

**RESISTÊNCIA DA LEVEDURA *ZYGOSACCHAROMYCES BAILII* A
AMBIENTES EXTREMOS: ESTUDOS SOBRE TOXICIDADE E UTILIZAÇÃO
DO ÁCIDO ACÉTICO E OUTROS ÁCIDOS MONOCARBOXÍLICOS**

Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

UNIVERSIDADE DO MINHO

Braga

1995

RESISTÊNCIA DA LEVEDURA *ZYGOSACCHAROMYCES BAILII* A
AMBIENTES EXTREMOS: ESTUDOS SOBRE TOXICIDADE E UTILIZAÇÃO
DO ÁCIDO ACÉTICO E OUTROS ÁCIDOS MONOCARBOXÍLICOS

Dissertação apresentada à Universidade
do Minho, para prestação de provas de
Doutoramento em Ciências

Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

UNIVERSIDADE DO MINHO

BRAGA

1995

AGRADECIMENTOS

O trabalho de investigação desenvolvido e apresentado nesta dissertação foi realizado no Departamento de Biologia da Universidade do Minho.

Ao finalizar este trabalho quero manifestar o meu sincero reconhecimento:

Ao Instituto Politécnico de Bragança, que me proporcionou as condições indispensáveis à realização deste trabalho, na pessoa do seu Presidente, Professor Doutor Dionísio Gonçalves.

À Professora Doutora Cecília Leão, pelo facto de ter aceite a orientação científica destas provas de doutoramento, pela dedicação, sugestões, ensinamentos e facilidades sem limites concedidas.

À Professora Manuela Côrte-Real que orientou e acompanhou de perto a realização do trabalho experimental.

Ao Professor Doutor Virgílio Loureiro, pelo incentivo e motivação que me deu para a realização do trabalho.

À Professora Maria da Conceição Loureiro-Dias pelas críticas e sugestões na discussão do trabalho.

Aos meus colegas de laboratório e a todos os elementos do Departamento de Biologia da Universidade do Minho, agradeço o apoio e dedicação que sempre me dedicaram. Em especial, à Helena Cardoso, à Teresa Almeida e à Fernanda Lages pelo apoio amigo e desinteressado que me dispensaram.

Às Senhoras D. Armanda e D. Rosa Oliveira pelo apoio nas tarefas laboratoriais.

Ao Senhor Luis Correia que pacientemente fez a dactilografia do manuscrito, o meu reconhecimento pela competência e dedicação demonstrada.

Ao Departamento de Microbiologia do Instituto Superior de Agronomia nas pessoas do Eng^o Manuel Malfeito e da Dr^a Ana Bela fico grata pelo apoio laboratorial que recebi.

Ao Instituto Nacional de Investigação Científica agradeço a bolsa que me concedeu e à Junta Nacional de Investigação Científica o subsídio para a edição deste trabalho de tese.

Finalmente, a todos os colegas e funcionários que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização desta tese, o meu muito obrigado.

A realização do trabalho insere-se no âmbito de um projecto de investigação financiada pelo CE no âmbito do programa Air, contrato CT 93 - 0830.

ÍNDICE

	Página
SUMÁRIO	ix
SUMMARY	xiii
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 - Enquadramento e Plano Geral da Tese	1
1.2 - Transporte membranar e utilização de ácidos orgânicos fracos	3
1.2.1 - Transporte membranar	3
1.2.2 - Ácidos orgânicos como fonte de carbono e de energia.....	5
1.3 - Toxicidade de ácidos orgânicos fracos.....	8
1.4 - Leveduras de contaminação alimentar.....	14
1.5 - O caso particular de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	16
1.5.1 - Características taxonómicas	16
1.5.2 - Importância na Indústria Alimentar.....	18
CAPÍTULO 2	
EFEITOS DE ÁCIDOS FRACOS E DO ETANOL NA CINÉTICA DE CRESCIMEN- TO DE <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ISA 1025, COMPARATIVAMENTE COM <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 4072	22
2.1 - Introdução	22
2.2 - Crescimento e morte celular e sua dependência da temperatura em leveduras Breve Revisão.....	23
2.2.1 - Crescimento exponencial.....	23
2.2.2 - Morte térmica microbiana.....	26
2.2.3 - Efeitos de tóxicos nas relações de temperatura.....	30

2.3 - Material e Métodos.....	32
2.3.1 - Microrganismos	32
2.3.2 - Meios de cultura.....	32
2.3.3 - Preparação das culturas em fase exponencial.....	32
2.3.4 - Experiências de crescimento.....	33
2.3.5 - Cálculo das taxas específicas de crescimento.....	33
2.4 - Resultados.....	33
2.4.1 - Crescimento de <i>Zygosaccharomyces bailii</i> num meio com glucose - células não adaptadas.....	33
2.4.1.1 - Crescimento em função da temperatura na ausência de ácidos e de etanol.....	33
2.4.1.2 - Efeitos dos ácidos acético, propiónico, butírico, pentanóico e sórbico na taxa específica de crescimento.....	35
2.4.1.3 - Efeitos do etanol na taxa específica de crescimento em função da temperatura, em <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	41
2.4.2 - Crescimento de <i>Zygosaccharomyces bailii</i> num meio com glucose e ácido - células adaptadas.....	43
2.4.2.1 - Efeitos do ácido acético e sórbico na taxa específica de crescimento, à temperatura de 25° C.....	43
2.4.3 - Efeitos do ácido sórbico na taxa específica do crescimento, à temperatura de 25° C, em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> num meio com glucose.....	45
2.5 - Discussão	47
2.5.1 - Efeitos dos ácidos e do etanol no crescimento de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	47
2.5.2 - Análise comparativa dos efeitos dos ácidos e do etanol em <i>Zygosaccharomyces bailii</i> e em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48

CAPÍTULO 3

EFEITOS DE ÁCIDOS FRACOS E DO ETANOL NA CINÉTICA E TERMODINÂMICA DE ACTIVAÇÃO DA MORTE CELULAR DE *Zygosaccharomyces bailii*

ISA 1025, COMPARATIVAMENTE COM *Saccharomyces cerevisiae* IGC 4072 ... 51

3.1 - Introdução	51
3.2 - Material e Métodos	51
3.2.1 - Microrganismos.....	51
3.2.2 - Meios de cultura.....	51
3.2.3 - Preparação das culturas na fase exponencial.....	52
3.2.4 - Ensaios de morte celular	52
3.2.5 - Cálculo das taxas específicas de morte celular.....	52
3.2.6 - Parâmetros de activação da morte celular: teoria e cálculos	53
3.3 - Resultados.....	54
3.3.1 - Morte celular induzida por ácidos fracos e pelo etanol em de <i>Zygosaccharomyces bailii</i> células crescidas num meio com glucose - células não adaptadas	54
3.3.1.1 - Morte celular na ausência de ácidos e de etanol.....	54
3.3.1.2 - Efeitos do ácido acético na morte celular, em função do pH extracelular	55
3.3.1.3 - Efeitos dos ácidos propiónico, butírico e pentanóico na morte celular.....	59
3.3.1.4 - Efeitos do ácido sórbico na morte celular de <i>Zygosaccharomyces bailii</i> compa- rativamente com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
3.3.1.5 - Efeitos do etanol na morte celular	65
3.3.2 - Morte celular induzida por ácidos fracos em células de <i>Zygosaccharomyces bailii</i> crescidas num meio com glucose e ácido acético - células adaptadas.....	68
3.3.2.1 - Efeitos do ácido acético, a pH 3,0 e 4,0.....	68
3.3.2.2 - Efeitos do ácido sórbico, a pH 4,0.....	71
3.4 - Discussão.....	73
3.4.1 - Efeitos de ácidos fracos e do etanol nos parâmetros termodinâmicos da morte celular de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	73
3.4.2 - Análise comparativa dos efeitos dos ácidos fracos e do etanol em <i>Zygosaccharomyces</i> <i>bailii</i> e em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75

CAPÍTULO 4

EFEITOS COMBINADOS DE ÁCIDOS FRACOS E DO ETANOL NA MORTE CELULAR DE *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1025

4.1 - Introdução.....	77
4.2 - Material e Métodos.....	77
4.3 - Resultados.....	77
4.3.1 - Morte celular induzida pelos ácidos acético e sórbico na presença de etanol em células crescidas num meio com glucose - células não adaptadas.....	77
4.3.2 - Morte celular induzida pelos ácidos acético e sórbico na presença de etanol em células crescidas num meio com glucose e ácido - células adaptadas.....	80
4.4 - Discussão.....	83

CAPÍTULO 5

EFEITOS DOS ÁCIDOS ACÉTICO E PENTANÓICO NO pH INTRACELULAR E SUA CORRELAÇÃO COM OS EFEITOS NA MORTE CELULAR DE *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1025.....

5.1 - Introdução	85
5.2 - Material e Métodos	87
5.2.1 - Microrganismo e obtenção das culturas	87
5.2.2 - Determinação do pH intracelular	88
5.2.2.1 - Método	88
5.2.2.2 - Condições experimentais de determinação do pH int.....	89
5.2.2.3 - Determinação do tempo de estabilização do ácido propiónico.....	90
5.2.2.4 - Cálculo da biomassa.....	91
5.2.2.5 - Cálculo do pH intracelular	91
5.3 - Resultados.....	91
5.3.1 - Efeitos dos ácidos acético e pentanóico no pH intracelular.....	91

5.3.2 - Relação entre os efeitos dos ácidos na morte celular e na acidificação intracelular	94
5.4 - Discussão	97
CAPÍTULO 6	
EFEITOS DE ÁCIDOS FRACOS E DO ETANOL NA RESPIRAÇÃO E	
NA FERMENTAÇÃO DA GLUCOSE EM <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	
ISA 1307	99
6.1 - Introdução	99
6.1.1 - Fermentação e respiração da glucose em leveduras. Conceitos básicos	99
6.2 - Material e Métodos	106
6.2.1 - Microrganismo	106
6.2.2 - Medição das taxas de respiração e fermentação em <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ,	
mediante a utilização da técnica manométrica (Aparelho de Warburg)	106
6.2.2.1 - Técnicas manométricas - Princípios básicos	106
6.2.2.2 - Medição das taxas específicas de respiração e de fermentação	108
6.2.2.3 - Determinação da biomassa	110
6.2.2.4 - Controlos experimentais	110
6.2.2.5 - Cálculo das taxas específicas de respiração e de fermentação	111
6.3 - Resultados	112
6.3.1 - Determinação da taxa específica de respiração da glucose em função do pH	112
6.3.2 - Efeitos do etanol na respiração da glucose	113
6.3.3 - Efeitos dos ácidos acético e sórbico na respiração da glucose em função do pH extra-	
celular na ausência e presença de etanol	115
6.3.4 - Determinação da taxa específica de fermentação da glucose em função do pH	120
6.3.5 - Efeitos do etanol na fermentação da glucose	122
6.3.6 - Efeitos dos ácidos acético e sórbico na fermentação da glucose em função	
do pH extracelular na ausência e presença de etanol	123
6.3.7 - Estudo comparativo entre os efeitos do ácido acético na taxa específica de fermentação	

tação da glucose e na acidificação intracelular.....	129
6.4 - Discussão	130
6.4.1 - Efeitos dos ácidos fracos e do etanol na fermentação e respiração de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	130
6.4.2 - Análise comparativa dos efeitos dos ácidos fracos e do etanol na respiração e na fermentação da glucose em <i>Zygosaccharomyces bailii</i> e em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	132
CAPÍTULO 7	
CRESCIMENTO DE <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ISA 1307 EM SUBSTRATOS SIMPLES E MISTOS: TRANSPORTE DE ÁCIDO ACÉTICO E QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES, ÁCIDOS FRACOS, ETANOL E GLICEROL NO MEIO DE CULTURA.....	133
7.1 - Introdução	133
7.1.1 - Membranas biológicas e mecanismos de transporte.....	134
7.1.1.1 - Transporte não mediado	136
7.1.1.2 - Transporte mediado.....	138
7.1.3 - Utilização de açúcares e produção de etanol, ácido acético e glicerol em leveduras- -Breve revisão	142
7.2 - Material e Métodos	146
7.2.1 - Condições experimentais utilizadas nos ensaios de transporte.....	146
7.2.1.1 - Microrganismos.....	146
7.2.1.2 - Meios de cultura.....	147
7.2.1.3 - Preparação da suspensão de células.....	147
7.2.1.4 - Experiências de medição da velocidade inicial de movimento de protões através da membrana plasmática das células da levedura.....	147
7.2.1.5 - Experiências de medição da velocidade inicial de transporte do ácido acético radioactivo	149
7.2.1.6 - Controlo de "quenching"	151

7.2.1.7 - Determinação dos parâmetros cinéticos de transporte.....	151
7.2.2 - Condições experimentais utilizadas nos ensaios de crescimento em meios com dife- rentes fontes de carbono.....	151
7.2.2.1 - Microrganismos.....	151
7.2.2.2 - Meios de cultura.....	152
7.2.2.3 - Quantificação do crescimento celular e doseamento de glucose, etanol, ácido acético e glicerol no meio de cultura.....	152
7.2.2.4 - Preparação da amostra para injeção no HPLC.....	153
7.2.2.5 - Condições de trabalho com o HPLC.....	153
7.2.2.6 - Identificação dos componentes na análise por HPLC.....	153
7.2.2.7 - Análise quantitativa.....	153
7.3 - Resultados.....	154
7.3.1 - Transporte do ácido acético e de outros ácidos monocarboxílicos na levedura <i>Zygo- saccharomyces bailii</i> crescida num meio com 2% de glucose. Efeitos do etanol.....	154
7.3.1.1 - Transporte de ácido acético, na ausência de etanol.....	154
7.3.1.2 - Efeitos do etanol no transporte do ácido acético.....	161
7.3.2 - Rastreo de movimento de prótons associado à entrada de ácidos fracos em <i>Zygosaccharomyces bailii</i> crescida em meios com diferentes fontes de carbono.....	164
7.3.2.1 - Células crescidas com glucose ou com frutose.....	164
7.3.2.2 - Células crescidas com ácido acético.....	166
7.3.2.3 - Células crescidas com outras fontes de carbono.....	168
7.3.3 - Crescimento de <i>Zygosaccharomyces bailii</i> em substratos simples e mistos: quanti- ficação de açúcares, ácidos fracos, etanol e glicerol no meio.....	170
7.3.3.1 - Células crescidas num meio com ácido acético.....	170
7.3.3.2 - Células crescidas num meio com glucose, a pH 5,0.....	171
7.3.3.3 - Células crescidas num meio com glucose, a pH 3,0.....	173
7.3.3.4 - Células crescidas num meio com frutose, a pH 5,0.....	176
7.3.3.5 - Células crescidas num meio com frutose, a pH 3,0.....	178
7.3.3.6 - Células crescidas com fontes de carbono mistas.....	179

7.4 - Discussão.....	185
7.4.1 - Transporte de ácido acético em <i>Zygosaccharomyces bailii</i> . Efeitos do etanol.....	185
7.4.2 - Rastreamento de protões associada à entrada de ácidos fracos.....	186
7.4.3 - Crescimento de <i>Zygosaccharomyces bailii</i> em substratos simples (açúcares e ácido acético) e mistos (açúcares e ácido acético e/ou etanol).....	186
CAPÍTULO 8	
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	189
Apêndice I	
COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	198
Apêndice II	
ESTIMATIVAS DA BIOMASSA PELA DETERMINAÇÃO DO PESO SECO	201
Apêndice III	
DOSEAMENTO DA GLUCOSE (MÉTODO DA GLUCOSE - OXIDASE/PEROXIDASE).....	202
Apêndice IV	
COMPOSIÇÃO DO LÍQUIDO DE CINTILAÇÃO	203
Apêndice V	
PARÂMETROS DE ACTIVAÇÃO DA MORTE TÉRMICA: DEDUÇÃO DAS EQUAÇÕES SEGUNDO A TEORIA DAS TAXAS ABSOLUTAS DE REACÇÃO	204
Apêndice VI	
EXEMPLO DE CÁLCULO DA PERCENTAGEM (%) DE CONTRIBUIÇÃO DA FERMENTAÇÃO E DA RESPIRAÇÃO PARA O CATABOLISMO DA GLUCOSE.....	207
Apêndice VII	
CINÉTICAS DE MOVIMENTO DE H ⁺ ASSOCIADAS À ENTRADA DE ÁCIDOS FRACOS EM <i>Zygosaccharomyces bailii</i> QUANDO CRESCIDA EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO.....	209
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	218

SUMÁRIO

No presente trabalho de tese seleccionou-se, como material biológico de estudo, a levedura *Zygosaccharomyces bailii* tipicamente considerada como uma das mais perigosas na indústria alimentar dada a sua aptidão para se desenvolver em ambientes extremos. Os estudos desenvolvidos tiveram como objectivo principal contribuir para a elucidação de possíveis mecanismos subjacentes à presença daquela levedura em tais ambientes sendo dada particular atenção a meios ácidos com etanol, como os presentes em produtos alimentares e bebidas. Como referência, utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que habitualmente não sobrevive a tais condições ambientais. Nesta perspectiva, foram desenvolvidos estudos sobre os efeitos tóxicos de ácidos orgânicos fracos, na presença e ausência de etanol, na actividade metabólica da levedura *Z. bailii*. Uma parte considerável do trabalho incluiu estudos ao nível da resposta da população celular à presença destes compostos, em termos de crescimento, morte celular, respiração/fermentação da glucose, pH intracelular e sua correlação com a morte celular. Uma última vertente do trabalho contemplou estudos sobre a utilização de ácidos fracos, na presença e ausência de açúcares, incluindo abordagens preliminares sobre o transporte membranar dos ácidos.

No que diz respeito ao crescimento observou-se que a presença de qualquer um dos ácidos estudados (acético, propiónico, butírico, pentanóico e sórbico) ou de etanol induzia efeitos inibidores sobre a taxa específica do crescimento, que se acentuaram com a concentração de ácido e/ou etanol no meio de crescimento. Para cada um dos compostos, para concentrações acima dos valores correspondentes às concentrações mínimas de inibição e a temperatura constante, a cinética de inibição foi traduzida por uma relação exponencial. Os valores das constantes exponenciais de inibição aumentaram com os respectivos coeficientes de repartição lípido-tampão, enquanto que, os valores das concentrações de ácido necessárias para induzirem 50% de inibição diminuíram com a lipossolubilidade dos compostos. A dependência dos efeitos observados com a temperatura traduziu-se basicamente num deslocar das temperaturas, óptima e máxima, características da estirpe em estudo, para valores mais baixos. Estes resultados obtidos em *Z. bailii*, de um modo global qualitativamente análogos aos descritos para *S. cerevisiae* foram, no entanto, em termos quantitativos distintos. De um modo sistemático, observou-se que os valores das concentrações de ácido ou de etanol mínimas necessárias para induzir efeitos inibitórios mensuráveis na taxa específica do crescimento foram mais elevados para *Z. bailii* do que para *S. cerevisiae*. Além disso, a toxicidade dos ácidos, a

temperatura constante e quando expressa pelo parâmetro constante exponencial de inibição do crescimento, foi do mesmo modo muito mais baixa em *Z. bailii*.

No que diz respeito aos estudos de viabilidade celular foram testados os efeitos dos ácidos e do etanol em células crescidas num meio com glucose. Nestas condições de crescimento, os resultados obtidos mostraram que a presença de etanol ou de qualquer um dos ácidos, acético, propiónico, butírico, pentanóico ou sórbico, no meio extracelular induzia efeitos estimuladores na morte celular de *Z. bailii*. Em todos os casos, os gráficos de Arrhenius das taxas específicas de morte na presença de concentrações crescentes de ácido ou etanol, constituíram uma única família de rectas paralelas entre si, sem alterações significativas no valor de ΔH^\ddagger (entalpia de activação da morte celular) que se manteve num valor aproximadamente igual ao da morte térmica na ausência de ácido ou etanol. Os efeitos tóxicos reflectiram-se essencialmente nos valores de ΔS^\ddagger (entropia de activação da morte celular) que, para cada um dos compostos, aumentou linearmente com a sua concentração extracelular. Além disso, em condições isotérmicas, e em toda a gama experimental de temperaturas, a morte celular foi estimulada exponencialmente na presença de concentrações de ácidos ou de etanol acima das respectivas concentrações mínimas de estimulação. Os valores das constantes exponenciais de estimulação de cada um dos ácidos e do etanol, estavam directamente correlacionados com a lipossolubilidade dos compostos aumentando com o respectivo coeficiente de repartição lípido/tampão. Experiências de morte na presença de ácidos, a temperatura constante e a diferentes valores de pH, indicaram que o efeito estimulador era dependente do pH extracelular quando as concentrações de ácido eram expressas em ácido total. No entanto, quando as mesmas foram expressas em ácido não dissociado, os efeitos estimuladores não diferiram significativamente para os diferentes valores de pH experimentais. No que diz respeito aos efeitos conjuntos de ácido acético e sórbico na presença de etanol, não foram observados efeitos estimuladores significativos do etanol sobre a morte induzida pelos ácidos. Os valores das concentrações mínimas estimuladoras de morte obtidos para cada um dos ácidos e etanol foram superiores aos descritos para *S. cerevisiae*. Por sua vez, os valores das constantes exponenciais de estimulação foram muito mais baixos em *Z. bailii*.

Os estudos prosseguiram no sentido de elucidar os efeitos dos ácidos na taxa de fermentação e respiração da glucose. Em termos do metabolismo da glucose, a estirpe de *Z. bailii* em estudo foi capaz de respirar e fermentar a glucose, sendo o peso relativo de cada um dos processos de 25 e 75%, respectivamente. Por outro lado, a adição de ácidos ou de etanol ao meio extracelular, a temperatura e pH constantes, foi acompanhada por efeitos negativos nas taxas de fermentação e de respiração acentuando-se os efeitos com a concentração extracelular do ácido ou do etanol. Em ambos os casos, respiração ou fermentação, os efeitos inibitórios foram expressos por cinéticas exponenciais, a partir das quais se estimaram os valores das

respectivas constantes exponenciais de inibição. Em termos comparativos com o comportamento de *S. cerevisiae* verificou-se que a resposta da fermentação à presença de etanol extracelular, expressa pela constante exponencial de inibição, foi idêntica em ambas as leveduras. No entanto, no que diz respeito ao efeito do ácido acético, o valor da constante exponencial de inibição da fermentação encontrado para *Z. bailii*, foi significativamente inferior ao descrito para *S. cerevisiae*. Por sua vez, o etanol estimulou levemente os efeitos inibitórios induzidos pelos ácidos acético e sórbico na fermentação ou respiração. Os resultados indicaram ainda que a fermentação da glucose não era significativamente afectada por concentrações de ácidos para as quais o crescimento era completamente inibido.

Uma outra vertente do trabalho incidiu na elucidação da resposta de *Z. bailii* à presença de ácidos em termos de acidificação intracelular. Basicamente, observou-se que, a 25 °C, a presença de ácido acético ou pentanóico no meio extracelular não afectava o valor do pH intracelular, para concentrações que em *S. cerevisiae*, nas mesmas condições experimentais, induziam acidificação significativa do citosol. Acidificação mensurável, em *Z. bailii*, somente ocorreu a concentrações de ácido muito mais elevadas.

Na parte final deste trabalho de tese, foram desenvolvidos estudos respeitantes ao transporte e utilização de ácidos orgânicos fracos em *Z. bailii*. No que diz respeito à utilização e metabolismo dos ácidos pela levedura, observou-se que, entre os ácidos estudados, láctico, sórbico, benzóico, propiónico, pentanóico, fórmico e acético, apenas o último era utilizado pela estirpe em estudo, como única fonte de carbono e de energia. Por outro lado, a estirpe em estudo, quando crescida num meio com glucose (0,2; 2,0; 10,0; 20,0 e 30,0%, p/v) ou frutose 1,0 e 20,0% como única fonte de carbono e energia, a pH 3,0 e 5,0, evidenciou capacidade de utilização de qualquer um dos açúcares com produção, essencialmente, de etanol e de glicerol, sendo, a produção de ácido acético insignificante, quer durante a fase exponencial quer durante a fase estacionária de crescimento. Adicionalmente, nas nossas condições experimentais, o crescimento de *Z. bailii* num meio contendo uma mistura de glucose (0,5 e 0,2%, p/v) e ácido acético (concentrações que variaram entre 0,01 e 0,5%, v/v), a pH 4,5 ou frutose (1,0%, p/v) e ácido acético (0,3%, v/v), a pH 3,5, apresentaram duas fases exponenciais distintas. Durante a primeira fase, observou-se um consumo simultâneo do açúcar e do ácido acético sendo a segunda fase correspondente ao esgotamento do ácido acético em simultâneo com a utilização do etanol e glicerol produzidos durante a 1ª fase de crescimento. Do mesmo modo, o crescimento da levedura num meio com uma mistura de glucose (0,5%, p/v), etanol (0,5%, p/v) e ácido acético (0,2%, v/v), foi bifásico. A glucose, o etanol e o ácido acético foram utilizados simultaneamente durante a 1ª fase com produção essencialmente de glicerol. Após a exaustão do açúcar no meio e do glicerol produzido ocorreu o 2º período de crescimento correspondente à completa assimilação do ácido acético associada ao consumo do etanol.

Comportamento análogo foi observado em células crescidas num meio contendo uma mistura de glucose (0,2%, p/v) e etanol (0,5%,p/v). No entanto, neste caso, durante a 1ª fase de crescimento foi utilizada, exclusivamente, a glucose, sendo o 2º período correspondente à assimilação do etanol que ocorreu imediatamente após consumo da glucose do meio.

Por outro lado, o crescimento de *Z. bailii* num meio com 2,0% p/v) de glucose foi bifásico. A uma 1ª fase de crescimento exponencial correspondente à utilização da glucose como fonte de carbono e de energia, seguiu-se imediatamente após o esgotamento da glucose, uma 2ª fase de crescimento exponencial, em que a levedura utilizou o ácido acético, o etanol e o glicerol produzidos como fonte de carbono e de energia. Para concentrações de açúcar elevadas (10,0, 20,0, 30,0%, p/v) e durante um período experimental de cerca de 70-100 h o crescimento foi expresso por uma só fase correspondente ao consumo do açúcar.

De acordo com os dados da literatura, em várias espécies de leveduras, incluindo *S. cerevisiae*, o transporte e metabolismo de ácidos fracos estão sujeitos a repressão catabólica pela glucose. No caso de *Z. bailii* observou-se que células desta levedura crescidas num meio com glucose ou frutose como única fonte de carbono e de energia, a pH 5,0, revelavam actividade para um sistema de transporte mediado para o acetato, cujo comportamento foi consistente com um mecanismo de simporte com H⁺. Resultados preliminares mostraram também que o transporte de ácido acético radioactivo não era inibido competitivamente pelos ácidos sórbico e benzóico, indicando que muito provavelmente estes dois ácidos não utilizam o mesmo transportador. Do mesmo modo, os ácidos propiónico, fórmico e butírico aparentemente não foram reconhecidos pelo transportador do acetato. Células crescidas em meio com ácido acético, pirúvico, etanol ou glicerol evidenciaram também actividade para um sistema de transporte mediado para ácidos fracos cujo comportamento foi igualmente consistente com o envolvimento de um simporte com protões para a forma aniónica dos ácidos. A especificidade deste transportador foi, no entanto, mais alargada, sendo capaz de reconhecer, para além de acetato, outros monocarboxilatos como propionato, formato e butirato. Foi ainda possível observar que, em células de *Z. bailii*, crescidas num meio com glucose, a presença de etanol no meio extracelular inibia a capacidade de transporte de acetato, expressa pela sua velocidade inicial máxima de entrada, aumentando o efeito inibidor com a concentração extracelular do álcool. Aparentemente, o etanol parece assim constituir um meio adicional de protecção para as células de *Z. bailii*, em meios ácidos, inibindo a sua entrada e por consequência diminuindo os possíveis efeitos tóxicos do ácido sobre a levedura. Estes resultados associados à ocorrência de metabolismo do ácido na presença de açúcares poderão estar correlacionados com a elevada resistência evidenciada por *Z. bailii*, a ambientes habitualmente adversos a outras leveduras como *S. cerevisiae* nas quais o transporte do acetato e o seu metabolismo estão sujeitos a repressão catabólica pela glucose.

SUMMARY

The yeast *Zygosaccharomyces bailii* is one of the most dangerous in food industry being able to survive in stress environments namely in acid media with ethanol like those found in wine. The main objective of the present thesis was to elucidate possible mechanisms underlying the high resistance of that yeast species to such environments. Particular attention was given to acid media with ethanol, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* being used as reference. In this perspective, the toxic effects of weak acids, in the presence and absence of ethanol, on the metabolic activity of *Z. bailii*, were studied. A great part of the work studies was concerned with the effects of those compounds on growth, cellular death, respiration/fermentation, intracellular pH and its correlation with the cellular death. A last part regarded the utilization of weak acids, in the presence or absence of sugars, including preliminary studies about the transport of the acids across the plasma membrane of the yeast.

In what respects yeast growth, it was observed that the presence of each one of the acids tested (acetic, propionic, butyric, pentanoic and sorbic) or of ethanol decreased the specific growth rate of *Z. bailii* when growing in glucose medium. For all compounds the inhibition kinetics was expressed by an exponential relation, in the presence of acid/ethanol concentrations above the values corresponding to the respective minimum inhibitory concentrations. Values of the exponential inhibition constants increased with the respective lipid-buffer partition coefficients, while, the needed acid concentrations to induce 50% inhibition decreased with the solubility in lipids of the compounds. The dependence of the observed effects on the temperature was basically expressed by a shift of the maximum and optimum growth temperatures to lower values. These results, although qualitatively identical to those described for *S. cerevisiae*, were quantitatively very different. In a systematic way, the values of the minimum inhibitory concentrations as well as the needed acid concentrations to induce 50% inhibition, in *Z. bailii* were much higher than in *S. cerevisiae*. In turn, the values of the exponential inhibition constants were much lower in *Z. bailii*.

In what concerns the cellular viability, the effects of the acids as well as of the ethanol on the kinetics and thermodynamics of cellular death in glucose-grown cells, were studied. It was shown that ethanol or each one of the acids, acetic, propionic, butyric, pentanoic and sorbic, enhanced death in such a way that the activation enthalpy (ΔH^\ddagger) was not affected, the effects being reflected only in the values of entropy activation (ΔS^\ddagger). For all the cases, the respective Arrhenius plots of death shifted to temperatures values lower than the one obtained

for thermal death induced in the absence of the toxic, the effect increasing with the acid or ethanol concentration in the medium. Furthermore, for each one of the compounds, and in isothermic conditions, cellular death was exponentially stimulated in the presence of increasing extracellular acid/ethanol concentrations. Acid toxicity estimated from the exponential enhancement constants increased with the respective values of the lipid-buffer partition coefficients. Again, the toxic effects induced by the acids on the cellular death of *Z. bailii* were significantly lower when compared to the ones described for *S. cerevisiae*, under the same experimental conditions.

Studies went on with the aim to elucidate the effects of the acids on the fermentation and respiration of glucose. The strain under study was able to respire and to ferment glucose, the relative weigh of each one of the processes being of 25 and 75%, respectively. On the other hand, the addition of the acids or of ethanol to the extracellular medium, at constant pH and temperature, was associated to inhibitory effects on the fermentation and respiration rates. In both processes the inhibition was expressed by exponential relations. While the value of the exponential inhibition constant of fermentation estimated for ethanol was similar to that of described for *S. cerevisiae*, the value of this constant estimated for acetic acid was much lower in *Z. bailii* than in *S. cerevisiae*.

In what respects the effects of the acids on the intracellular acidification, it was observed that, at constant temperature, acetic or pentanoic acid did not affected the intracellular proton concentration, when they were added to extracellular medium at concentrations that induced significant cytosol acidification in *S. cerevisiae*. In *Z. bailii*, intracellular acidification was only measurable at much higher acid concentration values.

In the final part of this thesis work, studies regarding the transport and the utilization of weak acids by *Z. bailii* were developed. It was found that, among the acids tested, lactic, sorbic, propionic, pentanoic, formic and acetic, only the last one was able to be used by the strain under study, as the only carbon and energy source. The yeast when grown in a medium with glucose (0,2; 2,0; 10,0; 20,0 and 30,0%, w/v) of fructose (1,0 and 20,0%, w/v) as the only carbon and energy source, at pH 3,0 and 5,0, displayed capacity to metabolize each one of the sugars with production essentially of ethanol and glycerol, the production of acetic acid being very low. In a medium with a mixture of glucose (0,2 and 0,5%, w/v) and acetic acid (from 0,01 to 0,5%, v/v), at pH 4,5, or with a mixture of fructose (1,0%,w/v), and acetic acid (0,3%, v/v), at pH 3,5, was byphasic. The first phase corresponded to the simultaneous utilization of the sugar and the acid and the second one to the exhaustion of the acid simultaneously with the consumption of the ethanol and glycerol produced in the first phase. In a similar way, growth in a medium with a mixture of glucose (0,5%, w/v), ethanol (0,5% w/v) and acetic acid (0,2%, v/v) was byphasic. Glucose, ethanol and the acid were consumed during

the first phase. The second growth phase only began after the exhaustion of the sugar from the medium and the glycerol produced and was associated to the consumption of the remaining acid and ethanol. In a media with 2,0% (w/v) glucose the growth was byphasic, but, in media with sugar at higher concentrations (10,0; 20,0 and 30,0%, w/v), growth was expressed by one phase corresponding to the sugar consumption, over a period of time 70 - 100h.

According to the literature, in several yeast species including *S. cerevisiae*, the transport and the intracellular metabolism are subjected to glucose repression by glucose. Our results showed that cells of *Z. bailii* grown in a medium with glucose or fructose, as the only carbon and energy source, at pH 5,0, revealed activity for a mediated transport system for acetic acid which behaved as a proton symport for the anion form of the acid. The system exhibited a high substrate specificity and apparently did not recognize other weak acids than acetic acid. Cells grown in a medium with acetic acid, pyruvic acid, ethanol or glycerol displayed activity for a mediated system for weak acids which again behaved as a proton symport for the anionic form of the acids, apparently being able to accept not only acetate, but also propionate, formate and butyrate. It was also observed that in glucose-grown cells of *Z. bailii*, the presence of ethanol in the extracellular medium inhibited the transport capacity of labelled acetic acid, expressed by its maximum initial uptake rate, the effects increasing with the alcohol concentration. Thus, the presence of ethanol appeared to play a protective role for the yeast, inhibiting the acid uptake and thereby decreasing its possible toxic effects on the metabolic activity. These results associated to the ocurrence of the acid metabolism in the presence of glucose could be correlated with the high resistance of *Z. baillii* to acid environments with ethanol where other yeast species like *S. cerevisiae*, in which the transport and the acid metabolism are subject to glucose repression, no more could survive.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 - Enquadramento e Plano Geral da Tese

As designadas "Leveduras de contaminação" figuram entre os microrganismos responsáveis pela deterioração de alimentos frescos e transformados. A sua actividade está associada a enormes perdas económicas para a Indústria Alimentar, sendo a sua importância crescente, por um lado devido à introdução de novas tecnologias de esterilização como a filtração através de membranas, degradação enzimática e de novos processos de tratamento térmico e por outro lado, à introdução de novos produtos alimentares nomeadamente com baixa concentração de conservantes, prontos a consumir, com baixo teor em calorias, ou com grau alcoólico reduzido. No caso dos produtos alimentares de baixo pH, essa importância acentua-se dado que a contaminação de bactérias, é de baixo significado sendo as leveduras a flora contaminante de maior peso e responsável pelas perdas económicas mais significativas. No entanto, a informação disponível sobre esta temática é escassa, particularmente no que respeita aos aspectos fisiológicos e bioquímicos, que determinam o comportamento destas leveduras de contaminação em alimentos. Além disso, os estudos realizados sobre os efeitos tóxicos dos ácidos e/ou do etanol, bem como a quase totalidade dos conhecimentos sobre a bioquímica celular de leveduras, está centralizada sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tradicionalmente utilizada para a produção de bebidas alcoólicas e de fermentos. Em leveduras identificadas de contaminação alimentar muito pouco se sabe sobre o seu metabolismo e respectiva regulação.

No presente trabalho de tese seleccionou-se como material biológico para os estudos desenvolvidos a levedura *Zygosaccharomyces bailii*, considerada como uma das mais perigosas em particular na indústria de vinhos dada a sua aptidão para se desenvolver em ambientes extremos presentes no processo final de estabilização e engarrafamento de vinhos. Assim, foi nosso objectivo fundamental, contribuir para o melhor conhecimento da levedura em si, bem como identificar e elucidar os possíveis mecanismos fisiológicos e bioquímicos subjacentes à sua elevada tolerância a ambientes de stress ácido na presença ou ausência de etanol. Como organismo de referência e para efeitos comparativos, utilizou-se a levedura *S. cerevisiae* que, ao contrário de *Z. bailii* não evidencia capacidade de sobrevivência em tais ambientes extremos.

Ao longo do trabalho (essencialmente Cap. 2 e 5) o pH e a temperatura foram variáveis por nós manipuladas. Em condições experimentais bem definidas, uma levedura pode ser caracterizada pelo seu perfil de temperatura. Este traduz as dependências do crescimento e da morte com a temperatura. Por sua vez, a acumulação no meio de crescimento de produtos do

metabolismo, pode alterar significativamente o perfil de temperatura da levedura. O estudo dos perfis modificados pode, fornecer informações importantes, designadamente sobre a natureza e localização dos alvos sensíveis aos tóxicos. Por outro lado, os ácidos orgânicos fracos, dada a sua natureza química, podem estar presentes no meio de cultura nas formas aniónicas, neutras ou em ambas. A manipulação do pH extracelular permite variar a concentração relativa de cada uma das formas do ácido podendo fornecer informação sobre o contributo de cada uma destas para a toxicidade global de ácidos.

O trabalho de tese iniciou-se estudando os efeitos do etanol e dos ácidos (acético, propiónico, butírico, pentanóico e sórbico) no crescimento de *Z. bailii*, num meio com glucose como única fonte de carbono e de energia. Os resultados obtidos e apresentados no Cap. 2, evidenciaram que, a temperatura e pH constantes, o etanol e os ácidos afectavam negativamente a taxa específica do crescimento, estando o efeito inibidor relacionado positivamente com a respectiva solubilidade nos lípidos. Por outro lado, a presença de inibidor no meio extracelular deslocou o perfil de temperaturas da levedura como um todo para uma zona de temperaturas mais baixas, mantendo-se o perfil do tipo associativo.

No Capítulo 3, em células crescidas nas mesmas condições experimentais, estudamos os efeitos do etanol e dos ácidos na cinética e parâmetros de activação da morte térmica de *Z. bailii*. Os ácidos estudados, estimularam a morte térmica segundo um mecanismo tal que, apenas a entropia de activação da morte térmica foi afectada. Por sua vez, e de forma análoga ao que foi observado noutras leveduras em condições isotérmicas, os efeitos estimuladores sobre a morte celular induzida pelos ácidos foram uma função exponencial da concentração de ácido extracelular.

Por outro lado, de acordo com os dados na literatura, o crescimento de *S. cerevisiae* em meio contendo tóxicos (células adaptadas), conduz a um aumento da sua tolerância em termos de crescimento e viabilidade celular. Adicionalmente, sabe-se que, no caso de uma fermentação alcoólica conduzida pela levedura *S. cerevisiae* a acumulação extracelular de ácido acético e de outros ácidos pode potenciar os efeitos tóxicos do produto final - o etanol - sobre a actividade metabólica da levedura. No sentido de avaliar o comportamento da levedura *Z. bailii*, foram desenvolvidos estudos sobre os efeitos dos ácidos (acético e sórbico) na presença de etanol na morte celular de células crescidas na ausência (células não adaptadas) e na presença de ácidos (células adaptadas). Os resultados apresentados no Capítulo 4, mostraram que a adaptação das células ao ácido acético e ao ácido sórbico se traduziu apenas num ligeiro aumento da sua resistência aos ácidos, sendo o aumento mais significativo para o caso do ácido sórbico. Os resultados indicaram ainda que o etanol estimulava exponencialmente os efeitos tóxicos dos ácidos sendo, no entanto, os efeitos sinérgicos significativamente inferiores aos descritos para *S. cerevisiae*.

No Capítulo 5 apresentamos resultados experimentais que evidenciaram que, a 25° C,

a presença de ácidos (acético e pentanóico) afectava o pH intracelular. Adicionalmente, não foi encontrada em *Z. bailii*, correlação positiva entre a acidificação intracelular e o estímulo de morte celular induzido pelos ácidos, conforme descrito para *S. cerevisiae*, em condições isotérmicas, a temperaturas baixas e intermédias.

No Capítulo 6 foram desenvolvidos estudos respeitantes aos efeitos dos ácidos (acético e sórbico) e/ou etanol na fermentação/respiração de *Z. bailii*. Os resultados mostraram que os ácidos inibiram exponencialmente a fermentação/respiração da levedura. O etanol potenciou os efeitos inibidores induzidos pelos ácidos sendo, no entanto, o valor da constante exponencial de estímulo relativamente reduzida (cerca de metade) quando comparada com o descrito para *S. cerevisiae*.

No Capítulo 7, utilizando culturas de células em meio com glucose, procedeu-se a estudos preliminares sobre a caracterização do transporte do ácido acético e de outros ácidos monocarboxílicos. Neste capítulo apresentamos também resultados experimentais, respeitantes à utilização da glucose, ácido acético e etanol em suspensões de células crescidas em meio com diferentes fontes de carbono e energia. Finalmente no Capítulo 8, apresentam-se considerações gerais sobre o trabalho desenvolvido e principais resultados obtidos e suas implicações na possível optimização de fermentações alcoólicas conduzidas pela levedura *S. cerevisiae*.

1.2 - Transporte membranar e utilização de ácidos orgânicos fracos

Aproximadamente metade das 600 espécies de leveduras reconhecidas actualmente (Barnett *et al.*, 1990) incluem estirpes com capacidade de utilizar ácidos orgânicos mono-, di-, ou tricarboxílicos como única fonte de carbono e de energia. O metabolismo destes ácidos envolve dois passos sequenciais: o seu transporte através da membrana citoplasmática na forma não dissociada, dissociada ou em ambas e o seu metabolismo intracelular.

1.2.1 - Transporte membranar

Apesar do número elevado de espécies de leveduras com capacidade de utilização de ácidos carboxílicos, estudos sistematizados sobre o transporte destes compostos através da membrana plasmática, são escassos e relativamente recentes. Esta escassez de dados torna-se particularmente acentuada se tivermos em conta o número elevado de estudos deste tipo que têm sido realizados em bactérias.

Os ácidos orgânicos fracos, dada a sua natureza química, em solução aquosa dissociam-se de acordo com o seu valor de pK_a e pH extracelular. Assim, dependendo do pH do meio, podem apresentar-se nas suas formas neutras e/ou carregadas. A forma não dissociada, dada a sua lipossolubilidade, poderá atravessar, por difusão simples, as biomembranas através da bicamada lipídica. A entrada da(s) forma(s) dissociada(s), atendendo à sua natureza polar implica a presença de proteínas transportadoras. Estudos realizados na

levedura *Candida utilis* (Leão e van Uden, 1986; Cássio e Leão, 1991; 1993) indicam que esta estirpe evidencia capacidade de utilização de ácidos mono-, di- e tricarboxílicos como única fonte de carbono e de energia. De acordo com resultados obtidos, células crescidas em meio com qualquer um destes ácidos metabolizáveis pela levedura, induziram a presença de dois tipos de sistemas de transporte: um sistema do tipo simporte com protões para a forma iónica (sistema de alta afinidade) e um mecanismo de difusão facilitada para a forma não dissociada (sistema de baixa afinidade). Por sua vez, as leveduras *Candida sphaerica* (Côrte-Real *et al.*, 1989) e *Hansenula anomala* (Côrte-Real e Leão, 1990) quando crescidas em meio com um ácido mono - di - ou tricarboxílico, evidenciam igualmente a presença de sistemas de transporte mediados do tipo simporte com protões específicos para mono- di- e tricarboxilatos. Foi descrito um sistema de transporte mediado do tipo simporte com protões, específico para monocarboxilatos, na levedura *Torulaspóra delbrueckii* quando crescida num meio com ácido láctico ou pirúvico como única fonte de carbono e energia. Esta levedura apresenta um outro sistema de transporte do tipo simporte com protões para ácidos monocarboxílicos mas de especificidade mais restrita capaz de transportar os ácidos acético, propiónico e fórmico, mas não os ácidos láctico e pirúvico. Este sistema está presente em células crescidas em ácido acético, ou etanol (Casal e Leão, 1992). Fonseca *et al.* (1991), em estudos de transporte numa estirpe de *Kluyveromyces marxianus* obtiveram resultados indicando que o lactato entra na célula por um sistema de transporte mediado do tipo antiporte com carbonato, específico para monocarboxilatos. A levedura *S. cerevisiae*, embora sem capacidade de utilizar ácidos orgânicos di - ou tricarboxílicos como única fonte de carbono e energia, inclui, no entanto, estirpes que revelam capacidade de utilização de ácido láctico, acético e pirúvico. Células da estirpe *S. cerevisiae* 4072 crescidas em meio com ácido láctico como única fonte de carbono e energia induzem um sistema de transporte mediado, do tipo simporte com protões acumulativo, com especificidade alargada a vários ácidos monocarboxílicos (Cássio *et al.*, 1987).

Nas espécies de leveduras referidas anteriormente, à excepção de *K. marxianus*, os sistemas de transporte mediados são indutivos e estão sujeitos a repressão pela glucose. Em *K. marxianus* o sistema de transporte de lactato é parcialmente indutivo e está parcialmente sujeito a repressão pela glucose. Por outro lado, em todos os casos em células crescidas num meio com glucose (condições de repressão), a membrana apresenta-se permeável à forma não dissociada do ácido. O ácido, nestas condições de crescimento, entra nas células por um mecanismo de difusão simples.

Outras espécies de leveduras como, *Schizosaccharomyces pombe* e *Zygosaccharomyces bailii*, não revelam capacidade de utilização de ácidos intermediários do ciclo de Krebs como única fonte de carbono e energia, embora a assimilação de alguns deles seja viabilizada na presença de glucose. Por outro lado, e à semelhança de *S. cerevisiae* algumas destas estirpes são capazes de utilizar ácidos monocarboxílicos como única fonte de carbono e energia. No caso de *S. pombe* observa-se capacidade de utilização de ácido málico

na presença de glucose (Taillandier, 1978). Células provenientes de um meio de cultura com glucose e ácido málico induzem um sistema de transporte mediado constitutivo, do tipo simporte com protões, específico para o ácido málico e outros dicarboxilatos (Osothsilp e Subden, 1986; Sousa *et al.*, 1992; Sousa, 1993). Adicionalmente, e paralelamente à entrada do ácido por este sistema de transporte mediado, o ácido málico pode também entrar na célula por difusão simples na forma não dissociada.

A levedura *Z. bailii* revela-se com capacidade de utilização de alguns ácidos monocarboxílicos, nomeadamente ácido acético, como única fonte de carbono e energia, bem como ácido málico, que é apenas assimilado na presença de glucose ou frutose (Herzberger e Radler, 1988). Estudos experimentais sobre os mecanismos de transporte de ácidos carboxílicos e a sua regulação, em *Z. bailii*, são escassos. Baranowski e Radler (1984) postulam que, nesta levedura crescida num meio com glucose o ácido L - málico entra na célula na forma não dissociada sendo o transporte mediado por um sistema de difusão facilitada. *S. cerevisiae* inclui estirpes com capacidade de utilização do ácido málico na presença de glucose. Aparentemente, nestas condições, o ácido entra na célula da levedura na forma não dissociada por difusão simples (Baranowski e Radler, 1984; Radler, 1986).

1.2.2 - Ácidos orgânicos como fonte de carbono e de energia

Em condições de aerobiose e de actividade das enzimas da cadeia respiratória a utilização de ácidos orgânicos como fonte de energia ocorre via ciclo de Krebs, sendo metabolizados a CO₂ e água. Este ciclo constitui a principal via de obtenção de ATP acoplada ao transporte de electrões (fosforilação oxidativa). Em leveduras, a utilização de ácidos, como substratos energéticos, pressupõe a presença, na membrana mitocondrial, de sistemas de transporte específicos (permeases específicas) para ácidos que deste modo poderão entrar directamente no ciclo de Krebs. Na ausência destas permeases os ácidos são convertidos a outros intermediários para os quais a membrana mitocondrial dispõe de sistemas de transporte.

A utilização como fonte de carbono de compostos que não hidratos de carbono, nomeadamente ácidos orgânicos, está associada ao funcionamento de uma via metabólica inversa à glicólise, a gluconeogénese. Em termos globais esta pode ser considerada como a conversão do piruvato a glucose - 6 - fosfato (Fig. 1.1). É um processo que requer energia, como ATP e GTP, e poder redutor como NADH.

A gluconeogénese é catalisada pelas mesmas enzimas da glicólise à excepção de dois passos: i) conversão da frutose - 1,6 - bifosfato a frutose - 6 - fosfato pela acção da frutose - 1,6 - bifosfatase e ii) conversão do piruvato a fosfoenolpiruvato, que ocorre em duas etapas. Numa primeira fase o piruvato é metabolizado a oxaloacetato pela acção da enzima carboxilase do piruvato. Numa segunda fase o oxaloacetato é convertido em fosfoenolpiruvato por

intervenção da enzima carboxicinase do fosfoenolpiruvato. Estas enzimas e as que catalizam as reacções inversas da glicólise (fosfofrutocinase e cinase do piruvato) constituem os pontos chave dos dois processos, evitando a existência de ciclos fúteis.

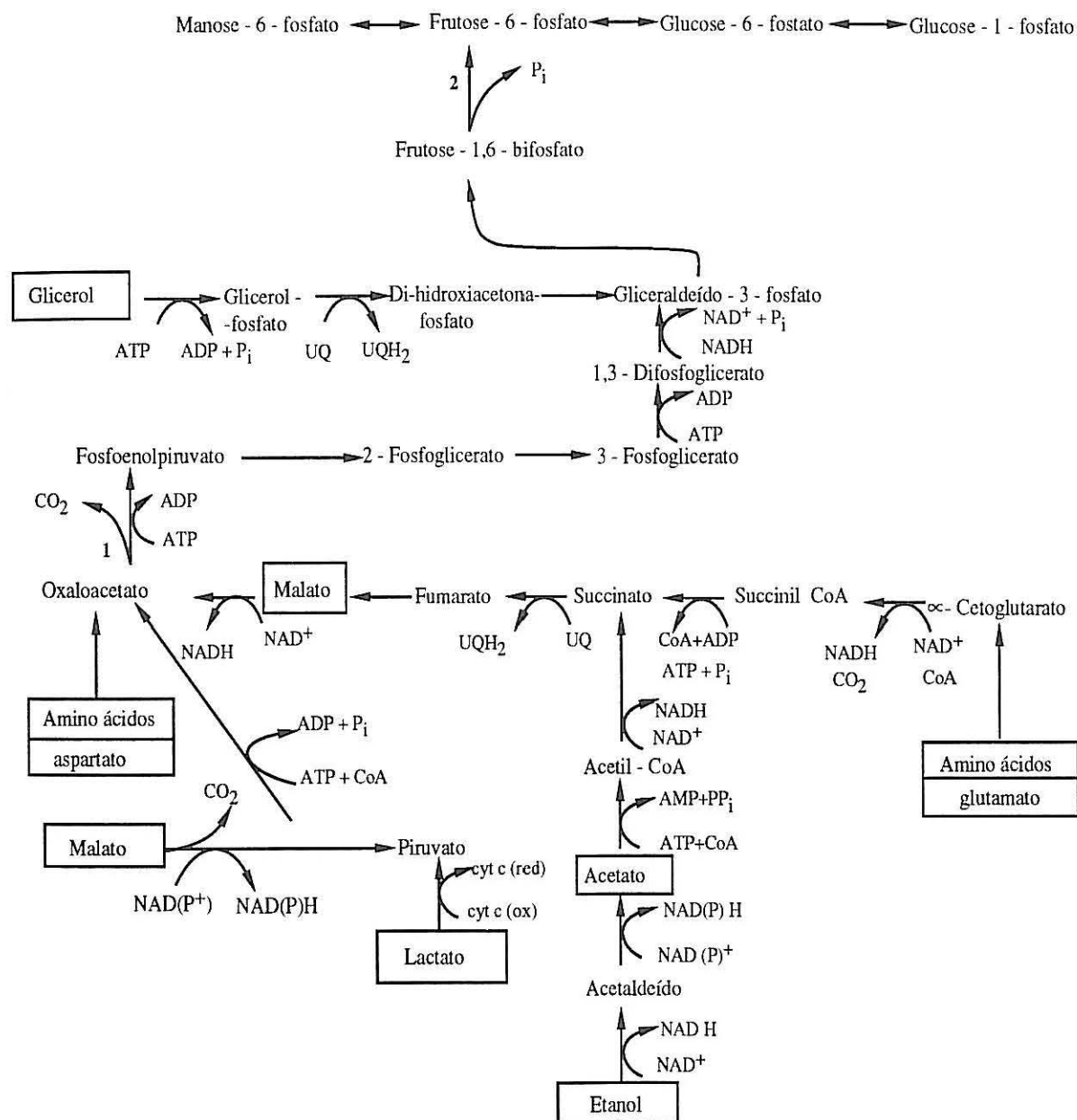


Fig. 1.1 - Gluconeogénese. Substratos gluconeogénicos representados: etanol, glicerol, aminoácidos e ácidos carboxílicos. As enzimas específicas da gluconeogénese são:

1) Carboxicinase do fosfoenolpiruvato; 2) Frutose - 1,6 - bifosfatase (adaptado de Gancedo e Serrano, 1989).

Por outro lado, a utilização, como fonte de carbono, de ácidos com um número de átomos de carbono inferior a dois, como por exemplo, o ácido acético, implica a operacionalidade do ciclo do glioxilato que por sua vez, constitui uma alteração ao ciclo de Krebs Fig. (1.2). Tal como no ciclo de Krebs a acetil CoA condensa-se com o oxaloacetato originando citrato, o qual é convertido em isocitrato pela acção da aconitase. Porém, a conversão do isocitrato ocorre por uma via em que dois passos do ciclo de Krebs são substituídos. Assim, na primeira reacção do ciclo do glioxilato a enzima liase do isocitrato catalisa a reacção reversível que cinde o isocitrato em succinato e glioxilato. Na segunda reacção, por acção da sintetase do malato o glioxilato combina-se com uma molécula de acetil - CoA para dar malato. O malato é seguidamente oxidado a oxaloacetato que pode condensar-se novamente com o acetil CoA para dar citrato e recomeçar o ciclo (Fig. 1.2).

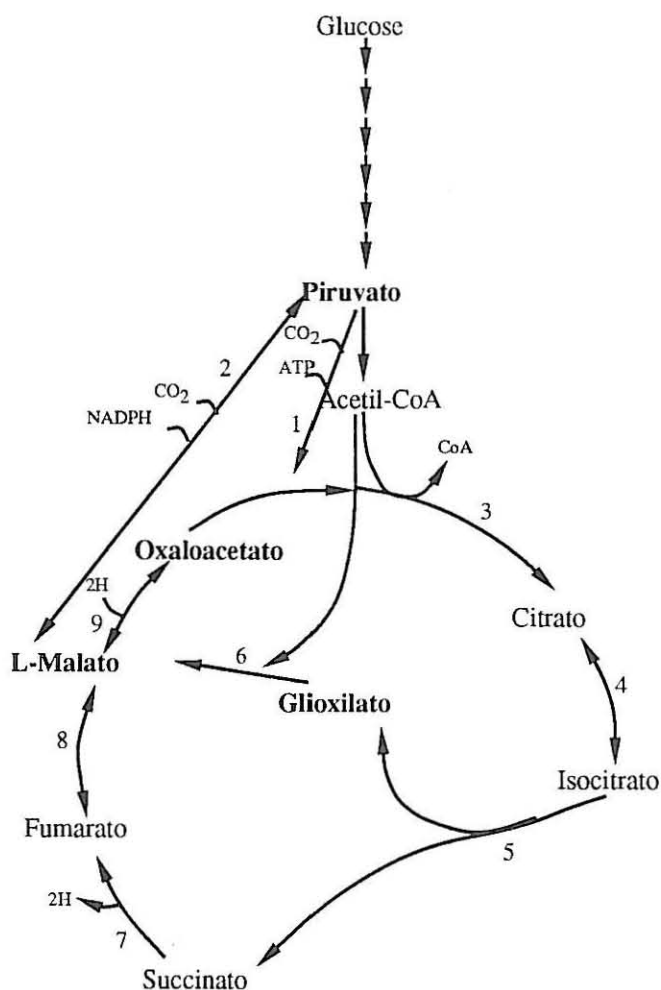


Fig. 1.2 - Reacções anapleróticas associadas ao ciclo de Krebs.

1) Carboxilase do piruvato; 2) Enzima málica; 3) Sintetase do citrato; 4) Aconitase; 5) Liase do isocitrato; 6) Sintetase do malato; 7) Desidrogenase do succinato; 8) Fumarase; 9) Desidrogenase do malato. —> —> indicam a omissão de um ou vários passos intermediários.

Este ciclo consiste, basicamente, numa sequência de reacções anapleróticas permitindo a obtenção de succinato a partir de compostos em C₂. O succinato assim formado atravessa a membrana mitocondrial e reabastece o ciclo de Krebs. O oxaloacetato formado a nível do ciclo de Krebs pode então seguir a via da gluconeogénese (Fig. 1.1).

Larpent (1991), refere a localização das duas enzimas específicas do ciclo do glioxilato no citoplasma o que explica a ocorrência, em leveduras, deste ciclo no citosol. Apesar de, em leveduras crescidas em meio com alcanos, como única fonte de carbono e energia, estas enzimas se localizarem em organelos semelhantes aos peroxissomas não está ainda demonstrado que nos fungos este ciclo tenha lugar em organitos específicos (Tanaka *et al.*, 1982).

1.3 - Toxicidade de ácidos orgânicos fracos

Os ácidos orgânicos fracos na natureza aparecem como constituintes naturais de frutos. Alguns deles, são ainda sub-produtos de fermentações resultantes da actividade microbiana nomeadamente de leveduras e bactérias lácticas e acéticas. Além disso, estes compostos são muitas vezes, adicionados como acidulantes e/ou conservantes, impedindo a posterior deterioração de alimentos e bebidas. Na tabela 1.1. apresentamos os compostos mais utilizados como conservantes nos alimentos, e seus possíveis efeitos na actividade metabólica microbiana.

Segundo Gomez e Herrero (1983) um conservante químico é adicionado aos alimentos para prevenir ou retardar as alterações microbianas e enzimáticas, bem como, as modificações físicas e químicas indesejáveis.

