

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

DENISE CASTRO PARENTE

**GENÉTICA DO METABOLISMO DE FONTES DE NITROGÊNIO NA
LEVEDURA *DEKKERA BRUXELLENSIS***

Recife
2017

DENISE CASTRO PARENTE

**GENÉTICA DO METABOLISMO DE FONTES DE NITROGÊNIO NA LEVEDURA
*DEKKERA BRUXELLENSIS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior

Coorientador: Dr. Diogo Ardaillon Simões

Dra. Fernanda Cristina Bezerra Leite

Recife

2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Parente, Denise Castro

Genética do metabolismo de fontes de Nitrogênio na levedura *Dekkera bruxellensis* / Denise Castro Parente- 2017.

120 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antonio de Moraes Junior

Coorientadores: Diogo Ardailton Simões e Fernanda Cristina Bezerra Leite

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética, Recife, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Leveduras 2. Expressão gênica 3. Aminoácidos I. Moraes Junior, Marcos Antonio de (orient.) II. Simões, Diogo Ardailton (coorient.) III. Leite, Fernanda Cristina Bezerra (coorient.) IV. Título

579.562

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-168

DENISE CASTRO PARENTE

**GENÉTICA DO METABOLISMO DE FONTES DE NITROGÊNIO NA LEVEDURA
*DEKKERA BRUXELLENSIS***

Aprovada em: 15/ 12/ 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Anna Carolina Soares Almeida
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Tercílio Calsa Júnior
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Márcia Vanusa da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Elaine Malosso
Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE
2017

DEDICATÓRIA

Aos meus amores: Arthur e minha filhinha,
Beatriz. Vocês que, naturalmente, me faziam
desligar do doutorado todos os dias ao chegar em
casa, me ensinaram a ver a vida com mais
serenidade e me ajudam a ser melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o meu guia e meu sustento nessa caminhada.

Aos meus orientadores: Prof. Marcos Morais, Prof. Diogo Simões e Prof. Fernanda Leite, pelas orientações fundamentais no sucesso desse trabalho, pela confiança e oportunidade de crescimento profissional que levarei comigo para sempre. Muito obrigada.

Ao meu esposo, Arthur, pelo amor, por toda paciência e compreensão nos momentos difíceis.

A minha mãe e a minha avó, pelo amor e apoio incondicional e por terem me ensinado a viver.

A minha irmã, Laise, pela amizade e apoio nos momentos difíceis

A família do meu esposo, em especial minha sogra Ivonildes, tia Darci, tia Raissa e a vovó Narcisa, por todo o apoio e carinho me dado nesses quatro anos de doutorado

Ao Prof. Tercílio Calsa, pela oportunidade de desenvolver os experimentos de proteômica no LGPP e pelo conhecimento compartilhado

Aos meus colegas e amigos do LGM, pelo apoio na pesquisa, amizade, pelo conhecimento compartilhado e momentos de descontração.

Aos colegas LGPP, em especial Adalto e Fabiana, pelo apoio e boa vontade em me ensinar cada detalhe da (imensa) proteômica

A CAPES, pela concessão da bolsa de pós graduação.

RESUMO

O interesse pela levedura *Dekkera bruxellensis* tem aumentado na última década pela sua capacidade de instalação e manutenção no processo fermentativo industrial de produção de etanol combustível, chegando a superar a população de *Saccharomyces cerevisiae*, a principal levedura usada como fermento. Essa capacidade está relacionado a assimilação de nutrientes presentes no caldo de cana, como por exemplo as fontes de nitrogênio, sendo indispensáveis para o crescimento celular. Diante desse desempenho competitivo e fermentativo demonstrado pela *D. bruxellensis*, há um interesse em esclarecer de que forma acontece o sucesso dessa levedura no ambiente industrial. Este trabalho tem como objetivo avaliar a influência de diferentes fontes de nitrogênio na taxa específica de crescimento, bem como na fisiologia e expressão de genes de células de *D. bruxellensis* cultivadas na presença ou ausência de oxigênio. Para isso, foram feitos cultivos na presença de aminoácidos, nitrato ou amônio como fonte de nitrogênio em condições aeróbicas e anaeróbicas, aliados a análise fisiológica feitas em HPLC e genética através de expressão gênica por PCR em tempo real. Os resultados gerados nesse trabalho relatam que a disponibilidade de oxigênio influencia a preferência de assimilação de cada um dos aminoácidos bem como, a expressão de genes e permeases envolvidos no metabolismo central do nitrogênio da levedura *D. bruxellensis*. A glutamina é o aminoácido preferencial independente da concentração de oxigênio, no entanto em anaerobiose aspartato e glutamato também foram consideradas preferências. Os dados também mostram que a maquinaria catabólica no meio contendo todos aminoácidos e no meio contendo nitrato é mais eficiente na ausência de oxigênio. Além disso, apontam para a importância do nitrato como aceptor de elétrons na ausência de oxigênio, tal como observado em processos de fermentação industrial. Por fim, os resultados contribuem para uma melhor descrição de aspectos fisiológicos relacionados as fontes de nitrogênio pela levedura *D. bruxellensis* e revelam a influência negativa do oxigênio sobre a assimilação do nitrato, além de oferecer estratégias que ajudam a favorecer o seu crescimento, contribuindo para uma futura aplicação biotecnológica dessa levedura.

Palavras-chave: Nitrato. Amônio. Aminoácidos. Expressão gênica por qPCR. Anaerobiose.

ABSTRACT

The interest in the *Dekkera bruxellensis* yeast has increased in the last decade due to its capacity of installation and maintenance in the industrial fermentation process of ethanol fuel production, surpassing the population of *Saccharomyces cerevisiae*, the main yeast used as ferment. This capacity is related to the assimilation of nutrients present in sugarcane juice, such as nitrogen sources, which are indispensable for cell growth. Given this competitive and fermentative performance demonstrated by *D. bruxellensis*, there is an interest in clarifying the success of this yeast in the industrial environment and how it happens. This work aims to evaluate the influence of different nitrogen sources on the specific growth rate, as well as on the physiology and expression of *D. bruxellensis* cells grown in the presence or absence of oxygen. For this, cultures were made in the presence of amino acids, nitrate or ammonia as a source of nitrogen under aerobic and anaerobic conditions, allied to the physiological analysis done in HPLC and genetics through gene expression by real-time PCR. The results generated in this work report that the oxygen availability influences the assimilation preference of each of the amino acids as well as the expression of genes and permeases involved in the central nitrogen metabolism of the *D. bruxellensis* yeast. Glutamine is the preferred amino acid regardless. The oxygen concentration, however, there were also preferences considered in anaerobic aspartate and glutamate. The data also shows that the catabolic machinery in the medium containing all amino acids and in the medium containing nitrate is more efficient in the absence of oxygen. In addition, they point to the importance of nitrate as an electron acceptor in the absence of oxygen, as observed in industrial fermentation processes. Finally, the results contribute to a better description of the physiological aspects related to nitrogen sources by the *D. bruxellensis* yeast and reveal the negative influence of oxygen on the assimilation of nitrate, besides offering strategies that help to promote its growth, contributing to biotechnological application of this yeast.

Key-words: Nitrate. Ammonia. Amino acids. Gene expression by qPCR. Anaerobiosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Micrografia da linhagem GDB248 da espécie <i>D. bruxellensis</i>	14
Figura 2 - Relação filogenética entre leveduras.....	17
Figura 3 - Representação esquemática do metabolismo de aminoácidos.....	25
Figura 4 - Via de assimilação do nitrato em leveduras.....	29

ON THE CATABOLISM OF AMINO ACIDS IN THE YEAST *DEKKERA BRUXELLENSIS* AND THE IMPLICATIONS TO INDUSTRIAL FERMENTATION PROCESSES

Figure 1 - Growth curves of <i>Dekkera bruxellensis</i> GDB 248 in synthetic medium.....	57
Figure 2 - Growth curves of <i>Dekkera bruxellensis</i> GDB 248 in synthetic medium....	58
Figure 3 - Level of expression of the permease encoding genes.....	59
Figure 4 - Level of expression of the enzyme encoding genes.....	60

FISIOLOGIA DA LEVEDURA *DEKKERA BRUXELLENSIS* EM RESPOSTA A DIFERENTES FONTES NITROGÊNIO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE OXIGÊNIO

Figura 1 - Velocidade específica de consumo de glicose.....	69
---	----

LISTA DE TABELAS

ON THE CATABOLISM OF AMINO ACIDS IN THE YEAST *DEKKERA BRUXELLENSIS* AND THE IMPLICATIONS TO INDUSTRIAL FERMENTATION PROCESSES

Table 1 - Classification of amino acids.....	61
Table 2 - Assimilation of amino acids during growth of <i>Dekkera</i>	61

FISIOLOGIA DA LEVEDURA *DEKKERA BRUXELLENSIS* EM RESPOSTA A DIFERENTES FONTES NITROGÊNIO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE OXIGÊNIO

Tabela 1 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu\text{máx}$).....	69
Tabela 2 - Porcentagem de açúcar consumido, rendimento em biomassa, etanol, glicerol e acetato por células de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 na presença de amônio.....	72
Tabela 3 - Porcentagem de açúcar consumido, rendimento em biomassa, etanol, glicerol e acetato por células de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 na presença de amônio.....	73
Tabela 4 - Porcentagem de açúcar consumido, rendimento em biomassa, etanol, glicerol e acetato por células de <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 na presença de amônio.....	74
Tabela 5 - Velocidades específicas de conversão	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-OG	2-oxoglutarate
AA	Aminoácidos
BCAA	branched-chain AA
CNM	central nitrogen metabolism
cDNA	DNA complementar
DO	Densidade óptica
GOGAT	Glutamine/2-oxoglutarate amino transferase
GAAC	Via geral de controle dos aminoácidos
GS	Glutamine synthase
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
MW	Peso molecular
mRNA	RNA mensageiro
Ln	Logarítmo neperiano
N	Nitrogen
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADPH-Gdh	NADPH-dependent glutamate dehydrogenase
NAD-Gdh	NAD ⁺ -dependent glutamate dehydrogenase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCR	Repressão catabólica do nitrogênio
NMR	Repressão metabólica do nitrogênio
qPCR	PCR quantitativa
QR	Quantificação Relativa
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
RNA	Ribonucleic acid / Ácido ribonucléico
SD	Synthetic defined medium
RT-qPCR	PCR quantitativa com transcrição reversa
UV	Ultravioleta
YNB	Yeast Nitrogen Base
WGD	Duplicação do genoma total

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS	13
1.1.1 Objetivo geral	13
1.1.2 Objetivo específico.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DE <i>Dekkera bruxellensis</i>	14
2.2 ASPECTOS GENÉTICOS E EVOLUTIVOS DA LEVEDURA <i>D. bruxellensis</i>	16
2.3 FISILOGIA DE <i>Dekkera bruxellensis</i>	18
2.3.1 Aspectos fisiológicos que contribuem na sustentação de <i>D. bruxellensis</i> na dorna de fermentação industrial.....	18
2.3.2 Assimilação de fontes de carbono por <i>D. bruxellensis</i>	19
2.3.3 Impacto do oxigênio na produção de biomassa e etanol	20
2.3.4 Impacto do oxigênio na produção acetato e glicerol	22
2.3.5. Anaerobiose estrita em <i>D. bruxellensis</i>	23
2.4 METABOLISMO DO NITROGÊNIO	24
2.4.1 Aspectos gerais.....	24
2.4.2 Assimilação da fonte de nitrogênio	24
2.4.3 Regulação dos compostos nitrogenados	27
2.4.4 Metabolismo do nitrato	28
3 ON THE CATABOLISM OF AMINO ACIDS IN THE YEAST DEKKERA BRUXELLENSIS AND THE IMPLICATIONS TO INDUSTRIAL FERMENTATION PROCESSES	31
4 FISILOGIA DA LEVEDURA <i>DEKKERA BRUXELLENSIS</i> EM RESPOSTA A DIFERENTES FONTES NITROGÊNIO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE OXIGÊNIO.....	62
5 DISCUSSÃO GERAL	85
6 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS.....	91
ANEXO A - ANÁLISE DIFERENCIAL DO PROTEOMA DE <i>DEKKERA BRUXELLENSIS</i> CULTIVADA EM NITRATO NA AUSÊNCIA DE OXIGÊNIO	99
ANEXO B - YEAST AUTHOR GUIDELINES.....	112
ANEXO C - GLUTAMINE: A MAJOR PLAYER IN NITROGEN CATABOLITE REPRESSION IN THE YEAST DEKKERA BRUXELLENSIS	116
ANEXO D - CURRÍCULO LATTES ATUALIZADO (2013- ATUAL).....	117

1 INTRODUÇÃO

Dekkera bruxellensis é uma levedura altamente competitiva no contexto industrial de produção de etanol que tem caldo de cana como substrato, apresentando uma característica comum a poucas leveduras: a capacidade de crescer num ambiente anaeróbio. O êxito adaptativo das células de *D. bruxellensis* no ambiente industrial de produção de etanol está relacionado com a capacidade das células assimilarem nutrientes no caldo de cana, principalmente as fontes de carbono e nitrogênio. Como fontes de nitrogênio, são encontrados principalmente amônio e nitrato neste substrato, sendo este último assimilado apenas pelas células de *D. bruxellensis* e não pelas células de *Saccharomyces cerevisiae*. A capacidade de assimilação do nitrato pelas células de *D. bruxellensis*, acontecendo mesmo na presença de amônio foi descrito como um importante fator de adaptação para que as células cresçam e se estabeleçam no processo de fermentação industrial.

Apesar de *D. bruxellensis* ser uma levedura constantemente identificada nas destilarias de álcool combustível, cujo ambiente é predominantemente anaeróbio, poucos estudos relatam a fisiologia dessa levedura na ausência de oxigênio. Sabe-se que nessa condição as leveduras produzem glicerol a fim de re-oxidar o NADH gerado nos processos anabólicos, no entanto, é observado uma limitada produção de glicerol pelas células de *D. bruxellensis* durante o crescimento celular em relação ao que é produzido por *S. cerevisiae*. Sendo assim, não está claro na literatura como, em anaerobiose, as células de *D. bruxellensis* conseguem fechar seu balanço redox. Tem sido relatado, no entanto, que, em anaerobiose, a adição de aminoácidos ou do nitrato alivia o desbalanço redox gerado pela limitada produção de glicerol nestas células. Nesse contexto, a hipótese de que a capacidade de assimilação de diferentes fontes de nitrogênio altera diversos aspectos fisiológicos e genéticos na levedura *D. bruxellensis* enfatiza a importância da fonte de nitrogênio para o sucesso adaptativo dessa levedura na dorna de fermentação industrial.

Diante disso, a compreensão acerca da capacidade de metabolização de cada um dos aminoácidos, do nitrato e do amônio, principalmente na condição de anaerobiose estrita, ajudará na compreensão de como esses compostos favorecem a permanência da levedura *D. bruxellensis* no ambiente industrial. Neste contexto, no artigo intitulado “**On the catabolism of amino acids in the yeast *Dekkera bruxellensis* and the implications to industrial fermentation processes**” foi

avaliada a capacidade de assimilação de cada aminoácido o que permitiu classificá-los de acordo com sua preferência, bem como entender acerca do mecanismo de repressão catabólica do nitrogênio através do estudo da expressão de permeases e genes da via do metabolismo central do nitrogênio. Já o artigo intitulado **“Fisiologia da levedura *Dekkera bruxellensis* em resposta a presença de nitrato e/ou amônio como fontes nitrogênio na presença e ausência de oxigênio”** procurou investigar como a utilização do nitrato e da amônio afetam o metabolismo do carbono e os rendimentos dos produtos da fermentação em condições aeróbias e anaeróbias bem controladas. Os resultados gerados nesse trabalho relatam que a disponibilidade de oxigênio influencia a preferência de assimilação de cada um dos aminoácidos bem como, a expressão de genes e permeases envolvidos no metabolismo central do nitrogênio da levedura *D. bruxellensis*. Além disso, as taxas de crescimento no meio contendo nitrato ou amônio bem como, os produtos da fermentação são também notavelmente modificados em função da disponibilidade nitrogênio e oxigênio.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Estudar o efeito de diferentes fontes de nitrogênio no metabolismo central do carbono e do nitrogênio na levedura *Dekkera bruxellensis* na presença ou ausência de oxigênio.

1.1.2 Objetivo específico

- a) Avaliar a capacidade de crescimento de *D. bruxellensis* na presença de diferentes aminoácidos como fonte de nitrogênio em condições respiro-fermentativa na presença de oxigênio ou completamente fermentativa na ausência de oxigênio;
- b) Avaliar o papel de genes que codificam permeases e genes envolvidos no metabolismo central do nitrogênio na levedura *D. bruxellensis* na assimilação de diferentes fontes de nitrogênio, na presença ou ausência de oxigênio;

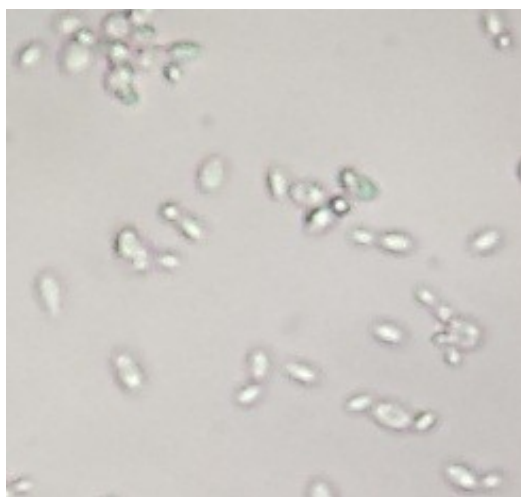
c) Investigar como a utilização do nitrato ou amônio afeta o metabolismo do carbono e os rendimentos dos produtos da fermentação em *D. bruxellensis* em condições aeróbias e anaeróbias.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DE *Dekkera bruxellensis*

A levedura da espécie *D. bruxellensis*, anamorfo *Brettanomyces bruxellensis* pertence a Família *Saccharomycetacea* (BARNETT et al., 1983). O gênero *Brettanomyces* é conhecido desde 1904. Esta levedura foi isolada no final da fermentação de uma cerveja inglesa e sua participação no processo estava relacionada à características aromáticas (CLAUSSEN, 1904). Mais adiante, em 1964, Van der Walt encontrou ascosporos em isolados de *B. bruxellensis* e *B. intermedius*, e descreveu o gênero *Dekkera* como teleomorfo de *Brettanomyces* (VAN DER WALT, 1964). A morfologia das células da levedura *D. bruxellensis* é bastante diversificada, apresentando-se principalmente na forma elíptica (VAN DER WALT, 1964), conforme apresentada.

Figura 1 - Micrografia da linhagem GDB248 da espécie *D. bruxellensis* crescidas em meio Mineral com amônio.



Fonte: Elaborada pelo autor (A) (2017)

A espécie *D. bruxellensis* tem um longo histórico de episódios de contaminação em destilarias de álcool combustível no Nordeste brasileiro (BASÍLIO et al., 2008; DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; PEREIRA et al., 2012) nos EUA, Canadá, Suécia (ABBOTT et al., 2005; PASSOTH et al., 2007) e na indústria

mundial de vinho (CHATONNET et al., 1992; LOUREIRO e MALFEITO-FERREIRA, 2003; WOOLFIT et al., 2007) cujos ambientes são predominantemente anaeróbios. Alguns trabalhos relatam a associação desta levedura à queda do rendimento em etanol e a mudanças no aroma e sabor dos vinhos (BASÍLIO et al., 2008; DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; LOUREIRO e MALFEITO-FERREIRA, 2003). Entretanto, em uma pesquisa feita em quatro destilarias de etanol no nordeste brasileiro, nas safras entre 2010-2011, *D. bruxellensis* esteve presente em 70% das amostras coletadas e sua prevalência variou de 0 a 70% nestas amostras. Mesmo assim, não foi relatado um efeito negativo dessa levedura sobre a eficiência do processo fermentativo (PEREIRA et al., 2012).

Por muito tempo a origem da contaminação na destilaria de etanol foi desconhecida. Recentemente, um trabalho tentou identificar a origem dessa contaminação no ambiente industrial de produção de etanol e se verificou a existência de células na água de lavagem, no caldo de cana, na vinhaça e no campo (DA SILVA et al., 2016). Nos vinhos, a contaminação geralmente não acontece durante a fermentação, sendo esta levedura frequentemente encontrada durante a conservação nos barris ou após envase, em média de 6 a 10 meses após o armazenamento (COCOLIN et al., 2004). Nos vinhos, esse micro-organismo converte ácidos hidroxicinâmicos em compostos fenólicos voláteis, que, em determinadas concentrações ocasionam o aparecimento de “*off-flavours*”, ou seja, substâncias que conferem odores e sabores indesejáveis às bebidas.

Apesar disso, em alguns vinhos, por exemplo, nos vinhos franceses *Chateau the Beaucastel*, *D. bruxellensis* contribui positivamente para o perfil aromático (SCHIFFERDECKER et al., 2014) e outro estudo mostra a capacidade que essa levedura tem de produzir substâncias capazes de conferir sabores desejáveis às bebidas fermentadas a partir do caldo de cana (CASTRO PARENTE et al., 2015). Além disso, um trabalho anterior já havia mostrado que o genoma desta levedura possui dois genes que codificam para a enzima responsável pela produção do fenil-acetaldeído (DE SOUZA LIBERAL et al., 2012), uma substância que confere o aroma floral aos vinhos (VERSTREPEN et al., 2003). A presença de dois parálogos para este gene chamado de *ARO10* no genoma de *D. bruxellensis* parece ser uma característica única dentre os ascomicetos, pelo menos daqueles cujo genoma já fora sequenciado (DE SOUZA LIBERAL et al., 2012). Isto reforça o potencial que

esta levedura pode ter na produção de bebidas diferenciadas, como já acontece na produção de cervejas Belgas do tipo Lambic (MARTENS et al, 1997).

2.2 ASPECTOS GENÉTICOS E EVOLUTIVOS DA LEVEDURA *D. bruxellensis*

Apesar do crescente número de estudos abordando aspectos fisiológicos de *D. bruxellensis*, pouco se sabe sobre suas características genéticas, e poucos trabalhos relatam a diversidade genética desta levedura.

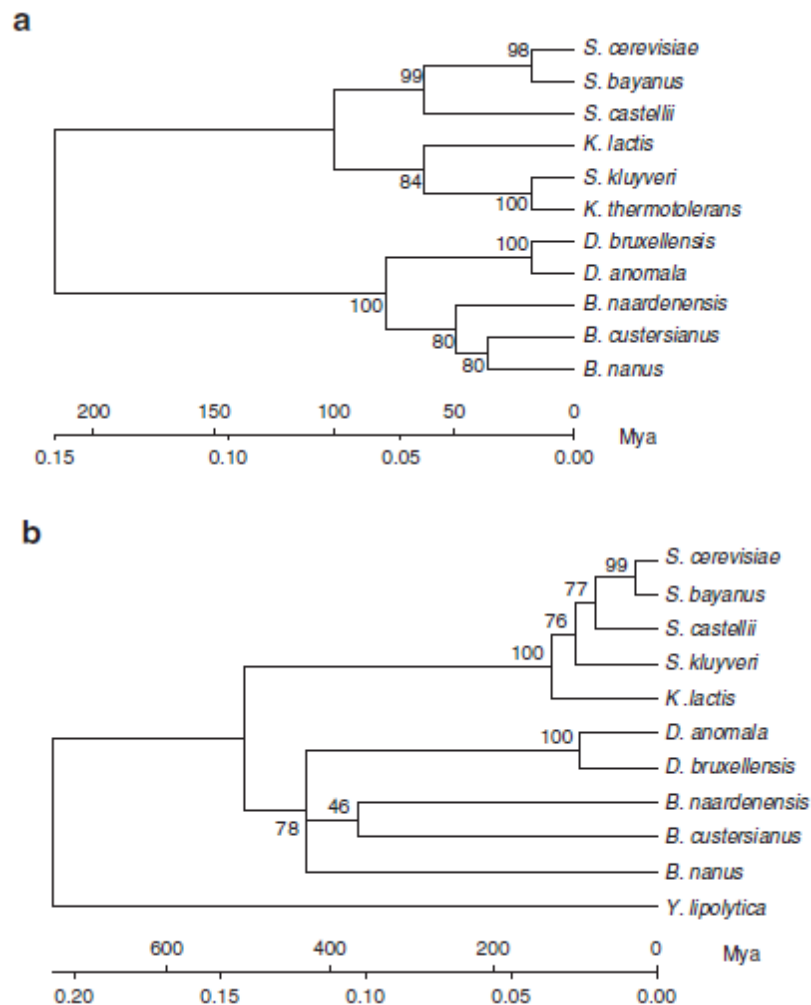
Em 2007, foi realizado o sequenciamento do genoma de um isolado de vinícola da levedura *D. bruxellensis* mostrando que o genoma desta espécie deve conter cerca de 7.340 genes. Foram identificadas 2.606 sequências completas ou parciais de genes codificadores de proteínas ortólogos a genes de *S. cerevisiae* e outros 277 não ortólogos *S. cerevisiae*, mas, ortólogos a outras espécies Saccharomycetales, como, *Candida albicans*, *Hansenula polymorpha* e *Pichia pastoris* (WOOLFIT et al., 2007). As proteínas ortólogas entre *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* apresentam cerca de 48,8% de identidade em aminoácidos enquanto *S. cerevisiae* e *C. albicans* compartilham cerca de 52,9%. O estudo de cariótipo de 30 linhagens de *D. bruxellensis* isoladas de vinho indicou que o número de cromossomos variou de quatro a nove, com tamanhos variando entre um pouco menos de 1Mb a mais de 6Mb (HELLBORG e PIŠKUR, 2009). Isso mostra uma grande diversidade genética nessa levedura, semelhante ao que acontece em *S. cerevisiae*.

Borneman et al. (2014) compararam o genoma de quatro cepas de *D. bruxellensis*, e duas delas (AWRI1613 e CBS2499) foram determinados como diplóides enquanto que as outras duas (AWRI11499 e AWRI1608) eram triplóides. Curiosamente, nas linhagens triplóides, estavam dois dos conjuntos cromossômicos das linhagens diplóides, enquanto o terceiro conjunto de cromossomos foi menos semelhante, provavelmente devido a uma hibridização das estirpes com uma cepa de *D. bruxellensis* ou uma espécie estreitamente relacionada ainda não identificada (BORNEMAN et al., 2014).

A análise filogenética de ascomicetos sugere que as linhagens dos clados *Saccharomyces/Kluyveromyces* e *Dekkera/Brettanomyces* foram separadas a 200 milhões de anos atrás (ROZPEDOWSKA et al., 2011) conforme apresenta a Figura 2. Essa divergência ocorreu muito antes da "Duplicação do Genoma Total" (*Whole Genome Duplication*, WGD) que aconteceu em *S. cerevisiae* (WOOLFIT et al.,

2007). No evento WGD, *Saccharomyces* divergiu da linhagem *Kluyveromyces* pela característica de reprimir a respiração e acumular etanol mesmo na presença de oxigênio, sendo essa estratégia referida como “Produzir-Acumular-Consumir” (*Make-Accumulate-Consume*, MAC) produzida como consequência do chamado efeito *Crabtree* (ROZPEDOWSKA et al., 2011). No entanto, *D. bruxellensis* também desenvolveu essa característica MAC mesmo não tendo sofrido WGD. Sendo assim, as leveduras *Saccharomyces* e *Dekkera* parecem ter adquirido a capacidade de produzir etanol mesmo na presença de oxigênio e excesso de glicose de forma independente (HELLBORG e PIŠKUR, 2009; ROZPEDOWSKA et al., 2011).

Figura 2 - Relação filogenética entre leveduras. (a) A relação filogenética é baseado na sequência de rDNA mitocondrial 15S. Cada um dos grupos de leveduras D/B e S/K podem ser divididos em dois subgrupos, com base em sua relação filogenética e traços fisiológicos. (b) A relação filogenética baseada nas seqüências de rDNA nucleares 26S.



Fonte: Rozpędowska et al., (2011).

O fundo molecular para o desenvolvimento do estilo de vida fermentativo e, portanto, Crabtree positivo de *S. cerevisiae* foi a duplicação dos genes envolvidos na via glicolítica devido a WGD (WOLFE e SHIELDS, 1997), além de um evento de reconfiguração do promotor, em que o elemento *cis*-regulatório, AATTTT, que em leveduras Crabtree-negativas tais como *Kluyveromyces lactis* ou *Candida albicans* está presente nos promotores de genes que codificam proteínas ribossômicas mitocondriais correlacionadas com respiração e crescimento rápido, foi perdido na família Saccharomycetacea (IHMEIS et al., 2005). Independente de *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* também perdeu este elemento nos genes envolvidos na respiração (BLOMQVIST e PASSOTH, 2015). As duas leveduras também apresentam amplificação nos genes ADH que codificam a atividade álcool desidrogenase, mas também ocorreram de maneira independente (PIŠKUR et al., 2012). O baixo número de genes duplicados em *D. bruxellensis* sugere que esta levedura não tenha sofrido WGD. Em vez disso, um aumento da ploidia pode ter compensado o efeito de WGD (PIŠKUR et al., 2012).

Sendo assim, a grande variabilidade genética entre as linhagens da levedura *D. bruxellensis* e as características fisiológicas que favorecem sua adaptação ao ambiente industrial a tornam um organismo modelo em potencial para se entender sobre a evolução de leveduras da fermentação alcoólica (BLOMQVIST e PASSOTH, 2015; SCHIFFERDECKER et al., 2014).

2.3 FISILOGIA DE *Dekkera bruxellensis*

2.3.1 Aspectos fisiológicos que contribuem na sustentação de *D. bruxellensis* na dorna de fermentação industrial

Diversas linhagens de *D. bruxellensis* tem se destacado por sua alta adaptabilidade no processo industrial de produção de etanol (DE BARROS PITA et al., 2011; DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; PASSOTH et al., 2007). Esse destaque esta relacionado ao fato de *D. bruxellensis* apresentar características fisiológicas indispensáveis a sobrevivência na dorna de fermentação, tais como: tolerância a etanol, capacidade de crescer em anaerobiose, capacidade de fermentar mesmo na presença de oxigênio desde que no meio tenha elevada concentração de glicose (efeito Crabtree positivo) e capacidade de sobreviver sem DNA mitocondrial (efeito *petite* positivo) (ROZPEĐOWSKA et al., 2011; VISSER et al., 1990; WOOLFIT et

al., 2007). Essas características são comuns a *S. cerevisiae*, que é a levedura fermentadora por excelência (ROZPEĐOWSKA et al., 2011; VISSER et al., 1990). Entretanto, existem algumas peculiaridades em *D. bruxellensis* que não acontecem em *S. cerevisiae*: a incapacidade de acumular trealose, um importante carboidrato de reserva (LEITE et al., 2016; PEREIRA et al., 2014), e a capacidade de assimilar nitrato como fonte de nitrogênio (DE BARROS PITA et al., 2011; DE BARROS PITA et al., 2013). A incapacidade de acumular trealose não afeta a viabilidade dessa levedura em condições fermentativas (PEREIRA et al., 2014), enquanto a capacidade de assimilar nitrato confere vantagem a *D. bruxellensis* sobre *S. cerevisiae* (DE BARROS PITA et al., 2011). Essa capacidade de assimilar nutrientes inacessíveis para *S. cerevisiae* pode favorecer episódios de contaminação na indústria de produção de etanol, descritos para esta levedura (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; PASSOTH et al., 2007). No entanto, a ideia de contaminante tem ficado para trás, visto que, vários trabalhos têm relatado que esta levedura produz etanol com rendimentos compatíveis aos de *S. cerevisiae* (BLOMQVIST et al., 2010; 2012; CASTRO PARENTE et al., 2015; DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; PEREIRA et al., 2014). Até o momento, não há dados na literatura sobre como seria a produção de etanol se as indústrias brasileiras utilizassem apenas *D. bruxellensis* como fermento (BLOMQVIST e VOLKMAR, 2015). Além disso, o desempenho celular em fermentações industriais pode ser afetado por características específicas da linhagem, pela composição mineral do caldo (DE SOUZA et al., 2015), bem como pela qualidade das fontes de carbono e nitrogênio, variação de temperatura e pH (BLOMQVIST et al., 2010; BLOMQVIST et al., 2012; DE BARROS PITA et al., 2013; ROZPEĐOWSKA et al., 2011), pela concentração de oxigênio no meio (JOUHTEN et al., 2008; ROZPEĐOWSKA et al., 2011).

