

MICROCALORIMETRIA: UMA TÉCNICA APLICÁVEL AO ESTUDO DO DIAUXISMO DA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Daniel Rettori e Pedro L. O. Volpe

Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - CP 6154 - 13083-970 - Campinas - SP

Recebido em 12/2/99; aceito em 7/5/99

MICROCALORIMETRY: A USEFUL TECHNIQUE FOR STUDYING THE DIAUXISM OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. In this work we first introduce the reader to the basic concepts of biology, bioenergetics and biochemistry, concerning the area of cell biology. Then we explain what diauxism is and an example of this phenomenon, applied to *S. cerevisiae*, is presented. Finally, thermograms obtained by microcalorimetry, from *S. cerevisiae* that undergo diauxism, are discussed from a biochemical point of view.

Keywords: diauxism; glucose repression; microcalorimetry; *S. cerevisiae*.

Apresentaremos inicialmente alguns conceitos básicos de biologia. Em seguida, uma introdução à bioenergética celular e à bioquímica da *Saccharomyces cerevisiae*. O fenômeno do diauxismo será abordado na seqüência e, por fim, iremos correlacionar este diauxismo com termogramas obtidos pela técnica de microcalorimetria.

INTRODUÇÃO: CONCEITOS BÁSICOS DE BIOLOGIA

As primeiras observações de organismos unicelulares ao microscópio, relatadas com desenhos e descrições precisas, foram feitas pelo naturalista holandês Antonie van Leeuwenhoek. Numa carta dirigida à Sociedade Real de Londres em 9 de outubro de 1676, ele escreveu:

"No ano de 1675 descobri seres vivos na água da chuva que havia ficado, por apenas alguns dias, num pote de barro vitrificado por dentro."

Ele chamou estes seres vivos de "animálculos"¹. Por volta da mesma época Robert Hooke foi quem chamou de "células" às unidades microscópicas que havia observado em amostras de cortiça.

Duzentos anos se passaram até que os pesquisadores Theodor Schwann e Matthias Schleiden reconheceram que a célula era a unidade básica da vida, uma unidade que podia se dividir, enfim, uma unidade que possuía vida².

Atualmente, a célula é definida como a unidade básica estrutural e funcional de todos os organismos vivos, unidade esta que pode se reproduzir exatamente^{3,4}. As células podem ser classificadas em dois grupos: *procariontes* ou *eucariontes*. A principal diferença entre ambos é a existência ou não de uma organela que contém o DNA da célula. Quando esta estrutura está presente, diz-se que a célula possui núcleo e que, portanto, é uma célula eucariótica. Caso contrário, a célula é procariótica e o seu DNA se encontra mais ou menos livre no citoplasma⁵.

Antes de classificar a *Saccharomyces cerevisiae*, continuaremos com mais algumas definições. Microrganismos são organismos que existem na forma de células livres ou como "clusters" (agrupamentos) de células que somente podem ser observados mediante o uso de um microscópio. As células microbianas são distintas das células animais e vegetais porque estas últimas são incapazes de sobreviver na natureza a não ser como partes de um organismo multicelular⁶. O reino Fungi é constituído pelos microrganismos eucarióticos, não fotossintéticos, que possuem

parede celular rígida. Por fim, as *leveduras* são organismos unicelulares pertencentes ao reino Fungi. Desta forma, fica fácil dizer que a *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura^{7,8}.

BIOENERGÉTICA

Na Figura 1 temos o perfil característico do crescimento de um microrganismo unicelular. A fase A, chamada de "lag", corresponde a uma fase de adaptação fisiológica das células ao novo meio de cultura no qual elas foram introduzidas. Nesta fase o metabolismo das células está ativo (sintetizando enzimas e coenzimas) de modo a criar as condições para que elas possam se dividir. Portanto, na fase "lag" as células não estão se dividindo. A fase B é conhecida como a fase exponencial de crescimento porque o número de células aumenta exponencialmente com o tempo. A fase C é a fase estacionária, onde o número de células viáveis se mantém constante, isto é, são iguais os números correspondentes às células que nascem e as que morrem. A fase D é a fase de morte pois as condições do meio vão se tornando cada vez mais impróprias para as células sobreviverem^{9,10}.