A utilização de conservantes químicos nem sempre é considerada a mais adequada. No entanto, actualmente em muitos países aplicam-se métodos eficazes de detecção e uma legislação mais ou menos estrita em matéria alimentar para evitar as infracções e o uso abusivo destas substâncias.

Em Portugal os princípios e as regras de aplicação de aditivos aos géneros alimentares foram estabelecidos no Decreto-Lei nº 192/89 de 8 de Junho. As portarias nº 833/89 de 22 de Setembro e nº 822/91 de 28 de Agosto fixam os aditivos admitidos nos alimentos e as suas utilizações. A definição e classificação dos aditivos admitidos encontram-se na Norma Portuguesa NP - 1735 (1986) e a Norma NP - 4136 (1991) fornece informação importante sobre conservantes.

A eficácia de um conservante químico depende de uma grande variedade de factores entre os quais se salientam: concentração do agente químico, condições de armazenamento, tipo, história e concentração da flora microbiana e das características físicas e químicas do alimento (Gomez e Herrero, 1983). Deste modo, os conservantes para poderem ser aceites têm

Tabela 1.2

Ocorrência e função dos principais compostos químicos utilizados na conservação de alimentos e seus efeitos nos microrganismos (adaptado de Gomez e Herrero, 1983 (1), Tilbury, 1980 (2); Cássio, 1994 (3)).

Composto	Ocorrência	Propriedade/função (3)	Efeitos na actividade microbiana
Ácidos orgânicos (1)			
Ácidos carboxílicos			
Fórmico	Fermentação alcoólica	Inibidor da fermentação alcoólica	
Acético e seus derivados	Molhos, marinadas e saladas caseiras (vinagre) Vegetais em salmoura (pickles, chucrute) Vinho	Acidulante e conservante; inibidor da fermentação "Amuo" da fermentação	Afecta enzimas glicolíticas em <i>S. cerevisiae</i> (Pampulha e Loureiro-Dias, 1990) Induz morte celular a altas e baixas temperaturas (Pinto <i>et al.</i> , 1989; Cardoso e Leão, 1992). Induz acidificação intracelular em <i>S. cerevisiae</i> (Pampulha e Loureiro Dias, 1989; Cardoso e Leão, 1992) e diminuição da taxa de fermentação em <i>S. cerevisiae</i> (Pampulha e Loureiro Dias, 1989). Inibidor do crescimento sobretudo em sinergismo com outros inibidores (Moon, 1983).
Propiónico (sais de sódio e cálcio)	Leites fermentados (iogurte queijo) Pão (propionatos) e produtos de pastelaria Recheios	Características organolépticas Conservante	Inibidor do crescimento sobretudo em sinergismo com outros inibidores (Moon, 1983) Diminuição da taxa do crescimento e rendimento celular Acidificação do pH intracelular (Cardoso e Leão, 1992).
Sórbico (sorbatos de cálcio, sódio, de potássio)	Queijo e produtos derivados Sumos de fruta e xaropes Margarinas Recheios Salada e molhos de saladas vegetais fermentados ("pickles", condimentos, azeitonas, chucrute) Vegetais e frutos frescos e secos Peixe conservado Bebidas Produtos de pastelaria e padaria	Conservante	Inibição do crescimento microbiano (Sofos e Busta, 1981; Liewen e Marth, 1985; Legan e Voysey, 1991).
Benzoico (benzoato de sódio)	Bebidas carbonatadas Sumos de fruta Margarinas, recheios, saladas e molhos de saladas, "pickles", azeitonas, chucrute	Conservante	Inibição da fermentação em <i>S. cerevisiae</i> (Warth, 1991).
Ácidos orgânicos (1)			
Ácidos hidroxílicos			
Láctico	Compotas, geleias, confeitaria, gelados e refrigerantes Salmouras de vegetais ("pickles" e azeitonas, chucrute) Peixe Enchidos Leite e derivados Vinho Fermentos em pó (lactato de cálcio)	Acidulante Características organolépticas Fermentação alcoólica e maloláctica efectuada respectivamente, por leveduras e bactérias	Inibidor do crescimento sobretudo em sinergismo com outros inibidores (Moon, 1983).
Málico	Uva e mosto Vinho	Acidulante Características organolépticas Fermentação maloláctica	Inibidor do crescimento (Pitt, 1974).
Tartárico	Uva e mosto Vinho	Acidulante Características organolépticas Fermentação maloláctica	Inibidor do crescimento (Pitt, 1974).
Cítrico	Soro do leite (0,1%) Frutos, fruta em calda, marmelada, geleias, xaropes, refrigerantes e rebuçados Bebidas alcoólicas Carne e peixe	Acidulante Características organolépticas Colabora no aparecimento de orifícios no queijo Anti oxidante, impedindo a descoloração do produto ou aparecimento de colorações inadequadas	Inibidor do crescimento (Pitt, 1974) Afecta a fase de latência e actua em sinergismo com os sorbatos na diminuição da taxa de crescimento (Restaino <i>et al.</i> , 1982).
Ácidos inorgânicos (1)			
Hidrofóbico			
Fosfórico			
Bórico			
Sais (2)			
Nitrato e nitrato			
Antibióticos (2)			
Sersina			
Paramisina			
Tetraciclina			

de satisfazer determinados requisitos, tais como: não possuir propriedades carcinogénicas, ausência de toxicidade para o homem e para os animais em concentrações realísticas e apropriadas, solúvel, homogéneo, ausência de propriedades organolépticas indesejáveis, possuir actividade antimicrobiana no produto onde vai ser utilizado e ser pouco dispendioso (Gomez e Herrero, 1983; Pelczar *et al.*, 1980).

Os ácidos orgânicos presentes nos alimentos, são, geralmente, compostos de baixo peso molecular, com uma estrutura relativamente simples. Como ácidos fracos, em solução aquosa tendem a dissociar-se de acordo com os valores do pH extracelular e da respectiva constante de dissociação (pK_a) segundo a equação de Henderson - Hasselbach, que para o caso de um ácido monocarboxílico poderá ser escrita:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad (1.1)$$

em que $[A^-]$ e $[AH]$ são as concentrações da forma aniónica e não dissociada, respectivamente.

A valores baixos de pH, os ácidos fracos encontram-se, predominantemente, na forma não dissociada. Esta molécula dada a sua elevada solubilidade na fracção lipídica pode atravessar a membrana citoplasmática por difusão simples. No caso de se tratar de um ácido não metabolizável pelo microrganismo, no interior da célula, onde o pH é mais elevado (cerca de 7,0), o ácido dissociar-se-á e se não estiver presente um transportador que promova o seu efluxo acumular-se-á no interior da célula. Esta acumulação poderá ser acompanhada por acidificação do citosol e eventuais efeitos tóxicos. Assim, a toxicidade destes ácidos fracos está frequentemente descrita como associada à forma não dissociada e como dependente da sua lipossolubilidade.

No entanto, trabalhos mais recentes associam também a forma aniónica aos efeitos tóxicos dos ácidos na actividade metabólica da levedura (Warth, 1977; 1986; 1988; Cole e Keenan, 1986). Os efeitos tóxicos acentuar-se-ão à medida que aumenta o pH extracelular (Eklund, 1983 e 1985). Para valores de pH superiores a 6,0, este autor, observou que cerca de metade da inibição do crescimento induzida pelo ácido sórbico era devida à forma aniónica.

As leveduras apresentam respostas muito diferentes à presença dos ácidos fracos usados como acidulantes e/ou conservantes na indústria alimentar. A sensibilidade das leveduras aos ácidos está dependente sobretudo, da estirpe e dentro da mesma estirpe, do tipo de ácido (Tab. 1.2). Porém geralmente, quando uma estirpe é sensível a um ácido particular, evidencia também uma menor resistência relativamente à presença de outros ácidos (Warth, 1977; 1988).

Tabela 1.2

Valores mínimos do pH do meio de cultura * que permitem o crescimento de leveduras em função tipo de ácido adicionado (Pitt, 1974 e adaptado de Cássio, 1994).

Leveduras	Ácido adicionado					
	HCl	H ₃ PO ₄	Cítrico	Málico	Tártárico	Acético
<i>Brettanomyces intermedius</i>	1,8	—	2,3	—	—	—
<i>Candida krusei</i>	1,3	1,7	1,9	1,7	1,9	2,4
<i>Candida tropicalis</i>	1,9	2,1	2,2	2,2	2,1	3,0
<i>Pichia membranefaciens</i>	1,9	2,1	2,2	2,1	2,2	3,0
<i>Rhodotorula rubra</i>	2,2	2,2	2,2	2,2	2,3	2,3
<i>Saccharomyces bailii</i>	2,4	2,5	2,2	2,4	2,5	2,9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,6	1,7	2,0	1,8	1,9	3,6
<i>Torulopsis holmii</i>	1,5	1,7	2,0	2,1	1,9	3,0
<i>Torulopsis stellata</i>	1,6	—	2,0	—	—	—

* Valor de pH medido após o crescimento a 25° C de pelo menos 5 gerações durante 4 semanas, num meio com YNB ("yeast nitrogen base") e glucose a 0,5%.

Muitos investigadores, postulam a acidificação do citosol como responsável pelos efeitos tóxicos dos ácidos. Krebs *et al.* (1983) num estudo sobre o efeito do ácido benzóico em *S. cerevisiae*, observaram um decréscimo do pH intracelular para valores próximos de 5,0 provocado pela acumulação intracelular do benzoato. A descida do pH provocaria uma inibição da actividade de enzimas glicolíticas, fosfofrutocinase (especialmente sensível a valores baixos pH_{int}) e hexocinases, com o conseqüente decréscimo na produção de ATP, e paragem no crescimento. Segundo Neal *et al.* (1965) os ácidos succínico e ftálico inibem igualmente enzimas glicolíticas em homogeneizados celulares de *S. cerevisiae*, embora, não tenham exercido efeitos significativos em suspensões de células intactas.

Warth (1991-a) utilizando células de *Z. bailii* e *S. cerevisiae*, verificou que concentrações de ácido benzóico superiores a uma concentração mínima abaixo da qual os efeitos negativos do ácido não eram mensuráveis (MIC), provocam uma redução na taxa de crescimento e no pH intracelular. Nestas condições a taxa específica de fermentação foi também inibida conduzindo a um decréscimo dos níveis de ATP e à acumulação significativa de

benzoato. No entanto, este autor, e ao contrário do que foi referido por Krebs *et al.* (1983) não observou inibição da enzima fosfofrutocinase.

Pampulha e Loureiro Dias (1989) demonstraram que a presença de ácido acético no meio extracelular inibia, de forma exponencial a taxa específica de fermentação de células de um mutante deficiente respiratório de *S. cerevisiae* crescidas num meio com glucose como única fonte de carbono e energia. Além disso, este ácido afectava também as enzimas glicolíticas, embora de forma diferencial, sendo a enolase a enzima mais significativamente inibida, seguida da mutase do fosfoglicerato e da isomerase da triose-fosfato. Adicionalmente, a cinética de inibição da fermentação na presença de ácido acético era idêntica à do abaixamento do pH_{int} e dependente apenas da concentração da forma não dissociada do ácido. Por outro lado, a presença de etanol potenciava os efeitos inibidores dos ácidos na fermentação e os efeitos estimuladores na acidificação intracelular. Mais tarde, Loureiro-Dias *et al.* (1989) verificaram ainda que o ácido acético se acumula intracelularmente, não sendo a acidificação intracelular provocada por um aumento do influxo passivo de protões. Segundo estas investigadoras o ácido acético afecta negativamente a taxa específica de crescimento, o rendimento celular e a produção de ATP. Adicionalmente, verificaram que o pH_{int} de células crescidas, na presença de ácido acético (células adaptadas) é significativamente superior do que em células crescidas na sua ausência, indicando que a adaptação seja devida à actividade de uma ATPase de membrana, que expulsa os protões, mantendo o pH_{int} a valores que permitem o crescimento. A acidificação intracelular induzida pelos ácidos acético, propiónico, butírico e pentanóico em *S. cerevisiae* tem sido igualmente referida como mecanismo subjacente (Cardoso, 1994).

Segundo Baronofsky *et al.* (1984), Herrero *et al.* (1985), Cole e Keenan (1986 e 1987) a inibição do crescimento e da actividade metabólica em geral de bactérias (*Clostridium thermoaceticum* e *Clostridium thermocellum*) e leveduras (*Z. bailii* e *S. cerevisiae*) na presença de elevadas concentrações de ácido (acético e benzóico) era provocada pela dissipação do gradiente de protões e consequentemente pelo decréscimo do pH_{int} , provavelmente devido ao metabolismo não repor os níveis de ATP necessários para o efluxo de protões pelas ATPases da membrana. Por outro lado, a acção dos ácidos fracos pode estar relacionada com alterações de funções da membrana. Maiorella *et al.* (1983) verificaram que o ácido acético inibe o transporte activo de fosfato ao nível da membrana, resultando numa diminuição da síntese de ATP, consequentemente, ocorre uma diminuição da biomassa e um aumento da produção de etanol, disponibilizando, assim, ATP suficiente para a manutenção celular. Estudos efectuados por Freese *et al.* (1973) de inibição de transporte de aminoácidos, de arsenato e fosfato pelos ácidos orgânicos, respectivamente, em membranas de bactérias e leveduras, mostram que concentrações baixas de ácido inibem os referidos transportes.

Adicionalmente, a presença simultânea de mais do que um inibidor pode resultar em efeitos interactivos no comportamento de populações de leveduras. Estes efeitos têm sido

objecto de estudo de inúmeros investigadores, não sendo no entanto, fácil comparar os resultados apresentados, por terem sido obtidos em diferentes condições experimentais. Moon (1983) estudou a inibição do crescimento de várias leveduras (*Saccharomyces uvarum*, *Geotrichum candidum*, *Endomycopsis burtonie* e *Hansenula canadensis*) associadas à deterioração de alimentos ácidos por misturas de acetato, lactato e propionato, tendo constatado que estes tinham um efeito inibitório sinérgico. Misturas de etanol/ácido acético (Pampulha e Loureiro-Dias, 1989) ou de etanol/ácido acético/NaCl (Kurita e Koike, 1983) inibem a fermentação e o crescimento da levedura *S. cerevisiae*. Misturas de ácido sórbico e benzóico têm efeitos sinérgicos negativos em células de *Z. bailii* no que respeita ao seu comportamento a nível do crescimento (Cole e Keenan, 1986). A resistência das leveduras aos ácidos orgânicos fracos é variável, sendo *Z. bailii*, material biológico em estudo, uma das leveduras descritas como elevada capacidade de resistência a elevadas concentrações de ácidos orgânicos fracos. Warth (1977) utilizando células de *Z. bailii* verificou que na presença de glucose a acumulação intracelular de ácidos sórbico e benzóico era inferior ao que seria de esperar com base no equilíbrio resultante dos valores dos pK_a dos ácidos e do pH intracelular. A capacidade de manutenção desses teores de ácido reduzidos era encontrada apenas em células crescidas na presença deste ácido (células adaptadas). Warth (1988), determinou valores de pH intracelular de $6,13 \pm 0,2$ e $6,51 \pm 0,27$, respectivamente, na presença e na ausência de glucose. Estes resultados levaram o autor a admitir que a resistência aos ácidos resulta de um sistema de transporte indutível, que requer energia para promover o efluxo da forma iónica dos ácidos. A energia gasta por este sistema, justificaria a diminuição da taxa de crescimento e do rendimento em biomassa observada em células crescidas na presença deste conservante. Um mecanismo deste tipo é questionável, sobretudo se considerarmos as características de lipossolubilidade das formas não dissociadas dos ácidos que poderão permitir a reentrada destes compostos.

Cole e Keenan (1987) ao contrário de Warth, encontraram em *Z. bailii* uma concentração intracelular de ácido benzóico idêntica à que seria de esperar com base no pK_a do ácido e nos pHs intra- e extracelulares. Na sequência destes resultados, colocam em causa a presença de uma bomba para ácidos fracos sugerindo que, o efluxo do ácido benzóico previamente acumulado, observado quando da adição de glucose ou frutose, não resulta de um transporte activo, mas de uma diminuição do pH interno com a consequente alteração do equilíbrio entre as formas dissociadas e não dissociadas do ácido. Alternativamente, sugerem que a resistência a ácidos fracos de *Z. bailii* e de outras leveduras afins surgiria da sua capacidade para tolerar valores de pH baixos e de excreção de ácidos orgânicos produzidos durante o metabolismo. A tolerância de *Z. bailii* também pode estar relacionada com as características da membrana. Este facto recebeu uma evidência experimental importante através dos trabalhos de Warth (1988) ao verificar que as espécies sensíveis eram mais permeáveis à forma não dissociada do ácido do que as mais resistentes.

Malfeito Ferreira *et al.* (1989) ao estudar a relação entre o grau de saturação dos ácidos gordos totais celulares e a tolerância a ambientes de stress em espécies de leveduras isoladas de vinhos, admitem a possibilidade da resistência aos ácidos poder estar relacionada com o grau de insaturação dos ácidos gordos. Esta observação vem consolidar os resultados de Pilkington e Rose (1989). Este autor, verificou que o coeficiente de permeabilidade da membrana para o sulfito aumentava à medida que decrescia o grau de insaturação dos seus fosfolípidos. Com efeito, os resíduos em C_{16:0}, C_{16:1} e C_{18:1} abundam em estirpes da espécie *S. cerevisiae* enquanto que nas estirpes de *Z. bailii* predominam os resíduos C_{16:0}, C_{18:1} e C_{18:2}.

Por outro lado, é também possível, que para as diferentes resistências de leveduras possam contribuir diferenças na razão volume/área celulares (V/A), no metabolismo energético e ainda na sensibilidade intrínseca aos inibidores (Warth, 1989-b). Segundo este autor as estirpes mais sensíveis de *S. cerevisiae* são as de menores dimensões celulares. As duas estirpes de *Zygosaccharomyces rouxii* estudadas, apesar de possuírem idêntica permeabilidade à forma não dissociada dos ácidos a mais resistente apresentava uma menor razão V/A. No entanto, ambas possuíam valores de V/A menores quando comparados com *Z. bailii*. Nesta espécie, a estirpe mais permeável e de menor dimensão foi a que apresentou maior sensibilidade. *Schizosaccharomyces pombe* apresentou um comportamento distinto dos anteriores, sendo de todas as espécies testadas a de menor permeabilidade ao ácido benzóico, possuindo no entanto, uma tolerância ao ácido menor do que *Z. bailii*, sugerindo uma maior sensibilidade intrínseca ao ácido.

1.4 - Leveduras de contaminação alimentar

As leveduras, taxonomicamente incluídas no reino dos Fungos, são organismos eucariontes heterotróficos que passam a maioria do seu ciclo de vida na fase unicelular. São providas de parede celular constituída essencialmente por manano, glucano e/ou quitina. A maioria são saprófitas, conhecendo-se, no entanto, alguns casos de parasitismo. Reproduzem-se assexuadamente por gemulação ou por divisão binária e sexuadamente mediante a formação de ascos no interior dos quais se encontram os ascósporos (Ascomycotina) ou de basídios que se diferenciam em basidiósporos (Basidiomycotina). Em algumas espécies, a reprodução sexuada ainda é desconhecida, sendo incluídas na sub divisão Deuteromycotina (Kreger-van Rij, 1984).

Os habitats das leveduras são variados, adaptando-se às mais diversas condições ecológicas. É pois natural, a sua ocorrência nos alimentos e bebidas e no ambiente em geral da indústria alimentar, devido à sua presença nas matérias primas, no equipamento e à sua disseminação através da atmosfera, operários e insectos. No entanto, das cerca de 600 espécies de leveduras actualmente conhecidas apenas um número relativamente pequeno assume um papel relevante na contaminação alimentar. Contudo, a importância destes organismos na

deterioração de produtos, tem vindo a aumentar, sendo, actualmente responsável por enormes perdas económicas. São várias as razões que podem contribuir para esta situação, entre os quais se salientam: introdução de novas tecnologias no processamento, novas formulações e diminuição da utilização de conservantes particularmente efectivos contra leveduras. Por este motivo, surgiu o conceito de levedura de alteração ou deterioração que engloba todas as espécies susceptíveis de provocar alterações indesejáveis de alimentos e bebidas. Esta denominação não deve ser confundida com o termo "leveduras de contaminação" relativo às leveduras isoladas de alimentos mas que não apresentam necessariamente capacidade para os deteriorar. As espécies de leveduras de deterioração isoladas de produtos alimentares, assim como as principais alterações provocadas por estes organismos, são referidas na tabela 1.3. Convém no entanto, referir que o conceito de levedura de contaminação é muitas vezes condicionado pelo tipo de produto em que esta exerce a sua actividade e que a degradação microbiana de alimentos é um processo competitivo que ocorre entre bactérias, leveduras e bolores.

Vários são os factores que condicionam a deterioração de um alimento ou bebida por microrganismos, em geral e por leveduras em particular. Entre estes factores destacam-se: disponibilidade de nutrientes, pH e capacidade tampão, actividade da água (a_w), temperatura, teores de conservantes, teor em açúcar residual, teor alcoólico e o nível de contaminação inicial (Malfeito Ferreira, 1990). O crescimento e a actividade metabólica dos microrganismos são significativamente afectados pelo valor de pH dos alimentos. Ainda que sejam capazes de crescer numa vasta gama de valores de pH, desde 1,5 em produtos cítricos a 7,8 no leite e derivados, o seu pH óptimo de crescimento situa-se entre 4,0 e 5,5 (Corlett e Brown, 1980). Geralmente, as leveduras são mais resistentes a valores reduzidos de pH e a_w do que as bactérias. Os fungos (bolores e leveduras) constituem a flora própria de alimentos e bebidas ácidas (pH inferior a 4,5) e com uma quantidade de água disponível que varia entre 0,91 e 0,60 (Jay, 1986). Convém, no entanto, salientar que o pH mínimo de crescimento de um microrganismo não é fácil de estabelecer, dado ser fortemente influenciado pela natureza dos ácidos e outros compostos presentes e, ainda por outros factores ambientais. Com efeito, na maior parte dos casos a estabilidade microbiana dos alimentos, nomeadamente do vinho, só se consegue através da compreensão de todos os factores epidemiológicos, ecológicos, fisiológicos e taxonómicos que determinam a contaminação pelos microrganismos envolvidos. Uma concepção fabril, um equipamento de fácil limpeza, uma escolha do programa de sanificação, um controlo microbiológico adequado, uma sensibilização dos meios humanos intervenientes na produção, serão por conseguinte, instrumentos valiosos na luta contra as alterações de alimentos provocados por leveduras (Thomas e Davenport, 1985).

Tabela 1.3

Principais leveduras de deterioração de produtos alimentares, características indesejáveis mais significativas e alimentos onde têm sido encontrados (adaptado de Quintas, 1993)

Leveduras	Características importantes	Alimentos
<i>Brettanomyces intermedius</i>	Produção de aromas anormais em cereja, cidra, e "soft drinks".	Vinhos.
<i>Cândida krusei</i>	Resistência a conservantes, formação de películas em azeitonas, pickles e molhos.	Cacau, produtos cítricos, concentrado de laranja, iogurte.
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Crescimento a valores de a_w reduzidas em alimentos conservados com NaCl, especialmente em carnes e produtos cárneos.	Refrigerantes gaseificados, vinho engarrafado, sumo de laranja, salmouras, leite e derivados.
<i>Kloeckera apiculata</i>	Deterioração de frutos frescos e transformados.	Cerveja, sumos, concentrado de laranja.
<i>Pichia membranefaciens</i>	Resistência a conservantes. Formação de películas em azeitonas, pickles e molhos.	Refrigerante gaseificado, cerveja, vinho em barris e engarrafado.
<i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Rhodotorula rubra</i>	Contaminante comum. Raramente associada à deterioração de frutos frescos.	Vinho engarrafado, natas, manteiga, gelados.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Contaminante ubíquo. Fermentações indesejáveis em "soft drinks".	Vinhos engarrafados, a granel, em barris e em depósito, vinhos leves adamados, cerveja, molhos, azeitonas em salmoura, sumos gaseificados ou não, iogurte e queijos.
<i>Saccharomyces exiguus</i>	Moderada resistência aos conservantes. Ocorrência comum em salmoura de azeitonas. Relativamente rara como causa de deterioração em choucroute, sumos, lacticínios ou "soft drinks".	Pickles, produtos cítricos.
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Resistência aos conservantes. Raramente constitui uma levedura de deterioração.	Recheios e coberturas de confeitaria, frutas cristalizadas.
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Resistência aos conservantes. Fermentações indesejáveis em produtos líquidos ácidos conservados como: sumos, molhos, cidras e vinhos.	Vinhos em barris, vinhos brancos engarrafados e em depósito, vinhos rosés secos, vinhos adamados, bebidas carbonatadas, pickles, xaropes, maionese, ketchup, geleias, fruta conservada, concentrados de sumos, sumo de uva e mosto.
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	Resistência aos conservantes. Propriedades intermédias entre <i>Z. bailii</i> e <i>Z. rouxii</i> .	Sumos gaseificados, marmelada, recheios e coberturas de confeitaria, flor de xerez.
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Resistência a valores de a_w muito reduzidos. Fermentações indesejáveis em concentrados de sumos, mel, geleias, produtos de pastelaria, frutos secos embalados.	Refrigerantes gaseificados ou não, vinho engarrafado, molho de soja, chocolate.

1.5 - O caso particular de *Zygosaccharomyces bailii*

1.5.1 - Características taxonómicas

Como já referido entre as leveduras de deterioração de alimentos destaca-se a espécie *Zygosaccharomyces bailii*. A sua actividade é responsável por consideráveis perdas económicas para a Indústria Alimentar.

Segundo Barnett *et al.* (1990); Kreger e van Rij (1984) as características taxonómicas de *Z. bailii* são as seguintes:

• Morfologia

A cor das colónias varia entre o branco e o creme, convexas lisas, muitas vezes acastanhadas no topo e com margem sinuosa. Verificam-se diferenças acentuadas de acordo com o meio utilizado. As células são cilíndricas e/ou elipsoidais, formando pares, pequenas cadeias ou cachos. O seu tamanho varia entre (3,5 - 6,5) x (4,5 - 11,5) μ .

• Formação de ascósporos

Da conjugação de duas células individuais resulta um asco que contem 2 a 4 ascósporos lisos de forma globosa ou elipsoidal, por célula.

c) Fermentação

D-Glucose +	Sacarose +, -	Celobiose -	Amido -
D-Galactose -	α , α -Trealose -, D	Melesitose -	D-Xilose -
Maltose -	Melibiose -	Rafinose +, -	
Me α -D-Glucosido -	Lactose -	Inulina -	

d) Assimilação/Crescimento

D-Glucose +	Inulina -	Metanol -	sem Piridoxina e Tiamina ?
D-Galactose+, -	Amido-	Etanol+	sem Niacina +
L-Sorbose-, D	Glicerol +, -	Propano 1,2 diol -	Sem PABA +
D-Glucosamina -	Eritritol -	Butano 2,3 diol -	a 25° C +
D-Ribose -	Ribitol+, -	Nitrato -	a 30° C +
D-Xilose -	Xilitol -, D	Nitrito -	a 35° C +,-
L-Arabinose -	L-Arabinitol -	Etilamina +	a 37° C +, -
D-Arabinose -	D-Glucitol+, D	L-Lisina +	a 40° C -
L-Ramnose -	D-Manitol+, D	Cadaverina +	0,01% Cicloheximida -
Sacarose+, -	Galactitol-	Creatina-	0,1% Cicloheximida -
Maltose -	Mio-Inositol -	Creatinina -	1% Ácido acético +

α, α -Trealose +,-	D-Glucano-1,5-lactona+,-	Glucosamina-	50% D-Glucose+
Me α -D-Glucosido -	2-Ceto-D-Gluconato +,-	Imidazole -	60% D-Glucose+,D
Celobiose -	5-Ceto-D-Gluconato -	sem Vitaminas -	
Salicina -	D-Gluconato -	sem mio- Inositol +	
Arbutina -	D-Glucuronato -	sem Pantotenato +	
Melibiose -	D-Galacturonato -	sem Biotina -	
Lactose -	DL-Lactato -	sem Tiamina +	
Rafinose -	Succinato -	sem Biotina e Tiamina -	
Melesitose -	Citrato -	sem Piridoxina +	

- Outras Características

Z. bailii não produz amido, não hidroliza a ureia e a reação com o composto azul de diazônio β é negativa. A razão guanina - citosina oscila entre 42,7-44,6. Possui o coenzima Q6.

1.5.2 - Importância na Indústria Alimentar

O habitat natural de *Zygosaccharomyces bailii* são os frutos secos e as gomas exsudadas de árvores de fruto. No entanto, a elevada tolerância a diversos factores ambientais adversos, associada à sua capacidade fermentativa tornam esta levedura uma das mais problemáticas na Indústria Alimentar. As características mais importantes como possível agente de alteração de alimentos e bebidas estão sumariadas na Tab. 1.4.

- Fonte de carbono e energia

Células de *Z. bailii* crescidas num meio de cultura com glucose e frutose como fonte de carbono e energia utilizam preferencialmente o último açúcar. Esta espécie é frutofílica e, segundo Emmerich e Radler (1983), ao contrário do que se verifica na espécie *Saccharomyces cerevisiae*, as permeases transportadoras da glucose e da frutose são, respectivamente, indutivas e constitutivas. A desassimilação da sacarose é mais lenta o que explica o facto da deterioração de alimentos aos quais foi adicionada sacarose não ocorrer imediatamente a seguir ao seu processamento. Adicionalmente, a taxa de alteração de um produto por esta levedura é condicionada pela concentração de um açúcar fermentescível, crescendo, por exemplo, mais rapidamente na presença de 10,0% de glucose do que na presença de 1,0%.

- pH

Z. bailii apresenta elevada resistência ao pH, podendo crescer a pH 2,2, na presença de ácido cítrico (Pitt, 1974).

Tabela. 1.4

Zygosaccharomyces bailii - características de importância tecnológica (adaptado de Thomas e Davenport, 1985).

Crescimento em produtos com um valor de pH que varia entre 2,0 e 7,0

Tolerância a ácidos orgânicos, i. e., > 2,5% (v/v) de ácido acético

Crescimento em produtos com concentrações de açúcares > 70% (v/v)

Tolerância ao calor > 75° C

Tolerância ao dietilpirocarbonato > 500 ppm

Tolerância ao ácido benzóico > 1000 ppm

Tolerância ao ácido sórbico > 800 ppm

Tolerância ao dióxido de enxofre > 3 ppm de SO₂ molecular

Tolerância ao etanol > 20% (v/v) etanol

Tolerância ao vapor de acetaldeído > 3% (v/v)

Tolerância a alguns agentes industriais de esterilização

Algumas estirpes são capazes de sintetizar as suas próprias vitaminas

• Conservantes ácidos

Algumas estirpes de *Z. bailii*, apresentam uma resistência extraordinária aos ácidos, sendo capazes de crescer na presença de concentrações de ácido sórbico ou benzoico superiores a 600 ppm para valores de pH inferiores ao pK_a do ácido (Pitt, 1974). Este autor observou também que, concentrações em ácido acético de 2% são insuficientes para evitar a alteração do sumo de tomate por esta levedura. Estas concentrações são superiores aos limites legais para aquelas substâncias em alguns produtos alimentares, nomeadamente vinho.

Esta levedura possui também, elevada resistência ao SO₂ (Rankine e Pilone, 1973; Hammond *et al.*, 1976; Thomas e Davenport, 1985) e agentes sanificantes (Neumayr *et al.*, 1989) e apresenta uma capacidade de adaptação a doses sub-letais dos agentes antimicrobianos utilizados na indústria alimentar, como o SO₂ (Delfini, 1988), o ácido benzoico (Warth, 1977) e o ácido sórbico (Thomas e Davenport, 1985).

• Etanol

Esta levedura possui elevada tolerância ao etanol, cuja resistência é, por vezes superior à de *S. cerevisiae* (Whiteley e Simpson, 1978). Esta característica é evidenciada pelas refermentações secundárias que provoca em vinhos com elevados teores de SO₂ e com

concentrações em etanol inferiores a 11,5% (v/v) constituindo um dos principais problemas nas regiões onde se produz vinho branco (Thomas e Davenport, 1985). Adicionalmente o etanol reduz a resistência ao ácido benzoico. Por outro lado, concentrações elevadas de frutose (20 a 50%) aumentam a sensibilidade ao etanol (Warth, 1986).

- Actividade da água (a_w)

Z. bailii resiste a valores de a_w de 0,80, sendo considerada por Pitt e Hocking (1985) como uma levedura xerófila. É uma levedura típica dos alimentos ricos em sacarose (Tilbury, 1980).

- Temperatura

Z. bailii é um organismo considerado mesófilo (Pitt e Hocking, 1985) capaz de crescimento numa gama de temperaturas compreendida entre os 5 e 35 ° C.

Put e De Jong (1982) ao comparar a resistência térmica de *Z. bailii* com a de *S. cerevisiae* constataram que as formas vegetativas de *Z. bailii* apresentam uma resistência semelhante às de *S. cerevisiae*; porém os ascósporos de *Z. bailii* são menos resistentes do que os esporos da última espécie. No entanto, a resistência às altas temperaturas dentro da mesma espécie varia com a estirpe. Por outro lado, a resistência ao calor aumenta em meios com teores elevados de açúcares e poliois (Corry, 1976, citado por Thomas e Davenport, 1985).

De facto, estas espécies alteram principalmente produtos alimentares com valores de pH e actividade da água reduzidos, que contenham açúcares fermentescíveis e/ou outros compostos de carbono assimiláveis (etanol, glicerol, ácido acético), uma fonte de azoto, vitaminas do grupo B e conservantes ácidos (Thomas e Davenport, 1985).

A natureza da extensão das alterações provocadas por *Z. bailii* podem variar com o nível de contaminação inicial (Warth, 1986), com a composição química do produto (Thomas e Davenport, 1985), com a utilização de tratamentos térmicos (Put e De Jong, 1982), com as condições de embalagem e de armazenamento (Thomas e Davenport, 1985) e com a higiene e sanificação do equipamento e ambiente (Seiler, 1980). De uma forma sumária, tais alterações traduzem-se basicamente em:

- Produção de gases;
- Alterações sensoriais resultantes da modificação da cor, turvação, carbonatação e aroma;
- Alteração do sabor;
- Produção de aromas desagradáveis relacionados com a produção de H_2S ;
- Amolecimento dos produtos;

- Alteração da composição do alimento, o que pode proporcionar a invasão por outros microrganismos de contaminação. Por exemplo: a utilização de ácido acético em pickles por *Z. bailii* possibilita o aumento de pH, favorecendo a alteração por outras espécies menos acidófilas (Thomas e Davenport, 1985).

CAPÍTULO 2

EFEITOS DE ÁCIDOS FRACOS E DO ETANOL NA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1025, COMPARATIVAMENTE COM *Saccharomyces cerevisiae* IGC 4072

2.1 - Introdução

Ao longo de uma fermentação alcoólica o etanol, produto principal da actividade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* e de outras leveduras afins, pode acumular-se no meio extracelular exercendo, a partir de determinada concentração efeitos negativos sobre a actividade metabólica das leveduras. A tolerância ao etanol depende da estirpe e das condições em que decorre a fermentação nomeadamente temperatura, composição do meio e presença de O₂, indispensável à biossíntese de esteróis e ácidos gordos insaturados.

No entanto, os efeitos tóxicos observados para o etanol quando adicionado ao meio extracelular não são suficientes para explicar paragens do crescimento e/ou da fermentação levadas a cabo por leveduras. Maiorela *et al.* (1983) referem que os subprodutos finais da fermentação podem potenciar os efeitos tóxicos do etanol. O ácido acético, sub-produto da fermentação alcoólica resultante quer da actividade metabólica das leveduras quer das bactérias lácticas e acéticas contaminantes, é um potencial candidato. Afecta negativamente o estado de populações de leveduras, nomeadamente, a taxa específica de crescimento, a taxa de fermentação e a viabilidade das células (Pampulha, 1989; Pampulha e Loureiro, 1989; Pampulha e Loureiro Dias, 1989; Pinto *et al.*, 1989; Ramos e Madeira Lopes, 1990; Warth, 1991-b; Rodrigues Alves *et al.*, 1992). Os ácidos propiónico, butírico e pentanóico encontram-se igualmente presentes, ainda que em concentrações relativamente baixas, no meio de fermentação podendo induzir também efeitos negativos na levedura *S. cerevisiae* (Cardoso, 1994).

O ácido sórbico é um ácido gordo insaturado utilizado como antiséptico em numerosos produtos alimentares incluindo vinhos adamados, que afecta negativamente a actividade de leveduras principalmente a taxa de crescimento e o rendimento em biomassa, embora existam diferenças na resposta das leveduras à sua toxicidade. As doses legais utilizadas nos vinhos são inferiores ou iguais a 200 mg/l.

Tal como no caso do etanol, também a toxicidade destes compostos é dependente da estirpe de levedura e condicionada por factores ambientais vários, como a temperatura, pH e composição do meio de cultura. No presente capítulo, procedeu-se ao estudo dos efeitos dos ácidos acético, propiónico, butírico, pentanóico e sórbico no crescimento de

Zygosaccharomyces bailii ISA 1025, quando cultivada num meio com glucose, como única fonte de carbono e energia. Em paralelo, desenvolveram-se estudos respeitantes aos efeitos do etanol no crescimento da levedura nas mesmas condições experimentais. Os efeitos negativos dos ácidos acético e sórbico e do etanol foram também estudados em função da temperatura. Adicionalmente e de uma forma sistematizada os resultados obtidos foram comparados com os obtidos na levedura *S. cerevisiae*.

2.2 - Crescimento e morte celular e sua dependência da temperatura em leveduras. Breve Revisão.

A temperatura é um dos factores ambientais que afecta significativamente a actividade dos microrganismos limitando os mecanismos termoadaptativos (ex.: variação da composição lipídica das membranas) e as reacções químicas que ocorrem no interior da célula.

Sabe-se desde há longa data, que temperaturas suficientemente elevadas provocam a morte de microrganismos. Tal está intimamente associado à prática da esterilização conduzida pelo calor. A morte celular induzida por temperaturas elevadas letais é designada por "Morte Térmica". Por sua vez a dependência do crescimento de uma dada população microbiana e da morte celular com a temperatura é habitualmente expressa pelo designado "Perfil de Temperaturas". Este, por sua vez, é constituído pelos gráficos de Arrhenius das taxas específicas do crescimento (k_c) e das taxas específicas de morte térmica (k_d), conforme se esquematiza na figura 2.3.

Os parâmetros k_c e k_d , em condições bem definidas são característicos de uma dada estirpe microbiana pelo que se revestem de particular importância em Microbiologia. Em particular, no caso das leveduras, estudos sistematizados sobre a definição destes parâmetros e a sua dependência com a temperatura iniciaram-se na década dos anos sessenta e estão por excelência associados às publicações de van Uden e colaboradores (1967; 1968; 1969; 1970; 1971; 1974; 1975; 1976; 1981; 1983; 1984-a e b; 1985 e 1989-a,b e c).

2.2.1 - Crescimento exponencial

O crescimento dos organismos pode ser encarado individual ou colectivamente. Nos seres superiores geralmente, é dedicada maior relevância ao crescimento individual. Nos microrganismos, porém, dadas as suas reduzidas dimensões, leva a que se dê, como regra, mais atenção ao crescimento das populações. No entanto, ambos os conceitos estão bastante interligados.

A avaliação do crescimento microbiano, em determinado momento, pode ser efectuada através de determinações de biomassa (peso seco), de densidade óptica, de massa de um

componente celular, quantidade de substrato consumido ou produto formado, de taxas metabólicas, contagens de células totais e de unidades viáveis.

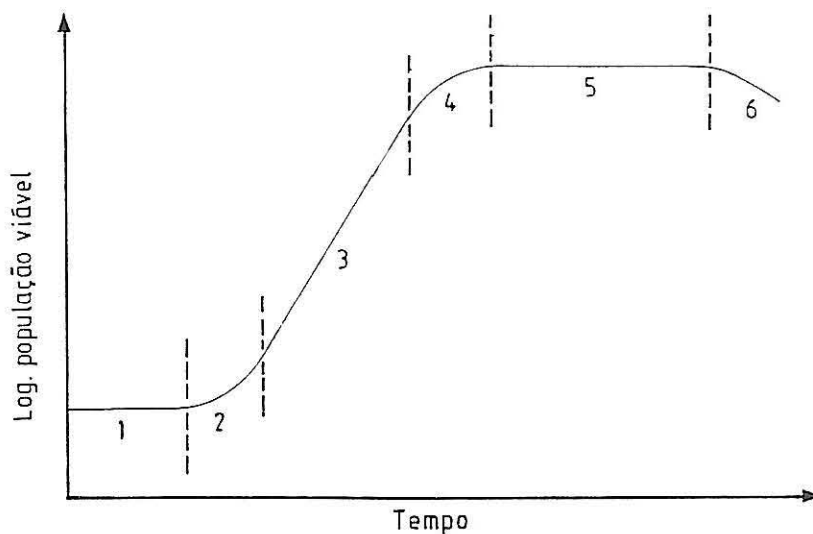


Fig.2.1 - Curva de crescimento de um microrganismo em sistema fechado.

- 1 - Fase de latência $k_c^a) = 0$
- 2 - Fase de aceleração $0 < k_c < k_c \text{ max}^b)$
- 3 - Fase exponencial de crescimento $k_c = k_c \text{ max}$
- 4 - Fase de desaceleração $0 < k_c < k_c \text{ max}$
- 5 - Fase estacionária $k_c = 0$
- 6 - Fase de morte celular

a) Taxa específica de crescimento

b) Taxa específica máxima de crescimento.

Consideremos uma população de células microbianas homogeneamente distribuídas, inoculada num meio de cultura líquido, com composição química e pH adequados, bem agitado e arejado, se necessário a temperatura constante e apropriada. Ao fim de algum tempo, verifica-se que os microrganismos começam a crescer. Se representarmos em papel semilogarítmico os

valores da densidade populacional, expressa por exemplo pela densidade óptica, em função do tempo, obtém-se uma curva que apresenta uma série de fases sequenciais e distintas entre si, reflectindo modificações no estado fisiológico do microrganismo e do seu meio de cultura (Fig. 2.1). Nestas condições após um período de latência variável (Fase 1), durante o qual o microrganismo se adapta às novas condições ambientais, inicia-se a divisão celular com uma velocidade de crescimento a aumentar progressivamente, até atingir a taxa de crescimento, k_c , máxima (Fase 2). Segue-se a fase de crescimento em que o valor de k_c é constante e corresponde ao valor máximo, k_c^{max} . Esta fase de crescimento (Fase 3) é designada por "crescimento exponencial". O aumento da população microbiana pode ser avaliado ao longo do tempo. Num intervalo de tempo infinitamente pequeno (dt), há um aumento da população (dx) que é proporcional à biomassa presente e ao intervalo de tempo. Isto é:

$$dx = k_c \times dt \quad \text{ou} \quad \frac{dx}{dt} = k_c \times x \quad (2.1)$$

em que x representa a densidade populacional, $\frac{dx}{dt}$ a taxa de crescimento da população em cada instante e k_c a taxa específica de crescimento, expressa em unidades do inverso do tempo (T^{-1}).

Enquanto o meio de cultura mantém as propriedades físico-químicas, observa-se um aumento exponencial da densidade populacional. O valor da taxa específica de crescimento mantém-se invariável com o tempo de acordo com a seguinte equação:

$$x_t = x_0 e^{k_c t} \quad (2.2)$$

em que x_t e x_0 são as densidades populacionais nos tempos t e 0 , respectivamente.

Logaritmizando a equação anterior obtemos:

$$\ln x_t = \ln x_0 + k_c t \quad (2.3)$$

A partir do declive da recta experimental correspondente ao crescimento exponencial (Fig. 2.1 - Fase 3) e de acordo com a equação 2.3, poder-se-á estimar o valor da taxa específica de crescimento.

Em cultura descontínua, ou em sistema fechado, como os nutrientes não são renovados nem retirados os produtos do metabolismo (excepção para a troca de gases) mais cedo ou mais tarde, quer devido à acumulação de inibidores quer devido à insuficiência de nutrientes, a taxa específica do crescimento diminui até se reduzir a zero - fase que é designada estacionária. Segue-se-lhe eventualmente a autólise celular (Fig. 2.1).

A taxa específica do crescimento constitui um parâmetro biológico, cujo valor depende da estirpe microbiana e é fortemente influenciada pelas condições físicas (pH, actividade da água, tensão de oxigénio, presença de inibidores) e químicas (particularmente a natureza e concentração da fonte de carbono e de energia) do meio.

A taxa específica de crescimento é igualmente uma função da temperatura.

2.2.2 - Morte térmica microbiana

Em microbiologia uma célula está morta quando perdeu irreparavelmente a sua capacidade de multiplicação, quando inoculada num meio apropriado.

Assim, quando uma população de células, é submetida a temperaturas superiores à T_{max} , é possível observar a ocorrência de morte celular. A velocidade de morte será função do agente letal e das condições ambientais a que os microrganismos estão expostos.

Para avaliar a morte celular retiram-se amostras em intervalos de tempo definidos, as quais são semeadas em superfícies de meio apropriado contido em placas de petri. Após incubação procede-se à contagem das colónias desenvolvidas.

Seguindo uma metodologia idêntica à usada no crescimento, se representarmos em gráfico o logaritmo natural do número de células viáveis (%) em função do tempo de exposição a uma temperatura letal, em leveduras geralmente, obtêm-se curvas do tipo da figura 2.2, que são

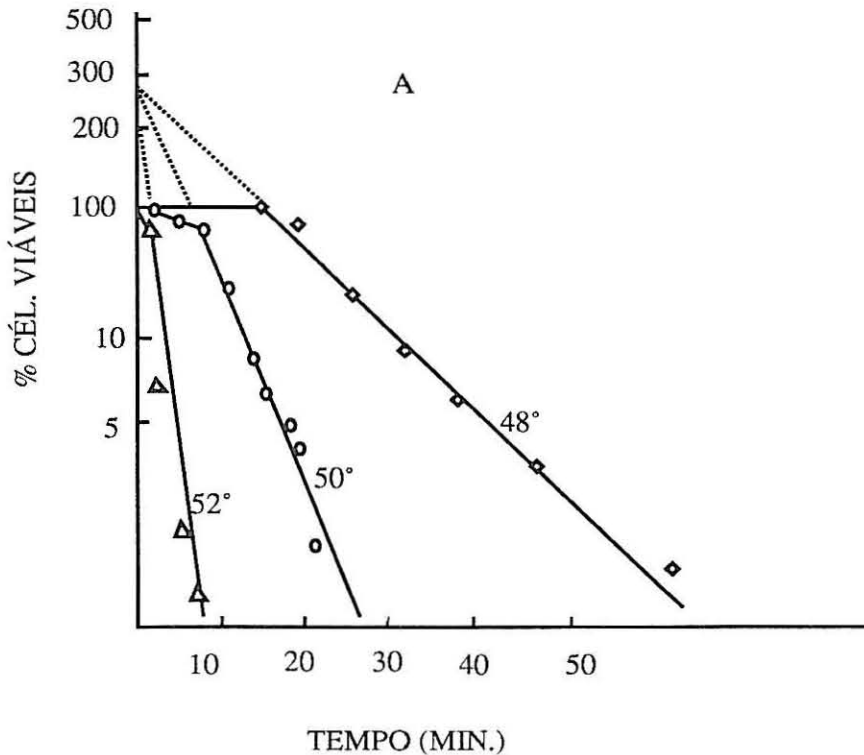


Fig. 2.2 - Curvas de sobrevivência de *Saccharomyces cerevisiae* a várias temperaturas letais. (adaptado de van Uden *et al.*, 1968).

constituídas por uma recta que poderá ser precedida de um patamar. No entanto, de acordo com os dados na literatura, poder-se-ão obter mais dois tipos de curvas de sobrevivência. A curva pode ser totalmente linear; a parte linear pode ser seguida por uma segunda recta de menor declive. Este tipo de curva de sobrevivência indica a existência de uma sub-população mais resistente (Farel e Rose, 1967)

O cálculo da taxa específica de morte térmica, k_d , é feito com base no declive da parte linear da curva semilogarítmica de sobrevivência, a partir da equação:

$$\ln x_t = \ln x_0 - k_d t \quad (2.4)$$

em que x_t e x_0 são respectivamente o número de células viáveis no tempo t , e no início da experiência de morte, k_d representa a taxa específica de morte térmica, com dimensões de inverso do tempo.

A partir da equação 2.4 obtém-se:

$$x_t = x_0 e^{-k_d t} \quad (2.5)$$

E diferenciando:

$$\frac{dx}{dt} = -k_d x_0 e^{-k_d t} \quad (2.6)$$

Conjugando as duas equações anteriores, obtém-se:

$$\frac{dx}{dt} = -k_d x \quad (2.7)$$

ou seja:

$$k_d = -\frac{dx}{dt} \frac{1}{x} \quad (2.8)$$

em que dx/dt representa o decréscimo instantâneo da população viável x .

A morte celular que varia de acordo com uma cinética expressa pela equação 2.8 é designada de morte exponencial.

A taxa específica de morte para uma dada estirpe microbiana, e para uma dada temperatura, é uma constante sob condições experimentais bem definidas e controladas. Com efeito, a resistência térmica da população de leveduras pode variar com o pH, composição do meio extracelular, presença de drogas, ou ainda com o estado fisiológico da cultura.

Assim, quando se pretende estudar o efeito de uma só variável (como por exemplo a temperatura) na cinética de activação da morte térmica, devem padronizar-se cuidadosamente as condições de inóculo e de experiência.

Saccharomyces cerevisiae, à semelhança das outras leveduras mesófilas possui um

perfil térmico associativo (Simões Mendes *et al.*, 1978), em que o crescimento e a morte estão associados para temperaturas superiores à temperatura óptima. Neste caso, a extrapolação do gráfico de Arrhenius das taxas específicas da morte térmica intersepta o gráfico de Arrhenius das taxas específicas de crescimento, numa zona de temperaturas com significado biológico, tal como está representado na figura 2.3. Esta figura esquematiza um perfil de temperaturas do tipo associativo, representando a variação de k_c em função da temperatura, sob a forma de gráfico de Arrhenius.

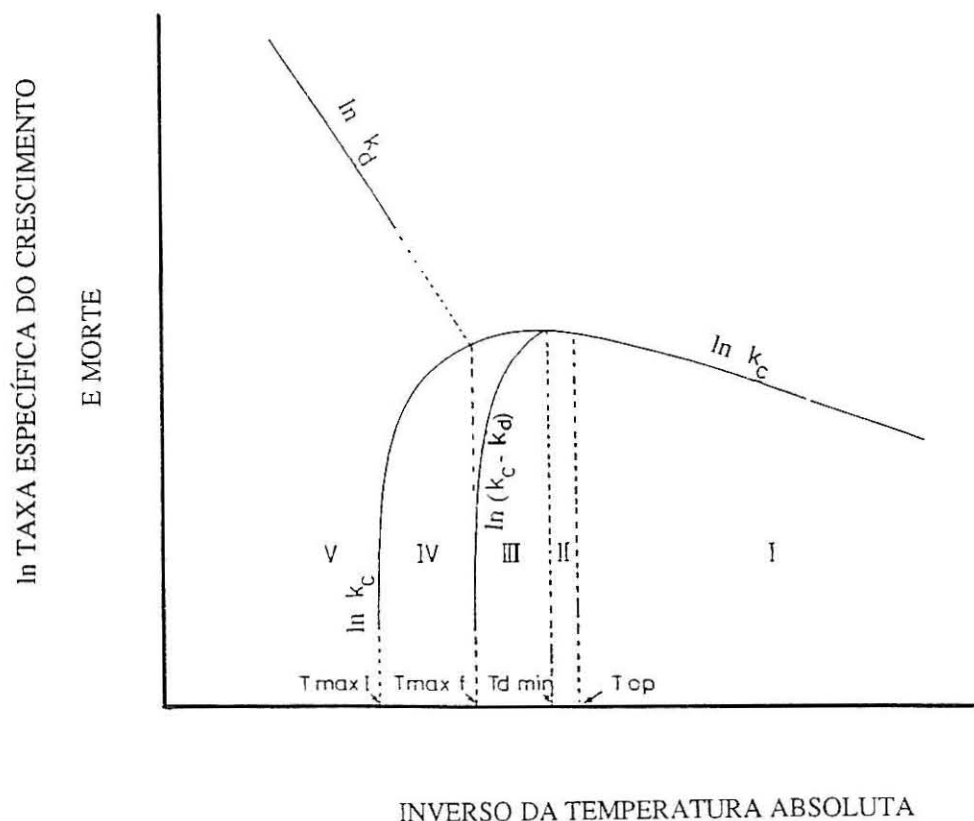


Fig. 2.3 - Gráfico de Arrhenius de uma levedura com perfil associativo (adaptado de van Uden, 1984-a).

Na curva observa-se a presença de duas zonas distintas de crescimento (subóptima e supraóptima), separadas pela temperatura óptima de crescimento à qual K_c tem o seu valor máximo. Para temperaturas inferiores à óptima observa-se um aumento progressivo de k_c desde o seu valor mínimo à temperatura mínima à qual o crescimento é mensurável (T_{min}) até à T_{op} . A zona supraóptima corresponde a uma diminuição muito acentuada do valor de k_c à medida que a temperatura aumenta, a qual se anula à temperatura máxima de crescimento (T_{max}), que é por definição a temperatura acima da qual não é mensurável crescimento.

A maior parte das leveduras, particularmente as presentes nos alimentos, comportam-se como microrganismos mesófilos (T_{max} entre 25° C e 50° C). Algumas no entanto, são psicrófilas cuja T_{max} de crescimento anda à volta de 7 a 20° C e cujo valor óptimo ronda os 12 a

15 ° C (Phaff *et al.*, 1978) e outras, designadas por Carmo - Sousa (1969) psicrófólicas, só crescem numa estreita gama de temperaturas (entre 20 - 30 ° C e 42 - 45 ° C). Não se encontraram até hoje leveduras termófilas (T_{max} superior a 50 ° C). A T_{min} das leveduras mesófilas é superior a 0 ° C, situa-se frequentemente entre 5 - 10 ° C (Phaff *et al.*, 1978).

Estas duas temperaturas limites, conjuntamente com a temperatura óptima de crescimento, são, pela sua importância na caracterização do perfil de temperaturas de um microrganismo, chamadas as temperaturas cardiais.

Neste caso (leveduras com perfil do tipo associativo) para $T > T_{op}$, ocorrem dois períodos exponenciais distintos de crescimento: na primeira fase não se detecta ainda a morte, na 2ª, associada ao crescimento observa-se aparecimento de morte celular da população viável. No 2º período a taxa específica de crescimento decresce acentuadamente em relação à do 1º período, assume, no entanto um valor positivo igual a $(k_c - k_d)$. Deste modo, para leveduras que apresentem este comportamento o conceito de temperatura cardinal - T_{max_c} descrito previamente por Johnson *et al.* (1954) foi alterado, definindo-se duas temperaturas máximas de crescimento, com base na interferência do fenómeno de morte (van Uden e Madeira Lopes, 1970). T_{max_i} (a temperatura máxima inicial do crescimento) e a T_{max_f} (a temperatura máxima final do crescimento). Entre a T_{op} e a T_{max_f} , no 2º período, a taxa específica de crescimento passa por um valor mais baixo em relação ao do 1º período, sendo no entanto superior à de morte. Entre a T_{max_f} e a T_{max_i} , no 2º período, a taxa específica de morte é superior à de crescimento, não se observando crescimento líquido no segundo período. Não iremos aprofundar os aspectos teóricos subjacentes ao 2º período de crescimento porque o trabalho experimental desenvolvido nesta tese tem como objectivo estudar os efeitos do etanol e dos ácidos orgânicos na taxa específica de crescimento do 1º período. Com efeito, os resultados apresentados dizem respeito ao efeito do etanol e dos ácidos orgânicos na taxa específica do crescimento do 1º período em que se observa unicamente crescimento.

Noutro tipo de leveduras, as representações de Arrhenius para o crescimento e para a morte não se intersectam, no ponto correspondente à T_{max} de crescimento numa zona de temperaturas com significado biológico. Por outro lado o Arrhenius de k_c não se dicotomiza acima da T_{op} , visto não ocorrer morte exponencial em simultâneo com o crescimento a temperaturas mais elevadas do que a temperatura óptima. O perfil térmico destas leveduras é designado por não associativo ou dissociativo: é o caso de leveduras psicrófilas e de algumas termotolerantes (van Uden *et al.*, 1968; Madeira Lopes, 1974, 1982, 1987 e 1992). Nestas leveduras os processos que regulam a morte térmica são distintos dos que limitam o valor da T_{max} (van Uden *et al.*, 1968).

2.2.3 - Efeitos de tóxicos nas relações de temperatura

Em *Saccharomyces cerevisiae* e em algumas outras leveduras têm-se vindo a acumular resultados que indicam que o etanol e ácidos fracos, induzem efeitos no microrganismo que como última consequência podem levar à perda total da viabilidade das células. Os efeitos tóxicos acentuam-se com a temperatura. Muitos dos mecanismos subjacentes a estes efeitos negativos são conhecidos empiricamente.

Em *S. cerevisiae* a presença de etanol no meio de cultura, provoca uma diminuição da T_{op} e de T_{max} (van Uden e Duarte, 1981) e um aumento da T_{min} (Sá Correia e van Uden, 1983). Para concentrações de etanol superiores a 3,0% (p/v) verifica-se um deslocamento acentuado da T_{op} e T_{max} efeito que se intensifica à medida que aumenta a concentração de álcool no meio extracelular. Ainda, em *S. cerevisiae*, o etanol desloca o perfil de temperaturas de crescimento e morte, para uma zona de temperaturas mais baixas, mantendo-se, no entanto, o perfil do tipo associativo. A amplitude da deslocação depende da concentração de álcool no meio de suspensão de células.

Tal como o etanol, também o ácido acético desloca o perfil de temperaturas de *S. cerevisiae* (Ramos e Madeira Lopes, 1990) e de *Candida shahetae* (Rodrigues Alves *et al.*, 1992) em bloco para uma zona de temperaturas inferiores, aumentando para uma determinada temperatura, a taxa específica de morte térmica e diminuindo a de crescimento. Consequentemente, estreita-se a gama de temperaturas às quais é possível observar crescimento.

No que respeita à morte térmica e em *S. cerevisiae* os respectivos gráficos de Arrhenius na ausência e na presença de concentrações crescentes de etanol, constituem uma família de rectas intrinsecamente paralelas e deslocadas para uma zona de temperaturas mais baixas (Leão e van Uden, 1982). Estes resultados foram interpretados como, indicativos de que o etanol tem efeito na entropia de activação da morte térmica (ΔS^\ddagger que definiremos no capítulo 3), sem no entanto modificar significativamente a sua entalpia de activação (ΔH^\ddagger que definiremos no capítulo 3). Isto indica que, o etanol aumenta a morte térmica desorganizando as suas moléculas termosensíveis e tornando-as mais sensíveis ao calor.