2.3.2 Assimilação de fontes de carbono por *D. bruxellensis*

Já é bem descrito na literatura a capacidade de *D. bruxellensis* assimilar uma grande variedade de fontes de carbono que incluem os monossacarídeos glicose, frutose e galactose, e os dissacarídeos sacarose, maltose, celobiose e trealose (CONTERNO et al., 2006; BLOMQVIST et al., 2010; LEITE, et al., 2012; MOKTADUZZAMAN et al., 2015; PEREIRA et al., 2014; REIS et al., 2016). Outros Açúcares como arabinose (monossacarídeo), lactose (dissacarídeo) e rafinose (trissacarídeo) não favorecem o crescimento em várias linhagens de

Dekkera/Brettanomyces (CONTERNO et al., 2006). Esta levedura apresenta preferência pela assimilação de glicose, frutose e sacarose, açúcares capazes de favorecer altas taxas de crescimento. Essas fontes apresentam relevância industrial por fazerem parte da composição de substratos, como o caldo de cana e o melaço de cana (CASTRO PARENTE et al., 2015; DE BARROS PITA et al., 2013; DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; PEREIRA et al., 2014). A taxa de crescimento no meio com maltose é normalmente menor do que acontece em glicose (BLOMQVIST et al., 2010; DE BARROS PITA et al., 2013; LEITE, et al., 2013). A lentidão do crescimento em maltose pode ser vista como um problema nas indústrias de produção de etanol a base de amido. No entanto, mesmo no caso de *S. cerevisiae* na fermentação de maltose, normalmente, é adicionado a enzima α -glucosidases, responsável pela degradação da maltose (BLOMQVIST, JOHANNA et al., 2010). Algumas linhagens de *D. bruxellensis* podem fermentar celobiose, embora seja mais devagar e menos eficiente do que acontece em glicose (BLOMQVIST et al., 2010; REIS et al 2016). Essa potencialidade é de grande importância para futuras aplicações em fermentações de materiais lignocelulósicos geração de etanol de 2ª geração. Pensando nisso, Galafassi et al (2011) analisaram cerca de 50 linhagens pertencentes ao gênero *Dekkera/Brettanomyces* quanto à assimilação de celobiose, xilose e arabinose. Os resultados mostraram a habilidade de linhagens de *D. bruxellensis* em assimilar celobiose, mas não xilose e arabinose (GALAFASSI, SILVIA et al., 2011).

2.3.3 Impacto do oxigênio na produção de biomassa e etanol

Em princípio, todas as leveduras fermentadoras (facultativas) são capazes de gerar ATP por fosforilação ao nível do substrato e, portanto, não dependem da respiração para dirigir reações que requerem energia. Entretanto, a função fisiológica do oxigênio não é limitada ao seu papel como um aceptor de elétrons na respiração mitocondrial. O oxigênio é essencial para biossíntese de ergosterol, componente da membrana plasmática das células, indispensável para o crescimento celular (DIJKEN et al., 1993). Mesmo com a adição do ergosterol no meio de cultivo, o crescimento anaeróbico é um atributo de poucas leveduras. Um estudo que avaliou a capacidade de crescimento anaeróbico de 75 espécies de leveduras em meio complexo e em meio mineral mostrou que apenas 17 foram capazes de crescer nessa condição, dentre elas *D. bruxellensis*, entretanto apenas

S. Cerevisiae atingiu taxa de crescimento específico superior a $0,10 \text{ h}^{-1}$ (VISSER et al., 1990).

Quando cultivos feitos em quimiostato com *S. cerevisiae*, cultivadas sob limitações de açúcar, com concentrações de biomassa, e velocidades de agitação constantes foi alimentado com altas concentrações de oxigênio, o metabolismo da glicose por *S. cerevisiae* foi totalmente respiratória e fermentação alcoólica não foi observada. Quando a alimentação do oxigênio foi diminuída, a fermentação alcoólica e respiração ocorreram simultaneamente, e foi possível também observar crescimento celular. Em tais níveis de glicose e oxigênio, um aumento da concentração de biomassa poderia ser percebido aumentando a concentração de glicose (o que leva também a aumento fermentação alcoólica) ou aumentando a disponibilidade de oxigênio (o que permite mais respiração e, conseqüentemente, um maior crescimento celular). (DIJKEN et al., 1993).

Em *D. bruxellensis*, segundo Leite et al. (2012), em cultivos aerados feitos em quimiostato sob limitação de glicose ou sacarose, não foi detectado metabólitos extracelulares como etanol, glicerol e acetato, apresentando assim um metabolismo completamente respiratório, e o açúcar foi totalmente convertido em biomassa e CO_2 . Nesse caso, o rendimento em biomassa foi 0.62 gDW gS^{-1} para essas fontes de carbono, esse valor é 20% maior do que o rendimento apresentado por *S. cerevisiae* nas mesmas condições de cultivo. Este maior rendimento de biomassa de *D. bruxellensis* é acompanhado por uma menor produção de CO_2 em ambos os substratos em comparação com culturas de quimiostatos de *S. cerevisiae* em glicose na mesma taxa de diluição. O fato de *D. bruxellensis* ser mais eficiente do que *S. cerevisiae* na conversão de glicose em biomassa pode ser explicado por diferenças na estrutura do aparelho respiratório. Nesse caso, mais ATP pode ser produzido a partir da oxidação de um equivalente redutor na cadeia respiratória de *D. bruxellensis*, implicando que menos glicose deve ser oxidada para produzir a energia necessária para o crescimento celular. A produção de etanol nesse experimento só foi observada após um pulso de glicose de 50 mMol . Indicando que a célula passou do metabolismo completamente respiratório para o metabolismo respiro-fermentativo, característico de leveduras Crabtree-positivas (LEITE et al., 2013).

Em limitação de oxigênio, o rendimento em biomassa por *D. bruxellensis* é maior em relação a *S. cerevisiae* (BLOMQVIST, JOHANNA et al., 2010; DE SOUZA LIBERAL, A. et al., 2007; PEREIRA et al., 2012; PEREIRA et al., 2014). Entretanto,

os autores discordam quanto ao rendimento em etanol e produção de glicerol. A maioria dos trabalhos mostra que o rendimento em etanol é semelhante ou maior que em *S. cerevisiae* e o rendimento em glicerol é menor. Enquanto Segundo Pereira et al (2012) rendimento em etanol foi menor do que em *S. cerevisiae* e não foi detectado produção de glicerol. Nesse caso, o menor rendimento em etanol por *D. bruxellensis* pode ter sido em decorrência da grande aeração do meio (160 rpm). Apesar da maioria dos trabalhos relatarem altos rendimentos em etanol, o maior problema desta levedura é o maior tempo que leva para converter o açúcar em etanol em relação a *S. cerevisiae*. (BLOMQVIST, JOHANNA et al., 2010; DE SOUZA LIBERAL, A. et al., 2007; LEITE, F. C. B. et al., 2012; PEREIRA et al., 2012).

2.3.4 Impacto do oxigênio na produção acetato e glicerol

Com relação a consequência da disponibilidade de oxigênio sobre a produção de acetato e glicerol em *D. bruxellensis*, alguns trabalhos mostram que quanto mais aerado for o meio, as células de *D. bruxellensis* tendem a desviar mais carbono para a produção de ácido acético do que para etanol, sendo produzido a partir de diferentes fontes de carbono como glicose ou etanol (AGUILAR USCANGA et al., 2003; FREER et al., 2003; BLOMQVIST et al., 2010; ROZPEĐOWSKA et al., 2011). Após o total consumo de glicose, as células de *Dekkera* consomem o acetato e o etanol produzido (LEITE et al., 2013; ROZPEĐOWSKA et al., 2011). Um trabalho recente mostra que o rendimento em acetato pelas células de *D. bruxellensis* é também afetado pela concentração inicial de glicose e apenas a partir de 50g/L de glicose inicial o rendimento em acetato é maior do que o de etanol (VICTOR et al., 2013), enquanto em condições limitantes de oxigênio, *D. bruxellensis* não produz nada ou produz quantidades muito baixas de ácido acético (BLOMQVIST et al. 2010, 2012, DE BARROS PITA 2013).

Em limitação de oxigênio é evidente a produção de glicerol a fim de re-oxidar NADH gerado durante os processos oxidativos (VAN DIJKEN; SCHEFFERS, 1986). Por outro lado, a produção de glicerol também é perda de energia porque a célula não recupera o ATP que é usado para fosforilar a glicose, além de ser perda de carbono (BLOMQVIST e PASSOTH., 2015). Em *Dekkera* esta produção é limitada quando comparado a *S. cerevisiae* (AGUILAR USCANGA et al., 2003; BLOMQVIST, JOHANNA et al., 2010; BLOMQVIST, J. et al., 2012; DE SOUZA LIBERAL, A. et al., 2007). Esta limitação levaria ao chamado efeito Custers, isto é, a

inibição temporária da fermentação e crescimento quando células crescidas em aerobiose são transferidas para um ambiente anaeróbico (WIJSMAN et al., 1984).

2.3.5. Anaerobiose estrita em *D. bruxellensis*

Em anaerobiose estrita, o crescimento de *D. bruxellensis* é pouco documentado. Visser et al. (1990) tentaram, sem êxito, crescer, em anaerobiose, uma linhagem de *D. bruxellensis* em meio mineral e rico. Wijsman (1984) obteve um crescimento tardio de células de *Brettanomyces* no meio contendo extrato de levedura, ele também observou que a fermentação anaeróbica foi estimulada pela adição de acetoína ou oxigênio. Ciani e Ferraro (1997) investigaram o efeito do oxigênio na produção de ácido acético utilizando suco sintético de uva como meio de cultivo. Em condições anaeróbicas, quase nenhum ácido acético foi produzido, ao contrário do que aconteceu em condições aeróbicas. Rozpędowska et al. (2011) compararam crescimento aeróbico e anaeróbico da linhagem CBS2499 de *D. bruxellensis* suplementada com aminoácidos. Em condições anaeróbicas, o rendimento da biomassa foi menor e o rendimento em etanol e glicerol foram maiores do que em aerobiose, e não foi produzido ácido acético. Por fim, em contraste, Blomqvist et al 2012, usaram a linhagem CBS11270, não obteve nenhum crescimento em anaerobiose estrita em meio mineral variando as fontes de nitrogênio, com exceção de um pequeno crescimento em alguns aminoácidos. Que é explicado pelo alívio na produção de NADH que seria gerado na síntese de aminoácidos e que não seria re-oxidado a NAD^+ devido a limitada capacidade de produção de glicerol (ALBERS et al., 1996; BLOMQVIST, J. et al., 2012).

Sendo assim, nenhuma linhagem de *D. bruxellensis* consegue crescer em anaerobiose estrita se não houver aminoácidos ou extrato de levedura no meio de cultura. Entretanto, a explicação para a baixa produção de glicerol devido a disponibilidade de aminoácidos como fonte de nitrogênio no meio de cultura precisa ser melhor estudada. Já é bem documentado que diferentes fontes de nitrogênio influenciam no crescimento e eficiência fermentativa das células de *D. bruxellensis* em limitação de oxigênio(PARENTE et al., 2015; DE BARROS PITA et al., 2011; DE BARROS PITA, et al., 2013). Entretanto não existem estudos prévios sobre a influência de diferentes fontes de nitrogênio nos produtos da fermentação numa condição de anaerobiose estrita. Entre as fontes de nitrogênio, esta levedura é capaz de assimilar amônio, glutamato, glutamina, prolina, arginina e nitrato

(BLOMQVIST, J. et al., 2012; CONTERNO et al., 2006; DE BARROS PITA et al., 2013), e os detalhes do seu metabolismo serão discutidos a seguir.

2.4 METABOLISMO DO NITROGÊNIO

2.4.1 Aspectos gerais

O nitrogênio é um constituinte essencial às células, uma vez que é necessário à formação de aminoácidos e ácidos nucleicos. Em *S.cerevisiae* e em outras leveduras, a concentração e a qualidade da fonte de nitrogênio é capaz de intervir nos parâmetros fisiológicos e na expressão dos genes da via glicolítica e da via central do metabolismo do nitrogênio (DE BARROS PITA et al., 2013; MENDES-FERREIRA et al., 2007). As leveduras podem usar quase 30 fontes de nitrogênio distintas, como: aminoácidos, uréia, amônio, bases nitrogenadas e derivados de purina (COOPER., 1982). Essas moléculas entram na célula por meio de permeases e são usadas como blocos de construção em reações de biossíntese ou catabolizadas para liberar nitrogênio na forma de amônio (via desaminação), glutamato (via transaminação) ou ambas (COOPER., 1982; MAGASANIK., 1992). As leveduras respondem metabolicamente a diferenças na disponibilidade de nitrogênio, afetando o crescimento celular, além de alterar a eficiência da fermentação e redistribuição das vias biossintéticas.

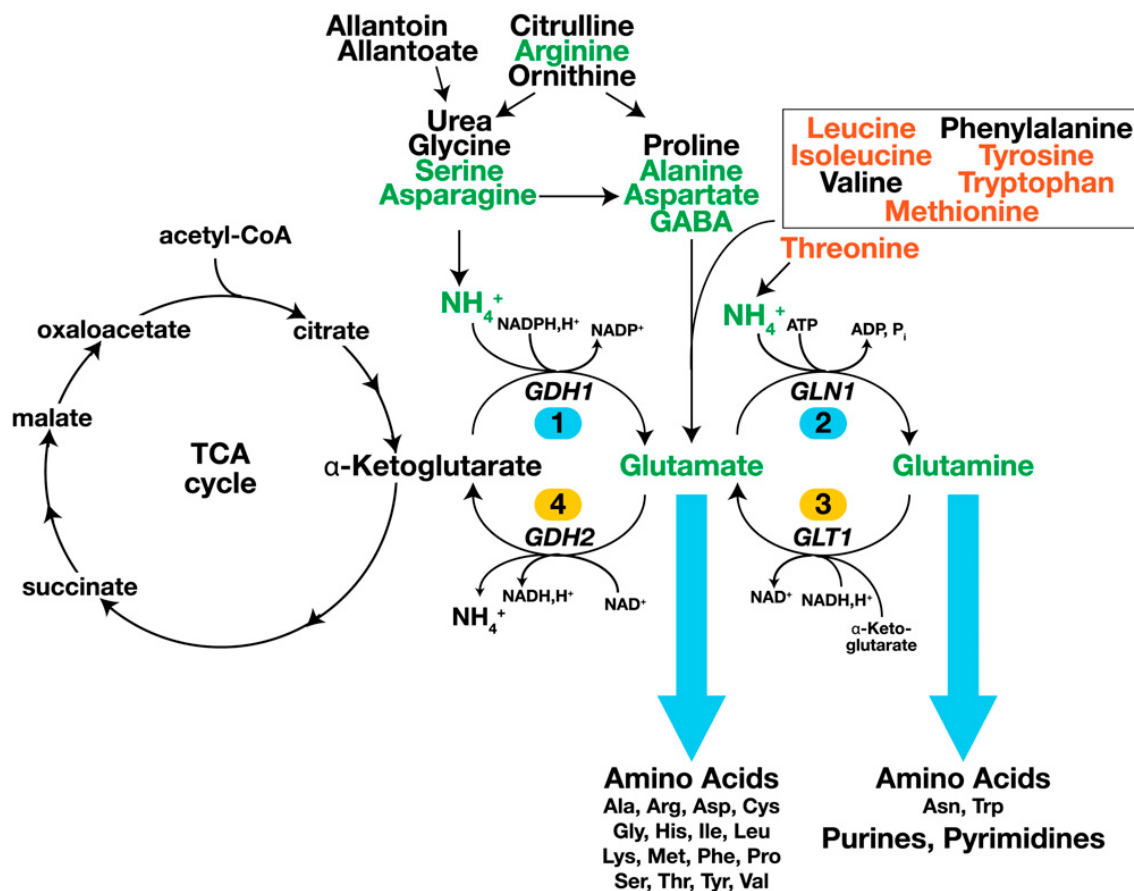
2.4.2 Assimilação da fonte de nitrogênio

Para o adequado desenvolvimento das células de levedura, é necessário monitorar a disponibilidade dos compostos alimentares, ajustar a maquinaria enzimática e o sistema de absorção para uma melhor eficiência da utilização das fontes alimentares (BOER et al., 2007). A membrana plasmática das leveduras não é livremente permeável para muitos compostos, sendo assim, leveduras como a *S. cerevisiae*, desenvolveram um sistema de transporte para absorver várias substâncias do meio externo, como por exemplo, os aminoácidos, sendo estes acumulados dentro da célula contra um gradiente de concentração através de uma permease geral para aminoácidos (Gap1) com alta capacidade e baixa afinidade (GRENSON, 1992). Outras permeases de aminoácidos podem transportar especificamente alguns compostos nitrogenados com baixa capacidade e alta afinidade em que, mesmo as concentrações micromolares podem ser transportadas

para dentro da célula. Os aminoácidos incorporados na célula podem ser usados diretamente na síntese de proteínas ou, assim com todas as de fontes de nitrogênio, preferenciais e não-preferenciais, se dirigir para uma via em comum, a liberação de amônia via desaminação, ou a produção de glutamato a partir da transferência do grupo amino para o α -cetoglutarato, numa reação de transaminação e posterior produção de glutamina a partir do glutamato. Estes dois aminoácidos servem como doadores de nitrogênio para todos os outros compostos nitrogenados da célula e, juntamente com a amônia, são interligados por um sistema de enzimas específicas formando a via do Metabolismo Central do Nitrogênio (COOPER., 1982; MAGASANIK., 2003; MAGASANIK e KAISER, 2002a). Quando amônia é a fonte de nitrogênio, sua entrada por difusão passiva sendo determinada pelo gradiente de concentração (MACMILLAN, 1956) e facilitada pela ação de três permeases, produto do gene *mep1*, *mep2* e *mep3*. Essas permeases transportam amônia com diferentes capacidades e afinidades permitindo assim, uma rápida absorção quando em excesso e uma absorção lenta embora contínua quando apenas uma quantidade muito limitada (1 μ M) está presente. Dentro da célula, a amônia pode servir para aaminação do α -cetoglutarato, sintetizado a partir do ácido tricarboxílico, para produzir glutamato a partir da ação da enzima glutamato desidrogenase, produto do gene *GDH1* (reação 1) (Figura 3) ou pode aminar diretamente o glutamato para produzir glutamina, sendo esta reação catalisada pela enzima glutamina sintetase, produto do gene *GLN1*(reação 2). A glutamina como única fonte de nitrogênio, pode ser convertida em glutamato, pela ação da enzima glutamato sintetase, produto do gene *GLT1* (reação 3), nesse caso, a amônia é gerada por desaminação oxidativa do glutamato. O glutamato como única fonte de nitrogênio, pela ação da enzima glutamato desidrogenase, produto do gene *GDH2*, é degradado a α -cetoglutarato liberando amônia para a síntese de glutamina (reação 4) (MAGASANIK e KAISER, 2002; MILLER e MAGASANIK, 1990).

Figura 3 - Representação esquemática do metabolismo de aminoácidos, mostrando as fontes preferenciais (em verde) e não preferenciais (vermelho). As fontes de nitrogênio oriundas de aminoácidos preferenciais são convertidas a glutamato, e os esqueletos de carbono são desviados em piruvato e α -cetoglutarato. Aminoácidos de cadeia ramificada, os aromáticos e a metionina (dentro da caixa) é transformado em α -cetoglutarato por transaminases formando glutamato. Os compostos nitrogenados são sintetizados a partir do glutamato ou da glutamina, como indicado nas setas azuis. Reações anabólicas (1 e 2) são catalisadas pela glutamato desidrogenase (*GDH1*) dependente de

NAPH e glutamina sintetase (GLN1). As reações catabólicas (3 e 4) são catalisadas pela glutamato sintetase (GLT1) dependente de NADH e glutamato desidrogenase 2 (GDH2) dependente de NAD^+ .



Fonte: Daignan-Fornier et al., (2012).

A importância central do glutamato e da glutamina na biossíntese de compostos nitrogenados é ilustrada na Figura 3 (setas azuis); ~ 85% do total de nitrogênio celular é incorporado a partir do grupo amino do glutamato, e o restante 15% é derivado do nitrogênio amida da glutamina (Cooper 1982).

Apesar de assimilarem uma ampla variedade de fontes de nitrogênio, as leveduras apresentam preferência na utilização de determinados compostos nitrogenados (MAGASANIK e KAISER, 2002). Em *Saccharomyces* foi observado que amônia, glutamato, glutamina e asparagina, são preferencialmente utilizadas pelas leveduras e induzem altas taxas de crescimento. Quando uma dessas fontes está em grande quantidade, ocorre a repressão das vias catabólicas de degradação de outros compostos nitrogenados como arginina, prolina e uréia que são fontes não preferenciais nas quais, estando presentes individualmente no meio, induzem um crescimento lento e geram um alívio da repressão a nível transcricional das vias de assimilação de fontes pobres de nitrogênio, esse mecanismo é referido como

repressão de catabólica do nitrogênio (NCR). Esse mecanismo celular determina qual e em que momento a fonte de nitrogênio será utilizada, regulando a expressão da maioria dos genes envolvidos no transporte e metabolismo de fontes secundárias do nitrogênio, sendo responsável por prevenir ou reduzir a desnecessária formação de enzimas e permeases para utilização compostos que são fontes não preferenciais quando a fonte preferencial esta disponível no meio (COOPER e SUMRADA, 1983; HOFMAN-BANG, 1999; MAGASANIK., 1992). Em *D. bruxellensis*, já se sabe que os genes que codificam permeases são suscetíveis a NCR (de Barros Pita *et al.*, 2013).

2.4.3 Regulação dos compostos nitrogenados

A regulação da expressão dos genes acontece em resposta a mudanças no meio celular gerando um sinal intracitoplasmático, que é traduzido por um ou mais transdutores de sinais para fatores de transcrição responsável pela ativação da expressão dos genes (MAGASANIK, B; KAISER, 2002a). O controle transcricional dos genes envolvidos no anabolismo de fontes de nitrogênio pode afetar genes de uma via anabólica ou afetar a via geral de controle dos aminoácidos (GAAC), afetando diversas vias de biossíntese de aminoácidos. GAAC é mediado pelo fator transcricional Gcn4, sendo ativada quando a célula está necessitada de aminoácidos, nessa situação a proteína Gcn2 causa a desrepressão de Gcn4 (HINNEBUSCH., 2002).

A maioria dos aminoácidos presentes no meio externo são detectados pelas células através de sensores associados a membrana plasmática (Ssy1-Ptr3-Ssy5 [SSP] (revisado por Godard., 2007). Esse complexo de proteínas SSP ativa a expressão de genes que codificam permeases para aminoácidos via fatores de transcrição Stp1, Stp2 e Uga35/Dal80 (ABDEL-SATER *et al.*, 2004).

O mecanismo NCR é exercido em muitos genes envolvidos na utilização de fontes não preferenciais de nitrogênio, quando fontes preferenciais (amônia e glutamina) estão presentes no meio. (MAGASANIK, B., 1992; WIAME., *et al* 1985). Os genes sensíveis a NCR são controlados por componentes regulatórios como o Ure2 e quatro fatores de transcrição do tipo GATA, Gln3, Gat1, Dal80 e Glzf3. Gln3 e Gat1 ativam a expressão dos genes, para isso, se dirigem para o núcleo onde desreprimem a expressão dos genes sensíveis a NCR. Em contraste, Dal80 e Gzf3 atuam como repressores que são constitutivamente localizados no núcleo. Todos os

quatro fatores de transcrição compartilham a característica dedo de zinco “zincfinger”, que os permite se ligar a sequência GATAAG presentes nos promotores de células sensíveis a NCR.

A expressão dos genes sensíveis a NCR é constitutivamente desreprimido por uma mutação que inativa Ure2, indicando que Ure2 participa na repressão dos genes em células crescidas na presença de fontes preferenciais (COSCHIGANO; MAGASANIK, 1991; WIAME et al., 1985). A desrepressão dos genes sensíveis a NCR na ausência de Ure2 é dependente de Gln3, células sem GLN3 são incapazes de desreprimir a expressão dos genes sensíveis a NCR (MINEHART; MAGASANIK, 1991; MITCHELL; MAGASANIK, 1984). Sendo assim, a inativação de Ure2 resulta na localização nuclear constitutiva de Gln3. Gat1 também se localiza no núcleo na presença de fontes não preferenciais (KULKARNI et al., 2006). Entretanto, em contraste com Gln3, a localização de Gat1 não é tão afetada com a perda de Ure2. A localização de Gat1 normalmente aparece independente de Ure2. Outros fatores devem ser importantes na determinação da função de Gat1 (GEORIS et al., 2008).

Os fatores de transcrição Dal80p e Nil2p tem função de contrapor a ativação da transcrição por Nilp1e em menor intensidade por Gln3p. A região “zinc finger” de Dal80p e Nil2p é altamente homóloga a região de Nil1p e um pouco menos homóloga a região de Gln3p, mas Dal80p e Nil2p faltam os domínios que provavelmente são responsáveis pela habilidade de Gln3p e Nil1p de ativar a expressão dos genes (STANBROUGH; MAGASANIK, 1995). Os dois fatores de transcrição negativos possuem papéis diferentes na ativação da expressão gênica por Nil1p. Nilp2 antagoniza a ativação da expressão autógena de NIL1em células crescidas em glutamina ou glutamato como fonte de nitrogênio. Enquanto Dal80p limita a ativação da expressão dos genes em células cultivadas em fontes de nitrogênio não preferenciais(MAGASANIK, B; KAISER, 2002).

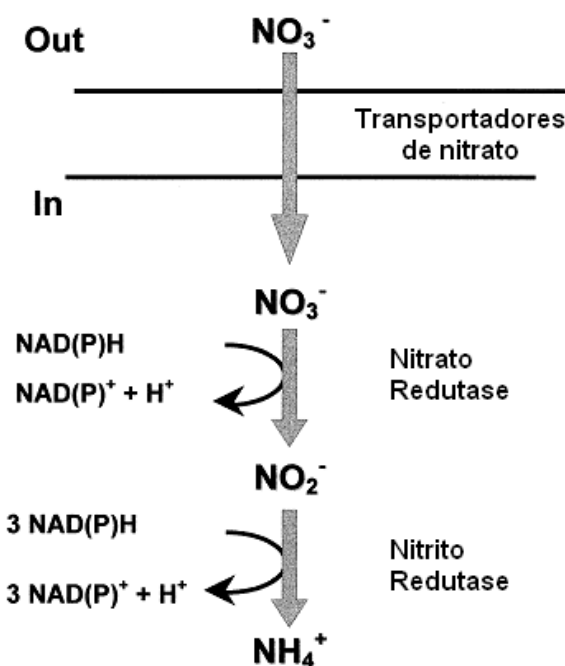
2.4.4 Metabolismo do nitrato

Nos fungos, a presença de amônia no meio de cultura influencia sobremaneira a assimilação de outras fontes de nitrogênio. Em particular a assimilação de nitrato é completamente inibida pela presença de amônia (MACMILLAN, 1956) Em *Hansenula polymorpha*, além da amônia outras fontes preferenciais como, glutamato e glutamina no meio de cultura inibem a assimilação de nitrato (SIVERIO, 2002).

Para linhagem GDB 248 *D. bruxellensis*, esse mecanismo é diferente, além de assimilar nitrato como única fonte de nitrogênio ela pode apresentar um co-consumo com amônia (DE BARROS PITA et al., 2011, 2013) enquanto, *S. cerevisiae* não é capaz (BARNETT et al., 1983). Em *Dekkera*, a co-assimilação do nitrato com a amônia é possível devido a expressão dos genes do nitrato mesmo na presença de amônia (DE BARROS PITA, W. et al., 2011). Entretanto ainda não foi relatado na literatura se existe uma concentração de amônia que reprime a expressão dos genes de assimilação de nitrato.

Várias espécies de leveduras também são capazes de assimilar nitrato e nitrito, entretanto, a via metabólica tem sido estudada especialmente nas leveduras com interesses biotecnológicos como a *Hansenula polymorpha*, *Pichia anomala* e *Arxula adeninivorans* (BÖER et al., 2009; PASSOTH et al., 2006; PEREZ et al., 1997). A assimilação de nitrato por *D. bruxellensis*, parece ser bem semelhante ao que acontece em fungos filamentosos. O transporte para dentro da célula acontece através de um transportador de nitrato codificado pelo gene YNT1, em seguida, nitrato é convertido a amônio por duas reduções sucessivas catalizadas pela nitrato redutase codificada pelo gene YNR1 e nitrito redutase codificado pelo gene YNI1, respectivamente (FIGURA 4).

Figura 4 - Via de assimilação do nitrato em leveduras



Fonte: Adaptado de Siverio (2002).

A multiplicidade de transportadores de nitrato é uma característica comum encontrada em leveduras, fungos filamentosos, algas e plantas. Em *H. polymorpha*, o transporte de nitrato de baixa afinidade foi observado em mutantes sem YNT1. No entanto, o gene envolvido neste transporte ainda não foram clonados (MACHÍN et al., 2004).

Na linhagem de *D. bruxellensis* seqüenciada foi mostrado a presença de um cluster gênico que contem os genes necessários para a via de assimilação do nitrato (WOOLFIT et al., 2007). Estudos mais recentes mostram que a capacidade de assimilar nitrato por *D. bruxellensis* melhora a habilidade de crescer em condições anaeróbias e favorece o metabolismo fermentativo, funcionando como uma válvula redox, eliminando o “efeito custer” (GALAFASSI, S. et al., 2013). Por outro lado, quando fornecido como única fonte de nitrogênio, nitrato não promove o crescimento anaeróbico em algumas linhagens (BLOMQVIST et al., 2012; GALAFASSI et al., 2013). Galafassi et al. (2013) mostrou que, no meio de cultivo contendo amônia e nitrato em anaerobiose houve produção de acetato, o que não aconteceu no meio contendo apenas amônia como fonte de nitrogênio. O acetato nesse caso foi explicado para disponibilizar o NAD(P)H necessário para redução de nitrato.

Dessa forma, os estudos tendo nitrato como fonte de nitrogênio pode revelar fatos importantes sobre a fisiologia e genética dessa levedura presente costumeiramente no ambiente industrial de produção de etanol.

