Brief Contents

Chapter 1 *General introduction* **11**

Chapter 2 C. halophila *kinetic growth assessment* **35**

Chapter 3 *Sugar and polyol transport characterization* **73**

Chapter 4 *General metabolism* **123**

Chapter 5 *Regulation of intracellular ion content* **175**

Chapter 6 *Final discussion and future perspectives* **193**

Chapter 7 *Material and methods* **199**

References **207**

Contents

Abstract ..... *vii*

Resumo ..... *viii*

Publications ..... *x*

Chapter 1

General introduction

1.1. Yeasts and Non-Conventional Yeasts (NCY) **12**
1.2. Eukaryotic models **12**
1.3. Studies on salt stress in yeasts and their applications **13**
1.4. The yeast *Candida halophila* (syn *versatilis*) CBS 4019 ..... **14**
1.5. Stress definition, osmotic stress, salt stress and other concepts **15**
1.6. Effects of salt in water structure and in water availability **16**
1.7. Salt stress response in yeasts **17**
1.7.1. Microbial strategies for survival under salt stress **18**
1.7.2. Phases of the osmotic response **19**
1.8. Signaling salt stress response **21**
1.9. Transcriptional and proteomic response of *Saccharomyces cerevisiae* to salt stress **23**
1.10. Salt stress resistance levels **30**
1.11. Scope and main goals of this thesis **33**

Chapter 2

C. halophila *kinetic growth assessment*

2.1. Introduction **37**
2.1.1. Nutritional requirements particularly important in yeasts **37**
2.1.2. The roles of intracellular accumulation of polyols in yeasts **40**
2.1.3. Meaning of trehalose and acetate production in yeasts **44**
2.1.4. Growth and assimilation tests pattern of *C. halophila* **46**

2.2. Results and discussion **48**
2.2.1. Growth studies in single carbon sources **48**
2.2.2. Growth studies in carbon sources mixtures **52**
2.2.3. Growth studies in the presence of salt **54**
2.2.3.1. Growth at different initial pH **59**
2.2.4. Intracellular solutes **64**
2.2.5. O_2 consumption and CO_2 production rates **69**

2.3. Concluding remarks **71**

Chapter 3

Sugar and polyol transport characterization

3.1. Introduction **75**
- **3.1.1.** Cell wall, plasma membrane and cytoskeleton composition in yeasts **75**
- **3.1.2.** Regulation of yeasts cell volume under salt stress **79**
- **3.1.3.** Plasma membrane transport mechanisms in yeasts **80**
  - **3.1.3.1.** Glucose transport **88**
  - **3.1.3.2.** Polyol transport **89**

3.2. Results and discussion **91**
- **3.2.1.** *C. halophila* cell volume under salt stress **91**
- **3.2.2.** Transport systems in *C. halophila* **94**
  - **3.2.2.1.** Glucose uptake study **94**
  - **3.2.2.2.** Glycerol uptake study **102**
  - **3.2.2.3.** Mannitol uptake study **116**

3.3. Concluding remarks **121**

Chapter 4

General metabolism

4.1. Introduction **125**
- **4.1.1.** Glycolysis **125**
- **4.1.2.** Metabolic alternatives for intracellular pyruvate **127**
- **4.1.3.** The tricarboxylic acid cycle (TCA) **131**
- **4.1.4.** Pentose phosphate pathway **134**
- **4.1.5.** Ethanol metabolism **136**
- **4.1.6.** Sugar alcohol metabolism **137**
  - **4.1.6.1.** Glycerol metabolism **138**
    - **4.1.6.1.1.** Glycerol synthesis **138**
    - **4.1.6.1.2.** Glycerol utilization **141**
  - **4.1.6.2.** Mannitol metabolism **143**
    - **4.1.6.2.1.** Mannitol synthesis **143**
    - **4.1.6.2.2.** Mannitol utilization **146**
- **4.1.7.** Futile cycles in fungi **148**
- **4.1.8.** Redox balance in the metabolism of yeasts **151**