Os resultados indicaram ainda, que a temperatura constante a entropia de activação da morte térmica aumentava linearmente com a concentração de etanol utilizada nas experiências de morte térmica. A relação entre as duas variáveis foi traduzida pela equação:

$$\Delta S_x^\ddagger = \Delta S_0^\ddagger + C_E^A \times x \quad (2.9)$$

em que S_x^\ddagger e S_0^\ddagger representam, respectivamente, a entropia de activação da morte térmica para as concentrações x e 0 de etanol, C_E^A é o coeficiente entrópico para a fase aquosa e representa o aumento da entropia de activação da morte térmica por unidade de concentração

de etanol presente no meio extracelular.

Este parâmetro fornece uma ideia da sensibilidade da levedura aos efeitos negativos do etanol sobre a morte térmica: quanto mais elevado for o valor C_E^A maior será o efeito do etanol na entropia de activação da morte térmica.

Ainda e de acordo com os resultados e o modelo matemático deduzido para os efeitos do etanol por Leão e van Uden (1982), verifica-se que, em condições isotérmicas a taxa específica de morte térmica é uma função exponencial da concentração de etanol, segundo a equação:

$$\ln k_d^x = \ln k_d^0 + \frac{C_E^A}{R} x \quad (2.10)$$

em que k_d^0 e k_d^x são respectivamente, as taxas específicas de morte térmica na ausência e na presença de etanol à concentração x , a uma temperatura constante, R é a constante dos gases perfeitos.

Também os ácidos octanóico, decanóico (Sá Correia, 1986) e fórmico (Cardoso, 1994) e os alcanóis propanol, isopropanol e etanol (Leão e van Uden, 1982; van Uden, 1985), aumentam a morte térmica em leveduras, com estimulação essencialmente de ΔS^\ddagger , tendo sido possível correlacionar a toxicidade destes compostos com a sua solubilidade nos lípidos, expressa pelos respectivos coeficientes entrópicos. De acordo com os resultados os sítios responsáveis pela morte térmica encontram-se provavelmente relacionados com zonas lipídicas da membrana.

Foi ainda observado que os ácidos acético, propiónico, butírico e pentanóico bem com o etanol induziam dois tipos de morte em células de *S. cerevisiae* crescidas em meio com glucose como única fonte de carbono e energia: morte de alta entalpia (MAE) e morte de baixa entalpia (MBE). A MAE induzida pelos ácidos ou pelo etanol representa morte térmica estimulada pelos ácidos ou etanol, em que os efeitos tóxicos se fazem sentir na ΔS^\ddagger mas não na ΔH^\ddagger , sendo os valores de ΔH^\ddagger , na presença e na ausência de inibidor semelhantes. Por sua vez, os valores de C_E^A aumentam com os respectivos valores dos coeficientes de repartição lípido - tampão. Segundo os mesmos autores o segundo tipo de morte induzida pelos ácidos ou pelo etanol (MBE), é diferente do primeiro, ocorre a temperaturas mais baixas e a concentrações de inibidor mais elevadas. Além disso, apresenta valores de ΔH^\ddagger e C_E^A mais reduzidos do que os obtidos na MAE e semelhantes para os ácidos acético, butírico, propiónico e pentanóico. Em condições isotérmicas o estímulo da MBE aparentemente está correlacionado com uma acidificação intracelular, indicando que o abaixamento do pH intracelular, seria o mecanismo responsável pela indução da MBE por ácidos carboxílicos fracos ou pelo etanol a temperaturas

baixas e intermédias.

2.3 - Material e Métodos

2.3.1 - *Microorganismos*

Nos ensaios experimentais apresentados neste capítulo foram utilizadas as estirpes da levedura *Zygosaccharomyces bailii* 1025 e IGC 4072 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A estirpe 1025 foi isolada de um vinho pelo Laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Agronomia. A estirpe 4072 foi isolada no Instituto Gulbenkian de Ciência a partir de uma preparação comercial de levedura seca activa para vinificação, de origem francesa, designada comercialmente FERMIVIN e actualmente distribuída em Portugal por FERMENTOS HOLANDESES.

As estirpes foram mantidas em inclinados contendo meio de manutenção (meio M solidificado), a 17 ° C.

2.3.2 - *Meios de Cultura*

A composição do meio de manutenção utilizado bem como a preparação de inóculos encontra-se descrito no Apêndice (I).

A composição e preparação do meio de cultura M líquido utilizado nas experiências de crescimento encontra-se também descrito no Apêndice (I)

2.3.3 - *Preparação das culturas em fase exponencial*

Para a preparação dos inóculos utilizou-se o seguinte protocolo:

- a) Repicar a estirpe para um tubo com meio M solidificado (c.f. Apêndice I) e incubar a 25° C durante 24 a 48 horas
- b) Transferir uma ansada do inóculo para um balão de Erlenmeyer de 500 ml contendo 200 ml de meio M líquido, de modo a que a absorvância inicial a 640 nm, medida no espectrofotómetro, Bausch e Lomb "Spectronic 20" oscile entre 0,05 e 0,1.
- c) Incubar a cultura assim preparada a 25° C, numa incubadora Gallenkamp (150 rev/min), até se atingir a absorvância de 0,3 (50% de transmitância). Esta cultura, foi posteriormente utilizada como inóculo nas experiências de crescimento.

As culturas preparadas de acordo com o protocolo anteriormente referido foram designadas por culturas de células não adaptadas por oposição a células adaptadas provenientes de culturas no mesmo meio ao qual foi adicionado ácido conforme se descreve nos resultados.

2.3.4 - Experiências de crescimento

A cultura em fase de crescimento exponencial (s.f.secção 2.3.3) foi utilizada como inóculo nas experiências de crescimento. Para isso, foi transferido um volume que assegurasse uma densidade óptica inicial aproximadamente de 0,1, para um balão de 500 ml com 200 ml de meio M líquido adicionado de ácido ou etanol. Os balões foram rolhados com rolha de borracha, para evitar a evaporação dos ácidos ou do etanol. O crescimento, às diferentes temperaturas, foi realizado por introdução dos balões em banhos termorregulados (oscilação inferior a $\pm 0,1^\circ \text{C}$) munidos de agitação magnética. Para cada uma das experiências foi também inoculado um balão controlo (0%), contendo 200 ml de meio M líquido.

Ao longo do tempo, geralmente de duas em duas horas, foram retiradas amostras para medição da densidade óptica. Quando necessário procedia-se à diluição das amostras, para obter leituras de absorvância na parte linear da curva padrão que relaciona a densidade óptica com o número de células. Em todas as leituras, usamos como branco o meio de cultura.

2.3.5 - Cálculo das taxas específicas de crescimento

As taxas específicas de crescimento (k_c) foram calculadas a partir do declive da relação linear entre os valores experimentais da densidade óptica, a 640 nm e o tempo de cultura, tendo-se utilizado o método dos mínimos quadrados, de acordo com a seguinte equação.

$$\ln N_t = \ln N_0 + k_c t \quad (2.11)$$

em que k_c corresponde à taxa específica de crescimento, expressa em unidades do inverso do tempo (h^{-1} , por ex.), e N_t e N_0 à densidade populacional, expressa pela D.O. 640 nm, ao fim do tempo t e t_0 , respectivamente.

2.4 - Resultados

2.4.1 - Crescimento de *Zygosaccharomyces bailii* num meio com glucose - células não adaptadas

2.4.1.1 - Crescimento em função da temperatura na ausência de ácidos e de etanol

Numa primeira série de experiências foi estudada a variação da taxa específica de crescimento (k_c) de *Zygosaccharomyces bailii* com a temperatura num meio com 2% de glucose, a pH 4,0. O crescimento foi acompanhado por leituras de densidade óptica. Não tendo sido nossa preocupação estudar o perfil de temperaturas da levedura, as experiências foram realizadas durante um período de tempo que à partida corresponderá somente ao primeiro

período de crescimento. A ocorrência ou não de um segundo período de crescimento, descrito para outras leveduras requer estudos complementares que não foram realizados no âmbito desta tese. A figura 2.4 apresenta resultados típicos de experiências de crescimento, mostrando o aumento exponencial da densidade óptica com o tempo, a diferentes temperaturas. A partir do declive das rectas experimentais foram obtidas estimativas de k_c às diferentes temperaturas de ensaio. Cada um dos valores apresentados corresponde à média dos resultados obtidos em experiências realizadas em triplicado. Os valores de k_c foram então representados na figura 2.5 sob a forma de gráficos de Arrhenius modificados ($\ln k_c$ versus $1/T$). A partir destes resultados é possível extrapolar um valor compreendido entre 32 e 33° C para a temperatura óptima de crescimento de *Z. bailii* nas condições experimentais de cultura.

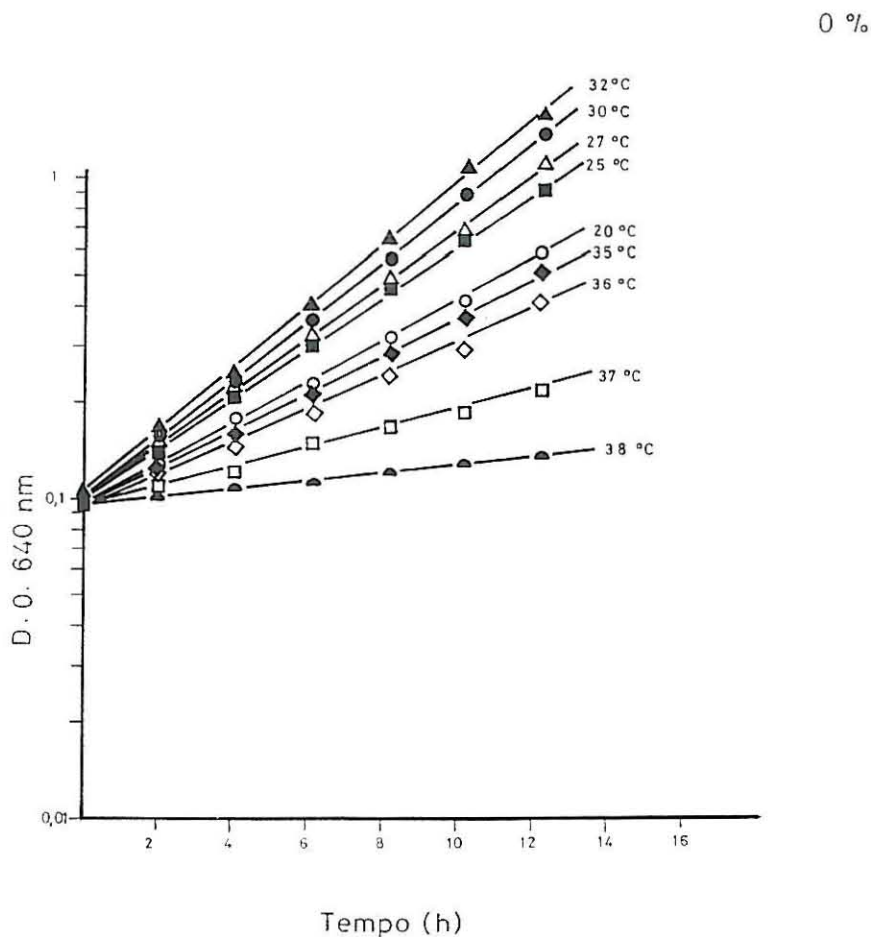


Fig. 2.4 - Gráficos semilogarítmicos da variação da densidade óptica com o tempo em *Z. bailii* ISA 1025, a diferentes temperaturas, na ausência de ácido e de etanol.

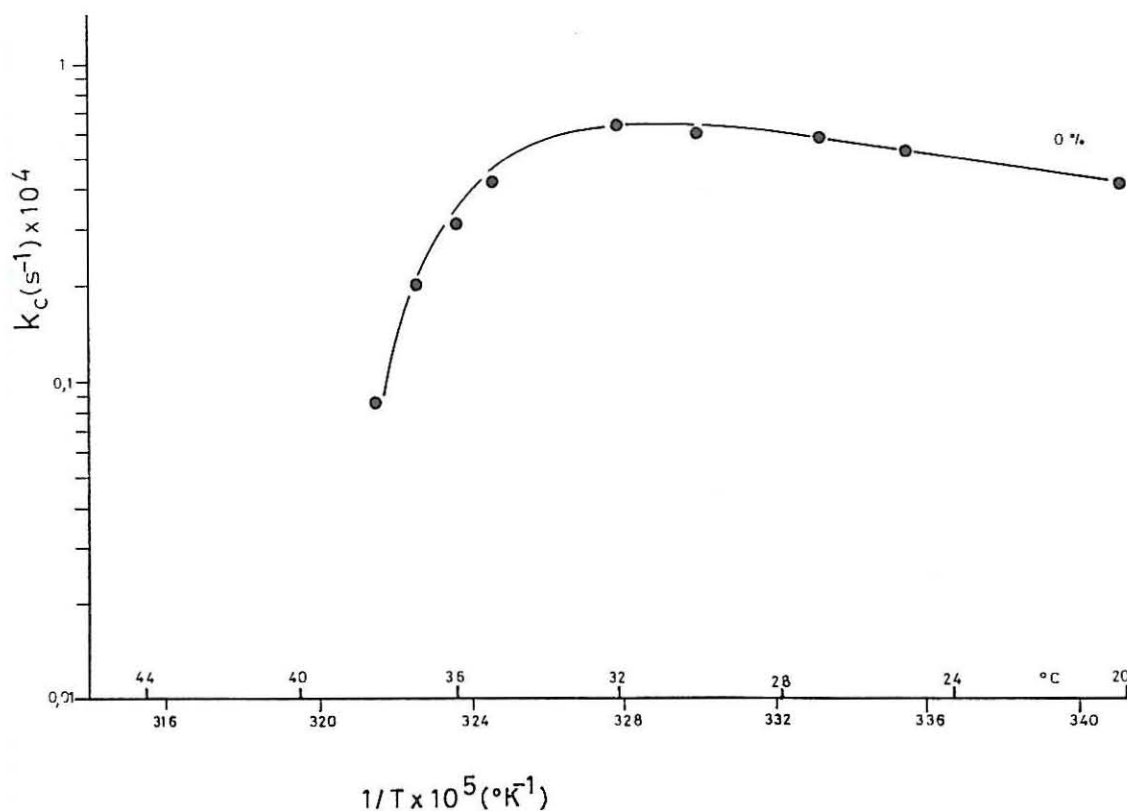


Fig. 2.5 - Gráficos de Arrhenius das taxas específicas do 1º período de crescimento de *Z. bailii* ISA 1025.

2.4.1.2 - Efeitos dos ácidos acético, propiónico, butírico, pentanóico e sórbico na taxa específica de crescimento

A adição de ácido à cultura provocou uma redução no valor de k_c . Para cada um dos ácidos ensaiados e às temperaturas experimentais, o efeito acentuou-se com o aumento da concentração do ácido no meio extracelular. Gráficos semilogarítmicos representativos da variação da densidade óptica com o tempo a várias concentrações de ácido (acético, propiónico, butírico, pentanóico e sórbico) a $25^\circ C$, estão representados na figura 2.6 (A, B, C, D e E).

Adicionalmente os valores obtidos para k_c , às diferentes temperaturas e na presença de ácidos, acético e sórbico, a várias concentrações encontram-se representados na figura 2.7 sob a forma de gráficos de Arrhenius modificados ($\ln k_c$ versus $1/T$). Uma primeira análise desta figura indica que a presença de ácidos no meio extracelular afectou negativamente a T_{op} do crescimento deslocando-a para valores mais baixos. O efeito acentuou-se com a concentração do ácido.

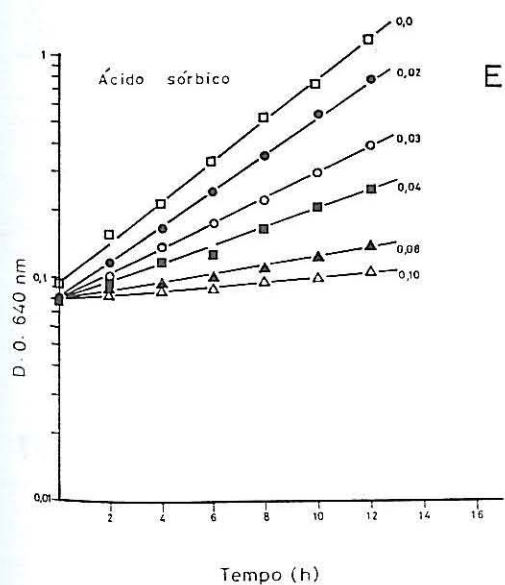
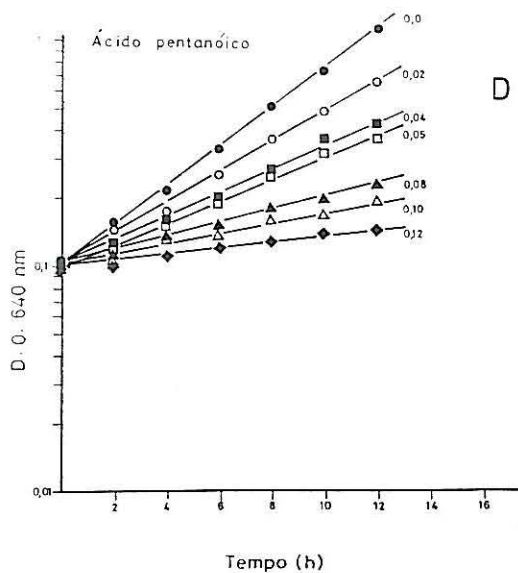
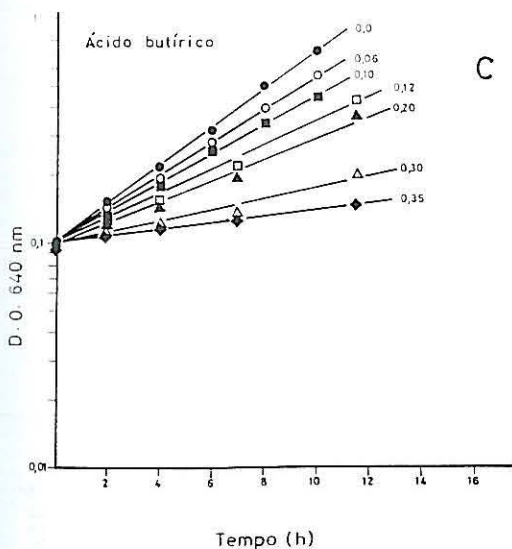
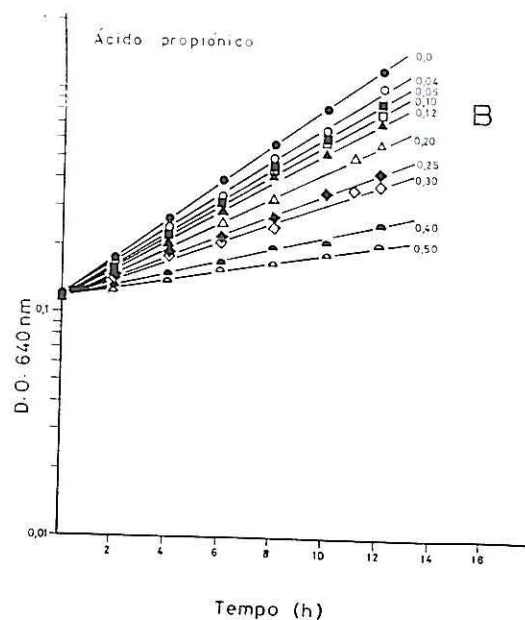
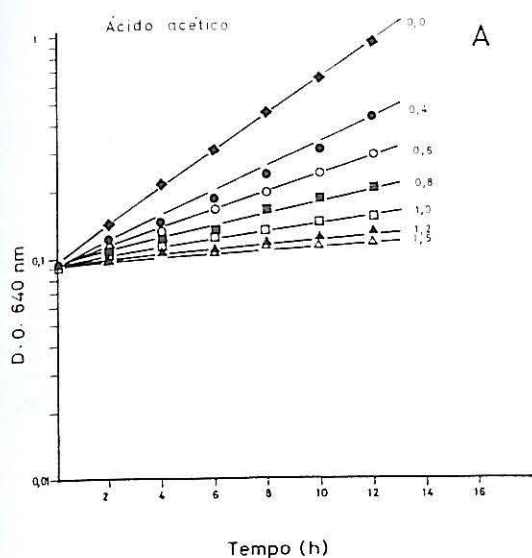


Fig. 2.6 - Gráficos semilogarítmicos da variação da densidade óptica com o tempo, em *Z. bailii* ISA 1025, a 25° C, a pH 4,0, na ausência e na presença de ácido acético (A), ácido propiónico (B), ácido butírico (C), ácido pentanóico (D) e ácido sórbico (E). Os números indicam as concentrações de ácido no meio extracelular. Ácido acético, propiónico, butírico e pentanóico: [% (v/v)]. Ácido sórbico: [% (p/v)].

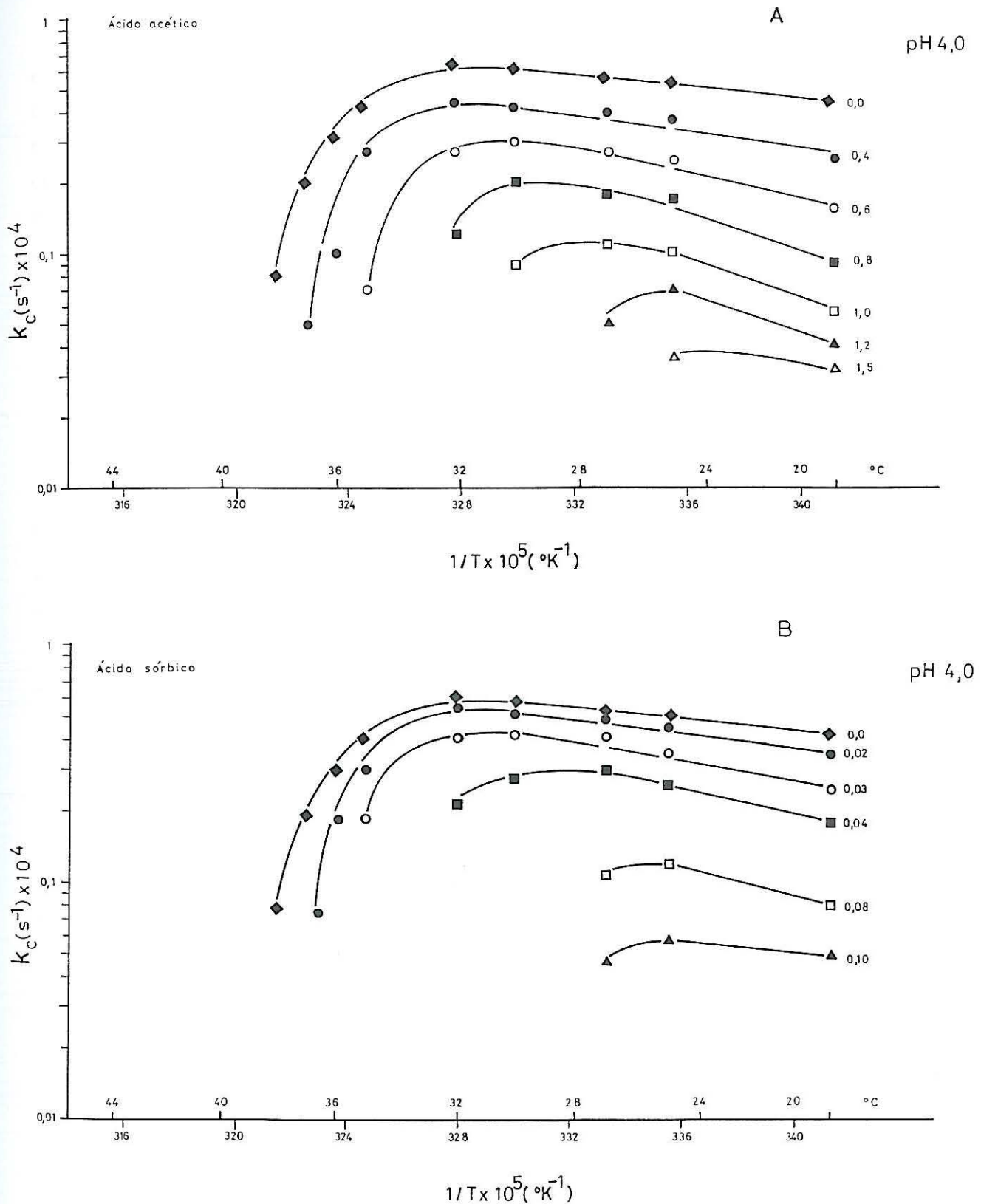


Fig. 2.7 - Gráficos de Arrhenius das taxas específicas de crescimento de *Z. bailii* ISA 1025, na presença de ácido acético (A) e de ácido sórbico (B). Os números indicam as concentrações de ácido no meio extracelular. Ácido acético [% (v/v)] e ácido sórbico: [% (p/v)].

Os valores de k_c , às diferentes temperaturas, expressos em valor relativo (%), encontram-se representados sob a forma de gráficos semilogarítmicos em função da concentração de ácido no meio extracelular na figura 2.8 (A, B, C, D e E). De acordo com os resultados apresentados nesta figura, para cada um dos diferentes ácidos em estudo em condições isotérmicas (25° C), verificou-se que a variação da taxa específica de crescimento com a concentração do ácido no meio extracelular obedeceu a uma cinética exponencial de acordo com a equação:

$$\ln k_c^x = \ln k_c^{x_{\min}^c} - k_i^c [x - x_{\min}^c] \quad (2.12)$$

em que k_c^x e $k_c^{x_{\min}^c}$ são as taxas específicas de crescimento na presença de ácido à concentração x e x_{\min}^c , respectivamente, e k_i^c é a constante exponencial de inibição do crescimento, x_{\min}^c é a concentração de ácido abaixo da qual os efeitos negativos no crescimento não foram mensuráveis. Os valores obtidos para as constantes exponenciais de inibição do crescimento, e para as concentrações necessárias para reduzir em 50% k_c bem como para as concentrações mínimas inibitórias (X_{\min}^c) à temperatura de 25° C, para os diferentes ácidos estão resumidos na tabela 2.1.

Tabela 2.1

Estimativas para os diferentes ácidos ensaiados das constantes exponenciais de inibição (k_i^c) e das concentrações necessárias para reduzir em 50% a taxa específica de crescimento ($X_{50\%}^c$), bem como das concentrações mínimas inibitórias (X_{\min}^c) em *Z. bailii*, a 25° C, pH 4,0.

Temperatura	Ácido	X_{\min}^c (mol/l)	$X_{50\%}^c$ (mol/l)	k_i^c (l/mol)	Coefficiente de repartição*
25°C	Acético	67,0 x10 ⁻³	110,0x10 ⁻³	12,78	0,05
	Propiónico	16,0 x10 ⁻³	37,5x10 ⁻³	22,80	0,16
	Butírico	9,04 x10 ⁻³	22,6x10 ⁻³	42,47	0,62
	Pentanóico	2,5 x10 ⁻³	5,6x10 ⁻³	116,64	3,02
	Sórbico	2,0 x10 ⁻³	4,1x10 ⁻³	281,73	3,09

* Segundo Leo *et al.* (1971).

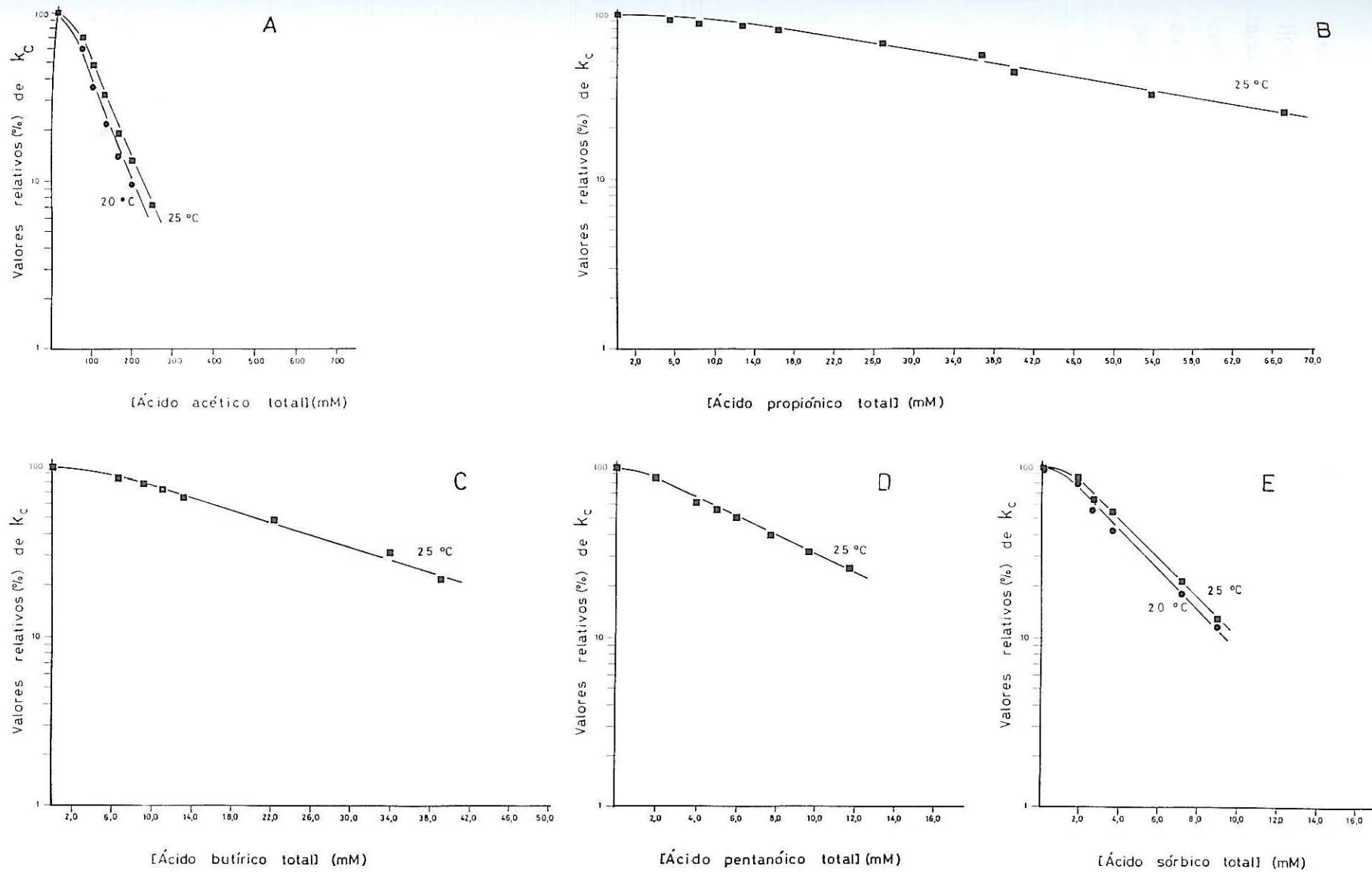


Fig. 2.8 - Variação da taxa específica de crescimento de *Z. bailii* ISA 1025, a várias temperaturas, a pH 4.0, com a concentração de ácido acético (A), propiónico (B), butírico (C), pentanoico (D) e sórbico (E). Os números indicam a temperatura ensaiada.

Por outro lado, o estudo comparativo dos efeitos induzidos pelos diferentes ácidos, na taxa específica de crescimento de *Z. bailii*, mostra que o efeito tóxico está dependente da lipossolubilidade do ácido (Fig. 2.9). De facto, os valores das concentrações de ácido necessárias para provocar uma redução de 50% no valor de k_C , diminuíram com o aumento do coeficiente lípido-tampão, enquanto que, os valores das constantes de inibição do crescimento aumentaram, sugerindo que as membranas das leveduras poderão constituir os alvos de acção para o efeito tóxico dos ácidos no crescimento.

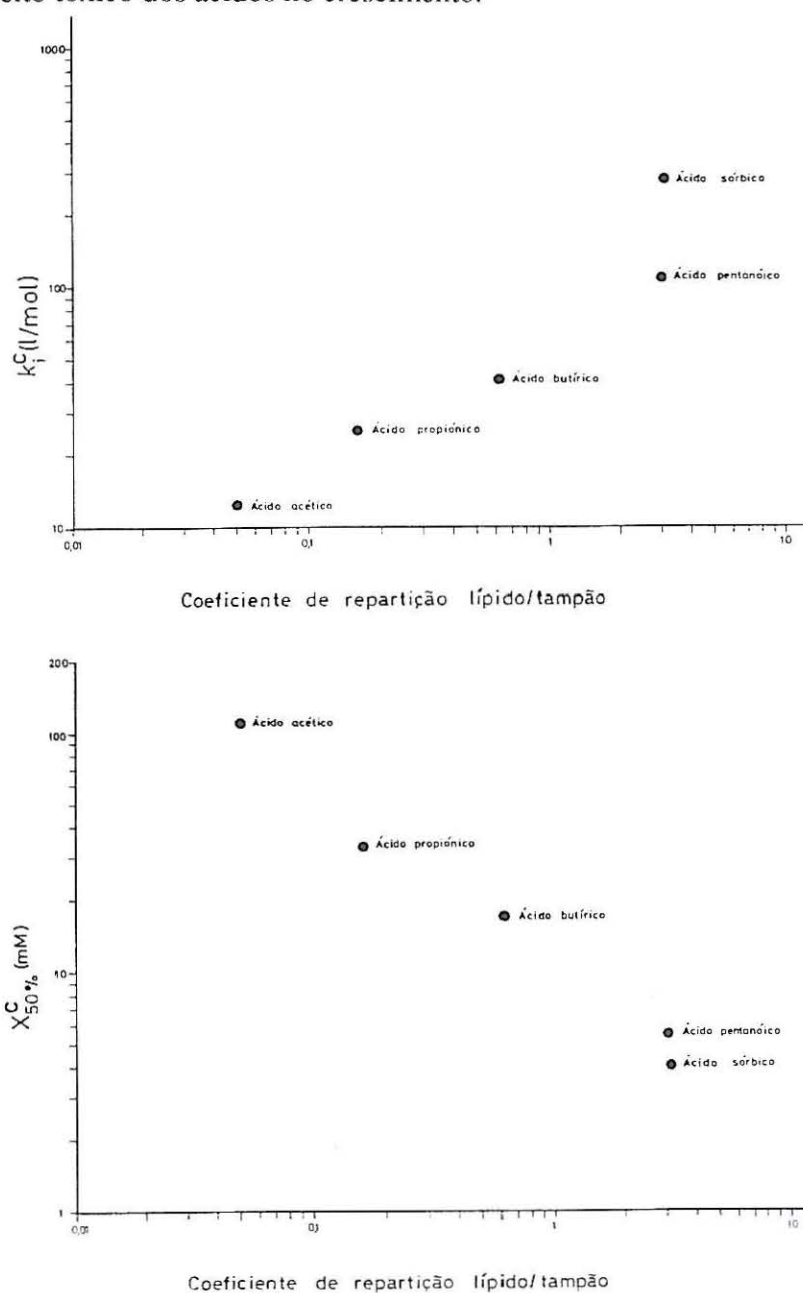


Fig. 2.9 - Variação, para os diferentes ácidos ensaiados da constante exponencial de inibição do crescimento (k_i^C) e das concentrações necessárias para reduzir em 50% a taxa específica de crescimento ($X_{50\%}^C$) com o coeficiente de repartição lípido/tampão.

2.4.1.3 - Efeitos do etanol na taxa específica de crescimento em função da temperatura, em *Zygosaccharomyces bailii*

Para avaliar o efeito de etanol na taxa específica de crescimento utilizou-se a metodologia descrita na secção 2.4.1.2. Os resultados experimentais obtidos encontram-se apresentados na figura 2.10. Os valores da densidade óptica ao longo do tempo, na ausência e na presença de diferentes concentrações de etanol, a 25° C, quando representados num gráfico semilogarítmico variaram linearmente com o tempo. Adicionalmente, verificou-se que, para as temperaturas ensaiadas, a adição de etanol provocou uma diminuição de k_c . Este efeito inibitório acentuou-se com o aumento da concentração de etanol no meio extracelular.

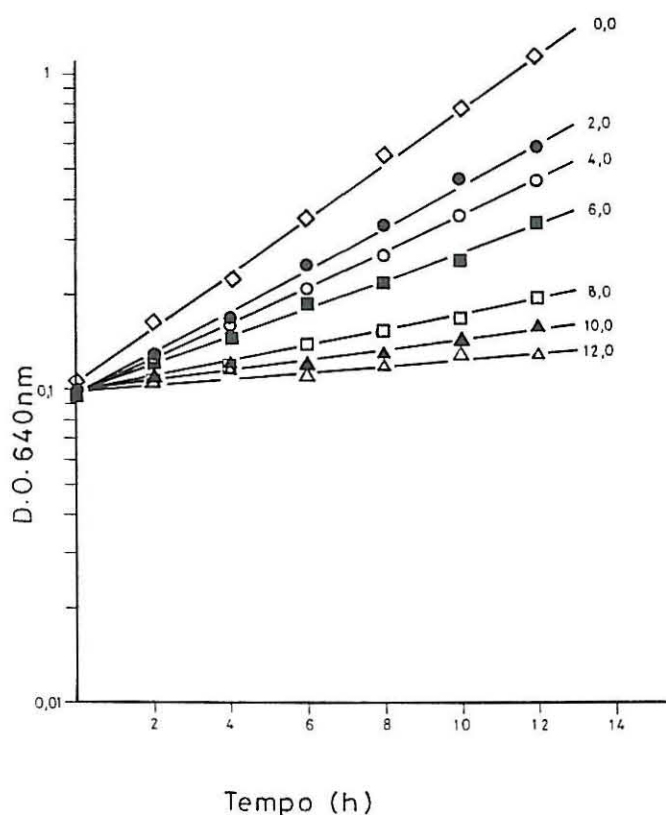


Fig. 2.10 - Gráficos semilogarítmicos da variação da densidade óptica com o tempo, em *Z. bailii* ISA 1025, a 25° C, a pH 4,0, na presença de etanol. Os números indicam as concentrações de etanol [% (p/v)] no meio extracelular.

Por outro lado, se representarmos em papel semilogarítmico, os valores de k_c em função do inverso da temperatura absoluta ($1/T$), obtemos os respectivos gráficos de Arrhenius. Na figura 2.11 estão representados gráficos de Arrhenius das taxas específicas de crescimento obtidas na presença e ausência de etanol, a diferentes temperaturas experimentais. Os resultados sugerem que, para concentrações de etanol superiores a 4% (p/v), a presença de álcool induziu uma diminuição nos valores da Temperatura ótima (T_{op}).

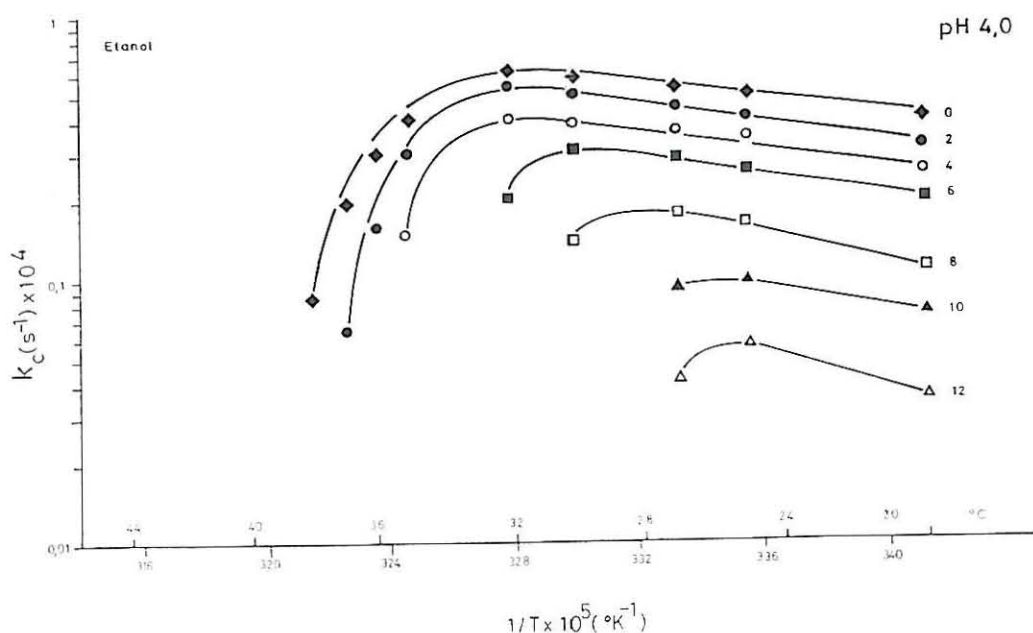


Fig. 2.11 - Gráficos de Arrhenius das taxas específicas de crescimento de *Z. bailii* ISA 1025 na presença de etanol. Os números indicam as concentrações de etanol [% (p/v)], no meio extracelular.

Na figura 2.12 estão representados sob a forma de gráficos semilogarítmicos os valores relativos de k_c , expressos em percentagem, em função da concentração de etanol. A partir destes resultados determinaram-se, os valores das concentrações mínimas de etanol abaixo das quais os efeitos negativos do álcool não foram mensuráveis, X_{min}^C , bem como os valores das concentrações necessárias para reduzir em 50% a taxa específica do crescimento, $X_{50\%}^C$ e os valores das constantes exponenciais de inibição do crescimento. Os valores obtidos estão sumariados na tabela 2.2.

Tabela 2.2

Estimativas das constantes exponenciais de inibição (k_i^C) e das concentrações necessárias para reduzir em 50% a taxa específica de crescimento ($X_{50\%}^C$), bem como das concentrações mínimas inibitórias (X_{min}^C) em *Z. bailii*, a diferentes temperaturas, pH 4,0.

Temperatura	X_{min}^C (mol/l)	$X_{50\%}^C$ (mol/l)	k_i^C (l/mol)
20°C	0,9	1,3	1,2
25°C	0,9	1,3	1,2
30°C	0,7	1,2	1,2

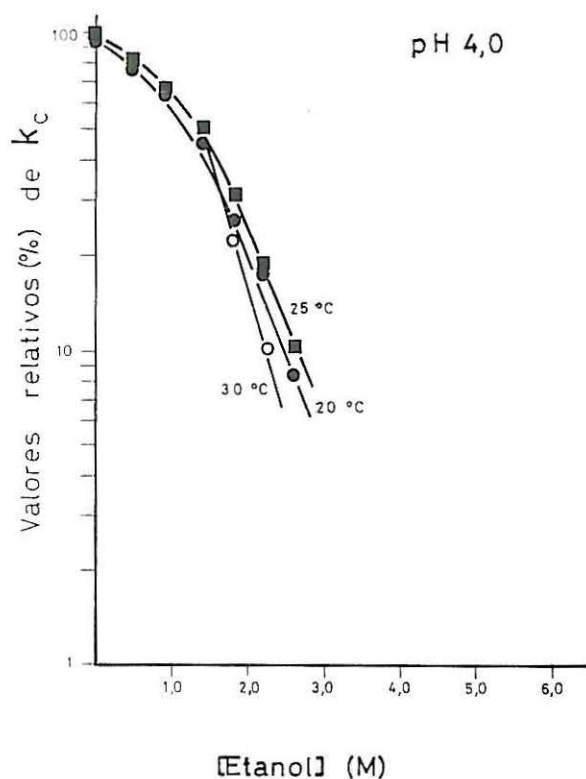


Fig. 2.12 - Variação da taxa específica de crescimento de *Z. bailii* ISA 1025, a várias temperaturas e a pH 4,0, com a concentração de etanol. Os números indicam as temperaturas ensaiadas.

2.4.2 - Crescimento de *Zygosaccharomyces bailii* num meio com glucose e ácido - células adaptadas

2.4.2.1 - Efeitos do ácido acético e sórbico na taxa específica de crescimento, à temperatura de 25° C

Foram também efectuadas experiências de crescimento em células de *Zygosaccharomyces bailii* adaptadas ao ácido acético e ao ácido sórbico, i. e, células crescidas num meio com glucose na presença de ácido.

Em ambos os casos, a variação da densidade óptica foi seguida ao longo do tempo. Os resultados obtidos, a 25° C, foram representados em papel semilogarítmico, na figura 2.13. Verificou-se que, o valor da taxa específica do crescimento, calculado a partir da tangente das rectas semilogarítmicas, diminuiu à medida que aumentava a concentração de ácido no meio de cultura. A partir da representação semilogarítmica dos valores de k_c em função da concentração extracelular de ácido, figura 2.14, estimaram-se os valores das concentrações necessárias para reduzir em 50% a taxa específica de crescimento ($X_{50\%}^C$), bem como os valores das concentrações de ácido mínimas inibitórias (X_{min}^C) e das constantes exponenciais de inibição do crescimento. Os valores obtidos estão resumidos na tabela 2.3.

Tabela 2.3

Estimativas das constantes exponenciais de inibição (k_i^c) e das concentrações necessárias para reduzir em 50% a taxa específica de crescimento ($X_{50\%}^c$), bem como das concentrações mínimas inibitórias (X_{min}^c) em *Z. bailii*, a 25° C, pH 4,0.

Temperatura	Ácido	X_{min}^c	$X_{50\%}^c$	k_i^c	Coefficiente de repartição*
		(mol/l)	(mol/l)	(l/mol)	
25°C	Acético	$67,0 \times 10^{-3}$	$133,0 \times 10^{-3}$	10,09	0,05
	Sórbico	$3,6 \times 10^{-3}$	$5,7 \times 10^{-3}$	215,07	3,09

* Segundo Leo *et al.*, (1971).

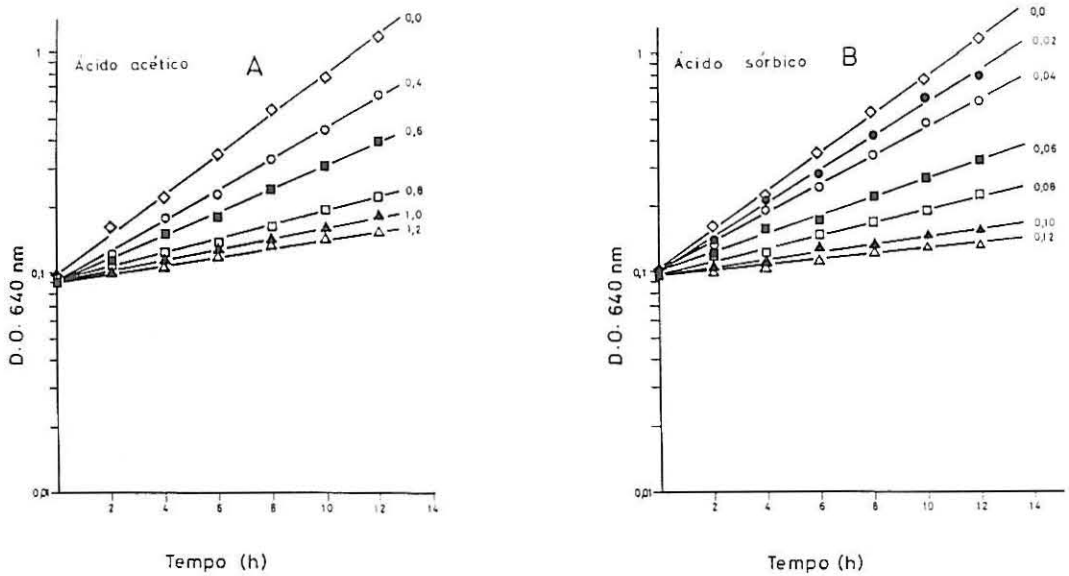


Fig. 2.13 - Gráficos semilogarítmicos da variação da densidade óptica com o tempo, em células adaptadas de *Z. bailii* ISA 1025, a 25° C, a pH 4,0, na presença de ácido acético e ácido sórbico conforme o indicado na figura. Os números indicam as concentrações de ácido, no meio extracelular. Ácido acético [% (v/v)] e ácido sórbico: [% (p/v)].

A) células crescidas num meio com glucose e ácido acético.

B) células crescidas num meio com glucose e ácido sórbico.

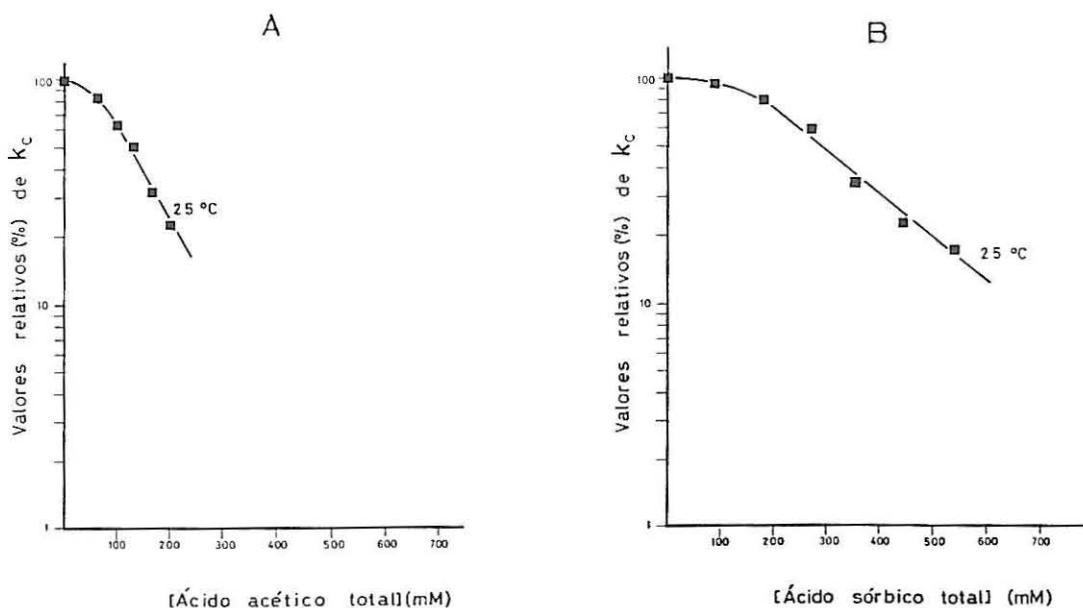


Fig. 2. 14 - Variação da taxa específica de crescimento em células adaptadas em *Z. bailii* ISA 1025, a várias temperaturas, a pH 4,0, com a concentração de ácido acético (A) e sórbico (B).

2.4.3 - Efeitos do ácido sórbico na taxa específica do crescimento, à temperatura de 25° C, em *Saccharomyces cerevisiae* num meio com glucose

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido objecto de estudos vários no que respeita à resistência e tolerância a ácidos fracos nomeadamente acético, propiónico, butírico, pentanóico e benzóico, o mesmo não se podendo dizer em relação ao ácido sórbico para o qual se realizou um número restrito de estudos (van Uden, 1989-a).

Os resultados experimentais obtidos na estirpe *S. cerevisiae* IGC 4072 para a variação da densidade óptica a 640 nm com o tempo, na ausência e na presença de ácido sórbico, a 25° C, estão representados na figura 2.15. Como mostra a figura e de forma análoga ao descrito na secção anterior para *Zygosaccharomyces bailii* a adição de ácido sórbico a uma cultura em fase exponencial provocou uma redução no valor de k_c , tanto mais acentuada quanto mais elevada a concentração de ácido no meio extracelular. Os valores relativos de k_c , expressos em percentagem, obtidos a 25° C, foram representados em papel semilogarítmico em função da concentração de ácido (Fig. 2.16). Os resultados sugerem que, em *S. cerevisiae*, à semelhança do obtido para *Z. bailii* a cinética de inibição do crescimento pelo ácido sórbico foi exponencial, tendo sido estimado para a constante exponencial de inibição (k_i) o valor de 1648,15 l/mol.

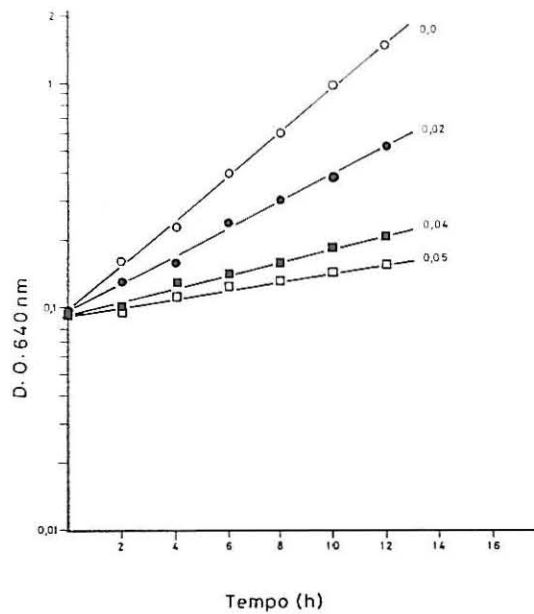


Fig. 2.15 - Gráficos semilogarítmicos da variação da densidade óptica com o tempo, em *S. cerevisiae* IGC 4072, a 25° C, a pH 4,0 na ausência e na presença de ácido sórbico. Os números indicam as concentrações de ácido [% (p/v)] no meio extracelular.

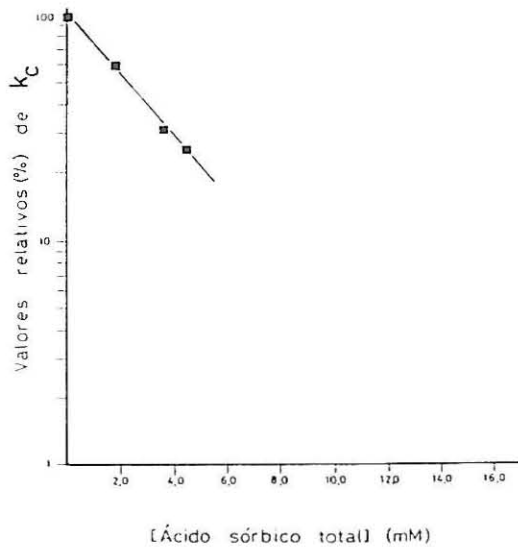


Fig. 2.16 - Variação da taxa específica de crescimento de *S. cerevisiae* IGC 4072, a 25° C, a pH 4,0, com a concentração de ácido sórbico.

2.5 - Discussão

2.5.1 - Efeitos dos ácidos e do etanol no crescimento de *Zygosaccharomyces bailii*

Os resultados obtidos mostram que a taxa específica de crescimento foi uma função da temperatura. Os valores de k_c aumentaram com a temperatura, entre os 20° C (temperatura mínima ensaiada) atingindo o valor mais elevado, nas nossas condições experimentais, à temperatura de 32 ° C, sendo possível extrapolar pelo respectivo gráfico de Arrhenius para temperatura óptima de crescimento, um valor compreendido entre 32° C e 33° C. Acima de T_{Op} os valores de k_c diminuíram deixando de ser mensuráveis a 39° C.

Como se esperava, e de acordo com os dados da literatura para outras leveduras para todas as temperaturas ensaiadas, o etanol provocou uma redução da taxa específica de crescimento de *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1025 crescida num meio com glucose. O efeito acentuou-se com o aumento da concentração de etanol no meio extracelular.

Adicionalmente verificamos que também os ácidos acético, propiónico, butírico, pentanóico e sórbico induziram efeitos inibidores sobre o crescimento de *Z. bailii*. O comportamento de *Saccharomyces cerevisiae* na presença de ácido acético, (Pampulha, 1989; Cardoso, 1994) propiónico, butírico e pentanóico (Cardoso, 1994), foi semelhante, sendo no entanto os valores das constantes de inibição do crescimento referidas para *S. cerevisiae* significativamente superiores aos obtidos em *Z. bailii*.

A análise dos gráficos de Arrhenius modificados das taxas específicas de crescimento na presença de ácido acético, ácido sórbico (Fig. 2.7) e etanol (Fig 2.11), indica que, para concentrações de ácido ou de etanol acima dos valores correspondentes às concentrações mínimas de inibição, a adição destes inibidores induziu uma redução na T_{Op} (Temperatura óptima do crescimento) acentuando-se o efeito com a concentração de inibidor. Além disso embora os estudos realizados não permitam determinar os valores absolutos da temperatura máxima de crescimento (T_{max}), os resultados sugerem que esta foi também deslocada para valores mais baixos na presença quer dos ácidos, quer do etanol. O patamar observado até às concentrações mínimas abaixo das quais, aparentemente não são extrapoláveis os efeitos negativos dos ácidos e do etanol no crescimento, traduz uma forma de resistência ao etanol e aos ácidos.

Adicionalmente, e à semelhança do que foi verificado por Leão e van Uden (1984-a) para o etanol, num mutante respiratório de *S. cerevisiae*, os resultados experimentais apresentados, sugerem que, para cada uma das temperaturas ensaiadas, a cinética de inibição pelo etanol e pelos ácidos (acético, sórbico, propiónico, butírico e pentanóico) foi traduzida por uma relação exponencial, para concentrações de inibidor superiores à concentração mínima inibitória. A análise da figura 2.8 indica que, a 25 ° C, em *Z. bailii* a concentração máxima de

ácido à qual foi mensurável crescimento foi de 250,0 mM, 67,5 mM, 39,55 mM, 11,7 mM e 8,9 mM, respectivamente, para os ácidos acético, propiónico, butírico, pentanóico e sórbico. Também Pitt (1974), refere que o crescimento de *Z. bailii*, a pH 3,5, em meio com 10% da glucose não é inibido na presença de 5,4 mM de ácido sórbico, ou 166,7mM de ácido acético.

Os valores das constantes exponenciais de inibição do crescimento, aumentaram de forma praticamente linear, com os coeficientes de repartição nos lípidos dos ácidos acético, propiónico, butírico, e pentanóico. O mesmo não se verificou em relação ao ácido sórbico. Para este aparentemente não se observou correlação significativa entre o valor da constante exponencial de inibição e de $X_{50\%}^C$ e a solubilidade do ácido nos lípidos (Fig. 2.9). Por outro lado e na sequência destes resultados, os valores das concentrações inibitórias de 50% e de X_{min}^C estão também dependentes da solubilidade nos lípidos dos ácidos, aumentando com a diminuição do coeficiente de repartição nos lípidos do tóxico. Os resultados no seu conjunto sugerem que os alvos de acção dos ácidos se encontram nas regiões hidrofóbicas das membranas.

Adicionalmente, a adaptação das células ao ácido acético não se traduziu numa alteração significativa dos valores dos parâmetros acima estimados para quantificar os efeitos inibitórios induzidos pelos ácidos e etanol. No entanto, para o caso do ácido sórbico, verificou-se que a adaptação ao ácido se traduziu num aumento do valor da concentração necessária para reduzir em 50% a taxa específica de crescimento, bem como do valor da concentração mínima inibitória e numa diminuição do valor da constante exponencial de inibição do crescimento.

