (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference unless this causes confusion, e.g. Jones, Brown and Green (1992) and Jones, Green and Smith (1992) would have to be quoted in full. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones et al. 1956). Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. This also applies to the Bibliography. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. References to papers not freely available to the public without charge are not acceptable. Web sites should be quoted in the text with an access date.

**Layout of references** The Harvard system should be used. Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Where italics are intended, words must either be typed in roman and underlined or printed in italics from a word processor. Abbreviate journal titles according to Index Medicus ([http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms\\_cond.html](http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html)). The following is an example of order and style to be used in the manuscript: Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the

enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127–135. Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office. Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In *Protozoan Parasites in Water* ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91–96. London: The Royal Society of Chemistry.

Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

**English usage** Numbers in text: one to nine in full; 10 and above as numerals. Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc.

**Headings** The hierarchy of the headings used is: First Order

**MATERIALS AND METHODS** Second Order **Sample preparation** Third Order  
*The media*. First paragraph runs on; second and subsequent paragraphs indented.

**Abbreviations and units** The Journal uses SI units: g l<sup>-1</sup> not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l<sup>-1</sup> (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (g). Please refer to the *Biochemical Journal* 'Instructions to Authors' [www.biochemj.org/bj/bj2a.htm](http://www.biochemj.org/bj/bj2a.htm).

**Microbial nomenclature** The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*; groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group A). Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae). The nomenclature used when describing the species of *Salmonella* should accord with the system proposed by Le Minor and Popoff (<http://www.bacterio.cict.fr/>). Specifically, at the first citation of a serotype the genus name is given followed by the word 'serotype' and then the serotype name. Names of serotypes should be in Roman type with the first letter capitalized (for example *Salmonella* serotype Typhimurium). Subsequently the name should be written with the genus (abbreviated) followed directly by the serotype name (for example *Salm.* Typhimurium). Here is a list of abbreviations currently in use for common generic names: *Acet.*, *Acetobacter*; *Ac.*, *Acinetobacter*; *Act.*, *Actinomyces*; *Aer.*, *Aeromonas*; *Ag.*, *Agrobacterium*; *Alc.*, *Alcaligenes*; *Alt.*, *Alteromonas*; *B.*, *Bacillus*; *Bact.*, *Bacteroides*; *Bord.*, *Bordetella*; *Bran.*, *Branhamella*; *Br.*, *Brucella*; *Camp.*, *Campylobacter*; *Cit.*, *Citrobacter*; *Cl.*, *Clostridium*; *Coryne.*, *Corynebacterium*;

*Cyt.*, *Cytophaga*; *Des.*, *Desulfomonas* or *Desulfovibrio* (spell out if both appear in same paper); *Edw.*, *Edwardsiella*; *Ent.*, *Enterobacter* or *Enterococcus* (spell out if both appear in same paper); *Erw.*, *Erwinia*; *E.*, *Escherichia*; *Eu.*, *Eubacterium*; *Fl.*, *Flavobacterium*; *Fus.*, *Fusobacterium*; *G.*, *Gemella*; *H.*, *Haemophilus*; *Kl.*, *Klebsiella*; *Lact.*, *Lactobacillus*; *L.*, *Lactococcus*; *Leg.*, *Legionella*; *Leuc.*, *Leuconostoc*; *L.*, *Listeria*; *Meth.*, *Methanobacterium* or *Methanococcus* (spell out if both appear in same paper); *Mic.*, *Microbacterium*; *M.*, *Micrococcus*; *Mor.*, *Moraxella*; *Myco.*, *Mycobacterium*; *Myc.*, *Mycoplasma*; *N.*, *Neisseria*; *Nit.*, *Nitrobacter* or *Nitrosomonas* (spell out if both appear in same paper); *Noc.*, *Nocardia*; *Past.*, *Pasteurella*; *Ped.*, *Pediococcus*; *Ple.*, *Plesiomonas*; *Pr.*, *Proteus*; *Ps.*, *Pseudomonas*; *Rh.*, *Rhizobium*; *R.*, *Ruminococcus*; *Salm.*, *Salmonella*; *Ser.*, *Serratia*; *Sh.*, *Shigella*; *Staph.*, *Staphylococcus*; *Strep.*, *Streptococcus*; *S.*, *Streptomyces*; *T.*, *Thiobacillus*; *V.*, *Vibrio*; *X.*, *Xanthomonas*; *Y.*, *Yersinia*. For plant pathogenic bacteria, authors may need to refer to the list of pathovars compiled by the International Society for Plant Pathology: Young, J.M., Bull, C.T., De Boer, S.H., Firrao, G., Gardan, L., Saddler, G.E., Stead, D.E. and Takikawa, Y. Names of Plant Pathogenic Bacteria Published Since 1995. Report of the Taxonomy of Bacterial Plant Pathogens Committee of the International Society of Plant Pathology.