4. 2. ***Results and discussion*** **156**
- **4.2.1.** Enzyme activities of main metabolic pathways **156**
- **4.2.2.** Enzyme activities of main metabolic pathways in salt-stress grown cells **159**
- **4.2.3.** Glycerol metabolic pathways in salt-stress grown cells **163**
- **4.2.4.** Mannitol metabolic pathways **167**
- **4.2.5.** Pyridine nucleotides balance under salt stress **169**

4.3. Concluding remarks **172**

Chapter 5

Regulation of intracellular ion content

5.1. Introduction **177**
5.1.1. Physiological role of ions in the life of microorganisms **177**
5.1.2. Intracellular concentrations of monovalent cations and chloride annion in microorganisms **178**
5.1.3. Ion toxicity in yeasts and its targets **180**
5.1.4. Transport of ions **181**
5.1.4.1. Hydrogen **182**
5.1.4.2. Potassium **182**
5.1.4.3. Sodium **184**
5.1.4.4. Chloride **185**
5.1.5. Ion homeostasis strategies for salt stress tolerance **186**
5.2. Results and discussion **187**
5.2.1. Internal Na^+ and K^+ concentrations during salt stress in of *C. halophila* **187**
5.3. Concluding remarks **190**

Chapter 6

Final discussion and perspectives

6.1. Physiological and biochemical behavior of *C. halophila* under salt stress **194**
6.2. Future perspectives **197**

Chapter 7

Material and Methods

7.1. Yeast strain and growth conditions **200**
7.2. Preparation of intracellular soluble fractions **200**
7.3. Estimation of sugar and other compounds concentration **200**
7.4. Determination of internal pH **200**
7.5. Determination of H^+-ATPase activity **200**
7.6. Measurement of substrate initial uptake rates **201**
7.7. Measurement of intracellular volume **201**
7.8. Measurement of radiolabelled glycerol and mannitol accumulation ratios **202**
7.9. Measurement of respiratory and fermentative fluxes **202**
7.10. Preparation of cell-free extracts **202**
7.11. Enzyme assays **203**
7.12. Verification of the in vitro NaCl toxicity over glyceraldehyde-3P-dehydrogenase **204**
7.13. Estimation of intracellular concentration of reduced and oxidized

enzyme co-factors **204**
7.14. Estimation of Na^+ and K^+ intracellular concentration **205**

Salt stress response of the extremely halotolerant yeast *Candida halophila (syn C. versatilis)* CBS 4019. Physiological and biochemical studies.

❑ Abstract

Halotolerant yeasts have been described as being able to grow in the presence of salt concentrations as high as 4 M NaCl, but yeasts can survive environments with higher salt concentrations like in salines. On the other hand, physiological mechanisms underlying extreme salt-tolerance in yeasts are still poorly understood. For this reason we selected *Candida halophila* from a salt stress resistance survey performed on 42 different yeast species, as a potentially good model to unveil some of the physiological mechanisms underlying long-term extreme tolerance to salt. The physiological studies here presented were performed in yeast cells surviving under heavy stress, *i.e.,* growing on synthetic medium in the presence of increasing salt concentrations up to close to the limits of salt solubility (4 to 5 M). These studies included (1) the determination of kinetic growth parameters, (2) the measurement of intracellular accumulation of osmolyte and other compounds, (3) glucose, glycerol and mannitol plasma membrane transport characterization, (4) the determination of intracellular volume and pH, (5) the study of glycerol and mannitol pathways, (6) the measurement of fermentative and respiratory fluxes, (7) *in vitro* assays of several enzymes from different central metabolic pathways like glycolysis or Krebs cycle between others, (8) the measurement of intracellular bulk redox equivalents and (9) the determination of sodium and potassium intracellular concentrations.

C. halophila grows better in the presence of a certain amount of salt than in its absence, although, unlike halophilic bacteria, it does not depend on the presence of salt to survive. It is a slow growing yeast, not severely affected by salt, but rather by external pH under stress. When growing on glucose as carbon source, mannitol and glycerol were produced. Glycerol is the osmolyte, since its accumulation increased exponentially with increasing concentrations of sodium chloride in the media. Mannitol is produced in cells using either carbon source tested, yet, its physiological role is still unknown. Data suggest that both glycerol and mannitol are actively transported. On the other hand, glucose is transported by facilitated diffusion. While both active transport V_{max} were not affected by growth under stress, glucose facilitated diffusion V_{max} was. Internal pH was constant during growth at all initial pH/salt combinations. H^+-ATPase activity was not affected by salt. Furthermore, we have shown that *C. halophila* maintains and even increases slightly intracellular volume when cultivated under stress, though it decreases significantly upon the same degrees of stress shock.