2.5.2 - Análise comparativa dos efeitos dos ácidos e do etanol em *Zygosaccharomyces bailii* e em *Saccharomyces cerevisiae*

A análise comparativa dos efeitos dos ácidos em *Zygosaccharomyces bailii* e em *Saccharomyces cerevisiae*, indicou que, *Z. bailii* foi de um modo geral e no que respeita ao crescimento mais resistente aos ácidos do que *S. cerevisiae*. Com efeito, a temperatura constante, por ex. 25° C, o decréscimo da taxa específica do crescimento da espécie de *S. cerevisiae*, em presença de 0,013% (p/v) de ácido sórbico, corresponde aproximadamente à acção de 0,08% (p/v) de ácido sórbico para *Z. bailii*. Em *S. cerevisiae* não se observou crescimento mensurável para teores de ácido sórbico de 0,04% (p/v) e a concentração mínima inibitória não foi mensurável, sendo aproximadamente de 0%, enquanto que *Z. bailii* tolerou concentrações deste ácido até 0,1%, e a concentração abaixo da qual os efeitos depressivos do tóxico não foram mensuráveis foi de 0,02% (p/v).

Em relação ao ácido acético, e à temperatura de 25° C, o valor da concentração máxima de ácido que permitiu crescimento em *Z. bailii*, nas nossas condições experimentais, foi superior ao determinado por Pampulha e Loureiro Dias (1989) num mutante respiratório de *S.*

cerevisiae, crescido em meio com glucose a pH controlado. Pensamos todavia que, estes resultados terão que ser interpretados apenas em termos qualitativos dado que as nossas experiências não foram conduzidas a pH controlado. Adicionalmente a acção inibitória dos ácidos acético, propiónico, butírico e pentanóico na taxa específica de crescimento de *Z. bailii* foi significativamente inferior à observada em *S.cerevisiae* por Cardoso (1994) (Tab. 2.4).

Por outro lado, a resistência de *Z. bailii* e de *S. cerevisiae* ao etanol foi comparável. Com efeito, o patamar observado até cerca de 4% (p/v) de etanol, é comum às duas leveduras. Além disso, a concentração máxima de etanol à qual foi possível crescimento mensurável, apesar de ligeiramente superior em *Z. bailii*, não foi significativamente diferente do determinado em *S. cerevisiae* por Leão (1984). Adicionalmente os valores obtidos para as constantes exponenciais de inibição de crescimento pelo etanol em *Z. bailii* e em *S. cerevisiae* foram idênticos, como se verifica na tabela 2.4.

Tabela 2.4

Valores das constantes exponenciais de inibição do crescimento (k_i^c) pelo etanol e pelos ácidos fracos em *Z. bailii* obtidos no presente trabalho comparativamente com os descritos para *S. cerevisiae*.

Etanol/Ácido fraco	k_i^c (l/mol)		Referência dos valores descritos para <i>S. cerevisiae</i>
	<i>Z. bailii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
Etanol	1,20	1,40	Leão (1984)
Acético			
células não adaptadas	12,78	184,81	Cardoso (1994)
células adaptadas	10,09	—	
Propiónico			
células não adaptadas	22,80	176,29	"
Butírico			
células não adaptadas	42,47	249,55	"
Pentanóico			
células não adaptadas	116,64	1300,08	"
Sórbico			
células não adaptadas	281,73	1648,15	
células adaptadas	215,07		

Com o objectivo de contribuir para identificar outros processos metabólicos afectados pelos ácidos e pelo etanol, no capítulo seguinte apresentamos resultados sobre o efeito dos ácidos e do etanol na cinética e na termodinâmica de activação da morte celular térmica de *Z. bailii* ISA 1025.

CAPÍTULO 3

EFEITOS DE ÁCIDOS FRACOS E DO ETANOL NA CINÉTICA E TERMODINÂMICA DE ACTIVAÇÃO DA MORTE CELULAR DE *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1025, COMPARATIVAMENTE COM *Saccharomyces cerevisiae* IGC 4072

3.1 - Introdução

Os resultados apresentados no capítulo 2 indicaram que a presença de etanol e de ácidos fracos no meio extracelular afectava desfavoravelmente o crescimento da levedura *Zygosaccharomyces bailii*. Este efeito acentuou-se com o aumento da concentração de inibidor no meio de suspensão de células. Os dados disponíveis na literatura indicam que os alcanóis (Leão e van Uden, 1982), o ácido acético (Pinto *et al*, 1989, Cardoso, 1994), e os ácidos propiónico, butírico, pentanóico, fórmico (Cardoso, 1994), octanóico e decanóico (Sá Correia, 1986) estimulam a morte térmica de *Saccharomyces cerevisiae*, aumentando a entropia de activação da morte térmica (ΔS^\ddagger), sem no entanto modificar significativamente a entalpia de activação (ΔH^\ddagger).

Neste sentido, e dada a elevada resistência de *Z. bailii* ao etanol e aos ácidos fracos, foram desenvolvidos estudos conducentes à elucidação dos efeitos do etanol e dos ácidos acético, propiónico, butírico, pentanóico e sórbico na viabilidade celular da levedura em estudo.

Os conceitos teóricos sobre a cinética da morte térmica microbiana já foram apresentados no capítulo anterior.

No presente capítulo apresentamos resultados experimentais que mostram como o etanol e os ácidos carboxílicos fracos afectaram a cinética e os parâmetros termodinâmicos de activação da morte térmica.

3.2 - Material e Métodos

3.2.1 - *Microrganismos*

Nas experiências da morte térmica foram utilizadas as estirpes *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1025 e *Saccharomyces cerevisiae* IGC 4072.

3.2.2 - *Meios de Cultura*

Os meios de cultura foram preparados como descrito no Apêndice I.

3.2.3 - Preparação de culturas em fase exponencial

As culturas foram preparados de acordo com o descrito em 2.3.3.

3.2.4 - Ensaios de morte celular

O protocolo das experiências de morte térmica, consistiu basicamente em:

- a) Preparar culturas em fase de crescimento exponencial em meio M líquido, na ausência de tóxico (células não adaptadas) ou na presença de tóxico (células adaptadas), conforme referido em 3.2.3.
- b) Colocar balões de Erlenmeyer de 500 ml, com rolha de borracha, contendo 100 ml de meio líquido M ao pH experimental, em banhos-maria ajustados à temperatura desejada e munidos de agitação magnética.
- c) Transferir para cada um dos Erlenmeyers um volume da cultura preparada em a) contendo cerca de $0,5 \times 10^6$ células e retirar amostras de 0,1 ml em triplicado, no tempo 0 e em intervalos de tempo regulares conforme apresentado nos resultados.
- d) Proceder ao espalhamento das amostras em placas de Petri contendo meio de repicagem (meio M solidificado).
- e) Incubar as placas a 25° C, até as colónias atingirem um diâmetro de 1 a 2 mm (pelo menos 36 horas).
- f) Proceder à contagem das colónias.

Para avaliar o efeito do etanol e dos ácidos (acético, sórbico, pentanóico, butírico, propiónico) na morte térmica, a inoculação do meio M líquido foi precedida pela adição do respectivo composto na concentração desejada.

Nota: Em algumas experiências o meio M líquido, referido na alínea b), foi substituído pelo meio MGV líquido, cujo formulário se encontra descrito no Apêndice I.
Nas experiências efectuadas neste meio e que são referidas nos resultados, utilizou-se o mesmo protocolo experimental.

3.2.5 - Cálculo das taxas específicas de morte celular

Para calcular as taxas específicas de morte, os valores das médias aritméticas do número de sobreviventes em cada amostra, transformados em % do tempo zero, foram representados em papel semilogarítmico em função do tempo.

As curvas de sobrevivência obtidas experimentalmente foram, fundamentalmente

constituídas por um patamar de duração variável seguido de uma recta. Aplicando-se à parte linear de decréscimo exponencial a equação: $\ln N_t = \ln N_0 - k_d t$, em que N_0 e N_t representam a média das contagens das colónias sobreviventes na parte linear, no tempo 0 e no tempo t, respectivamente; k_d (taxa específica de morte térmica), é numericamente igual ao coeficiente angular da parte linear das curvas de sobrevivência.

3.2.6 - Parâmetros de activação da morte celular: teoria e cálculos

Em populações de leveduras crescidas em condições controladas, a variação do logaritmo natural das taxas específicas da morte térmica calculadas a várias temperaturas, com o inverso da temperatura absoluta apresenta-se como uma recta com um declive negativo. Deste modo, a morte térmica pode ser relacionada com os seus parâmetros de activação, com base na teoria das taxas absolutas de reacção (Eyring, 1935; Johnson *et al.*, 1954; van Uden, 1979) como se desenvolve mais em pormenor no Apêndice V.

A equação obtida é a seguinte:

$$k_d = \frac{K_B T}{h} e^{-\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{R}} \frac{1}{T} \quad (3.1)$$

A equação 3.1 poderá ser escrita da seguinte forma:

$$\ln \frac{k_d}{T} = \ln \frac{K_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} - \frac{1}{T} \quad (3.2)$$

em que:

K_B - é a constante de Boltzman ($1,4 \times 10^{-16}$ erg. K^{-1});

h - é a constante de Planck ($6,6 \times 10^{-27}$ erg. s.);

ΔS^\ddagger - é a entropia de activação da morte térmica;

R - é a constante dos gases perfeitos ($2,0$ cal. mol^{-1});

ΔH^\ddagger - é a entalpia de activação da morte térmica;

T - é a temperatura absoluta.

Esta equação expressa os designados "gráficos de Arrhenius modificados". Consequentemente, os valores de ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger poderão ser calculados, pelas seguintes relações;

$$\Delta H^\ddagger = -(\text{tangente}) \times R \quad (3.3)$$

$$\Delta S^\ddagger = (\text{ordenada na origem}) - \ln \frac{K_B}{h} R \quad (3.4)$$

3.3 - Resultados

3.3.1. Morte celular induzida por ácidos fracos e pelo etanol em células de *Zygosaccharomyces bailii* crescidas num meio com glucose - células não adaptadas

3.3.1.1 - Morte celular na ausência de ácidos e de etanol

Num primeiro conjunto de experiências obtiveram-se estimativas de k_d , na ausência de ácidos e de etanol, a quatro temperaturas diferentes. As curvas semilogarítmicas de sobrevivência, obtidas em *Zygosaccharomyces bailii*, na ausência de inibidor obedeceram à equação já referida:

$$x_t = x_0 e^{-k_d t} \quad (3.5)$$

onde x representa a densidade instantânea da população viável e k_d a taxa específica da morte.

Na figura 3.1 apresentamos um exemplo típico de curvas de sobrevivência obtidas experimentalmente. Da análise da figura 3.1 podemos concluir que a população viável diminui exponencialmente a uma taxa específica da morte constante (k_d). A taxa específica da morte térmica é numericamente igual ao coeficiente angular de cada uma das rectas experimentais. Os valores experimentais de k_d estão representados na figura 3.2, sob a forma de gráficos de Arrhenius ($\ln \frac{k_d}{T}$ versus $\frac{1}{T}$). A partir destes resultados procedeu-se ao cálculo de ΔS^\ddagger (entropia de activação da morte térmica) e ΔH^\ddagger (entalpia de activação da morte térmica), tendo sido obtidos os seguintes valores: $\Delta H^\ddagger = 97,0$ Kcal/mol, $\Delta S^\ddagger = 348,9$ Kcal/mol.

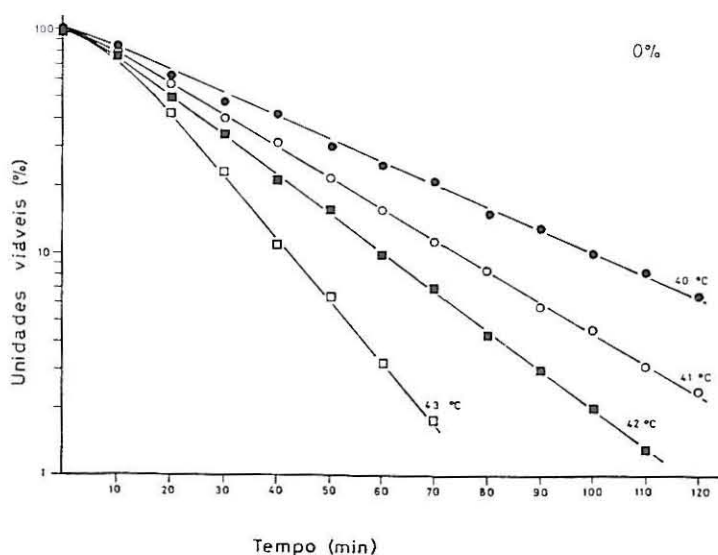


Fig. 3.1 - Curvas semilogarítmicas de sobrevivência de *Z. bailii* ISA 1025, a várias temperaturas letais, na ausência de ácido e de etanol.

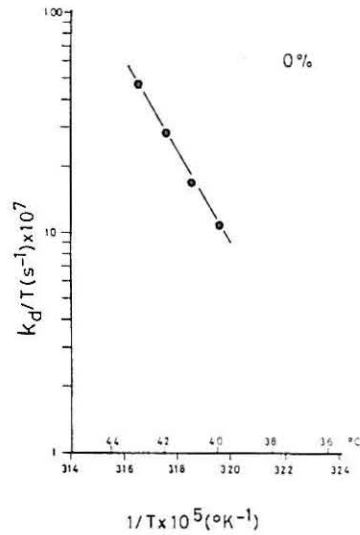


Fig. 3.2 - Gráfico de Arrhenius das taxas específicas da morte térmica de *Z. bailii* ISA 1025, na ausência de ácidos e de etanol.

3.3.1.2 - Efeitos do ácido acético na morte celular, em função do pH extracelular

A adição de ácido acético ao meio de suspensão de células teve um efeito estimulador da morte térmica, provocando um deslocamento das temperaturas letais para valores mais baixos. Este efeito acentuou-se com o aumento da concentração de ácido no meio extracelular.

Na figura 3.3 e a título exemplificativo estão representados os gráficos semilogarítmicos representativos da variação do número de sobreviventes (%) com o tempo, a diferentes temperaturas, na presença de ácido acético e para valores de pH extracelular 3,0 (A) e 4,0 (B).

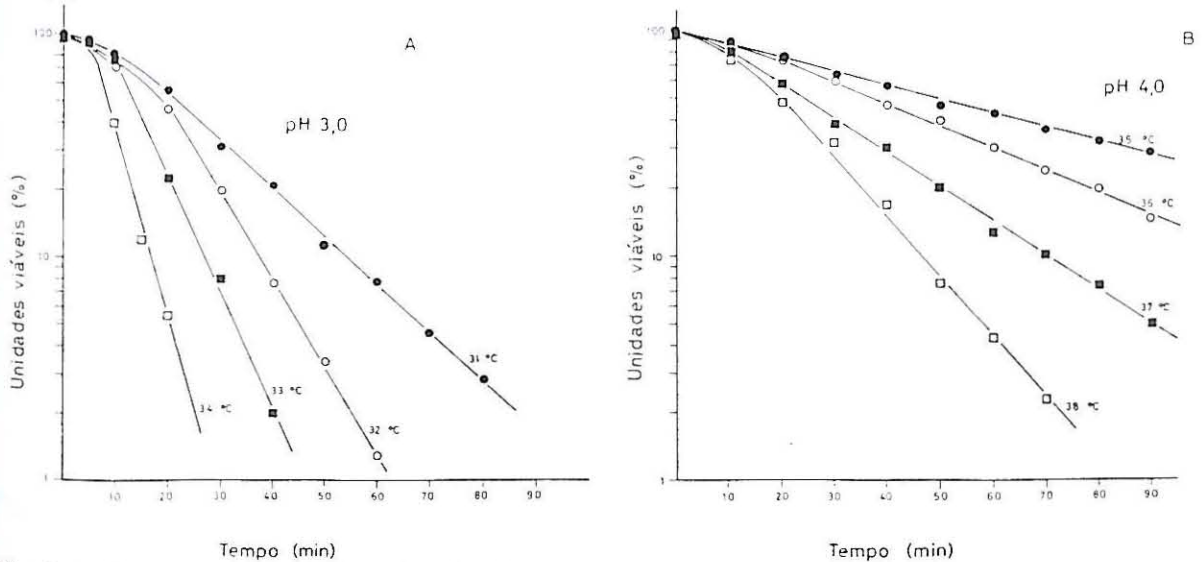


Fig. 3.3 - Curvas semilogarítmicas de sobrevivência de *Z. bailii* ISA 1025, a várias temperaturas letais, na presença de ácido acético 2% (v/v) e 1% (v/v), a pH 3,0 (A) e 4,0 (B), respectivamente.

Com os diferentes valores de k_d estimados a partir dos declives das respectivas rectas experimentais construíram-se gráficos de Arrhenius para valores de pH extracelular 3,0 e 4,0. Obtiveram-se assim um total de 11 gráficos de Arrhenius (Fig. 3.4) respeitantes à morte térmica de *Z. bailii* na presença de ácido acético a pH 3,0 (A) e 4,0 (B), nas concentrações indicadas na figura.

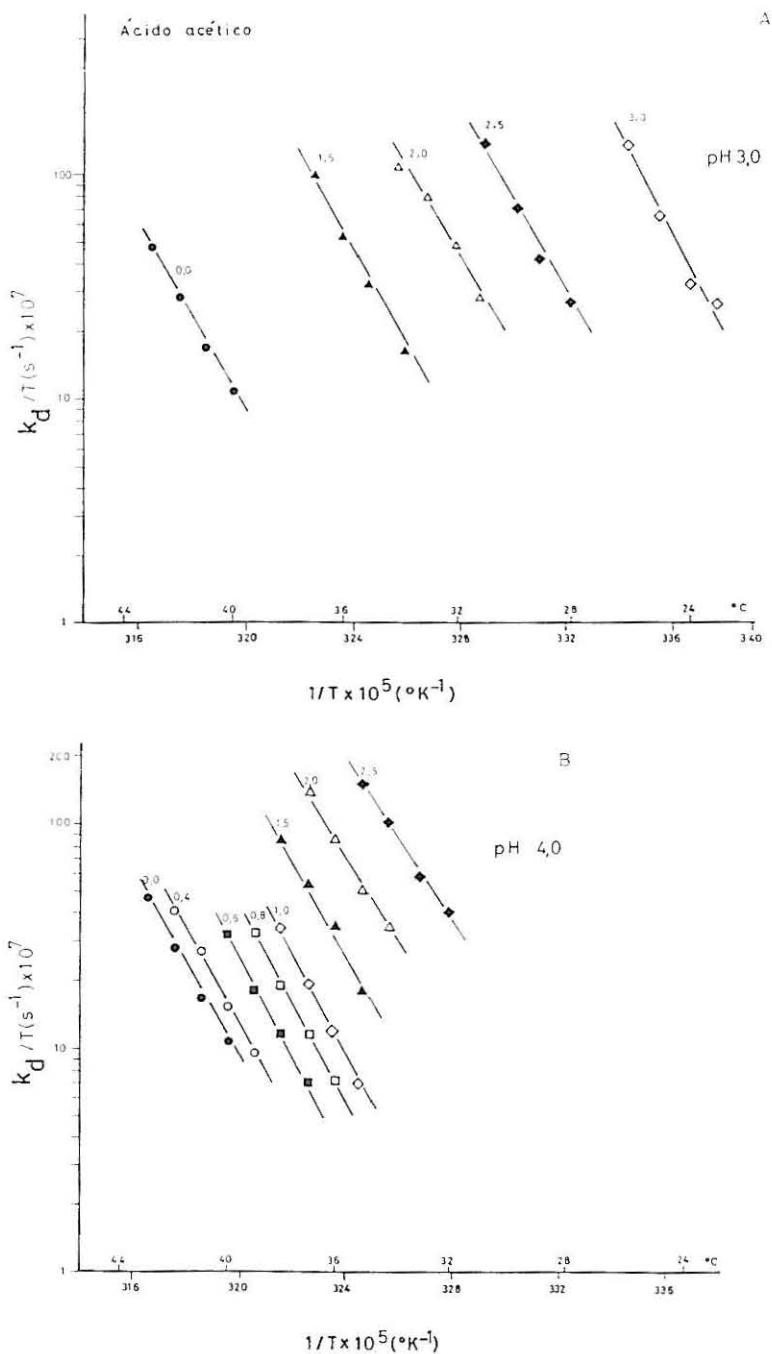


Fig. 3.4 - Gráficos de Arrhenius das taxas específicas da morte térmica de *Z. bailii* ISA 1025, na presença de ácido acético total [% (v/v)], a pH 3,0 (A) e 4,0 (B). Os números indicam a concentração de ácido no meio extracelular.

A análise da figura 3.4 (A, B) indica que, os gráficos de Arrhenius da morte térmica induzida pelo ácido acético constituíram uma família de rectas paralelas entre si, apresentando uma sequência no sentido da diminuição da temperatura, à medida que aumentava a concentração de ácido no meio extracelular. Além disso, são paralelas ao gráfico de Arrhenius de morte térmica na ausência de ácido. O paralelismo evidenciado pelos gráficos da figura 3.4 (A e B) às várias concentrações de ácido sugeriu que o ácido acético afectou as ordenadas na origem dos gráficos, ou seja, entropia de activação da morte térmica (ΔS^\ddagger), mas não modificou significativamente a entalpia de activação da morte térmica (ΔH^\ddagger).

A partir dos gráficos experimentais de Arrhenius na ausência e na presença de ácido foram obtidos os valores para a entalpia de activação sumariados na tabela 3.1.

Tabela 3.1

Valores da entalpia de activação (ΔH^\ddagger) estimados a partir dos gráficos de Arrhenius da figura 3.4.

pH	ΔH^\ddagger (K cal/mol)	
	0%	Presença de ácido acético 1)
3,0	97,20	97,70 \pm 7,30
4,0	104,30	94,60 \pm 4,70

1) Os valores apresentados correspondem à média dos valores de ΔH^\ddagger obtidos às diferentes concentrações de ácido acético.

O valor médio obtido para ΔH^\ddagger e respectivo desvio padrão confirmam os resultados da análise visual segundo a qual os gráficos são essencialmente paralelos e o valor ΔH^\ddagger da morte térmica (0%) não foi significativamente afectada pela presença do ácido.

De acordo com os resultados obtidos e o modelo matemático deduzido para os efeitos do etanol e de outros alcanóis por Leão e van Uden (1982) e partindo do princípio que os gráficos de Arrhenius para a morte térmica são essencialmente paralelos, poder-se-á postular que em condições isotérmicas, a representação semilogarítmica dos valores de k_d em função da concentração de ácido obedecerá a uma recta com declive idêntico para todas as temperaturas. Esta hipótese foi confirmada experimentalmente. Para os valores de pH 3,0 e 4,0 foram realizadas experiências da morte térmica, a temperatura constante, fazendo variar a concentração de ácido no meio extracelular. A figura 3.5 mostra os resultados obtidos. Verifica-se que, realmente, nas nossas condições experimentais, k_d foi uma função exponencial da concentração de ácido expressa pela seguinte equação.

$$k_d^x = k_d^0 e^{k_{est}[x]} \quad (3.6)$$

em que k_d^x e k_d^0 representam as taxas específicas da morte térmica, respectivamente, às concentrações x e zero de ácido, a temperatura constante; k_{est} a constante exponencial de estimulação da morte, característica do ácido.

Na tabela 3.2 encontram-se os valores da constante de estimulação da morte (k_{est}) pelo ácido acético estimados a partir dos declives das rectas da figura 3.5.

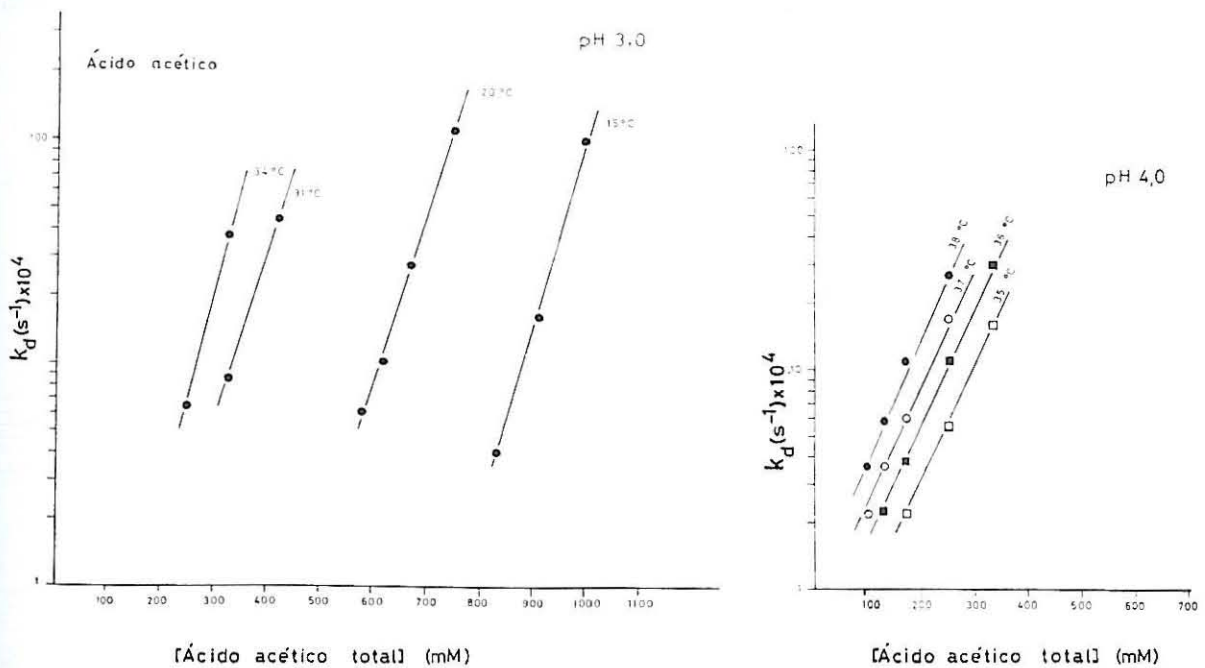


Fig. 3.5 - Variação das taxas específicas da morte térmica de *Z. bailii* ISA 1025, com a concentração de ácido acético total, a pH 3,0 (A) e pH 4,0 (B), em condições isotérmicas

Uma análise mais detalhada das figuras 3.4 e 3.5 indica que, a pH 3,0 comparativamente com pH 4,0, *Z. bailii* apresenta uma resistência ao ácido acético total, ligeiramente inferior no que respeita ao efeito estimulante da morte (Arrhenius deslocados para a zona das temperaturas mais baixas). No entanto, os valores de k_{est} pelo ácido acético quando expressa em concentração de ácido na forma não dissociada são idênticos aos dois valores de pH (ver Tab. 3.2, pag. 62) sugerindo que a forma tóxica do ácido é essencialmente a forma não dissociada e que o efeito aparentemente não foi afectado pelo pH extracelular.

3.3.1.3 - Efeitos dos ácidos propiônico, butírico e pentanóico na morte celular

Para avaliar o efeito dos ácidos propiônico, butírico e pentanóico nos parâmetros termodinâmicos da morte celular, efectuaram-se experiências nas quais se obtiveram estimativas de k_d , para cada uma das concentrações de ácido, a 3 ou 4 temperaturas diferentes e a pH 3,0. Nas nossas condições experimentais e à semelhança do descrito nas secções anteriores verificamos que as curvas de sobrevivência foram constituídas por um patamar seguido de uma recta. Na figura 3.6 (A,B e C) apresentam-se resultados experimentais deste comportamento. Para cada concentração de ácido os valores dos declives das rectas e a duração do patamar foram função da temperatura.

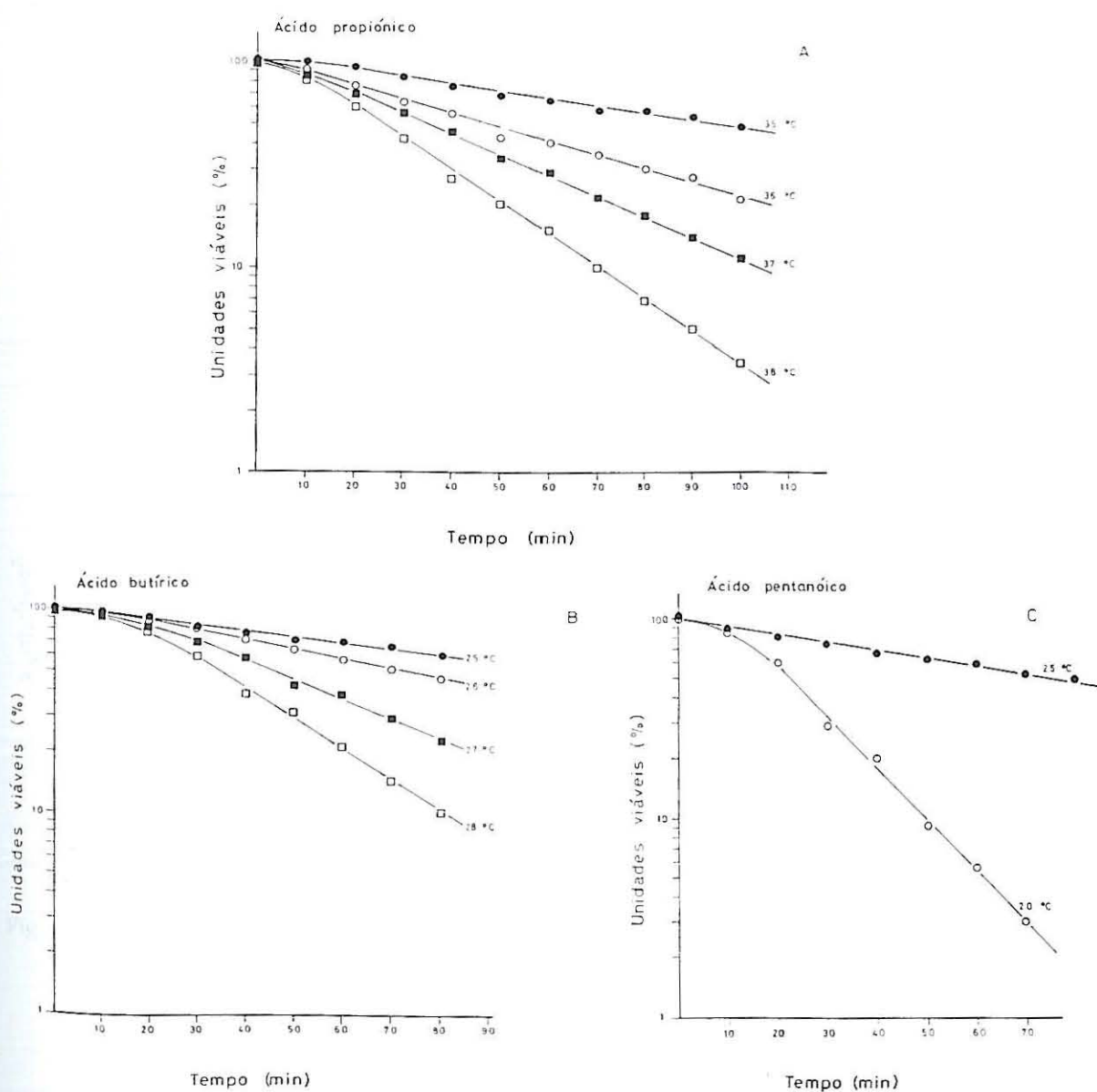


Fig. 3.6 - Curvas semilogarítmicas de sobrevivência de *Z. bailii* ISA 1025, a várias temperaturas letais na presença ácido propiônico 0,4% (v/v) (A), butírico 1% (v/v) (B) e pentanóico 0,5% (v/v) (C).

Os gráficos de Arrhenius modificados construídos para cada um dos três ácidos, a partir dos diferentes valores de k_d , em função do inverso da temperatura absoluta ($1/T$), estão representados na figura 3.7.

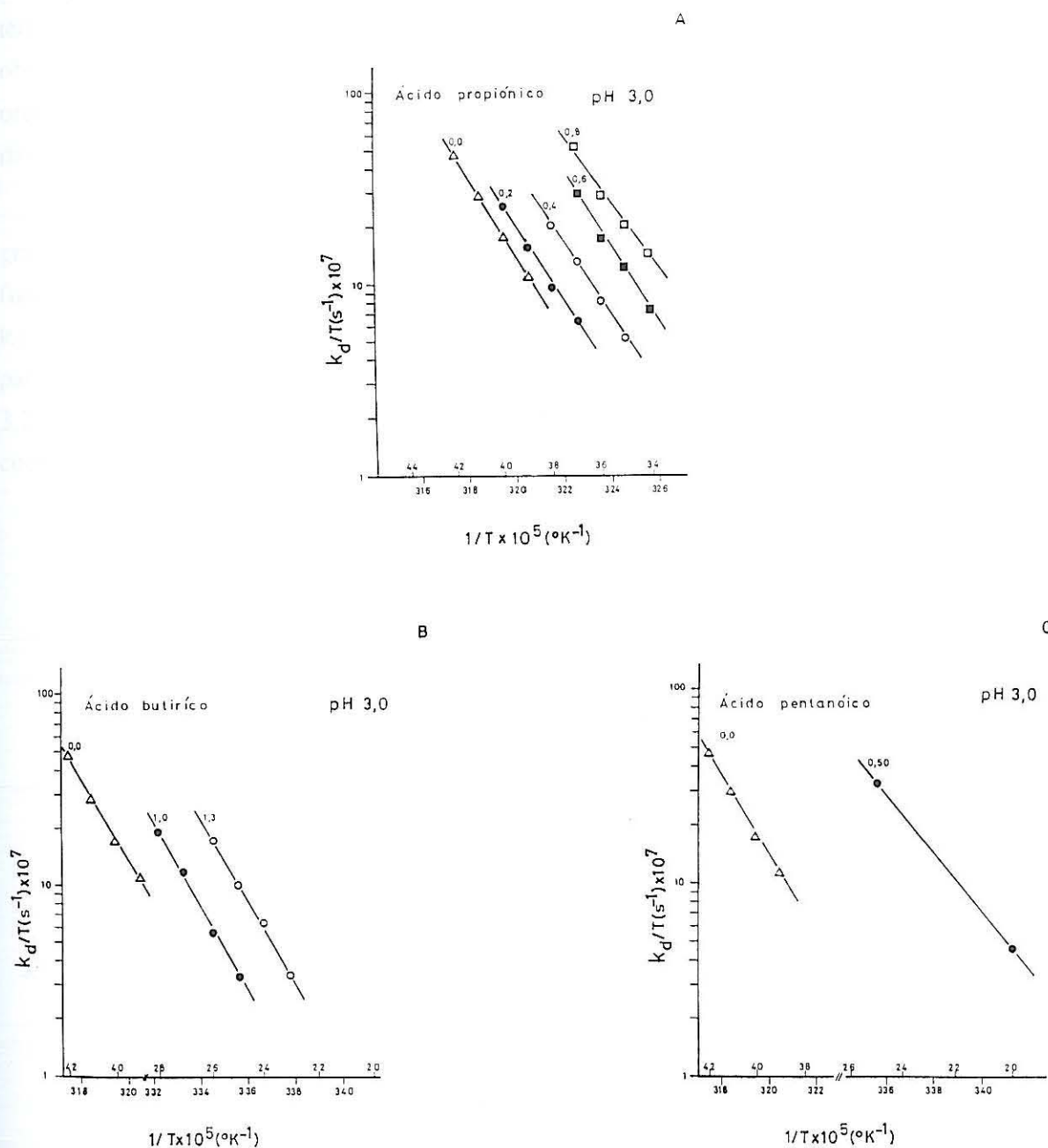


Fig. 3.7 - Gráficos de Arrhenius das taxas específicas da morte térmica de *Z. bailii* ISA 1025 na presença de ácido propiônico (A), butírico (B) e pentanóico (C), a pH 3,0. Os números indicam as concentrações de ácido total [% (v/v)], no meio extracelular.

Uma primeira análise desta figura, indica que os gráficos de Arrhenius respeitantes a cada um dos ácidos estão ordenados segundo a concentração de ácido utilizado e apresentam

sensivelmente a mesma inclinação, sugerindo que, à medida que aumentava a concentração de ácido no meio extracelular diminuía a tolerância térmica da levedura.

Por outro lado, o paralelismo evidenciado pelos gráficos de Arrhenius da morte térmica às diferentes concentrações de ácido, indicou que estes ácidos, à semelhança do que foi observado na presença do ácido acético, actuaram sobre a entropia da morte térmica, dada pela ordenada na origem da recta que representa graficamente a equação 3.2, sem no entanto modificar a entalpia de activação, ou seja o declive da mesma recta.

A partir dos valores de k_D obtidos em condições isotérmicas, construíram-se os gráficos da figura 3.8, que relacionam k_D em função da concentração de ácido extracelular. As figuras, mostram que em condições isotérmicas, para cada um dos ácidos em estudo, o valor de k_D aumentou exponencialmente com a concentração de ácido. Os valores da k_{est} calculados a partir do coeficiente angular de cada uma das rectas experimentais, estão sumariados na tabela 3.2. Os seus valores aumentaram com a lipossolubilidade dos ácidos expressa pelo respectivo coeficiente de repartição lípido - tampão.

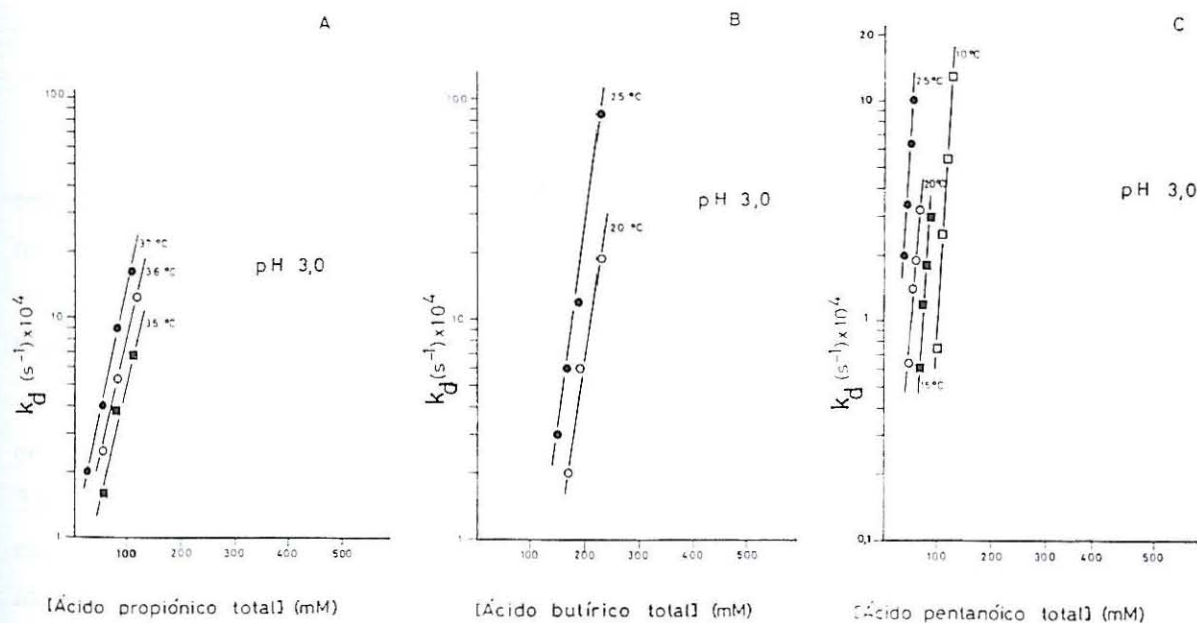


Fig 3.8 - Variação das taxas específicas da morte térmica de *Z. bailii* ISA 1025, com a concentração de ácido propiónico total (A), butírico total (B) e pentanóico total (C), a pH 3,0, em condições isotérmicas.

Tabela 3.2

Valores das constantes exponenciais de estimulação da morte (k_{est}) dos diferentes ácidos carboxílicos em *Z. bailii* ISA 1025 e pelo ácido sórbico em *S. cerevisiae* IGC 4072.

Levedura	Ácido	pH	Coeficiente de ^{a)} repartição lípidio-tampão	k_{est} (l/mol)	
				Ácido total	Ácido não dissociado
<i>Z. bailii</i>	Acético	3,0	0,05	19,00	19,00
		4,0		13,00	19,00
<i>Z. bailii</i>	Propiónico	3,0	0,16	26,00	26,00
<i>Z. bailii</i>	Butírico	3,0	0,62	36,00	36,20
<i>Z. bailii</i>	Pentanóico	3,0	3,02	106,00	106,10
<i>Z. bailii</i>	Sórbico	4,0	3,09	232,00	330,00
<i>S. cerevisiae</i>	Sórbico	4,0	3,09	511,00	727,00

(a) Valores de Leo *et al.* (1971)

3.3.1.4 - Efeitos do ácido sórbico na morte celular de *Zygosaccharomyces bailii* comparativamente com *Saccharomyces cerevisiae*

Para avaliar o efeito do ácido sórbico nos parâmetros termodinâmicos da morte térmica em células de *Zygosaccharomyces bailii* e *Saccharomyces cerevisiae*, fizemos experiências da morte térmica a 4 temperaturas diferentes numa gama de concentrações de ácido que variou entre 0,02 e 0,14% (p/v), e entre 0,02 e 0,08% (p/v), em *Z. bailii* e *S. cerevisiae*, respectivamente.

Os gráficos representativos da variação da população viável (%) com o tempo a várias concentrações de ácido sórbico e diferentes temperaturas estão representadas na Fig. 3.9 e 3.10. Adicionalmente, se representarmos em papel semilogarítmico os valores do inverso da k_d em função do inverso da temperatura absoluta, obtemos os respectivos gráficos de Arrhenius modificados (Fig. 3.11 e 3.12).

Nas figuras 3.11 e 3.12 estão representados gráficos de Arrhenius das taxas específicas de morte obtidas na presença de ácido sórbico a diferentes concentrações. Do paralelismo e linearidade evidenciado pelos Arrhenius das figuras 3.11 e 3.12 deduz-se que, em ambas as leveduras e à semelhança do observado para os outros ácidos o efeito deste ácido se fez sentir sobre a entropia de activação da morte térmica (ΔS^\ddagger) enquanto que a entalpia de activação da morte térmica (ΔH^\ddagger) se manteve praticamente constante.

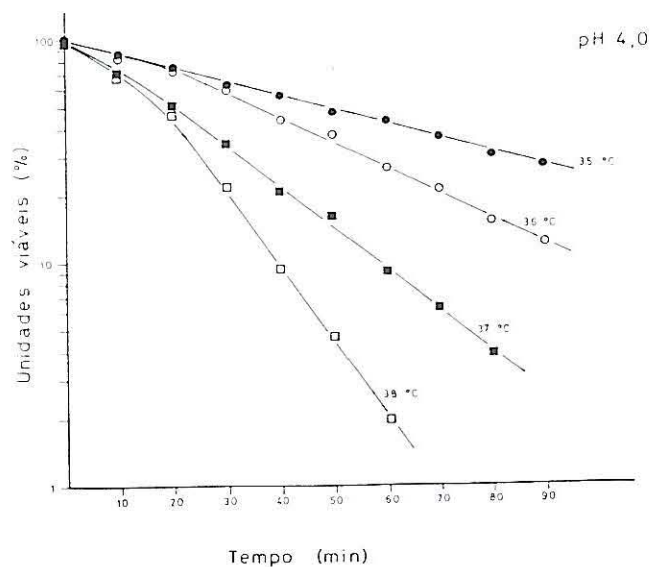


Fig. 3.9 - Curvas semilogarítmicas de sobrevivência de *Z. bailii* ISA 1025, a várias temperaturas letais, na presença de ácido sórbico 0,1% (p/v), a pH 4.0.

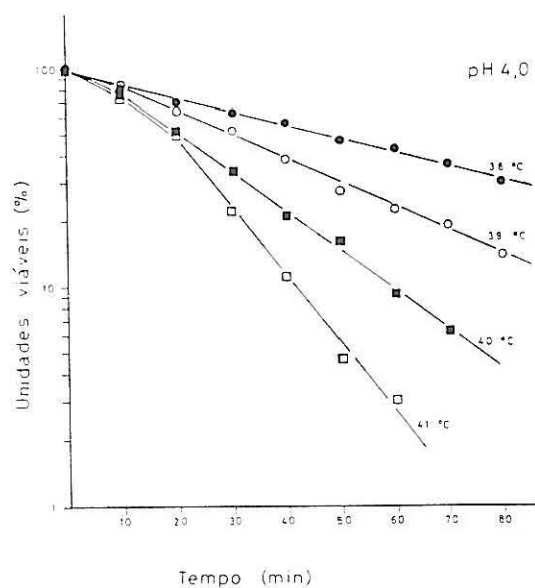


Fig. 3.10 - Curvas semilogarítmicas de sobrevivência de *S. cerevisiae* IGC 4072, a várias temperaturas letais, na presença de ácido sórbico 0,04% (p/v), a pH 4.0.

Nas nossas condições experimentais os valores médios obtidos para ΔH^\ddagger na presença de ácido sórbico foram $98,8 \pm 5,3$ Kcal/mol para *Z. bailii* e $116,0 \pm 6,25$ Kcal/mol para *S. cerevisiae*. Na ausência de ácido os valores de ΔH^\ddagger foram 97,2 e 120,0 Kcal/mol para *Z. bailii* e *S. cerevisiae*, respectivamente.

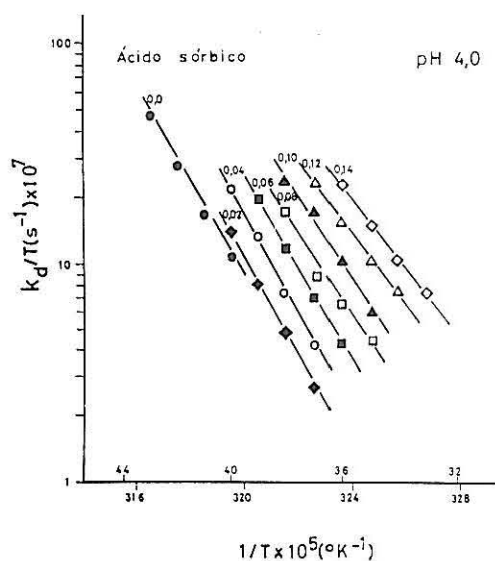


Fig. 3.11 - Gráficos de Arrhenius das taxas específicas da morte térmica de *Z. bailii* ISA 1025, na presença e na ausência de ácido sórbico, a pH 4,0. Os números indicam as concentrações de ácido total [% (p/v)], no meio extracelular.

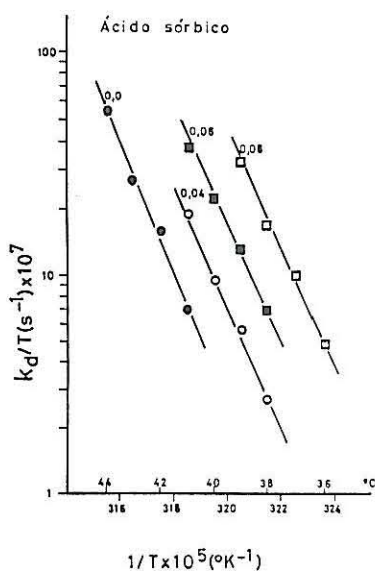


Fig 3.12 - Gráficos de Arrhenius das taxas específicas da morte térmica de *S. cerevisiae* IGC 4072, na presença e na ausência de ácido sórbico, a pH 4,0. Os números indicam as concentrações de ácido total [% (p/v)], no meio extracelular.

Os resultados indicaram que os gráficos de Arrhenius na presença e ausência de ácidos foram essencialmente paralelos. Além disso, como prevê o modelo matemático deduzido para o efeito dos alcanóis por Leão e van Uden (1982), verificamos que sob condições isotérmicas a taxa específica da morte (k_d) foi uma função exponencial da concentração de ácido, (Fig 3.13 e 3.14).

Os valores estimados para k_{est} a partir dos resultados das figuras 3.13 e 3.14 e pela equação (3.6) encontram-se representados na tabela 3.2. O valor de k_{est} para o ácido sórbico, a pH 4,0, em *Z. bailii* foi cerca de metade do obtido para *S. cerevisiae*.

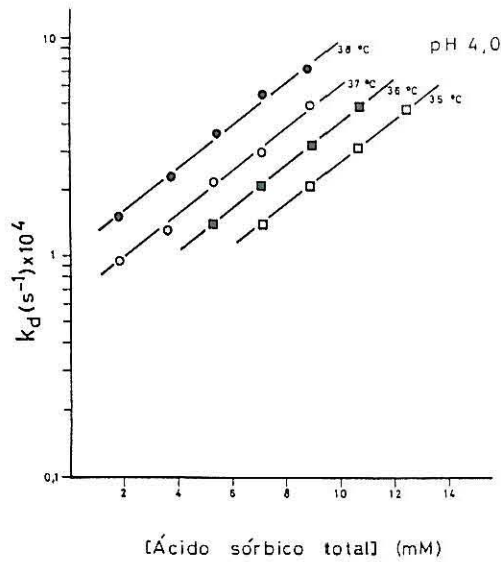


Fig 3.13 - Variação das taxas específicas da morte térmica de *Z. bailii* ISA 1025, com a concentração de ácido sórbico total, a pH 4,0, em condições isotérmicas.

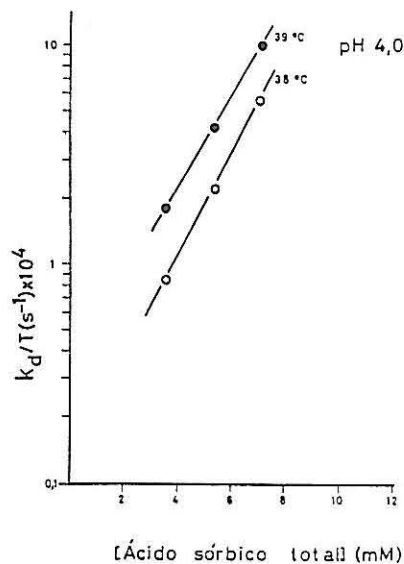


Fig 3.14 - Variação das taxas específicas da morte térmica de *S. cerevisiae* IGC 4072, com a concentração de ácido sórbico total, a pH 4,0, em condições isotérmicas.

3.3.1.5 - Efeitos do etanol na morte celular

Numa primeira série de experiências obtiveram-se estimativas de k_d , para cada uma das diferentes concentrações de etanol, a 4 temperaturas diferentes e a pH 4,0.

Tal como foi observado na presença de ácidos as curvas de sobrevivência obtidas para *Zygosaccharomyces bailii*, na presença de etanol obedeceram ao modelo descrito nas secções anteriores e expresso pela equação (3.5).

Na figura 3.15 apresentamos um exemplo típico das curvas de sobrevivência obtidas experimentalmente. Uma análise desta figura comparativamente com a figura 3.1 (morte térmica na ausência de ácido ou etanol) indica que o etanol aumentou a sensibilidade a morte térmica de *Z. bailii* deslocando as temperaturas letais para valores inferiores aos da morte térmica na ausência de ácido. O efeito acentuou-se, com o aumento da concentração de etanol no meio extracelular.

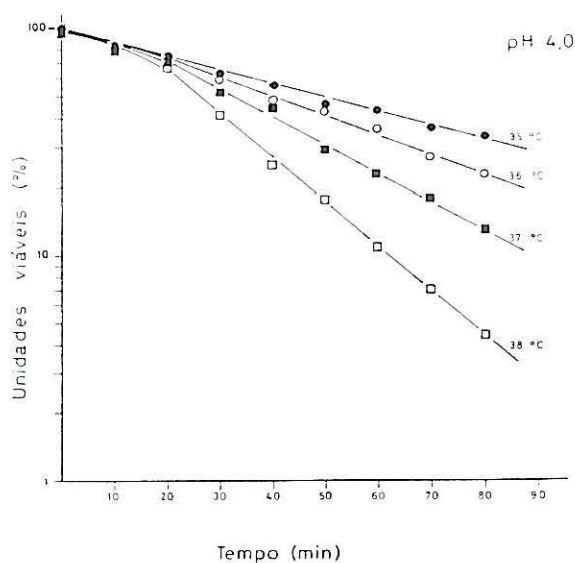


Fig 3.15 - Curvas semilogarítmicas de sobrevivência de *Z. bailii* ISA 1025, a várias temperaturas, na presença de etanol 8% (p/v), a pH 4,0.

Com os diferentes valores de k_d , construiu-se um conjunto de gráficos de Arrhenius modificados da morte térmica, para cada uma das concentrações de etanol (Fig. 3.16). A figura indica, que estes gráficos constituiram uma família de rectas essencialmente paralelas, que se deslocaram no sentido das temperaturas mais baixas, à medida que aumenta a concentração de álcool adicionado ao meio de cultura. Adicionalmente, o paralelismo evidenciado pelos perfis da morte térmica, indica que o etanol afectou a entropia de activação da morte térmica (ΔS^\ddagger), sem no entanto modificar a entalpia (ΔH^\ddagger), expressa pelo declive da recta que representa a equação (3.2).

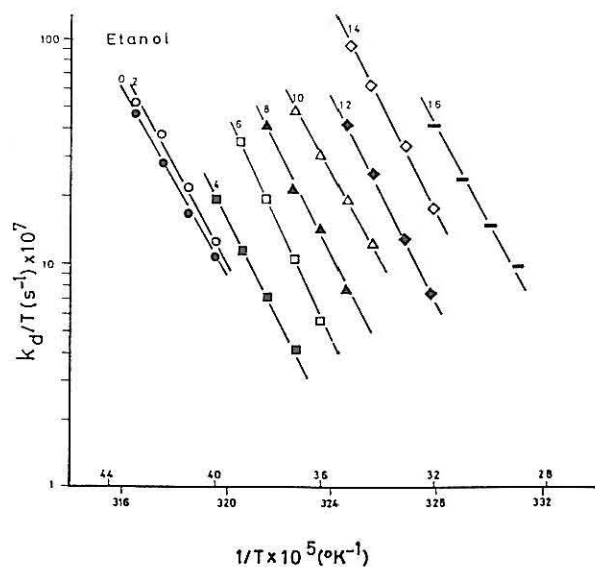


Fig. 3.16 - Gráficos de Arrhenius das taxas específicas da morte térmica de *Z. bailii* ISA 1025, na presença de etanol a pH 4,0. Os números indicam as concentrações de etanol [% (p/v)], no meio extracelular.

Em concordância com esta análise visual dos gráficos da figura 3.16 os valores da entalpia de ativação da morte térmica na ausência ($\Delta H^\ddagger = 97,2$ Kcal/mol) e na presença (ΔH^\ddagger médio = $98,6 \pm 0,23$ Kcal/mol) de álcool foram muito idênticos.

Nas nossas condições experimentais, verificamos também, e à semelhança do que foi descrito nas secções anteriores para os ácidos que a temperatura constante, k_d foi uma função exponencial da concentração de etanol (Fig. 3.17). O valor estimado para a k_{est} a partir dos resultados experimentais da figura 3.17 foi 2,0 l/mol.

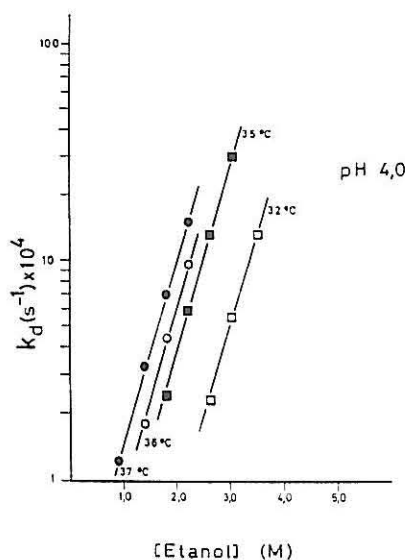


Fig. 3.17 - Variação das taxas específicas da morte térmica de *Z. bailii* ISA 1025, com a concentração de etanol, a pH 4,0 em condições isotérmicas.

3.3.2. Morte celular induzida por ácidos fracos em células de *Zygosaccharomyces bailii* crescidas num meio com glucose e ácido acético - células adaptadas

3.3.2.1 - Efeitos do ácido acético a pH 3,0 e 4,0

Foram ainda efectuadas experiências da morte térmica em células adaptadas ao ácido acético. Para tal as células foram crescidas em meio com glucose (2%, p/v) e ácido acético (0,5%, p/v).

Nas experiências realizadas obtiveram-se estimativas de k_d na presença de concentrações crescentes de ácido acético a pH 3,0 e 4,0. Os gráficos semilogarítmicos representativos da variação da população viável (%) com o tempo, a várias concentrações de ácido acético pH 3,0 e 4,0 estão representados na figura 3.18 (A e B).

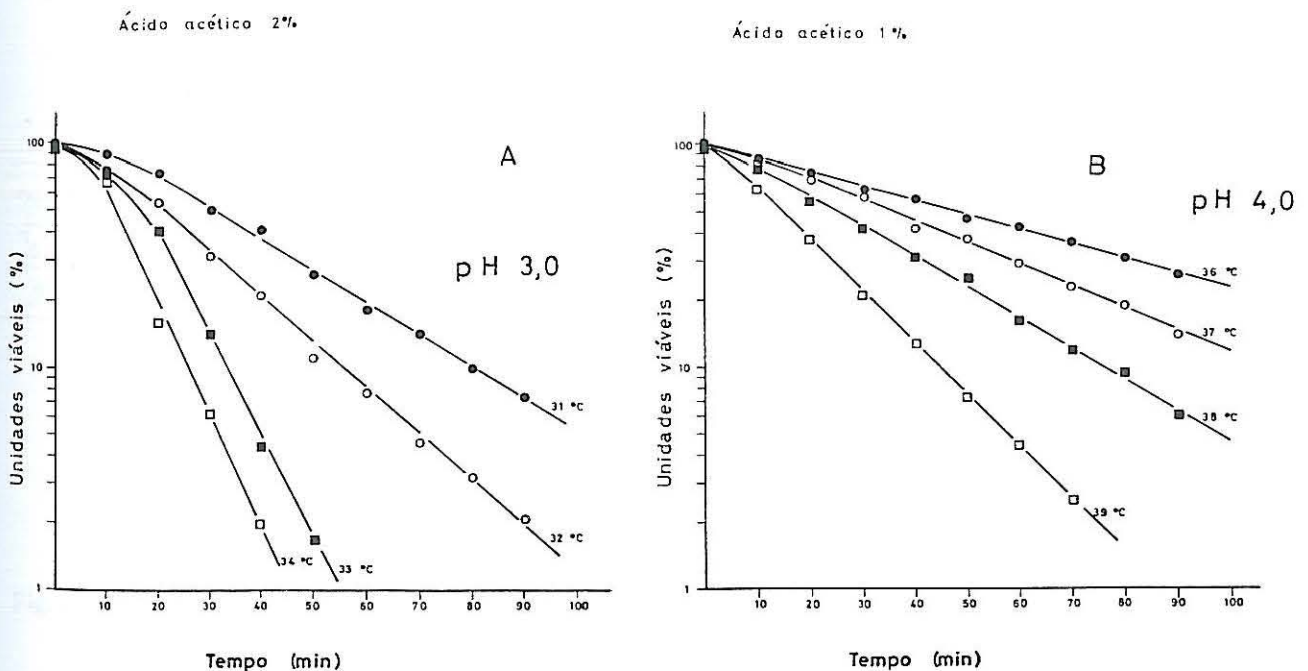


Fig. 3.18 - Curvas semilogarítmicas de sobrevivência em células adaptadas de *Z. bailii* ISA 1025, a várias temperaturas letais, na presença de ácido acético 2% (v/v) e 1% (v/v) a pH 3,0 (A) e pH 4,0 (B), respectivamente.