Available at

[http://www.isppweb.org/names\\_bacterial\\_new2004.asp](http://www.isppweb.org/names_bacterial_new2004.asp) In this, many species names not included in the Approved Lists ([www-sv.cict.fr/bacterio](http://www-sv.cict.fr/bacterio)) are reduced to the rank of pathovar so that the original names are retained in a trinomial form. Where the pathovar name is cited it may subsequently be abbreviated as follows: *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* becomes *P. s. phaseolicola*. Reference to the two lists avoids the need for citing past authors who named or renamed pathogens but, for completeness or clarity, synonyms suggested by more recent work may have to be considered.

**Nucleotide sequences** (1) Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the manuscript; (2) Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript. Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information; (3) Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure.

**Statistics** Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated. Authors are urged to give consideration to the

assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

**Tables** Tables must be prepared using the same word processing package as the manuscript text. They should not be embedded but be placed immediately following the main text. Do not submit tables separately. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): \*, †, ‡, §, , \*\*, †† etc. For an example of LAM table style, [click here](#).

**Figures** Figures may be line drawings or photographs. They may be uploaded to the online submission site as separate files or included within the manuscript following the text and any tables. Do not embed figures in the text. All graphs, charts and diagrams must be submitted in a finished form and at their intended publication size. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend typed on a separate sheet. For an example of LAM figure style, [click here](#).

*Photographs.* These must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels, with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers). Captions should be set out in the same manner as that used for figures.

*Electronic submission.* We would like to receive your artwork in electronic form. Please save line art (vector graphics) in encapsulated PostScript (EPS) format. Photographic images should be saved as Tagged Image Format Files (TIFF). Please indicate any form of file compression used (e.g. Zip). Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: <http://www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp>

*Colour figures.* It is the policy of the Journal for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF from [http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN\\_Sub2000\\_X\\_CoW.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf). If you are unable to download the form please contact the Editorial Office.

**Footnotes** Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

**Experimental hazards** Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

**Ethics of experimentation** The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided to the Journal Editor. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example in vitro biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations.

**Gnotobiotic animals** The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals* are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free animals* are those with an associated flora which have become conventional.

**Supplementary material** Authors wishing to submit supplementary material (such as multimedia adjuncts, large data sets, extra colour illustrations, bibliographies or any other material for which there is insufficient space in the print edition of the Journal) must do so at the time of first submission. This supplementary material is an integral part of the article and will be reviewed accordingly. The availability of supplementary material should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supplementary material' and providing titles of figures and tables.

**2. Review Articles Preparation of manuscript** These will present a substantial survey with an adequate historical perspective of the literature on some facet of applied microbiology. Your manuscript should not be simply a review of past work or be concentrated largely on unpublished results from your or colleagues' laboratory. We would prefer to see a distillation of early and present work within the field to show progress and explain the present interest and relevance. It is essential at the planning stage to realize that there is a limit to the number of pages available. The final manuscript must not exceed 22 pages (A4) with double-spaced typing, including references. The Tables and Figures must be considered as part of the text and the pages available for text reduced accordingly. References can make a heavy demand on the pages available to you, and it is suggested that you select key references only.

**Manuscript presentation** The headings in these Review articles are of the author's choice; they should be listed under the heading 'Contents' on page 2 of the manuscript. A short SUMMARY of 150-200 words must be included. The first page of the manuscript must give only (a) the title; (b) name(s) of author(s) and address; (c) an abbreviated title to be used for the running headline not exceeding 35 letters and spaces; (d) the name, postal and email address of the author to whom all correspondence should be addressed and who will check the proofs.