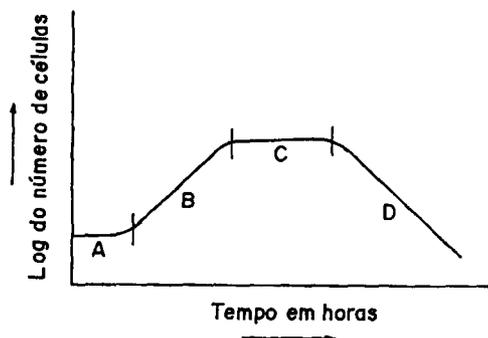


Figura 1. Curva típica de crescimento celular. (A) fase "lag"; (B) fase exponencial de crescimento; (C) fase estacionária; (D) fase de morte. (Extraído e modificado da fig. 7-5 da ref. 9).

O metabolismo de uma célula é a soma do seu *catabolismo* e *anabolismo* e depende do meio de cultura utilizado e da fase (A, B, C ou D) na qual a célula se encontra. Grande parte dos processos metabólicos celulares requerem ATP, o qual, em geral, é produzido à custa da oxidação de uma fonte de carbono (e.g., glicose, sacarose)¹¹. A fase exponencial de crescimento, por exemplo, é

danielre@iqm.unicamp.br, volpe@iqm.unicamp.br.

uma fase de intenso metabolismo celular porque, para crescer exponencialmente, é preciso muita energia, isto é, a célula necessita produzir grandes quantidades de ATP à custa de um grande consumo de uma fonte de carbono. Este processo catabólico (produção de ATP a partir de uma fonte de carbono) é exotérmico^{12,13} e o balanço deste com os demais processos catabólicos e anabólicos que ocorrem no interior da célula também é exotérmico. Em outras palavras, uma célula libera calor quando está ativa metabolicamente^{14,15}, logo, a microcalorimetria é uma técnica que pode ser utilizada no estudo da bioenergética celular.

Alguns exemplos quantitativos: um eritrócito (hemácia) produz em torno de 0,01 pW (10^{-12} J s⁻¹) de calor; uma bactéria *Klebsiella aerogenes* libera entre 0,5 a 5 pW; um linfócito (um tipo de glóbulo branco) 2 pW; um fibroblasto de pele humana, 40 pW¹⁶. Um microcalorímetro detecta efeitos térmicos na faixa de microwatts (μ W)¹⁷, portanto, para detectar o calor produzido por uma suspensão de células é necessário que esta contenha no mínimo um milhão delas. Facilmente consegue-se preparar uma suspensão com mais de 1 milhão de células por mililitro, por isso, a microcalorimetria é uma técnica promissora no estudo dos fenômenos térmicos e energéticos associados a sistemas celulares.

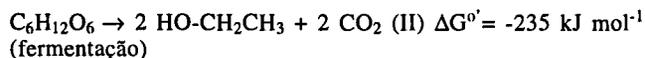
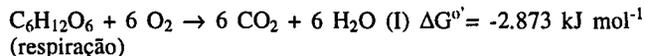
BIOQUÍMICA

O catabolismo da glicose pela *Saccharomyces cerevisiae*, com o objetivo de produzir ATP, pode se dar pela *via aeróbia* ou *anaeróbia* (ver Figura 2). A *via glicolítica* é comum às duas e, ao chegar no piruvato, o leitor poderá se perguntar: o que determina a via a ser seguida? Evidentemente que na ausência de O₂ a única possibilidade é a via anaeróbia mas, mesmo na presença de oxigênio, a via anaeróbia também é a escolhida se a concentração de glicose estiver acima de um valor chamado *concentração crítica* (C_{crit})^{18,19,20}. A *S. cerevisiae* faz uso exclusivo da via aeróbia somente em concentrações abaixo da C_{crit}.

A explicação deste comportamento está no fenômeno chamado de *repressão por glicose*, que, como veremos mais adiante, é o responsável pelo diauxismo. Na presença de concentrações acima da C_{crit}, a glicose reprime a expressão dos genes que codificam *enzimas do ciclo de Krebs*, *enzimas da cadeia respiratória* e *estruturas mitocondriais*^{18,21}. Desta forma,

encontrando-se reduzida a atividade mitocondrial na *S. cerevisiae*, a via a ser seguida pelo piruvato é a anaeróbia com formação de etanol. Por outro lado, em concentrações de glicose abaixo da C_{crit} e na presença de O₂, o piruvato seguirá a via aeróbia porque, ao não se encontrarem reprimidos os genes em questão, a *S. cerevisiae* possuirá alta atividade mitocondrial.