O estudo da figura 3.18 mostra que, tal como foi observado para as células não adaptadas, as curvas de sobrevivência constam de uma recta precedida de um patamar, cuja duração dependeu da concentração de ácido e da temperatura.

Os gráficos de Arrhenius modificados obtidos para cada um dos ácidos, a partir da representação semilogarítmica dos valores de k_d em função do inverso da temperatura absoluta ($1/T$) (Fig. 3.19), constituíram também uma família de rectas essencialmente paralelas entre si, sugerindo que à medida que aumentava a concentração de ácido no meio extracelular diminuía a temperatura tolerada por *Zygosaccharomyces bailii*. O paralelismo evidenciado por estas representações às várias concentrações de ácido acético sugeriu, que este ácido afectou as ordenadas na origem dos gráficos de Arrhenius não modificando significativamente a entalpia de activação da morte térmica. Em *Z. bailii* as médias dos valores obtidos para a entalpia de activação da morte térmica foram de $97,8 \pm 18,3$ e $89,1 \pm 5,3$ Kcal/mol, respectivamente, para o ácido acético a pH 3,0 e 4,0, comparativamente com o valor de 97,2 Kcal/mol a pH 3,0 e 100,1 Kcal/mol a pH 4,0, na ausência de ácido.

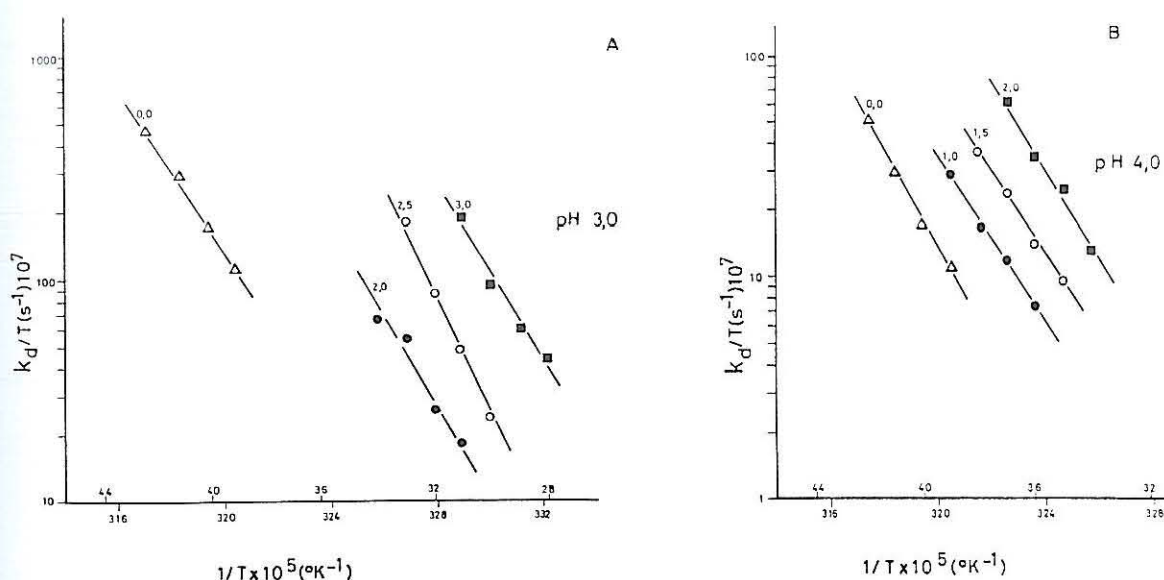


Fig. 3.19 - Gráficos de Arrhenius modificados das taxas específicas da morte térmica em células adaptadas de *Z. bailii* ISA 1025, na presença de ácido acético, a pH 3,0 (A) e 4,0 (B). Os números indicam as concentrações de ácido total [% (v/v)], no meio extracelular.

Além disso e à semelhança do observado em células não adaptadas, nas nossas condições experimentais, verificou-se que a taxa específica da morte térmica aumentava exponencialmente com a concentração de ácido presente para uma mesma temperatura. Assim, a representação do $\ln k_d$ em função da concentração de ácido para cada temperatura ensaiada, foi linear, sendo o coeficiente angular das várias rectas similar (Fig. 3.20). Os valores estimados para a k_{est} a partir dos resultados experimentais da figura 3.20, estão resumidos na tabela 3.3.

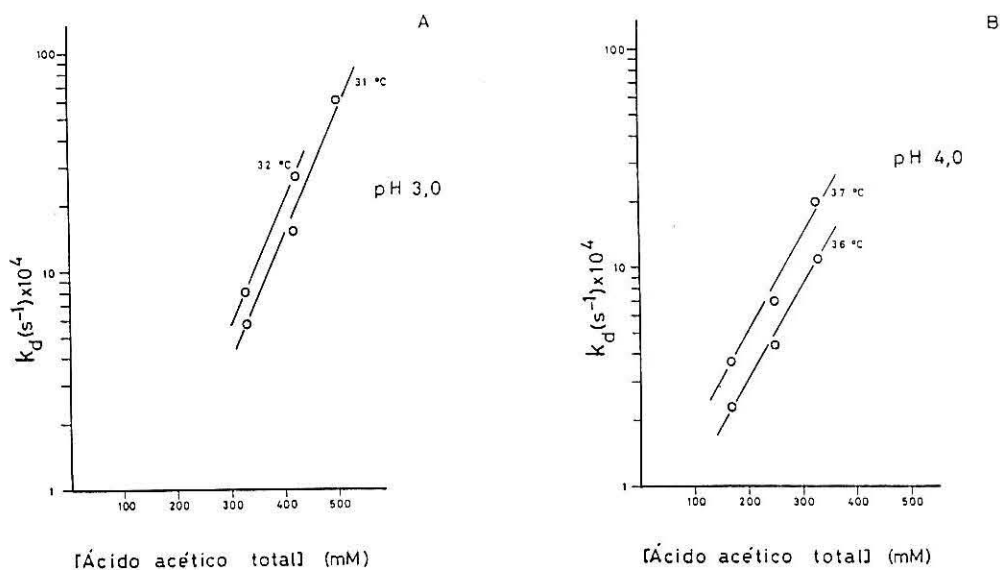


Fig. 3.20 - Variação das taxas específicas da morte térmica em células adaptadas de *Z. bailii* ISA 1025, com a concentração de ácido acético total, a pH 3,0 (A) e 4,0 (B), em condições isotérmicas.

Tabela 3.3

Valores das constantes exponenciais de estimulação da morte (k_{est}) do ácido acético em células de *Z. bailii* ISA 1025 adaptadas à presença de ácido, a diferentes temperaturas, a pH 3,0 e 4,0.

Temperatura	pH	k_{est} (l/mol)	
		Ácido acético total	Ácido acético não dissociado
31° C	3,0	14,20	14,10
32° C		14,00	14,00
36° C	4,0	10,00	15,10
37° C		10,50	14,00

Adicionalmente, observa-se que a pH 3,0, comparativamente com pH 4,0, o estímulo da morte térmica pelo ácido acético total expresso pela constante exponencial de estimulação da morte foi mais acentuado. No entanto os valores de k_{est} pelo ácido acético quando expressos em função da concentração de ácido não dissociado, foram idênticos sugerindo que este estímulo está correlacionado com a concentração de ácido acético não dissociado. Comparando estes resultados com o descrito para células não adaptadas (Tab. 3.2) verifica-se que, o estímulo da morte pelo ácido acético em células crescidas em glucose na presença de ácido

acético, células adaptadas, foi ligeiramente inferior do observado em células não adaptadas.

3.3.2.2 - Efeitos do ácido sórbico, a pH 4,0

Utilizando células provenientes de culturas em meio com glucose e ácido sórbico (0,05%, p/v) obtiveram-se estimativas de k_d , a 4 temperaturas diferentes, para as seguintes concentrações de ácido sórbico: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,12 e 0,14 % (p/v).

Curvas semilogarítmicas de sobrevivência representativas dos resultados experimentais estão representadas na figura 3.21. As taxas específicas da morte térmica foram obtidas a partir do coeficiente angular da componente linear de cada uma das curvas de sobrevivência.

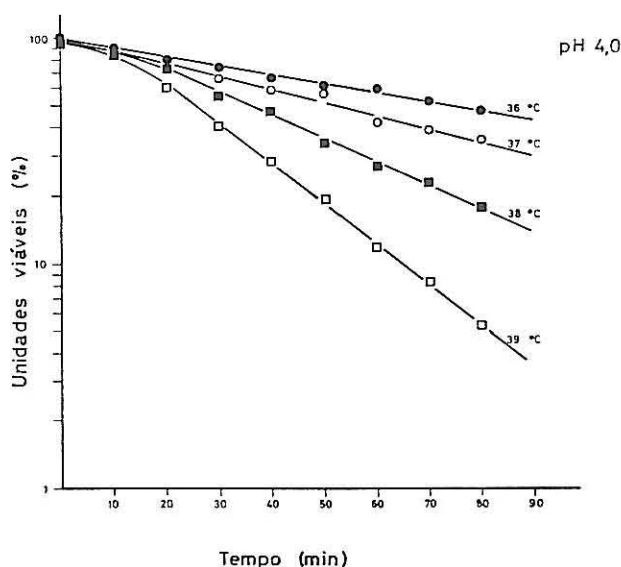


Fig 3.21 - Curvas semilogarítmicas de sobrevivência em células adaptadas de *Z. bailii* ISA 1025, a várias temperaturas letais, na presença de ácido sórbico 0,1% (p/v), a pH 4,0.

Gráficos de Arrhenius modificados da variação exponencial de k_d em função do inverso da temperatura absoluta, a diferentes temperaturas, estão representados na figura 3.22. De forma análoga ao descrito nas secções anteriores, esta figura indica que os gráficos de Arrhenius da morte térmica respeitantes ao ácido sórbico, constituíram uma família de rectas essencialmente paralelas, sugerindo assim que, à medida que aumentava a concentração de ácido no meio de suspensão de células, baixava a temperatura letal das células da levedura sem que a entalpia de activação seja significativamente afectada. Com efeito, os valores da entalpia de activação estimados a partir dos gráficos de Arrhenius na ausência e presença de ácido sórbico foram análogos, conforme se apresenta na tabela 3.4.

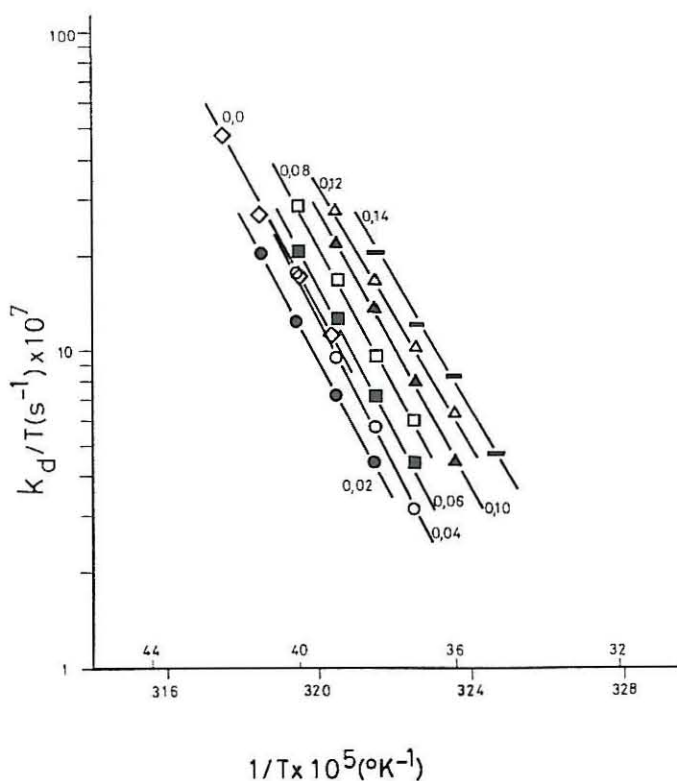


Fig. 3.22 - Gráficos de Arrhenius das taxas específicas da morte térmica em células adaptadas de *Z. bailii* ISA 1025, na presença de ácido sórbico, a pH 4,0. Os números indicam as concentrações de ácido total [% (p/v)], no meio extracelular.

Tabela 3.4

Valores da entalpia de activação (ΔH^\ddagger) estimados a partir dos gráficos de Arrhenius da Fig. 3.22.

	ΔH^\ddagger (K cal/mol) ¹⁾
Ausência de ácido	97,20
Presença de ácido	88,03 ± 6,20

1) Os valores apresentados correspondem à média dos valores de ΔH^\ddagger obtidos às diferentes concentrações de ácido sórbico.

Os valores de k_d encontram-se representados sob a forma de gráficos semilogarítmicos em função da concentração de ácido no meio extracelular, na figura 3.23. A partir do declive de cada uma das rectas estimou-se o valor da k_{est} . Os valores obtidos encontram-se sumariados na tabela 3.5.

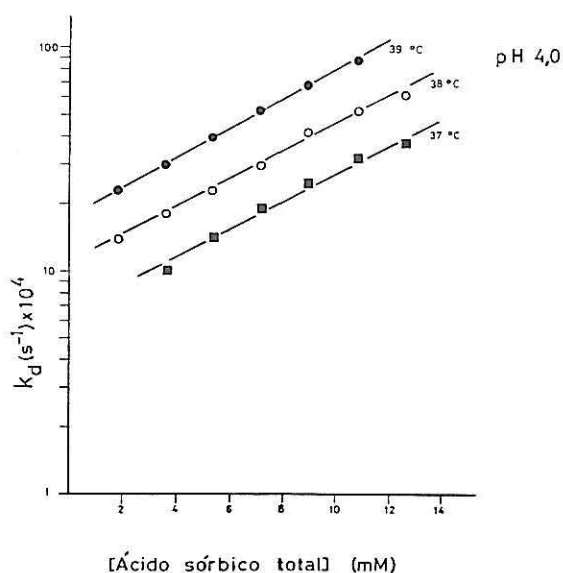


Fig. 3.23 - Variação das taxas específicas da morte térmica em células adaptadas de *Z. bailii* ISA 1025, com a concentração de ácido sórbico total a pH 4,0, em condições isotérmicas.

Tabela 3.5

Valores das constantes exponenciais de estimulação da morte (k_{est}) do ácido sórbico em células de *Z. bailii* ISA 1025 adaptadas à presença de ácido, a diferentes temperaturas e a pH 4,0.

Temperatura	pH	k_{est} (l/mol)	
		Ácido sórbico total	Ácido sórbico não dissociado
37	4,0	148,75	212,50
38		144,40	213,40
39		149,60	213,70

3.4. - Discussão

3.4.1 - Efeitos de ácidos fracos e do etanol nos parâmetros termodinâmicos da morte celular de *Zygosaccharomyces bailii*

Os resultados experimentais apresentados neste capítulo respeitantes aos efeitos do etanol e dos ácidos (acético, propiônico, butírico, pentanóico e sórbico) na viabilidade das

células de *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1025, crescidas à temperatura de 25° C, num meio com glucose, indicaram que:

- O etanol e os ácidos nas concentrações por nós ensaiadas, afectaram negativamente a viabilidade das células de *Z. bailii* crescidas em glucose, provocando um deslocamento das temperaturas letais para temperaturas mais baixas. Verificou-se assim, uma maior sensibilização térmica dos alvos celulares determinantes da morte térmica, pela acção dos inibidores.
- Os diferentes compostos estudados aumentaram a taxa específica da morte térmica, segundo um mecanismo tal que, apenas a entropia de activação da morte térmica foi afectada.
- Os gráficos experimentais de Arrhenius respeitantes à morte induzida pelos vários ácidos e etanol foram lineares, e constituíram uma família de rectas essencialmente paralelas. Em concordância com estes resultados em condições isotérmicas, 1) k_d foi uma função exponencial da concentração de ácido ou etanol no meio extracelular e 2) os coeficientes angulares destes gráficos foram idênticos para todas as temperaturas e corresponderam à constante exponencial de estimulação.
- Os valores de k_{est} para os ácidos na fase aquosa, calculados pela equação 3.6 aumentaram, com os respectivos valores dos coeficientes lípido-tampão. Estes resultados sugeriram que, os sítios termosensíveis da morte térmica da levedura *Z. bailii* se encontram provavelmente em regiões lipídicas das membranas.
- As células adaptadas ao ácido acético, apresentaram uma sensibilidade ao ácido no que respeita ao efeito estimulador da morte térmica ligeiramente mais reduzida do que células não adaptadas, isto é, crescidas num meio com glucose na ausência de ácidos. Assim, por exemplo, o efeito de 0,8(%) (p/v) de ácido acético nas células não adaptadas correspondeu à acção de 1,0% nas células crescidas na presença de conservante. No entanto, para o caso do ácido sórbico foram encontradas diferenças mais significativas entre células adaptadas e células não adaptadas. Com efeito, comparando os resultados obtidos em outras condições (Tab. 3.2 e 3.3) verificou-se que a adaptação ao ácido sórbico se traduziu numa diminuição do valor da constante exponencial de estimulação da morte celular, de 232,0 l/mol para 147,58 l/mol.

A análise comparativa dos resultados obtidos aos valores de pH testados indicou que muito provavelmente é a forma não dissociada do ácido a principal responsável pelo estímulo da morte térmica induzida pela presença de ácidos no meio extracelular. Esta hipótese é também apoiada, pelo facto da toxicidade dos ácidos, calculada pela constante exponencial de estímulo da morte estar correlacionada com a sua lipossolubilidade.

- Em *Z. bailii* as concentrações de ácido acético, propiónico, butírico, pentanóico e

sórbico por nós utilizados, não induziram morte de baixa entalpia, pois os gráficos de Arrhenius aparentemente apenas são constituídos por uma família de rectas paralelas.

3.4.2 - Análise comparativa dos efeitos dos ácidos fracos e do etanol em *Zygosaccharomyces bailii* e em *Saccharomyces cerevisiae*

Utilizando a constante exponencial de estimulação como parâmetro expressivo dos efeitos estimuladores induzidos pelos ácidos e etanol na morte celular apresenta-se na tabela 3.6 uma análise comparativa do comportamento de *Zygosaccharomyces bailii* com *Saccharomyces cerevisiae*.

No que diz respeito aos efeitos estimuladores do etanol sobre a morte térmica em *Z. bailii*, podem ser considerados de um modo geral, semelhantes aos descritos previamente em *S. cerevisiae*, apesar do valor da k_{est} calculado para a estirpe em estudo ser ligeiramente inferior ao obtido para as células de duas estirpes diferentes de *S. cerevisiae* crescidas em idênticas condições experimentais por Leão e van Uden (1982) e por Loureiro e van Uden (1982), Loureiro (1984). Por outro lado, os resultados sobre os efeitos estimuladores dos ácidos na morte térmica de *Z. bailii*, quando comparados com os resultados obtidos em *S. cerevisiae*, indicaram que:

– Os valores das constantes exponenciais de estímulo da morte térmica induzida pelos ácidos em *Z. bailii*, foram significativamente inferiores aos de *S. cerevisiae*, sugerindo que estes compostos são mais tóxicos no que respeita à viabilidade da célula a temperaturas elevadas, em *S. cerevisiae* do que na levedura em estudo. Por exemplo, o efeito tóxico do ácido acético expresso pela k_{est} é cerca de 3,5 vezes inferior ao descrito para este ácido para *S. cerevisiae*.

– Adicionalmente, e tal como foi observado para *S. cerevisiae*, em *Z. bailii* os valores de k_{est} para os ácidos ensaiados também estão fortemente correlacionados com o seu coeficiente de repartição lípido-tampão, aumentando com a lipossolubilidade dos compostos.

Por outro lado, e ao contrário do que foi referido para *S. cerevisiae* por Pinto *et al.* (1989) e por Cardoso e Leão (1992) em *Z. bailii*, a temperaturas baixas e intermédias, não foi observada morte de baixa entalpia induzida pelos ácidos. Segundo estes autores em *S. cerevisiae*, os gráficos de Arrhenius da morte celular induzida pela presença dos ácidos (acético, propiónico, butírico e pentanóico) são lineares e podem ser decompostos em duas famílias de rectas paralelas, indicando a ocorrência de dois tipos de morte: morte de alta entalpia, predominante para concentrações de ácido baixas e temperaturas altas e morte de baixa entalpia predominante para concentrações de ácido elevadas e temperaturas baixas e intermédias. A morte de alta entalpia induzida pelos ácidos e/ou pelo etanol representa morte térmica estimulada exponencialmente pela adição dos diferentes compostos. O segundo tipo de morte induzida

pelos ácidos, morte de baixa entalpia, é diferente do primeiro, tendo-se verificado que em *S. cerevisiae* a acidificação intracelular pode estar relacionada com a indução deste tipo de morte induzida pelos ácidos monocarboxílicos ou pelo etanol a temperaturas baixas e intermédias.

Tabela 3.6

Valores das constantes exponenciais de estimulação da morte (k_{est}) do etanol e dos ácidos fracos em *Z. bailii* obtidos no presente trabalho comparativamente com os descritos para *S. cerevisiae*.

Etanol/Ácido fraco	k_{est} (l/mol)		Referência dos valores descritos para <i>S. cerevisiae</i>
	<i>Z. bailii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
Etanol	2,00	2,62	Leão e van Uden (1982)
	—	2,82	Loureiro e van Uden (1982)
Acético			
células não adaptadas	19,00	84,55 - 74,42	Pinto <i>et al.</i> (1989); Cardoso (1994)
células adaptadas	14,10	—	
Propiónico			
células não adaptadas	26,00	46,30	"
Butírico			
células não adaptadas	36,00	69,95	"
Pentanóico			
células não adaptadas	106,00	215,90	"
sórbico			
células não adaptadas	232,00	511,00	
células adaptadas	147,58	—	

De acordo com os nossos resultados, em *Z. bailii*, a temperaturas intermédias e baixas (até 15° C) não foi possível detectar ocorrência de morte de baixa entalpia na presença dos ácidos. Nesta gama de temperaturas a presença destes compostos estimulava a morte celular de tal modo que a entalpia de activação não era significativamente afectada. Tal parece indicar que em *Z. bailii*, concentrações elevadas de ácidos estimulam predominantemente a morte térmica deslocando as temperaturas letais para valores muito baixos.

Finalmente, é de referir que o valor de ΔH^\ddagger obtido em *Z. bailii* na ausência e na presença de ácidos ou etanol (97,2 Kcal/mol) foi da mesma ordem de grandeza ao previamente determinados em três estirpes diferentes de *S. cerevisiae*: 113,60 Kcal/mol van Uden (1974), 92,1 Kcal/mol Leão e van Uden (1982), 126,0 Kcal/mol Cardoso (1994) e 108,9 Kcal/mol Loureiro e van Uden (1982) e em *Kluyveromyces fragilis* (97,4 Kcal/mol) Sá Correia e van Uden (1982).

CAPÍTULO 4

EFEITOS COMBINADOS DE ÁCIDOS FRACOS E DO ETANOL NA MORTE CELULAR DE *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1025.

4.1 - Introdução

Nos capítulos anteriores apresentamos resultados experimentais indicando que a presença de etanol e ácidos fracos no meio extracelular, têm efeitos negativos sobre o crescimento e a morte celular da levedura *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1025, quando crescida num meio com glucose. Os efeitos acentuavam-se à medida que as concentrações de tóxico aumentavam no meio extracelular. No entanto, os efeitos, de um modo global foram inferiores aos descritos para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

No presente capítulo serão apresentados resultados experimentais sobre os efeitos combinados do etanol e dos ácidos acético ou sórbico na cinética de morte celular da levedura em estudo.

4.2 - Material e Métodos

O material biológico utilizado, bem como a metodologia e as condições experimentais subjacentes aos ensaios de morte celular realizados neste capítulo, foram idênticos aos descritos na secção material e métodos do capítulo 3. Apenas variou a composição do meio de cultura em que se efectuaram as experiências de morte celular, que será indicada na secção dos resultados.

4.3 - Resultados

4.3.1 - Morte celular induzida pelos ácidos acético e sórbico na presença de etanol em células crescidas num meio com glucose - células não adaptadas.

Com o objectivo de estudar o efeito combinado dos ácidos acético, e sórbico e do etanol na viabilidade de células de *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1025, fizeram-se experiências da morte celular na ausência e na presença de ácidos e etanol, a quatro temperaturas diferentes a pH 4,0.

As curvas semilogarítmicas de sobrevivência obtidas nestas condições obedeceram ao modelo referido na secção 2.2.2. A figura 4.1 (A e B) apresenta resultados experimentais representativos da variação do número de sobreviventes (%) com o tempo, a diferentes temperaturas às concentrações 1,4% (v/v) de ácido acético (A) e 0,08% (p/v) de ácido sórbico (B) na presença de 8,0% (p/v) de etanol. Estes resultados mostram que após um período inicial em que não se detectou perda significativa de viabilidade celular, segue-se uma recta cujo coeficiente angular é numericamente igual à taxa específica da morte celular. Para cada um dos ácidos na presença de etanol, a duração do patamar e o valor do declive da recta da curva de sobrevivência foram função da temperatura e da concentração do ácido no meio de suspensão de células.

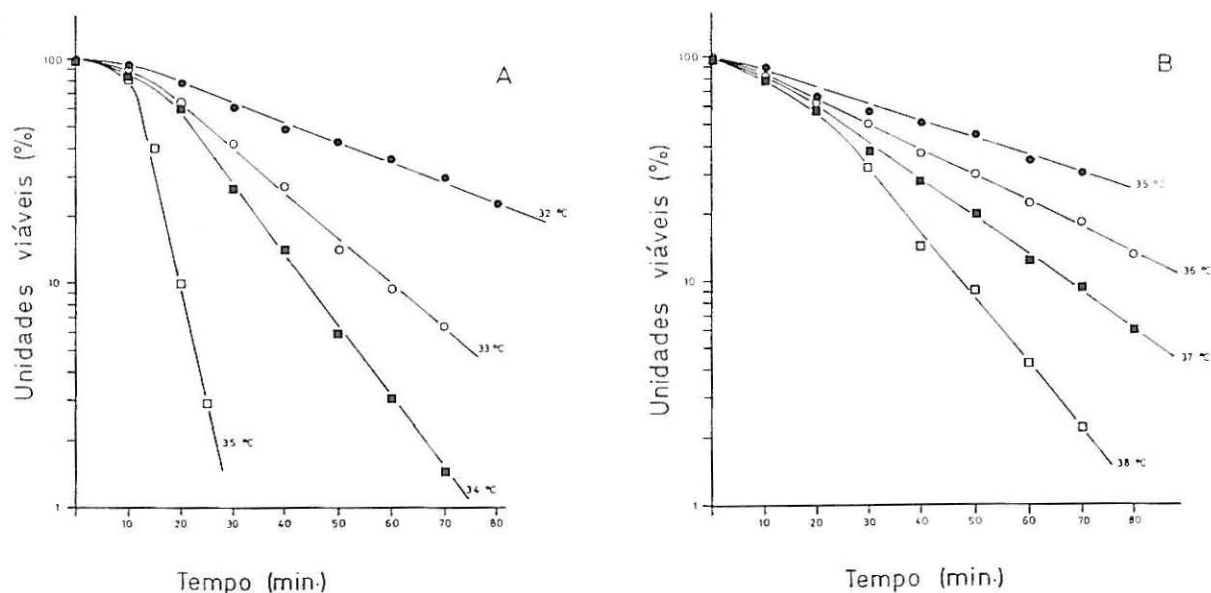


Fig. 4.1 - Curvas semilogarítmicas de sobrevivência de *Z. bailii* ISA 1025, a várias temperaturas letais, na presença de ácido acético (1,4%, v/v) + etanol (8%, p/v) (A) e ácido sórbico (0,08%, p/v) + etanol (8%, p/v) (B).

Adicionalmente, a adição de ácidos induziu a um deslocamento das temperaturas letais para valores mais baixos. Este efeito foi tanto mais acentuado quanto mais elevada era a concentração de ácido no meio extracelular.

Com os diferentes valores das taxas específicas de morte celular estimadas a partir dos declives das rectas experimentais, construíram-se os gráficos de Arrhenius que exprimem a dependência dos valores de k_d com a temperatura.

Na figura 4.2 (A e B) apresentamos os gráficos de Arrhenius da morte celular induzida

pelos ácidos acético e sórbico na presença de etanol. Numa primeira análise visual da figura, verificamos que os gráficos de Arrhenius constituíram uma família de rectas paralelas entre si. Além disso, à medida que a concentração de ácido na presença de etanol aumentava no meio extracelular, os respectivos gráficos de Arrhenius deslocaram-se no sentido da diminuição da temperatura. Do paralelismo evidenciado pelos Arrhenius da figura 4.2 deduz-se, que para ambos os ácidos na presença de etanol e à semelhança do que foi observado no capítulo 3, os efeitos se fizeram sentir sobre a entropia de activação da morte térmica, enquanto que a entalpia de activação não foi significativamente afectada. Nestas condições experimentais os valores médios para a entalpia de activação da morte térmica, calculados pelos declives dos gráficos de Arrhenius foram de $107,6 \pm 4,7$ Kcal/mol para o ácido acético na presença de etanol e de $94,3 \pm 5,0$ Kcal/mol para o ácido sórbico na presença de etanol.

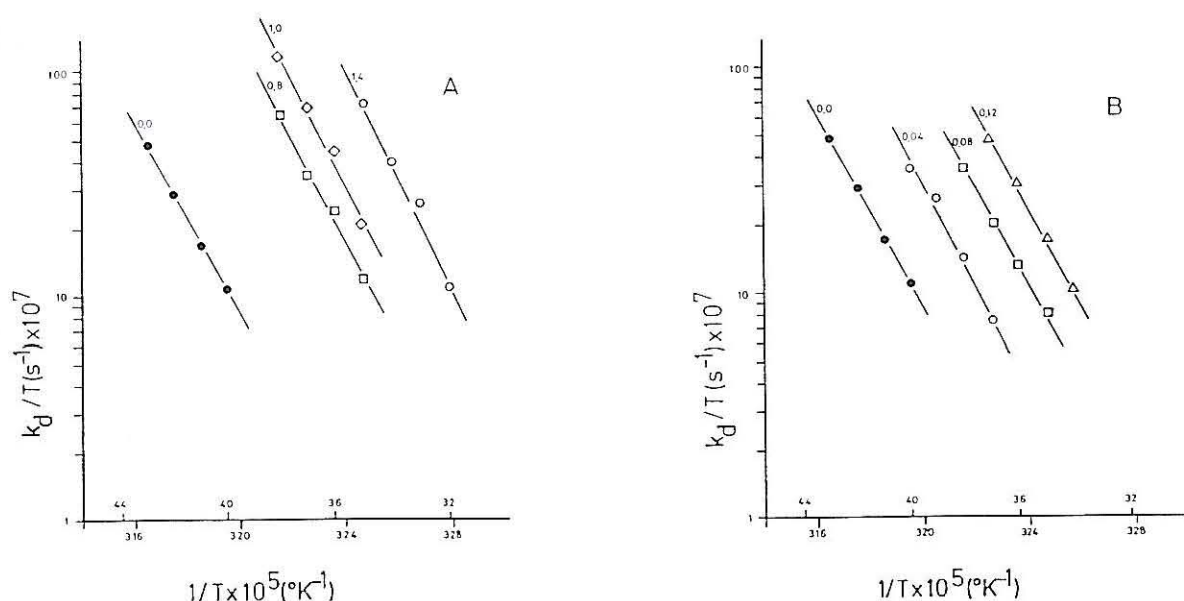


Fig. 4.2 - Gráficos de Arrhenius das taxas específicas da morte celular de *Z. bailii* ISA 1025, na presença de ácido acético total + etanol (8%, p/v) (A) e ácido sórbico total + etanol (8%, p/v) (B). Os números indicam as concentrações de ácido no meio extracelular. Ácido acético [% (v/v)] e ácido sórbico [% (p/v)].

Por outro lado, em condições isotérmicas, observou-se um aumento exponencial da taxa específica da morte celular induzida pelos ácidos na presença de etanol à medida que aumentava a concentração do ácido no meio de cultura. A partir do declive das rectas experimentais da figura 4.3 foram estimados os valores das constantes exponenciais de estimulação da morte celular induzida pelos ácidos na presença de etanol. Os valores obtidos estão sumariados na tabela 4.1.

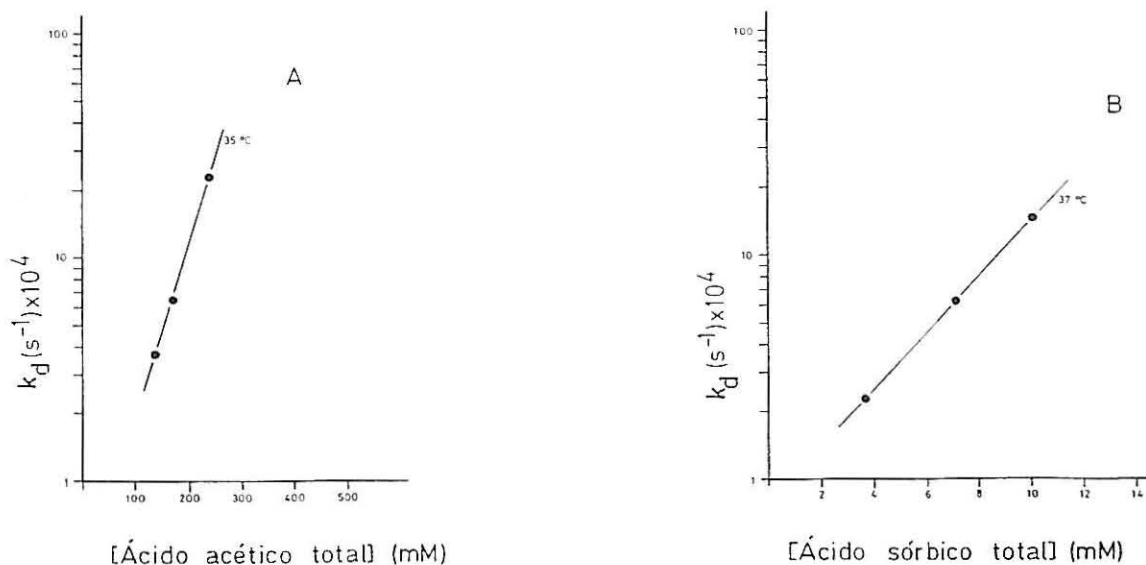


Fig. 4.3 - Variação das taxas específicas da morte celular de *Z. bailii* ISA 1025, com a concentração de ácido acético total na presença de etanol 8% (p/v) (A) e sórbico total na presença de 8% (p/v) etanol (B), a pH 4,0, em condições isotérmicas.

Tabela 4.1

Valores das constantes exponenciais de estimulação da morte (K_{est}) dos ácidos acético e sórbico na presença de etanol em células de *Z. bailii* ISA 1025 não adaptadas, pH 4,0.

Ácido + etanol 8% (p/v)	k_{est} (Ácido total) (l/mol)
Acético	18,50
Sórbico	264,57

4.3.2 - Morte celular induzida pelos ácidos acético e sórbico na presença de etanol em células crescidas num meio com glucose e ácido - células adaptadas

Utilizando células crescidas previamente em meio mineral suplementado com glucose (2%, p/v) e ácido acético (0,5%, v/v) e com glucose e ácido sórbico (0,02%, p/v), à temperatura de 25° C, fizeram-se experiências da morte celular na ausência e na presença de ácidos acético ou sórbico, respectivamente, com etanol.

Nas nossas condições experimentais e à semelhança do que foi descrito na secção anterior, observamos que as curvas de sobrevivência obedeceram a uma cinética de decréscimo exponencial da população viável. Na figura 4.4 (A e B) apresentamos curvas semilogarítmicas de sobrevivência, na presença de 8% (p/v) de etanol + 1,4% (v/v) de ácido acético e 8% (p/v) de etanol + 0,08% (p/v) de ácido sórbico. Para cada concentração de ácido os valores dos declives das rectas de sobrevivência e a duração do patamar foram função da temperatura, da natureza e da concentração de ácido. Adicionalmente, a presença de ácidos e etanol provocou um deslocamento das temperaturas letais para uma zona de temperaturas mais baixas.

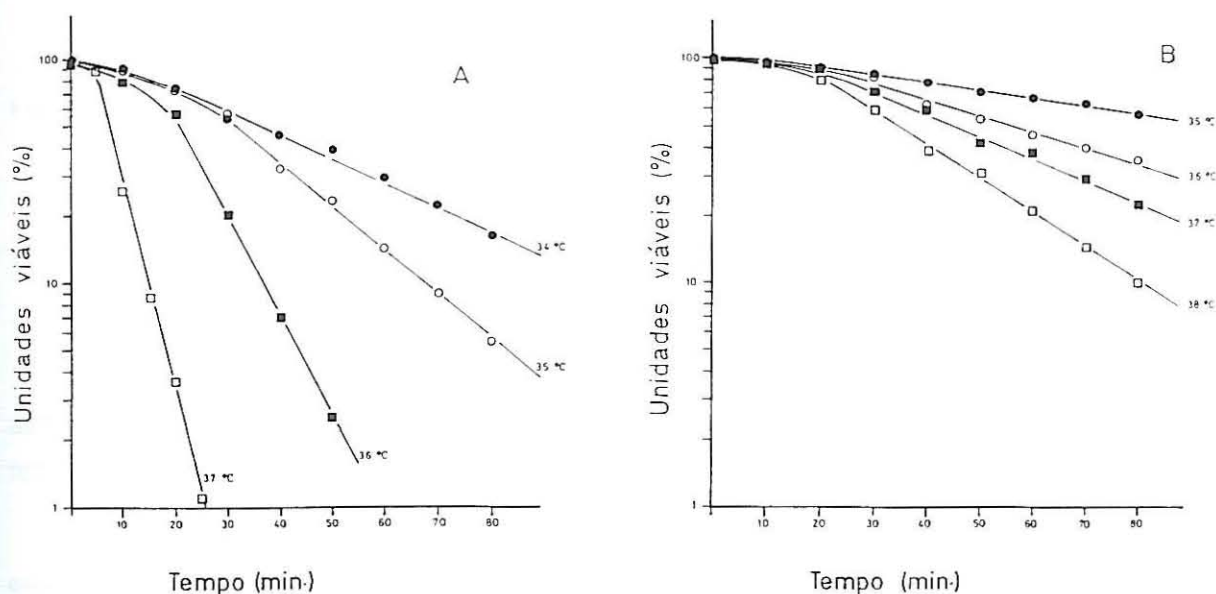


Fig. 4.4 - Curvas semilogarítmicas de sobrevivência em células adaptadas de *Z. bailii* ISA 1025, a várias temperaturas letais, na presença de ácido acético (1,4%, v/v) + etanol (8%, p/v) (A) e ácido sórbico (0,08%, p/v) + etanol (8%, p/v) (B).

A) células crescidas num meio com glucose e ácido acético 0,5% (v/v)

B) células crescidas num meio com glucose e ácido sórbico 0,05% (p/v).

Os valores experimentais de k_d estão representados na figura 4.5, sob a forma de gráficos de Arrhenius ($\ln \frac{k_d}{T}$ versus $\frac{1}{T}$). A análise destes resultados indica que, os gráficos de Arrhenius da morte celular, na ausência e na presença de concentrações crescentes de ácido na presença de etanol, obedecem ao modelo descrito na secção anterior. Os declives das rectas foram muito idênticos ao da recta respeitante ao gráfico de Arrhenius da morte térmica na ausência de ácido sugerindo que a presença de ácidos e etanol no meio extracelular não afectou significativamente o valor da entalpia de activação da morte celular, sendo os efeitos estimuladores essencialmente na entropia de activação.

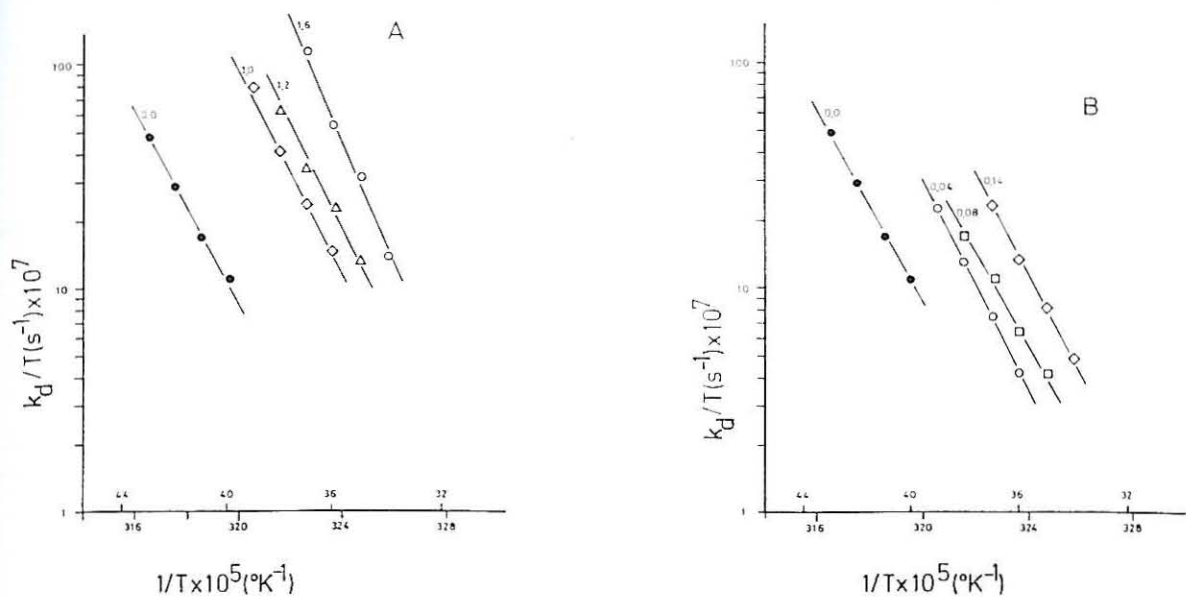


Fig. 4.5 - Gráficos de Arrhenius das taxas específicas da morte celular em células adaptadas de *Z. bailii* ISA 1025, na presença de ácido acético total + etanol (8%, p/v) (A) e ácido sórbico total + etanol (8%, p/v) (B). Os números indicam as concentrações de ácido, no meio extracelular. Ácido acético [% (v/v)] e ácido sórbico [% (p/v)].

Os valores médios da entalpia de ativação da morte celular obtidos a partir do declive dos gráficos de Arrhenius foram $105,0 \pm 0,2$ Kcal/mol e $98,83 \pm 7,3$ Kcal/mol, respectivamente, para os ácidos acético e sórbico.

Verificamos também, que em células adaptadas aos ácidos acético ou sórbico, a taxa específica da morte celular foi uma função exponencial da concentração extracelular de ácido na presença de etanol para uma mesma temperatura (Fig. 4.6). Os valores estimados para k_{est} a partir dos resultados da figura 4.6, estão sumariados na tabela 4.2.

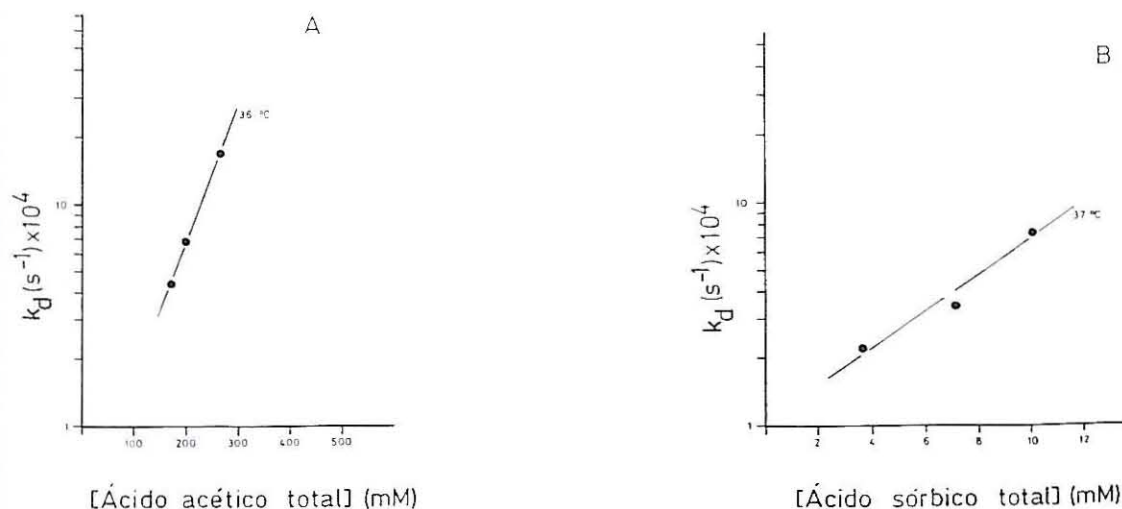


Fig. 4.6 - Variação das taxas específicas da morte térmica de células adaptadas de *Z. bailii* ISA 1025, com a concentração de ácido acético total (A) e sórbico total (B), a pH 4,0, em condições isotérmicas.

Tabela 4.2

Valores das constantes exponenciais de estimulação da morte (K_{est}) dos ácidos acético e sórbico na presença de etanol, em células de *Z. bailii* ISA 1025 adaptadas, pH 4,0.

Ácido + etanol 8% (p/v)	k_{est} (Ácido total) (l/mol)
Acético	13,90
Sórbico	171,43

Os valores obtidos para k_{est} nas células crescidas na presença de ácido, sobretudo na presença de ácido sórbico, foram inferiores aos determinados, nas mesmas condições experimentais, em células não adaptadas.

4.4 - Discussão

Os resultados experimentais apresentados neste capítulo, respeitantes aos efeitos dos ácidos acético e sórbico na presença de etanol sobre a viabilidade de *Zygosaccharomyces bailii* indicaram que:

- Os ácidos acético e sórbico na presença de etanol, nas concentrações por nós estudadas, estimularam a morte celular de células de *Z. bailii*, crescidas em meio com glucose ou numa mistura de glucose e ácido acético ou sórbico.
- Os gráficos de Arrhenius traçados para células sujeitas a temperaturas de morte na ausência e na presença de concentrações crescentes de misturas de ácidos (acético ou sórbico) e etanol constituíram uma família de rectas visualmente paralelas e deslocadas para uma zona de temperaturas inferiores, sugerindo que, tal como na ausência de etanol, os ácidos na presença de etanol afectaram a entropia de activação da morte térmica (ΔS^\ddagger) sem no entanto modificar significativamente a entalpia de activação (ΔH^\ddagger).
- Para cada um dos ácidos, a temperatura constante, k_d foi uma função exponencial da concentração de ácido no meio extracelular.

- Os valores das constantes exponenciais de estímulo da morte induzidas pelos ácidos na presença de etanol encontram-se também correlacionados com a lipossolubilidade dos ácidos (Tab.(s) 4.1 e 4.2).

A presença de etanol [8%, (p/v)] aparentemente potenciou os efeitos tóxicos dos ácidos, na morte celular, muito em particular para o caso do ácido sórbico (comparar Tab. 4.1 com Tab(s) 3.2 e 3.5).

Conforme se apresenta na tabela 4.3 as células que cresceram na presença de ácidos acético, e a uma temperatura de 25° C, apresentam uma resistência ligeiramente superior ao ácido na presença de etanol no que respeita ao efeito intensificador da morte térmica. A constante exponencial de estímulo da morte, k_{est} , baixa para o valor 13,9 l/mol (Tab 4.3). No que respeita ao ácido sórbico, os resultados obtidos mostraram que os valores das constantes exponenciais de estímulo da morte obtidos em células não adaptadas e em células crescidas na presença de ácido foram significativamente diferentes, indicando que a adaptação se traduziu num aumento da resistência ao ácido sórbico na presença de etanol.

Tabela 4.3

Valores das constantes exponenciais de estimulação da morte (K_{est}) dos ácidos acético e sórbico na presença e na ausência de etanol, em células de *Z. bailii* não adaptadas e adaptadas, pH 4,0.

	k_{est} (l/mol)	
	células não adaptadas	células adaptadas
Ácido acético 1)	13,00	10,25
Ácido acético + 8% etanol	18,50	13,90
Ácido sórbico 1)	232,00	147,58
Ácido sórbico + 8% etanol	264,57	171,43

1) Valores retirados das Tab(s). 3.2, 3.3 e 3.5, capítulo 3.

CAPÍTULO 5

EFEITOS DOS ÁCIDOS ACÉTICO E PENTANÓICO NO PH INTRACELULAR E SUA CORRELAÇÃO COM OS EFEITOS NA MORTE CELULAR DE *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1025

5.1 - Introdução

O pH é um dos factores ambientais que afecta significativamente o crescimento dos seres vivos em geral e dos microrganismos em particular. Alguns organismos têm um crescimento óptimo em meios ácidos, outros em meios alcalinos e um terceiro grupo em meios neutros. Contudo, os valores de pH citoplasmático de todos eles, mantêm-se próximos da neutralidade, condições que optimizam a actividade da maior parte das enzimas. Verifica-se assim, que as células conseguem manter o pH intracelular constante, ainda que se verifiquem flutuações no pH extracelular.

Na homeostase da acidificação intracelular intervêm vários mecanismos, entre os quais se destaca: os sistemas tamponizantes (sistemas carbonato, sistemas fosfato, ácidos orgânicos fracos e polieletrólitos celulares), a transferência de H^+ do citosol para organelos celulares, a conversão bioquímica dos ácidos não voláteis e das bases em substâncias neutras e o efluxo de H^+ através da membrana plasmática.

As leveduras sintetizam três ATPases estruturalmente distintas: a ATPase da membrana plasmática e ATPases das membranas vacuolares e mitocondriais. A forma de actuação destas ATPases está representada na figura 5.1. Em 1986 foi descrita uma quarta ATPase, localizada na membrana peroxisomal das leveduras metilotróficas (Goffeau e Boutry, 1986).

A ATPase da membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* é uma proteína que já foi isolada, identificada e purificada tendo a sua actividade sido reconstituída em liposomas por Malpartida e Serrano (1981-a e b). Segundo estes autores a ATPase presente na membrana celular da levedura promove o efluxo de protões à custa da hidrólise de ATP. Como estes iões são partículas carregadas positivamente, o seu transporte do interior para o exterior da célula conduz a um excesso de cargas positivas no meio extracelular. Assim, a ATPase pode conduzir à formação de um potencial eléctrico ($\Delta \Psi$) positivo no exterior e negativo no interior da célula. Além disso, o efluxo de protões pode promover a formação de um gradiente de pH ($\Delta pH = pH_i - pH_e$), mais alcalino no interior. Este processo conduz à criação de um gradiente de potencial eletroquímico, que neste caso se pode considerar com uma força protomotriz (PMF). A equação matemática que a expressa é a seguinte:

$$PMF = \Delta \Psi - \frac{2,303 RT}{F} \Delta pH \quad (5.1)$$

onde:

R - constante dos gases perfeitos (1,9869 cal. mol.⁻¹ °C⁻¹)

T - Temperatura absoluta (K)

F - Constante de Faraday (23,06 cal. mV⁻¹ eq.⁻¹)

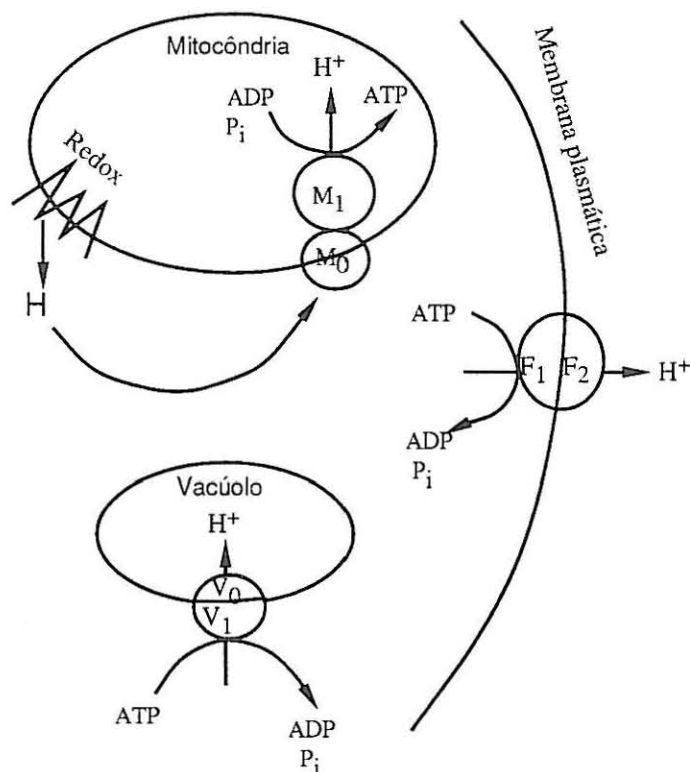


Fig. 5.1 - Bombas de prótons em leveduras (adaptado de Goffeau e Boutry, 1986).

M₀ e M₁) Componente solúvel 0 e sector 1 da ATPase mitocondrial, respectivamente; V₀ e V₁) Componentes 1 e 2 da ATPase vacuolar, respectivamente; F₁ e F₂) Formas isoméricas 1 e 2 da ATPase da membrana plasmática, respectivamente.

Evidências experimentais têm sido acumuladas nos últimos anos, demonstrando que esta ATPase pode assumir um papel importante na regulação do pH interno das células, assim como na criação de um potencial de membrana associada ao transporte de nutrientes (Goffeau e Boutry, 1986; Serrano, 1984 e 1988). Vallejo e Serrano (1989), estudaram a actividade desta ATPase em estirpes selvagens e mutantes de *S. cerevisiae*, admitindo que as diferenças na

resistência das leveduras a ácidos orgânicos fracos (ácido acético) podem advir de alterações na quantidade ou na actividade da bomba de prótons. Porém, Guidici (1989) determinou experimentalmente actividades da ATPase idênticas para leveduras das espécies *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Hansenula anomala* com sensibilidade distintas a ácidos fracos.

A ATPase da mitocôndria das leveduras têm como principal função converter o ADP em ATP, utilizando o gradiente de prótons produzido durante a respiração (Fig. 5.1).

Segundo Okorokov e Lichko (1983) a ATPase da membrana vacuolar de *Saccharomyces carlsbergensis* transporta H^+ do citoplasma para o vacúolo criando uma força protomotriz através da membrana (Fig. 5.1). Esta força está associada ao transporte activo de aminoácidos através de vesículas de membranas vacuolares (Goffeau e Boutry, 1986).

De acordo com os dados da literatura, e conforme já referido no capítulo 1 os ácidos têm efeitos negativos no pH intracelular e conseqüentemente na actividade metabólica das leveduras. O propósito deste capítulo foi avaliar os efeitos dos ácidos acético e pentanóico no pH intracelular de *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1025, crescida num meio com glucose, a pH 4,0, à temperatura de 25° C. Adicionalmente, procuramos correlacionar os resultados obtidos com os efeitos induzidos pelos ácidos na morte celular descritos nos capítulos anteriores.

5.2 - Material e Métodos

5.2.1 - Microrganismo e obtenção das culturas

Foi utilizada a estirpe ISA 1025 da levedura *Zygosaccharomyces bailii*.

O protocolo para a preparação das culturas incluía os seguintes aspectos:

- a) Repicar a estirpe para um tubo de agar inclinado com meio M solidificado e incubar aproximadamente durante 48 horas, a 25° C.
- b) Transferir uma ansada do inóculo para um balão de Erlenmeyer de 1000 ml contendo 500 ml de meio M líquido - glucose, de modo a que a absorvância a 640 nm, num espectrofotómetro Baush Lomb "Spectronic" fique situada entre 0,05 e 0,1.
- c) Incubar a cultura, a 25° C, com agitação mecânica (incubadora orbital Gallenkamp), até se atingir uma absorvância de 0,45 (35% de transmitância).

5.2.2 - Determinação do pH intracelular

5.2.2.1 - Método

Para o cálculo do pH intracelular (pH_{int}), seguimos o método descrito por Rottenberg (1979). Este método baseia-se na utilização de ácidos ou bases cujas espécies neutras se difundem através da membrana, sendo esta impermeável às respectivas formas iônicas. Utilizam-se ácidos, apenas, quando o pH extracelular é inferior ao pH intracelular (isto é, quando ΔpH é positivo). Nas nossas experiências, medimos a distribuição relativa do ácido $[2^{-14}\text{C}]$ propiônico (actividade específica = 57 m Ci mol⁻¹), entre o interior e o exterior das células.

Para o cálculo do pH_{int} usamos a seguinte expressão:

$$[\text{H}^+]_{\text{int}} = \frac{1}{\frac{A_{\text{int}}^{\text{T}}}{A_{\text{ext}}^{\text{T}}} \left(\frac{1}{[\text{H}^+]_{\text{ext}}} + \frac{1}{K_{\text{d}}} \right) - \frac{1}{K_{\text{d}}}} \quad (5.2)$$

onde, $A_{\text{int}}^{\text{T}}$ e $A_{\text{ext}}^{\text{T}}$ são, respectivamente, as concentrações totais internas e externas do

ácido propiônico e K_{d} a sua constante de dissociação ($1,35 \times 10^{-5}$ mol/l).

Sempre que um ácido (AH) atinge uma situação de equilíbrio e, se dissocia de ambos os lados da membrana, dentro e fora da célula, $\text{AH}_{\text{int}} = \text{AH}_{\text{ext}}$ e, assumindo que a constante de dissociação não varia obtém-se:

$$k_{\text{d}} = \frac{[\text{H}^+]_{\text{int}} [\text{A}^-]_{\text{int}}}{[\text{AH}]_{\text{int}}} = \frac{[\text{H}^+]_{\text{ext}} [\text{A}^-]_{\text{ext}}}{[\text{AH}]_{\text{ext}}} \quad (5.3)$$

no equilíbrio:

$$\text{pH}_{\text{int}} - \text{pH}_{\text{ext}} = \text{pH} = \log \frac{[\text{A}^-]_{\text{int}}}{[\text{A}^-]_{\text{ext}}} \quad (5.4)$$

se $\text{pH}_{\text{ext}} > \text{pk} + 1$, a maior parte do ácido está dissociado em ambos os lados da membrana e a medida da razão de distribuição do ácido, permite calcular o ΔpH , utilizando a equação anterior. Se $\text{pH}_{\text{ext}} < \text{pk} + 1$, uma percentagem significativa de ácido, está na forma não dissociada e, uma vez que a concentração total de ácido $A^{\text{T}} = \text{A}^- + \text{AH}$, no equilíbrio obtém-se:

$$A_{\text{int}}^{\text{T}} = \frac{\frac{1}{K_{\text{d}}} + \frac{1}{[\text{H}^+]_{\text{int}}}}{\frac{1}{K_{\text{d}}} + \frac{1}{[\text{H}^+]_{\text{ext}}}} \quad (5.5)$$

e

$$pH_{int} = \log \left[\frac{A_{int}^T}{A_{ext}^T} \left(\frac{1}{[H^+]_{ext}} + \frac{1}{K_d} \right) - \frac{1}{K_d} \right] \quad (5.6)$$

A equação (5.6) permite determinar o valor do pH intracelular.