- A. The title should be as shown here. Lower case after first letter.
- B. The author(s) – I.M. Able, J. Brown and A. Lincoln.
- C. Address – upper and lower case.
- D. List of contents, to follow title page.
  - 1. Summary
  - 2. Introduction
    - 2.1 .....
    - 3. ....
    - 3.1 .....
    - 3.2 .....
- E. The manuscript
  - 1 SUMMARY (left flush)
  - 2 INTRODUCTION
  - 3 INFECTIONS CAUSED BY PATHOGENS
    - 3.1 Skin infections
    - 3.2 Pulmonary infections
  - 4 INCIDENCE
  - 5 TREATMENT
  - 6 CONCLUSIONS
  - 7 REFERENCES

### **3. Letters to the Editor**

The Chief Editor will consider letters which will provide further debate on a particular topic arising from the publication of a paper. Author(s) of the paper will be sent an edited copy of the letter and they will have the right of reply. Both letters will be published in the Journal.

### **Proofs**

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software may be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html> This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proofs. Hard copy proofs will be posted if no email address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, will be charged separately.

## **Offprints**

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal.

## **Exclusive licence**

Papers are accepted on the understanding that *Letters* is granted exclusive licence to publish them.

## **OnlineOpen**

OnlineOpen is a pay-to-publish service from Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via Blackwell Synergy. Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee of £1250 (equivalent to \$2500), excluding colour charges, to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. The print version of the article will also be branded as OnlineOpen and will draw attention to the fact that the paper can be downloaded for free via Blackwell Synergy.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the combined payment and licence form available from our website at:

[http://www.blackwellpublishing.com/pdf/LAM\\_OOF.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/LAM_OOF.pdf)

(Please note this form is for use with OnlineOpen material ONLY.)

Once complete this form should be sent to the Editorial Office along with the rest of the manuscript materials at the time of acceptance or as soon as possible after that (preferably within 24 hours to avoid any delays in processing). Please do not inform the Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen before that paper has been accepted for publication.

The copyright statement for OnlineOpen authors will read:

(c) [date] The Author(s) Journal compilation (c) [date] The Society for Applied Microbiology

## **Author material archive policy**

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you

require the return of any material submitted, please inform the Editorial Office or Production Editor.

### **Abbreviations**

These are some examples of common abbreviations used in *Letters in Applied Microbiology*:

A, Absorbance  
approx. or c., approximately  
at. wt., atomic weight  
bp, base pairs  
by vol, by volume (for greater than two component liquids)  
cm<sup>2</sup>, per square centimetre  
cpDNA, chloroplast DNA  
D, attenuation (see  
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/newsletter/1996/news3.html>  
Da (kDa), daltons (kilodaltons)  
edn, edition  
ed., editor(s)  
ergs. sq. mm<sup>-1</sup>, ergs per square millimetre  
IU, International unit  
kbp, kilobase pair  
Mabs, monoclonal antibodies  
MIC, minimal inhibitory concentration  
mol 1-1, moles per litre  
Mr, molecular mass  
nm, nanometre  
OD, optical density  
OFAGE, orthogonal field alteration gel electrophoresis  
ORF or orf, open reading frame  
P, probability  
PFG, pulsed field gradient  
ppm, parts per million  
recDNA, recombinant DNA  
rev min<sup>-1</sup>, revolution per minute  
SD, standard deviation  
SE, standard error  
subsp., subspecies  
U, enzyme unit  
UV, ultraviolet  
vs, versus  
v/v, volume per volume  
w/v, weight per volume  
w/w, weight per weight  
There is no need to define common acronyms such as ATP, EDTA, ELISA, GLC, HPLC, RNA or SDS-PAGE.

### **OnlineEarly**

*Letters in Applied Microbiology* is covered by Blackwell Publishing's *OnlineEarly* service.

OnlineEarly articles are complete full-text articles published online in advance of

their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. *OnlineEarly* articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of *OnlineEarly* articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so *OnlineEarly* articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

### **Disclaimer**

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.

## **7.2 Journal of Applied Microbiology**

Including Letters in Applied Microbiology & Annual Symposium - the Official Journals of the Society for Applied Microbiology.