O fato de *D. bruxellensis* ser uma levedura de relevância industrial torna essencial o conhecimento sobre aspectos do seu metabolismo. Sendo assim, conhecer sobre o metabolismo de assimilação das fontes de nitrogênio em aerobiose e em anaerobiose é um conhecimento essencial para se compreender o porquê da vantagem adaptativa dessa levedura no ambiente industrial.

3 ON THE CATABOLISM OF AMINO ACIDS IN THE YEAST *DEKKERA BRUXELLENSIS* AND THE IMPLICATIONS TO INDUSTRIAL FERMENTATION PROCESSES

Artigo aceito para publicação na revista YEAST



Fator de impacto: 1.99

On the catabolism of amino acids in the yeast *Dekkera bruxellensis* and the implications to industrial fermentation processes

Denise Castro Parente¹, Danielli Batista Bezerra Cajueiro¹, Irina CharlotPeña Moreno¹, Fernanda Cristina Bezerra Leite^{1,4}, Will de Barros Pita^{1,2} and Marcos Antonio de Morais Jr^{1,3,*}

¹Interdepartmental Research Group in Metabolic Engineering, ²Department of Antibiotics,

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

⁴Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, PE 52171-900, Brazil.

*Correspondence to:

Marcos A Morais Jr

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco

Av. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária 50670-901 Recife PE Brasil

E-mail: marcos.moraisjr@ufpe.br Phone: 55-81-21267817 Fax: 55-81-21268522

Running head: Catabolism of amino acids in the yeast *Dekkera bruxellensis*

Abstract

In the last years several reports have reported the capacity of the yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis* to survive and adapt to the industrial process of alcoholic fermentation. Much of this feature seems to relate to the ability to assimilate limiting sources of nutrients, or somehow some that are inaccessible to *Saccharomyces cerevisiae*, in particular the sources of nitrogen. Among them, amino acids (AA) are relevant in terms of beverage musts, and could also be important for bioethanol. In view of the limited knowledge on the control of AA, the present work combines physiological and genetic studies to understand how it operates in *D. bruxellensis* in response to oxygen availability. The results allowed to separate the AA in three groups of preferentiality and showed that glutamine is the preferred AA irrespective to the presence of oxygen. Glutamate and aspartate were also preferred AA in anaerobiosis as indicated by the physiological data. Gene expression experiments showed that, apart from the conventional Nitrogen Catabolic Repression mechanism that is operating in aerobiosis, there seems to be an oxygen-independent mechanism acting to overexpress key genes like *GAP1*, *GDH1*, *GDH2* and *GLT1* to ensure adequate anaerobic growth even in the presence of non-preferential nitrogen source. This could be of major importance for the industrial fitness of this yeast species.

Keywords: aerobiosis; anaerobiosis; gene expression; nitrogen catabolite repression; nitrogen central metabolism

Introduction

The yeast *Dekkera bruxellensis* is now widely regarded as part of the microbial population in industrial ethanol fermentation processes, reaching high counts and sometimes overcoming the population of *Saccharomyces cerevisiae* (De Souza Liberal et al 2007; Blomqvist and Passoth 2015). This yeast is well-adapted to several niches, most of them linked to industrial production plants, which ensures its constant introduction to the fermentation process (Da Silva et al. 2016). Such adaptive ability may be attributed to its high capacity to assimilate nutrients, especially those limiting or, in some way, inaccessible to *S. cerevisiae* (de Barros Pita et al., 2011; Leite et al., 2013; Blomqvist and Passoth, 2015). In spite of being regarded as a contaminant organism, *D. bruxellensis* has attracted attention for its biotechnological potential for producing fuel ethanol from cellobiose, fermented beverages and molecules for use in the industry of fine chemicals and food (Reis et al. 2016; Blomqvist and Passoth 2015; Radecka et al. 2015; Steensels et al. 2015). However, many aspects of its metabolism are still poorly understood, such as the molecular mechanisms enabling cells to assimilate and metabolise different nutrients, dissimilate them into different metabolic routes, as well as their regulations. In a very recent report, Phenotype Microarray (PM) technology revealed the capacity of this yeast to use a series of carbon (C) and nitrogen (N) sources for cell growth (Crauwels et al. 2015). The "nitrogen factor" is rather important, especially when considering industrial processes such as fuel-ethanol fermentation using sugarcane juice, a substrate that hardly contains organic N-source. De Barros Pita et al. (2011) showed that in sugarcane samples ammonium could be present at 13.3 mM (10.3 mgN/l) and in some cases together with nitrate at 3.2 mM (0.72 mgN/l). Thus, the adaptive mechanism to such environment depends on the production efficiency of intracellular building blocks for the anabolic processes from this scarce N-sources.

In the general aspects of the Central Nitrogen Metabolism (CNM), two limiting steps must be taken into consideration: the uptake by general or specific permeases and further assimilation by transamination and catabolic reactions by the structural enzymes (Magasanik and Kaiser, 2002; Godard *et al.*, 2007). Ammonium is primarily assimilated in a molecule of 2-oxoglutarate (2-OG) towards glutamate, by NADPH-dependent glutamate dehydrogenase (NADPH-Gdh, coded by *GDH1* gene). Further, ammonium is used to aminate glutamate into glutamine, by ATP-dependent glutamine synthase (GS, coded by *GLN1* gene). When glutamate is present in the medium, it can be broken down, by NAD^+ -dependent glutamate dehydrogenase (NAD-Gdh, coded by *GDH2* gene) to generate ammonium and 2-OG. On the other hand, if glutamine is provided, it is partially converted towards glutamate in a transamination reaction with 2-OG by NADH-dependent glutamate synthetase, also known as glutamine/2-OG amino transferase (GOGAT, coded by *GLT1* gene). Glutamate is the main amino donor in the biosynthesis of other amino acids (AA), mostly by transamination reactions catalysed by several general or specific enzymes. Conversely, when other AA are supplied to the medium, they can be directly assimilated for protein synthesis, proteinogenic AA, or act as amino donor in reverse transamination reactions with 2-OG to maintain high internal concentration of glutamate (Crépin *et al.*, 2017).

The genes and enzymes involved in these metabolic steps are generally controlled by regulatory mechanisms that select the use of the so-called preferential N-sources in detriment of non-preferential. This strategy enables cells to control the proper usage of N-sources and is the basis of the Nitrogen Catabolite Repression (NCR) mechanism (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). Therefore, the presence of preferential N-sources in the medium transduces a signal that ultimately triggers NCR and down-regulates the expression of genes involved in the metabolism of non-preferential N-sources. On the other hand, genes subjected to NCR are derepressed or up-regulated in the presence of non-preferential N-sources or in condition of

nitrogen starvation (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). In *S. cerevisiae*, ammonium and glutamine are inducers of NCR as preferential nitrogen sources (Magasanik and Kaiser, 2002; Godard *et al.*, 2007; Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012), whereas in *D. bruxellensis*, we have just proposed that glutamine has central action in this control (Cajueiro *et al.*, 2017).

Besides ammonium, N sources can be present in the environment in the form of organic molecules like AA, specially when considering complex substrates such as grape and cereals musts. These AA can be uptaken by the yeast cells as exogenous N source and be used directly for protein synthesis after being linked to tRNA molecules. In a very recent report, Crépinet *al.* (2017) used isotopic labelling to reveal that in *S. cerevisiae* most of AA are preferentially proteinogenic and only a limited number of them AA would serve as amino donor (or even carbon supplier) for *de novo* synthesis of other AA. Therefore, the presence of proteinogenic AA as sole N source would represent a condition of N starvation for the yeast cells, with consequent interference in cells growth and gene regulation.

The regulation of nitrogen metabolism is a key process for cell adaptation in industrial environments, as it can be observed in sugarcane juice for fuel-ethanol production or even in grape or malt worts for wine and beer production. The present study aimed to evaluate the capacity of *D. bruxellensis* to metabolise different AA as N-source in respiro-fermentative metabolism in presence of oxygen or fully fermentative condition in anaerobiosis. Herein, we report the preference of *D. bruxellensis* cells for each one of the 20 AA, which slightly changes according to oxygen availability. The data also showed that the lack of growth in most of AA is not due to a decreased uptake, as we report by measuring N consumption and expression of permease-encoding genes. Moreover, differential expression of enzyme-encoding genes of CNM revealed differences in the releasing of cells from NCR, an important aspect that is related to sequential or parallel assimilation of different N-sources with importance to industrial yield and productivity.

Material and Methods

Strain and growth conditions

Dekkera bruxellensis GDB 248 industrial strain (de Barros Pita *et al.* 2011; Leite *et al.* 2013; Cajueiro *et al.*, 2017) was used in the present study. Reference synthetic defined (SD) medium was composed by yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulphate (Difco Co., USA) at 1.7 g/l supplemented with glucose and ammonium sulphate to 20 g/l and 5 g/l, respectively. Specific SD contained different N sources adjusted to initial N concentration of 1.05 gN/l: ammonium (sulphate salt), a single AA or mixture of 20 AA. Cells were cultivated in SD at 30°C and 150 rpm in a rotator shaker until late exponential growth phase, harvested by centrifugation for 5 min at 5,000 rpm and room temperature and suspended in sterile distilled water. For growth experiments, cells were added to specific SD media to initial concentration of 0.1 at A_{600nm} and cultivated as following. For aerobic cultivations, cells were mixed with specific SD to a final volume of 150 μ l in sterile microtitre plates and cultivated in multireader Synergy HT (BioTek, Switzerland) at 30°C and maximum speed. Absorbance readings at 600nm were automatically recorded every hour. For anaerobic cultivations, cells were mixed with specific SD to a final volume of 1500 μ l in sterile flowerplate™ and incubated in Biolector microfermenter (m2pLab, Germany). Cultivations were performed at 30°C at 85% constant humidity and was flushed with ultrapure nitrogen gas (>99.999% purity) sterile supplied at 0.5% vvm. Automatic readings of light scattering were taken every hour and the values converted to A_{600nm} by pre-defined calibration curves. Ergosterol (10 mg/l) and Tween 80 (420mg/l) was added to the media in anaerobic experiments (Jouhten *et al.*, 2008; Blomqvist *et al.*, 2012). To certify the complete anaerobic environment, each experiment was accompanied by cultivation of *S. cerevisiae* JP1 strain in SD medium contained glucose (20 g/l) as positive control or glycerol (10 g/l) as negative control. Growth

rates were calculated as the angular coefficient of the most linear exponential growth interval ($R^2 \geq 0.99$) from $\ln(A_{600nm})$ vs time curves (Leite *et al.* 2013). The results represent the mean value of triplicates.

Nitrogen determination and N uptake assay

Nitrogen content of peptone medium or N content in the uptake assays were determined by the test with ninhydrin that reacts with the amine groups generating a purple colour in a dose-dependent intensity (Abernathy *et al.* 2009). The ninhydrin solution (sol. A) was prepared by dissolving 8 g of Ninhydrin in 400 ml of diluent consisting of 300 ml of ethylene glycol solution (1%) and 100 ml of 4 M sodium acetate solution pH 4. The second solution was made by dissolving 500 mg of SnCl_2 in 5 ml ethylene glycol (1%) (sol. B). The reaction solutions were freshly prepared by mixing 25 μl of solution B with 1 ml of solution A. Nitrogen concentration was measured by mixing 20 μl of culture sample with 200 μl of the reaction solution. The mixture was incubated at 100°C for 10 minutes, followed by incubation at 4°C for 5 minutes. Then, 2.8 ml of ultra pure water was added to each tube and the absorbance was measured at 575 nm. The determinations were performed in duplicate for each sample. Calibration dose-response curves were prepared with standard AA solutions. Ammonium solution was used as negative control of ninhydrine reaction (Abernathy *et al.* 2009).

For uptake assay, yeast cells were cultivated in SD containing peptone until mid log phase (around $1.0 A_{600nm}$), collected by centrifugation and suspended in specific SD medium containing one of the AA to 10% (w/v), condition similar to what we have used in our fermentation experiments (Parente *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2016). Samples at point zero were collected, filtered in 0.22 μm and the supernatant analysed as above for initial N concentration. Cell suspensions were incubated at 30°C for 2 h. Samples were collected and filtered, and the supernatant analysed for final N concentration. AA specific uptake rate was

measured as $[(N_{\text{initial}} - N_{\text{final}})/2h]/100\text{gCell}]$ and the results represent the mean value of triplicates.

Quantitative PCR

Yeast cells were withdrawn at 24 h of cultivation in specific SD medium, harvested by centrifugation and immediately subjected to RNA extraction, quantification and integrity analysis in agarose gel and used for cDNA synthesis according to the methods described by de Barros Pita *et al.* (2012). Six genes orthologous to *S. cerevisiae* were used as target genes: *MEP1*, *GAP1*, *PUT4*, *GDH1*, *GDH2* and *GLT1*. Additionally, *TEF1* and *ACT1* were used as reference genes. Primers for qPCR were described by De Barros Pita *et al.* (2013). Amplification efficiencies and reaction specificity were analysed according De Barros Pita *et al.* (2012). RT-qPCR assays were performed with SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) in the ABI Prism 7300 device (Applied Biosystems). Negative PCR controls (for unspecific amplification) and negative RT controls (for genomic DNA contamination) were always run in parallel for internal control (de Barros Pita *et al.*, 2012). Amplification curves were analysed by using SDS v.2.0 software (Applied Biosystems) and relative quantifications were conducted in Microsoft® Excel® 2010. For the quantification of gene expression, the Normalisation Factor was obtained from reference genes by using geNorm applet, according to the User's Guide (Vandesompele *et al.*, 2002). Herein, we used the terms up-regulated (fold change >2) or down-regulated (fold change <-2) to designate the abundance of transcripts of a given gene in a specific SD medium relative to reference SD.

Results and Discussion

Physiology of amino acids assimilation

The overall picture of the oxygen-dependence for the metabolism of L-amino acids (AA) in *D. bruxellensis* was established by comparing the yeast growth in inorganic (ammonium) or organic (AA mixture at equimolar concentrations) nitrogen sources (Fig. 1). Full condition of anaerobiosis was attested by the lack of growth of *S. cerevisiae* in medium containing glycerol as sole carbon source (data not shown). In general, higher growth rates were reached in anaerobiosis than in aerobiosis. A recent work using 29 strains of *D. bruxellensis* showed that concentrations of acetic acid higher than 40 mM can affect cell growth, glucose consumption and ethanol production rate, as well as biomass and ethanol yield (Moktaduzzaman *et al.*, 2015). However, we have evidences the points for differences in AA metabolism between aerobiosis and anaerobiosis. In ammonium-based medium, yeast cells grew at 0.15 h^{-1} in aerobiosis, which is similar to those reported by Leite *et al.* (2013) for shake flask cultivations, whereas in anaerobiosis, cells grew at 0.20 h^{-1} (Fig. 1A). In the mixture of 20 AA, yeast cells grew at 0.12 h^{-1} in aerobiosis and at 0.15 h^{-1} in anaerobiosis (Fig. 1B). A few points should be considered from the latter results. First, growth rate in the mixture of 20 AA is considerably lower (aprox. -23%) in comparison to ammonium, both in aerobiosis and anaerobiosis, with longer lag phase and shorter exponential phase. Similar result (-23%) was reported for *Metschnikovia pulcherrima*, while for *S. cerevisiae*, *Lachancea thermotolerans*, *Hanseniaspora uvarum* and *Torulospora delbrueckii* the mixture of AA promoted higher growth rate than ammonium (Kemsawasd *et al.* 2015). Thus, the presence of nitrogen for each AA at 52.5 mgN/l in the form of poorly-usable N source could lead to a state of nitrogen starvation (see below). Two wine isolates of *D. bruxellensis* were able to grow in synthetic wine medium containing Yeast Assimilable Nitrogen (YAN) at 96 mgN/l prepared with a mixture of 16 amino acids, lacking asparagine, cysteine, glutamine and proline (Childs *et al.*, 2015), which represents eight times less nitrogen than we used in this

work. Therefore, we assume that growth of the ethanol strain GDB 248 was not limited by nitrogen supply in the medium, but for its capacity to metabolise most of AA in the medium.

Assimilation capacity of each of individual AA was tested by cultivating the cells in single AA as N source (Fig. 2). Again, higher growth rates were achieved in anaerobiosis than in aerobiosis. The results based solely in the maximal growth rate calculation allowed us to place the AA in three categories as the criterion of N quality (Table 1): preferential, secondary and poorly-usable (which also includes those unusable). The presence or absence of oxygen did not influence in the categorisation of most AA, although some exceptions were observed and explored below. Over 60% of AA were classified as poorly-usable by *D. bruxellensis* (Table 1). In *S. cerevisiae*, those AA were classified as proteinogenic (Crépinet *et al.*, 2017). Thus, those proteinogenic AA might cause N starvation that impairs protein synthesis and cell growth. This scenario may be likely similar in *D. bruxellensis* (Fig. 2).

In this report we propose glutamine as the most preferred AA for *D. bruxellensis* irrespective of oxygen presence (Table 1), most likely due to its central position as main intracellular N sensor in this yeast (Cajueiro *et al.*, 2017). In *S. cerevisiae*, asparagine was reported as one of the preferred amino acid (Magasanik and Kaiser, 2002; Godard *et al.*, 2007; Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012), whereas in the present work, it was classified as secondary (in anaerobiosis) or poorly-usable (in aerobiosis) N source (Table 2; Fig. 2). However, both studies agreed that cysteine and proline are the poorest assimilable AA. In addition, the branched-chain amino acids (leucine, isoleucine and valine), as well as the aromatics (phenylalanine, tyrosine and tryptophan) and methionine, are also considered poorly-usable N sources. It is noteworthy that such classification is not absolute, since the ability of each AA to support growth might vary between different strains of yeast, and even for *S. cerevisiae* such variations are observed for nitrogen assimilation according to the genetic background of strains (Magasanik and Kaiser, 2002). When studying a *S. cerevisiae*

wine strain, Kemsawasd *et al.* (2015) classified all AA as “intermediate” N-source, equivalent to what was classified herein as non-preferential. Only the mixture of 20 AA was considered as “good” N-source and lysine as “bad” N-source, respectively preferential and poorly-usable in the present study. Overall, the present classification partly agrees with that proposed by Blomqvist *et al.* (2012) when testing the AA requirement for *D. bruxellensis* growth under anaerobic condition. In that work the authors reported that arginine supported the higher number of cell generations, while tryptophan, proline and cysteine hardly supported yeast growth. Afterwards, Crauwels *et al.* (2015) used Phenotype Microarray (PM) technology to report that different *D. bruxellensis* strains from beer and wine were able to assimilate all AA (although some variation was observed among the strains) as sole nitrogen source after eight days of incubation. Moreover, they reported that alanine, glutamate and proline could also be metabolised as carbon source. Unfortunately, such semi-quantitative approach did not provide information about the preferentiality of these nutrients. Moreover, it is very intriguing that proline could also be used as carbon source (Crauwelset *al.* 2015), since it did not support yeast growth as N source reported in the present work (Table 1; Fig. 2). According to isotopic studies, proline is primarily a proteinogenic AA and is hardly catabolised, which in turns does not seem to support yeast growth (Crépin *et al.*, 2017).

Glutamine, classified as preferential AA, promoted cell growth at 0.08 h^{-1} and 0.09 h^{-1} in the presence or absence of oxygen, respectively. This AA is produced from amination of glutamate at expenses of ATP by the action of GS coded by *GLT1* gene. Moreover, aside of exerting its metabolic functions, glutamine can be also metabolised by GOGAT, coded by *GLT1* gene, towards two molecules of glutamate. Indeed, in *S. cerevisiae* this glutamine/glutamate core of CNM, in combination with transaminases, is capable of producing *de novo* all proteinogenic AA necessary for balanced cell growth (Crépin *et al.*, 2017). As side-effect, the GOGAT reaction could also help to maintain the redox equilibrium

by consuming the excess of NADH in anaerobiosis, an important feature for *D. bruxellensis* since it does not produce glycerol as *S. cerevisiae* for metabolic redox balancing (Leite *et al.*, 2013). Glutamate was classified as preferential N source in anaerobiosis (0.09 h^{-1}) and as secondary N source (0.05 h^{-1}) source in aerobiosis. However, similar final biomasses were achieved by glutamate and glutamine in the presence or absence of oxygen when the cultivations approached the stationary phase after 72 h of growth (data not shown). Aspartate was also pointed as preferential in anaerobiosis (0.14 h^{-1}) and secondary (0.06 h^{-1}) in aerobiosis (Table 2). It can be promptly used as amino donor in transamination reaction catalysed by product of *AAT1* gene involving 2-OG towards the production of glutamate and oxaloacetate. This α -keto acid is the backbone for synthesis *de novo* of threonine and isoleucine (Crépinet *et al.*, 2017). In turn, alanine was classified as secondary N source in both aerobiosis and anaerobiosis (0.06 h^{-1}). This AA is catabolised by transamination with 2-OG to generate pyruvate and glutamate. Therefore, the growth behaviour in alanine or aspartate could be explained by the further metabolisation of glutamate in the presence or absence of oxygen. However, the fast entry in the stationary phase of alanine-based aerobic cultures (Fig. 2) might be the result of an overflow of cytosolic acetate produced from pyruvate coming simultaneously from glucose and alanine. We detected the production of 4 mM of acetate in the end of aerobic cultivations with alanine, while no acetate was detected in anaerobiosis. Alanine was considered “good” N source for *Hansenia sporauvarum* and *Torulospira delbrueckii* (Kemsawasdet *et al.*, 2015). Also in anaerobiosis, the growth rate and the profile of the growth curve of *D. bruxellensis* achieved in medium containing alanine was similar to arginine and asparagine (Fig. 2).

Arginine promoted growth of *D. bruxellensis* cells at rates of 0.06 h^{-1} and was classified as secondary N source in both aerobiosis and anaerobiosis (Table 1). This AA is reported as one the most important N donor for synthesis *de novo* of AA and supported high

growth rates for five wine yeast species (Kemsawasdet *al.*, 2015; Crépinet *al.*, 2017). It contains four atoms of N and is first deaminated by arginase coded by *CARI* gene to urea and ornithine. Urea is then converted to two ammonium ions, while the catabolism of ornithine produces one molecule glutamate and one of proline. At last, proline is converted to glutamate by proline oxidase in aerobic condition. Globally, it is expected four moles of glutamate from one mol of arginine in aerobiosis. On the other hand, only three mols of glutamate are produced from one mol of arginine in anaerobiosis, with accumulation of one mol of proline (Magazanik 1992; Martin et al 2003). As proline is poorly-usable as N source (Table 1), only 3N are useful from arginine in anaerobiosis. Yet, this certainly represents enough nitrogen for the yeast cells as the final biomass achieved by arginine and aspartate was similar (Fig. 2). In *S. cerevisiae*, arginine accumulates in vacuole and is released later in growth phase when N sources are scarce for the building of AA (Crépinet *al.*, 2017).

Asparagine promoted yeast growth at 0.06 h^{-1} in anaerobiosis. Yet, in aerobiosis, irregular behaviour of the cultures impaired accurate calculation of growth rate. On the other hand, it is one of the most preferred N sources for *S. cerevisiae* and other four wine yeasts (Kemsawasdet *al.*, 2015). It is first deaminated by asparaginase coded by *ASPI* gene to produce ammonium and aspartate. Ammonium is converted to glutamate in the CNM by NADPH-Gdh, while the formed aspartate produces another molecule of glutamate. Therefore, one mol of asparagine could produce up to two moles of glutamate, while one mol of aspartate produces only one mol of glutamate. From this point of view, asparagine should be more efficient than aspartate as reported for other yeasts (Kemsawasdet *al.*, 2015).

Leucine was classified as secondary N source in aerobiosis (0.06 h^{-1}) and as not-usable N source in anaerobiosis (Table 1). However, it was observed that leucine sustained exponential growth for only a short period in aerobiosis, followed by abrupt cell death as cultivation continued (Fig. 2). This was similar to reported for the wine yeast

Lachancea thermotolerans that grew at high rate, achieved high maximal count number but ended the cultivations with lower count number (Kemsawasdet *et al.*, 2015). This is one of the three branched-chain AA (BCAA) that is well known for its low capacity to support cell growth of *S. cerevisiae* (Boer *et al.*, 2007) because it is mostly incorporated directly into proteins and does not serve as amino donor for synthesis *de novo* of AA (Crépin *et al.*, 2017). In *S. cerevisiae*, it was demonstrated that 80% of the assimilated leucine goes directly to proteins (Crépin *et al.*, 2017). In agreement to this result, we reported that *D. bruxelensis* did not grow during oxygen-limited fermentation of BCAA-based synthetic medium probably due to fast production of isoamyl alcohol, indicating that its concentrations around 10 mg/l was cytotoxic for this yeast (Parente *et al.*, 2015).

Threonine was classified as secondary N source in aerobiosis (0.06 h^{-1}) and as not-usable N source in anaerobiosis (Table 1). This AA can be deaminated by threonine deaminase coded by *CHAI* gene to release one molecule of ammonium and one 2-oxobutanoate (Bornaes *et al.*, 1992). On the other hand, it was reported amongst the last effective AA for growth in five wine yeasts (Kemsawasdet *et al.*, 2015). Just on the contrary, we observed that serine promoted growth in anaerobiosis as secondary N source and supporting only an irregular and very low growth in aerobiosis (Fig. 2). Low aerobic growth rate was reported for *T. delbrueckii* growing in this AA, contrasting to high growth rate observed for other four wine yeast (Kemsawasdet *et al.*, 2015). The product of *CHAI* gene also acts as serine deaminase that hydrolyses serine towards ammonium and pyruvate (Bornaes *et al.*, 1992). Phenylalanine also promoted yeast growth in anaerobiosis as secondary N source (0.07 h^{-1}), but not in aerobiosis (Fig. 2). It was capable of supporting aerobic growth as “intermediate” N source for four wine yeasts, and as “good” for *H. uvarum* (Kemsawasdet *et al.*, 2015). Thus, aspartate, serine, alanine and phenylalanine have in common the fact that they promote yeast growth in anaerobiosis but not in aerobiosis.

The remaining 10 AA were classified as poorly usable N sources, some of them not useful at all, in both culture conditions. Among them, it can be highlighted that isoleucine (BCAA) and tyrosine (aromatic) were classified as “intermediate” N source for four wine yeasts, and as “good” sources for *L. thermotolerans* (Kemsawasd et al., 2015). It can be explained by their limited participation for synthesis *de novo* of other AA (Crépin *et al.*, 2017).

One important question to be addressed relies on the capacity of the yeast cells to uptake AA that do not supported yeast growth them as the first barrier for their use for cell growth. We chose two AA that did not support yeast growth either in aerobiosis and anaerobiosis and other two as representative of secondary N source only in anaerobiosis. Results from Table 2 clearly showed that all AA tested were efficiently uptaken by the yeast cells, with more than 80% of nitrogen consumed. This N consumed would be enough to sustain cell growth if the AA was prone to internally release its amino group for the biosynthesis of other AA, associated with the lack of a toxic compound. AA consumption by *S. cerevisiae* was calculated as five-times higher than the demand for biomass formation, most of the assimilable AA is directly used for protein synthesis and not for synthesis *de novo* of other AA (Crépin *et al.*, 2017). Therefore, the uptake by either general or specific AA permeases does not seem to be the limiting step of AA assimilation by *D. bruxellensis* cells, which was corroborated by the following experiments on permeases gene expression.

Genetic aspects of AA assimilation

Analysed were performed on the expression of three genes encoding enzymes of the CNM and three genes encoding permeases. We concentrated the studies in the third category of poorly-usable AA in order to figure out how they influence gene expression and regulate NCR mechanism in *D. bruxellensis*. Glycine and isoleucine were considered mostly as proteinogenic AA in *S. cerevisiae* (Crépin *et al.*, 2017) and did not support growth of *D.*

bruxellensis cells as well (Fig. 2), although were uptaken at high rates by this yeast (Table 2). It indicated that the limitation of with these AA relies on the further steps of catabolisation as amino donor. Alanine and phenylalanine showed the particularity of promoting yeast growth in anaerobiosis, albeit at low rate, but not in aerobiosis (Fig. 2). In *S. cerevisiae* the first serves as important amino donor, while the second for primary a proteinogenic AA (Crépin *et al.*, 2017). The mixture of all AA was also used in the study of gene expression because it induced cell growth similar to ammonium (Fig. 1). Thus, the poorly-usable AA may be directly incorporate into proteins while preferential and secondary AA may serve as amino donor for *de novo* synthesis of other AA as well.

We first examined the expression of three genes involved in nitrogen uptake: *MEP1* (ammonium permease), *GAP1* (general amino acid permease) and *PUT4* (high-affinity permease for proline, and also for alanine and glycine) (Fig. 3). *GAP1* is a suitable model to study the regulation of genes of nitrogen metabolism in *S. cerevisiae* due to its up-regulation by the NCR activators Gln3p and Gat1p and down-regulated by the NCR repressors Dal80p and Gzf3p (Stanbrough and Magasanik, 1996; Coffman *et al.*, 1997; Magasanik and Kaiser, 2002; Godard *et al.*, 2007). *PUT4* gene was included in the present analysis because it is referred to as NCR sensor in *S. cerevisiae* (Magasanik and Kaiser, 2002; Fayyad-Kazan *et al.* 2016). Its expression decreases with ammonium concentrations above 616 mgN/l in the medium, and consequently, its intracellular availability, and the authors concluded that *PUT4* expression is regulated by ammonium concentration rather than ammonium flux (ter Schure *et al.*, 1995).

As reference for the preferential AA, we first compared the expression of those genes in medium containing glutamate, a model molecule when studying NCR mechanism in *S. cerevisiae* and that promote down-regulation of *GAP1* (Stanbrough and Magasanik, 1996). The results of the present study showed that the presence of glutamate in the medium did not

significantly change the expression of *MEP1* and *GAP1* in aerobiosis (Fig. 3), as previously reported by us for *D. bruxellensis* (de Barros Pita *et al.*, 2013) and by others for *S. cerevisiae* (Stanbrough and Magasanik, 1996). However, it promoted up-regulation of those genes in anaerobiosis (Fig. 3). Expression of *PUT4* was not altered by the presence of glutamate either in aerobiosis or in anaerobiosis (Fig. 3). On the other hand, significant up-regulation of this gene was reported at N-limited aerobic cultivation irrespective the type of N source used in the medium (de Barros Pita *et al.*, 2013). Therefore, glutamate did not alter the expression of three permease genes above the ammonium level in aerobiosis. However, we observed a remarkable finding showing their oxygen-dependent regulation. Unfortunately, no data is available for *S. cerevisiae* in such condition. We have just reported that in *D. bruxellensis* the regulation of *MEP1* expression may respond to different mechanism of that responsible for the regulation of *GAP1* and *PUT4* in aerobiosis (Cajueiro *et al.*, 2017). *MEP1* gene was generally down-regulated when the cells were cultivated in medium containing one of the four poorly-usable AA tested (glycine, isoleucine, alanine and phenylalanine), irrespective to the presence of oxygen (Fig. 3). Our previous work showed that proline (a poorly-usable AA) promoted up-regulation this gene by four times (de Barros Pita *et al.*, 2013). Up-regulation of *GAP1* gene was observed for these AA in both environments, but not in glycine in aerobiosis (Fig. 3). It was observed a very high level of *GAP1* transcripts in the presence of phenylalanine in aerobiosis (>800x) (Fig. 3). This AA was reported to highly up-regulate (>900x) one of its own catabolic gene *ARO10-1* in *D. bruxellensis*, which encodes for phenylpyruvate decarboxylase (De Souza Liberal *et al.*, 2012). *PUT4* was also up-regulated by these poorly-usable AA in aerobiosis, but glycine. It corroborated our recent results indicating that these genes respond to the same regulatory circuit in aerobiosis (Cajueiro *et al.*, 2017). However, *PUT4* up-regulation was not observed in anaerobiosis for none of these N sources (Fig. 3). Therefore, it is reasonable to assume that an unknown different regulatory

mechanism acts in anaerobiosis, releasing *GAP1* expression but not *PUT4*. It indicated that Gap1 permease may be the main uptake mechanism of these AA in whatever environment. So far, no study on the regulation of these genes has been done in anaerobiosis even in *S. cerevisiae*. When all 20 AA were used in the medium, we observed up-regulation of *GAP1* and *PUT4* genes only in aerobiosis (Fig. 3), although yeast growth was more pronounced in anaerobiosis (Fig. 1). This indicates that the catabolic machinery for AA is more efficient in the absence of oxygen when usable AA like arginine, aspartate, glutamate and glutamine, are present in the medium as shown by the growth curves (Fig. 2). As consequence, the presence of their catabolic products inside the cells in anaerobiosis, ammonium and/or glutamate as discussed above, signals for the excess of nitrogen in the medium that induces NCR response and maintain their regulation in the level observed for cultivations in ammonium.