5.2.2.2 - Condições experimentais de determinação do pH_{int}

As experiências foram delineadas de modo a reproduzir as condições de ensaio, utilizadas nas experiências da morte térmica.

Para a medição do pH intracelular utilizou-se o seguinte protocolo:

- a) Transferir 100 ml de cultura preparada conforme descrito em 5.2.1 para um balão Erlenmeyer de 250 ml, com agitação magnética.
- b) Adicionar o ácido acético na concentração desejada.
- c) Ajustar os valores de pH aos valores pretendidos (pH 3,0).
- d) Deixar actuar o ácido um período de tempo tal que, de acordo com as experiências de morte térmica (Cap. 3) se verificasse um percentagem de sobrevivência da ordem dos 30 a 50%.
- e) Retirar 5 ml da suspensão de células, centrifugar, lavar o depósito com H_2O fria e ressuspender as células em igual volume de meio em que decorreu o ensaio, sendo respeitadas as condições de trabalho.
- f) Ao balão contendo a suspensão de células, adicionar aos 5 ml da amostra 2 μ l de ^{14}C ácido propiónico (Amersham) (actividade específica = 57 Ci mol⁻¹).
- g) Incubar as suspensões de células preparadas em f), à temperatura de ensaio, numa incubadora Gallenkamp, durante o tempo previamente determinado para atingir o equilíbrio interno do ácido propiónico.
- h) Filtrar 4 ml desta suspensão de células, através de uma membrana Whatman GF/C, com 2,5 cm de diâmetro e 0,45 μ m de poro, previamente humedecida.
- i) Lavar as células, duas vezes com 5ml de água gelada.
- j) Transferir os filtros para frascos contendo 5ml de líquido de cintilação Optiphase.
- l) Da mesma suspensão de células, retirar 500 μ l e centrifugar durante 1 minuto numa centrífuga de bancada Eppendorf.
- m) Do sobrenadante pipetar 20 μ l, directamente para um frasco com líquido de cintilação.

n) Leitura da radioactividade das amostras no contador de cintilações.

A contagem da radioactividade das amostras, foi efectuada num contador de cintilações "Beckman LS 1800 Liquid Scintillation Counter System", programável para leituras de carbono ou de trítio, com um erro estatístico inferior a 1%.

O valor do pH extracelular final foi determinado numa experiência a decorrer em paralelo, com ácido propiónico não marcado radioactivamente durante um período de tempo igual ao da experiência em que se mediu o pH_{int} .

5.2.2.3 - Determinação do tempo de estabilização do ácido propiónico

O protocolo experimental utilizado, consistiu basicamente em:

- a) Transferir 30 ml da suspensão de células preparadas de acordo com as condições experimentais utilizadas na determinação do pH intracelular, para um balão Erlenmeyer de 100 ml.
- b) Adicionar 9 μ l de uma solução [1 - C^{14}] ácido propiónico.
- c) Colocar os balões assim preparados num banho termostaticado com agitação magnética, a 25° C.
 - c.1) Imediatamente após adição do ácido propiónico marcado radioactivamente (tempo zero) filtrar 2 ml desta suspensão, através de uma membrana Whatman GF/C previamente humedecida. Esta amostra corresponde ao t_0 .
 - c.2) Lavar a membrana com 5 ml de água gelada e colocar em frascos com líquido de cintilação Optiphase, Whatman "Hisafe" II LKB (FSA Laboratory Supplies, Loughborough, Leics, Uq), para leitura posterior.
- d) Recolher sucessivamente amostras aos 8 ;15; 20; 30; 40; 50; 60... 80 minutos, e proceder conforme descrito em c.1) e c.2). Nos intervalos de filtragem, manter a cultura conforme descrito em c).
- e) Contagem de radioactividade das amostras.
- f) Determinar o tempo que o ácido propiónico leva a atingir o equilíbrio.

Para determinar o tempo de equilíbrio do ácido propiónico na presença de ácido acético procedeu-se de acordo com o protocolo acima descrito, mas adicionando à cultura preparada em a) ácido acético na concentração desejada.

5.2.2.4 - Cálculo da biomassa

Para quantificar a biomassa presente nas suspensões de células utilizadas nos ensaios procedeu-se de acordo com o descrito no Apêndice II.

5.2.2.5 - Cálculo do pH intracelular

Na equação (5.2), os valores de A_{int}^T e A_{ext}^T foram calculados da seguinte forma:

$$A_{int}^T = \frac{\text{c.p.m. (sedimento)}}{\text{vol filtrado (ml)} \times \text{peso seco (mg/ml)} \times V_{int} (\mu\text{l/mg})} \quad (5.7)$$

$$A_{ext}^T = \frac{\text{c.p.m. (sobrenadante)}}{\text{volume de sobrenadante} (\mu\text{l})} \quad (5.8)$$

Tal como referimos o valor de K_d foi de $1,35 \times 10^{-5}$ mol/l

Admitimos um valor para o volume intracelular (V_{int}) de $2,0 \mu\text{l/mg}$ (ver referência em Côrte-Real e Leão, 1989).

5.3 - Resultados

5.3.1 - Efeitos dos ácidos acético e pentanóico no pH intracelular

Tal como referimos, e numa perspectiva de elucidarmos a correlação existente entre pH intracelular/morte celular, fomos avaliar o efeito dos ácidos acético e pentanóico no pH intracelular da levedura *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1025 quando crescida em meio com 2% (p/v) de glucose, a 25°C , com agitação magnética. O valor do pH intracelular, na ausência e presença dos ácidos acético e pentanóico, foi determinado pela distribuição relativa de $[1\text{-C}^{14}]$ ácido propiónico, a pH 3,0, numa gama de concentrações de ácido acético e pentanóico que variou, respectivamente, entre 1,0-3,0% (p/v) e 0,30 - 0,55% (p/v). Estes ensaios foram delineados de modo a reproduzir, tanto quanto possível, as condições experimentais, utilizadas para quantificar a morte celular. Para tal foram usadas concentrações de ácido e tempos de incubação tais que, a 25°C , se sabia estimularem morte celular. Por outro lado, as células para medição do pH intracelular, após sujeitas à acção dos ácidos, foram lavadas por centrifugação e só depois incubadas com o ácido propiónico radioactivo.

Nas nossas condições experimentais, a 25°C e pH 3,0, o valor obtido para o pH intracelular, na ausência de ácidos, foi de 6,6 - 6,7.

Os resultados obtidos, a 25° C, para o pH intracelular na presença de concentrações crescentes de ácido acético e pentanóico, estão representados em gráfico, em função do tempo na figura 5.2 (A e B). Como mostra a figura a presença de ácidos, induziu acidificação intracelular. No entanto, os efeitos só foram mensuráveis a concentrações de ácido relativamente elevadas.

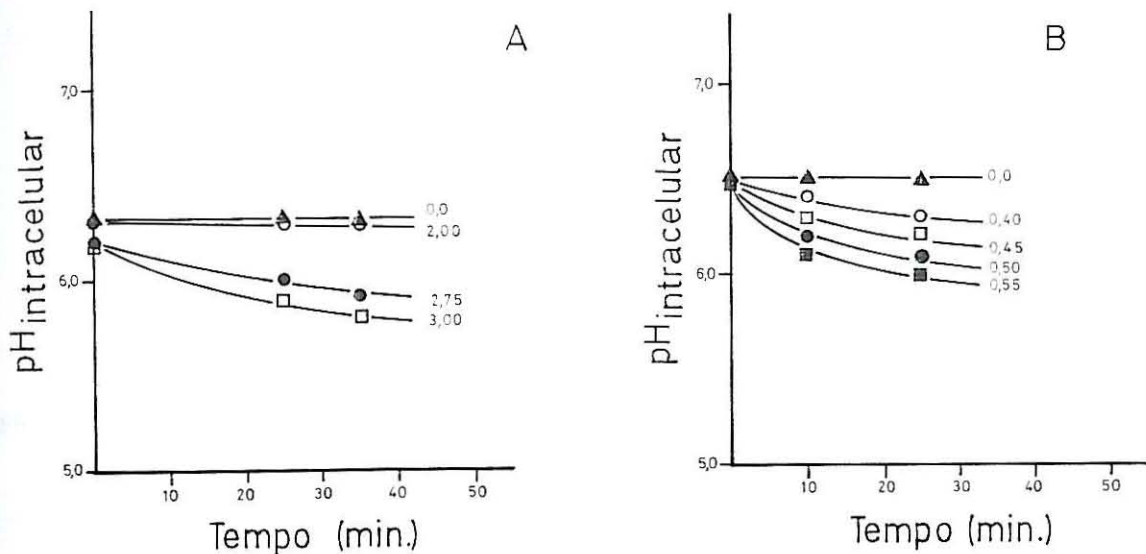


Fig. 5.2 - Curvas de abaixamento do pH intracelular, induzido pela presença de ácido acético (A) e pentanóico (B), em *Z. bailii* ISA 1025, à temperatura de 25° C e pH 3,0. Os números indicam as concentrações [% (v/v)] de ácido no meio extracelular.

Para cada um dos ácidos, os valores experimentais obtidos, a pH extracelular 3,0, para a concentração intracelular de prótons $[H^+]$, encontram-se representados sob a forma de gráficos semilogarítmicos em função da concentração de ácido não dissociado no meio extracelular na figura 5.3.

A figura evidencia que o valor do pH intracelular na presença de ácido apenas foi significativamente afectado para concentrações de ácido superiores à concentração mínima de estimulação da acidificação intracelular. Para concentrações superiores a este valor mínimo observou-se um aumento da concentração de prótons no interior da célula, e conseqüentemente uma acidificação do citosol, com o aumento da concentração de ácido acético e pentanóico no meio de cultura.

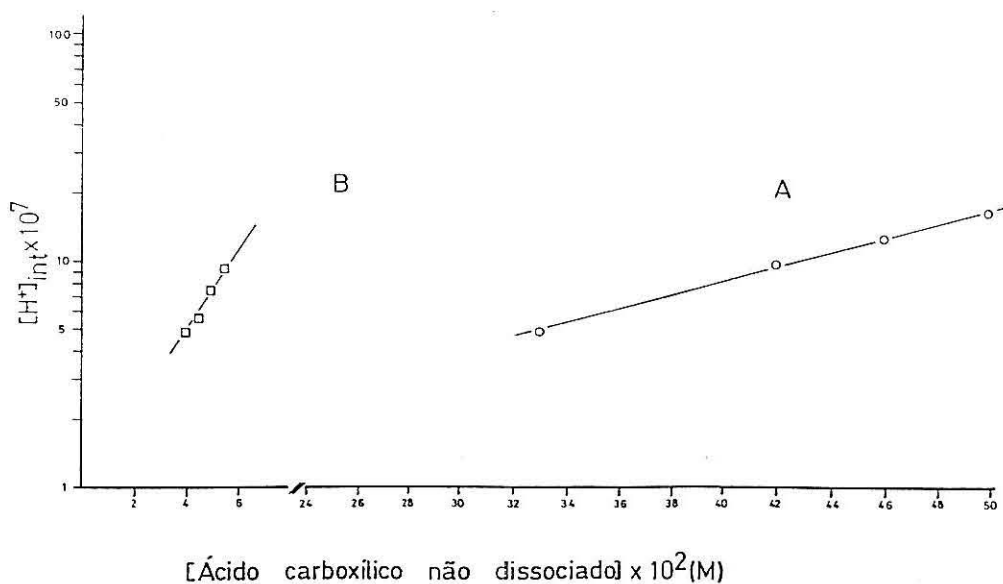


Fig. 5.3 - Efeito dos ácidos acético (A) e pentanóico (B) na concentração intracelular de prótons $[H^+]$ em *Z. bailii* ISA 1025, a 25° C, a pH 3.0.

Por outro lado, de acordo com os resultados apresentados na figura 5.3 verificou-se que a variação da concentração intracelular de prótons com a concentração de ácido não dissociado no meio de suspensão de células obedeceu a uma cinética exponencial, de acordo com a seguinte equação:

$$[H^+]_{int}^x = [H^+]_{int}^{x_m} e^{-k_1(x-x_m)} \quad (5.9)$$

em que:

$[H^+]$ - concentração intracelular de prótons

x - concentração de ácido carboxílico

x_m - concentração mínima estimulante da acidificação intracelular

k_1 - constante exponencial de estimulação da acidificação intracelular, característica do ácido.

Os valores das constantes exponenciais de estimulação da acidificação intracelular calculados a partir do declive das rectas da figura 5.3 e de acordo com a equação 5.9, estão sumariados na tabela 5.1.

Adicionalmente, a partir do gráfico da figura 5.3 estimaram-se os valores da concentração mínima abaixo das quais aparentemente não são extrapoláveis os possíveis efeitos negativos dos ácidos acético e pentanóico no pH intracelular. Os valores obtidos encontram-se também na tabela 5.1

Tabela 5.1

Valores das concentrações mínimas (x_m) e das constantes exponenciais de estimulação da acidificação intracelular (k_1) induzidas pelos ácidos acético e pentanóico em *Z. bailii* ISA 1025, nas condições experimentais utilizadas para a medição do pH intracelular.

Ácido	x_m (mol/l)	k_1 (eq. 5.9) (l/mol)
Acético	$333,10 \times 10^{-3}$	0,79
Pentanóico	$34,00 \times 10^{-3}$	3,44

O estudo comparativo do efeito do ácido acético com o do ácido pentanóico, no pH intracelular de *Z. bailii*, mostrou que o efeito está dependente da solubilidade do ácido nos lípidos. De facto, os valores das constantes exponenciais de estimulação da acidificação, aumentaram com o aumento do coeficiente de repartição lípido-tampão do ácido, enquanto que, os valores das concentrações abaixo das quais se observa abaixamento do pH intracelular diminuíram, sugerindo que os efeitos estarão provavelmente associados à permeabilidade da membrana à forma não dissociada dos ácidos.

5.3.2. - Relação entre os efeitos dos ácidos na morte celular e na acidificação intracelular

Tendo como objectivo comparar os efeitos dos ácidos na morte celular e na acidificação intracelular, realizaram-se experiências de morte celular na presença de ácido acético e pentanóico, em condições experimentais idênticas, no que diz respeito à obtenção da amostra, pH e temperatura, às das experiências de medição do pH intracelular. Assim, em células provenientes da mesma cultura, fomos determinar a taxa específica de morte na presença dos referidos ácidos na mesma gama experimental de concentrações e temperaturas (Tab. 5.2).

Tabela 5.2

Valores da perda de viabilidade (%), da concentração intracelular de H⁺ e do pH intracelular, induzidos pelos ácidos acético e pentanóico, em *Z.bailii* ISA 1025, 25° C, pH 3,0.

Ácido	[Ácido] (%, p/v)	Tempo de actuação do ácido	Perda de viabilidade (%)	[H ⁺] $\times 10^7$	pH _{in}
	1,50	35'	0	5,0	6,3
	2,00	35'	0	5,0	6,3
	2,50	1'	0	6,8	6,0
		25'	25	9,3	6,0
		35'	44	9,8	5,9
Acético	2,75	1'	0	6,9	6,2
		25'	46	9,3	6,0
		35'	97	12,5	5,9
	3,00	1'	0	10,1	6,0
		25'	90	13,4	5,9
		35'	97	16,0	5,8
	0,35	10'	4,0	6,4	
		25'	10	4,5	6,3
	0,40	10'	34	4,3	6,4
		25'	42	4,9	6,3
Pentanóico	0,45	10'	44	4,6	6,3
		25'	62	5,6	6,2
	0,50	10'	48	6,2	6,2
		25'	78	7,5	6,9
	0,55	10'	62	7,8	6,1
		25'	92	9,5	6,0

Nas nossas condições experimentais e de modo análogo ao constatado no capítulo 3, para cada um dos ácidos em estudo e em condições isotérmicas, na gama de temperaturas de 10; 20 e 25° C verificou-se que, a variação da taxa específica de morte térmica com a concentração de ácido no meio extracelular obedeceu a uma cinética exponencial de acordo com a equação:

$$k_d^x = k_d^0 e^{k_{est} [x]} \quad (5.10)$$

em que k_d^x e k_d^0 representam a taxa específica da morte celular, respectivamente, às concentrações x e zero de ácido, a temperatura constante, e k_{est} a constante exponencial de estimulação da morte.

Na tabela 5.3 encontram-se os valores das concentrações mínimas de ácido (acético e pentanóico), abaixo das quais os efeitos negativos destes tóxicos na morte celular não foram mensuráveis, bem como os valores das constantes exponenciais de estimulação da morte, estimados de acordo com a equação 5.10.

Na figura 5.4 estão representados em gráfico semilogarítmico os resultados respeitantes à perda de viabilidade celular (k_d) e da variação da concentração intracelular de prótons com a concentração de ácido não dissociado, a 25° C.

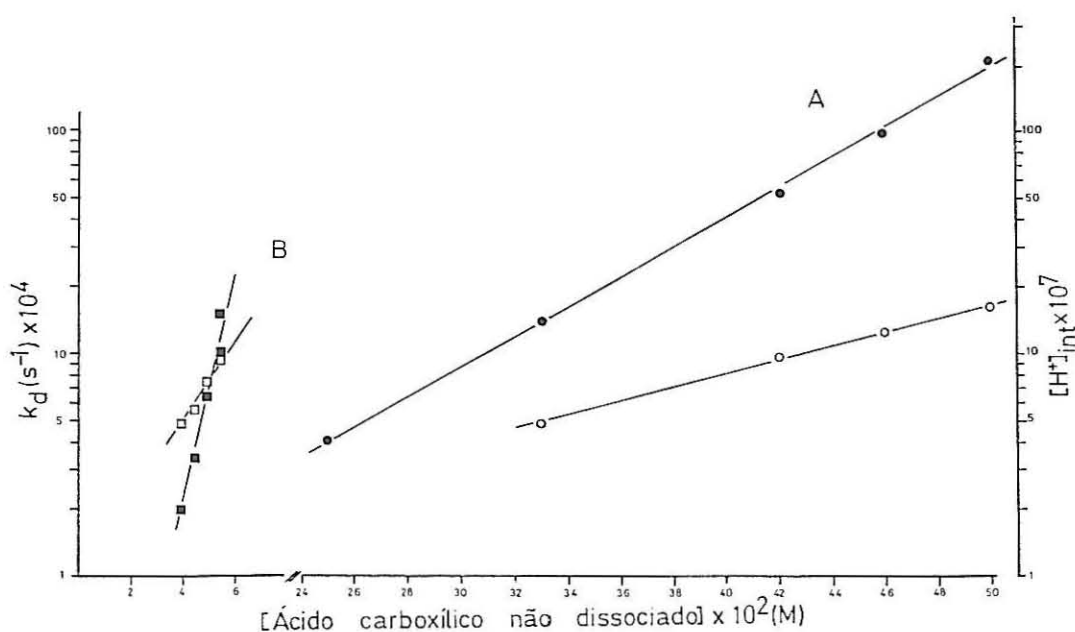


Fig. 5.4 - Efeitos dos ácidos acético (●, ○) e pentanóico (■, □) na taxa específica de morte (k_d) (símbolos fechados) e na concentração intracelular de prótons $[H^+]_{int}$ (símbolos abertos), a 25° C, a pH 3.0.

Tabela 5.3

Valores das concentrações mínimas (X_{min}) e das constantes exponenciais de estimulação da morte celular (k_{est}) induzidas pelos ácidos acético e pentanóico, em *Z. bailii* ISA 1025, nas condições experimentais utilizadas para a medição do pH intracelular.

Ácido	X_{min} (mol/l)	k_{est} (eq. 5.10) (l/mol)
Acético	$333,10 \times 10^{-3}$	19,00
Pentanóico	$34,00 \times 10^{-3}$	116,00

O estudo comparativo, dos valores obtidos para as constantes de estimulação da morte celular Tab. (5.3) com os obtidos para as constantes exponenciais de estimulação da acidificação intracelular (Tab. 5.1), indicam que para cada um dos ácidos em estudo, os valores das duas constantes foram diferentes. Aparentemente, nas nossas condições experimentais, não foi encontrada correlação entre o abaixamento do pH intracelular e o estímulo da morte celular induzida pelos ácidos acético e pentanóico, em condições isotérmicas, na gama de temperaturas de 15; 20 e 25°C.

5.4 - Discussão

Neste capítulo como nos propusemos elucidar a relação existente entre a morte celular e a concentração intracelular de protões fomos simular tanto quanto possível, as condições experimentais de determinação da morte celular. Para calcular a perda da viabilidade celular, as células após submetidas à acção dos ácidos eram semeadas à superfície de placas de Petri contendo um meio de cultura apropriado. Após incubação procedia-se à contagem das colónias que nelas se desenvolviam. Também, os valores experimentais estimados para o pH intracelular, foram obtidos em células, que após contacto com os tóxicos, foram lavadas e ressuspensas em meio fresco com glucose e sem ácido e só depois incubadas com o ácido propiónico radioactivo. Assim, os valores experimentais obtidos para o pH intracelular devem ser considerados como valores relativos, resultantes da capacidade de recuperação pelas células, da acidez intracelular induzida pelos ácidos.

Os resultados obtidos mostraram uma diminuição do pH intracelular e um aumento da taxa específica de morte, na presença de ácido acético e pentanóico. Resultados similares utilizando a mesma metodologia experimental foram obtidos por Cardoso e Leão (1992), em

Saccharomyces cerevisiae IGC 4072, na presença de ácido acético, propiónico, butírico e pentanóico e por Quintas (1993) em *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307, na presença de ácido benzóico. O abaixamento foi semelhante ao constatado por Quintas (1993), menos drástico do que o verificado por Cole e Keenan (1987) e mais acentuado do que o observado por Warth (1988), em estirpes de *Z. bailii*. Estas discrepâncias podem ser devidas, ao facto, destes autores terem submetido as amostras para determinação do pH_{int} a um processo de concentração celular por centrifugação. As alterações fisiológicas ocorridas durante a centrifugação poderão induzir modificações no pH_{int} , tal como foi postulado por Quintas (1993) nos casos em que as amostras de células de *Z. bailii* eram centrifugadas. Por outro lado, a técnica de determinação do pH_{int} utilizada por Warth (1988) poderá ter sido a principal responsável pelos resultados obtidos. O rebentamento das células por congelamento em azoto líquido, seguido de descongelamento pode provocar o tamponamento da suspensão devido às membranas celulares fragmentadas, ao conteúdo citoplasmático libertado e ao fluido intersticial e por consequência obtenção de valores de pH mais elevados (Kotyk, 1989). Alterações de potencial de Donnan, quando se utiliza este método, podem também reflectir-se nas medições do pH_{int} (Borst - Pauwels, 1981).

Adicionalmente, verificou-se que a concentração intracelular de protões e a taxa específica de morte, em condições isotérmicas, foram uma função exponencial da concentração extracelular de ácido. Quando comparamos os valores das constantes exponenciais de estimulação da acidificação intracelular estimadas a partir da equação 5.9, com os das constantes exponenciais de estimulação da morte observou-se que diferem significativamente entre si. Assim, aparentemente não foi verificada correlação entre o abaixamento do pH_{int} e o estímulo da morte induzidos por concentrações crescentes de ácido no meio extracelular. Este comportamento é distinto do que se verificou em *S. cerevisiae* 4072 (Cardoso e Leão, 1992), em que, em condições isotérmicas, existe uma relação linear entre o abaixamento relativo do pH intracelular e o aumento relativo da taxa específica de estimulação da morte celular, induzida por ácidos monocarboxílicos fracos e pelo etanol. Deste modo, enquanto em *S. cerevisiae* os dados experimentais sugerem a acidificação intracelular como mecanismos subjacentes à morte celular de baixa entalpia induzida pelos ácidos a temperaturas baixas e intermédias, o mesmo parece não ocorrer em *Z. bailii*. Além disso, os resultados reforçam as evidências experimentais dos capítulos anteriores que sugeriam a não ocorrência de morte celular de baixa entalpia em *Z. bailii*, pelo menos na gama de temperaturas entre 25 e 15° C. Nesta gama de temperaturas os ácidos induziram essencialmente estímulo da morte térmica de alta entalpia que aparentemente não está correlacionada com a acidificação intracelular.

CAPÍTULO 6

EFEITOS DE ÁCIDOS FRACOS E DO ETANOL NA RESPIRAÇÃO E NA FERMENTAÇÃO DA GLUCOSE EM *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307.

6.1 - Introdução

Na sequência do referido no capítulo anterior, o etanol produto resultante da actividade fermentativa de leveduras, e os ácidos orgânicos podem induzir efeitos negativos complexos e, em certas condições, letais sobre as leveduras. De acordo com os objectivos definidos para o presente trabalho da tese, os estudos prosseguiram no sentido de elucidar os efeitos do etanol e ácidos fracos na taxa de respiração e de fermentação de *Zygosaccharomyces bailii* comparativamente com *Saccharomyces cerevisiae*.

Neste capítulo, apresentamos resultados experimentais que mostram como o etanol e os ácidos acético e sórbico afectaram a taxa específica de respiração/fermentação da glucose da levedura *Z. bailii* ISA 1307, a diferentes valores de pH. Foram ainda avaliados os efeitos combinados do etanol e do ácido acético ou sórbico na taxa específica de respiração/fermentação da glucose, em função do pH.

Para facilitar a compreensão dos resultados obtidos far-se-á uma breve revisão bibliográfica de alguns conceitos básicos sobre fermentação e respiração da glucose em leveduras.

6.1.1 - *Fermentação e respiração da glucose em leveduras. Conceitos básicos*

Os hidratos de carbono constituem a principal fonte de carbono e energia utilizada pelos microrganismos quimioheterotróficos.

De todos os hidratos de carbono, a glucose é sem dúvida o substrato favorito da maioria das leveduras, representando o ponto de partida das principais vias do catabolismo celular. Nestes organismos a glucose, após fosforilação a glucose - 6 - fosfato, é regra geral metabolizada a piruvato através da via de Embden - Meyerhof - Parnas. A forma como cada açúcar é metabolizado até originar glucose-fosfato ou um intermediário desta via, e desse modo nela entrar, é muito variada. Por outro lado, o destino metabólico do piruvato depende da

espécie e estado fisiológico da levedura que o está a utilizar e de factores físicos-químicos do meio ambiente (Gancedo e Serrano, 1989; Käppeli, 1986).

No caso da D - glucose, D - frutose e manose, e em *Saccharomyces cerevisiae* uma vez no interior da célula estes três açúcares são fosforilados pela acção de três enzimas. A hexocinase A ou PI e B ou PII, que fosforilam os três açúcares, e a glucocinase, que apenas actua em D - glucose ou D - manose (Barnett, 1976; Gancedo e Serrano, 1989). A hexocinase A, contrariamente à hexocinase B, utiliza preferencialmente a frutose. A D - galactose extracelular, ou originária da hidrólise intracelular da lactose entra na via glicólítica de uma forma mais complexa denominada via de Leloir (Larpent, 1991). Para o caso particular de *S. cerevisiae* este processo envolve a acção de três enzimas (induzidas pela D - galactose) que dão origem a glucose - 1 - fosfato, que por sua vez será transformada em glucose - 6 - fosfato pela acção de uma fosfoglucomutase (Sierkstra *et al.*, 1993).

Tal como foi referido a via de Embden - Meyerhof - Parnas (EMP), é uma das principais vias do catabolismo da glucose em leveduras. Este processo, consiste numa sequência de reacções enzimáticas coordenadas que convertem a glucose - 6 - fosfato em piruvato, com a concomitante produção de ATP.

Conforme esquematizado na figura 6.1 numa primeira etapa da glicólise a glucose - 6 - fosfato é convertida no isómero frutose - 6 - fosfato, pela acção da enzima isomerase da fosfo-glucose. A frutose - 6 - fosfato é fosforilada em frutose - 1,6 - bifosfato pela acção da enzima fosfofrutocinase, com a consequente utilização de uma molécula de ATP.

A cisão da frutose - 1,6 - bifosfato em duas moléculas de triose fosfato, o gliceraldeído - 3 - fosfato e a di-hidroxiacetona fosfato, é catalisada pela aldolase. Esta reacção é reversível e as duas triose fosfato são interconvertíveis, originando assim, duas moléculas de gliceraldeído - 3 - fosfato, a partir de uma molécula de frutose - 1,6 - bifosfato, pela acção sequencial das enzimas aldolase e isomerase da triose fosfato.

A desidrogenase do gliceraldeído - 3 - fosfato catalisa a reacção que converte o gliceraldeído - 3 - fosfato em 1,3 - difosfoglicerato, um composto com uma ligação fosfato de elevado potencial energético. Esta energia, é então, transferida para o ADP, pela cinase do fosfoglicerato originando-se 3 - fosfoglicerato e ATP por um mecanismo de fosforilação ao nível do substrato. O 3 - fosfoglicerato é convertido em 2 - fosfoglicerato pela mutase do fosfoglicerato. De seguida, é hidrolisado, com a intervenção da enolase, formando-se fosfoenolpiruvato, outro composto com elevado potencial energético na ligação fosfato. A transferência da ligação éster fosfórica do fosfoenolpiruvato ao ADP pela enzima cinase do piruvato, conduz à síntese de ATP e piruvato. O balanço total do processo é o seguinte:



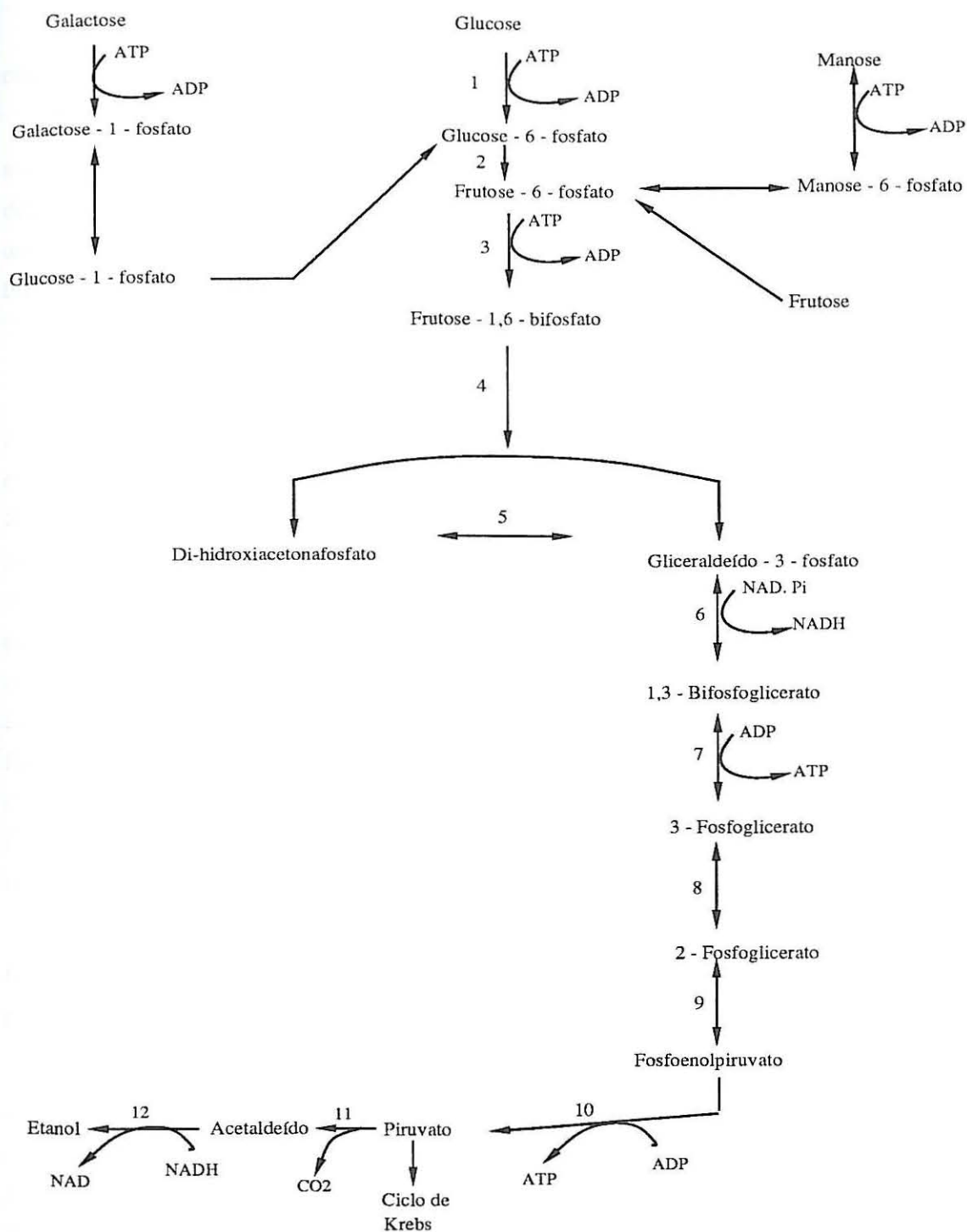


Fig. 6.1 - A via glicolítica (adaptado de Larpent, 1991)

As enzimas indicadas pelos números são as seguintes:

- 1) Hexocinase; 2) Isomerase da fosfo-glucose; 3) Fosfofrutocinase; 4) Aldolase; 5) Isomerase da triose fosfato; 6) Desidrogenase do gliceraldeído - 3 - fosfato; 7) Cinase do fosfoglicerato; 8) Fosfogliceratomutase; 9) Enolase; 10) Cinase do piruvato.

O piruvato dependendo da espécie de levedura e das condições de crescimento, pode então seguir duas vias metabólicas, nomeadamente, a via fermentativa ou respiratória.

No processo fermentativo, o piruvato é descarboxilado, originando acetaldeído e CO₂ através da descarboxilase do piruvato que tem por coenzima a tiamina fosfato. O acetaldeído é depois reduzido a etanol pela acção da desidrogenase alcoólica, com a concomitante oxidação do coenzima NADH, formado na oxidação do gliceraldeído - 3 - fosfato a 1,3 - bifosfoglicerato.

Em aerobiose, o piruvato é oxidado ao nível de ciclo de Krebs (TCA).

A via das hexoses monofosfato também conhecida por via das pentoses fosfato ocorre em leveduras e constitui uma via alternativa de degradação da glucose (Lenhinger, 1977; Stanier *et al.*, 1986; Gancedo e Serrano, 1989; Bruinemberg *et al.*, 1986-a e b; Larpent, 1991) (Fig. 6.2). Esta via fornece as pentoses fosfato, principalmente a ribose - 5 - fosfato, necessárias à síntese de RNA e DNA, além de NADPH, que é uma coenzima indispensável para muitas enzimas do metabolismo, sobretudo as de síntese de esteróis e de ácidos gordos. É composta por duas fases essenciais: uma oxidativa, irreversível e outra não oxidativa e reversível. Na parte oxidativa a glucose - 6 - fosfato é desidrogenada pela desidrogenase da glucose - 6 - fosfato a 6 - fosfogluconolactona, os electrões são transferidos para o NADP. A 6 - fosfogluconolactona, é então, transformada em 6 - fosfogluconato, podendo esta hidrólise ser espontânea ou catalisada pela enzima 6 - fosfogluconolactonase. A desidrogenase do 6 - fosfogluconato catalisa a descarboxilação oxidativa do 6 - fosfogluconato a ribulose - 5 - fosfato.

O processo reversível implica a interconversão das pentoses fosfato em hexoses fosfato e trioses fosfato. Esta fase é catalisada pelas enzimas: isomerase da ribose - 5 - fosfato, ribulose - 5 - fosfato - 3 epimerase, transcetolase e transaldolase.

Convém no entanto salientar, que as pentoses fosfato formadas na primeira fase, nem sempre sofrem as restantes transformações, podendo ser desviadas para síntese de nucleótidos. Assim, se as necessidades metabólicas da célula microbiana em pentoses fosfato são superiores às de NADPH, as transcetolases e as transaldolases desviam o gliceraldeído - 3 - fosfato e a frutose - 6 - fosfato da via glicolítica convertendo-os em ribose - 5 - fosfato. No entanto, geralmente, em leveduras, as exigências em NADPH são superiores às necessidades em pentoses fosfato, o excesso nestas moléculas é transformado em gliceraldeído - 3 - fosfato e frutose - 6 - fosfato que são então metabolizados via glicólise a piruvato (Gancedo e Serrano, 1989; Larpent, 1991).

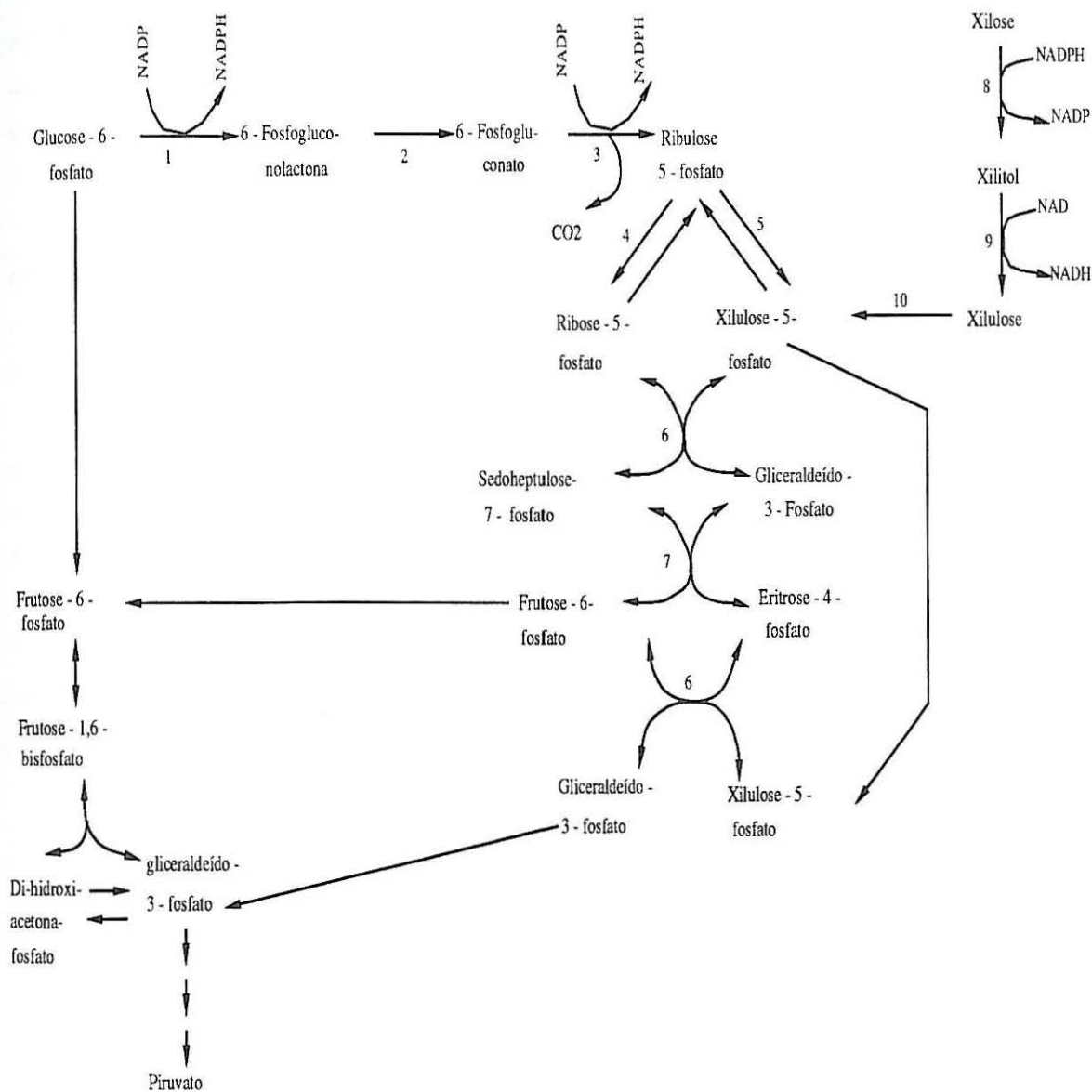


Fig. 6.2 - Ciclo das pentoses fosfato e entrada da xilose nesse ciclo (adaptado de Stanier *et al.*, 1986; Schlegel, 1986; Larpent, 1991). A via das pentoses fosfato está ligada à glicólise pela glucose - 6 - fosfato, pela frutose - 6 - fosfato e pelo gliceráldeido - 3 - fosfato.

As enzimas intervenientes no processo são as seguintes:

- 1) Desidrogenase da glucose - 6 - fosfato; 2) 6 - Fosfogluconolactonase; 3) Desidrogenase do 6 - fosfogluconato; 4) Isomerase da ribose - 5 - fosfato; 5) Ribulose - 5 - fosfato - 3 - epimerase; 6) Transcetolase; 7) Transaldolase; 8) Redutase NADPH dependente; 9) Desidrogenase do xilitol NAP dependente; 10) Xilulosecinase.

Os pares redox NADPH/NADP⁺ e NADH/NAD⁺ desempenham papéis centrais e distintos no metabolismo das leveduras. O primeiro autor afirma que a oxidação do NADPH aparentemente pode estimular a via das pentoses fosfato (Gong, 1983), enquanto, o NADH actua sobre a desidrogenase do gliceraldeído - 3 - fosfato, inibindo-a, reduzindo o fluxo da glicólise e consequentemente a concentração intracelular de piruvato (van Dijken e Scheffers, 1986).

A percentagem de contribuição relativa da via das pentoses fosfato e da via glicolítica para a formação de piruvato, nas leveduras, varia de levedura para levedura, em particular com as condições de cultura, com a fonte de carbono e azoto utilizadas no crescimento e com a metodologia usada no estudo (Bruinemberg *et al.*, 1986-a e b).

Em células de *Saccharomyces cerevisiae* crescidas em glucose a contribuição desta via no metabolismo da glucose varia de autor para autor sendo de 2% para Gancedo e Lagunas (1973), de 8% para Bruinemberg *et al.* (1986-a) e de 34% para Millar *et al.* (1982). Para *Rhodotorula toruloides* são referidos valores que oscilam entre 20% (Höffer, 1968), 80% (Evans Ratledge, 1984) e 11% (Bruinemberg *et al.*, 1986-b). Blumenthal (1968) indica que em *Candida utilis*, estes valores estão compreendidos entre 4 e 50%. Apesar desta diversidade, a análise global dos resultados, permite-nos sugerir que em espécies de *Rhodotorula* e *Candida* a via da HPM é mais activa do que em leveduras do género *Saccharomyces*.

A aptidão das várias espécies de leveduras para fermentar e respirar hidratos de carbono, bem como a sua resistência à presença de elevadas concentrações de açúcar e de O₂ são variáveis. Na tabela 6.1 apresentamos uma classificação sumária das leveduras de acordo com a percentagem de participação da fermentação e respiração da glucose em condições de aerobiose ou anaerobiose.

Tabela 6.1

Classificação das leveduras segundo vários autores de acordo com as suas capacidades fermentativa e respiratória de glucose em condições de aerobiose e anaerobiose.

Barnett (1976); Gancedo e Serrano (1989)

Classe	Exemplo
Aeróbias obrigatórias (100% Respiração)	<i>Torulopsis candida</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Pichia vini</i> etc.
Anaeróbias facultativas	
– Fermentativas (≥ a 90% Fermentação)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces uvarum</i> <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
– Respiratórias (≤ 30% Fermentação)	<i>Pichia sp</i> <i>Hansenula anomala</i> <i>Kluyveromyces sp</i> <i>Candida sp</i>

van Dijken e Scheffers (1986)

Classe	Exemplo
Não Fermentativas (100% Respiração)	<i>Rhodotorula rubra</i>
Fermentativas	
– Obrigatórias (100% Fermentação)	<i>Candida pintolopesii</i>
– Facultativas	
Crabtree positivas	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Crabtree negativas	<i>Candida utilis</i> <i>Pachysolen tannophilus</i> <i>Pichia stipitis</i> <i>Candida shehatae</i>

Fletcher e Seghezzi (1992)

Classe	Exemplo
Respiratórias ou insensíveis à glucose (100% Respiração)	<i>Trichosporum cutaneum</i>
Sensíveis ao O ₂ ou de sensibilidade intermédia (formação anaeróbia de etanol)	<i>Candida tropicalis</i>
Sensíveis à glucose (formação aeróbia de etanol para concentrações elevadas de glucose)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

6.2 - Material e Métodos

6.2.1 - *Microrganismo*

O microrganismo utilizado nas experiências apresentadas neste capítulo, foi a estirpe ISA 1307 da levedura *Zygosaccharomyces bailii*.

6.2.2 - *Medição das taxas de respiração e fermentação em Zygosaccharomyces bailii, mediante a utilização da técnica manométrica (Aparelho de Warburg)*

6.2.2.1 - *Técnicas manométricas – Princípios básicos*

O aparelho de Warburg, também conhecido por respirómetro a volume constante, utiliza técnicas manométricas baseadas nas leis dos gases perfeitos para medir as trocas gasosas que geralmente ocorrem entre os sistemas biológicos e o meio ambiente.

Apesar de existirem três técnicas manométricas básicas (Willians e Wilson, 1981), nomeadamente a manométrica a volume constante, a manométrica a pressão constante e a manométrica a diferencial, a primeira é a mais utilizada. Nesta técnica o gás no frasco experimental é mantido a temperatura e volume constante sendo as variações na quantidade de gás medidas pelas variações de pressão. Nas nossas experiências utilizamos o aparelho Warburg–Apparat, Modelos VL 166, da B. Braun equipado com 14 manómetros e respectivos balões de ensaio (Fig.6.3).

Este aparelho consta essencialmente, de frascos experimentais de 17ml de capacidade, com um braço lateral ligados a um manómetro. Cada um destes frascos de ensaio encontra-se munido de um poço central, destinado à absorção de gases. Assim, nas experiências de respiração em que há produção simultânea de O_2 e CO_2 para se remover este último gás coloca-se no poço central uma solução concentrada de KOH (20%) embebida num pequeno leque de papel de filtro (destinado a aumentar a superfície de exposição). O CO_2 produzido reage com KOH formando CO_3K_2 , pelo que, as variações de volume correspondem apenas à produção de O_2 . Os frascos são imersos num banho termostaticado de volume constante e com agitação mecânica de modo a manter uma troca constante e homogénea de gás entre a fase líquida e a fase gasosa.

O manómetro de Warburg é constituído por um tubo graduado, em forma de U, sendo uma das extremidades do tubo aberta, estando assim em contacto com o ar. O outro braço encontra-se ligado ao frasco experimental através de uma junção de vidro esmerilado lubrificada com silicone. Na base do tubo encontra-se um reservatório de borracha (R) contendo um fluido manométrico de densidade conhecida e com baixa tensão superficial (o líquido de Brodie).

Dado que, o volume de gás no sistema frasco/manómetro e a temperatura do banho se mantêm constantes, quando varia a quantidade de gás contida no frasco e no braço do manómetro, varia a pressão exercida sobre o líquido, de acordo com a lei dos gases perfeitos. Deste modo, o líquido de Brodie sobe ou desce no braço aberto do manómetro, conforme a variação de pressão corresponde a produção ou consumo de gás.

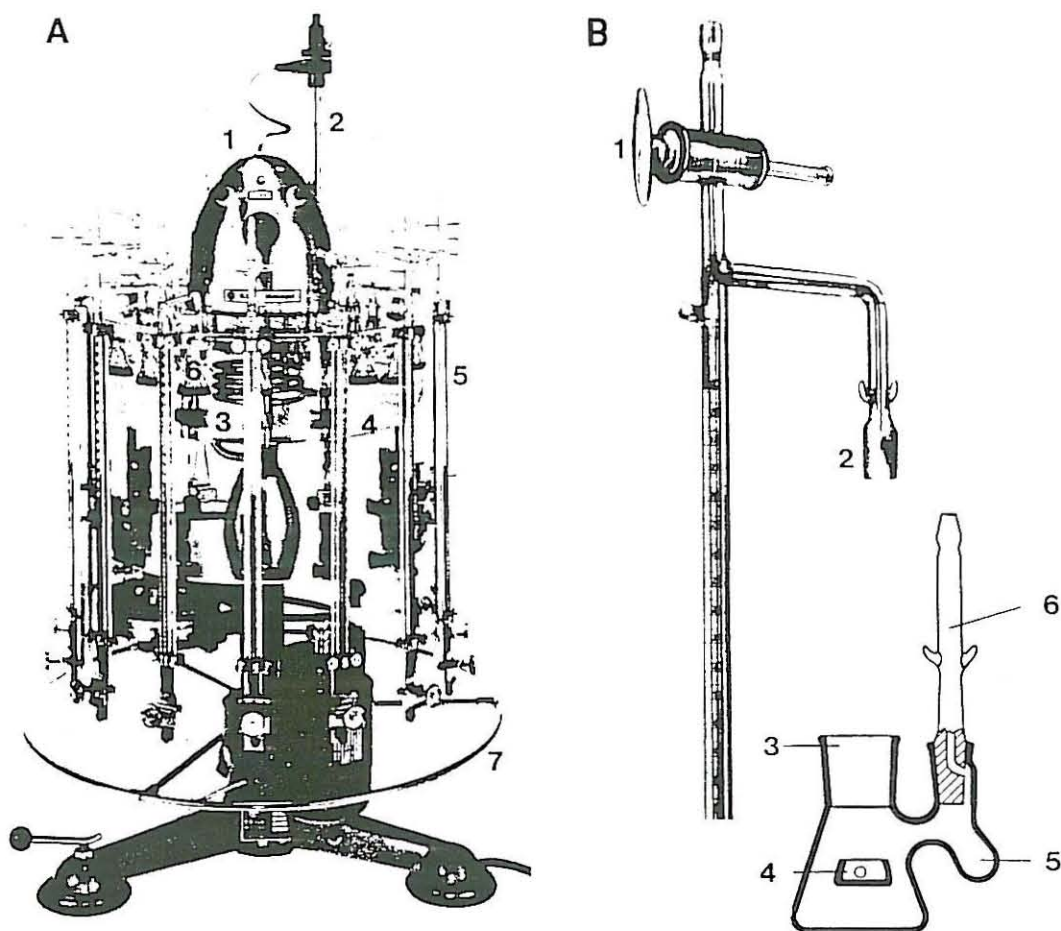


Fig 6.3 - Aparelho de Warburg utilizado nas experiências de medição da taxa de respiração/fermentação em células de *Z. bailii* (adaptado de Côte-Real, 1990).

A) Aparelho de Warburg: 1) cabeça para controlo da temperatura; 2) termómetro de controlo; 3) serpentinas de aquecimento e de arrefecimento; 4) banho; 5) manómetro; 6) frasco experimental; 7) volante giratório para acesso aos diferentes manómetros.

B) Manómetro e frasco experimental: 1) torneira de abertura do manómetro; 2 e 3) zonas esmeriladas para adaptação do manómetro ao frasco; 4) poço central; 5) braço lateral; 6) tampa do frasco com ventilo.

6.2.2.2 - Medição das taxas específicas de respiração e de fermentação

(Protocolo experimental)

As suspensões de células usadas nestes estudos foram preparadas do modo que passamos a descrever.

As células de *Zygosaccharomyces bailii* 1307, foram crescidas a 28° C com agitação mecânica numa incubadora orbital Gallenkamp, em 100 ml de meio MGIV com 2% (p/v) de glucose, contido em balões Erlenmeyer de 250 ml.

A cultura a meio da fase exponencial de crescimento (DO 640 nm cerca de 0,4) foi centrifugada para a remoção de células, a 10.000 rotações por minuto, à temperatura ambiente durante 10 minutos. O sedimento foi lavado duas vezes por ressuspensão em KH_2PO_4 0,1 M a diferentes valores de pH (3,5; 4,5 e 5,5), consoante o pH a que pretendíamos efectuar os ensaios experimentais, e centrifugado nas mesmas condições. De seguida, as células foram ressuspensas num volume de tampão (KH_2PO_4) 0,1M ao pH de ensaio, de modo a assegurar uma D.O. final compreendida entre 1,6 e 2,0 aproximadamente.

O protocolo experimental para medição das taxas de respiração ou de fermentação consistiu basicamente nas seguintes etapas:

- Distribuição da suspensão de células e dos reagentes, nos frascos experimentais de acordo com a tabela 6.2. Adicionalmente, nas experiências de respiração, no poço central do balão de ensaio colocou-se 0,1 ml de KOH (20%p/v) sobre um pequeno leque de papel de filtro.
- Fecho e ajuste de cada um dos frascos ao manómetro correspondente, de tal forma a que fiquem isolados do meio exterior.
- Colocação do conjunto frasco - manómetro, num banho-maria à temperatura do ensaio.
- Estabilização da temperatura dos frascos, com agitação durante 10 minutos.
- Paragem da agitação e inversão do conteúdo do braço lateral para o interior do compartimento principal.
- Introdução do frasco no banho e estabilização da temperatura com agitação durante 5 minutos.
- Fecho sucessivo dos manómetros. Realização da primeira leitura correspondente ao tempo zero, após ajuste do nível do líquido de Brodie à marca situada a meio da escala (15 mm) o braço do manómetro ligado ao frasco. Registrar as variações do nível do líquido (h) no braço do manómetro que está em contacto com o exterior.

Tabela 6.2

Esquema da distribuição das soluções nos frascos de Warburg utilizadas nas experiências da respiração e da fermentação.

Frascos experimentais	Compartimento principal			Braço lateral		
	Suspensão de células ¹⁾	Tampão ²⁾ (ml)	Ácido e/ou etanol (ml)	Glucose 0,6M (ml)	Tampão ²⁾ (ml)	Ácido e/ou etanol
Termobarómetro	—	3,0	—	—	—	—
Fermentação endógena	2,5	—	—	—	0,5	—
Fermentação da glucose	2,5	—	—	0,06	0,44	—
Fermentação da glucose na presença de etanol	2,5	—	—	0,06	Tampão + etanol na concentração desejada. Volume total = 0,44	
Fermentação da glucose na presença de ácido acético	2,5	—	—	0,06	Tampão + ácido acético na concentração desejada Volume total = 0,44	
Fermentação da glucose na presença de ácido sórbico	1,5	Tampão + ácido sórbico na concentração desejada. Volume total = 1,0		0,06	0,44	—
Fermentação da glucose na presença de ácido acético e etanol	2,0	Tampão + ácido acético na concentração desejada. Volume total = 0,5		0,06	Tampão + etanol na concentração desejada. Volume total = 0,44	
Fermentação da glucose na presença de ácido sórbico e etanol	1,5	Tampão + ácido sórbico na concentração desejada. Volume total = 1,0		0,06	Tampão + etanol na concentração desejada. Volume total = 0,44	

1) Suspensão de células em KH_2PO_4 0,1M, ao pH de ensaio (3,5, 4,5 e 5,5).

2) Tampão KH_2PO_4 0,1M, ao pH de ensaio (3,5, 4,5 e 5,5).

Nota: Apesar de termos utilizado um volume de células diferente nos vários ensaios, o volume de tampão utilizado na ressuspensão das células foi de modo a que o peso seco em todas as experiências fosse idêntico.

Nas experiências de respiração, no poço central do balão de ensaio colocou-se 0,1 ml de KOH (20%, p/v) sob um leque de papel de filtro.

• De 10 em 10 minutos e durante o período de tempo de ensaio, paragem da agitação e a realização de novas leituras de acordo com descrito no ponto anterior.

Nota: O pH da mistura reacional, foi ajustado aos valores de pH a que se pretendia conduzir as experiências, com uma solução de Na OH ou de HCl.

6.2.2.3 - Determinação da biomassa

A determinação do peso seco presente em cada ensaio foi feita de acordo com o descrito no Apêndice II.

6.2.2.4 - Controlos experimentais

Nesta técnica é necessário proceder a três controlos muito importantes.

Termobarómetro

O termobarómetro consiste num conjunto manómetro-frasco que contém unicamente um volume total de tampão idêntico aos restantes frascos experimentais. Este destina-se a registar as variações ambientais (pressão atmosférica e temperatura do banho) que podem conduzir a possíveis erros. Dado que, um dos braços do manómetro está em contacto directo com o meio ambiente, uma pequena variação de pressão atmosférica ou de temperatura durante o período em que decorre a experiência (60 a 90 minutos), pode afectar o valor da altura (h) em alguns milímetros.

Metabolismo endógeno

Em todos os ensaios utilizou-se um frasco experimental para avaliar, nas mesmas condições experimentais, mas na ausência de substrato fermentescível ou respirável, a capacidade das células de executar uma fermentação ou respiração residual a partir das suas reservas intracelulares - fermentação ou respiração endógena. Para estudar o metabolismo endógeno, utilizou-se volume de suspensão de células idêntico ao utilizado nos outros frascos experimentais, ao qual se adicionou 0,5 ml de tampão KH_2PO_4 0,1M ao pH de ensaio, para prefazer um volume final de 3ml.

Proporcionalidade entre a concentração da suspensão de células e o consumo de O_2 ou produção de CO_2

Tendo como objectivo seleccionar uma concentração de células adequada às nossas condições experimentais (concentração de células, agitação e temperatura) fomos verificar a proporcionalidade existente entre a concentração de células e o consumo de O_2 ou a produção de CO_2 . Este controlo experimental é necessário para se determinar correctamente a taxa específica de respiração/fermentação, porque quando a concentração da suspensão de células é

muito elevada ou a agitação é pouco eficiente, o O₂, por exemplo, pode tornar-se factor limitante.

6.2.2.5 - Cálculo das taxas específicas de respiração e de fermentação

As leituras da variação de h (mm) do líquido manométrico permitem-nos determinar a quantidade de O₂ consumido por unidade de biomassa e por unidade de tempo - taxa específica de respiração, mediante a utilização da seguinte equação (Umbreit *et al.*, 1964):

$$Q = h \cdot K \quad (6.1)$$

em que:

h = diferença de nível, em milímetros, observada no ramo aberto do manómetro no intervalo de tempo t.

K = "Constante do frasco" que integra todos os factores termodinâmicos envolvidos no processo, o valor desta constante é dado pela seguinte expressão (Umbreit *et al.*, 1964):

$$K = \frac{V_g \cdot \frac{273}{T} \cdot V_f \cdot \alpha}{P_0} \quad (6.2)$$

em que:

V_g = Volume da fase gasosa, no frasco experimental e no manómetro contíguo, até ao ponto de referência do líquido de Brodie (1).^{a)}

V_f = Volume do líquido total contido no frasco de ensaio (µl).