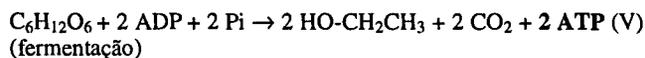
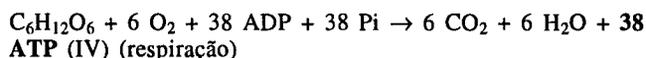
As equações químicas simplificadas do catabolismo da glicose, pelas vias aeróbia (respiratória) e anaeróbia (fermentativa), se encontram a seguir²²:



As variações de energia livre nos mostram claramente que, para quantidades iguais de glicose consumida, a respiração é a via capaz de realizar uma maior quantidade de trabalho. Em outras palavras, um maior número de moléculas de ATP podem ser sintetizadas pela via respiratória. A síntese de 1 mol de ATP demanda 31 kJ de energia²³:



Em teoria, uma molécula de glicose poderia fornecer 92 moléculas de ATP pela via respiratória e apenas 7 pela via fermentativa. Na prática são produzidas 38 moléculas de ATP pela via aeróbia e apenas 2 pela anaeróbia²⁴.



As reações (IV) e (V) são exotérmicas ($\Delta H < 0$)¹⁴, o que significa que, se células de uma suspensão estão respirando ou fermentando, o fluxo de calor liberado (dQ/dt) pode ser detectado por um microcalorímetro. Quanto maior for o catabolismo celular, isto é, quanto maior for o número de moléculas de glicose consumidas

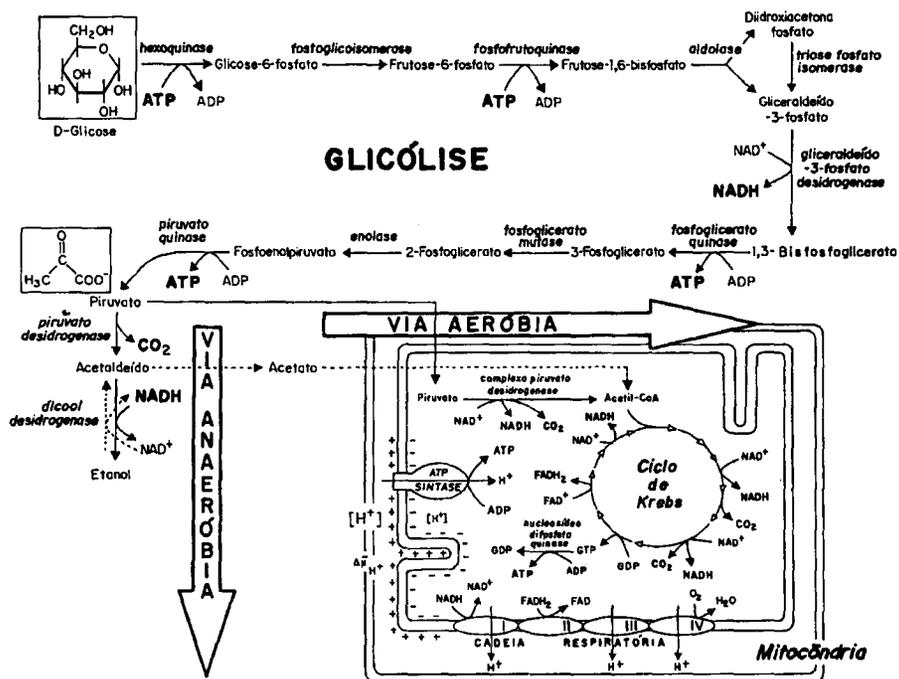


Figura 2. Diagrama do catabolismo da glicose em células de *S. cerevisiae*.

por unidade de tempo, maior será a energia liberada e conseqüentemente maior será o efeito térmico registrado. O principal inconveniente da técnica é a falta de especificidade dos resultados experimentais. Em outras palavras, se diferentes processos bioquímicos estiverem ocorrendo ao mesmo tempo, e isto sempre acontece, a microcalorimetria somente consegue "enxergar" o efeito térmico resultante da combinação dos diferentes processos.