Glycerol and mannitol pathways were not under glucose repression but still metabolically regulated. In particular, glycerol kinase and mitochondrial glycerol 3-P dehydrogenase activities were not detected, suggesting glycerol dissimilation operates through dihydroxyacetone. Glycerol-3P-dehydrogenase (Gpdp) is the key enzyme in glycerol production. Unlike Gpd1p and Gpd2p from *S. cerevisiae*, in *C. halophila* it proved to be able to use either co-factor, being NADPH preferred during growth under salt. This co-factor interchange ability, an increased fermentation rate and mannitol pathway activity, are suggested to contribute to redox stability as found.

Our results show a generalised increase in enzyme expression under stress-growth conditions, though enzymes *per se* were not salt-tolerant *in vitro*. This increase had a correspondence in respiratory and fermentative fluxes increment. Consistently, intracellular sodium was low and potassium high. Potassium concentrations closely correlate with growth rates in the presence of salt and thus can be considered as a requirement for growth. In view of the results from this work, the concept of halophily and its applicability to yeasts is discussed.

Resposta ao stresse salino na levedura halotolerante extrema *Candida halophila (syn C. versatilis)* CBS 4019. Estudos fisiológicos e bioquímicos

❑ Resumo

Leveduras halotolerantes foram descritas como capazes de se multiplicar na presença de elevadas concentrações, até 4M de NaCl. No entanto, as leveduras podem sobreviver em concentrações de sal superiores como as que se encontram nas salinas. Os mecanismos fisiológicos subjacentes a esta tolerância extrema são pouco conhecidos ou compreendidos. Por esta razão seleccionámos a levedura *Candida halophila* de um rastreio envolvendo 42 espécies de leveduras, como uma boa candidata para estudar alguns dos mecanismos responsáveis pela resistência ao sal de longa duração. Os estudos fisiológicos apresentados nesta tese foram realizados em levedura cultivada em condições de stresse salino extremo, *i.e.*, em meio mineral na presença de concentrações crescentes de NaCl até perto do seu limite de solubilidade (4 a 5M). Estes estudos incluíram (1) a determinação de parâmetros de crescimento, (2) a identificação e quantificação dos osmolitos e outros compostos acumulados intracelularmente, (3) a caracterização bioquímica do transporte transmembranar do glicerol, do manitol e da glucose, (4) a determinação de variações de volume e pH intracellular, (5) o estudo das vias metabólicas associadas ao glicerol e ao manitol, bem como (7) dos fluxos fermentativo e respiratório e (8) ensaios *in vitro* de enzimas seleccionadas como representantes de vias metabólicas essenciais para a célula, como do ciclo de Krebs ou da glicólise, entre outras. Para além disso, este estudo englobou ainda a medição dos equivalentes redox globais (9) e a quantificação intracelular dos iões sódio e potássio (10).

C. halophila cresce melhor na presença de uma quantidade moderada de NaCl do que na sua ausência. No entanto esta levedura não se comporta como uma bactéria halófila, visto que não requer a presença de sal para sobreviver. É uma levedura de crescimento lento, que, uma vez na presença de sal se torna mais sensível a variações de pH da cultura. *C. halophila* cultivada em glucose produz glicerol e manitol. O glicerol, tal como em outras leveduras, tem o papel de osmolito, dado que a sua concentração intracelular se mostrou proporcional à concentração externa de sal. Por seu lado, o manitol diminui a sua concentração com o aumento da concentração externa de sal, não estando ainda esclarecido o seu papel fisiológico. Ambos estes metabolitos são transportados por transporte mediado sendo no caso do glycerol do tipo simporte com protões, cuja V_{max} não se mostrou sensível ao cultivo em condições de stresse. Foi também determinado que a glucose era transportada por difusão facilitada, cuja V_{max}, ao contrário dos transportes de glicerol e manitol, se mostrou sensível ao cultivo em sal. Por seu lado, a actividade da H^+-ATPase foi também medida, tendo-se verificado que, em concomitância com o caso dos simportadores, não era afectada pelo crescimento em stresse salino.