[Published for the Society for Applied Microbiology](#)

**Edited by:**

A. Gilmour

**ISI Journal Citation Reports® Ranking:** 2004: 51/133  
(Biotechnology & Applied Microbiology); 48/84 (Microbiology)

**Impact Factor:** 1.835 (ISI Impact Factor for 2004)



---

**Including *Letters in Applied Microbiology* & Annual Symposium. The Official Journals of the Society for Applied Microbiology.**

*Journal of Applied Microbiology* publishes research and review papers on all aspects of applied microbiology; including environmental, food, agricultural, medical, pharmaceutical, veterinary, taxonomy, soil, systematics, water and biodeterioration. Papers reporting work on all microorganisms, including viruses, are welcomed providing they demonstrate new findings of relevance to the field as a whole.

**Rapid Production:** Average time from acceptance to publication is now around 5 months.

---

## **The preparation and presentation of manuscripts**

Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in the Journal is at a premium, the Editors always reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscripts. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard. By submission of a manuscript to the journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere.

### **Format of papers**

Manuscripts should be prepared using a word-processor. Text must be double-spaced, and the right hand margin justification should be switched off. Similarly, artificial word breaks at the end of lines must be avoided. A margin of at least 2.5 cm should be left around the text. The pages of the manuscript must be numbered consecutively, and should have line numbers. Do not use the carriage return (enter) at the end of lines within a paragraph. Turn the hyphenation option off. The first page should show: (a) the title; (b) name(s) of author(s) and place(s) where the work was done; (c) an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; (d) the name, complete mailing address, email address, telephone and fax numbers of the author to whom all correspondence should be addressed and who will check the proofs. Authors may be advised that short papers not exceeding four published pages would be better placed in *Letters in Applied Microbiology*.

### **Submissions**

Authors are invited to suggest at least three reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them. Conversely, authors may identify, with appropriate justification, reviewers or institutions that they would prefer were not approached. Authors are advised that Editors reserve the right to select reviewers of their choice. Authors are advised to submit their manuscripts online at <http://appliedmicrobiology.manuscriptcentral.com/>. If you experience difficulties submitting your manuscript online you should first contact the Editorial Assistant [jam@oxon.blackwellpublishing.com](mailto:jam@oxon.blackwellpublishing.com). A helpline for technical support is accessible on the online submission site. Save your complete manuscript as a Word document (.doc), Rich Text Format (.rtf), Portable Document Format (.pdf) or PostScript (.ps) file. The file will be converted to a PDF when uploaded. All original files that you upload will be available and can be accessed by the Editorial Office if necessary.

#### **1. Full-length papers**

The paper should have as its aim the development of concepts as well as the recording of facts. The manuscript should be prepared for a wide readership. As far as possible the paper should present the results of a substantial programme of research. Sequential publication of numbered papers will not be permitted.

The paper will have the following sections:

- (a) ABSTRACT: A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added;
- (b) INTRODUCTION: A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;
- (c) MATERIALS AND METHODS: Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control

(JAM 2004 96(2):221; available at <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-2672.2003.02188.x/full>);

- (d) RESULTS: Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study. In general, journal papers will contain between one and seven figures and tables;
- (e) DISCUSSION: This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section;
- (f) ACKNOWLEDGEMENTS;
- (g) REFERENCES: Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones et al. (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference unless this causes confusion, e.g. Jones, Brown and Green (1992) and Jones, Green and Smith (1992) would have to be quoted in full. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones et al. 1956). Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. This also applies to the Bibliography. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. References to papers not freely available to the public without charge are not acceptable. Web sites should be quoted in the text with an access date.

## Layout of references

The Harvard system should be used. Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Where italics are intended, words must either be typed in roman and underlined or printed in italics from a word processor. Abbreviate journal titles according to *Index Medicus* ([http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms\\_cond.html](http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html)). The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127–135.

Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In *Protozoan Parasites in Water* ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91–96. London: The Royal Society of Chemistry.

Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

## English usage

Numbers in text: one to nine in full; 10 and above as numerals. Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc.

## Headings

The hierarchy of the headings used is: First Order

## MATERIALS AND METHODS

Second Order

### Sample preparation

Third Order

#### *The media*

First paragraph runs on; second and subsequent paragraphs indented.