DIAUXISMO

Começemos pela etimologia da palavra: *di*, do grego, significa *duplo*; *aux*, também do grego, *crecimento*; *ismo*, o *processo de*²⁵. Portanto, quando nos referimos ao *diauxismo da Saccharomyces cerevisiae*, estamos considerando o fenômeno responsável por fazer a levedura apresentar dois perfis de crescimento.

Isto pode ser facilmente visto na Figura 3. A *curva X* (correspondente ao peso seco da levedura) cresce até a exaustão da glicose (*curva Cg*). Durante esta primeira fase de crescimento, o *quociente de respiração* (QR = moles de CO₂ formados/moles de O₂ consumidos) se mantém alto (*curva QR*), indicando que a glicose é praticamente toda "canalizada" para a via fermentativa, gerando etanol (*curva Ce*). Em seguida pode-se observar um pequeno patamar na *curva X*, evidenciando o cessamento da proliferação celular. Concomitantemente, inicia-se o consumo do etanol pela via aeróbia (pois o QR cai). Nesta respiração do etanol (ver via indicada pelas linhas tracejadas na Figura 2), o precursor do acetyl-CoA é o acetato e não o piruvato. O reinício do crescimento celular ocorre pouco tempo depois, caracterizando assim o *diauxismo*.

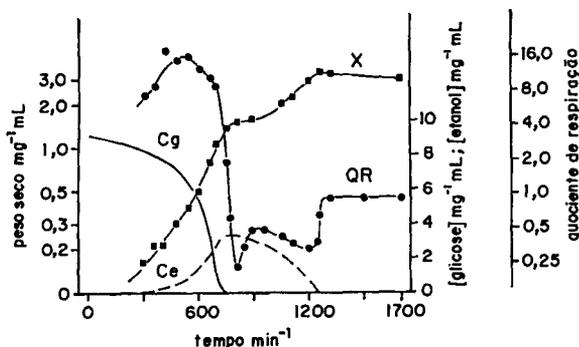


Figura 3. Crescimento em batelada da *S. cerevisiae* sob condições aeróbias em meio de cultura contendo 0,92% de glicose. Curva X (biomassa determinada pelo método do peso seco); curva Cg (concentração de glicose); curva Ce (concentração de etanol); curva QR (quociente de respiração). (Extraído e modificado da fig. 1A da ref. 26).

A *repressão por glicose* é a responsável pelo surgimento deste diauxismo. Na presença de altos níveis de glicose (acima da C_{crit}), os genes, que codificam as enzimas necessárias para constituir a via aeróbia, estão reprimidos. Assim, a glicose é fermentada produzindo etanol. O mecanismo de repressão baseia-se na interação entre um *signal*, decorrente da glicose, e a(s) proteína(s) regulatória(s) da expressão gênica, ativando proteínas repressoras ou inibindo proteínas ativadoras²⁷. Ao esgotar-se a glicose, estes genes são desreprimidos e criam-se as condições para que agora a fonte de carbono presente (o etanol - produzido pela própria *S. cerevisiae*) seja "canalizado" pela recém reconstituída via aeróbia (linhas tracejadas da Figura 2)¹⁹. O leitor poderá perguntar: a concentração de glicose do meio cai para valores abaixo da C_{crit} antes de se esgotar, portanto, quando isto acontece, a *S. cerevisiae* passa a oxidar a glicose pela via aeróbia; certo? Errado, pois os valores de *concentração crítica* são em geral baixos (e.g., entre 0,09 e 0,9 % em massa de glicose)¹⁸ e, num experimento em batelada, as células acabam degradando a glicose remanescente pela via anaeróbia antes que elas possam recuperar

a atividade mitocondrial. Os experimentos que fazem uso da técnica de *cultura contínua* são os que permitem constatar a respiração da glicose pela *S. cerevisiae*²⁸.

O diauxismo também pode ser observado quando a *S. cerevisiae* se defronta com duas fontes de carbono diferentes no meio de cultura (e.g., glicose mais galactose). Iremos explorar este assunto no próximo tópico.