T = Temperatura absoluta do banho (°K).

α = Coeficiente de solubilidade do gás, expresso em ml gás/ml de líquido, à temperatura de ensaio (2) e à pressão de 760 mm Hg (ver Umbreit *et al.*, 1964).^{a)}

P₀ = Pressão padrão do ensaio, correspondente ao valor da pressão atmosférica em milímetros de mercúrio (densidade = 13,6) corrigida para milímetros de fluido de Brodie (densidade = 1,033). O seu valor obtem-se utilizando a equação (Umbreit *et al.*, 1964):

$$P_0 = 760 \frac{13,60}{1,033} = 10\,000 \text{ mm de líquido de Brodie} \quad (6.3)$$

a) 1) V_g é calculado através do conhecimento, por calibração do volume total contido em cada manómetro e no frasco que se lhe encontra ligado, subtraindo o valor de V_f.

2) α CO₂ a 18° C = 0,949 e a 25° C = 0,759

α O₂ a 18° C = 0,0325 e a 25° C = 0,0285

As unidades de K vêm expressas em $\mu\text{l}/\text{mm}$, e de acordo com a equação (6.1) a quantidade de gás Q vem expressa em μl .

Os valores de Q obtidos nos frascos manométricos, depois de corrigidos pelos obtidos no termobarómetro e na fermentação endógena são expressos por unidade de biomassa, e representados graficamente em função do tempo. O valor do declive da recta assim obtido, corresponde à taxa específica de respiração ou de fermentação expressas, respectivamente, em $\mu\text{l O}_2 \text{ mg peso seco}^{-1} \text{ min}^{-1}$ e em $\mu\text{l CO}_2 \text{ mg peso seco}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

6.3 - Resultados

6.3.1 - Determinação da taxa específica de respiração da glucose em função do pH

Numa primeira série de experiências e conforme referido na secção 6.2 células provenientes de uma cultura em meio líquido com 2% (p/v) de glucose e em fase exponencial de crescimento, lavadas e ressuspensas em tampão fosfato 0,1M, pH 3,5, 4,5 e 5,5 foram utilizadas para determinação da taxa específica de respiração da glucose. Para tal, acompanhou-se o consumo de O_2 ao longo do tempo.

Na figura 6.4 apresentamos os resultados destas experiências. Como mostra a figura o consumo de O_2 variou linearmente com o tempo. Os valores das taxas específicas de respiração a diferentes valores de pH obtidos a partir do coeficiente angular de cada uma das rectas experimentais da figura 6.4, expressos em $\mu\text{l O}_2 / \text{min}/\text{mg peso seco}$, encontram-se sumariados na tabela 6.3.

Tabela. 6.3

Valores das taxas específicas de respiração, em *Z. bailli*, a 26° C, a diferentes valores de pH.

pH	Taxa específica de respiração $\mu\text{l O}_2/\text{min}/\text{mg peso seco}$
3,5	10,10
4,5	10,10
5,5	9,50

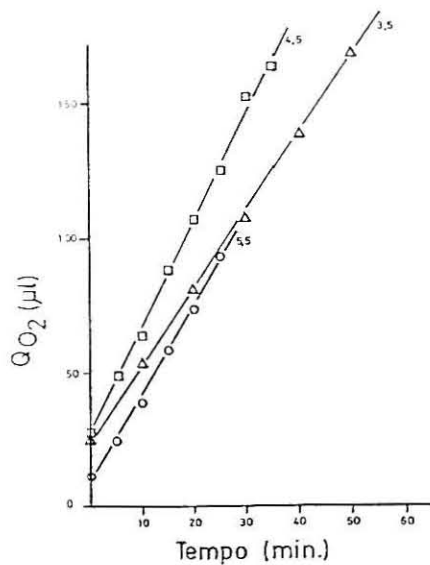


Fig. 6.4 - Variação do consumo de O₂ com o tempo, em *Z. bailii* ISA 1307 na ausência de ácidos e de etanol, a 26° C. Os números indicam os valores de pH extracelular.

6.3.2 - Efeitos do etanol na respiração da glucose

Para estudar o efeito do etanol na respiração da glucose na levedura *Zygosaccharomyces bailii*, determinaram-se os valores das respectivas taxas de respiração na presença de diferentes concentrações de etanol, em células provenientes de culturas num meio com glucose. A figura 6.5 apresenta resultados típicos destas experiências, mostrando o aumento linear do consumo de O₂ com o tempo. A partir dos declives das rectas experimentais foram obtidas estimativas da taxa específica de respiração às diferentes concentrações de etanol ensaiadas.

Os resultados indicaram, que o etanol provocou uma redução na taxa específica de respiração, acentuando-se o efeito com o aumento da concentração do álcool no meio de suspensão de células.

Os valores das taxas específicas de respiração expressos em valor relativo (% do valor obtido na ausência de etanol) encontram-se representados em gráfico semilogarítmico, em função da concentração do álcool, na figura 6.6. A partir destes gráficos estimaram-se os valores da concentração de etanol à qual se observou 50% de redução na respiração e da concentração abaixo da qual, aparentemente não foram mensuráveis os possíveis efeitos negativos do etanol na respiração bem como da constante exponencial de inibição da respiração da glucose pelo etanol. Os valores obtidos encontram-se na tabela 6.4.

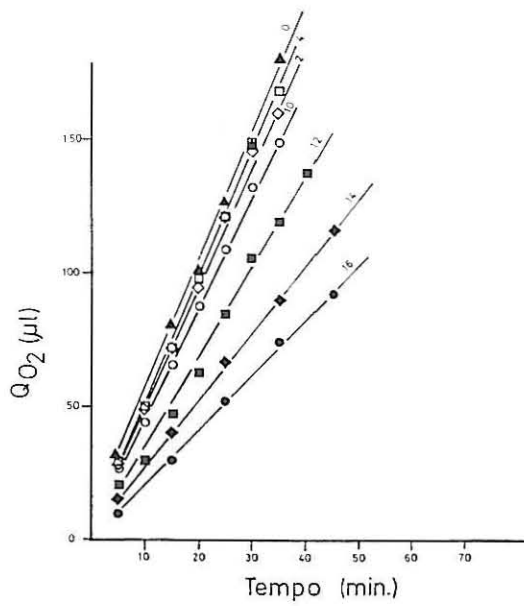


Fig. 6.5 - Variação do consumo de O_2 com o tempo, em *Z. bailii* ISA 1307, na presença de etanol, a $26^\circ C$, pH 4.5. Os números indicam as concentrações de etanol [% (v/v)] no meio extracelular.

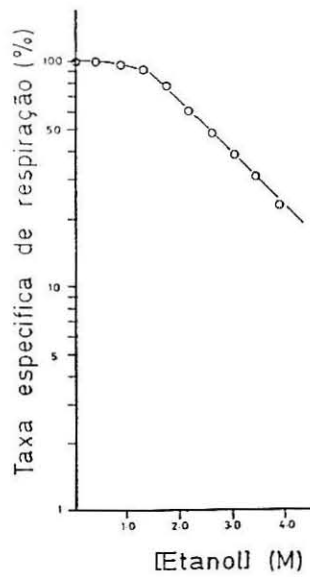


Fig. 6.6 - Gráficos semilogarítmicos das taxas específicas de respiração da glicose de *Z. bailii* ISA 1307, em função da concentração de etanol, a pH 4.5.

Tabela. 6.4

Estimativas dos parâmetros de inibição da respiração da glucose pelo etanol, em *Z. bailii*, 26°C, pH 4,5.

$X_{\min}^{1)}$	$X_{50\%}^{1)}$	$k_i^{1)}$
(M)	(M)	(L/mol)
1,02	1,86	0,39

- 1) X_{\min} - Concentração de etanol mínima de inibição; $X_{50\%}$ - Concentração de etanol correspondente a 50% de inibição; k_i - Constante exponencial de inibição

6.3.3 - Efeitos dos ácidos acético e sórbico na respiração da glucose em função do pH extracelular na ausência e presença de etanol

Numa primeira série de experiências procuramos determinar os efeitos dos ácidos acético e sórbico na respiração da glucose, em células provenientes de culturas em meio com glucose. Para tal, procedeu-se à avaliação do consumo do oxigénio ao longo do tempo na presença de diferentes concentrações de ácido e a diferentes valores de pH. Adicionalmente e de um modo análogo avaliaram-se os efeitos de cada um dos ácidos na presença de etanol. Resultados representativos destas experiências encontram-se na figura 6.7.

De acordo com estes dados e em todas as condições experimentais testadas observou-se que o consumo de oxigénio era uma função linear do tempo e que a presença de ácido com ou sem etanol no meio extracelular induzia um decréscimo no consumo de O_2 acentuando-se o efeito com a concentração de ácido e/ou etanol.

A partir do declive das representações lineares do tipo dos apresentados na figura 6.7 obtiveram-se estimativas das taxas específicas de respiração da glucose nas diferentes condições experimentais referidas.

Estes valores expressos em percentagem relativa do valor obtido na ausência de ácido e/ou etanol (0%), foram por sua vez representados em gráfico semilogarítmico em função da concentração de ácido na presença e ausência de etanol. Estes resultados encontram-se representados na figura 6.8.

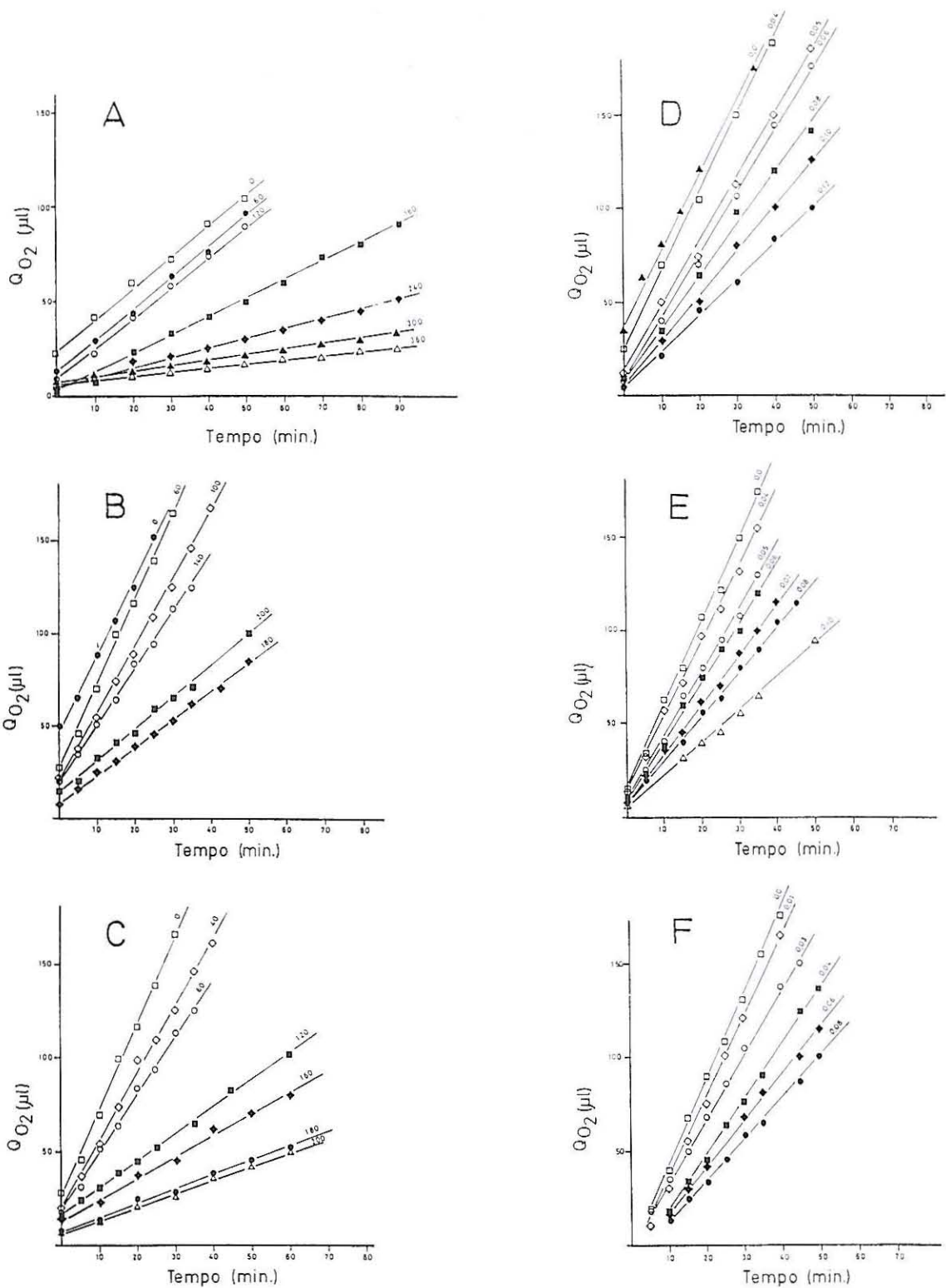


Fig. 6.7 - Variação do consumo de O_2 ao longo do tempo em função da concentração de ácido acético ou sórbico, a pH 4.5. Os números indicam as concentrações extracelulares de ácido.

- A) ácido acético na ausência de etanol.
- B) ácido acético na presença de 5% (v/v) etanol.
- C) ácido acético na presença de 10% (v/v) etanol.
- D) ácido sórbico na ausência de etanol.
- E) ácido sórbico na presença de 5% (v/v) etanol.
- F) ácido sórbico na presença de 10% (v/v) etanol.

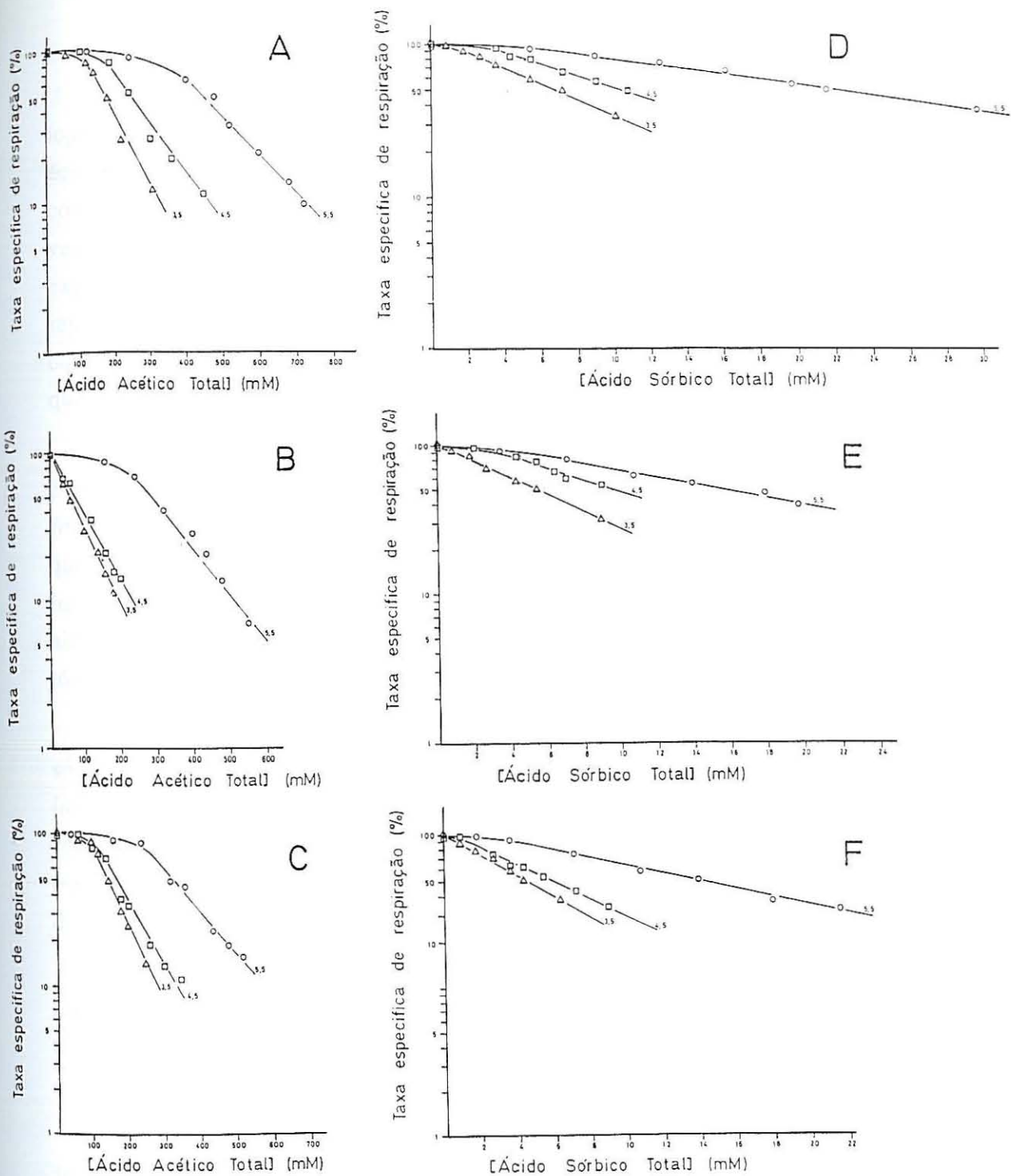


Fig. 6.8 - Dependência da taxa específica de respiração da glucose (em %) em função da concentração de ácido acético ou sórbico. Os números indicam os valores de pH experimentais.

- A) ácido acético na ausência de etanol.
- B) ácido acético na presença de 5% (v/v) etanol.
- C) ácido acético na presença de 10% (v/v) etanol.
- D) ácido sórbico na ausência de etanol.
- E) ácido sórbico na presença de 5% (v/v) etanol.
- F) ácido sórbico na presença de 10% (v/v) etanol.

Para todas as situações experimentais testadas observou-se uma relação linear entre os logaritmos naturais da taxa específica de respiração da glucose e a concentração extracelular de ácido indicando que a inibição pelos ácidos na ausência ou presença de etanol, para concentrações superiores a uma concentração mínima, obedeceu a uma cinética exponencial. Os valores das constantes exponenciais de inibição da respiração (k_i) para cada valor de pH experimental, calculados a partir do declive das rectas experimentais, encontram-se representados na tabela 6.5. Adicionalmente nesta tabela, apresentam-se os valores das concentrações mínimas inibitórias (X_{min}), bem como os valores das concentrações para as quais se observa 50% de inibição ($X_{50\%}$), aos diferentes valores de pH experimentais.

Os valores obtidos para as constantes exponenciais de inibição da respiração pelo ácido total aumentaram à medida que o pH decresceu, sugerindo que muito provavelmente a forma não dissociada do ácido está envolvida no processo inibitório. No entanto, esses valores quando expressos em concentração de ácido na forma não dissociada variaram de uma forma inversa, isto é, aumentaram quando o pH variou de 3,5 a 5,5. Isto leva-nos a postular que, para além da concentração do ácido não dissociado, outros factores estarão subjacentes à acção tóxica do ácido, na respiração (Tab. 6.5).

Adicionalmente, a comparação do efeito inibidor do ácido acético com o do ácido sórbico nas taxas específicas de respiração da glucose, parece indicar que o mecanismo de inibição está dependente da lipossolubilidade do ácido. Com efeito, os valores das concentrações de ácido necessários para provocar uma diminuição de 50% no valor da taxa específica de respiração diminuíram com o aumento do coeficiente de repartição lípido tampão do ácido.

Por outro lado, na figura 6.9 estão representados sob a forma de gráficos semilogarítmicos os valores das constantes exponenciais de inibição da respiração pelo ácido acético ou sórbico, em função da concentração de etanol (5 e 10%, v/v), a três valores de pH extracelular diferentes.

Os valores das constantes exponencias de estimulação pelo etanol dos efeitos inibidores dos ácidos ($k_{est,r}^{et}$), estimados a partir do declive das rectas da figura 6.9 encontram-se na tabela 6.6. A análise destes resultados sugere que os efeitos estimuladores do etanol foram pouco intensos e independentes do pH extracelular.

Tabela 6.5

Valores das concentrações mínimas inibitórias (X_{min}), das concentrações correspondentes a 50% de inibição ($X_{50\%}$) e das constantes exponenciais de inibição da respiração (k_i) pelo ácido acético e sórbico, na ausência e presença de etanol, em *Z. bailii*, 26° C, a diferentes valores de pH extracelular.

pH	Ácido	Etanol (%, v/v)	Respiração					
			X_{min} (mM)		$X_{50\%}$ (mM)		k_i (l/mol)	
			Total*	ND*	Total*	ND*	Total*	ND*
3,5		0	150,00	141,00	205,00	192,70	11,01	11,70
		5	120,00	113,70	150,00	141,00	12,50	13,30
		10	10,00	9,40	60,00	56,40	13,80	14,40
4,5	Acético	0	180,00	116,20	235,00	151,60	9,10	12,50
		5	140,00	90,36	170,00	109,10	9,80	13,30
		10	45,00	29,05	75,00	48,40	10,50	16,20
5,5		0	300,00	45,00	440,00	66,00	5,90	37,30
		5	270,00	40,50	330,00	49,50	6,20	40,20
		10	200,00	30,00	285,00	42,70	7,10	46,30
3,5		0	1,50	1,40	6,80	6,40	113,72	124,90
		5	1,00	2,90	5,50	5,20	142,40	150,00
		10	0,00	0,00	4,50	4,30	163,45	172,43
4,5	Sórbico	0	3,80	2,40	10,40	6,70	84,10	130,50
		5	3,20	2,70	9,70	6,30	103,5	160,22
		10	1,00	0,60	7,90	5,10	131,06	202,70
5,5		0	8,00	1,20	22,80	3,50	40,80	263,92
		5	8,00	1,20	16,00	2,50	48,70	325,6
		10	3,00	1,10	14,00	2,20	58,00	417,60

* - Total - concentração de ácido total; ND - concentração de ácido na forma não dissociada.

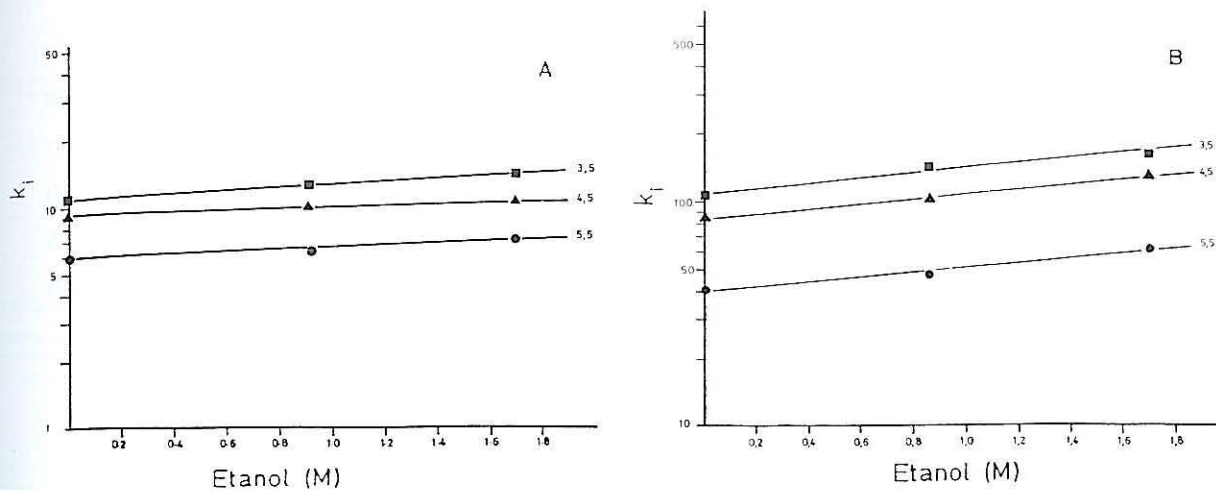


Fig. 6.9 - Efeito do etanol na constante exponencial de inibição da respiração da glucose (k_i) pelo ácido acético (A) e sórbico (B) em *Z. bailii* ISA 1307. Os números indicam os valores de pH extracelular.

Tabela 6.6

Valores das constantes exponenciais de estimulação ($k_{est,r}^{et}$) pelo etanol da inibição da respiração da glucose pelo ácido acético e sórbico, a diferentes valores de pH.

Ácido	pH	$k_{est,r}^{et}$ (l/mol)
Acético	3,5	0,13
	4,5	0,11
	5,5	0,10
Sórbico	3,5	0,26
	4,5	0,25
	5,5	0,23

6.3.4 - Determinação da taxa específica de fermentação da glucose em função do pH

As células de uma cultura em fase de crescimento exponencial ressuspensas em tampão fosfato de potássio 0,1M a pH 3,5; 4,5 e 5,5 utilizadas nas experiências de respiração foram também utilizadas em paralelo nas experiências de fermentação.

A quantidade de CO₂ produzida foi seguida ao longo do tempo. Os ensaios realizaram-se a 26° C. A figura 6.10 apresenta resultados típicos das experiências de fermentação, mostrando que a produção de CO₂ variou linearmente com o tempo. A partir do declive das rectas experimentais foram obtidas estimativas dos valores das taxas específicas de fermentação da glucose, expressas em µl CO₂ /min /mg peso seco (Tab. 6.7). Estes resultados sugerem que à semelhança do observado para o efeito do pH extracelular na taxa específica de respiração, a taxa específica de fermentação não variou significativamente com pH.

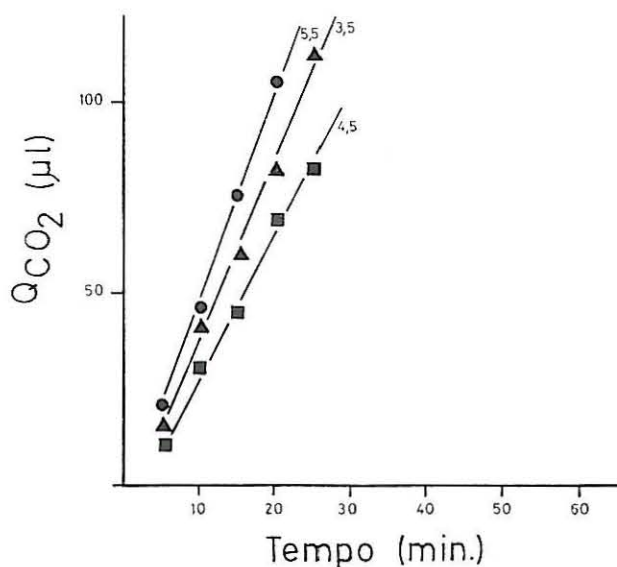


Fig. 6.10 - Variação da produção de CO₂ com o tempo, em *Z. bailii* ISA 1307 na ausência de ácidos e de etanol, a 26° C. Os números indicam os valores de pH extracelular.

A análise destes resultados em simultâneo com os representados na figura 6.4 e tabela 6.3 permitiu estimar que em condições de aerobiose em média, para os diferentes pH experimentais, a fermentação e a respiração contribuem respectivamente, em 75 e 25% para o catabolismo da glucose (ver cálculos no Anexo VI).

Tabela 6.7

Valores das taxas específicas de fermentação, em *Z. bailii*, a 26° C a diferentes valores de pH.

pH	Taxa específica de fermentação µl CO ₂ /min/mg peso seco
3,5	10,20
4,5	10,30
5,5	10,50

6.3.5 - Efeitos do etanol na fermentação da glucose

Para avaliar o efeito do etanol na fermentação da glucose na levedura *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307, a 26° C e a pH 4,5, determinaram-se os valores das taxas específicas de fermentação na presença de diferentes concentrações de etanol, utilizando as condições experimentais descritas na secção anterior.

Nestas condições observou-se que a variação da produção de CO₂ com o tempo foi linear (Fig. 6.11). Por outro lado, a análise destes resultados indica que o etanol provocou uma redução na taxa de fermentação. O efeito acentuou-se com a concentração de álcool no meio extracelular.

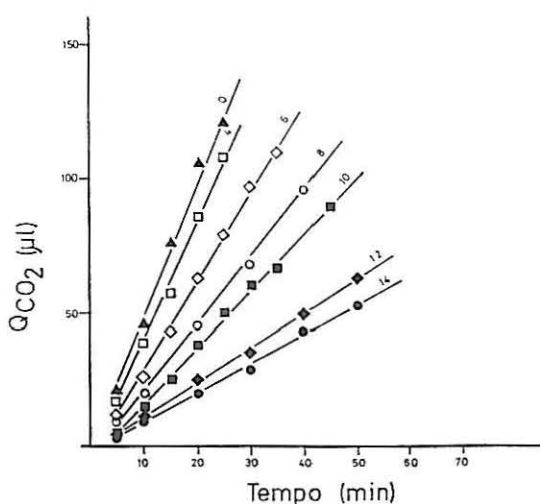


Fig. 6.11 - Variação da produção de CO₂ com o tempo, em *Z. bailii* ISA 1307, na presença de etanol, a 26° C, pH 4,5. Os números indicam as concentrações de etanol [% (v/v)] no meio extracelular.

Na figura 6.12 apresentam-se em gráfico semilogarítmico os valores das taxas específicas de fermentação da glucose obtidas para as diferentes concentrações de etanol expressas em valor relativo (% do valor obtido na ausência de etanol) em função da concentração de etanol.

De acordo com os resultados apresentados na figura 6.12, verifica-se que a variação da taxa específica de fermentação em função da concentração de etanol no meio extracelular obedece a uma cinética exponencial. A partir destes gráficos estimaram-se os valores das concentrações às quais se observou 50% de inibição da fermentação ($X_{50\%}$) e das concentrações abaixo das quais não foram mensuráveis efeitos negativos do etanol na fermentação (X_{\min}), bem como as constantes exponenciais de inibição da fermentação da glucose pelo etanol (k_i). Os resultados obtidos encontram-se na tabela 6.8.

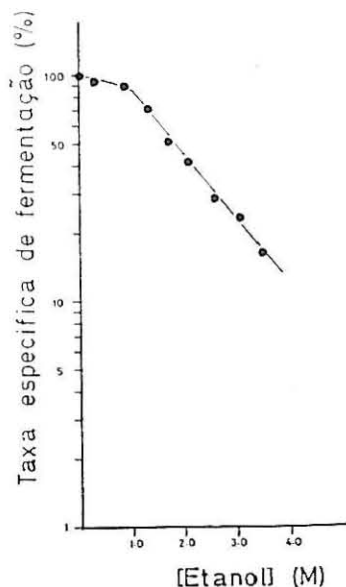


Fig. 6.12 - Gráfico semilogarítmico das taxas específicas de fermentação da glucose de *Z. bailii* ISA 1307, em função da concentração de etanol, a pH 4,5.

Tabela. 6.8

Estimativas dos parâmetros de inibição da fermentação da glucose pelo etanol, em *Z. bailii*, 26°C, pH 4,5.

$X_{\min}^{1)}$	$X_{50\%}^{1)}$	$k_i^{1)}$
(M)	(M)	(L/mol)
1,02	2,20	0.59

1) X_{\min} - Concentração de etanol mínima de inibição; $X_{50\%}$ - Concentração de etanol correspondente a 50% de inibição; k_i - Constante exponencial de inibição

6.3.6 - Efeitos dos ácidos acético e sórbico na fermentação da glucose em função do pH extracelular na ausência e presença de etanol

Com o objectivo de estudar os efeitos dos ácidos acético e sórbico na fermentação da glucose na levedura *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307, procedeu-se à avaliação da produção de CO₂ ao longo do tempo na presença dos referidos ácidos, a diferentes valores de pH de acordo com a metodologia descrita nas secções anteriores. De uma forma análoga fomos avaliar

os efeitos de cada um dos ácidos na presença de etanol. A figura 6.13 apresenta resultados experimentais exemplificativos destas experiências. A análise desta figura indica que, para cada um dos ácidos com ou sem etanol a produção de CO₂ variou linearmente com o tempo e que a adição de ácidos e/ou etanol provocou uma diminuição da produção de CO₂. Este efeito acentuou-se com o aumento da concentração do tóxico na meio extracelular. A partir dos declives das rectas da figura 6.13 estimaram-se os valores das taxas específicas de fermentação da glucose nas diferentes condições testadas. Os valores obtidos expressos em valor relativo (% do valor obtido na ausência de ácido e/ou etanol) encontram-se representados sob a forma de gráficos semilogarítmicos em função da concentração de ácido na ausência e na presença de etanol na figura 6.14.

De acordo com os resultados apresentados nesta figura, para cada um dos ácidos e/ou etanol, aos diferentes valores de pH e a 26° C, verifica-se que, para concentrações de ácido superiores a uma concentração mínima (X_{min}), a variação da taxa específica de fermentação com a concentração de ácido no meio extracelular obedeceu a uma cinética exponencial.

A partir destes gráficos, estimaram-se os valores para as constantes exponenciais de inibição da fermentação (k_i) e para as concentrações necessárias para reduzir em 50% a taxa específica de fermentação ($X_{50\%}$) bem como para as concentrações mínimas inibitórias X_{min} . Os valores obtidos estão resumidos na tabela 6.9.

O estudo da tabela 6.9 e da figura 6.14 indica que a inibição da fermentação pelos ácidos e/ou etanol, aumentou à medida que o pH diminui, o que é consistente com a ideia já exposta, de que a forma não dissociada, está associada aos efeitos tóxicos, uma vez que, a pH 5,5 a percentagem de ácido acético e sórbico não dissociado é de 15% e a pH 3,5 de 95%.

Além disso, o estudo comparativo do efeito inibidor do ácido acético e do ácido sórbico na taxa específica de fermentação de *Z. bailii* ISA 1307, mostra que o efeito tóxico está correlacionado com a respectiva lipossolubilidade. Assim, os valores das constantes exponenciais de inibição da fermentação diminuíram com a diminuição do coeficiente de repartição lípido/tampão do ácido.

Adicionalmente, os valores das constantes exponenciais de inibição da fermentação pelo ácido acético e sórbico, obtidos aos três valores de pH, foram representados em gráfico em função da concentração de etanol (5 e 10%, v/v) na figura 6.15. A partir dos declives das rectas desta figura estimaram-se os valores das constantes exponenciais de estimulação pelo etanol dos efeitos inibitórios dos ácido ($k_{est,f}^{et}$). Os valores obtidos estão sumariados na tabela 6.10. Uma análise da tabela indica que, os valores obtidos para as constantes exponenciais de estímulo em *Z. bailii* foram relativamente baixos quando comparados com os descritos para *Saccharomyces*

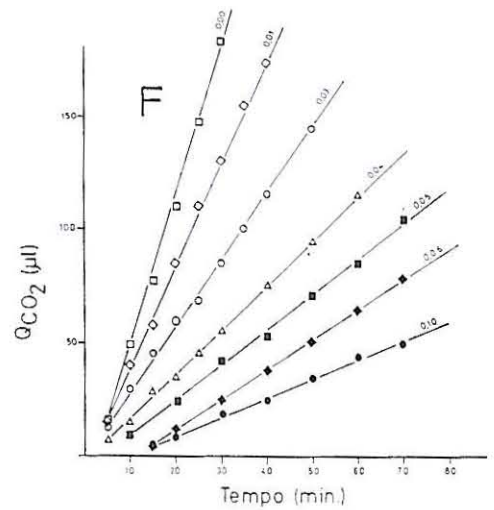
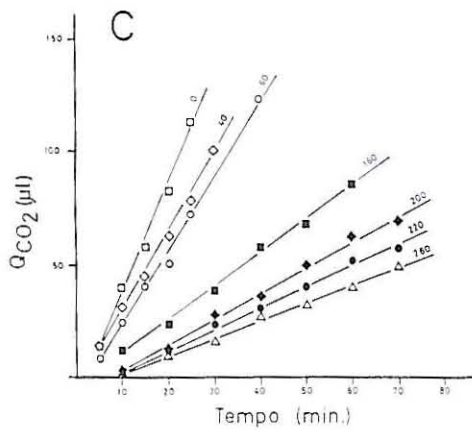
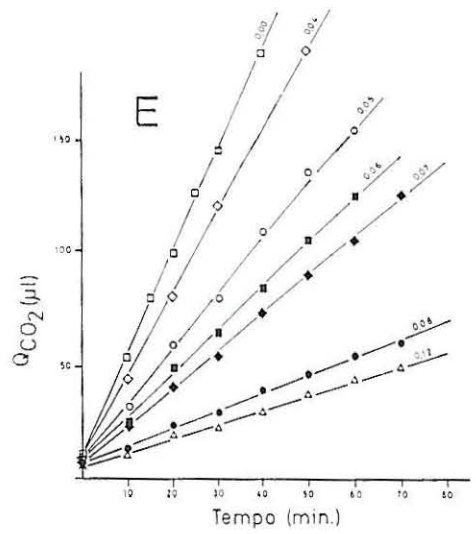
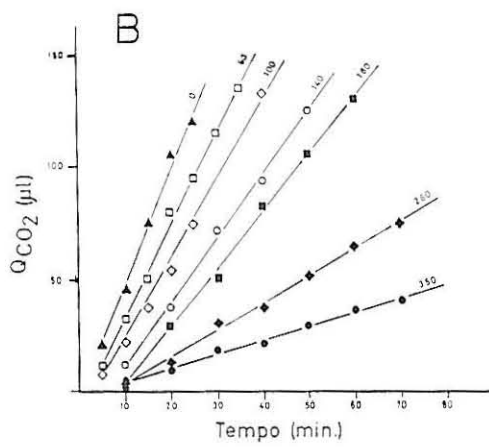
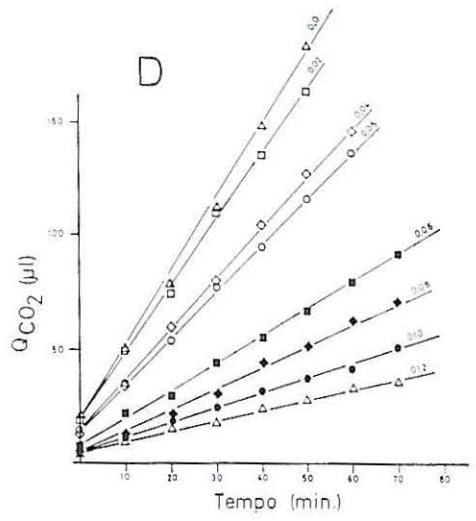
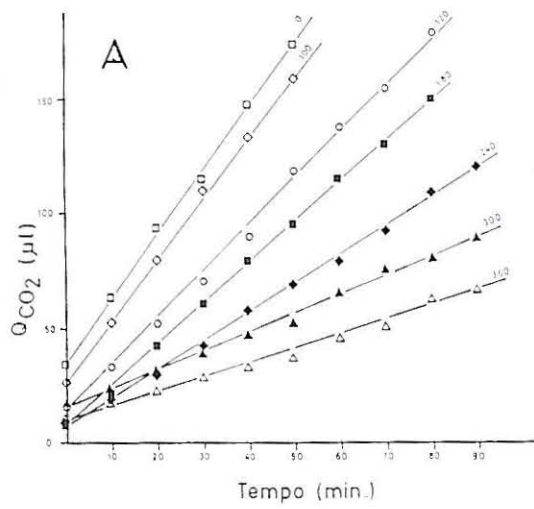


Fig. 6.13 - Variação da produção de CO_2 ao longo do tempo em função da concentração de ácido acético ou sórbico, a pH 4.5. Os números indicam as concentrações extracelulares de ácido.

- A) ácido acético na ausência de etanol.
- B) ácido acético na presença de 5% (v/v) etanol.
- C) ácido acético na presença de 10% (v/v) etanol.
- D) ácido sórbico na ausência de etanol.
- E) ácido sórbico na presença de 5% (v/v) etanol.
- F) ácido sórbico na presença de 10% (v/v) etanol.

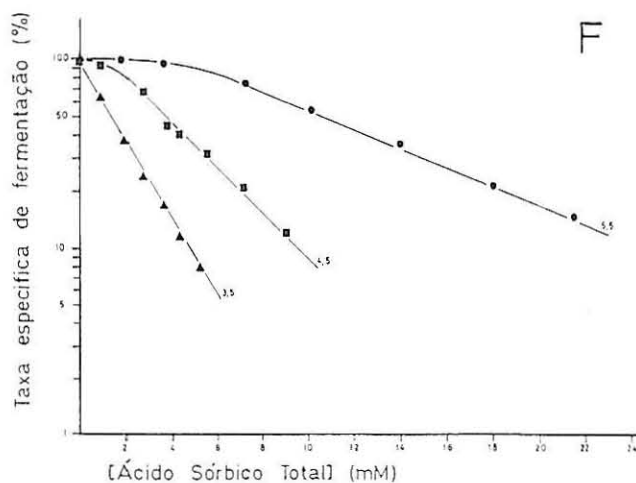
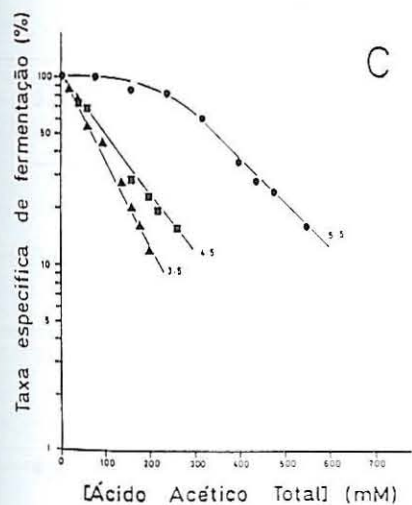
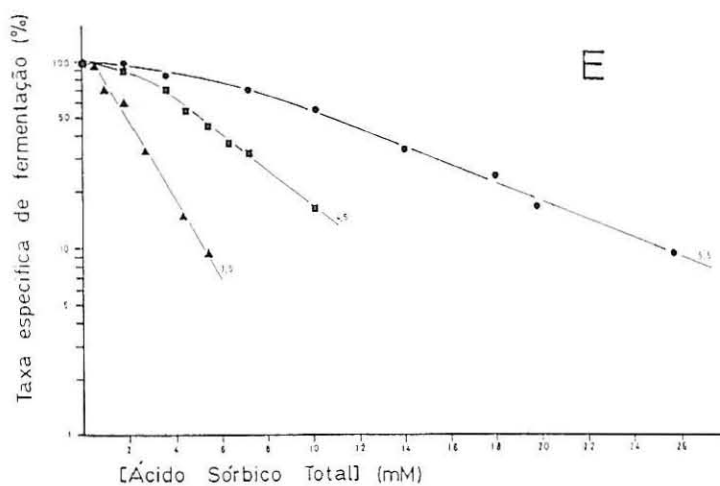
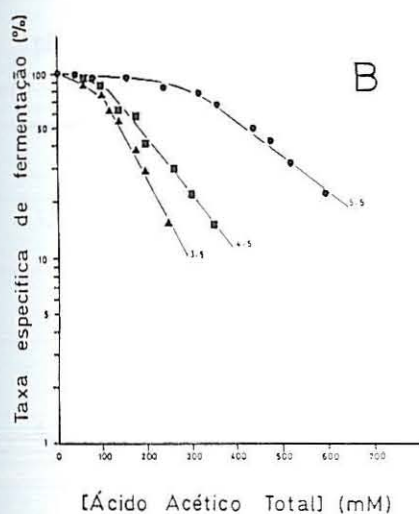
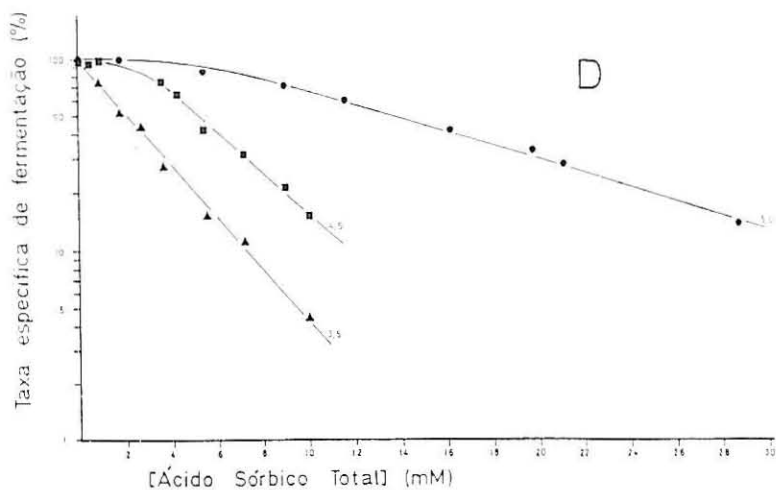
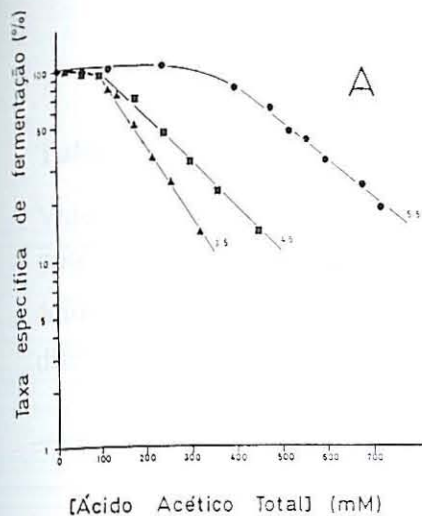


Fig. 6.14 - Dependência da taxa específica de fermentação da glucose (em %) em função da concentração de ácido acético ou sórbico. Os números indicam os valores de pH experimental.

- A) ácido acético na ausência de etanol.
- B) ácido acético na presença de 5% (v/v) etanol.
- C) ácido acético na presença de 10% (v/v) etanol.
- D) ácido sórbico na ausência de etanol.
- E) ácido sórbico na presença de 5% (v/v) etanol.
- F) ácido sórbico na presença de 10% (v/v) etanol.

Tabela 6.9

Valores das concentrações mínimas inibitórias (X_{min}), das concentrações correspondentes a 50% de inibição ($X_{50\%}$) e das constantes exponenciais de inibição (k_i) da fermentação pelo ácido acético e sórbico, na ausência e presença de etanol, em *Z. bailii* ISA 1307, a 26° C, a diferentes valores de pH.

pH	Ácido	Etanol (%, v/v)	Fermentação					
			X_{min} (mM)		$X_{50\%}$ (mM)		k_i (l/mol)	
			Total*	ND*	Total*	ND*	Total*	ND*
3,5		0	100,00	94,90	172,00	162,30	9,22	9,77
		5	100,00	94,90	143,00	135,60	9,40	9,80
		10	10,00	9,40	75,00	7,10	11,00	11,40
4,5	Acético	0	120,00	77,40	220,00	141,90	6,00	8,25
		5	100,00	64,50	180,00	116,10	6,80	9,30
		10	20,00	12,90	100,00	63,30	7,20	11,10
5,5		0	240,00	36,00	500,00	75,00	4,40	28,03
		5	220,00	33,00	415,00	62,25	4,70	30,57
		10	160,00	24,00	340,00	51,00	5,20	32,81
3,5		0	0,50	0,47	2,20	2,08	300,00	316,60
		5	0,30	28,30	1,90	1,80	347,40	366,50
		10	0,00	0,00	1,30	1,23	461,00	470,73
4,5	Sórbico	0	3,50	2,26	5,60	3,60	183,70	285,10
		5	3,50	2,26	5,10	3,29	220,60	341,50
		10	2,00	1,29	3,90	2,52	272,30	420,30
5,5		0	6,20	0,90	13,70	2,10	84,50	547,00
		5	4,50	0,70	10,50	1,60	94,82	615,60
		10	3,00	0,50	8,70	1,30	110,00	806,20

* - Total - concentração de ácido total: ND - concentração de ácido na forma não dissociada.

cerevisiae, nas mesmas condições experimentais (Pampulha e Loureiro, 1989). Aparentemente os valores de $k_{est,f}^{et}$ não variaram significativamente com o pH extracelular. Observou-se apenas, uma ligeira alteração no que respeita ao ácido sórbico a pH 5,5 onde o valor de $k_{est,f}^{et}$ foi cerca de metade do obtido aos outros valores de pH estudados.

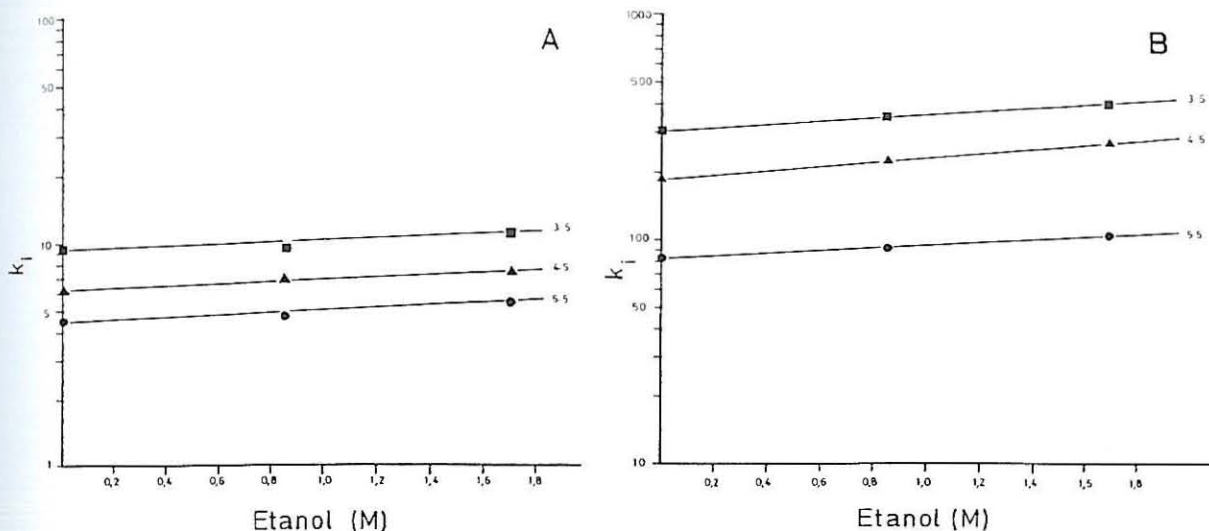


Fig. 6.15 - Efeito do etanol na constante exponencial de inibição da fermentação da glucose (k_i) pelo ácido acético (A) e sórbico (B) em *Z. bailii* ISA 1307. Os números indicam os valores de pH extracelular.

Tabela 6.10

Valores das constantes exponenciais de estimulação ($k_{est,f}^{et}$) pelo etanol da inibição da fermentação pelo ácido acético e sórbico, a diferentes valores de pH.

Ácido	pH	$k_{est,f}^{et}$ (l/mol)
Acético	3,5	0,123
	4,5	0,106
	5,5	0,100
Sórbico	3,5	0,250
	4,5	0,235
	5,5	0,160

6.3.7 - Estudo comparativo entre os efeitos do ácido acético na taxa específica de fermentação da glucose e na acidificação intracelular.

Em paralelo com os estudos respeitantes aos efeitos do ácido acético na fermentação da glucose, procuramos também avaliar os efeitos do ácido na acidificação intracelular, em condições experimentais idênticas.

Para tal, utilizando células provenientes das mesmas culturas e mantendo as condições usadas na determinação da taxa específica de fermentação, medimos o pH intracelular, na presença de ácido acético na mesma gama de concentrações, a 26° C e a pH 3,5, de acordo com a metodologia descrita no capítulo anterior. Nestas condições, e como esperávamos, de acordo com os resultados apresentados no capítulo anterior verificou-se que a concentração intracelular de protões, a temperatura constante, foi uma função exponencial da concentração de ácido no meio extracelular de acordo com a equação:

$$[H^+]_{int}^x = [H^+]_{int}^{x_m} e^{k(x-x_m)} \quad (6.3)$$

em que:

$[H^+]$ - concentração intracelular de protões

x - concentração de ácido carboxílico

x_m - concentração mínima estimulante da acidificação intracelular

k_1 - constante exponencial de estimulação da acidificação intracelular, característica do ácido.

Na figura 6.16 apresentamos resultados referentes à variação da taxa específica de fermentação e à variação da concentração intracelular de protões em função da concentração de ácido, a 26° C. A partir dos dados na figura 6.16 determinou-se o valor da constante exponencial de estimulação da acidificação intracelular (equação 6.3), bem como o valor da constante exponencial de inibição da fermentação. Os valores obtidos foram, respectivamente de 0,72 l/mol e 9,22 l/mol.

Comparando os valores das constantes exponenciais de inibição da fermentação da glucose (Tab. 6.9) com os obtidos para a constante exponencial de estimulação da acidificação intracelular, verifica-se que os valores de ambas as constantes foram diferentes, sugerindo que, não existe relação entre a diminuição da taxa específica de fermentação da glucose e o aumento da concentração intracelular de protões induzida pelo ácido acético.

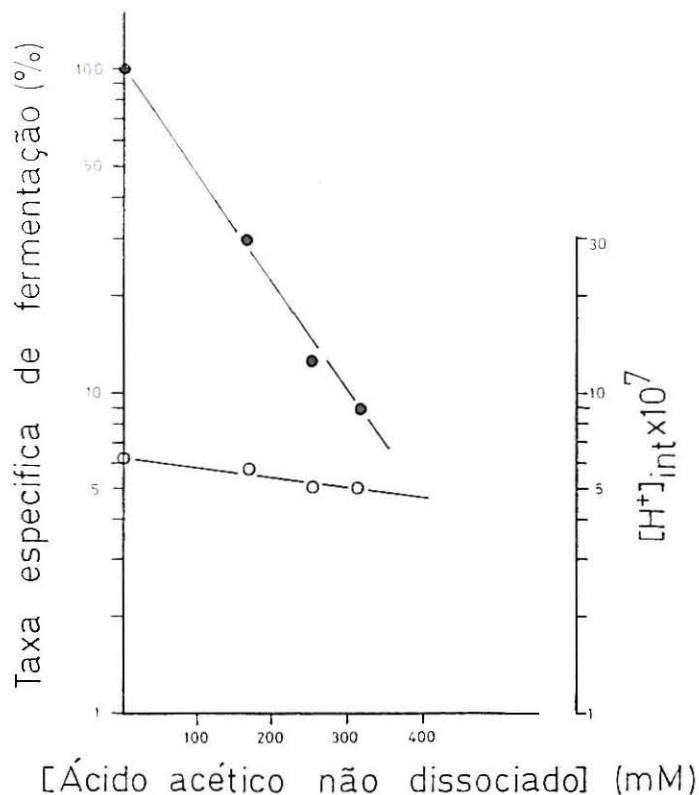


Fig. 6.16 - Efeitos do ácido acético na taxa específica de fermentação (símbolos fechados) e na concentração intracelular de prótons $[H^+]$ (símbolos abertos), a 25° C, pH 3,5.

6.4 - Discussão

6.4.1 - Efeitos dos ácidos fracos e do etanol na fermentação e na respiração de *Zygosaccharomyces bailii*

No presente capítulo, estudamos o efeito dos ácidos acético e sórbico na ausência e presença de etanol, na taxa específica de respiração/fermentação de *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307, quando crescida num meio com glucose à temperatura de 26° C. De acordo com os resultados obtidos, estimou-se, que em aerobiose a fermentação e a respiração contribuíram respectivamente, em 75% e 25% para o catabolismo da glucose.

Adicionalmente verificamos que os ácidos com ou sem etanol induziram efeitos inibidores sobre a respiração/fermentação da estirpe de levedura em estudo. Os efeitos acentuaram-se com o aumento da concentração de ácido e/ou etanol no meio extracelular. Para cada um dos ácidos a cinética foi traduzida por relação exponencial, para concentrações de

inibidor acima dos valores correspondentes às concentrações mínimas de inibição. Os valores das constantes exponenciais de inibição aumentaram proporcionalmente com os valores dos coeficientes de repartição lípido-tampão dos ácidos. Adicionalmente, e na sequência destes resultados, as concentrações de ácido necessárias para induzir 50% de inibição na respiração/fermentação e das concentrações mínimas inibitórias, estão igualmente relacionadas com a lipossolubilidade dos ácidos, diminuindo com os respectivos coeficiente de repartição lípido-tampão.

Por outro lado, os valores obtidos para as constantes exponenciais de inibição da respiração/fermentação (k_i) pelo ácido acético total e sórbico total aumentaram à medida que o pH decresceu, sugerindo que muito provavelmente a forma não dissociada do ácido está envolvida no processo inibitório. No entanto, quando esses valores se encontram expressos na forma não dissociada, diminuíram quando o pH variou de 3,5 para 5,5 o parece indicar que, para além da concentração de ácido não dissociado, outros factores estarão subjacentes a acção tóxica dos ácidos na respiração/fermentação. Os estudos efectuados neste âmbito por Eklund, (1983), Cole e Keenan (1986) vêm de encontro aos nossos resultados, mostrando que a acção inibitória dos ácidos fracos, em dependência estrita do pH, nem sempre se verifica e que não se pode generalizar, de que apenas a forma não dissociada do ácido é a forma tóxica.

Por outro lado, se compararmos os resultados obtidos nas experiências do crescimento (Cap. 2) com os da respiração e da fermentação, na presença dos ácidos e/ou etanol, verificamos que o seu efeito negativo no crescimento é mais acentuado do que na taxa específica de respiração/fermentação. Estes resultados estão de acordo com observações anteriores de Brown *et al.*, 1981 e de Leão e van Uden, 1984-b. Segundo os últimos autores, em células de *Saccharomyces cerevisiae* crescidas num meio com glucose e amónio, a fermentação pode prosseguir para concentrações de etanol elevadas, às quais o crescimento é inibido. Assim, nesta levedura para concentrações de etanol inferiores a 1 M, a inibição do transporte da glucose é o principal responsável pela cinética global de inibição pelo etanol do crescimento e da fermentação. Para concentrações de etanol superiores, a fermentação continua a ser determinada pela inibição do transporte da glucose, enquanto, que o crescimento é sobretudo determinado pelo transporte do amónio. De facto, a concentração de etanol necessária para inibir o transporte do amónio é inferior à exigida para a inibição da glucose.

Adicionalmente, verificou-se que o etanol estimulou exponencialmente os efeitos inibitórios induzidos pelos ácidos na fermentação/respiração, sendo no entanto, os efeitos estimuladores pouco intensos e independentes do pH extracelular.

6.4.2 - Análise comparativa dos efeitos dos ácidos fracos e do etanol na respiração e na fermentação da glucose em *Zygosaccharomyces bailii* e em *Saccharomyces cerevisiae*

Os resultados apresentados sobre os efeitos do etanol na taxa específica de fermentação de *Zygosaccharomyces bailii* foram semelhantes aos obtidos por Leão e van Uden (1984-a) num mutante deficiente respiratório de *Saccharomyces cerevisiae*. Os valores determinados por estes investigadores para as concentrações de etanol necessárias para induzir 50% de inibição da fermentação e para as concentrações abaixo das quais os efeitos negativos do etanol não foram mensuráveis foram, respectivamente, de 10% (p/v) e de 6% (p/v). O valor da constante exponencial de inibição da fermentação pelo etanol em *Z. bailii* (0,59 l/mol) foi idêntico ao descrito para *S. cerevisiae* (0,728 l/mol) por Leão e van Uden (1984-a e 1985).