## Abbreviations and units

The Journal uses SI units: g l<sup>-1</sup> not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l<sup>-1</sup> (not M or N); probability is P; centrifugation conditions

relative to gravity (*g*). Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors' [www.biochemj.org/bj/bji2a.htm](http://www.biochemj.org/bj/bji2a.htm).

### **Microbial nomenclature**

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*); groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group

A). Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae) . Here is a list of abbreviations currently in use for common generic names: *Acet.*, *Acetobacter*; *Ac.*, *Acinetobacter*; *Act.*, *Actinomyces*; *Aer.*, *Aeromonas*; *Ag.*, *Agrobacterium*; *Alc.*, *Alcaligenes*; *Alt.*, *Alteromonas*; *B.*, *Bacillus*; *Bact.*, *Bacteroides*; *Bord.*, *Bordetella*; *Bran.*, *Branhamella*; *Br.*, *Brucella*; *Camp.*, *Campylobacter*; *Cit.*, *Citrobacter*; *Cl.*, *Clostridium*; *Coryne.*, *Corynebacterium*; *Cyt.*, *Cytophaga*; *Des.*, *Desulfomonas* or *Desulfovibrio* (spell out if both appear in same paper); *Edw.*, *Edwardsiella*; *Ent.*, *Enterobacter* or *Enterococcus* (spell out if both appear in same paper); *Erw.*, *Erwinia*; *E.*, *Escherichia*; *Eu.*, *Eubacterium*; *Fl.*, *Flavobacterium*; *Fus.*, *Fusobacterium*; *G.*, *Gemella*; *H.*, *Haemophilus*; *Kl.*, *Klebsiella*; *Lact.*, *Lactobacillus*; *L.*, *Lactococcus*; *Leg.*, *Legionella*; *Leuc.*, *Leuconostoc*; *L.*, *Listeria*; *Meth.*, *Methanobacterium* or *Methanococcus* (spell out if both appear in same paper); *Mic.*, *Microbacterium*; *M.*, *Micrococcus*; *Mor.*, *Moraxella*; *Myco.*, *Mycobacterium*; *Myc.*, *Mycoplasma*; *N.*, *Neisseria*; *Nit.*, *Nitrobacter* or *Nitrosomonas* (spell out if both appear in same paper); *Noc.*, *Nocardia*; *Past.*, *Pasteurella*; *Ped.*, *Pediococcus*; *Ple.*, *Plesiomonas*; *Pr.*, *Proteus*; *Ps.*, *Pseudomonas*; *Rh.*, *Rhizobium*; *R.*, *Ruminococcus*; *Salm.*, *Salmonella*; *Ser.*, *Serratia*; *Sh.*, *Shigella*; *Staph.*, *Staphylococcus*; *Strep.*, *Streptococcus*; *S.*, *Streptomyces*; *T.*, *Thiobacillus*; *V.*, *Vibrio*; *X.*, *Xanthomonas*; *Y.*, *Yersinia*. For plant pathogenic bacteria, authors may need to refer to the list of pathovars compiled by the International Society for Plant Pathology: Young, J.M., Bull, C.T., De Boer, S.H., Firrao, G., Gardan, L., Saddler, G.E., Stead, D.E. and Takikawa, Y. Names of Plant Pathogenic Bacteria Published Since 1995. Report of the Taxonomy of Bacterial Plant Pathogens Committee of the International Society of Plant Pathology. Available at [http://www.isppweb.org/names\\_bacterial\\_new2004.asp](http://www.isppweb.org/names_bacterial_new2004.asp). In this, many species names not included in the Approved Lists ([www-sv.cict.fr/bacterio](http://www-sv.cict.fr/bacterio)) are reduced to the rank of pathovar so that the original names are retained in a trinomial form. Where the pathovar name is cited it may subsequently be abbreviated as follows: *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* becomes *P. s. phaseolicola*. Reference to the two lists avoids the need for citing past authors who named or renamed pathogens but, for completeness or clarity, synonyms suggested by

more recent work may have to be considered. The nomenclature used when describing the species of salmonella should accord with the system proposed by Le Minor and Popoff (<http://www.bacterio.cict.fr/>). Specifically, at the first citation of a serotype the genus name is given followed by the word "serotype" and then the serotype name. Names of serotypes should be in Roman type with the first letter capitalised (for example *Salmonella* serotype Typhimurium). Subsequently the name should be written with the genus (abbreviated) followed directly by the serotype name (for example *Salm.* Typhimurium).