Afterwards, genes encoding enzymes of the CNM (*GDH1*, *GDH2* and *GLT1*) were analysed. As stated above, most of assimilable (preferential or secondary) AA may release ammonium and/or glutamate in the due course of their catabolism. Glutamate, the sensor molecule in *S. cerevisiae*, had almost no influence in the expression of these three genes in aerobiosis (Fig. 4). This response was similar to our previous work, and may be related to the lack of NCR binding motifs in its promoter region (Cajueiro *et al.*, 2017). On the other hand, *GDH1* and *GDH2* showed up-regulation (>10-fold) when the cells were cultivated in glutamate in anaerobiosis (Fig. 4). In the case of poorly usable AA, these genes showed similar expression profile with a tendency for up regulation in aerobiosis and down-regulation in anaerobiosis (Fig. 4). Again, it points out for a component of the regulatory circuit that responds not only to the type of N source but also to the availability of oxygen. Thus, in anaerobiosis and in the presence of preferential N-source (except ammonium), another independent NCR binding motif may specifically act on the promoter of *GDH1* gene. In *S. cerevisiae*, the presence of non-preferential sources induces the expression level of these

genes, which are activated by the transcription factors Gln3p, Nil1p and Gcn4p to compensate the low intracellular concentration of glutamate (Magasanik and Kaiser, 2002; Hernandez *et al.*, 2011). It explains the low level of *GDH2* transcripts observed when poorly usable AA were used (Fig. 4). This gene is also upregulated when nitrate is the N-source (Cajueiro *et al.*, 2017). The profile of gene expression of *GDH1* and *GLT1* genes in medium containing all AA (Fig. 4) was similar to that observed for *GAP1* and *PUT4* (Fig. 3). It corroborated the hypothesis that signal of nitrogen limitation seems stronger in aerobiosis, probably due to less efficient AA metabolisation as observed from the growth curves (Fig. 2).

In conclusion, our data reveal that oxygen availability exerts a great influence on the preference of nitrogen sources as well as on the expression pattern of the permeases and genes involved in CNM in the yeast *D. bruxellensis*. As expected, glutamine was considered a preferred source independent of oxygen availability and most amino acids were considered to be poorly usable in both aerobic and anaerobic conditions. Therefore, the catabolic machinery for AA is more efficient in the absence of oxygen when usable AA like arginine, aspartate, glutamate and glutamine are in the medium. Such metabolic regulation of N metabolism may be one of the key processes for adaptation of the cells in a given industrial environment. In parallel work, we have specifically analysed the regulation of these and other genes of *D. bruxellensis* in response to nitrate as N source in anaerobiosis (manuscript in preparation). Together, these results may provide un evaluable information on the adaptive success of *D. Bruxellensis* to the industrial context and revealed new insights in the genetic regulation of the sensing mechanisms involved in N availability in the medium. So far, the present work represents the first study on *D. bruxellensis* connecting physiological and genetic aspects of AA in anaerobiosis and sheds light on possible particularities of the regulation of N in the absence of oxygen, a condition usually found in industrial fermentation processes.

Acknowledgements

This work was sponsored by the Bioethanol Research Network of the State of Pernambuco (CNPq-FACEPE/PRONEM program, grant n° APQ-1452-2.01/10) and by grants of the National Council of Science and Technology (CNPq n° 472533/2013-4 and 474847/2013-6).

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Abernathy DG, Spedding G, Starcher B. 2009. Analysis of Protein and Total Usable Nitrogen in Beer and Wine Using a Microwell Ninhydrin Assay. *J Inst Brew* **115**: 122-127.
- Blomqvist J, Nogue VS, Gorwa-Grauslund M, Passoth V. 2012. Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic conditions. *Yeast* **29**: 265-274.
- Blomqvist J, Passoth V. 2015. *Dekkera bruxellensis*-spoilage yeast with biotechnological potential, and a model for yeast evolution, physiology and competitiveness. *FEMS Yeast Res* **15**: fov021.
- Boer VM, Tai SL, Vuralhan Z, Arifin Y, Walsh MC, Piper MD, De Winde JH, Pronk JT, Daran JM. 2007. Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Res* **7**: 604-620.
- Bornaes C, Petersen JG, Holmberg S. 1992. Serine and threonine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the CHA1 polypeptide is homologous with other serine and threonine dehydratases. *Genetics* **131**: 531-539.
- Cajueiro DBB, Parente DCS, Leite FCB, de Moraes Junior MA, de Barros Pita W. 2017. Glutamine: a major player in Nitrogen Catabolite Repression in the yeast *Dekkera bruxellensis*. *Antonie van Leeuwenhoek*
- Childs BC, Bohlscheid JC, Edwards CG. 2015. Impact of available nitrogen and sugar concentration in musts on alcoholic fermentation and subsequent wine spoilage by *Brettanomyces bruxellensis*. *Food Microbiol* **46**: 604-609.

- Coffman JA, Rai R, Loprete DM, Cunningham T, Svetlov V, Cooper TG. 1997. Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol***179**: 3416-3429.
- Crauwels S, Van Assche A, de Jonge R, Borneman A.R, Verreth C, Troels P, De Samblanx G, Marchal K, Van de Peer Y, Willems KA, Verstrepen KJ, Curtin CD, Lievens B. 2015. Comparative phenomics and targeted use of genomics reveals variation in carbon and nitrogen assimilation among different *Brettanomyces bruxellensis* strains. *ApplMicrobiolBiotechnol***91**:23-34.
- Crépin L, Truong NM, Bloem A, Sanchez I, Dequin S, Camarasa C. 2017. Management of multiple nitrogen sources during wine fermentation by *S. cerevisiae*. *ApplEnvironMicrobiol*
- Da Silva TCD, Leite TCB, de Morais Jr MA. 2016.Distribution of *Dekkera bruxellensis* in a sugarcane-based fuel-ethanol fermentation plant. *LettApplMicrobiol***62**: 354-358.
- De Barros Pita W, Leite FCB, de Souza Liberal AT, Simões DA, de Morais Jr MA. 2011. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek***100**: 99-107.
- De Barros Pita W, Leite FC, de Souza Liberal AT, Pereira LF, Carazzolle MF, Pereira GA, de Morais Jr MA. 2012. A new set of reference genes for RT-qPCR assays in the yeast *Dekkera bruxellensis*. *Can J Microbiol***58**: 1362-1367.
- De Barros Pita W, Tiukova I, Leite FCB, Passoth V, Simões DA, de Morais Jr MA. 2013. The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. *Yeast***30**: 111-117.

- De Souza Liberal AT, Basílio ACM, Brasileiro BTRV, da Silva Filho EA, Simões DA, de Morais Jr MA. 2007. Identification of the yeast *Dekkera bruxellensis* as major contaminant in continuous fuel ethanol fermentation. *J Appl Microbiol***102**: 538-547.
- De Souza Liberal AT, Carazzolle MF, Pereira, GA, Simões DA, de Morais MA. 2012. The yeast *Dekkera bruxellensis* genome contains two orthologs of the *ARO10* gene encoding for phenylpyruvate decarboxylase. *World J Microbiol Biotechnol***28**: 2473-2478.
- Fayyad-Kazan M, Feller A, Bodo E, Boeckstaens M, Marini AM, Dubois E, Georis I. 2016. Yeast nitrogen catabolite repression is sustained by signals distinct from glutamine and glutamate reservoirs. *Mol Microbiol***99**: 360–379.
- Godard P, Urrestarazu A, Vissers S, Kontos K, Bontempi G, Van Helden J, André B. 2007. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol***27**: 3065-3086.
- Hernandez H, Aranda C, Lopez G, Riego L, Gonzalez A. 2011. Hap2-3-5-Gln3 determine transcriptional activation of *GDH1* and *ASN1* under repressive nitrogen conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol***157**: 879-889.
- Jouhten P, Rintala E, Huuskonen A, Tamminen A, Toivari M, Wiebe M, Ruohonen L, Penttilä M, Maaheimo H. 2008. Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A. *BMC Syst Biol***2**: 60.
- Kemsawasd V, Viana T, Ardö Y, Arneborg N. 2015. Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol***99**: 10191-10207.

- Leite FC, Basso TO, De Barros Pita W, Gombert AK, Simoes DA, de Morais Jr MA. 2013. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. *FEMS Yeast Res***13**: 34-43.
- Ljungdahl PO, Daignan-Fornier B. 2012. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics***190**: 885-929.
- Magasanik B, Kaiser CA. 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene***290**: 1-18.
- Martin O, Brandriss MC, Schneider G, Bakalinsky AT. 2003. Improved anaerobic use of arginine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol***69**: 1623-1628.
- Moktaduzzaman M, Galafassi S, Vigentini I, Foschino R, Corte L, Cardinali G, Piškur, Compagno C. 2015. Strain-dependent tolerance to acetic acid in *Dekkera bruxellensis*. *Ann Microbiol***66**:351–359.
- Parente DC, Vidal EE, Leite FC, de Barros Pita W, de Morais Jr MA. 2015. Production of sensory compounds by means of the yeast *Dekkera bruxellensis* in different nitrogen sources with the prospect of producing cachaça. *Yeast***32**: 77-87.
- Radecka D, Mukherjee V, Mateo RQ, Stojiljkovic M, Foulquie-Moreno MR, Thevelein JM. 2015. Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Res***15**: fov053.
- Reis ALS, Damilano ED, Menezes RSC, de Morais Jr MA Jr. 2016. Second-generation ethanol from sugarcane and sweet sorghum bagasses using the yeast *Dekkera bruxellensis*. *Ind Crops Prod* **92**: 255-262.

- Stanbrough M, Magasanik B. 1996. Two transcription factors, Gln3p and Nil1p, use the same GATAAG sites to activate the expression of *GAP1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol***178**: 2465-2468.
- Steensels J, Daenen L, Malcorps P, Derdelinckx G, Verachtert H, Verstrepen KJ. 2015. *Brettanomyces* yeasts-From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int J Food Microbiol***206**: 24-38.
- Ter Schure EG, Sillje HH, Verkleij AJ, Boonstra J, Verrips CT. 1995. The concentration of ammonia regulates nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol***177**: 6672-6675.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol***3**: 0034.

Figure headings

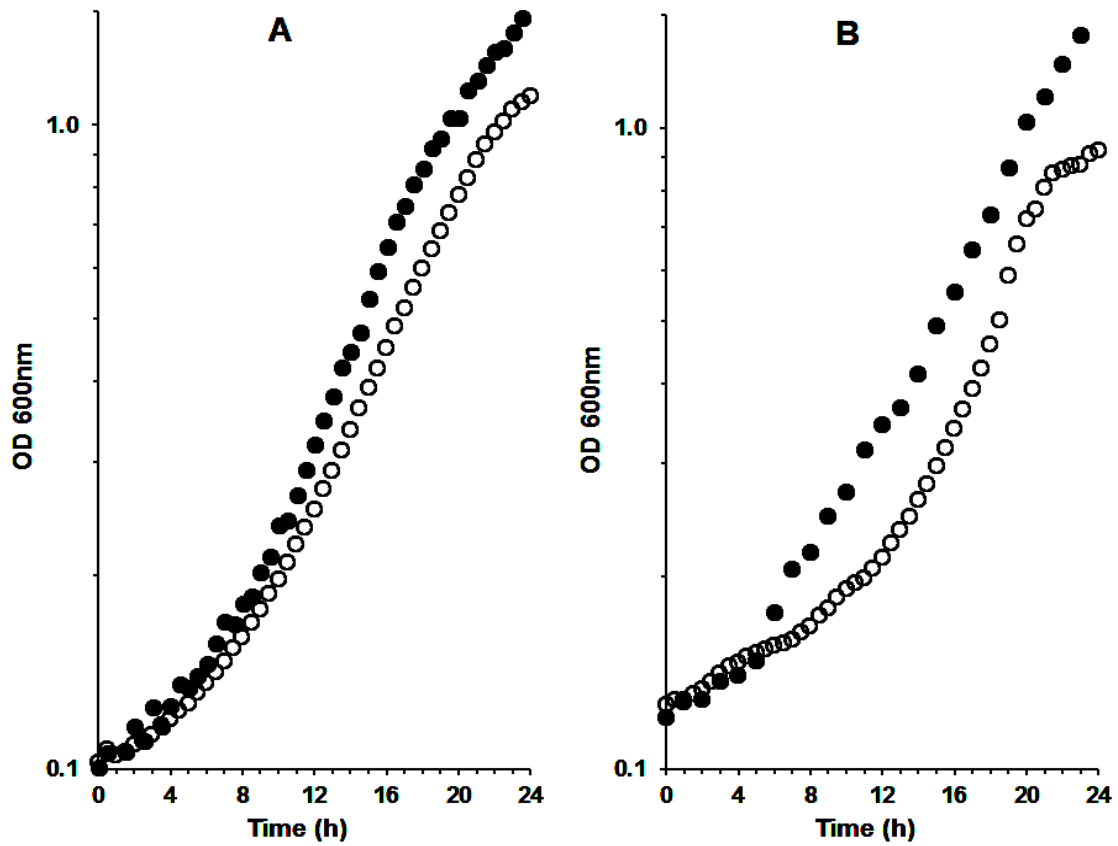


Figure 1 - Growth curves of *Dekkera bruxellensis* GDB 248 in synthetic medium containing ammonium sulphate (A) or a mixture of all 20 amino acids (B) as nitrogen source. Cells were cultivated in aerobiosis (open circles) or in anaerobiosis (closed circles).

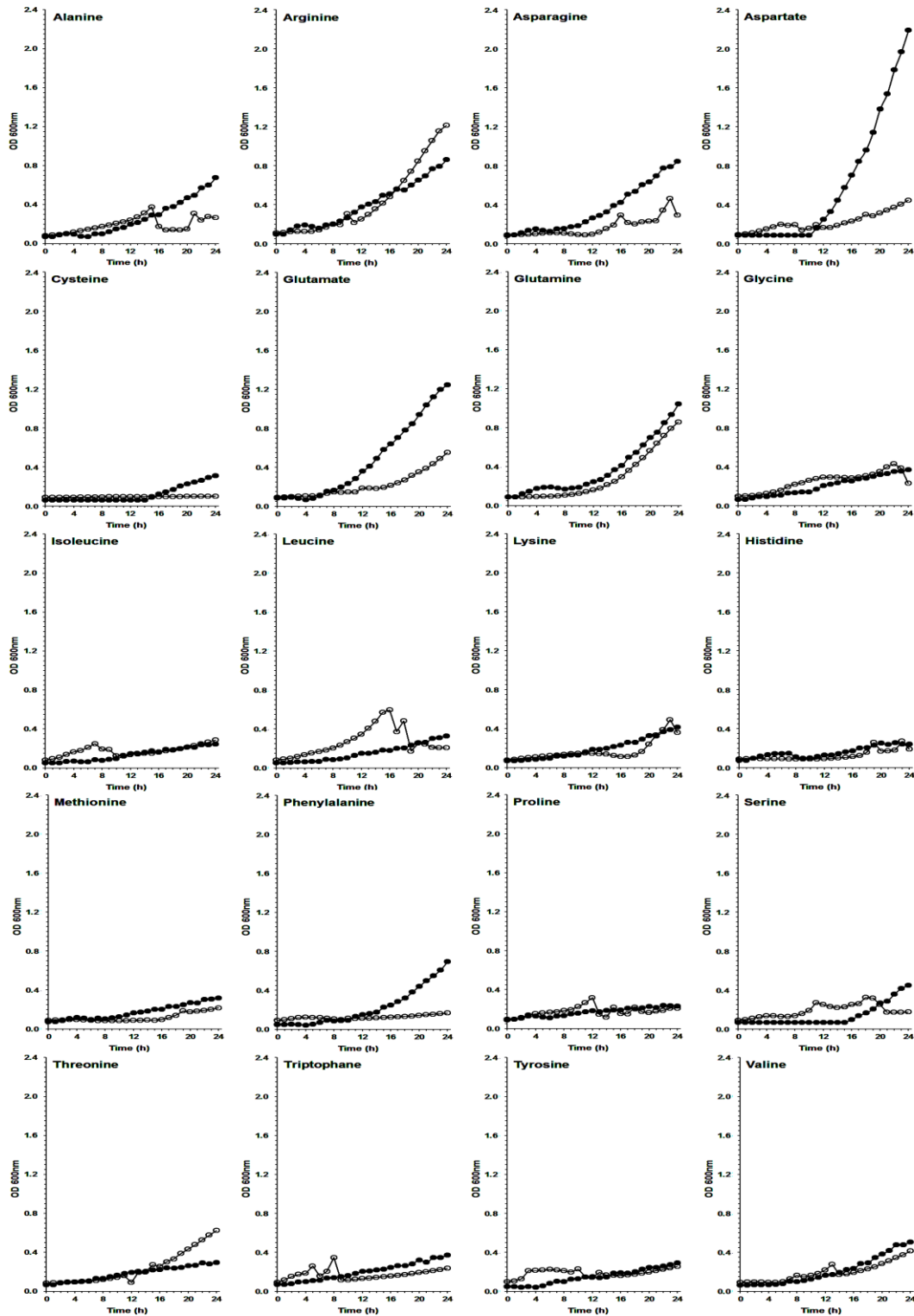


Figure 2 - Growth curves of *Dekkera bruxellensis* GDB 248 in synthetic medium containing one of the 20 amino acids as nitrogen source. Cells were cultivated in aerobiosis (open circles) or in anaerobiosis (closed circles).

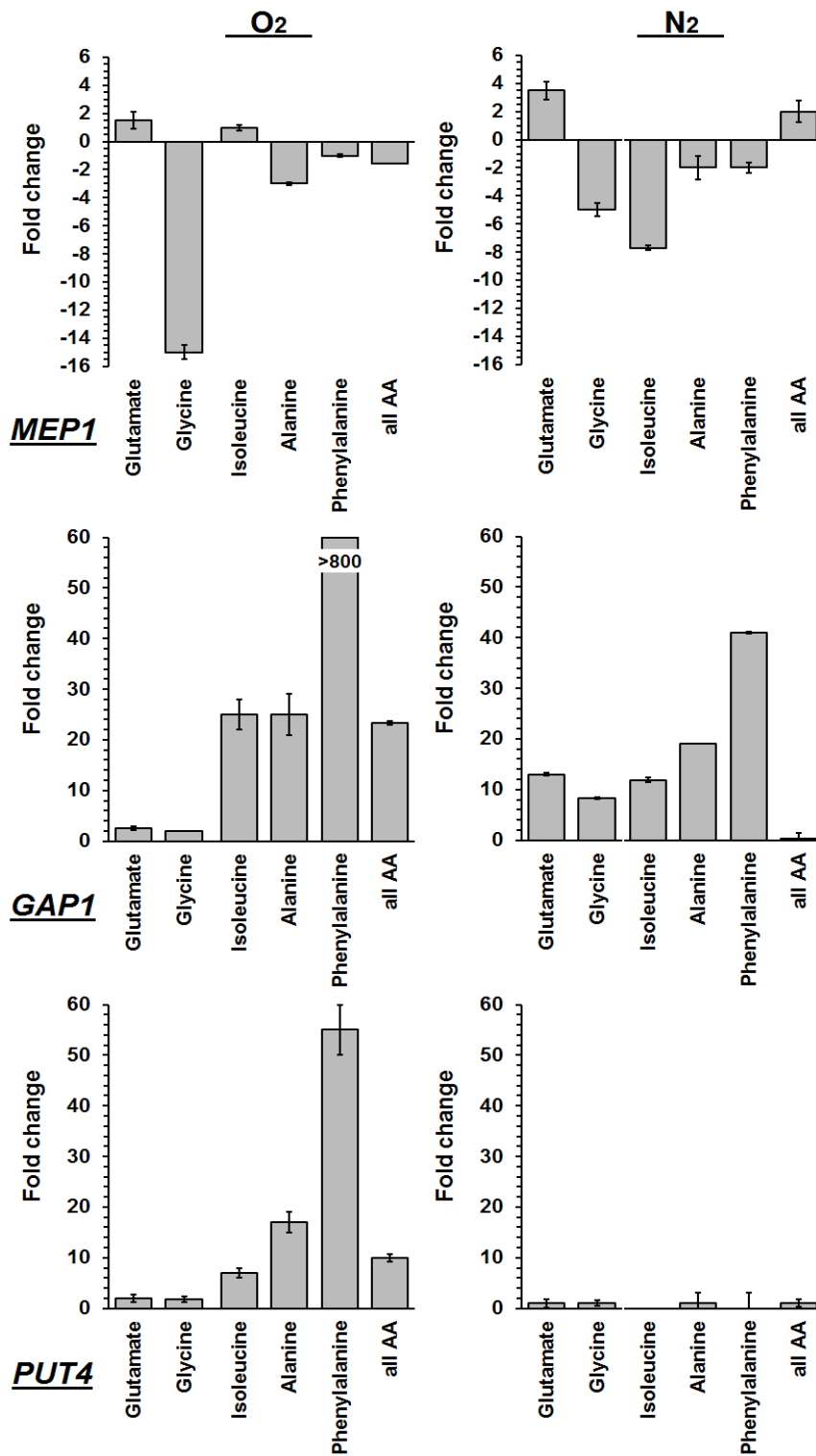


Figure 3 - Level of expression of the permease encoding genes *MEPI*, *GAP1* and *PUT4* of *Dekkera bruxellensis* cultivated in single amino acids or in a mixture of 20 amino acids relative to their expression in ammonium based medium.

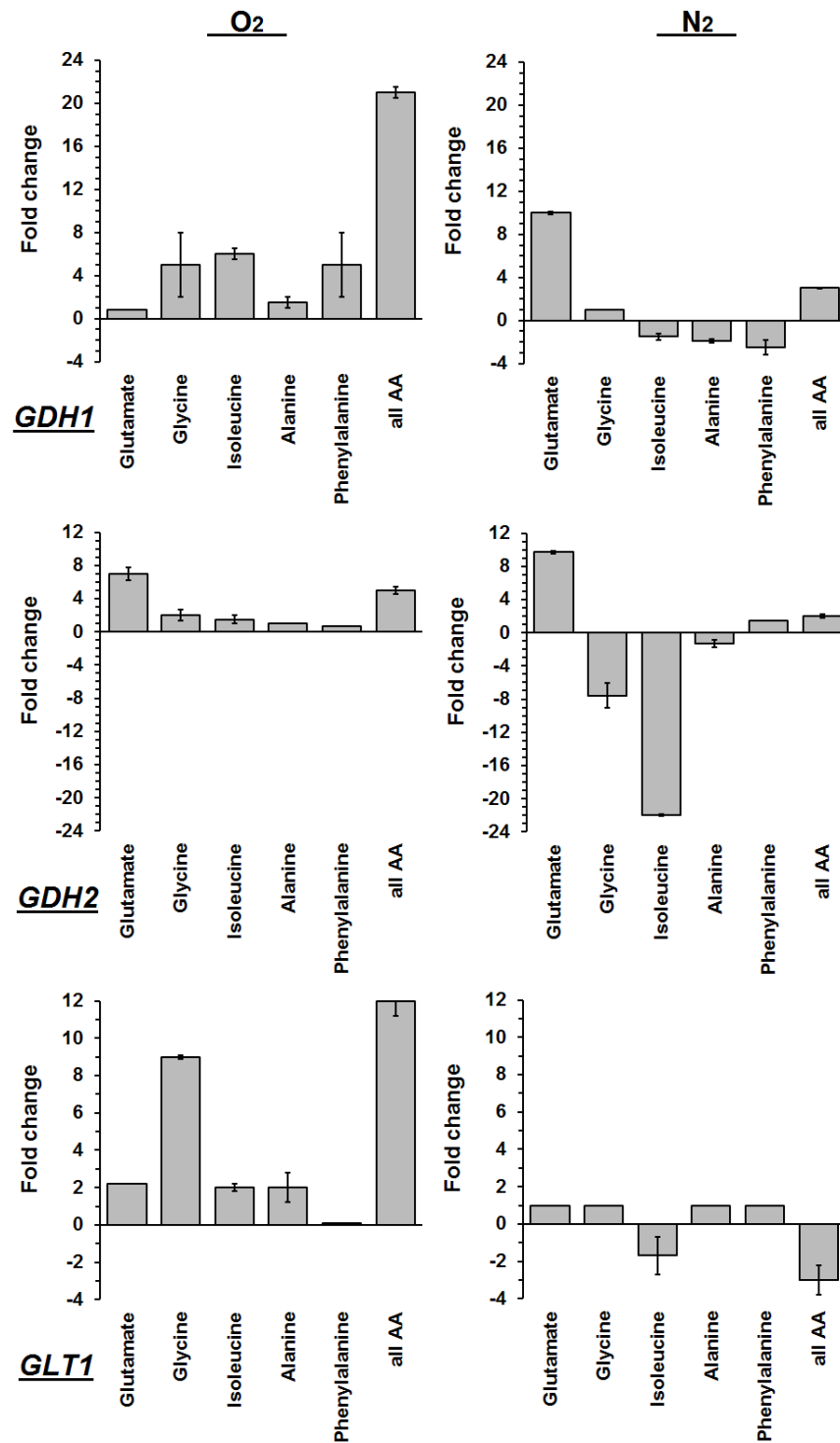


Figure 4 - Level of expression of the enzyme encoding genes *GDH1*, *GDH2* and *GLT1* of *Dekkera bruxellensis* cultivated in single amino acids or in a mixture of 20 amino acids relative to their expression in ammonium based medium.

Table 1 - Classification of amino acids according their potential to promote growth of *Dekkera bruxellensis* GDB 248 in aerobiosis or in anaerobiosis.

Condition	Category		
	Preferential	Secondary	Poor usable
O ₂	Glutamine	Arginine, aspartate, glutamate, leucine, threonine	Alanine, asparagine, cysteine, glycine, isoleucine, lysine, histidine, methionine, phenylalanine, proline, serine, tyrosine, tryptophan, valine
N ₂	Aspartate, glutamate, glutamine	Alanine, arginine, asparagine, serine phenylalanine,	Cysteine, glycine, isoleucine, leucine, lysine, histidine, methionine, proline, threonine, tryptophan, tyrosine, valine

Table 2 -.Assimilation of amino acids during growth of *Dekkera bruxellensis* GDB 248 in synthetic defined medium with glucose.

Amino acids	N concentration in the medium (mg/l)		Nitrogen consumed (%)	N uptake rate (mg/h.gCell)
	Initial	Final		
Glycine	1048.6 (±15.7)	151.2 (±2.3)	85.6	44.0 (±0.7)
Alanine	1051.4 (±11.1)	67.2 (±0.7)	93.6	48.2 (±0.5)
Isoleucine	1048.6 (±58.4)	197.4 (±4.2)	81.2	41.7 (±2.7)
Phenylalanine	1054.2 (±10.3)	204.4 (±0.6)	80.6	41.6 (±0.5)

4 FISIOLOGIA DA LEVEDURA *DEKKERA BRUXELLENSIS* EM RESPOSTA A DIFERENTES FONTES NITROGÊNIO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE OXIGÊNIO

Artigo em fase de preparação

4 - Fisiologia da levedura *Dekkera bruxellensis* em resposta a diferentes fontes de nitrogênio na presença e ausência de oxigênio

Denise Castro Parente, Jackeline Maria da Silva, Fernanda Cristina Bezerra Leite³, Marcos Antonio de Moraes Jr² e Diogo Ardaillon Simões¹

¹ Departamento de Bioquímica, ² Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50760-901, Brasil.

³ Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE 52171-900, Brasil.

Resumo

O interesse pela levedura *Dekkera bruxellensis* tem aumentado na última década pela sua capacidade de instalação e manutenção no processo fermentativo industrial de produção de etanol combustível, cujo ambiente é predominantemente anaeróbio. Sabe-se que tanto a fonte de carbono como a fonte de nitrogênio podem interferir no crescimento celular e na produção de metabólitos. A capacidade de assimilação de nitrato, mesmo na presença de amônio, pelas células de *D. bruxellensis* já foi descrita como um importante fator na competitividade dessa levedura na dorna de fermentação industrial. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar como a utilização do nitrato e da amônia afetam o metabolismo do carbono e os rendimentos dos produtos da fermentação. Esses aspectos foram investigados em meios definidos em condições aeróbias e anaeróbias bem controladas. Nossos resultados mostraram que, para *D. bruxellensis*, a presença de nitrato (como única fonte de nitrogênio ou no meio misto), em anaerobiose, atua como aceptor de elétron permitindo aumentar consideravelmente a velocidade específica de crescimento e de consumo de glicose em relação ao meio com amônia além de determinar mudanças profundas na distribuição dos produtos finais do metabolismo do açúcar. Esse trabalho também evidencia o efeito negativo da presença de oxigênio sobre o crescimento de *D. bruxellensis* em nitrato.

Palavras-chave: Amônio; Nitrato; Anaerobiose; Acetaldeído; Aceptor de elétrons

Introdução

A levedura *Dekkera bruxellesis* é uma das poucas leveduras capazes de crescer em anaerobiose estrita, embora seja necessária a adição de esteróis e ácidos graxos insaturados (BLOMQVIST et al., 2012). Essa levedura tem despertado o interesse da comunidade científica por apresentar uma boa adaptação ao ambiente industrial de produção de etanol (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; BASÍLIO et al., 2008) sendo também descrita no processo de vinificação em todo mundo por ser considerada um contaminante (LOUREIRO e MALFEITO-FERREIRA, 2003).