A MICROCALORIMETRIA "ENXERGANDO" O DIAUXISMO

Veremos agora como se dá a produção de calor pela *S. cerevisiae* quando primeiro ela fermenta a glicose e depois respira o próprio etanol produzido.

A Figura 4 mostra que, concomitantemente à queda acentuada da concentração de glicose (*curva Cg*) e aumento da concentração do etanol (*curva Ce*), há uma primeira banda de potência com máximo no tempo $\approx 12,5$ horas (*curva dQ/dt*). O catabolismo da glicose pela via anaeróbia é exotérmico e o balanço deste processo com os processos anabólicos também é exotérmico³⁰. Assim, pode-se interpretar esta banda de potência como sendo o calor resultante liberado pelo balanço do catabolismo anaeróbio da glicose e o conseqüente anabolismo. Uma segunda banda significativa de potência (com máximo em ≈ 19 horas) surge quando a concentração de etanol começa a diminuir devido à respiração do mesmo. A biomassa (*curva X*) retoma o crescimento e fica caracterizado assim o diauxismo da levedura. Portanto, este diauxismo fica evidenciado pelas duas bandas de potência que aparecem no termograma (*curva potência-tempo*) da Figura 4.

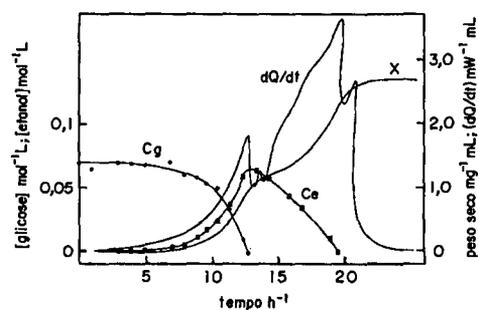


Figura 4. Crescimento em batelada da *S. cerevisiae* sob condições aeróbias em meio de cultura contendo glicose. Curva X (biomassa determinada pelo método do peso seco); curva Cg (concentração de glicose); curva Ce (concentração de etanol); curva dQ/dt (produção de calor em unidades de potência). (Extraído e modificado da fig. 2 da ref. 29).

O diauxismo também pode ocorrer quando a *S. cerevisiae* é posta para crescer, em condições anaeróbias, num meio de cultura contendo dois açúcares diferentes.

Os termogramas das Figuras 5, 6 e 7 mostram duas bandas de potência cada. A primeira banda (nos 3 casos) é resultante do catabolismo da glicose, enquanto que a segunda, do catabolismo do segundo açúcar presente no meio. Novamente a *repressão por glicose* explica porque o segundo açúcar não pode ser catabolizado juntamente com a glicose. No caso da glicose + sacarose (Figura 5), o monossacarídeo entra diretamente na via glicolítica, resultando na primeira banda de potência com máximo em ≈ 7 h, enquanto que a sacarose precisa ser hidrolisada a glicose e frutose para que depois ambos os açúcares sejam catabolizados. Após esta hidrólise, a glicose entra na via glicolítica e a frutose mais ATP (na presença de hexoquinase - a enzima que catalisa a primeira etapa da via glicolítica)³² formam a frutose-6-fosfato que já é um intermediário da via glicolítica (ver Figura 2). Mas para formar glicose e frutose a partir da sacarose, faz-se necessária a presença da enzima cha-

mada *invertase*³³ (ou β -D-frutofuranosidase). Em altas concentrações de glicose, a expressão do gene que codifica a invertase é reprimida³⁴, portanto, a sacarose é catabolizada somente quando a glicose é exaurida. Assim, no termograma, a primeira banda corresponde ao catabolismo da glicose e a segunda, ao da sacarose. O leitor poderá se fazer a seguinte pergunta: a glicose produzida na hidrólise da sacarose é capaz novamente de causar repressão? A resposta é não, porque esta glicose é catabolizada logo após a sua formação (i.e., a glicose produzida nesta hidrólise não supera nem atinge a C_{crit} para causar repressão).