## **Nucleotide sequences**

- (1) Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the manuscript;
- (2) Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript. Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information;
- (3) Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure.

## **Statistics**

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated. Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

## **Tables**

Tables must be prepared using the same word processing package as the manuscript text. They should not be embedded but be placed immediately following the main text. Do not submit tables separately. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): \*, †, ‡, §, , \*\*, †† etc. For an example of JAM table style, [click here](#).

## **Figures**

Figures may be line drawings or photographs. They may be uploaded to the online submission site as separate files or included within the manuscript following the text and any tables. Do not embed figures in the text. All graphs, charts and diagrams must be submitted in a finished form and at their intended publication size. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend typed on a separate sheet. For an example of JAM figure style, [click here](#).

*Photographs.* These must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels, with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers). Captions should be set out in the same manner as that used for figures.

*Electronic submission.* We would like to receive your artwork in electronic form. Please save line art (vector graphics) in encapsulated PostScript (EPS) format. Photographic images should be saved as Tagged Image Format Files (TIFF). Please indicate any form of file compression used (e.g. Zip). Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: <http://www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp>

*Colour figures.* It is the policy of the Journal for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF from [http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN\\_Sub2000\\_X\\_CoW.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf). If you are unable to download the form please contact the Editorial Office.

## **Footnotes**

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

## **Experimental hazards**

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

## **Ethics of experimentation**

The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided to the Journal Editor. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example *in vitro* biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations.

### **Gnotobiotic animals**

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals* are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free* animals are those with an associated flora which have become conventional.

### **Supplementary material**

Authors wishing to submit supplementary material (such as multimedia adjuncts, large data sets, extra colour illustrations, bibliographies or any other material for which there is insufficient space in the print edition of the Journal) must do so at the time of first submission. This supplementary material is an integral part of the article and will be reviewed accordingly. The availability of supplementary material should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supplementary material' and providing titles of figures and tables.

## **2. Review Articles**

Review articles should not exceed 10–12 Journal pages.

### **Preparation of manuscript**

These will present a substantial survey with an adequate historical perspective of the literature on some facet of applied microbiology. Your manuscript should not be simply a review of past work or be concentrated largely on unpublished results from your or colleagues' laboratory. We would prefer to see a distillation of early and present work within the field to show progress and explain the present interest and relevance. It is essential at the planning stage to realize that there is a limit to the number of pages available. The final manuscript must not exceed 32 pages (A4) with double-spaced typing, including references. The Tables and Figures must be considered as part of the text and the pages

available for text reduced accordingly. References can make a heavy demand on the pages available to you, and it is suggested that you select key references only.

### **Manuscript presentation**

The headings in these Review articles are of the author's choice; they should be listed under the heading 'Contents' on page 2 of the manuscript. A short SUMMARY of 150-200 words must be included. The first page of the manuscript must give only (a) the title; (b) name(s) of author(s) and address; (c) an abbreviated title to be used for the running headline not exceeding 35 letters and spaces; (d) the name, postal and email address of the author to whom all correspondence should be addressed and who will check the proofs.

- A. The title should be as shown here. Lower case after first letter
- B. The author(s) – I.M. Able, J. Brown and A. Lincoln.
- C. Address – upper and lower case.
- D. List of contents, to follow title page.
- E. 1. Summary
- 2. Introduction
- 2.1 .....
- 3. .....
- 3.1 .....
- 3.2 .....
- E. The manuscript
- F. 1 SUMMARY (left flush)
- G. 2 INTRODUCTION
- H. 3 INFECTIONS CAUSED BY PATHOGENS
- I. 3.1 Skin infections
- J. 3.2 Pulmonary infections
- K. 4 INCIDENCE
- L. 5 TREATMENT
- M. 6 CONCLUSIONS
- N. 7 REFERENCES

### **3. Letters to the Editor**

The Chief Editor will consider letters which will provide further debate on a particular topic arising from the publication of a paper. Author(s) of the paper will be sent an edited copy of the letter and they will have the right of reply. Both letters will be published in the Journal.