Muitos aspectos da fisiologia de *D. bruxellensis* já foram estudados em aerobiose (CONTERNO et al., 2006; ROZPEDOWSKA et al., 2011; LEITE et al., 2013). Uma característica marcante dessas células em aerobiose é a capacidade de produzir etanol mesmo em presença de oxigênio, quando submetidas a elevadas concentrações de glicose caracterizando assim o efeito *Crabtree* positivo (VAN DIJKEN e SCHEFFERS, 1986; ROZPEDOWSKA et al., 2011). Entretanto, existe uma escassez de relatos sobre o crescimento anaeróbico de *D. bruxellensis*. Visser et al. (1990) tentaram, sem êxito, crescer em anaerobiose, uma linhagem de *D. bruxellensis* em meio mineral ou rico. WIJSMAN (1984) obteve crescimento após uma extensa fase lag de células de *Brettanomyces* no meio contendo extrato de levedura, ele também observou que a fermentação anaeróbica foi estimulada pela adição de acetoína ou oxigênio. Rozpedowska et al. (2011) observaram crescimento de *D. bruxellensis*, em anaerobiose, em meio suplementado com aminoácidos. Por fim, Blomqvist et al. 2012, não notaram crescimento em anaerobiose estrita em meio mineral variando as fontes de nitrogênio, com exceção de um pequeno crescimento na presença de alguns aminoácidos. Que é explicado pelo alívio na produção de NADH que seria gerado na síntese de aminoácidos e que não seria re-oxidado a NAD^+ devido a limitada capacidade de produção de glicerol pelas células de *D. bruxellensis* (ALBERS et al., 1996; BLOMQVIST et al., 2012).

Diante disso, a carência de dados em anaerobiose pode ser devida ao fato da maioria das linhagens não crescerem ou apresentarem baixas velocidades de crescimento nessa condição (ROZPEDOWSKA et al., 2011; BLOMQVIST et al., 2012). Além do mais, *D. bruxellensis* apresenta o efeito Custers, conhecido pela inibição temporária da fermentação e crescimento quando células crescidas em aerobiose são transferidas para um ambiente anaeróbico. Esse efeito é causado por

um estresse redutivo, já que no caso de *Dekkera* ocorre a incapacidade de fechar o equilíbrio redox através da produção de glicerol ou de outro composto reduzido. (WIJSMAN *et al.*, 1984). Vários estudos reportam a baixa produção de glicerol pelas células de *D. bruxellensis* em relação a *S. cerevisiae* em anaerobiose estrita (ROZPEDOWSKA *et al.*, 2011) e em limitação de oxigênio (USCANGA *et al.*, 2003; BLOMQVIST *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; PARENTE *et al.*, 2015). Sabe-se no entanto que, a adição de aceptores de elétrons como acetoína ou ainda, a presença de nitrato estimula a fermentação aliviando o efeito Custers (SCHEFFERS, 1966; GILIS, 1999; GALAFASSI *et al.*, 2013).

Sendo assim, diante da escassez de estudos quantitativos de crescimento anaeróbio de *D. bruxellensis* diante diferentes fontes de carbono e nitrogênio, incluindo nitrato, o objetivo deste estudo foi conhecer a fisiologia da linhagem industrial GDB 248 de *D. bruxellensis* em cultivos aeróbicos e anaeróbicos frente a diferentes fontes de carbono na presença de amônio, nitrato ou amônio e nitrato como fontes de nitrogênio.

Materiais e métodos

Linhagem da levedura

A linhagem usada nesse trabalho foi *Dekkera bruxellensis* GDB 248 (de Souza Liberal *et al.*, 2007). As células foram estocadas em placas contendo meio YP (1% extrato de levedura, 2% de peptona bacteriológica, 2% ágar) e revitalizadas para cada experimento em meio YP com 20g L⁻¹ de glicose durante 48 h. Em seguida, as células foram centrifugadas e resuspendidas em meio mineral líquido (YNB sem aminoácidos/amônio: 1,7 g L⁻¹; sulfato de amônio: 5 g L⁻¹; glicose: 20 g L⁻¹) e cultivadas a 30 °C sob agitação de 160 rpm durante 24 h. Estas células foram utilizadas como pré-inóculos para os experimentos de crescimento celular na presença e ausência de oxigênio.

Experimentos de cultivo celular

Os ensaios aeróbicos ou anaeróbicos foram realizados em microfermentador BioLector (Biotek, Suíça) que permite análise em tempo real da cinética de 48 experimentos de crescimento celular em tempo real em placas FlowerPlate™ (Biotek, Suíça). As células do pré-inóculo foram usadas para inocular o volume de 1,5 mL de meio mineral descrito acima contendo combinações de diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, sacarose, maltose e celobiose) na concentração de 20

g L⁻¹ e de fontes de nitrogênio na forma de sulfato de Amônio (5 g L⁻¹), nitrato de sódio (6,43 g L⁻¹) ou a mistura de sulfato de amônio (2,5 g L⁻¹) e nitrato de sódio (3,21g L⁻¹). A concentração inicial de células foi calculada para em torno de 0,2 unidades de absorbância a 600 nm (A_{600}). As placas foram incubadas a 30°C, 800 rpm, 85% de umidade do ar e aeração com ar comprimido no fluxo de 0,5 vvm pelo período de 72 h. Para os cultivos anaeróbicos, o meio foi suplementado com ergosterol (10 mg l⁻¹) e Tween 80 (420 mg l⁻¹) como fonte lipídica (Jouhten *et al.*, 2008; Blomqvist *et al.*, 2012). Para os cultivos anaeróbicos, as placas foram colocadas dentro de uma câmara anaeróbica com vazão de 0,5 vvm de nitrogênio ultrapuro (99,999% de pureza; <1 ppm O₂). Os experimentos em cada condição foram realizados em duplicata biológica, com réplicas técnicas. A variação de biomassa durante os cultivos foi medida no espectrofotômetro a 600nm. O peso seco da biomassa na presença de amônio ou nitrato foi determinado gravimetricamente por filtração, em cultivos em frascos, como previamente descrito (Olsson and Nielsen, 1997). Brevemente, 20 ml das culturas foram filtrados em membranas de 0,45 µm com peso pré-determinado. Os filtros foram lavados com água destilada, secos em estufa por 2 horas a 105°C, mantidos por 1 h em dessecador e logo após pesados em balança analítica. A diferença de peso de cada filtro foi usada para determinação da concentração celular nas culturas (em g/l). O valor de absorbância (A_{600}) das culturas foi relacionado com o valor de concentração para se estabelecer o fator de calibração FC (Conc.= A_{600} ×FC). Os experimentos em cada condição foram realizados em duplicata biológica, com réplicas técnicas.

Cálculo da velocidade específica máxima de crescimento

Em cada cultivo, a fase de crescimento exponencial foi identificada pela região linear do gráfico de $\ln(A_{600})$ contra o tempo, calculando-se a velocidade específica máxima de crescimento a partir do coeficiente angular da regressão linear obtida. Para cada condição testada, a estimativa da velocidade específica máxima de crescimento corresponde à média dos valores obtidos a partir de dois experimentos independentes realizados em duplicata, levando em consideração o desvio padrão que foi calculado a partir das 4 determinações.

Quantificação de metabólitos

Ao final de cada experimento, amostras foram coletadas e centrifugadas e o sobrenadante foi filtrado em filtro 0,22 µm para determinação da quantidade de açúcar residual e da produção de etanol, acetato e glicerol por cromatografia líquida

de alto desempenho (HPLC). Para isso, foi utilizada coluna de permuta iônica HPX-87H (BioRad, EUA) e solução de 5 mM de H_2SO_4 como fase móvel no fluxo de 600 $\mu\text{l}/\text{min}$. O volume de amostra injetado foi 20 μL e a temperatura do forno foi 35 °C. Os compostos foram identificados considerando os tempos de retenção relativos e quantificados com base na comparação direta utilizando uma curva padrão. Os valores representam a média de duas repetições biológicas independentes com, pelo menos, duas repetições técnicas. A análise dos dados determinou que o erro na medição foi inferior a 10% em todos os casos.

Cálculos de rendimento e consistência das análises

O rendimento em biomassa, etanol e acetato e glicerol foram calculados a partir da quantidade final de produtos dividido pelo total de açúcar consumido. A consistência das análises na condição anaeróbica foi feita através do software MACROBAL 2.02, obtido da Delft University of Technology, Holanda (HELLINGA, 1992), sendo utilizada uma incerteza de 10% para biomassa, glicerol e acetato e 3% para etanol e glicose. O carbono recuperado foi calculado a partir da produção de biomassa, metabólitos e CO_2 . O dióxido de carbono não foi mensurado, mas foi estimado pelo software, como descrito por LEITE et al (2013) para dados de quimiostato de cultivos de *D. bruxellensis* em condição de limitação de carbono.

Ensaio de velocidade específica de consumo de glicose em anaerobiose

As células de *Dekkera bruxellensis* foram cultivadas em meio mineral contendo mistura de sulfato de amônio/nitrato de sódio sob anaerobiose em microfermentador BioLector até o início da fase exponencial. Em paralelo, foram preparados tubos com 14 ml de meio mineral contendo ergosterol a 10 g l^{-1} e Tween 80 a 420 g l^{-1} e as seguintes condições: 1) Sulfato de Amônio a 5 g l^{-1} ; 2) mistura de sulfato de amônio a 2,5 g l^{-1} e nitrato de sódio a 3,21 g l^{-1} ; 3) mistura de sulfato de amônio a 5 g l^{-1} e acetaldeído a 0,09 g l^{-1} ; 4) nitrato de sódio a 6,43 g l^{-1} . Estes tubos foram borbulhados com nitrogênio ultrapuro para gerar ambiente anaeróbio. As células foram coletadas e re-suspensas em cada uma das condições acima para a concentração de aproximadamente 0,5 g l^{-1} . O ensaio de assimilação foi iniciado pela adição de glicose para concentração inicial de 20 g l^{-1} a 30°C com constante borbulhamento de nitrogênio (<1 ppm O_2). Amostras foram coletadas pelo período de 6h, centrifugadas a 10000rpm e 4° C por 5 min e o sobrenadante estocado a -20°C para posterior quantificação de metabólitos por HPLC. As velocidades específicas foram calculadas dividindo-se o coeficiente angular da reta da curva de

relação entre a quantidade de glicose consumida pelo tempo e incubação. Todos os ensaios foram feitos em duplicata biológica, com duplicata técnica para cada ensaio.

Resultados

O crescimento de *D. bruxellensis* GDB 248 sobre diversas fontes de carbono foi estudado em condições aeróbicas e anaeróbicas em um sistema de micro fermentação, utilizando amônio, nitrato ou uma mistura de amônio e nitrato como fontes de nitrogênio. A duração da fase exponencial de crescimento foi regularmente de 6 a 8 horas e as velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de *D. bruxellensis* GDB 248 em meio mínimo, contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio, na presença ou ausência de oxigênio.

Fonte de Carbono	$\mu_{\text{máx}}(\text{h}^{-1})^*$					
	Amônio		Nitrato		Amônio/Nitrato	
	Aerobiose	Anaerobiose	Aerobiose	Anaerobiose	Aerobiose	Anaerobiose
Glicose	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,25 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,24 ± 0,01
Frutose	0,21 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,14 ± 0,06	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,01
Sacarose	0,22 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,21 ± 0,01
Maltose	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,11 ± 0,04	0,19 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,19 ± 0,03
Celobiose	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,02

*Valores de $\mu_{\text{máx}}$ em h^{-1} . As velocidades específicas máximas de crescimento representam à média dos valores obtidos a partir de dois experimentos independentes realizados em duplicata, seguido dos desvios padrões calculados a partir das quatro réplicas.

Quando amônio é utilizada como única fonte de nitrogênio, as células de *D. bruxellensis* crescem com velocidades um pouco maiores em aerobiose do que em anaerobiose, para quaisquer das fontes de carbono testadas. O inverso se observa quando nitrato é a única fonte de nitrogênio: as velocidades específicas máximas de crescimento foram em média 40% maiores em anaerobiose do que em aerobiose, para quaisquer das fontes de carbono estudadas. Já no meio contendo uma mistura de amônio e nitrato (meio misto) não houve diferenças significativas nas velocidades de crescimento em aerobiose e anaerobiose.

Nos cultivos realizados em anaerobiose, a presença de nitrato (como única fonte de nitrogênio ou em meio misto) levou a velocidades máximas de crescimento

substancialmente maiores do que em presença apenas de amônio. Esse efeito não é observado nos cultivos em aerobiose, nos quais a presença de nitrato não leva a um aumento da velocidade de crescimento em relação ao meio contendo apenas amônio, causando ao contrário uma diminuição significativa da velocidade (entre 30 e 45%) quando o nitrato é a única fonte de nitrogênio.

Observa-se ainda que, as velocidades específicas de crescimento na presença dos dissacarídeos maltose e celobiose foram sempre significativamente menores do que nos outros açúcares, independente da fonte de nitrogênio utilizada ou da disponibilidade de oxigênio.

Os cultivos foram interrompidos após 72 horas, determinando-se ao final a densidade celular, bem como as concentrações de açúcar residual, e dos produtos formados (etanol, glicerol e acetato). Os rendimentos observados estão apresentados nas Tabela 2, 3 e 4 de acordo com a fonte de nitrogênio utilizada.

Quando amônio é a fonte de nitrogênio, o crescimento de *D. bruxellensis* em condições aeróbicas sobre glicose leva à produção de quantidades expressivas de etanol e acetato, mas nenhum glicerol é detectado (Tabela 2). Em termos molares, a produção de etanol, acetato e glicerol obedece à razão 5 : 1 : 0. Os rendimentos em biomassa e metabólitos são semelhantes em todas as fontes de carbono testadas, com exceção de celobiose, onde muito menos etanol é produzido e mais biomassa é formada. Quando o crescimento é realizado em condições anaeróbicas, mais etanol é produzido e observa-se produção de glicerol, mas a produção de acetato é suprimida (Tabela 2). Em anaerobiose, etanol, acetato e glicerol são produzidos numa razão de 9 : 0 : 0,1, em termos molares. O rendimento em biomassa é semelhante ao observado em aerobiose, não havendo nesse caso diferença significativa entre as diversas fontes de carbono, incluindo a celobiose.

Quando as células são crescidas aerobicamente sobre glicose utilizando nitrato como fonte de nitrogênio, a distribuição de produtos é semelhante à observada em meio com amônio (Tabela 3). A produção de etanol e acetato obedece uma proporção de aproximadamente 4:1 em termos molares, e nenhum glicerol é detectado. O crescimento aeróbico sobre celobiose em meio com nitrato se acompanhou de um menor rendimento em etanol e maior rendimento em biomassa quando comparada as outras fontes de carbono, como já observado no meio contendo amônio. Entretanto, em anaerobiose o crescimento sobre nitrato leva a uma distribuição de produtos diferente da observada em meio contendo amônio:

observa-se produção de acetato e a produção de glicerol é menor. Em nitrato, a razão molar de etanol, acetato e glicerol observada em anaerobiose é de 9 : 0,7 : 0,1.

Quando em meio misto, em aerobiose, o padrão de produtos foi semelhante ao observado em amônio e em nitrato, com produção de acetato e etanol e nenhuma produção de glicerol (Tabela 4). Já em anaerobiose, a produção de acetato e glicerol é intermediária às observadas no meio com amônio e no meio com nitrato, em todas as fontes de carbono.

Tabela 2 - Porcentagem de açúcar consumido, rendimento em biomassa, etanol, glicerol e acetato por células de *D. bruxellensis* GDB 248 na presença de amônio como fonte de nitrogênio em diversas fontes de carbono, em condições aeróbicas e anaeróbicas.

AMÔNIO								
	Fonte de Carbono	μ (h ⁻¹)	Açúcar consumido (%)	X (g/L ⁻¹)*	Rendimento (g/g)			
					Biomassa	Etanol	Glicerol	Acetato
Aerobiose	Glicose	0,214	100%	1,59 ± 0,23	0,08 ± 0,01	0,27 ± 0,01	ND**	0,071 ± 0,01
	Frutose	0,211	100%	1,65 ± 0,32	0,09 ± 0,02	0,26 ± 0,02	ND	0,080 ± 0,02
	Sacarose	0,219	100%	1,60 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,26 ± 0,03	ND	0,073 ± 0,01
	Maltose	0,204	100%	1,52 ± 0,10	0,07 ± 0,01	0,26 ± 0,02	ND	0,065 ± 0,01
	Celobiose	0,150	65%	1,57 ± 0,10	0,11 ± 0,01	0,19 ± 0,02	ND	0,094 ± 0,02
Anaerobiose	Glicose	0,200	100%	1,45 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,012 ± 0,001	ND
	Frutose	0,195	100%	1,48 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,44 ± 0,03	0,013 ± 0,002	ND
	Sacarose	0,200	100%	1,52 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,011 ± 0,002	ND
	Maltose	0,170	100%	1,44 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,43 ± 0,04	0,010 ± 0,000	ND
	Celobiose	0,150	87%	1,46 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,013 ± 0,001	ND

* O peso seco foi estimado a partir da DO final como descrito na metodologia.

**ND: não detectado

Tabela 3 - Porcentagem de açúcar consumido, rendimento em biomassa, etanol, glicerol e acetato por células de *D. bruxellensis* GDB 248 na presença de nitrato como fonte de nitrogênio e diversas fontes de carbono, em condições aeróbicas e anaeróbicas.

NITRATO								
	Fonte de Carbono	μ (h ⁻¹)	Açúcar consumido (%)	X (g/L ⁻¹)*	Rendimento (g/g)			
					Biomassa	Etanol	Glicerol	Acetato
Aerobiose	Glicose	0,150	74%	0,61 ± 0,33	0,04 ± 0,02	0,22 ± 0,03	ND**	0,08 ± 0,02
	Frutose	0,140	64%	0,70 ± 0,36	0,06 ± 0,03	0,22 ± 0,03	ND	0,07 ± 0,01
	Sacarose	0,130	66%	0,69 ± 0,20	0,05 ± 0,01	0,17 ± 0,04	ND	0,08 ± 0,01
	Maltose	0,110	50%	0,48 ± 0,12	0,04 ± 0,01	0,18 ± 0,01	ND	0,11 ± 0,01
	Celobiose	0,096	39%	0,77 ± 0,07	0,09 ± 0,01	0,14 ± 0,01	ND	0,18 ± 0,01
Anaerobiose	Glicose	0,249	100%	1,63 ± 0,06	0,08 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,009 ± 0,001	0,044 ± 0,004
	Frutose	0,240	100%	1,45 ± 0,16	0,08 ± 0,01	0,46 ± 0,04	0,007 ± 0,001	0,042 ± 0,008
	Sacarose	0,210	100%	1,65 ± 0,21	0,08 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,005 ± 0,001	0,041 ± 0,004
	Maltose	0,190	100%	1,54 ± 0,07	0,07 ± 0,01	0,41 ± 0,02	0,008 ± 0,002	0,041 ± 0,003
	Celobiose	0,160	100%	1,67 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,43 ± 0,03	0,008 ± 0,000	0,034 ± 0,003

* O peso seco foi estimado a partir da DO final como descrito na metodologia.

**ND: não detectado

Tabela 4 - Porcentagem de açúcar consumido, rendimento em biomassa, etanol, glicerol e acetato por células de *D. bruxellensis* GDB 248 na presença de amônio e nitrato como fonte de nitrogênio e diversas fontes de carbono, em condições aeróbicas e anaeróbicas.

MISTO (AMÔNIO E NITRATO)								
	Fonte de Carbono	μ (h ⁻¹)	Açúcar consumido (%)	X (g/L ⁻¹)*	Rendimento (g/g)			
					Biomassa	Etanol	Glicerol	Acetato
Aerobiose	Glicose	0,230	66%	1,12 ± 0,25	0,08 ± 0,02	0,22 ± 0,04	ND**	0,07 ± 0,02
	Frutose	0,225	63%	1,18 ± 0,73	0,07 ± 0,04	0,27 ± 0,02	ND	0,12 ± 0,03
	Sacarose	0,230	59%	1,15 ± 0,26	0,09 ± 0,02	0,22 ± 0,05	ND	0,12 ± 0,03
	Maltose	0,216	57%	1,08 ± 0,30	0,09 ± 0,02	0,19 ± 0,03	ND	0,11 ± 0,03
	Celobiose	0,153	36%	1,00 ± 0,15	0,12 ± 0,02	0,15 ± 0,03	ND	0,14 ± 0,06
Anaerobiose	Glicose	0,245	100%	1,78 ± 0,08	0,09 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,010 ± 0,001	0,025 ± 0,002
	Frutose	0,230	100%	1,44 ± 0,26	0,08 ± 0,01	0,44 ± 0,03	0,008 ± 0,001	0,025 ± 0,003
	Sacarose	0,210	100%	1,64 ± 0,10	0,08 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,005 ± 0,001	0,025 ± 0,002
	Maltose	0,190	100%	1,63 ± 0,11	0,08 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,008 ± 0,003	0,024 ± 0,002
	Celobiose	0,160	100%	1,67 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,009 ± 0,001	0,018 ± 0,002

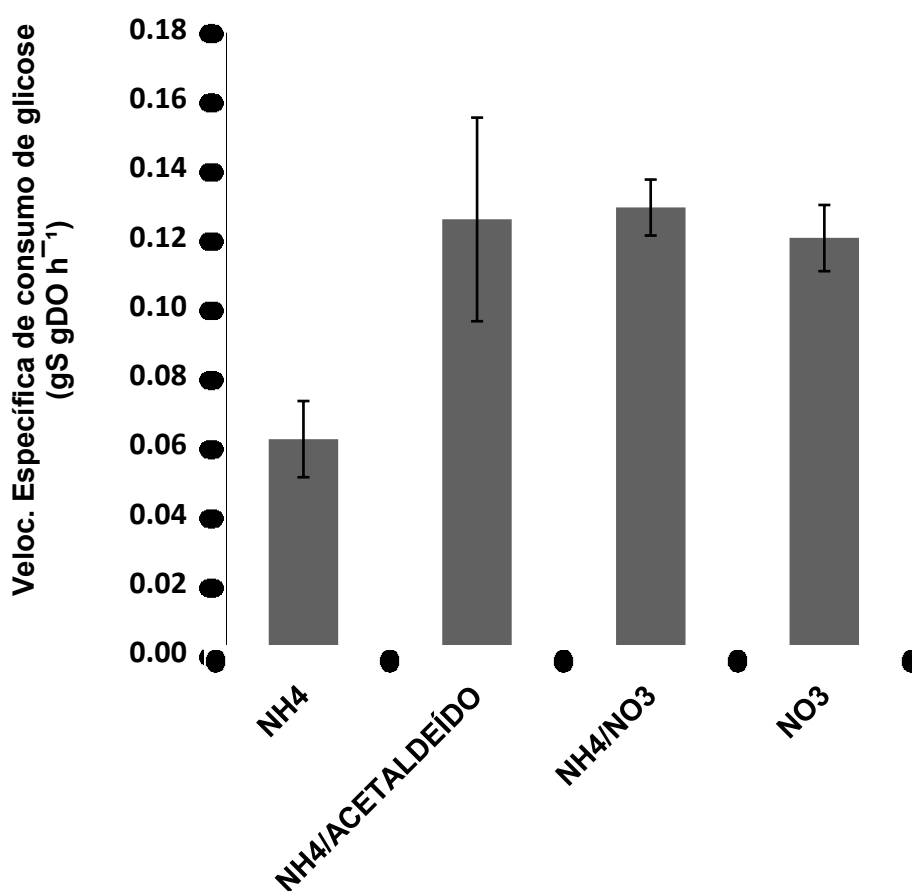
* O peso seco foi estimado a partir da DO final como descrito na metodologia.

** ND: não detectado

Com relação à celobiose, no crescimento aeróbio se observou, uma vez mais, uma menor produção de etanol e maior rendimento em biomassa em comparação com as outras fontes de carbono.

O efeito da adição de aceptores de elétrons como o acetaldeído e o nitrato sobre a velocidade de consumo de glicose de células de *D. bruxellensis* GDB 248 foi avaliado em um sistema anaeróbio. Neste trabalho, a Figura 1 mostra que nos meios contendo nitrato ou acetaldeído, a velocidade específica de consumo de glicose é cerca de duas vezes maior do que a observada em meio contendo apenas com amônio.

Figura 1 - Velocidade específica de consumo de glicose por células de *D. bruxellensis*, pré-cultivadas em meios contendo diferentes fontes de nitrogênio. Os resultados representam a média dos valores de duas replicatas biológicas e duas replicatas técnica.



Discussão

O crescimento aeróbio de *D. bruxellensis* sobre amônio pode apresentar diferentes rotas metabólicas, desde um metabolismo completamente oxidativo, na qual apenas biomassa e CO₂ são formados, até um metabolismo respiro-fermentativo, em que além de biomassa e CO₂, é observado a produção de etanol e acetato (BLOMQVIST et al, 2012; LEITE et al., 2013; GALAFASSI et al., 2013). Enquanto em condições anaeróbicas, *D. bruxellensis* não produz nada ou produz quantidades muito baixas de ácido acético (BLOMQVIST et al., 2010, 2012, et al., 2013). Na ausência de oxigênio é evidente a produção de glicerol pelas leveduras, no entanto, já é bem conhecido da literatura que a levedura *D. bruxellensis* apresenta uma baixa produção de glicerol durante o crescimento celular em relação ao que é produzido por *S. cerevisiae* (WIJSMAN et al., 1984; VAN DIJKEN e SCHEFFERS, 1986; ROZPEDOWSKA et al., 2011), o qual em condições anaeróbicas é produzido como meio de re-oxidação do NADH produzido pelos processos anabólicos (VAN DIJKEN e SCHEFFERS, 1986). Essa deficiência parece estar relacionada com o chamado “efeito Custers” nesta levedura (WIJSMAN et al., 1984). Sendo assim, não está bem definido na literatura como, em anaerobiose, as células de *D. bruxellensis* conseguem fechar o balanço redox. Sabe-se, no entanto, que a adição de aceptores de elétrons como acetoina ao meio de cultura acelera o metabolismo da glicose, aliviando o “efeito Custers” (WIJSMAN et al., 1984; VAN DIJKEN e SCHEFFERS, 1986). Também tem sido relatado que a adição de aminoácidos ao meio de cultivo anaeróbio favorece o crescimento das células de *D. bruxellensis*, já que levaria ao alívio na produção de NADH gerado a partir da síntese desses aminoácidos (ALBERS et al., 1996; BLOMQVIST et al., 2012). Recentemente, foi sugerido também que a assimilação de nitrato funcionaria como uma válvula redox capaz de abolir este “efeito Custers” (DE BARROS PITA et al., 2011; GALAFASSI et al., 2013). No entanto, o efeito positivo do nitrato em anaerobiose já havia sido descrito por Gilis em 1999, mostrando que a presença do nitrato acelera a fermentação em células de *Brettanomyces*, sendo mais eficiente do que acetoina. Diante do exposto, neste estudo foi avaliado como a utilização do nitrato ou amônio afeta o crescimento e os rendimentos dos produtos da fermentação em *D. bruxellensis* em condições aeróbias e anaeróbias.

A linhagem GDB 248 de *D. bruxellensis* utilizada no presente estudo se mostrou capaz de crescer sobre nitrato como única fonte de nitrogênio, tanto em aerobiose como em anaerobiose, o que nem sempre ocorre com outras linhagens (BLOMQVIST *et al.*, 2012; GALAFASSI *et al.*, 2013) e a metabolização do nitrato nessa levedura provavelmente se dá como em *Hansenula polymorpha*, por sua redução seqüencial a nitrito e amônio, visto que, os genes necessários para a assimilação de nitrato em *Hansenula* estão presentes nos dados da seqüência de genes de *D. bruxellensis* (WOOLFIT *et al.*, 2007).

Neste trabalho, em aerobiose, a velocidade de crescimento de *D. bruxellensis* tendo apenas nitrato como fonte de nitrogênio é menor do que em amônio, enquanto em anaerobiose, a presença do nitrato (como única fonte de nitrogênio ou em meio misto) permite aumentar consideravelmente a velocidade específica da linhagem GDB 248 de *D. bruxellensis* em comparação com um meio contendo apenas amônio. Esses resultados corroboram com a ideia do nitrato funcionar como uma eficiente válvula redox em anaerobiose como foi sugerido por Galafassi *et al.*, (2013). Sendo assim, diante da limitada produção de glicerol pelas células de *D. bruxellensis*, a assimilação redutiva de nitrato oferece rota alternativa para a reoxidação do excesso de NADH, uma vez que a redução de um mol de nitrato a amônio consome 4 moles de NAD(P)H (SIVERIO, 2002). Resultados semelhantes foram observados por Galafassi *et al.*, (2013) mostrando a maior velocidade de crescimento das células de *D. bruxellensis* no meio misto em relação ao meio contendo apenas amônio em anaerobiose. Adicionalmente, resultados obtidos em sistema anaeróbio neste trabalho mostraram que, na linhagem GDB248 de *D. bruxellensis*, o nitrato funciona como um aceptor de elétrons tão eficiente quanto o acetaldeído, dobrando a capacidade de metabolização de açúcares em anaerobiose, quando comparada a um meio contendo apenas amônio.

Os resultados obtidos neste trabalho destacam o fato de que a velocidade específica de crescimento sobre nitrato em anaerobiose é mais rápida do que em aerobiose quando o nitrato é única fonte de nitrogênio, mas não no meio misto. Esse fato evidencia um efeito negativo da presença de oxigênio sobre o crescimento de *D. bruxellensis* em nitrato. É possível que esse efeito se deva a uma menor atividade da enzima nitrato redutase em aerobiose, a qual se tornaria limitante para a assimilação de nitrogênio quando o nitrato é a única fonte. Uma diminuição da

atividade nitrato redutase em aerobiose foi relatada por Galafassi et al., (2013) ao estudar o crescimento de outra linhagem de *D. bruxellensis* em meio misto.

Quanto aos produtos do metabolismo, o crescimento das células de *D. bruxellensis* em cultivos descontínuos realizados em micro fermentador produziu diferentes perfis de subprodutos que variaram em função das diferentes fontes de nitrogênio e da presença ou ausência do oxigênio.

Em todas as fontes de nitrogênio testadas na condição aeróbica *D. bruxellensis* apresentou um metabolismo respiro-fermentativo em que, bastante etanol foi produzido acompanhado de acetato. A produção de etanol em condições aeróbicas a caracteriza como Crabtree positiva, assim como *S. cerevisiae*, entretanto *S. cerevisiae* não produz acetato em condições aeróbicas (PRONK et al., 1996).

Em anaerobiose, o perfil de distribuição dos produtos é diferente: em presença de amônio, continua a ser produzido etanol e cessa a produção de acetato, passando a haver produção de glicerol, o que é esperado já que o glicerol é necessário para reoxidar o NADH gerado em processos anabólicos (VAN DIJKEN e SCHEFFERS, 1986). Entretanto, em *D. bruxellensis*, a quantidade de glicerol produzida por grama de biomassa (1,7 mmol de glicerol / g cel) é muito inferior aos 9,1 mmol/gcel referidos na literatura para *S. cerevisiae* (VERDUYN et al., 1990). Sabe-se que em *S. cerevisiae* essa produção de glicerol responde pela eliminação de 82% do excesso de NADH produzido teoricamente durante o crescimento anaeróbico, quando a biomassa contém 47% de proteína e 7% de RNA (Verduyn et al., 1990; VAN DIJKEN e SCHEFFERS, 1986). Sendo assim, o perfil de produtos observado em *D. bruxellensis*, em especial a baixa produção específica de glicerol, não permite explicar como o balanço redox de é fechado em cultivos descontínuos realizados em anaerobiose. É possível que nessas condições a levedura apresente uma composição elementar ou macromolecular significativamente diferente daquela descrita para cultivo aeróbio sob limitação de carbono (LEITE et al., 2012).