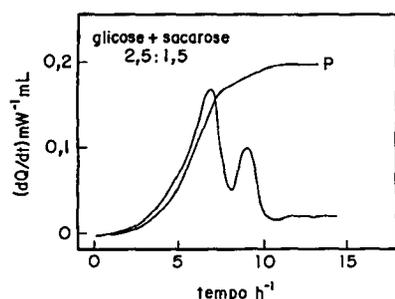


Figura 5. Termograma do crescimento em batelada da *S. cerevisiae* sob condições anaeróbias em meio de cultura contendo 0,25% de glicose + 0,15% de sacarose. Curva P (densidade óptica que é proporcional à biomassa). (Extraído e modificado da fig. 2C da ref. 31).

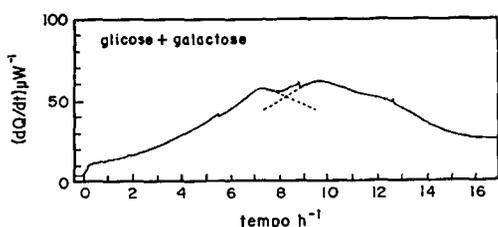


Figura 6. Termograma do crescimento em batelada da *S. cerevisiae* sob condições anaeróbias em meio de cultura contendo quantidades iguais de glicose e galactose. (Extraído e modificado da fig. 11 da ref. 14).

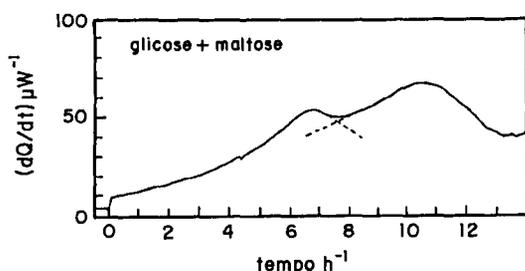


Figura 7. Termograma do crescimento em batelada da *S. cerevisiae* sob condições anaeróbias em meio de cultura contendo quantidades iguais de glicose e maltose. (Extraído e modificado da fig. 10 da ref. 14).

A galactose também precisa ser transformada num intermediário da via glicolítica para poder ser catabolizada. Isto é feito pela *via de Leloir*, na qual a galactose é transformada em glicose-6-fosfato³⁵ (ver Figura 8). As enzimas envolvidas nesta via somente são sintetizadas por *indução*, isto é, a *S. cerevisiae* somente vai sintetizá-las se a galactose estiver presente. Por outro lado, devido à *repressão por glicose*, os genes responsáveis pela síntese destas enzimas não são transcritos na presença de glicose. Na presença de ambos os monossacarídeos (glicose e galactose), a *repressão* se sobrepõe à *indução*. Por isto, a primeira banda de potência no termograma da Figura 6 é devida ao catabolismo da glicose e a segunda banda, ao da galactose.

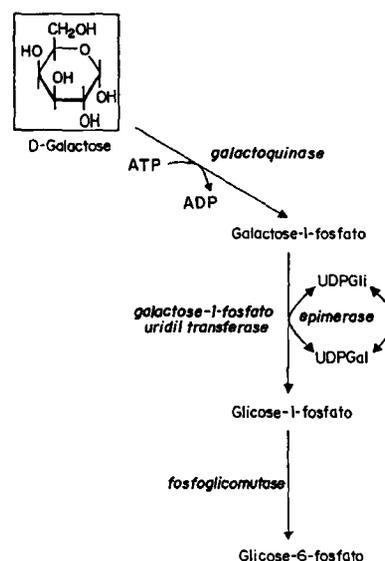


Figura 8. Conversão da galactose em glicose-6-fosfato (via de Leloir). (Extraído e modificado da fig. 3-22 da ref. 36).

Analogamente ao caso da sacarose, a maltose precisa ser hidrolisada a duas moléculas de glicose para que estas sejam catabolizadas pela via glicolítica. A maltase catalisa esta hidrólise³³ e, da mesma forma que no caso da galactose, a maltose induz a biossíntese da maltase¹⁹. Na presença de glicose (em alta concentração) e maltose, a *S. cerevisiae* não produz maltase devido à *repressão por glicose*²⁷. Aqui novamente, a *repressão* se sobrepõe à *indução*. Logo, o termograma da Figura 7 mostra uma primeira banda de potência devido ao catabolismo da glicose e uma segunda devido ao da maltose.