### **Proofs**

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software may be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html> This will enable the file

to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proofs. Hard copy proofs will be posted if no email address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, will be charged separately.

### **Offprints**

Authors will be provided with electronic PDF offprint of their article. This PDF may be posted on the Contributing Authors' own website for personal or professional use, or on the Contributing Authors' internal university or corporate network/intranet, or on a secure external website at the Contributing Authors' institution, providing access is limited to members of the Contributing Authors' university or corporation. Paper offprints may be ordered at prices as quoted on the order form that accompanies proofs.

### **Exclusive licence**

Papers are accepted on the understanding that the *Journal* is granted exclusive licence to publish them.

### **OnlineOpen**

OnlineOpen is a pay-to-publish service from Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via Blackwell Synergy. Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee of £1250 (equivalent to \$2500), excluding colour charges, to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. The print version of the article will also be branded as OnlineOpen and will draw attention to the fact that the paper can be downloaded for free via Blackwell Synergy.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the combined payment and licence form available from our website at:

[http://www.blackwellpublishing.com/pdf/JAM\\_OOF.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/JAM_OOF.pdf)

(Please note this form is for use with OnlineOpen material ONLY.)

Once complete this form should be sent to the Editorial Office along with the rest of the manuscript materials at the time of acceptance or as soon as possible after that (preferably within 24 hours to avoid any delays in processing). Please do not inform the Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen before that paper has been accepted for publication.

The copyright statement for OnlineOpen authors will read:

(c) [date] The Author(s) Journal compilation (c) [date] The Society for Applied Microbiology

## **Author material archive policy**

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Editorial Office or Production Editor.

## **Abbreviations**

These are some examples of common abbreviations used in *Journal of Applied Microbiology*:

A, Absorbance

approx. or *ca*, approximately

at. wt., atomic weight

bp, base pairs

by vol, by volume (for greater than two component liquids)

cm<sup>2</sup>, per square centimeter

cpDNA, chloroplast DNA

D, attenuation

(see <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/newsletter/1996/news3.html>

Da (kDa), daltons (kilodaltons)

edn, edition

ed., editor(s)

ergs. sq. mm<sup>-1</sup>, ergs per square millimeter

IU, International unit

kbp, kilobase pair

Mabs, monoclonal antibodies

MIC, minimal inhibitory concentration

mol 1-1, moles per litre

Mr, molecular mass

nm, nanometre

OD, optical density

OFAGE, orthogonal field alteration gel electrophoresis

ORF or orf, open reading frame

*P*, probability

PFG, pulsed field gradient

ppm, parts per million

recDNA, recombinant DNA

rev min<sup>-1</sup>, revolution per minute

SD, standard deviation

SE, standard error

subsp., subspecies

U, enzyme unit

UV, ultraviolet

vs, versus

v/v, volume per volume

w/v, weight per volume

w/w, weight per weight

There is no need to define common acronyms such as ATP, EDTA, ELISA, GLC, PLC, RNA or SDS-PAGE.

## **OnlineEarly**

*Journal of Applied Microbiology* is covered by Blackwell Publishing's *OnlineEarly* service.

*OnlineEarly* articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. *OnlineEarly* articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after

online publication. The nature of *OnlineEarly* articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so *OnlineEarly* articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

### **Disclaimer**

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.

Exclusive licence form: [http://www.blackwellpublishing.com/pdf/jam\\_caf.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/jam_caf.pdf)  
Colourwork Agreement form:  
[http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN\\_Sub2000\\_X\\_CoW.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf)

 Pós-Graduação em  
**Biologia de Fungos**

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Micologia  
50670-420, Recife [PE]  
fone | fax: 81 2126 8482, 2126 8865

## DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que **HÉLIO FERNANDES DE MELO**, defendeu sua Tese de Doutorado, sob o título "**RESPOSTA AO ESTRESSE ÁCIDO EM LEVEDURAS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA INDUSTRIAL**" no dia 10 de março de 2006 às 09:00 horas, tendo obtido a menção "**APROVADO**".

Recife, 10 de maio de 2006.

  
Giovanna de Lima Góes  
Secretaria PPGBF/UFPE  
SIAPE - 1132628