Em presença de nitrato houve diminuição da produção de glicerol em relação ao produzido no meio com amônio, mas também observa-se a formação de acetato. A produção de acetato em meio misto na ausência de oxigênio já foi reportada por Galafassi et al (2013), sendo 0.033 g g^{-1} , esse rendimento é semelhante ao valor encontrado nos nossos cultivos em meio misto. A diminuição da

produção de glicerol no meio com nitrato em anaerobiose, sendo 25% menor do que em amônio, não poderia ser de outra maneira porque para dar conta da assimilação de nitrogênio demandada pela formação de biomassa é necessário destinar à assimilação de nitrato um fluxo de equivalentes redutores bem superior ao destinado à produção de glicerol no meio contendo amônio.

A partir dos dados de rendimentos e velocidades específicas de crescimento foi possível calcular os fluxos de consumo de glicose e formação de produtos tal como mostrado na Tabela 5. Os fluxos foram calculados para os experimentos em anaerobiose, nas diversas fontes de nitrogênio, tendo glicose como substrato e a consistência dos dados foi testada utilizando o software MACROBAL (HELLINGA,1992). Como a quantidade do número de velocidades medidas são superiores ao grau de liberdade do sistema de equações (grau de redundância = 1), isso permite o cálculo de velocidades não medidas e também de velocidades estimadas de valores com variância reduzida em relação aos experimentais (VAN DER HEIJDEN et al., 1994). Observa-se que o balanço de carbono foi fechado de maneira satisfatória e a estatística do teste mostrou não encontrar evidências de que exista um erro experimental nos dados. Nesta tabela, observa-se que a velocidade específica de consumo de glicose foi maior no meio com nitrato. Quanto a produção de glicerol, nota-se que a simples eliminação da produção desse produto não seria capaz de prover os equivalentes redutores necessários à assimilação de nitrato, sendo assim, um fluxo suplementar de NAD(P)H é obtido por meio da produção de acetato pela oxidação de acetaldeído, em detrimento da produção de etanol. No ensaio só com nitrato pode-se verificar que, a produção de acetato pode responder por cerca de 50% da demanda de equivalentes redutores decorrente da assimilação de nitrato (Tabela 5), obedecendo a uma razão de 2:1 (acetato/NO₃), bastante superior aquela referida por Galafassi et al., (2013), em que a taxa específica de produção de acetato corresponde a taxa específica de consumo de nitrato obedecendo uma razão 1:1. Assim, quando o nitrato é a única fonte de nitrogênio, a produção de acetato representa um meio de produzir o NAD(P)H suplementar necessária à assimilação do nitrato, sendo fundamental para de fechar o balanço redox.

Tabela 5 - Velocidades específicas de conversão medidas e estimadas para células de *Dekkera bruxellensis* no estado estacionário em condições anaeróbicas

Substrato/Produto	VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CONVERSÃO ($\text{mmol}^{-1} \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$)*				
	<i>S. cerevisiae</i> ($D=0,1 \text{ h}^{-1}$)**	<i>D. bruxellensis</i> AMÔNIO		<i>D. bruxellensis</i> NITRATO	
	Valor Estimado	Valor Medido	Valor Estimado	Valor Medido	Valor Estimado
q Biomassa	3,99	7,4 ± 0,7	7,4 ± 0,7	9,2 ± 0,9	9,2 ± 0,9
q Glicose	-5,81	-14,5 ± 0,4	-14,0 ± 0,3	-16,5 ± 0,5	-16,9 ± 0,4
q Etanol	8,7	24,0 ± 1,0	25,1 ± 0,6	28,9 ± 1,3	27,5 ± 0,8
q Glicerol	0,91	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
q Acetato	0,02	-	-	3,0 ± 0,3	2,9 ± 0,3
q NH ₄	-	-	1,1 ± 0,0	-	-
q NO ₃	-	-	-	-	1,4 ± 0,0
q CO ₂	-	-	25,5 ± 0,0	-	30,7 ± 0,0
q Lactato	0,05	-	-	-	-
Carbono recuperado (%)	94,75%	93%	100%	107%	100%
NAD(P)H-produzido (biomassa)***	11,02		11,02		11,02
NAD(P)H-produzido (acetato)***	0,02		-		11,83
NAD(P)H-consumido (glicerol)***	9,1		1,71		1,16
NAD(P)H-consumido (nitrato)***	-		-		21,91
Excesso NADPH sem destino***	1,94		9,3		-0,22

*Os fluxos mensurados (q : $\text{mmol}^{-1} \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$) correspondem à média dos valores obtidos a partir de dois experimentos independentes realizados em duplicata, seguido dos desvios padrões calculados a partir das quatro réplicas. ** $D=0,1 \text{ h}^{-1}$

** Verduyn et al., (1990).

*** mmol⁻¹ g⁻¹

Tanto em aerobiose como em anaerobiose as velocidades específicas de crescimento são consideravelmente maiores em glicose, frutose e sacarose do que nos dissacarídeos maltose e celobiose. Isso indica que existem diferenças metabólicas na assimilação desses açúcares, como também já foi reportado em estudos anteriores (DE BARROS PITA *et al.*, 2013; LEITE *et al.*, 2013). Sabe-se que, algumas linhagens de *D. bruxellensis* podem consumir a celobiose e maltose, e assim como acontece com a linhagem do presente estudo, essa assimilação ocorre mais devagar e menos eficiente do que acontece em glicose (BLOMQVIST *et al.*, 2010; DE BARROS PITA *et al.*, 2013). No caso da celobiose, apesar da baixa velocidade de crescimento, na presença de oxigênio observa-se mais biomassa e menos etanol em relação as outras fontes de carbono independente da fonte de nitrogênio, sendo assim, talvez o efeito Crabtree seja diferente em celobiose.

Conclusão

Nossos resultados mostraram que, para *D. bruxellensis*, a presença de nitrato (como única fonte de nitrogênio ou no meio misto) atuando como aceptor de elétron permite aumentar consideravelmente a velocidade específica de crescimento e de consumo de glicose em relação ao meio com amônio em anaerobiose além de determinar mudanças profundas na distribuição dos produtos finais do metabolismo do açúcar. Esse trabalho também evidencia o efeito negativo da presença de oxigênio sobre o crescimento de *D. bruxellensis* em nitrato. Portanto, os resultados aqui apresentados contribuem para uma melhor descrição de aspectos fisiológicos importantes da levedura *D. bruxellensis* e oferece estratégias que ajudam a favorecer o seu crescimento, contribuindo para uma futura aplicação biotecnológica dessa levedura.

Referências

ABOTT, D. A; KNIJNENBURG, T. A; DE POORTER, L. M; REINDERS, M. J; PRONK, J. T; VAN MARIS, A. J. Generic and specific transcriptional responses to

different weak organic acids in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 7, n. 6, p. 819-833, 2007. ISSN 1567-1364.

ALBERS, E; LARSSON, C; LIDÉN, G; NIKLASSON, C; GUSTAFSSON, L. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3187-3195, 1996. ISSN 0099-2240.

AVILA, J; PÉREZ, M. D; BRITO, N; GONZÁLEZ, C; SIVERIO, J. Cloning and disruption of the YNR1 gene encoding the nitrate reductase apoenzyme of the yeast *Hansenula polymorpha*. **FEBS letters**, v. 366, n. 2-3, p. 137-142, 1995. ISSN 0014-5793.

BLOMQVIST, J; EBERHARD, T; SCHNÜRER, J; PASSOTH, V. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1487-1497, 2010. ISSN 0175-7598.

BLOMQVIST, J; NOGUE, V. S; GORWA-GRAUSLUND, M; PASSOTH, V. Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic conditions. **Yeast**, v. 29, n. 7, p. 265-74, Jul 2012. ISSN 1097-0061

CARRASCOSA, J; VIGUERA, M. D; DE CASTRO, I. N; SCHEFFERS, W. Metabolism of acetaldehyde and custers effect in the yeast. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 47, n. 3, p. 209-215, 1981. ISSN 0003-6072.

CASTRO PARENTE, D; VIDAL, E. E; LEITE, F. C; DE BARROS PITA, W; DE MORAIS, M. A., JR. Production of sensory compounds by means of the yeast *Dekkera bruxellensis* in different nitrogen sources with the prospect of producing cachaca. **Yeast**, v. 32, n. 1, p. 77-87, Jan 2015. ISSN 1097-0061

CONTERNO, L; JOSEPH, C. L; ARVIK, T. J; HENICK-KLING, T; BISSON, L. F. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, n. 2, p. 139-147, 2006. ISSN 0002-9254.

DE BARROS PITA, W; LEITE, F. C. B; DE SOUZA LIBERAL, A. T; SIMÕES, D. A; DE MORAIS, M. A. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-9, 2011. ISSN 0003-6072.

DE BARROS PITA, W; TIUKOVA, I; LEITE, F. C. B; PASSOTH, V; SIMÕES, D. A; MORAIS, M. A. The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. **Yeast**, 2013. ISSN 1097-0061.

DE SOUZA LIBERAL, A; BASILIO, A; DO MONTE RESENDE, A; BRASILEIRO, B; DA SILVA FILHO, E; DE MORAIS, J; SIMOES, D; DE MORAIS JR, M. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous

fuel ethanol fermentation. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 2, p. 538-547, 2007. ISSN 1365-2672.

GALAFASSI, S; CAPUSONI, C; MOKTADUZZAMAN, M; COMPAGNO, C. Utilization of nitrate abolishes the "Custers effect" in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 2013. ISSN 1476-5535.

GILIS, J.F. Étude de contaminations de fermentations alcooliques industrielles par les levaduras **Brettanomyces**. Tesis, INP, Toulouse, Francia. 1999.

HELLINGA, C. Macrobal 2.02. Delft University of Technology, Delft, The Netherlands. Available at <http://www.tnw.tudelft.nl/en/about-faculty/departments/biotechnology/research/download-centre/macrobal/>. 1992.

HERNANDEZ, D; ROWE, J. J. Oxygen inhibition of nitrate uptake is a general regulatory mechanism in nitrate respiration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 17, p. 7937-7939, 1988. ISSN 0021-9258.

JOUHTEN, P; RINTALA, E; HUUSKONEN, A; TAMMINEN, A; TOIVARI, M; WIEBE, M; RUOHONEN, L; PENTTILA, M; MAAHEIMO, H. Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A. **BMC Syst Biol**, v. 2, p. 60, Jul 09 2008. ISSN 1752-0509

LEITE, F. C; BASSO, T. O; PITA WDE, B; GOMBERT, A. K; SIMOES, D. A; DE MORAIS, M. A., JR. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. **FEMS Yeast Res**, v. 13, n. 1, p. 34-43, Feb 2013. ISSN 1567-1364

LOUREIRO, V; MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. **International journal of food microbiology**, v. 86, n. 1, p. 23-50, 2003. ISSN 0168-1605.

MACHÍN, F; MEDINA, B; NAVARRO, F. J; PÉREZ, M. D; VEENHUIS, M; TEJERA, P; LORENZO, H; LANCHI, A; SIVERIO, J. M. The role of Ynt1 in nitrate and nitrite transport in the yeast *Hansenula polymorpha*. **Yeast**, v. 21, n. 3, p. 265-276, 2004. ISSN 1097-0061.

OLSSON, L; NIELSEN, J. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 12, p. 517-522, 1997. ISSN 0167-7799.

PEREIRA, L. F; BASSI, A. P. G; AVANSINI, S. H; NETO, A. G. B; BRASILEIRO, B. T. R. V; CECCATO-ANTONINI, S. R; DE MORAIS, M. A. The physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-11, 2012. ISSN 0003-6072.

PRONK, J. T; STEENSMA, H. Y; VAN DIJKEN, J. P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 12, n. 16, p. 1607-1633, 1996. ISSN 0749-503X.

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

SCHEFFERS, W. Stimulation of fermentation in yeasts by acetoin and oxygen. **Nature**, v. 210, p. 533-534, 1966. ISSN 0028-0836.

SIVARIO, J. M. Assimilation of nitrate by yeasts. **FEMS microbiology reviews**, v. 26, n. 3, p. 277-284, 2002. ISSN 1574-6976.

VAN DER HEIJDEN, R; ROMEIN, B; HEIJNEN, J; HELLINGA C & LUYBEN, K. Linear constraint relations in biochemical reaction systems: II. Diagnosis and estimation of gross errors. **Biotechnol Bioeng** 43: 11–20, 1994.

VAN DIJKEN, J. P; SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS microbiology letters**, v. 32, n. 3, p. 199-224, 1986. ISSN 0378-1097.

VERDUYN, C; POSTMA, E; SCHEFFERS, W. A; VAN DIJKEN, J. P. Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. **Journal of General Microbiology**, v. 136, n. 3, p. 405, 1990. ISSN 1350-0872.

VISSER, W; SCHEFFERS, W. A; BATENBURG-VAN DER VEGTE, W. H; VAN DIJKEN, J. P. Oxygen requirements of yeasts. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, n. 12, p. 3785-92, Dec 1990. ISSN 0099-2240

WIJSMAN, M. R; DIJKEN, J. P; KLEEFF, B. H; SCHEFFERS, W. A. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 50, n. 2, p. 183-192, 1984. ISSN 0003-6072.

WOOLFIT, M; ROZPĘDOWSKA, E; PIŠKUR, J; WOLFE, K. H. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis*. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 4, p. 721-733, 2007. ISSN 1535-9778.

5 DISCUSSÃO GERAL

A capacidade de crescer em anaerobiose é pouco documentada em *D. bruxellensis* visto que, seu crescimento nessa condição acontece em baixas velocidades específicas (BLOMQVIST et al., 2012; ROZPEĐOWSKA et al., 2011). Essa limitação no crescimento acontece devido ao desbalanço redox gerado pela pouca produção de glicerol, que tem a função de re-oxidar o NADH produzido durante a síntese de aminoácidos (WIJSMAN et al., 1984). Sabe-se que a adição de aminoácidos pode aliviar esse problema, visto que diminuiria o excesso de NADH (BLOMQVIST et al., 2012). A presença de nitrato como fonte de nitrogênio também funciona como uma válvula redox devido a dependência de NAD(P)H pelas enzimas de assimilação do nitrato. Diante disso, sabendo que a concentração e a qualidade das fontes de nitrogênio são capazes de influenciar a taxa de crescimento e a eficiência fermentativa em diferentes leveduras (MENDES-FERREIRA et al., 2007; DE BARROS PITA et al., 2011; ESPINOSA VIDAL et al., 2012), o primeiro trabalho aqui apresentado teve o objetivo de avaliar a capacidade de *D. bruxellensis* metabolizar diferentes aminoácidos como fonte de nitrogênio em aerobiose ou anaerobiose estrita, além de comparar o padrão de expressão permeases e genes envolvidos no metabolismo central do nitrogênio. Foi relatado que as velocidades específicas de crescimento foram maiores em anaerobiose do que em aerobiose, o que poderia ser explicado pela alta produção de acetato em aerobiose, uma característica marcante em *D. bruxellensis* (Leite et al., 2013). Uma concentração de até 1.7 g L^{-1} (28mM) de acetato foi observado em nossos cultivos aeróbicos (dados não apresentados) que pode ser suficiente para inibir uma maior taxa de crescimento na linhagem utilizada no presente estudo.

A preferência das células de *D. bruxellensis* por cada um dos 20 AA, modifica ligeiramente de acordo com disponibilidade de oxigênio e que a glutamina foi o aminoácido preferencial independente da disponibilidade de oxigênio. A classificação quanto à preferência por cada fonte de nitrogênio, classificadas como sendo preferencial ou não preferencial (pobres), é feita com base dois critérios. O primeiro critério é relacionado a capacidade de cada composto individual ajudar no crescimento quando estão presentes como única fonte de nitrogênio. O segundo critério reflete a constatação de que as fontes

preferidas de nitrogênio geralmente reprimem os processos necessários para a utilização das fontes de nitrogênio não preferenciais (COOPER 1982; MAGASANIK 1992; MAGASANIK E KAISER, 2002). É importante ressaltar que, a classificação de fontes de nitrogênio não é absoluta, e seus efeitos repressivos podem variar significativamente entre diferentes linhagens de levedura. Em *S. cerevisiae*, amônio e glutamina são fontes preferenciais indutoras da NCR (MAGASANIK e KAISER, 2002; GODARD *et al.*, 2007; LJUNGDAHL AND DAIGNAN-FORNIER, 2012), por outro lado, em *D. bruxellensis*, glutamina tem uma ação central nesse controle (CAJUEIRO *et al.*, 2017).

Neste trabalho, observou-se que a absorção dos AA por permeases gerais ou específicas não parece ser o passo limitante da assimilação de AA por células de *D. bruxellensis*, o que foi corroborado com o experimento mostrando a eficiente captação dos aminoácidos e com o perfil de expressão dos genes que codificam as permeases. Os dados de quantificação relativa indicaram que os genes MEP1, GAP1 e PUT4 apresentaram diferentes padrões de expressão, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose. O gene MEP1, que codifica o transportador de baixa afinidade para amônio, não apresentou sobre-expressão em nenhum dos aminoácidos pobres que foram testados, tanto na presença como na ausência de oxigênio. Já o gene GAP1 apresentou sobre-expressão quando as células foram cultivadas em todos os aminoácidos considerados fontes pobres em aerobiose e anaerobiose, com exceção da glicina em aerobiose, na qual não houve mudança na expressão. O gene PUT4, permease para prolina, apresentou padrão de sobre-expressão para os aminoácidos de terceira categoria que foram testados, com menor destaque para a glicina que não houve expressão do gene em relação a condição de referência, enquanto em anaerobiose, não houve expressão em nenhum dos aminoácidos testados. Isto mostra que, em aerobiose, o gene PUT4 está sob o controle de repressão catabólica do nitrogênio, e sugere que nesta levedura o produto do gene PUT4 está relacionado não só com a assimilação da prolina, como acontece em *S. cerevisiae* (JAUNIAUX *et al.*, 1987), mas com o de outras fontes de nitrogênio consideradas não preferenciais. Esse resultado difere do apresentado por De Barros Pita *et al* (2013), na qual, em aerobiose, todos esses genes acima que codificam permeases estão sob o controle do mecanismo de NCR, sendo induzidos quando a fonte preferencial de nitrogênio está limitante no meio ou quando a fonte secundária está presente. Em

S.cerevisiae, a expressão e atividade das permeases Gap1p e Put4p também estão sujeitos a regulação do nitrogênio (JAUNIAUX e GRENSON, 1990; MAGASANIK e KAISER, 2002) e a presença de fontes preferenciais leva a diminuição da atividade das permeases e como consequência a indução de vias específicas de assimilação de nitrogênio são diminuídas (COOPER e SUMRADA, 1983). Além disso, em glutamato observa-se uma expressão significativa de GAP1 apenas em anaerobiose, em *S. cerevisiae* na presença de oxigênio, o crescimento sobre glutamato gera um sinal de direcionamento da permease Gap1 para o vacúolo, por outro lado, o crescimento sobre fontes pobres como prolina, direciona a permease para membrana plasmática (STANBROUGH e MAGASANIK, 1995). Isso reforça a ideia de regulação das permeases dependente da concentração de oxigênio. Além disso, a expressão diferencial de genes que codificam a enzima do CNM revelou diferenças na liberação da NCR, aspecto importante que está relacionado a assimilação seqüencial ou paralela de diferentes fontes de nitrogênio com importância para o rendimento industrial e produtividade.

Ao estudar como a utilização do nitrato ou amônio afeta o metabolismo do carbono e os rendimentos dos produtos da fermentação em *D. bruxellensis* em condições aeróbias e anaeróbias, observou-se que, a presença de nitrato (como única fonte de nitrogênio ou no meio misto) atuando como aceptor de elétron permite aumentar consideravelmente a velocidade específica de crescimento e de consumo de glicose em relação ao meio com amônio em anaerobiose além de determinar mudanças profundas na distribuição dos produtos finais do metabolismo do açúcar. A taxa específica de crescimento no meio com amônio e glicose, em anaerobiose, foi quase três vezes maior do que a reportada para outra linhagem de *D. bruxellensis* (ROZPEĐOWSKA et al., 2011). Em aerobiose, as taxas de crescimento no meio com nitrato e glicose, foram superiores ao relatados também pelo nosso grupo em crescimentos aeróbicos. Segundo de Barros Pita et al (2011), as taxas de crescimento foram 0.09 e 0.16 h⁻¹ em meio sintético contendo nitrato e no mix de amônio e nitrato respectivamente. É importante ressaltar que a transferência de oxigênio é mais eficiente no presente estudo, visto que o BioLector proporciona maior agitação em contraste com o estudo anterior feito em shaker.

As maiores velocidades específicas no meio com nitrato em anaerobiose quando comparado ao meio na presença de oxigênio, é outro importante achado nesse trabalho. Sendo assim, esses dados sugerem que a assimilação do nitrato é fortemente influenciada pela concentração de oxigênio dissolvido no meio, podendo exercer um efeito negativo sobre a assimilação do nitrato em aerobiose, o que não acontece quando amônio está presente como fonte de nitrogênio. Adicionalmente, dados não ainda não publicados pelo nosso grupo mostram que a expressão do gene *YNR1* no meio apenas com nitrato em anaerobiose corresponde ao dobro da expressão em aerobiose, tendo amônio como condição de referência. Esse conjunto de dados apontam um efeito negativo do oxigênio sobre a assimilação de nitrato a nível da nitrato redutase.

Durante o crescimento anaeróbico no meio com amônio, *D. bruxellensis* converteu a menos glicose em biomassa do que em aerobiose devido a maior produção de etanol, juntamente com a produção de glicerol. Entretanto, os rendimentos em etanol e glicerol em anaerobiose foram consideravelmente maiores dos que os reportados por Rozpędowska et al. (2011) que encontraram 0.34 e 0.007 (g/g) respectivamente. Enquanto, o rendimento em biomassa apresentado pela nossa linhagem em anaerobiose foi 41% menor do que a linhagem CBS2499 (ROZPĘDOWSKA et al., 2011). No meio com nitrato, na presença de oxigênio, os rendimentos em biomassa e etanol foram consideravelmente menores do que em anaerobiose e do que os rendimentos em amônio, mesmo assim, o etanol foi o principal produto do metabolismo dos açúcares. Em anaerobiose, nos nossos ensaios também houve uma expressiva produção de acetato no meio com nitrato e no meio misto, sendo o rendimento em meio misto 24% menor do que o observado por Galafassi et al (2013). Nos nossos ensaios, não houve produção de glicerol em aerobiose. Na ausência de oxigênio a produção de glicerol aconteceu em todos os meios testados, sendo menor, em média 45%, nos meios na presença com nitrato e no meio misto em relação ao meio com amônio em todas as fontes de carbono. Já é sabido que a presença do nitrato como fonte de nitrogênio modifica os produtos da fermentação (GALAFASSI et al., 2013), isso é bem evidente em condições anaeróbicas, contribuindo para o ajuste redox, entretanto a questão de como *D. bruxellensis* resolve o problema redox gerado pela limitada produção de glicerol, especialmente na presença de amônio, continua desconhecida.

Diante do exposto, a hipótese de que a capacidade de assimilação de diferentes fontes de nitrogênio altera diversos aspectos fisiológicos e genéticos na levedura *D. bruxellensis* foi confirmada. Portanto esse trabalho contribui para uma melhor descrição de aspectos fisiológicos importantes da levedura *D. bruxellensis* ajudando a entender, de maneira ainda superficial, como as fontes de nitrogênio favorecem a permanência da levedura *D. bruxellensis* no ambiente industrial.

6 CONCLUSÕES

- A capacidade de assimilação de diferentes fontes de nitrogênio bem como a disponibilidade de oxigênio alteram diversos aspectos fisiológicos e genéticos na levedura *D. bruxellensis*;
- Glutamina é o aminoácido preferencial independente da disponibilidade de oxigênio;
- A maquinaria catabólica para aminoácidos é mais eficiente na ausência de oxigênio quando arginina, aspartato, glutamato ou glutamina estão no meio;
- A absorção dos aminoácidos por permeases gerais ou específicas não é o passo limitante da assimilação de AA por células de *D. bruxellensis*, é, todavia, a capacidade de metabolizar cada aminoácido;
- O padrão de expressão dos genes envolvidos no metabolismo central do nitrogênio na levedura *D. bruxellensis* indica que existe um mecanismo regulatório que responde não apenas em função da fonte de nitrogênio, mas também em função da disponibilidade de oxigênio;
- A presença de nitrato (como única fonte de nitrogênio ou no meio misto) atuando como aceptor de elétron permite aumentar a velocidade específica de crescimento e de consumo de glicose em relação a amônio em anaerobiose determinando mudanças profundas na distribuição dos produtos finais;
- O nitrato funciona como um aceptor de elétrons tão eficientemente quanto o acetaldeído, dobrando a capacidade de metabolização de açúcares em anaerobiose, quando comparada a um meio contendo apenas amônio;
- Os resultados obtidos nesse trabalho contribuem para uma melhor descrição de aspectos fisiológicos relacionados as fontes de nitrogênio pela levedura *D. bruxellensis* e revelam possíveis particularidades da regulação do nitrogênio na ausência de oxigênio.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, D; HYNES, S; INGLEDEW, W. Growth rates of Dekkera/Brettanomyces yeasts hinder their ability to compete with Saccharomyces cerevisiae in batch corn mash fermentations. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 66, n. 6, p. 641-647, 2005. ISSN 0175-7598.

ABDEL-SATER, F; IRAQUI, I; URRESTARAZU, A; ANDRÉ, B. The external amino acid signaling pathway promotes activation of Stp1 and Uga35/Dal81 transcription factors for induction of the AGP1 gene in Saccharomyces cerevisiae. **Genetics**, v. 166, n. 4, p. 1727-1739, 2004. ISSN 0016-6731.

AGUILAR USCANGA, M; DELIA, M.-L; STREHAIANO, P. Brettanomyces bruxellensis: effect of oxygen on growth and acetic acid production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 61, n. 2, p. 157-162, 2003. ISSN 0175-7598.

ALBERS, E; LARSSON, C; LIDÉN, G; NIKLASSON, C; GUSTAFSSON, L. Influence of the nitrogen source on Saccharomyces cerevisiae anaerobic growth and product formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3187-3195, 1996. ISSN 0099-2240.

BARNETT, J. A; PAYNE, R. W; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. Cambridge University Press, 1983. ISBN 0521252962.

BASÍLIO, A. C; DE ARAÚJO, P. R; DE MORAIS, J. O; DA SILVA FILHO, E; DE MORAIS, M; SIMÕES, D. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current microbiology**, v. 56, n. 4, p. 322-326, 2008. ISSN 0343-8651.

BECK, T; HALL, M. N. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 689-692, 1999. ISSN 0028-0836.

BECK, T; HALL, MN. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 689-92, Dec 09 1999. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10604478> >.

BERTRAM, PG; CHOI, JH; CARVALHO, J; AI, W; ZENG, C; CHAN, T-F; ZHENG, XS. Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 46, p. 35727-35733, 2000. ISSN 0021-9258.

BLOMQVIST, J; EBERHARD, T; SCHNÜRER, J; PASSOTH, V. Fermentation characteristics of Dekkera bruxellensis strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1487-1497, 2010. ISSN 0175-7598.

BLOMQVIST, J; NOGUE, VS; GORWA-GRAUSLUND, M; PASSOTH, V. Physiological requirements for growth and competitiveness of Dekkera

bruxellensis under oxygen-limited or anaerobic conditions. **Yeast**, v. 29, n. 7, p. 265-74, Jul 2012. ISSN 1097-0061

BLOMQVIST, J; PASSOTH, V. Dekkera bruxellensis--spoilage yeast with biotechnological potential, and a model for yeast evolution, physiology and competitiveness. **FEMS Yeast Res**, v. 15, n. 4, p. fov021, Jun 2015. ISSN 1567-1364

BÖER, E; SCHRÖTER, A; BODE, R; PIONTEK, M; KUNZE, G. Characterization and expression analysis of a gene cluster for nitrate assimilation from the yeast *Arxula adeninivorans*. **Yeast**, v. 26, n. 2, p. 83-93, 2009. ISSN 1097-0061.

BOER, VM; TAI, SL; VURALHAN, Z; ARIFIN, Y; WALSH, MC; PIPER, MD; DE WINDE, JH; PRONK, JT; DARAN, JM. Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. **FEMS yeast research**, v. 7, n. 4, p. 604-620, 2007. ISSN 1567-1364.

BORNEMAN, AR; ZEPPEL, R; CHAMBERS, PJ; CURTIN, CD. Insights into the Dekkera bruxellensis genomic landscape: comparative genomics reveals variations in ploidy and nutrient utilisation potential amongst wine isolates. **PLoS Genet**, v. 10, n. 2, p. e1004161, 2014. ISSN 1553-7404.

CASTRO PARENTE, D; VIDAL, EE; LEITE, FC; DE BARROS PITA, W; DE MORAIS, MA, JR. Production of sensory compounds by means of the yeast Dekkera bruxellensis in different nitrogen sources with the prospect of producing cachaca. **Yeast**, v. 32, n. 1, p. 77-87, Jan 2015. ISSN 1097-0061

CHATONNET, P; DUBOURDIE, D; BOIDRON, JNL; PONS, M. The origin of ethylphenols in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 60, n. 2, p. 165-178, 1992. ISSN 0022-5142.

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

COCOLIN, L; RANTSIOU, K; IACUMIN, L; ZIRONI, R; COMI, G. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1347-1355, 2004. ISSN 0099-2240.

CONTERNO, L; JOSEPH, CL; ARVIK, TJ; HENICK-KLING, T; BISSON, LF. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, n. 2, p. 139-147, 2006. ISSN 0002-9254.

COOPER, T; SUMRADA, R. What is the function of nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*? **Journal of Bacteriology**, v. 155, n. 2, p. 623-627, 1983. ISSN 0021-9193.

COOPER, T. G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cold Spring Harbor Monograph Archive**, v. 11, n. 0, p. 39-99, 1982.

COSCHIGANO, PW; MAGASANIK, B. The URE2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione s-transferases. **Molecular and cellular biology**, v. 11, n. 2, p. 822, 1991. ISSN 0270-7306.

DA SILVA, TC; LEITE, FC; DE MORAIS, MA, JR. Distribution of *Dekkera bruxellensis* in a sugarcane-based fuel ethanol fermentation plant. **Let Appl Microbiol**, v. 62, n. 4, p. 354-8, Apr 2016. ISSN 1472-765X.

DE BARROS PITA, W; LEITE, FCB; DE SOUZA LIBERAL, AT; SIMÕES, DA; DE MORAIS, MA. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-9, 2011. ISSN 0003-6072.

DE BARROS PITA, W; TIUKOVA, I; LEITE, FCB; PASSOTH, V; SIMÕES, DA; MORAIS, MA. The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. **Yeast**, 2013. ISSN 1097-0061.

DE SOUZA LIBERAL, A; BASILIO, A; DO MONTE RESENDE, A; BRASILEIRO, B; DA SILVA FILHO, E; DE MORAIS, J; SIMOES, DA; DE MORAIS JR, M. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 2, p. 538-547, 2007. ISSN 1365-2672.

DE SOUZA LIBERAL, AT; CARAZZOLLE, MF; PEREIRA, GA; SIMÕES, DA; DE MORAIS, MA. The yeast *Dekkera bruxellensis* genome contains two orthologs of the ARO10 gene encoding for phenylpyruvate decarboxylase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, p. 1-6, 2012. ISSN 0959-3993.