A Figura 9 mostra dois termogramas sobrepostos. Cada um corresponde à fermentação, pela *S. cerevisiae*, do respectivo açúcar na ausência de outros. Pode-se concluir que o tempo de indução, pela galactose, para sintetizar as enzimas da *via de Leloir*, é menor que o tempo de indução, pela maltose, para sintetizar a maltase.

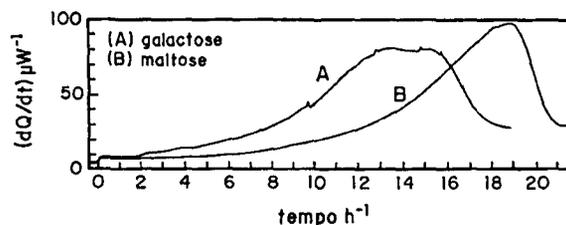


Figura 9. Termograma do crescimento em batelada da *S. cerevisiae* sob condições anaeróbias em meio de cultura contendo quantidades iguais de galactose e maltose. (Extraído e modificado da fig. 9 da ref. 14).

Outros dois exemplos de diauxismo da *S. cerevisiae* podem ser observados nos termogramas das Figuras 10 e 11. Da mesma forma que a glicose, a frutose e a manose são açúcares de rápida fermentação capazes também de promover o fenômeno da *repressão por glicose*³⁷. Desta maneira, o microcalorímetro consegue detectar o diauxismo quando no meio de cultura se encontram disponíveis pelo menos um açúcar de rápida fermentação e um de lenta. Nas duas figuras, a primeira banda de potência corresponde ao catabolismo do respectivo açúcar de rápida fermentação enquanto que a segunda banda, ao catabolismo da maltose.

Um dado interessante que diz respeito à proporção dos açúcares é exemplificado pelo termograma da Figura 11. A maltose está em maior quantidade que a manose (proporção 3:1) e isto

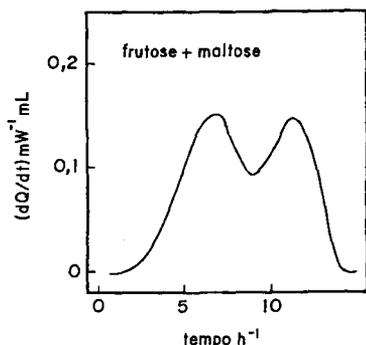


Figura 10. Termograma do crescimento em batelada da *S. cerevisiae* sob condições anaeróbias em meio de cultura contendo frutose e maltose. (Extraído e modificado da fig. 3 da ref. 29).

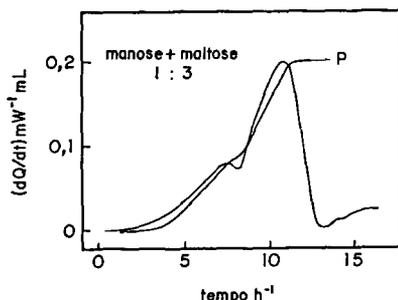


Figura 11. Termograma do crescimento em batelada da *S. cerevisiae* sob condições anaeróbias em meio de cultura contendo 0,1% de manose + 0,3% de maltose. Curva P (densidade óptica que é proporcional à biomassa). (Extraído e modificado da fig. 2B da ref. 31).

se reflete no termograma através de uma maior área sob a curva do açúcar mais abundante.

CONCLUSÃO

A técnica de microcalorimetria é uma ferramenta de grande potencial para o estudo da produção e absorção de calor (na faixa dos $\mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$) de sistemas biológicos em geral. Neste trabalho abordaram-se especificamente aspectos da bioenergética da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

O diauxismo da *S. cerevisiae* é detectado pela microcalorimetria com mais resolução que outras técnicas, como por exemplo, a densidade óptica (ver Figuras 5 e 11). Por outro lado, o calor detectado é o resultado do balanço energético das reações bioquímicas que ocorrem dentro da célula, e este é o motivo que faz a técnica ser não-específica. Logo, torna-se imprescindível acoplar diversas outras técnicas à microcalorimetria, a fim de entender melhor a energética do sistema biológico em estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. Também agradecemos ao professor Nelson Durán pela leitura crítica deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Pelczar, M., Reid, R.; Chan, E. C. S.; *Microbiologia*, volume 1; Editora McGraw-Hill do Brasil; São Paulo, 1980; p. 23.