O pH intracellular de *C. halophila* cultivada em concentrações crescentes de NaCl/pH variável manteve-se constante. Por seu lado, o volume intracelular mostrou um ligeiro aumento em células cultivadas em sal por comparação a células cultivadas sem sal. O mesmo não se verificou quando as células foram sujeitas a choque, ao qual se verificou, à semelhança de outras leveduras, uma diminuição acentuada.

As enzimas das vias associadas à produção e ao consumo do glicerol e do manitol mostraram ser constitutivamente expressas. No caso particular do glycerol não se conseguiu detectar a actividade da via de consumo que corresponde à actividade da glycerol cinase e da glycerol 3-P desidrogenase mitocondrial, mas antes, foi detectada actividade correspondente a uma glicerol desidrogenase e dihidroxiacetona cinase, o que indica ser esta a via em funcionamento em *C. halophila* para a dissimilação do glicerol. Já no caso da sua síntese, as actividades enzimáticas detectadas sugerem que esta se processe através da produção de glycerol 3-P como intermediário metabólico. Em particular há a salientar o facto de haver especificidades de co-factor pouco usuais. A glicerol 3-P desidrogenase

citoplasmática (Gpdp) mostou ser capaz de utilizar tanto NADH como em *S. cerevisiae* como NADPH, sendo o NADPH o co-factor preferido em condições de stresse. Esta versatilidade de utilização de co-factor, em conjunto com a presença de um ciclo constitutivo de produção e consumo de manitol, sugerem uma regulação do potencial redox citoplasmático mais eficiente que em *S. cerevisiae*, como que à semelhança do papel desempenhado pelas transhidrogenases em algumas bactérias. O comprovativo deste equilíbrio foi obtido com a medição dos equivalentes redox intracelulares em células cultivadas em sal.

Os resultados obtidos com os ensaios enzimáticos *in vitro* mostraram generalizadamente um aumento da actividade específica das enzimas com o cultivo em stresse salino. As enzymas *de per se* não são tolerantes a sal, como foi possível mostrar em variados casos. Antes, a regulação da sua expressão parece ser sujeita a um estímulo sucessivamente maior em condições de stresse acrescido. Em concordância, verificou-se que as concentrações intracelulares de sódio em *C. halophila* são muito baixas, mesmo em células cultivas em 4M de NaCl. Verificou-se que para concentrações crescentes de sal, entre 2 e 3 M se observa uma viragem das concentrações dos dois iões, sendo que o sódio ultrapassa o valor do potássio. As concentrações de potássio variam em percentagem idêntica à variacão das taxas específicas de crescimento, verificando-se ser a manutenção da concentração intracelular de potássio um requerimento indispensável ao crescimento.

Tendo em conta os resultados, é discutido no âmbito desta tese o conceito de halofilia e a sua aplicabilidade às leveduras.

Publications

Papers published within the thesis context

- **Lages, F., Silva-Graça, M. and Lucas, C.** (1999) Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiology* 1451,2577-2585

- **Silva-Graça, M. and Lucas, C.** (2003) Physiological studies on long-term adaptation to salt stress in the extremely halotolerant yeast *Candida versatilis* CBS 4019 (*syn. C. halophila*). *FEMS Yeast Research* 3,247-260

- **Silva-Graça, M., Neves, L. and Lucas, C.** (2003) Outlines for the definition of halotolerance/halophily in yeasts: *Candida versatilis* (*halophila*) CBS 4019 as the archetype? *FEMS Yeast Research* 3,347-362

Publications in conference proceedings

- **Silva-Graça, M. and Lucas, C.** (1998) *Candida halophila*: Contribution to the portrait of an halophilic yeast. 19th ISSY-Yeast in the production and spoilage of Food and beverages.

Other publications

- **Oliveira, R., Lages, F., Silva-Graça, M. and Lucas, C**. (2003) Fps1 channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*: artefacts and re-definitions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1613,57-71