DE SOUZA, RB; DE MENEZES, JAS; DE SOUZA, RDFR; DUTRA, ED; DE MORAIS JR, M. A. Mineral composition of the sugarcane juice and its influence on the ethanol fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 209-222, 2015. ISSN 0273-2289.

DIJKEN, J. P; WEUSTHUIS, R. A; PRONK, J. T. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 63, n. 3, p. 343-352, 1993. ISSN 0003-6072.

ESPINOSA VIDAL, E; BILLERBERCK, G; SIMOES, DA; SHULER, A; FRANCOIS, JM. ; MORAIS JR, MA. . Influence of nitrogen supply on the production of higher alcohol/esters and expression of the flavor-related genes in cachaça like-industrial fermentation. **Food Chemistry**, v. 138, p. 701-708, 2012.

FREER, S; DIEN, B; MATSUDA, S. Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 101-105, 2003. ISSN 0959-3993.

GALAFASSI, S; CAPUSONI, C; MOKTADUZZAMAN, M; COMPAGNO, C. Utilization of nitrate abolishes the "Custers effect" in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 2013. ISSN 1476-5535.

GALAFASSI, S; MERICO, A; PIZZA, F; HELLBORG, L; MOLINARI, F; PIŠKUR, J; COMPAGNO, C. *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1079-1088, 2011. ISSN 1367-5435.

GEORIS, I; TATE, JJ; COOPER, TG; DUBOIS, E. Tor pathway control of the nitrogen-responsive DAL5 gene bifurcates at the level of Gln3 and Gat1 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 14, p. 8919-8929, 2008. ISSN 0021-9258.

GRENSON, M. Amino acid transporters in yeast: structure, function and regulation. **New Comprehensive Biochemistry**, v. 21, p. 219-245, 1992. ISSN 0167-7306.

HELLBORG, L; PIŠKUR, J. Complex nature of the genome in a wine spoilage yeast, *Dekkera bruxellensis*. **Eukaryotic cell**, v. 8, n. 11, p. 1739-1749, 2009. ISSN 1535-9778.

HINNEBUSCH, AG; NATARAJAN, K. Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. **Eukaryotic cell**, v. 1, n. 1, p. 22, 2002. ISSN 1535-9778.

HOFMAN-BANG, J. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 35-71, 1999. ISSN 1073-6085.

IHMELS, J; BERGMANN, S; GERAMI-NEJAD, M; YANAI, I; MCCLELLAN, M; BERMAN, J; BARKAI, N. Rewiring of the yeast transcriptional network through the evolution of motif usage. **Science**, v. 309, n. 5736, p. 938-940, 2005. ISSN 0036-8075.

JAUNIAUX, JC; GRENSON, M. GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **The FEBS Journal**, v. 190, n. 1, p. 39-44, 1990.

JAUNIAUX, JC; VANDENBOL, M; VISSERS, S; BROMAN, K; GRENSON M. Nitrogen catabolite regulation of proline permease in *Saccharomyces cerevisiae*. **The FEBS Journal**, v. 164, n. 3, p. 601-606, 1987.

JOUHTEN, P; RINTALA, E; HUUSKONEN, A; TAMMINEN, A; TOIVARI, M; WIEBE, M; RUOHONEN, L; PENTTILA, M; MAAHEIMO, H. Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A. **BMC Syst Biol**, v. 2, p. 60, Jul 09 2008. ISSN 1752-0509

KULKARNI, A; BUFORD, TD; RAI, R; COOPER, TG. Differing responses of Gat1 and Gln3 phosphorylation and localization to rapamycin and methionine sulfoximine treatment in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 2, p. 218-229, 2006. ISSN 1567-1364.

LEITE, FCB; BASSO, TO; PITA, WB; GOMBERT, AK; SIMÕES, DA; MORAIS JÚNIOR, MA. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. **FEMS yeast research**, 2012. ISSN 1567-1364.

LEITE, FCB; LEITE, DDR; PEREIRA, LF; BARROS PITA, W; MORAIS, M. High intracellular trehalase activity prevents the storage of trehalose in the yeast *Dekkera bruxellensis*. **Letters in applied microbiology**, v. 63, n. 3, p. 210-214, 2016. ISSN 1472-765X.

LOUREIRO, V; MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. **International journal of food microbiology**, v. 86, n. 1, p. 23-50, 2003. ISSN 0168-1605.

MACHÍN, F; MEDINA, B; NAVARRO, FJ; PÉREZ, MD; VEENHUIS, M; TEJERA, P; LORENZO, H; LANCHA, A; SIVERIO, JM. The role of Ynt1 in nitrate and nitrite transport in the yeast *Hansenula polymorpha*. **Yeast**, v. 21, n. 3, p. 265-276, 2004. ISSN 1097-0061.

MACMILLAN, A. The entry of ammonia into fungal cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 7, n. 1, p. 113-126, 1956. ISSN 1460-2431.

MAGASANIK, B. Regulation of nitrogen utilization. **The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: gene expression**, v. 2, p. 283-317, 1992.

MAGASANIK, B. Ammonia assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 5, p. 827-829, 2003. ISSN 1535-9778.

MAGASANIK, B; KAISER, C.A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 290, n. 1-2, p. 1-18, 2002. ISSN 0378-1119.

MENDES-FERREIRA, A; DEL OLMO, M; GARCIA-MARTINEZ, J; JIMENEZ-MARTI, E; MENDES-FAIA, A; PEREZ-ORTIN, J; LEO, C. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to different nitrogen concentrations during alcoholic fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 9, p. 3049-3060, 2007. ISSN 0099-2240.

MILLER, SM; MAGASANIK, B. Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 9, p. 4927-4935, 1990. ISSN 0021-9193.

MINEHART, PL; MAGASANIK, B. Sequence and expression of GLN3, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a

putative zinc finger DNA-binding domain. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, n. 12, p. 6216-6228, 1991. ISSN 0270-7306.

MITCHELL, AP; MAGASANIK, B. Regulation of glutamine-repressible gene products by the GLN3 function in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 4, n. 12, p. 2758-2766, 1984. ISSN 0270-7306.

MOKTADUZZAMAN, M; GALAFASSI, S; CAPUSONI, C; VIGENTINI, I; LING, Z; PIŠKUR, J; COMPAGNO, C. Galactose utilization sheds new light on sugar metabolism in the sequenced strain *Dekkera bruxellensis* CBS 2499. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 2, 2015. ISSN 1567-1356.

PASSOTH, V; BLOMQVIST, J; SCHNÜRER, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4354-4356, 2007. ISSN 0099-2240.

PASSOTH, V; FREDLUND, E; DRUVEFORS, UÄ; SCHNÜRER, J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 1, p. 3-13, 2006. ISSN 1567-1364.

PEREIRA, LF; BASSI, APG; AVANSINI, SH; NETO, AGB; BRASILEIRO, BTRV; CECCATO-ANTONINI, SR; DE MORAIS, MA. The physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-11, 2012. ISSN 0003-6072.

PEREIRA, LF; LUCATTI, E; BASSO, LC; DE MORAIS, MA. The fermentation of sugarcane molasses by *Dekkera bruxellensis* and the mobilization of reserve carbohydrates. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 3, p. 481-489, 2014. ISSN 0003-6072.

PEREZ, M; GONZALEZ, C; AVILA, J; BRITO, N; SIVERIO, J. The YNT1 gene encoding the nitrate transporter in the yeast *Hansenula polymorpha* is clustered with genes YNI1 and YNR1 encoding nitrite reductase and nitrate reductase, and its disruption causes inability to grow in nitrate. **Biochem. J**, v. 321, p. 397-403, 1997.

PIŠKUR, J; LING, Z; MARCET-HOUBEN, M; ISHCHUK, OP; AERTS, A; LABUTTI, K; COPELAND, A; LINDQUIST, E; BARRY, K; COMPAGNO, C. The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. **International journal of food microbiology**, v. 157, n. 2, p. 202-209, 2012. ISSN 0168-1605.

REIS, ALS., DAMILANO, ED., MENEZES, RSC., DE MORAIS JR, MA. Second-generation ethanol from sugarcane and sweet sorghum bagasses using the yeast *Dekkera bruxellensis*. **Industrial Crops and Products** v. 92, p. 255-262, 2016.

ROZPĘDOWSKA, E; HELLBORG, L; ISHCHUK, OP; ORHAN, F; GALAFASSI, S; MERICO, A; WOOLFIT, M; COMPAGNO, C; PIŠKUR, J. Parallel evolution of the

make—accumulate—consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. **Nature communications**, v. 2, p. 302, 2011.

SCHIFFERDECKER, AJ; DASHKO, S; ISHCHUK, OP; PISKUR, J. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. **Yeast**, v. 31, n. 9, p. 323-32, Sep 2014. ISSN 1097-0061.

SCHMELZLE, T; HALL, MN. TOR, a central controller of cell growth. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 253-262, 2000. ISSN 0092-8674.

SIVARIO, JM. Assimilation of nitrate by yeasts. **FEMS microbiology reviews**, v. 26, n. 3, p. 277-284, 2002. ISSN 1574-6976.

STANBROUGH, M; MAGASANIK, B. Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 1, p. 94-102, 1995. ISSN 0021-9193.

VAN DER WALT, J. *Dekkera*, a new genus of the Saccharomycetaceae. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 30, n. 1, p. 273-280, 1964. ISSN 0003-6072.

VAN DIJKEN, JP; SCHEFFERS, WA. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS microbiology letters**, v. 32, n. 3, p. 199-224, 1986. ISSN 0378-1097.

VERSTREPEN, KJ; DERDELINCKX, G; DUFOUR, JP; WINDERICKX, J; THEVELEIN, JM; PRETORIUS, IS; DELVAUX, FR. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 110-118, 2003. ISSN 1389-1723.

VICTOR, C-H; JAVIER, G-R; MANUEL, D-GJ; GUADALUPE, A-UM. Effect of glucose concentrations on the growth and metabolism of *Brettanomyces bruxellensis* under aerobic conditions. 2013.

VISSER, W; SCHEFFERS, WA; BATENBURG-VAN DER VEGTE, WH; VAN DIJKEN, JP. Oxygen requirements of yeasts. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, n. 12, p. 3785-92, Dec 1990. ISSN 0099-2240

WIAME, J-M; GRENSON, M; ARS, HN. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. **Advances in microbial physiology**, v. 26, p. 1-88, 1985. ISSN 0065-2911.

WIJSMAN, MR; DIJKEN, JP; KLEEFF, BH; SCHEFFERS, WA. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 50, n. 2, p. 183-192, 1984. ISSN 0003-6072.

WOLFE, KH; SHIELDS, DC. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. **Nature**, v. 387, n. 6634, p. 708-13, Jun 12 1997. ISSN 0028-0836

WOOLFIT, M; ROZPĘDOWSKA, E; PIŠKUR, J; WOLFE, KH. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis*. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 4, p. 721-733, 2007. ISSN 1535-9778.

ANEXO A - ANÁLISE DIFERENCIAL DO PROTEOMA DE *DEKKERA BRUXELLENSIS* CULTIVADA EM NITRATO NA AUSÊNCIA DE OXIGÊNIO

1-Introdução

A levedura *Dekkera bruxellensis* tem chamado a atenção pela sua capacidade de instalação e manutenção no processo fermentativo industrial de produção de etanol combustível. Inicialmente classificado como contaminante, estudos recentes têm revelado um conjunto de características fisiológicas que mostram seu potencial biotecnológico (Blomqvist *et al.*, 2010; Leite *et al.*, 2013; Castro Parente *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2016). Uma característica marcante na levedura *D. bruxellensis* é a habilidade de assimilar nitrato, uma fonte de nitrogênio presente no caldo de cana e que não é assimilada por *Saccharomyces cerevisiae*, predominante no processo, essa característica confere vantagem a levedura *D. bruxellensis*, na dorna de fermentação (de Barros Pita *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012; De Barros Pita *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014). Entretanto pouco se sabe a respeito dos aspectos fisiológicos e genéticos dessa levedura em anaerobiose plena, condição predominante na industrial de produção de etanol. Galafassi *et al* (2013) mostraram a capacidade de células de *D. bruxellensis* assimilar nitrato em anaerobiose e a assimilação dessa fonte de nitrogênio inibe o efeito Custers, comum nas células de *D. bruxellensis*, que acontece devido a incapacidade de produção de glicerol por *D. bruxellensis*. Sendo assim, a eliminação do excesso de NADH associado à produção de biomassa em anaerobiose fica grandemente facilitada pela possibilidade de redução do nitrato. Esse estudo corroborou o trabalho anterior de De Barros Pita *et al.* (2011) que mostrou o efeito do nitrato no crescimento celular e capacidade de fermentação de *D. bruxellensis* em substrato industrial. Ainda em relação à condição anaeróbica, dados recentes ainda não publicados mostram que ausência oxigênio exerce uma influência positiva, juntamente com o nitrato na taxa específica de crescimento da levedura *D. bruxellensis* quando comparada a condição aeróbica. No entanto, estudos genéticos mais detalhados são necessários para se entender o funcionamento das vias metabólicas envolvidas no processo de assimilação de fontes de nitrogênio em *D. bruxellensis*. Um trabalho recente de proteômica em aerobiose com a linhagem de *D. bruxellensis*

utilizada neste trabalho mostrou que as proteínas diferencialmente expressas na presença de nitrato, tendo amônio como referência, mostraram que o nitrato induz maior metabolismo oxidativo, favorecendo a respiração celular (Neto *et al.*, 2014), como já havia sido sugerido em trabalhos anteriores (De Barros Pita *et al.*, 2011; De Barros Pita *et al.*, 2013ab; Leite *et al.*, 2013). Além do mais, a presença de nitrato parece favorecer a estocagem de nitrogênio via produção de espermidina (Neto *et al.*, 2014). Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar em nível traducional o efeito da presença de nitrato durante o crescimento anaeróbico das células de *D. bruxellensis*.

2-Material e métodos

2.1- Linhagem da levedura e condições de pré-cultura

A cepa industrial da *D. bruxellensis* GDB 248 (de Barros Pita *et al.*, 2011) foi utilizada neste estudo. A linhagem foi mantida em meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona bacteriológica e 2% de agar) com repique constante para novas placas a fim de manter colônias de células frescas. As células foram inoculadas em frascos de agitação contendo YPD (1% de extrato de levedura, 2% de glicose e 2% de peptona bacteriológica) para pré-cultura. As pré-culturas foram incubadas a 30 °C e 160 rpm por 48 h. Em seguida, as células foram centrifugadas e resuspendidas em meio mineral líquido (1,7 g L⁻¹YNB sem aminoácidos e sulfato de amônio; 20 g L⁻¹ de glicose; 5 g L⁻¹ de sulfato de amônio) a 30 °C sob agitação de 160 rpm durante 24 h.

2.2- Meios e Condições de cultivo

Foi utilizado meio mineral YNB sem sulfato de amônio e aminoácidos, com suplementação de sacarose como fonte de carbono (20g l⁻¹). Sulfato de Amônio, 5 g l⁻¹ ou nitrato de sódio, 6,43 g l⁻¹; foram utilizados como fonte de nitrogênio. Os meios para culturas anaeróbicas foram suplementados com ergosterol, 10 mg l⁻¹ e Tween 80, 420mg l⁻¹ (Jouhten *et al.*, 2008; Blomqvist *et al.*, 2012).

Os cultivos aeróbicos foram feitos em frascos agitados em shaker orbital a 150rpm e os cultivos anaeróbicos foram realizados no Biolector system, um micro fermentador que permite temperatura, humidade e oxigenação controlados. O experimento em anaerobiose foi realizado com fornecimento de Nitrogênio (<1 ppm O₂) numa placa do tipo FlowerPlate, com o volume de trabalho de 1500ul a 30° C. A células do pré-inóculo foram adicionados em cada meio de cultivo com

0.1 de densidade óptica (OD_{600nm}) inicial. Os ensaios aconteceram em triplicata técnica e biológica.

O crescimento foi monitorado até atingir uma densidade óptica (OD_{600nm}) entre 1-1.5, que representa a fase exponencial de crescimento nessas condições, baseado em cultivos anteriores. Foram coletados 12 mL de cada amostra para centrifugação a 5000g por 5 minutos a temperatura ambiente e imediato congelamento em nitrogênio líquido. As células foram mantidas a $-80^{\circ}C$ até a extração de proteínas para análise proteômica.

2.3- Extração de proteínas totais

Cada amostra coletada com células de *D. bruxellensis* foi submetida a extração de proteínas totais como segue o protocolo abaixo (Neto *et al.*, 2014). As amostras foram descongeladas no gelo e o pellet foi inicialmente lavado com 2 mL de água Milli-Q estéril, centrifugado e re-suspendido em 200 μ L de água Milli-Q estéril. Em seguida, foi adicionado 200 μ L de 0.6M de NaOH e após 5 min de repouso em temperatura ambiente, a suspensão foi centrifugada a 10000xg a $4^{\circ}C$ por 5min. Ao pellet obtido foi adicionado 200 μ L de Tampão de Amostra SDS (60mM tris-HCL, pH 6.8%; 5% glicerol; 4% β -mercaptoetanol; 2% SDS; 0.0025% azul de bromofenol) e fervido por 3 min para lise celular. Após centrifugação a 5000xg a $4^{\circ}C$ por 5min, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e mantidos a $4^{\circ}C$.

Enquanto isso, foram adicionados aos precipitados 200 μ L de Tampão de Amostra SDS e o mesmo volume de esferas de vidro 425-600 μ m (Sigma), sendo agitado por 5 minutos em ciclos de 30 segundos em banho de gelo e 30 segundos no vortex (Kushnirov, 2000). Após nova centrifugação, o segundo sobrenadante foi misturado ao primeiro.

As proteínas foram precipitadas em 1mL de uma solução de 0.1M de acetato de amônio em metanol, após incubação a $-20^{\circ}C$ por 30 minutos e centrifugados a 17000xg, por 20 minutos a $4^{\circ}C$. Em seguida as proteínas precipitadas foram lavadas três vezes em uma solução gelada de 1 mL de acetona 80%, centrifugado mais uma vez por igual período e rotação e lavadas com 1 mL de etanol 70% gelado. Após centrifugação o pellet foi secado em temperatura ambiente por 15 minutos, em seguida, solubilizado em 200 μ L de tampão contendo 8.0M de uréia e 2.0 M de tiouréia e estocados a -80° .

2.4- Quantificação

As proteínas solúveis totais foram quantificadas pelo método de Bradford, que utiliza *Coomassie Brilliant Blue* G-250 como reagente de coloração e uma solução padronizada de albumina de soro bovino (BSA) na concentração de 2.0 mg.mL⁻¹, para o estabelecimento da curva padrão (Bradford, 1976).

2.5- Integridade das Proteínas

Para verificar a integridade dos extratos, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 12% de SDS-PAGE com 1.0mm de espessura, a 17mA, com voltagem constante, 150 V. Após a eletroforese os géis foram corados com azul de *Coomassie Brilliant* (Candiano *et al* 2004) e posteriormente digitalizados em scanner de transparência ImageScanner III(GE LifeSciences).

2.6- 2D-PAGE

A focalização isoeletrica (IEF) foi realizada com fitas DryStrip (GE LifeScience) de 11 cm e pH imobilizada de 4-7 para cada uma das três réplicas biológicas. As quais foram hidratados com 200 µg de proteínas dissolvidas em solução de uréia 7 M e tiourea 2 M, 2% CHAPS (m/v) , 19,4 mM de DTT, IPG buffer/ pH 4-7 não linear 1,0% (GE Life Sciences) e 0,005% de azul de bromofenol(m/v). Para hidratação completa as fitas foram incubadas em IPG-Box (GE Life Sciences) por cerca de 18hs. A focalização foi realizada no aparelho Multiphor II Electrophoresis Unit (GE Life Sciences) e conduzida a 10°C em três etapas: i) 300 V – 30 V/h⁻¹;ii) 3500V-2900 V/h⁻¹; e iii) 3500 V-6170 V/h⁻¹, com condições constantes de corrente (2 mA) e potência (5 W).

Antes da eletroforese 2D-PAGE as fitas foram mantidas em solução de equilíbrio contendo 50 mM de Tris-HCl, pH 8,8; 6 M de uréia; 30% de glicerol(v/v); 2% de SDS; 1% de DTT) e em seguida alquilado em solução de iodoacetamida (IAA) (50 mM de Tris-HCl, pH 8,8; 6 M de ureia, glicerol a 30%, SDS a 2%, 2,5% de IAA). A eletroforese também foi realizada no Multiphor II Electrophoresis Unit (GE Life Sciences) em gel de poliacrilamida 12,5% com 24 cm (GE Life Sciences), utilizando duas tiras por gel, a 15 ° C em dois passos: i) 120 V, 20 mA e 30 W durante 30 minutos; e ii) 600 V, 50 mA e 30 W durante 1 hora e 30 minutos, tempo necessário para que ocorra a transferência da amostra para o gel. Os géis 2D foram corados com 0,02% de *Coomassie blue PlastGel* R (GE Life Sciences) (Pacheco *et al.*, 2013; Neto *et al.*, 2014).

2.7. Análise de imagens e seleção de spots diferenciais

Após a descoloração os geis foram digitalizados no ImageScanner III (GE Life Sciences) com o uso do programa LabScan 6.0 (GE Life Sciences). Os arquivos de imagem foram analisados com o software Image Master 2D Platinum v7.05 (GE Life Sciences). Para que o programa faça inferências estatísticas foram cadastrados os valores do gradiente de pH da fita DryStrip e dos valores de massa molecular das bandas geradas pelo marcador utilizado. Após esse procedimento o programa gera informações a respeito da localização do *spot* no gel, ponto isoelétrico (pI), massa molecular (MW) e informa as comparações e inferências estatísticas, como a razão da % do volume (*Ratio*), referente a razão entre dois *spots* correspondentes em um *match*, e o valor da ANOVA.

Assim, foram selecionados os *spots* que apresentaram valor de porcentagem de volume $\geq 1,5$ e $p \leq 0,05$ para ANOVA, que representa a confiabilidade estatística dos dados.

2.8. Identificação dos spots diferenciais através da espectrometria de massas e anotação

Os *spots* selecionados foram excisados manualmente a partir dos géis e digeridos com tripsina (Shevchenko *et al.*, 1996). Os peptídeos foram extraídos utilizando uma solução de extração (5% de ácido trifluoroacético (TFA) em solução com 50% de acetonitrila), e após 40 minutos em banho de gelo, a solução foi retirada e adicionada uma solução de tripsina. Após evaporação da amostras, utilizando evaporadores centrífugos tipo Speed-Vac, as amostras foram armazenadas a -20 tratados até a realização das análises por espectrometria de massas. Os espectros MS foram obtidos no espectrometro Autoflex III MALDI-ToF / ToF (Bruker Daltonics) usando uma matriz α -ciano. Os espectros foram identificados usando o software Mascot com o método: Peptide Mass Fingerprint, contra o banco de proteínas de *D. bruxellensis* obtidos a partir do UniProt (<http://www.uniprot.org/>). As proteínas putativamente anotadas foram salvas no formato FASTA a partir do acesso UniProt (<http://www.uniprot.org/batch/>) e agrupadas por função molecular, processo biológico e localização subcelular com o software Blast2Go (Conesa et al., 2005)

3-Resultados e Discussão preliminar

3.1-Influência da fonte de nitrogênio no crescimento da levedura *D. bruxellensis*

A partir do perfil das curvas de crescimento apresentados na Figura 1 foi possível calcular as velocidades de crescimento nos valores de $0,22\text{h}^{-1}$ e $0,20\text{h}^{-1}$ para os cultivos em amônio na presença e ausência de oxigênio, respectivamente, e de $0,13\text{ h}^{-1}$ e $0,21\text{ h}^{-1}$ em nitrato na presença e ausência de oxigênio, respectivamente. Esses dados estão de acordo com dados anteriores (capítulo 2 desta tese) que mostram que o crescimento em nitrato é maior em anaerobiose do que em aerobiose. Os valores acima de $0,2\text{ h}^{-1}$ para os cultivos em amônio são devidos ao uso do dissacarídeo sacarose como fonte de carbono, que induz maior velocidade de crescimento do que os monossacarídeos constituintes glicose e frutose (ver capítulo 2 desta tese). Na tentativa de uniformizar o momento fisiológico das células nas quatro condições de cultivo, amostras foram coletadas na fase exponencial de crescimento, quando as culturas atingiram entre 1 e 1,5 de densidade óptica a 600 nm. (Figura 1).

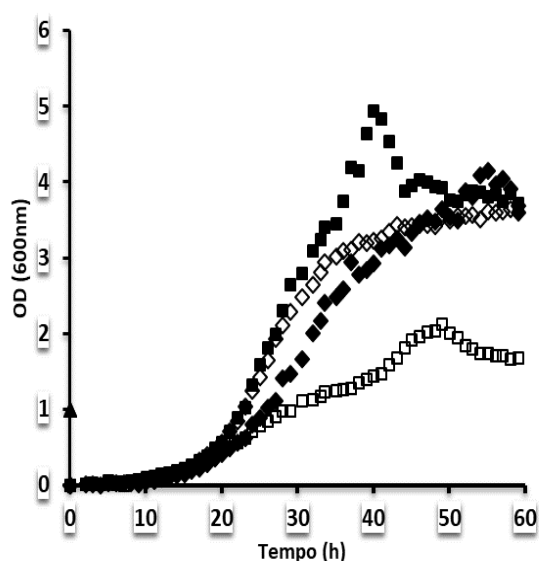


Figura 1 - Cinética do crescimento celular de *Dekkera bruxellensis* GDB 248 durante cultivos aeróbicos (símbolos abertos) e anaeróbicos (símbolos fechados) em meio mineral contendo sacarose como fonte de carbono e amônio (diamante) ou nitrato (quadrado) como fonte de nitrogênio. Os resultados representam a média dos valores de réplicas biológicas com duas réplicas técnicas para cada ponto.

3.2 Análise proteômica

A Figura 2 representa um gel representativo das extrações proteicas realizadas neste trabalho, com as bandas de proteínas bem definidas e sem degradação para as quatro condições de cultivo, assim como anteriormente mostrado por Neto *et al.* (2014). A partir dessa análise de qualidade, as proteínas extraídas foram submetidas a separação eletroforética bidimensional (2D) que as separam inicialmente pelo ponto isoelétrico e em seguida pela massa molecular.

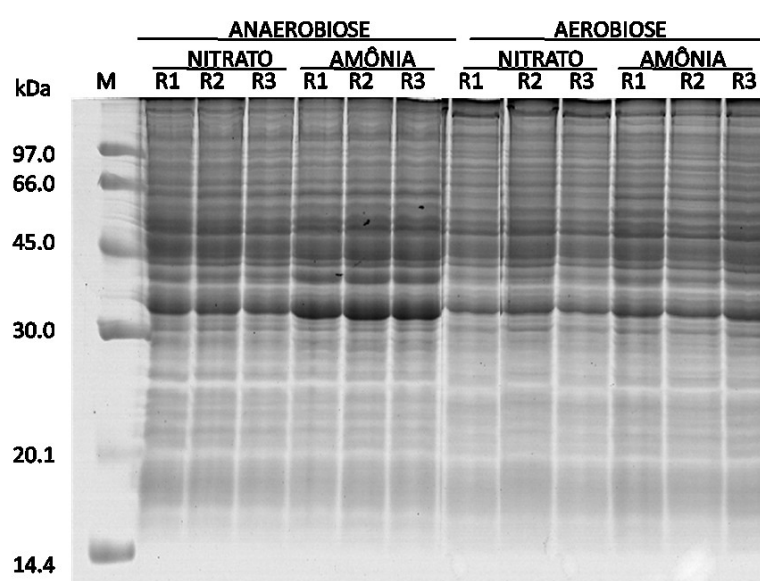


Figura 2 - SDS-PAGE de extrato de proteínas a partir de replicatas de células de *D. bruxellensis* GDB248 crescidas em nitrato ou amônio como fonte de nitrogênio, na presença ou ausência de oxigênio

A figura 3 apresenta um gel representativo da separação 2D, com os *spots* protéicos diferencialmente expressos sendo reconhecidos e numerados. Em média, a eletroforese 2D proporcionou a detecção de 288 *spots* por gel no meio com amônio em anaerobiose (Figura 3A), 281 *spots* por gel no meio com nitrato em anaerobiose (Figura 3B), e 187 *spots* por gel no meio com nitrato em aerobiose (Figura 3C). Foram considerados peptídeos diferencialmente acumulados (*Differentially Accumulated Polypeptides* – DAP) aqueles que foram exclusivos de uma única condição ou que na análise relativa apresentaram

valores acima ou abaixo de 1,5 na razão de área entre uma amostra teste e uma amostra referência nas duas comparações realizadas.

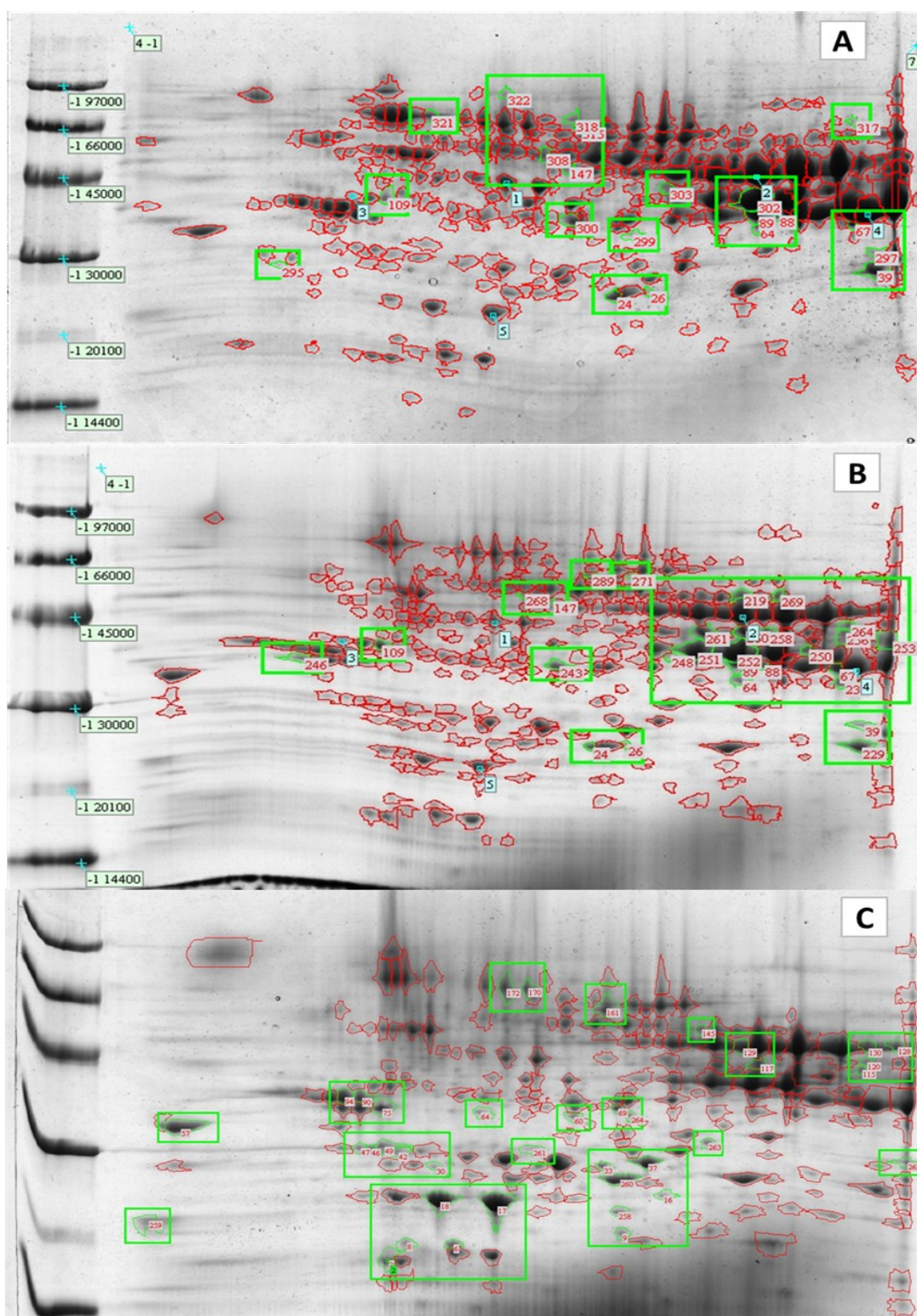


FIGURA 3 - Proteínas diferencialmente acumuladas em 2D-PAGE. A) Géis-2D mostrando o perfil do proteoma e os spots numerados correspondentes as DEPs identificadas nas seguintes condições: A) amônio anaerobiose; B) nitrato anaerobiose e C) nitrato aerobiose.