2. Darnell, J.; Lodish, H.; Baltimore, D.; *Molecular Cell Biology*, second edition; Scientific American Books, Inc.; New York, 1990; p. 3,4.
3. Martin, E. A.; *A Concise Dictionary of Biology*; Oxford University Press; Oxford, 1990; p. 41.
4. Martin, E. A.; *Concise Medical Dictionary*, fourth edition; Oxford University Press; Oxford, 1994; p. 109.
5. Brock, T. D.; Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J.; *Biology of Microorganisms*, seventh edition; Prentice-Hall, Inc.; Englewood Cliffs, 1994; p. 47-49, 82.
6. Ibidem ref. 5; p. 1.
7. Ibidem ref. 1; p. 7-13.
8. Ibidem ref. 5; p. 843-852.
9. Ibidem ref. 1; p. 134-136.
10. McCormick, T. S. R.; *The Essentials of Microbiology*; Research and Education Association; Piscataway, 1995; p. 42-44.
11. Ibidem ref. 2; p. 583-586.
12. Tinoco Jr., I.; Saver, K.; Wany, J. C.; *Physical Chemistry, Principles and Applications in Biological Sciences*; Prentice-Hall, Inc.; Upper Saddle River, 1996; p. 160.
13. Laidler, K. J.; *Physical Chemistry with Biological Applications*; The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc.; Menlo Park, 1978; p. 248.
14. Volpe, P. L. O.; *Quím. Nova* 1997, 20, 528.
15. Marsh, K. N.; O'Hare, P. A. G.; *Solution Calorimetry, Experimental Thermodynamics*, volume IV; Blackwell Scientific Publications; London, 1994; p. 270.
16. James, A. M.; *Thermal and Energetic Studies of Celular Biological Systems*; IOP Publishing Limited; Bristol, 1987; p. 4.
17. Volpe, P. L. O.; *Quím. Nova* 1987, 10, 122.
18. Barnett, J. A.; *Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.* 1976, 32, 171.
19. Entian, K. D.; Barnett, J. A.; *Trends Biochem. Sci.* 1992, 17, 506.
20. Alexander, M. A.; Jeffries, T. W.; *Enzyme Microb. Technol.* 1990, 12, 2.
21. Porro, D.; Smeraldi, C.; Martegani, E.; Ranzi, B. M.; Alberghina, L.; *Biotechnol. Prog.* 1994, 10, 193.
22. Ibidem ref. 18; p. 168.
23. Chang, R.; *Physical Chemistry with Applications to Biological Systems*; Macmillan Publishing Co., Inc.; New York, 1977; p. 251.
24. Lamprecht, I.; *Biological Microcalorimetry*; ed. Beezer, A. E.; Academic Press Inc.; London, 1980; p.52.
25. Borror, D. J.; *Dictionary of Word Roots and Combining Forms*; Mayfield Publishing Company; Mountain View, 1988; p. 16, 32, 49.
26. Beck, C.; Meyenburg, H. K.; *J. Bacteriol.* 1968, 56, 479.
27. Gancedo, J. M.; *Eur. J. Biochem.* 1992, 206, 297.
28. Fiechter, A.; Fuhrmann, G. F.; Käppeli, O.; *Adv. Microb. Physiol.* 1981, 22, 127.
29. Schaarschmidt, B.; Lamprecht, I.; *Thermochim. Acta* 1978, 22, 333.
30. Meier-Schneiders, M.; Grosshans, V.; Busch, C.; Eigenberger, G.; *Appl. Microbial, Biotechnol.* 1995, 43, 431.
31. Schaarschmidt, B.; Lamprecht, I.; *Rad. and Environm. Biophys.* 1977, 14, 153.
32. Ibidem ref. 18; p. 173.
33. Rose, A. H.; Harrison, J. S.; *The Yeasts*, volume 3; Academic Press Inc.; London, 1970; p. 157.
34. Ibidem ref. 18; p. 190.
35. Ibidem ref. 18; p. 175.
36. Moat, A. G.; Foster, J.W.; *Microbial Physiology*, second edition; John Wiley & Sons, Inc.; New York, 1988; p. 151.
37. Klein, C. J. L.; Olsson, L.; Nielsen, J.; *Microbiology* 1998, 144, 13.