Na comparação 1 foram detectados 59 DAPs considerando a razão entre os *spots* do cultivo em nitrato em anaerobiose pelo cultivo em nitrato em aerobiose. Na comparação 2 foram detectados 40 DAPs considerando a razão entre os *spots* do cultivo em nitrato em anaerobiose pelo cultivo em amônio em anaerobiose. Desses, foi possível a identificação de 22 proteínas na comparação I (Tabelas 1 e 2) e 20 proteínas na comparação II (Tabelas 3 e 4).

A tabela 1 como primeira referência mostra as proteínas mais acumuladas em nitrato/aerobiose em relação ao cultivo em nitrato/anaerobiose, destacando-se as proteínas relacionadas com o metabolismo oxidativo que é induzido nesta condição. Isto mostra a consistência da análise proteômica deste trabalho. Já na tabela 2 estão listadas as proteínas mais acumuladas na condição nitrato/anaerobiose em relação a nitrato/aerobiose, com destaque para as duas enzimas da via do metabolismo central do nitrogênio. Neste caso, a proteína glutamato desidrogenase, apesar de ter sido comum nas duas condições, foi cinco vezes mais acumulada em anaerobiose do que em aerobiose, enquanto a glutamina sintase foi acumulada significativamente apenas em anaerobiose. Esses dados enriquecem os resultados de crescimento na qual a velocidade específica de crescimento no meio com nitrato é 40% maior em anaerobiose do que na presença de oxigênio em diversas fontes de carbono. Além de corroborar com dados de expressão gênica ainda não publicados pelo nosso grupo, na qual mostra a alta expressão do gene *GDH1* em anaerobiose quando comparado a condição aeróbica.

A tabela 3 como segunda referência lista proteínas mais acumuladas em amônio/anaerobiose que não constituem processos ou mecanismos biológicos característicos em relação ao crescimento em nitrato/anaerobiose. Por outro lado,

quando se avalia na tabela 4 as proteínas acumuladas em nitrato/anaerobiose em relação a amônio/anaerobiose, verifica-se uma tendência no metabolismo do piruvato pelo ciclo de Krebs mesmo em anaerobiose, o que pode representar maior acetil-coA e conseqüentemente de α -cetoglutarato para suprir a demanda biossintética de glutamato e glutamina sugerido pelo acúmulo em nitrato/anaerobiose de suas enzimas geradoras (Tabela 2).

4-Conclusão parcial

Esses dados de proteômica corroboram tendência desta levedura pelo metabolismo oxidativo e, conseqüentemente, pela geração de biomassa em detrimento ao metabolismo fermentativo, que impõe uma alta demanda pela produção de glutamato e glutamina. E isto fica mais evidente quando a fonte de nitrogênio disponível no meio é o nitrato. Em anaerobiose a eventual maior produção desses compostos está intimamente relacionada com a maior produção de biomassa do que em aerobiose, e isto vai ao encontro da preferenciabilidade dos diferentes aminoácidos por esta levedura em aerobiose e em anaerobiose, como mostrado no capítulo 1 desta tese. O nitrato parece ter papel importante como acceptor de elétrons na ausência de oxigênio como mostrado no capítulo 2 desta tese, explicando, mesmo que de maneira parcial, o maior crescimento celular em anaerobiose. Isto pode se dar pela produção de glutamato como sugerido pelo acúmulo de glutamato desidrogenase (Tabela 2) talvez pela sua isoforma 2 que é dependente de NADH, como sugerido pela co-expressão dos genes *GDH1* e *GDH2* mostrado no capítulo 1 desta tese. Isto explicaria a baixa produção de glicerol durante o crescimento anaeróbico desta levedura.

Tabela 1 - Proteínas de *Dekkera bruxellensis* mais acumuladas na condição de nitrato aerobiose na comparação I. As anotações dos DEPs foram obtidas por espectrometria de massa- MALDO ToF/ToF e analisadas via PMF

Spot	Ratio	ANOVA	Proteína	ID UniProt	Score	%	Mobs - Mcal	plobs - plcal
2*	1,85	3,9E-02	Zinc finger protein ypr022c	I2K0D6	53	9	9422 - 61838	5,05 - 8,81
6*	2,57	1,6E-02	Asparaginyl-trna synthetase (Fragment)	I2K256	52	16	18228 - 51332	5,30 - 8,07
9*	7,29	3,1E-02	Uncharacterized protein	I2JXP4	56	19	20884 - 25325	5,93 - 6,09
16*	4,65	2,3E-02	Ph domain protein	I2JYH7	52	10	24587 - 57387	6,09 - 6,45
17*	4,52	2,9E-03	Peroxiredoxin tsa1	I2JY42	59	25	23484 - 21743	5,46 - 5,23
18*	2,96	1,9E-02	Peroxiredoxin tsa1	I2JY42	65	29	23907 - 21743	5,25 - 5,23
30*	7,09	1,7E-02	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	A2VBP6	60	18	27861 - 48784	5,23 - 9,24
33*	2,03	1,7E-02	Asparaginyl-trna synthetase	I2K256	52	12	27932 - 51332	5,86 - 8,07
37*	1,86	3,0E-02	Mitochondrial peroxiredoxin prx1	MYO1_YEAST	77	19	28219 - 25902	6,03 - 5,86
57*	2,39	4,6E-02	Asparaginyl-trna synthetase (Fragment)	I2K256	50	11	32793 - 51332	4,27 - 8,07
60*	7,87	1,1E-02	ATP synthase subunit alpha	I2JUZ8	52	9	34455 - 59240	5,75 - 9,15
69*	2,43	3,9E-02	Asparaginyl-trna synthetase (Fragment)	I2K256	52	12	35668 - 51332	5,91 - 8,07
75*	1,78	9,9E-03	Dna-(Apurinic or apyrimidinic site) lyase	I2JUZ4	53	38	35668 - 15017	5,03 - 9,76
258	Exclusivo-AERO	8,8E-03	Flavohemoprotein	I2K374	52	16	22893 - 37241	5,91 - 6,68
264	Exclusivo-AERO	1,6E-02	Protein phosphatase regulatory	I2JSA8	53	23	34626 - 25373	5,96 - 5,12
260	Exclusivo-AERO	3,5E-03	Triosephosphate isomerase	I2JZV0	51	25	26340 - 26938	5,92 - 6,21

*Spots comuns na comparação

I

Tabela 2 - Proteínas de *Dekkera bruxellensis* mais acumuladas na condição de nitrato anaerobiose na comparação I. As anotações dos DEPs foram obtidas por espectrometria de massa- MALDO ToF/ToF e analisadas via PMF

Spot	Ratio	ANOVA	Proteína	ID UniProt	Score	%	Mobs - Mcal	plobs - plcal
128*	5,1049	2,73E-02	Glutamate dehydrogenase	I2JSK0	78	15	47103 - 50395	6,76 - 7,01
198	Exclusivo-ANERO	2,79E-04	Glutamine synthetase	I2JZC1	93	20	41339 - 41701	6,42 - 6,46
205	Exclusivo-ANERO	6,52E-03	Phosphotransferase	I2JZ04	74	26	51791 - 53261	6,39 - 5,8
209	Exclusivo-ANERO	1,29E-03	Adenylosuccinate lyase	I2JW61	50	9	56546 - 55232	6,31 - 6,01
215	Exclusivo-ANERO	4,16E-02	Pyruvate dehydrogenase E1	I2JWY8	73	29	60663 - 36443	5,19 - 4,81
249	Exclusivo-ANERO	9,44E-03	Triosephosphate isomerase	I2JZV0	51	25	24715 - 26938	5,78 - 6,21

*Spots comuns na comparação I

Tabela 3 - Proteínas de *Dekkera bruxellensis* mais acumuladas na condição amônio anaerobiose na comparação II. As anotações dos DEPs foram obtidas por espectrometria de massa- MALDO ToF/ToF e analisadas via PMF

Spot	Ratio	ANOVA	Proteína	ID UniProt	Score	%	Mobs - Mcal	plobs - plcal
39*	5,38	1,8E-02	Triosephosphate isomerase	I2JZV0	140	51	25522 - 26938	6,83 - 6,21
89*	1,85	2,7E-02	Alcohol dehydrogenase	I2JSF0	49	25	38243 - 37665	6,38 - 6,65
297	Exclusivo-NH4	1,1E-03	Nut2p	I2JWI4	58	44	28449 - 16245	6,84 - 5,36
302	Exclusivo-NH4	1,7E-06	Fructose-bisphosphate aldolase	I2JTP7	56	19	40583 - 39786	6,36 - 6,08
308	Exclusivo-NH4	1,9E-02	Phosphotransferase	I2K3Z7	124	25	60696 - 54447	5,54 - 5,59
321	Exclusivo-NH4	7,3E-03	Heat shock protein 70	I2K1X5	50	13	81132 - 71860	5,14 - 5,26

*Spots comuns na comparação II

Tabela 4 - Proteínas de *Dekkera bruxellensis* mais acumuladas na condição nitrato anaerobiose na comparação II. As anotações dos DEPs foram obtidas por espectrometria de massa- MALDO ToF/ToF e analisadas via PMF

Spot	Ratio	ANOVA	Proteína	ID UniProt	Score	%	Mobs	-	Mcal	plobs	-	plcal
26*	7,99	8,1E-03	Triosephosphate isomerase	I2JZV0	52	20	25101	-	26938	5,85	-	6,21
67*	1,85	3,7E-02	Cbs and pb1 domain-containing protein	I2JUJ0	50	8	35718	-	50931	6,60	-	8,99
88*	3,84	2,5E-02	Uncharacterized protein	I2JUV4	49	14	36226	-	28415	6,33	-	5,12
109*	3,69	4,9E-02	Pyruvate dehydrogenase	I2JWY8	88	26	39621	-	36443	4,99	-	4,81
219*	4,90	3,0E-02	Phosphotransferase	I2JZ04	135	31	52339	-	53261	6,26	-	5,8
229	Exclusivo-NO ₃	1,1E-03	Triosephosphate isomerase	I2JZV0	99	25	23917	-	26938	6,84	-	6,21
239	Exclusivo-NO ₃	9,1E-03	40s ribosomal protein	I2JVQ6	111	40	33515	-	28400	6,62	-	7,77
243	Exclusivo-NO ₃	4,9E-04	Inorganic pyrophosphatase	I2JXL8	54	17	36056	-	32068	5,61	-	5,54
250	Exclusivo-NO ₃	7,9E-03	Fructose-bisphosphate aldolase	I2JTP7	70	22	38789	-	39786	6,49	-	6,08
251	Exclusivo-NO ₃	4,6E-03	Fructose-bisphosphate aldolase	I2JTP7	76	24	38425	-	39786	6,10	-	6,08
252	Exclusivo-NO ₃	7,9E-05	40s ribosomal protein	I2JUC3	50	32	38065	-	12926	6,24	-	9,48
253	Exclusivo-NO ₃	1,5E-02	Acetohydroxyacid reductoisomerase	I2JYT8	55	18	40376	-	42113	6,79	-	9,01
260	Exclusivo-NO ₃	2,3E-03	Gtp cyclohydrolase ii	I2JYE4	53	18	42126	-	35610	6,27	-	5,96
269	Exclusivo-NO ₃	5,9E-03	Phosphotransferase	I2JZ04	74	26	51791	-	53261	6,39	-	5,8

*Spots comuns na comparação II

5-Referências

- Blomqvist, J., Eberhard, T., Schnürer, J., Passoth, V., 2010. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. Applied microbiology and biotechnology 87, 1487-1497.
- Blomqvist, J., Nogue, V.S., Gorwa-Grauslund, M., Passoth, V., 2012. Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic conditions. Yeast 29, 265-274.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72, 248-254.
- Castro Parente, D., Vidal, E.E., Leite, F.C., de Barros Pita, W., de Moraes, M.A., Jr., 2015. Production of sensory compounds by means of the yeast *Dekkera bruxellensis* in different nitrogen sources with the prospect of producing cachaca. Yeast 32, 77-87.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M., 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatic 21(18):3674–6.
- de Barros Pita, W., Leite, F.C.B., de Souza Liberal, A.T., Simões, D.A., de Moraes, M.A., 2011. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. Antonie van Leeuwenhoek, 1-9.
- De Barros Pita, W., Tiukova, I., Leite, F.C.B., Passoth, V., Simões, D.A., Moraes, M.A., 2013. The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. Yeast.
- Jouhten, P., Rintala, E., Huuskonen, A., Tamminen, A., Toivari, M., Wiebe, M., Ruohonen, L., Penttilä, M., Maaheimo, H., 2008. Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A. BMC Syst Biol 2, 60.
- Kushnirov, V.V., 2000. Rapid and reliable protein extraction from yeast. Yeast 16, 857-860.
- Leite, F.C., Basso, T.O., Pita Wde, B., Gombert, A.K., Simoes, D.A., de Moraes, M.A., Jr., 2013. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. FEMS Yeast Res 13, 34-43.
- Neto, A.G.B., Pestana-Calsa, M.C., de Moraes, M.A., Calsa, T., 2014. Proteome responses to nitrate in bioethanol production contaminant *Dekkera bruxellensis*. Journal of proteomics 104, 104-111.
- Pacheco, C.M., Pestana-Calsa, M.C., Gozzo, F.C., Mansur Custodio Nogueira, R.J., Menossi, M., Calsa Junior, T., 2013. Differentially delayed root proteome responses to salt stress in sugar cane varieties. Journal of proteome research 12, 5681-5695.
- Reis, A.L.S., Damilano, E.D., Menezes, R.S.C., de Moraes Jr, M.A., 2016. Second-generation ethanol from sugarcane and sweet sorghum bagasses using the yeast *Dekkera bruxellensis*. Industrial Crops and Products 92, 255-262.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. Analytical chemistry 68, 850-858.

ANEXO B - YEAST AUTHOR GUIDELINES

Manuscript Submission Yeast operates an online submission and peer review system that allows authors to submit articles online and track their progress via a web interface. Please read the remainder of these instructions to authors and then click <http://mc.manuscriptcentral.com/yeast> to navigate to the Yeast online submission site. IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal in the past year it is likely that you will have had an account created.

All papers must be submitted via the online system.

File types. Preferred formats for the text and tables of your manuscript are DOC (.doc) or RTF (.rtf). Figures should be provided in TIFF (.tiff) or EPS (.eps) format. LATEX USERS: For reviewing purposes you should upload PDF file of the manuscript that you have generated from your source files. You must use the File Designation "Main Document" from the dropdown box.

REVISION SUBMISSION

The files uploaded at this stage should be of sufficient quality for publication. Therefore the authors should provide:

- The manuscript text in Word format. Tables must be on separate pages after the reference list and must be provided in editable format, ie not embedded.
- Figures should be uploaded as separate figure files in high-resolution TIFF or EPS format.

Manuscript style. The language of the journal is English. 12-point type in one of the standard fonts: Times, Helvetica, or Courier is preferred. It is not necessary to double-line space your manuscript. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate figure files.

- During the submission process you must enter the full title, short title of up to 70 characters and names and affiliations of all authors. Give the full address, including email, telephone and fax, of the author who is to check the proofs.
- Include the name(s) of any **sponsor(s)** of the research contained in the paper, along with **grant number(s)**.
- Enter an **abstract** of up to 250 words for all articles. An abstract is a concise summary of the whole paper, not just the conclusions, and is understandable without reference to the rest of the paper. It should contain no citation to other published work.
- Include up to six **keywords** that describe your paper for indexing purposes.

The text should generally be divided into: Introduction; Materials and Methods; Results and Discussion; References; Tables, Figure Legends. Please avoid section numbering.

Major reviews will be commissioned, but minor reviews and original research papers are solicited, together with any other reports, letters or announcements of potential interest to the readers of the journal. There is no restriction on length,

although manuscripts may be returned for shortening at the discretion of the editor.

Commercial literature should be sent to Editorial Office. Book Reviews should be submitted via the online system.

Nomenclature. When using genetic nomenclature authors should follow the guidelines laid down in Cherry, JM. 1998. Genetic Nomenclature Guide *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in Genetics* : S.10-S.11 (available for download at http://www.yeastgenome.org/sgdpub/Saccharomyces_cerevisiae.pdf). Authors naming a new gene or renaming an old gene are asked to use the Gene Registry at the Saccharomyces Genome Database: <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/registry/geneRegistry>. Authors should use yeast names consistent with Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*, Third Edition, Cambridge University Press.

Abbreviations. All abbreviations must be defined in full in the first instance.

Reference style. The APA systems of citing sources should be used in all submissions. Citations should indicate the author's last name and the date, in parenthesis, within the text of the paper. **For reviews only**, references should be cited by number in the text. The reference list should be ordered alphabetically and numbered in sequence. Hence references in the text will not be in numerical sequence. All references must be complete and accurate. Online citations should include date of access. If necessary, cite unpublished or personal work in the text but do not include it in the reference list. References should be listed in the following style:

Cooper T.G., & Sumrada R. (1975). Urea transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 121:571-576.

Spencer J.F.T, Spencer D.M., & Smith A.R.W. (Eds). (1984). *Yeast Genetics: Fundamental and Applied Aspects*. Springer-Verlag: Godalming; 121-124.

Dart E.C., Pioli D., & Atherton K.T. (1981). Genetic engineering. In *Essays in Microbiology*, Norris JR, Richmond MH. (eds). John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester; 311-332.

Illustrations. Supply each illustration on a separate page, with the lead author's name, the figure number and the top of the figure indicated. Tints are not acceptable; lettering must be of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction, and consistent within each figure and set of figures. Where a key to symbols is required, please include this in the artwork itself, not in the figure legend. Supply artwork at the intended size for printing. The artwork must be sized to the text width of 76 mm (1 column) and 156 mm (2 column).

Colour Policy. Illustrations where **colour** is essential to the biological meaning (e.g. pigmented colonies, FISH, or microarray datasets) will be published at no cost to the author. Non-essential **colour** will be printed in black and white, but may be published in colour if part of the cost (£200 for each page containing a colour illustration) is borne by the authors. If colour illustrations are supplied as files in either TIFF or EPS format, they will be used in the online PDF of the article at no cost to the authors, even if the illustration is printed in black and white in the journal. The PDF will appear on the *Wiley Online Library* site.

SPECIAL SECTIONS

Yeast contains two special sections in which short communications in the designated areas may be published. Such communications will undergo a rapid review process.

1. Sequencing Reports

Sequence data may be published rapidly with little accompanying commentary beyond the precise location of the sequenced region within its chromosome. Sequence submissions must comply with the rules laid down in the section on Nucleic Acid Sequences above. The publication of single gene sequences is not encouraged unless accompanied by extensive experimental data on function.

Apart from the sequence of an individual gene, the nucleotide sequence will only be published as supplementary information. Rather, authors should provide a detailed 'features table' with co-ordinates.

The format of sequences should be kept simple, being confined to nucleotides and amino acids. Important regions should be highlighted by nucleotide sequence number in an accompanying legend

Accepted Articles. Accepted Articles is a Wiley Blackwell service whereby peer reviewed, accepted articles or abstracts are published online as and when they are ready, prior to their ultimate inclusion in a print or online issue and without having been copy-edited or typeset. This service has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers immediately after acceptance. Readers should note that articles published within Accepted Articles have been fully refereed, but should not be considered the version of record. Wiley Blackwell cannot be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in these articles; nor do the views and opinions expressed necessarily reflect those of Wiley Blackwell.

EarlyView. EarlyView is Wiley's exclusive service presenting individual, complete, peer-reviewed articles as soon as they are ready before the release of the compiled print issue.

Dual Use. *Yeast* expects that all authors will conform to the National Science Advisory Board for Biosecurity (NSABB) guidelines for Dual Use Life Sciences Research..

Note to NIH Grantees. Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Electronic Enhancement/Supporting Information. Data that are (i) not amenable to presentation in a traditional print format, (ii) of interest primarily to specialists and do not require Journal page space, or (iii) particularly useful to the community in electronic (downloadable) form can be published online as supporting information hosted within *Wiley Online Library*.

Further Information. For accepted manuscripts the publisher will supply proofs to the main author prior to publication for checking. This stage is to be used only to correct errors that may have been introduced during the production process. Prompt return of the corrected proofs, preferably within two days of receipt, will minimise the risk of the paper being held over to a later issue. Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Further offprints and copies of the journal may be ordered. There is no page charge to authors.

Editorial Office

The *Yeast* Editorial Office may be contacted at
Wiley Blackwell, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK
Email: andrea.reynolds@wiley.com
Fax: 44 (0)1865 714591

ANEXO C - GLUTAMINE: A MAJOR PLAYER IN NITROGEN CATABOLITE REPRESSION IN THE YEAST *Dekkera bruxellensis*

Antonie van Leeuwenhoek
DOI 10.1007/s10482-017-0888-5



ORIGINAL PAPER

Glutamine: a major player in nitrogen catabolite repression in the yeast *Dekkera bruxellensis*

Danielli Batista Bezerra Cajueiro · Denise Castro Parente ·
Fernanda Cristina Bezerra Leite · Marcos Antonio de Moraes Junior ·
Will de Barros Pita

Received: 14 February 2017 / Accepted: 10 May 2017
© Springer International Publishing Switzerland 2017

Abstract In the present work we studied the expression of genes from nitrogen central metabolism in the yeast *Dekkera bruxellensis* and under regulation by the Nitrogen Catabolite Repression mechanism (NCR). These analyses could shed some light on the biological mechanisms involved in the adaptation and survival of this yeast in the sugarcane fermentation process for ethanol production. Nitrogen sources (N-sources) in the form of ammonium, nitrate, glutamate or glutamine were investigated with or without the addition of methionine sulfoximine, which inhibits the activity of the enzyme glutamine synthetase and releases cells from NCR. The results showed that

glutamine might act as an intracellular sensor for nitrogen availability in *D. bruxellensis*, by activating NCR. Gene expression analyses indicated the existence of two different GATA-dependent NCR pathways, identified as glutamine-dependent and glutamine-independent mechanisms. Moreover, nitrate is sensed as a non-preferential N-source and releases NCR to its higher level. After grouping genes according to their regulation pattern, we showed that genes for ammonium assimilation represent a regulon with almost constitutive expression, while per-mease encoding genes are mostly affected by the nitrogen sensor mechanism. On the other hand, nitrate assimilation genes constitute a regulon that is primarily subjected to induction by nitrate and, to a lesser extent, to a repressive mechanism by preferential N-sources. This observation explains our previous reports showing that nitrate is co-consumed with ammonium, a trait that enables *D. bruxellensis* cells to scavenge limiting N-sources in the industrial substrate and, therefore, to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in this environment

D. B. B. Cajueiro · D. C. Parente · F. C. B. Leite ·
M. A. de Moraes Junior · W. de Barros Pita
Interdepartmental Research Group in Metabolic
Engineering, Recife, PE 50760-901, Brazil

W. de Barros Pita
Department of Antibiotics, Recife, PE 50760-901, Brazil

M. A. de Moraes Junior
Department of Genetics, Federal University of
Pernambuco, Recife, PE 50760-901, Brazil

F. C. B. Leite
Department of Biology, Federal Rural University of
Pernambuco, Recife, PE 52171-900, Brazil

W. de Barros Pita (✉)
Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de
Pernambuco, Artur de Sá, Cidade Universitária, Recife,
PE 50740520, Brazil
e-mail: will.barros.pita@pq.cnpq.br

Keywords GATA · Gene expression · Methionine sulfoximine · Nitrate assimilation · Nitrogen metabolism

Introduction

Since we first showed that *Dekkera bruxellensis* is present at high counts in yeast populations from sugarcane industrial fermentation in Brazil (De Souza

ANEXO D - CURRÍCULO LATTES ATUALIZADO (2013- ATUAL)

Denise Castro Parente

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Denise Castro Parente

Formação acadêmica/titulação

- 2013** Doutorado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Metabolismo fermentativo da levedura *Dekkera bruxellensis* em função da disponibilidade de oxigênio
Orientador: Marcos Antônio de Moraes Júnior
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2011 - 2013** Mestrado em Ciências Biológicas.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO E ORGANOLÉPTICO DA LEVEDURA *Dekkera bruxellensis* VISANDO À ELABORAÇÃO DE CACHAÇAS DIFERENCIADAS, Ano de obtenção: 2013
Orientador: Marcos Antônio de Moraes Júnior
Co-orientador: Esteban Espinosa Vidal
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
- 2005 - 2009** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade de Pernambuco - Campus Petrolina, UPE-FFPP, Brasil
Título: Pesquisa sobre casos notificados de hanseníase em Petrolina-PE no período de 2005-2008
Orientador: Maria Helena Gomes dos Santos

Formação complementar

- 2013 - 2013** Extensão universitária em PCR em Tempo Real: Princípios Básicos e Aplicações. (Carga horária: 60h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

- CAJUEIRO, DANIELLI BATISTA BEZERRA; **PARENTE, DENISE CASTRO**; LEITE, FERNANDA CRISTINA BEZERRA; DE MORAIS JUNIOR, MARCOS ANTONIO; DE BARROS PITA, WILL
Glutamine: a major player in nitrogen catabolite repression in the yeast *Dekkera bruxellensis*. ANTONIE VAN LEEUWENHOEK INTERNATIONAL JOURNAL OF GENERAL AND MOLECULAR MICROBIOLOGY. , v.110, p.19 junho 2017 - , 2017.

2. **PARENTE, DENISE CASTRO**; VIDAL, ESTEBAN ESPINOSA; LEITE, FERNANDA CRISTINA BEZERRA; DE BARROS PITA, WILL; DE MORAIS, MARCOS ANTONIO

Production of sensory compounds by means of the yeast *Dekkera bruxellensis* in different nitrogen sources with the prospect of producing cachaça. Yeast (Chichester, England. Print). , v.32, p.n/a - n/a, 2014.

3. BARROS PITA, WILL; **SILVA, DENISE CASTRO**; SIMÕES, DIOGO ARDAILLON; PASSOTH, VOLKMAR; MORAIS, MARCOS ANTONIO

Physiology and gene expression profiles of *Dekkera bruxellensis* in response to carbon and nitrogen availability. Antonie van Leeuwenhoek (Gedrukt). , v.104, p.855 - 868, 2013.

Artigos aceitos para publicação

1. **PARENTE, DENISE CASTRO**; CAJUEIRO, DANIELLI BATISTA BEZERRA; MORENO, IRINA CHARLOT PEÑA; LEITE, FERNANDA CRISTINA BEZERRA; DE BARROS PITA, WILL; DE MORAIS, MARCOS ANTONIO.

On the catabolism of amino acids in the yeast *Dekkera Bruxellensis* and the implications to industrial fermentation processes. YEAST. , 2018.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **PARENTE, D. C.**; ESPINISA VIDAL, E.; , Leite, F.C.B ; PITA, W. B.; Morais Junior, M.A.

Produção de compostos sensoriais através da levedura *Dekkera bruxellesis* em diferentes fontes de nitrogênio na perspectiva da produção de cachaça In: XII CURSO DE VERÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, 2015, Ribeirão Preto.

Anais do XII CURSO DE VERÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR. , 2015.

2. **PARENTE, D. C.**; SILVA, J. M.; , Leite, F.C.B ; SIMOES, D. A.; DE MORAIS, MARCOS ANTONIO

The anaerobic growth of GDB248 *Dekkera bruxellensis* strain is increased in the presence of nitrate as nitrogen source In: 5ª Jornada Sul Americana de Biologia e Biotecnologia de Leveduras, 2015, Recife.

5ª Jornada Sul Americana de Biologia e Biotecnologia de Leveduras. , 2015.

3. BATISTA, D.; **PARENTE, D. C.**; SPINELLI, K. C. M.; BARROS PITA, WILL; Morais Junior, M.A.

“EFEITO NA EXPRESSÃO GÊNICA DA ASSIMILAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM DEKKERA BRUXELLENSIS In: XX encontro de genética do Nordeste, 2014, Campina Grande.

Anais do XX Encontro de Genética do Nordeste. , 2014.

4. SILVA, J. M.; **PARENTE, D. C.**; BATISTA, D.; SPINELLI, K. C. M.; Morais Junior, M.A.

UTILIZAÇÃO DE JOGOS DIDÁTICOS COMO ESTRATÉGIA DE REVISÃO DE ASSUNTOS RELACIONADOS À GENÉTICA NO ENSINO MÉDIO. In: XX encontro de genética do Nordeste, 2014, Campina Grande.

Anais do XX Encontro de Genética do Nordeste. , 2014.

5. DE BARROS PITA, WILL; ELSZTELIN, C.; **SILVA, D. C.**; PASSOTH, V.; SIMOES, D. A.; Morais Junior, M.A.

. Nitrogen Metabolite Repression in the yeast *Dekkera bruxellensis* is dependent on the nitrogen source and oxygen availability In: Yeast 2013, 2013, Frankfurt.

Anais Yast 2013. , 2013.

6. **PARENTE, D. C.**; Morais Junior, M.A.

Metabolismo fermentativo da levedura *Dekkera bruxellensis* em função da disponibilidade de Oxigênio In: III Jornada de pós-Graduação em Genética, 2013, Recife.

Anais da III Jornada de pós-Graduação em Genética. , 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. MORENO, I. C. P.; **PARENTE, D. C.**; MENDONCA, A. A.; DE BARROS PITA, WILL; Morais Junior, M.A.

INFLUÊNCIA DA DISPONIBILIDADE DE NITROGÊNIO NA EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO CENTRAL DA LEVEDURA INDUSTRIAL DEKKERA BRUXELLENSIS In: XXI Encontro de Genética do Nordeste (ENGINE), 2016, RECIFE.

XXI Encontro de Genética do Nordeste (ENGINE) ANAIS 2016. , 2016.

2. **PARENTE, D. C.**; , Leite, F.C.B ; BARROS PITA, WILL; Morais Junior, M.A.

METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS PELA LEVEDURA DEKKERA BRUXELLENSIS In: Encontro de Genética do Nordeste (ENGINE), 2016, Recife.

Encontro de Genética do Nordeste (ENGINE) ANAIS 2016. , 2016.