No que diz respeito aos efeitos do ácido acético também à semelhança do que foi observado por Pampulha e Loureiro (1989) num mutante deficiente respiratório de *S. cerevisiae*, a taxa específica de fermentação de *Z. bailii*, para concentrações de ácido acético acima de uma concentração mínima diminui exponencialmente com a concentração de ácido. Porém, em *Z. bailii* a concentração mínima inibitória, bem como a concentração para a qual se obteve 50% de inibição foram significativamente superiores às estimadas, nas mesmas condições experimentais, para *S. cerevisiae* IGC 3507, enquanto que a constante exponencial de inibição foi inferior.

Por outro lado, os nossos resultados são consistentes com os estudos de Warth (1991-a e b) em que, concentrações em ácido benzoico entre 5 e 10 mM, inibem progressivamente a fermentação de *Z. bailii*. Porém, e ao contrário do que foi observado por este autor, no nosso trabalho não observamos estímulo da fermentação ou da respiração mesmo para concentrações de ácido reduzidas. Vários factores poderão contribuir para estas discrepâncias, entre os quais se salientam: estirpe de levedura utilizada; condições de crescimento; adaptação das células utilizadas nos ensaios e da metodologia utilizada nas determinações.

Adicionalmente os resultados apresentados mostraram que, como em *S. cerevisiae*, também em *Z. bailii*, o etanol estimulou exponencialmente a inibição da fermentação/respiração pelos ácidos acético e sórbico. Para o ácido acético, o valor da constante exponencial de estimulação pelo etanol de inibição da fermentação pelo ácido acético, em *Z. bailii* foi cerca de metade do obtido em *S. cerevisiae* (0,33 l/mol). Estes resultados poderão contribuir para explicar a maior resistência de *Z. bailii* comparativamente com *S. cerevisiae* a ambientes ácidos e na presença de etanol.

CAPÍTULO 7

CRESCIMENTO DE *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307 EM SUBSTRATOS SIMPLES E MISTOS: TRANSPORTE DE ÁCIDO ACÉTICO E QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES, ÁCIDOS FRACOS, ETANOL E GLICEROL NO MEIO DE CULTURA

7.1 - Introdução

Nos capítulos anteriores mostramos que em *Zygosaccharomyces bailii* concentrações elevadas de ácidos e etanol estimularam a taxa específica de morte térmica e inibiram a taxa específica de crescimento, de fermentação e de respiração. Foi também possível mostrar que estes efeitos foram de um modo global muito inferiores aos descritos para *Saccharomyces cerevisiae* e que além disso não eram significativamente agravados na presença de etanol ao contrário do que também se encontra descrito para *S. cerevisiae*.

A deterioração de alimentos que incluem ácidos na sua composição (como substratos naturais ou adicionados) pode estar associada ao crescimento de leveduras com capacidade de utilização daqueles substratos. Recentemente foram desenvolvidos diferentes estudos sobre o transporte transmembranar de ácidos fracos monocarboxílicos e sua regulação em leveduras. No caso das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Cássio *et al.*, 1987), *Candida utilis* (Leão e van Uden, 1986; Cássio *et al.*, 1993) e *Torulaspota delbrueckii* (Casal e Leão, 1992 e 1995) os estudos sugerem que a forma aniônica do ácido láctico e outros monocarboxilatos atravessa a membrana plasmática por um mecanismo do tipo simporte com protões. Em *Kluyveromyces marxianus* (Fonseca *et al.*, 1991) parece estar presente um uniporte para os monocarboxilatos.

No presente capítulo após estudos preliminares sobre o transporte de ácido acético e outros monocarboxilatos na levedura de *Z.bailii*, na ausência e presença de etanol, procedemos à:

- análise da capacidade de utilização de açúcares, etanol e ácido acético.
- análise quantitativa e qualitativa dos metabolitos produzidos a partir da utilização da glucose, frutose, ácido acético e etanol.

Antes da apresentação dos resultados experimentais procede-se a uma breve referência a conceitos fundamentais sobre transporte transmembranar de nutrientes e utilização de açúcares, ácidos orgânicos e outros substratos gluconeogénicos, em leveduras.

7.1.1 - Membranas biológicas e mecanismos de transporte

A designação genérica de membrana compreende uma estrutura celular do tipo unitária presente em todas as células vivas. Esta estrutura dada a sua permeabilidade selectiva, funciona como uma barreira de separação entre o ambiente exterior e interior, que permite à célula manter uma composição relativamente constante e manter os seus constituintes celulares. Adicionalmente, a célula tem necessidade de controlar a entrada de nutrientes presentes no meio e a excreção dos produtos residuais do metabolismo.

As membranas biológicas, incluindo a plasmática têm uma estrutura global muito semelhante, sendo constituídas essencialmente por lípidos e proteínas. Entre os lípidos presentes, os principais são os fosfolípidos, colesterol, esfingolípidos e glicolípidos. Os lípidos, dada a sua natureza anfipática, dispõem-se em bicamadas moleculares com os grupos hidrofílicos projectados para o meio extracelular, e as porções hidrofóbicas orientadas para o interior da bicamada constituindo, assim, uma matriz fluida, onde as proteínas membranares flutuam mais ou menos submersas, conforme a distribuição dos grupos polares à superfície definida por sua vez pela sequência de aminoácidos.

A estabilidade da membrana é devida a forças hidrofóbicas entre os ácidos gordos dos lípidos e a forças electrostáticas entre os grupos hidrofílicos (Brock e Madigan, 1991). Esta organização estrutural dos lípidos em bicamada (Fig 7.1) é o chamado modelo em mosaico fluido descrito por Singer e Nicolson (1972). O interior da bicamada lipídica é pelas suas características hidrofóbicas impermeável a solutos polares e a iões, incluindo H^+ e OH^- . A difusão passiva de uma substância através da camada bilípídica depende do seu tamanho e da sua solubilidade nos lípidos. Em geral, quanto mais pequena for a molécula e maior for a sua lipossolubilidade mais rapidamente se difunde. Por conseguinte, as moléculas hidrofóbicas (O_2 , N_2 e benzeno) e as pequenas moléculas polares não carregadas (água, etanol, CO_2 e NH_3) difundem-se passivamente através da matriz lipídica. Porém, a matriz lipídica é altamente impermeável à maior parte dos nutrientes e subprodutos metabólicos, na sua grande maioria de natureza essencialmente hidrofílica (Fig 7.2). A sua passagem através da membrana é regulada por sistemas de transporte envolvendo ligações com proteínas específicas transmembranares. Assim, a organização das membranas biológicas, ao combinar a permeabilidade selectiva conferida pela bicamada lipídica, com a existência de sistemas específicos de transporte, faz com que as espécies químicas se distribuam de uma forma desigual entre o citoplasma e o meio extracelular. Assim para cada uma dessas espécies pode existir um gradiente de potencial químico ($\Delta\mu$). Adicionalmente, dado que a maior parte destas moléculas são iões é possível para além de um potencial químico a existência de um potencial eléctrico transmembranar ($\Delta\Psi$). Estes gradientes iónicos transmembranares constituem a força proto-motriz para um grande número de diferentes processos metabólicos, entre os quais se salientam, o transporte de

substratos, a transmissão de sinais eléctricos (nas bactérias, cloroplastos e mitocôndrias) e a síntese de ATP.

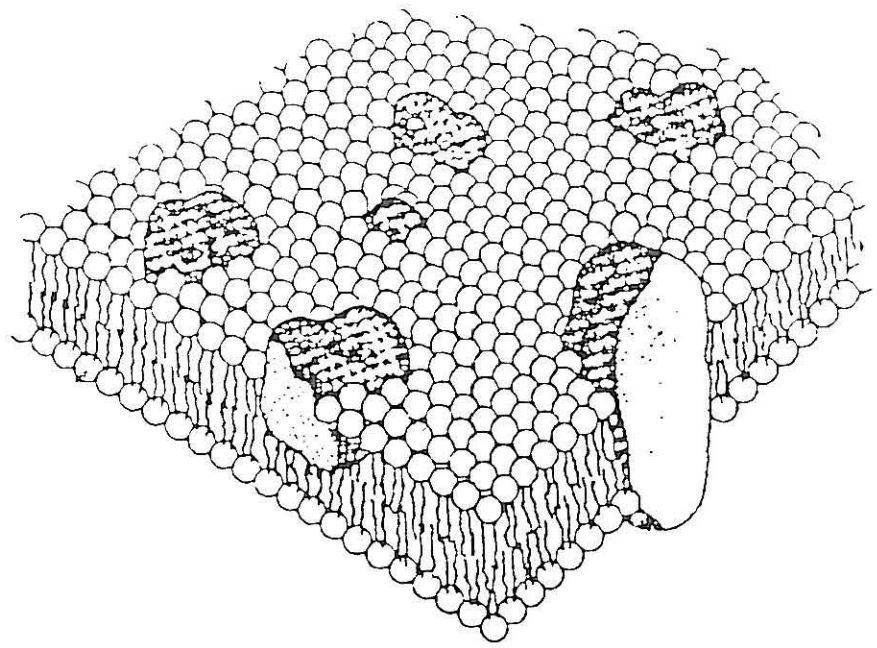


Fig. 7.1 - Modelo do mosaico fluido de Singer e Nicolson (1972) para a estrutura da membrana.

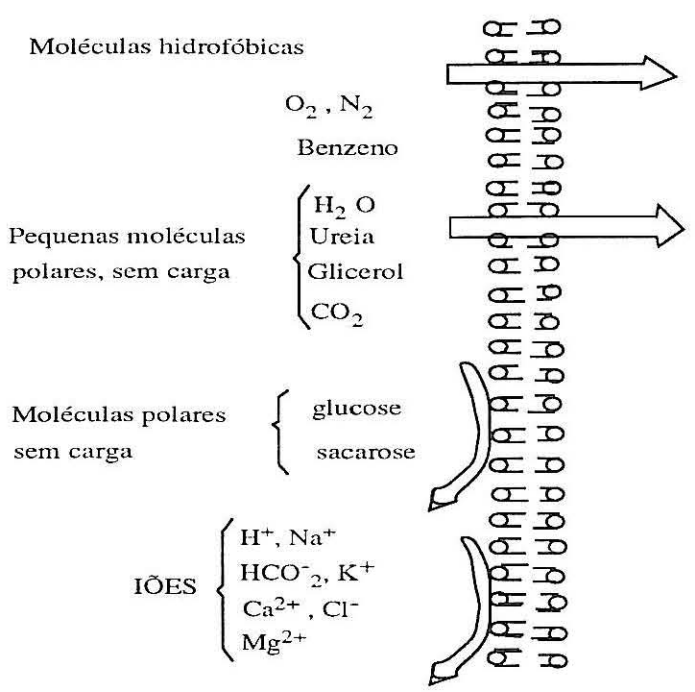


Fig. 7.2 - Permeabilidade selectiva de várias moléculas através de uma camada bilipídica artificial.

O movimento de solutos através das membranas biológicas pode ser dividido em:

7.1.1.1 - transporte não mediado

7.1.1.2 - transporte mediado

- *difusão facilitada*
- *transporte activo*

7.1.1.1 - Transporte não mediado

Na difusão simples o movimento de compostos ocorre a favor do gradiente químico existente através da membrana. O fluxo cessa quando se atinge o equilíbrio, ou seja quando a concentração intracelular iguala a concentração extracelular.

Consideremos uma membrana semipermeável que separa dois compartimentos em que o soluto se distribui segundo duas concentrações diferentes, C_1 e C_2 . A difusão ocorre quando o sistema passa de um estado de energia livre mais elevado para um de energia livre mais baixa.

A variação da energia livre (ΔG), quando uma mole de um soluto sem carga se move de um compartimento para outro é dado pela expressão:

$$\Delta G^0 = RT \ln K \quad (7.1)$$

ou

$$\Delta G = RT \ln \frac{C_2}{C_1} \quad (7.2)$$

em que R é a constante dos gases perfeitos, T a temperatura absoluta, K a constante de equilíbrio do processo e C_2 e C_1 são os valores das concentrações do composto nas duas fases aquosas dos dois lados da membrana (Mitchell, 1961).

A velocidade de transporte de um soluto por um mecanismos de difusão simples, a favor do seu gradiente de concentrações é dada pela equação empírica de Fick:

$$\text{Fluxo} = \frac{dC}{dt} = -DA \frac{C_2 - C_1}{X} \quad (7.3)$$

em que o fluxo representa o número de moles de um soluto (C) que se difunde no intervalo de tempo (dt), $\frac{C_2 - C_1}{X}$ o gradiente de concentrações sob o qual ocorre a difusão e A a área de difusão.

A constante de proporcionalidade D é designada por coeficiente de difusão (L^2T^{-1}) (de Voe e Maloney, 1980). O coeficiente de difusão depende das características da membrana através da qual se dá a difusão, isto é, da sua espessura a e da lipossolubilidade do composto

em questão, expressa pelo coeficiente de repartição lípido tampão (c_r). Introduzindo o coeficiente de repartição na equação (7.3) é possível deduzir a expressão:

$$\text{Fluxo} = - \frac{D}{a} c_r A (C_2 - C_1) \quad (7.4)$$

onde, $(D/a)c_r$ é a permeabilidade (P) da membrana a um dado substrato. O parâmetro P possui as dimensões LT^{-1} (de Voe e Maloney, 1980), exprime quantitativamente a facilidade com que cada substância se difunde através da membrana, e constitui uma característica intrínseca da mesma. Como os valores de a e do coeficiente de difusão (D), para uma determinada célula, não variam significativamente de substrato para substrato, podemos dizer que a variabilidade do coeficiente de permeabilidade é devida principalmente a diferenças de lipossolubilidade dos compostos, sugerindo que a difusão é, em geral proporcional ao coeficiente de repartição lípido tampão do composto.

A difusão de moléculas pequenas como a água constituem excepções dado que nestas situações não se observa proporcionalidade com o c_r .

A equação 7.4 referente à velocidade de difusão do soluto pode ser escrita como:

$$F = PA (C_2 - C_1) \quad (7.5)$$

A relação matemática estabelecida para o mecanismo de difusão simples, através de uma membrana, mostra que a velocidade líquida de difusão de um soluto é directamente proporcional ao seu gradiente de concentração. Consequentemente, os gráficos das velocidades iniciais de entrada do soluto em função da concentração do mesmo é traduzido por uma recta que passará na origem com um declive PA (Fig. 7.3).

Quando o soluto é um ião, em vez de uma molécula neutra, há que ter em conta para além do gradiente químico entre os dois compartimentos, o gradiente de carga eléctrica ou potencial, correspondente a uma diferença de cargas. A adição dos dois gradientes constitui o potencial electroquímico ($\tilde{\mu}$).

Neste caso, a variação da energia livre associada ao movimento do ião c é dada por:

$$\Delta G = RT \ln \frac{C_2}{C_1} + Z_c F \Delta \Psi \quad (7.6)$$

em que Z é o número de cargas por molécula, F a constante de Faraday (23601 cal/volt equivalente) e $\Delta \Psi$ a diferença de potencial eléctrico entre os dois compartimentos.

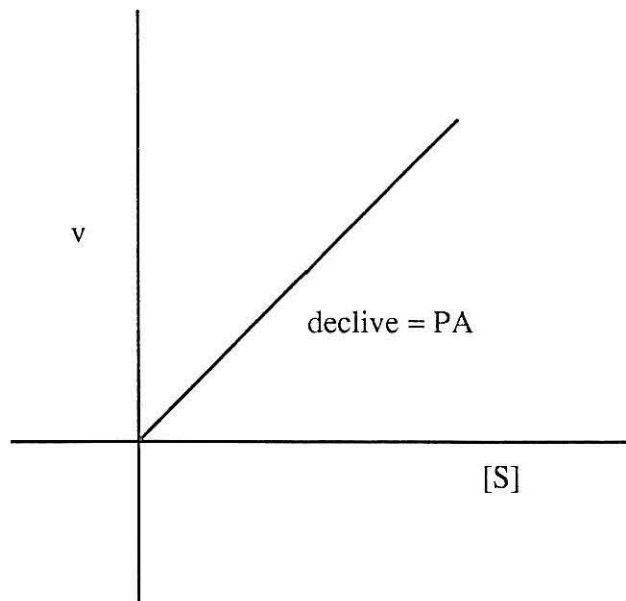


Fig. 7.3 - Cinética das velocidades iniciais de entrada do substrato segundo um mecanismo de transporte não mediado: difusão simples.

No caso de ácidos e de bases fracas que tenham o seu pK_a na gama fisiológica de pH verifica-se um caso particular de difusão. Com efeito, dependendo do pH extracelular e da sua relação com o valor do pK_a , vamos encontrar predominantemente a forma ionizada ou a não ionizada. A forma não dissociada ao contrário da ionizada, sendo lipossolúvel, atravessa a membrana e se o valor de pH extracelular for inferior ao intracelular ocorrerá acumulação intracelular da forma dissociada, dado que ao pH intracelular a forma não dissociada dissocia-se. O equilíbrio será então atingido quando:

$$[\text{ácido não dissociado}]_{\text{int}} = [\text{ácido não dissociado}]_{\text{ext}} \quad (7.7)$$

e,

$$\log \frac{[\text{ácido dissociado}]_{\text{int}}}{[\text{ácido dissociado}]_{\text{ext}}} = \text{pH}_{\text{int}} - \text{pH}_{\text{ext}} \quad (7.8)$$

7.1.1.2 - Transporte mediado

O transporte mediado (facilitado) distingue-se do transporte não mediado (difusão simples) pelas suas características cinéticas (Fig. 7.4).

Como foi referido anteriormente, no processo não mediado a velocidade de difusão é proporcional à concentração do soluto, obedecendo a uma cinética de 1ª ordem.

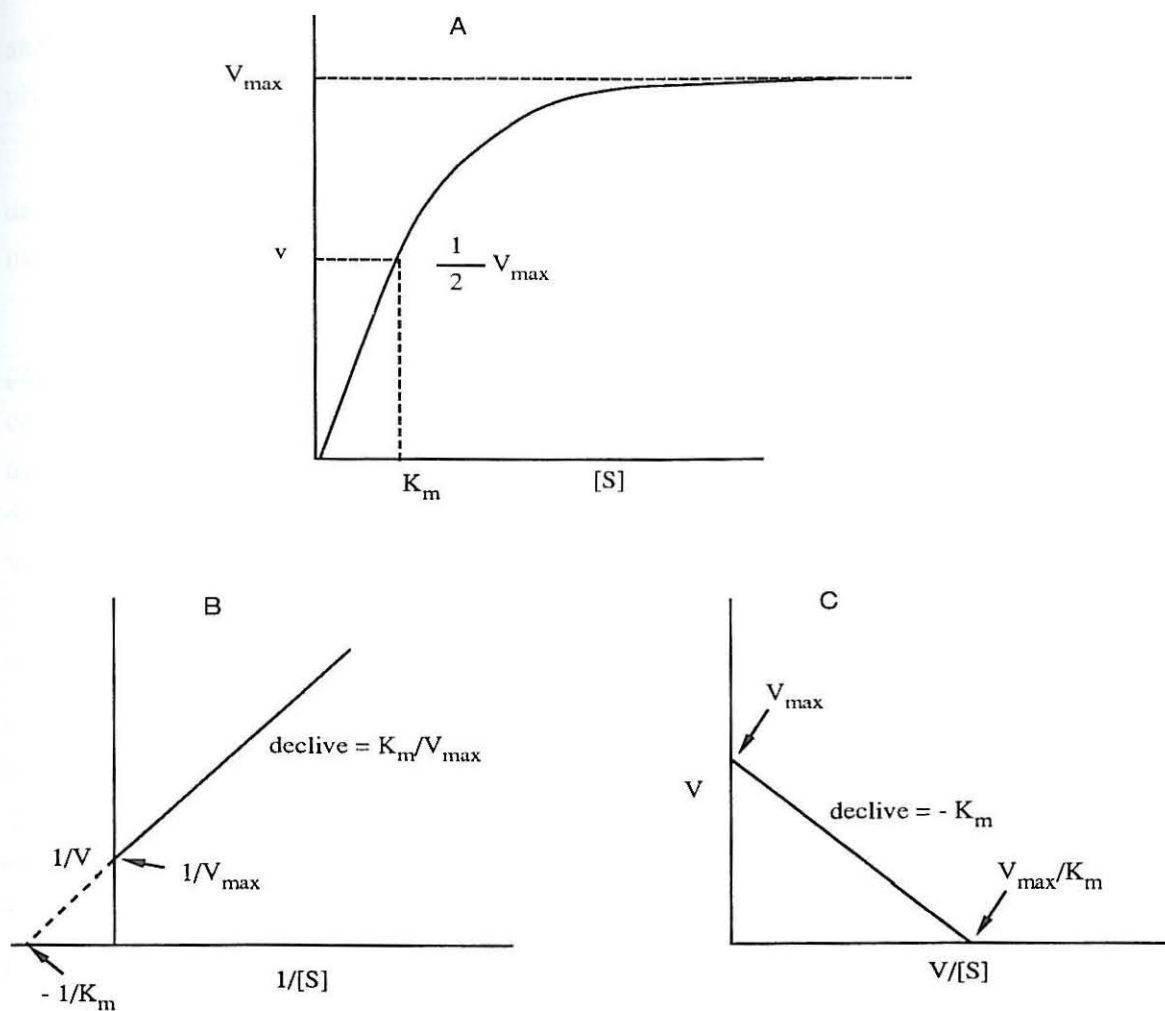


Fig. 7.4 - Cinética das velocidades iniciais de entrada do substrato segundo um mecanismo de transporte mediado. Representação directa (A), representação de Lineweaver-Burk (B) e representação de Eadie-Hofstee (C).

O transporte mediado implica o envolvimento de proteínas (permeases) transportadoras a cujos centros activos o substrato (ou substrato e co-substrato) se liga reversivelmente. Tipicamente apresenta uma cinética de saturação do tipo Michaelis - Menten. Neste caso, a representação gráfica da velocidade inicial de entrada do substrato (v) em função da sua concentração conduz a uma hipérbole rectangular como se ilustra na figura 7.3, em que V_{max} é a velocidade inicial máxima de transporte para concentrações saturantes de substrato ou co-substrato e K_m é a constante de meia saturação, correspondente à concentração do substrato ou co-substrato para a qual o valor de v é metade do valor da velocidade máxima. Adicionalmente, nesta figura resumem-se as representações gráficas clássicas. Estes sistemas de transporte são estereoespecíficos, podendo ser inibidos competitivamente por moléculas estruturalmente

análogas. São ainda caracterizados pela velocidade de entrada variar com a temperatura e com o pH. Estes mecanismos de transporte incluem a difusão facilitada e o transporte activo.

O 1º tipo - difusão facilitada - corresponde ao transporte mediado de um soluto a favor do seu gradiente químico e/ou eléctrico, em que, no equilíbrio, a concentração do soluto é a mesma dos dois lados da membrana.

No transporte activo, e contrariamente ao mecanismo de difusão facilitada, o soluto pode mover-se contra o seu gradiente de concentrações. É um transporte acumulador e requer o consumo de energia pela célula. Classicamente e consoante a natureza da fonte de energia utilizada pode subdividir-se em transporte activo primário e secundário. De acordo com esta divisão no transporte activo primário a energia provem de uma reacção química, enquanto no secundário depende de um gradiente eléctrico ($\Delta \Psi$) e/ou de um gradiente químico.

A teoria quimiosmótica, sobre o acoplamento e a transdução de energia, proposta por Mitchell em 1961, inicialmente desenvolvida com vista à elucidação da fosforilação oxidativa em mitocôndrias, cloroplastos e membranas das bactérias está na base dos conceitos actualmente aceites sobre o transporte activo. De acordo com esta teoria, a cadeia respiratória está associada ao transporte de prótons para o lado de fora da membrana, gerando assim um gradiente que pode conduzir à síntese de ATP via uma ATPsintetase como consequência do fluxo de prótons a favor do gradiente de concentrações. Ou seja, a cadeia respiratória converteria a energia libertada durante o transporte de electrões em energia de um gradiente electroquímico de H^+ e esta, por sua vez é convertida em energia metabólica sob a forma de ATP (Fig. 7.5 a). Como sistemas de transporte activo primário temos por exemplo, a Na^+ , K^+ - ATPase das células animais e a H^+ - ATPase das células das plantas e dos fungos. Por exemplo, a ATPase (bomba de prótons) da membrana plasmática de leveduras, material biológico em estudo nesta tese, ao promover o efluxo activo de prótons origina um gradiente electroquímico (força protomotriz) (Fig. 7.5 b).

Nesta categoria também se englobam outros processos de transporte que não se ajustam ao conceito clássico de transporte activo, tais como os processos em que o substrato é modificado quimicamente durante o transporte e os processos de translocação de prótons na fotossíntese (na membrana tilacoide dos cloroplastos) (Fig. 7.5 c) e pela bomba de prótons activada pela luz (bactériorrodopsina) de *Halobacterium* (Fig. 7.5 b).

O gradiente electroquímico formado a partir da translocação de prótons pode ser utilizado na realização de diferentes tipos de trabalho: a) no transporte de substratos acoplado ao movimento de iões (Fig. 7.4 e), b) na síntese de ATP acoplada ao influxo de prótons (Fig. 7.5 f) ou c) nos processos de transidrogenação associados a prótons (Fig. 7.5 g).

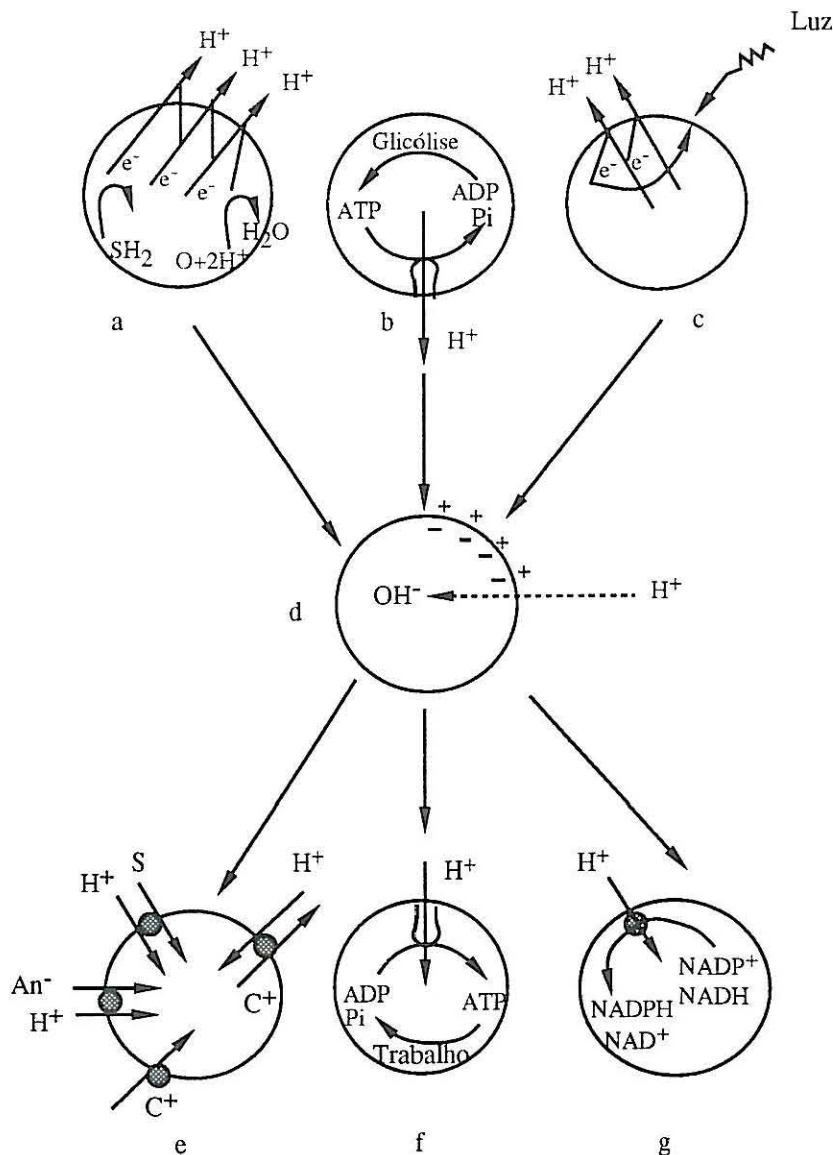


Fig. 7.5 - Produção e utilização de correntes de prótons de acordo com a teoria quimiosmótica. No topo da figura são apresentadas 3 vias de extrusão de prótons a) cadeia respiratória, b) H^+ - ATPase e c) transporte cíclico de electrões na fotossíntese. Estas três vias conduzem à criação de um gradiente electroquímico de prótons que tende a promover a reentrada dos prótons. Na base da figura são apresentados processo de realização de trabalho útil pela utilização da circulação de prótons: e) acoplamento do movimento de prótons a proteínas de transporte, f) síntese de ATP à custa do influxo de prótons e g) processos de transidrogenações associados a prótons (adaptado de: Harold, 1986; Córte-Real, 1990).

Os mecanismos de transporte activo secundário podem ser classificados em:

- Uniporte - o movimento do soluto não é acompanhado pelo movimento de outros iões através do sistema de transporte.
- Simporte - o movimento do soluto é acompanhado pelo movimento do ião.
- Antiporte - o movimento do soluto é acompanhado pelo movimento do ião em sentido contrário.

Os sistemas de transporte activo secundário podem ainda ser classificados, quanto às suas propriedades eléctricas como:

- Electroneutro - quando após o transporte não se verifica transferência líquida de carga através da membrana.
- Eléctrico - quando o transporte envolve uma transferência líquida de carga através da membrana.
 - a) Electrogénico - quando essa transferência cria um novo potencial.
 - b) Electroforético - quando o movimento se faz segundo um potencial pré-existente.

Na tabela 7.1 apresenta-se uma representação esquemática dos principais tipos de mecanismos de transporte, bem como alguns exemplos e respectivas referências.

7.1.3 - Utilização de açúcares e produção de etanol, ácido acético e glicerol em leveduras - Breve revisão

Os açúcares mais abundantes nos produtos alimentares, nomeadamente no mosto de uva são a glucose e a frutose. Algumas leveduras metabolizam preferencialmente a glucose outras, como por exemplo a espécie *Saccharomyces uvarum*, utilizam indiferentemente a glucose e a frutose e, outras ainda, como a espécie *Zygosaccharomyces bailii* fermentam preferencialmente a frutose (Emmerich e Radler, 1983).

O catabolismo das hexoses ocorre via Embden-Meyerhof-Parnas e conforme referido em 6.1.1. conduzindo à formação de 2 moles de ácido pirúvico. Nestas condições, o ácido pirúvico sofre uma descarboxilação seguida de uma redução transformando-se em etanol. Além do etanol, ao longo da fermentação alcoólica conduzida por *Saccharomyces cerevisiae* pode ocorrer produção de pequenas quantidades de glicerol, alcoóis superiores, diacetilo, acetoína, 2,3 - butanodiol, ácido succínico, ácido acético, ácido láctico e acetaldeído (Phaff *et al.*, 1978).

Classificação	Designação	Esquema	Exemplos	Referências
Transporte não mediado	Difusão simples		<p>H_2O através da membrana</p> <p>Ácido láctico não dissociado e outros ácidos monocarboxílicos através da membrana. (<i>C. utilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>)</p> <p>Ácido succínico não dissociado através da membrana (<i>C. sphaerica</i> e <i>H. anomala</i>)</p>	<p>Leão e van Uden, 1986</p> <p>Cassio <i>et al.</i> 1987; 1991; 1993</p> <p>Côrte-Real e Leão, 1990</p>
		Transporte mediado		<p>Glucose através da membrana (<i>S. cerevisiae</i>)</p> <p>Galactose através da membrana (<i>S. cerevisiae</i>)</p>
	Activo			
	Primário		<p>H^+ - ATPase através da membrana (<i>S. cerevisiae</i>)</p>	<p>Malpartida e Serrano, 1981-a, b</p>
	Secundário			
	* Uniporte electroforético		<p>K^+ através da membrana (<i>S. cerevisiae</i>)</p>	<p>Referência em Leão, 1984</p>
	* Simporte electroneutro		<p>H^+/Lactato através da membrana (<i>C. utilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>)</p> <p>H^+/Maltose através da membrana (<i>C. utilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>)</p>	<p>Leão e van Uden, 1986</p> <p>Cássio <i>et al.</i> 1987</p> <p>Serrano, 1977</p> <p>Loureiro Dias e Peinado, 1984</p>
	* Simporte electroforético		<p>H^+/aminoácidos através da membrana (<i>S. cerevisiae</i>)</p>	<p>Eddy e Novacki, 1971</p>
	* Antiporte electroneutro		<p>K^+/H^+ da membrana vacuolar (<i>S. cerevisiae</i>)</p>	<p>Okorokov, 1985</p>
	* Antiporte electroforético		<p>Arginina/ H^+ da membrana vacuolar (<i>S. cerevisiae</i>)</p>	<p>Ohsumi e Anraku, 1981.</p>

Em fermentações vinárias, o ácido acético presente no meio extracelular resulta principalmente da actividade metabólica das bactérias acéticas e lácticas. Em bactérias acéticas a produção deste ácido está relacionada com a oxidação do etanol. No segundo caso, o ácido acético forma-se em condições de anaerobiose a partir da fermentação de pentoses e de ácidos carboxílicos, nomeadamente cítrico, láctico e pirúvico. No entanto, o ácido acético é também produzido pelas leveduras, normalmente em concentrações inferiores a 0,3 g/l, na fase inicial da fermentação alcoólica de sumo de uva. A produção de acetato é variável com as estirpes. Geralmente as maiores produtoras de ácido acético possuem uma alta actividade da acetaldéido desidrogenase (Radler, 1986 e 1993). As espécies *Hansenula anomala* (syn: *Pichia anomala*), *Kloekera apiculata* e *Candida krusei* figuram entre as leveduras produtoras de ácido acético em concentrações significativas. Além disso, em treze estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* a concentração de acetato formada esteve dependente da concentração de açúcares, da fonte de azoto e do pH do meio extracelular. A adição de ácido nicotínico a um meio sintético estimula a produção de ácido acético, tanto a reduzidas como a concentrações elevadas de açúcar. A formação de ácido decresce acentuadamente, após esgotamento do açúcar do meio (Radler, 1993). Por outro lado, a produção é estimulada em meios com valor de pH alcalino, isto provavelmente devido ao facto, do pH óptimo de actividade da acetaldéido desidrogenase estar associado a valores ligeiramente básicos (Larpent, 1991). Em leveduras o acetato pode ser formado a partir do piruvato que é descarboxilado pela acção da descarboxilase do piruvato a acetaldéido que, por sua vez, é oxidado a acetato pela desidrogenase do acetaldéido com a concomitante redução do coenzima NAD (Verduyn, 1991-a e b) Fig. 7.6. Todavia, Rose (1977) sugere que o precursor do acetato é provavelmente o acetil-CoA, intermediário do catabolismo e anabolismo dos ácidos gordos de cadeia longa.

Tal como foi anteriormente referido, o metabolismo do etanol e do ácido acético enquanto fontes de carbono implica a ocorrência da gluconeogénese e do ciclo do glioxilato. O mecanismo bioquímico de utilização do etanol envolve uma primeira oxidação do álcool a acetaldéido pela acção da desidrogenase alcoólica. Numa segunda oxidação a desidrogenase do acetaldéido transforma o acetaldéido em acetato. O acetato é em seguida condensado pela sintetase do acetil-CoA em acetil - CoA que entra no ciclo de Krebs e no ciclo do glioxilato.

O glicerol é o metabolito secundário mais importante na fermentação vinária. A sua produção está particularmente relacionada com a actividade metabólica das leveduras. A sua formação pode ocorrer na fase inicial da fermentação logo a seguir à adição do inóculo (Phaff *et al.*, 1978). A sua formação parece resultar da competição entre as enzimas desidrogenase alcoólica e desidrogenase do glicerol - 3 - fosfato para reoxidarem o coenzima NAD reduzido. O acetaldéido é o aceitador preferencial de electrões. No entanto, quando não existe no meio em quantidade suficiente, a oxidação do coenzima NADH pode ocorrer através da di-

-hidroxiacetonafofato. A formação de glicerol parece depender da concentração de NADH na célula; quando a relação NADH/NAD é elevada verifica-se a produção de glicerol como mecanismo para contrabalançar o excesso de coenzima reduzido. A redução da di-hidroxiacetonafofato conduz à formação de glicerol - 3 - fosfato, que seguidamente pela acção da fosfatase se transforma em glicerol (Phaff *et al.*, 1978; Ribereau - Gayon *et al.*, 1982) (Fig. 7.7). A quantidade de glicerol produzido está dependente da estirpe utilizada. Radler e Schütz (1982) observaram uma variação de 4,2 a 10,4 gr/l no teor de glicerol produzido por diversas estirpes de *S. cerevisiae*. Em condições de aerobiose menor é a quantidade de glicerol formado, na medida em que a reoxidação do coenzima NADH se poderá fazer, através da cadeia de transporte de electrões. Quanto mais elevados forem os valores da temperatura de vinificação, da concentração inicial de açúcar, do teor em dióxido de enxofre utilizado na desinfecção dos mostos, bem como do pH do meio, maior é a concentração final deste metabolito (Radler, 1986). Radler e Schütz (1982), estudaram ainda o efeito de vários aminoácidos e vitaminas na produção de glicerol e verificaram que a ausência de tiamina e a presença de alguns aminoácidos como a alanina, a aspargina, a serina e a valina provocam um decréscimo na sua produção.

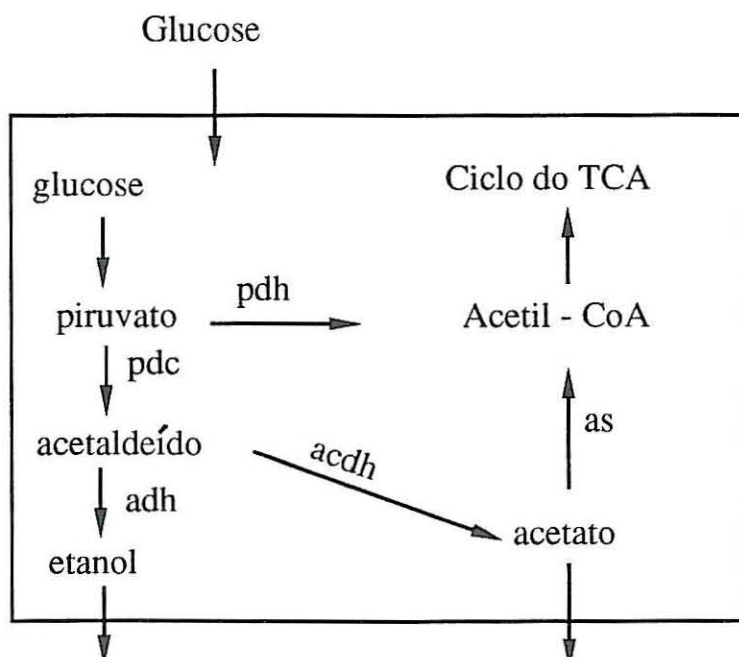


Fig. 7.6 - Vias alternativas do catabolismo do piruvato em leveduras.

pdh: Desidrogenase do piruvato; pdc: Descarboxilase do piruvato ; acdh: Desidrogenase do acetaldeído (NAD ou NADPH⁺ - dependente); adh: Desidrogenase alcoólica; as: Sintetase do acetil CoA; TCA - ciclo do ácido tricarbóxico (adaptado de Verduyn, 1991-a).

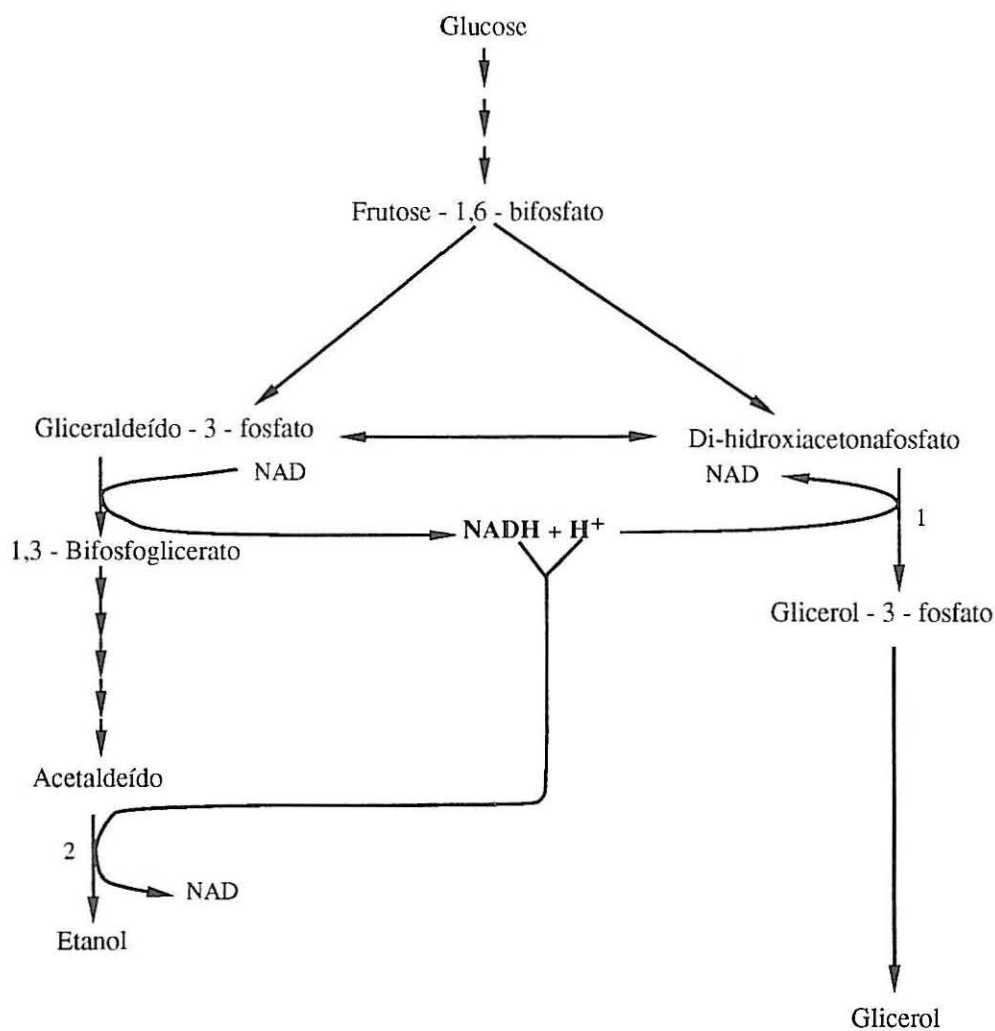


Fig. 7.7 - Produção de glicerol, por competição entre a 1) Desidrogenase do glicerol - 3 fosfato e a 2) Desidrogenase alcoólica, por *S. cerevisiae* durante a fermentação vinária. —> —> indicam a omissão de um ou vários passos intermediários (adaptado de Radler e Shütz, 1982).

7.2. Material e Métodos

7.2.1. Condições experimentais utilizadas nos ensaios de transporte

7.2.1.1 - Microrganismos

Neste estudo utilizou-se a levedura *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307. O processo de inoculação foi o mesmo que descrevemos em 2.3.3. A temperatura de incubação foi de 26°C.

7.2.1.2 - Meios de cultura

- Meio mineral + 2,0% (p/v) glucose, pH 5,0
- Meio mineral + glucose (2,0; 10,0 e 15,0%, p/v), pH 3,0
- Meio mineral + ácido acético (0,2; 0,5; 1,0 e 1,2%, v/v), pH 5,0
- Meio mineral + frutose (2,0 e 7,5%, p/v), pH 3,0
- Meio mineral + etanol 0,5% (p/v), pH 5,0
- Meio mineral + glicerol 0,5% (v/v), pH 5,0

7.2.1.3. - Preparação da suspensão de células

As células foram crescidas num balão de 1 l contendo 500 ml de meio mineral líquido com vitaminas e diferentes fontes de carbono (ver secção 7.2.1.2.) num agitador orbital (marca Gallenkamp) com uma agitação de 125 rpm à temperatura de 26° C.

A cultura foi recolhida a meio da fase exponencial de crescimento (D.O. = 0,5) por centrifugação a 10000 g numa centrífuga Internacional modelo B 20, refrigerada (0-4° C).

As células foram lavadas duas vezes com água desmineralizada a 4° C, nas condições de centrifugação usadas anteriormente e, finalmente, ressuspensas em água desmineralizada fria a uma concentração final de aproximadamente 30 mg peso seco/ml e 70 mg peso seco/ml, respectivamente, para os ensaios do eléctrodo e para os ensaios com isótopos radioactivos (Apêndice II).

Durante as experiências as suspensões de células foram mantidas a temperaturas baixas, num recipiente com gelo.

7.2.1.4. - Experiências de medição da velocidade inicial de movimentos de protões através da membrana plasmática das células da levedura

O método utilizado nestas experiências baseia-se nas alterações observáveis no pH extracelular quando há movimentos de protões através da membrana plasmática das células de algumas leveduras, em solução aquosa.

Deste modo, quando se pretende verificar se o transporte de um dado substrato está associado ao movimento de protões a adição de substrato a uma suspensão de células deverá ser

acompanhada por um sinal de alcalinização. O coeficiente angular na parte inicial da curva, associado a uma calibração que relacione variações de pH com quantidades equivalentes de ácido ou base, adicionadas ao sistema, permite calcular a velocidade inicial de alcalinização do meio extracelular para cada concentração de substrato, isto é, a velocidade inicial de entrada de prótons.

- Protocolo experimental

A técnica de medição da velocidade inicial do movimento de prótons compreende os seguintes passos:

- a) Colocar na câmara termostatzada 4,5 ml de tampão KH_2PO_4 (10 mM) e 0,5 ml da suspensão de células.
- b) Deixar estabilizar, a temperatura da câmara pelo menos durante 3 minutos.
- c) Ajustar o pH experimental ao valor desejado adicionando HCl ou NaOH, para obtenção da linha de base.
- d) Iniciar a reacção, pela adição de um volume de uma solução de ácido ajustado previamente ao valor de pH do ensaio e à concentração desejada.
- e) Registo da alcalinização extracelular e determinação do declive da parte inicial do sinal que permitirá calcular a velocidade inicial aparente de entrada de prótons.

Os resultados obtidos vêm expressos em: nmoles de prótons/s/mg peso seco, conhecido o peso seco de cada uma das amostras, a velocidade de avanço do papel e depois de feita a calibração.

- Controlos experimentais

– Adicionar a mesma quantidade de solução de ácido utilizada em cada um dos ensaios experimentais ajustado ao pH de ensaio, a 5 ml de tampão KH_2PO_4 10 mM também previamente ajustado ao valor de pH de ensaio. Verificar se há alteração do pH extracelular. Neste caso, ajustar o pH da solução do ácido a um valor tal que, a sua adição ao tampão não provoque variações deste último.

– Para cada ensaio experimental foi realizada uma calibração, adicionando 10 μl de HCl ou NaOH 10 mM a 5 ml de tampão KH_2PO_4 .

7.2.1.5 - Experiências de medição da velocidade inicial de transporte de ácido acético radioactivo

Para quantificar a velocidade inicial de transporte de ácido acético, recorreu-se à utilização do respectivo isótopo radioactivo, usando o método que tem como base, o contacto por períodos de tempo variáveis e curtos, de uma suspensão de células da cultura previamente preparada com a solução do composto radioactivo. Ao longo do tempo acompanhar através de leituras em tempos bem definidos e regulares, a variação da quantidade de radioactividade presente no material em estudo, medida em unidades de dpm. Na utilização de isótopos radioactivos trabalhamos com volumes muito pequenos (50 μ l), durante períodos curtos a que se seguiu uma paragem rápida do processo de incorporação por adição de um volume elevado de água fria (cerca de 10 ml). A suspensão de células foi depois filtrada e lavada sobre um filtro incorporado a um sistema de filtração. As células retidas na membrana de filtração, foram então colocadas em frascos de vidro rolhados, contendo o líquido de cintilação Optiphase, "Hisafe" II, LKB (FSA Laboratory Supplies, Loughborough, Leics, Uk), para posterior contagem, em aparelho de leitura, de partículas β , presentes na suspensão de células.

Preparação das soluções radioactivas

No estudo do transporte do ácido acético foi utilizada uma solução de ácido [U - 14 C] acético obtida, por diluição, a partir de uma solução mãe contendo 50 - 60 mCi/mmol, de forma a obter-se uma actividade específica entre 2000 e 3000 dpm/nmol. As soluções a diferentes concentrações, foram preparadas a partir de uma mesma solução de modo a garantir a mesma actividade específica. Estas soluções foram mantidas a 4° C negativos em frascos rolhados.

Protocolo experimental

Adoptou-se a metodologia inicialmente descrita por Serrano (1977) e adaptado posteriormente (ver por ex. Côrte-Real, 1990; Cassio 1994), que envolveu os seguintes passos:

- a) Num tubo de ensaio de fundo cónico com 10 ml de capacidade, incubaram-se 35 μ l de tampão KH_2PO_4 0,1M, a pH 5,0, com 5 μ l da suspensão de células obtidas como descrito em 7.2.1.3, durante cerca de 3 minutos, num banho termostaticado, a 25° C.
- b) Adição de 10 μ l de ácido acético marcado radioactivamente, à concentração desejada, agitando manualmente, durante o período de incubação.
- c) Paragem da reacção para os tempos de incubação 0; 5 e 10 s, adicionando 5 ml de água desmineralizada gelada (4° C).

- d) Filtração da suspensão de células sob vácuo (Litle Grant, Gelman Instruments Company) através de uma membrana Whatman GF/C (Whatman, Inc. Clifton, N. J.) com 2,5 cm de diâmetro e com um poro de 0,45 μm , previamente humedecida.
- e) Lavagem do filtro com as células com 10 ml de água desmineralizada, a 4° C.
- f) Transferência das membranas de filtração com as células para frascos com 5 ml de líquido de cintilação OptiPhase, "HiSafe" II (LK Scintillation Products).
- g) Contagem num contador de cintilações Packard Tri-Cab 2200 CA, programado para leituras de ^{14}C com correcção do "quenching" (Packard Instrument Co., Inc., Rockville, Md.).

Para estudar o transporte do ácido acético na presença de etanol, de ácido acético ou sórbico, retiramos 5 μl da suspensão de células para um tubo de fundo cónico de 10ml, adicionamos 30 μl de tampão tris 100 mM pH 5,0, contendo etanol, ácido acético ou sórbico na concentração desejada e deixamos incubar durante 5 minutos num banho termorregulado à temperatura de ensaio. Nos ensaios com etanol os tubos foram tapados com rolhas de borracha para evitar a evaporação de álcool. Após este período de tempo de incubação, adicionamos 10 μl de uma solução de ácido acético radioactivo, a diferentes concentrações. Após a adição da solução radioactiva procedeu-se de acordo com o descrito nas alíneas c), d), e), f) e g).

Em cada ensaio foi determinada a biomassa de acordo com a metodologia descrita no Anexo II, num volume de amostra de 20 μl . As actividades específicas das soluções de ácido radioactivo às várias concentrações foram calculadas colocando 5 μl de cada solução num frasco com 5 ml de líquido de cintilação, e procedendo a posterior leitura de ^{14}C .

• Controlos experimentais

Como controlo utilizaram-se amostras, para cada concentração de ácido, a que se juntaram 5ml de H_2O fria (4° C), antes de adicionar a solução radioactiva, seguindo-se as operações de lavagem e filtração nas condições previamente descritas. As contagens obtidas desta forma indicam a quantidade de isótopo radioactivo que possa ter ficado retido por adsorção às membranas e à superfície da parede celular. Os valores obtidos foram, geralmente, inferiores a 10% dos obtidos para as respectivas amostras, pelo que as correcções foram desprezadas.

Outro controlo consistiu em verificar se existia linearidade entre o tempo de incubação e a radioactividade incorporada. Na levedura em estudo, nas nossas condições experimentais, observou-se linearidade para os primeiros 10s de incorporação do ácido radioactivo, pelo que, todos os ensaios se realizaram em duplicado, usando 5 a 10s como tempo de incorporação.

Foi ainda testada a proporcionalidade entre a concentração de biomassa e a radioactividade incorporada.

Os resultados obtidos, depois de feita a conversão, em cada contagem, entre dpm e nmoles de ácido, através da actividade específica da solução usada, foram expressos em unidades de velocidade de transporte: n moles /s/mg peso seco.

7.2.1.6 - Controlo de "quenching"

Este controlo destinou-se a verificar se a presença do filtro e/ou soluções de células no líquido de cintilação poderiam produzir "quenching" (absorção da radiação emitida, ou turvação) de forma que as leituras registadas não correspondem às emissões reais. Como controlo usaram-se frascos com líquido de cintilação contendo:

- a) Membrana filtrante
- b) Membrana filtrante e volume experimental da suspensão de células
- c) Membrana filtrante, volume experimental da suspensão de células e volume experimental da solução radioactiva.

Em todas as leituras efectuadas, verificou-se que a contagem era insignificante e idêntica na presença da membrana e/ou células, pelo que não foi feita qualquer correcção nas medições das amostras de nenhum ensaio experimental.

7.2.1.7 - Determinação dos parâmetros cinéticos de transporte

Os parâmetros cinéticos V_{max} e K_m , foram estimados a partir das respectivas representações de Lineweaver - Burk das velocidades iniciais de transporte do ácido em estudo.

7.2.2 - Condições experimentais utilizadas nos ensaios de crescimento em meios com diferentes fontes de carbono

7.2.2.1 - Microrganismos

O microrganismo utilizado foi a estirpe *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307.

7.2.2.2 - Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados, foram os a seguir indicados:

- Meio mineral + glucose (0,2; 2,0; 10,0; 20,0 e 30,0%,p/v), pH 5,0
- Meio mineral + glucose (20,0 e 30,0%, p/v), pH 3,0
- Meio mineral + frutose 1,0 e 20,0% (p/v), pH 5,0
- Meio mineral + frutose 20,0% (p/v), pH 3,0
- Meio mineral + etanol 0,5% (p/v) + ac. acético 0,2% (v/v)+ glucose 0,2% (p/v), pH 4,5
- Meio mineral + ac. acético 0,3% (v/v) + glucose 1% (p/v), pH 3,5
- Meio mineral + ac. acético 0,5% (v/v) + glucose 0,2% (p/v), pH 4,5
- Meio mineral + ac. acético 0,05% (v/v) + glucose 0,5% (p/v), pH 4,5
- Meio mineral + ac. acético 0,1% (v/v) + glucose 0,5% (p/v), pH 4,5
- Meio mineral + ac. acético 0,5% (v/v) + glucose 0,5% (p/v), pH 4,5
- Meio mineral + etanol 0,5% (p/v) + glucose 0,2% (p/v), pH 4,5
- Meio mineral + ac. acético 0,3% (v/v) + frutose 1% (p/v), pH 3,5

7.2.2.3 - *Quantificação do crescimento celular e doseamento de glucose, etanol, ácido acético e glicerol no meio de cultura*

O crescimento no meios referidos na secção 7.2.2.2., foi acompanhado por leituras de D.O. a 640 nm.

A utilização da glucose foi avaliada pelos respectivos doseamentos no meio extracelular de acordo com os métodos analíticos no Apêndice III. O etanol, o ácido acético e glicerol foram analisados por HPLC. Para tal, em intervalos de tempo regulares, durante as várias fases de crescimento exponencial, as células foram removidas por centrifugação durante um minuto a 8000 g, numa centrífuga de bancada Eppendorf e os respectivos sobrenadantes foram congelados para doseamentos posteriores da glucose, etanol, glicerol e ácido acético.

7.2.2.4 - Preparação da amostra para injeção no HPLC

Após descongelação a amostra foi filtrada através de uma membrana Shodex DT de 0,45 µm. Em seguida, foi injectado na coluna, um volume de 25µl de amostra.

7.2.2.5 - Condições de trabalho com o HPLC

As condições de trabalho foram essencialmente as seguintes:

Cromatografo Waters Millipore

Bomba Waters 501

Registador Waters 746

Refractómetro Waters R 401

Coluna Slodex Sugar SP 1010 Water Millipore

Pre-coluna IC Pack Water Millipore

Temperatura da coluna - 60° C

Fluxo: 1,0 ml min⁻¹

Solvente - H₂ SO₄ 0,01N

Atenuação - 8 X

Velocidade do papel - 1 mm min⁻¹

Volume da amostra injectado - 25 µl

Após injeção a seringa foi lavada com metanol a 50% (v/v)

7.2.2.6 - Identificação dos componentes na análise por HPLC

A identificação foi efectuada por comparação dos tempos de retenção dos componentes. Em casos de dúvida, procedeu-se à adição de uma certa quantidade do composto em causa, na tentativa de observar um aumento na área e na altura do pico inicial.

7.2.2.7 - Análise quantitativa

A análise quantitativa foi efectuada com base na área dos picos de cada um dos componentes.

7.3 - Resultados

7.3.1 - Transporte do ácido acético e de outros ácidos monocarboxílicos na levedura *Zygosaccharomyces bailii* crescida num meio com 2% de glucose. Efeitos do etanol

7.3.1.1 - Transporte de ácido acético, na ausência de etanol

A ocorrência de alcalinização associada à entrada de ácido acético foi testada em células de *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307 provenientes de culturas em meio com glucose, 2%(p/v), pH 5,0. Conforme se mostra na figura 7.8 a adição de ácido acético a uma suspensão de células levemente tamponada foi acompanhada por uma alcalinização resultante do desaparecimento de protões do meio extracelular. A figura 7.8 ilustra essas variações de pH após adição de ácido acético numa gama de concentrações finais que variaram entre 0,075 e 1,0 mM. A partir do declive da parte inicial destas curvas de alcalinização calcularam-se as velocidades iniciais de desaparecimento de protões do meio extracelular expressas em nmoles H^+ /s/mg de peso seco (v), para cada uma das concentrações de ácido estudadas. Estas velocidades de entrada de H^+ , variaram com a concentração de ácido acético segundo uma cinética de saturação do tipo Michaelis-Menten, Fig. 7.9 (A). De facto, o gráfico de Lineweaver-Burk ($1/V$) em função de $1/[\text{Ácido acético}]$ foi linear na gama de concentração experimental, Fig. 7.9 (A₁). Os valores dos parâmetros cinéticos do sistema de transporte do ácido acético K_m (constante de Michaelis-Menten) e V_{max} (velocidade inicial máxima), estimados pela extrapolação deste gráfico de Lineweaver-Burk foram: $K_m = 0,87$ mM ácido total e $V_{max} = 0,58$ nmoles ácido total/s/mg peso seco.

A velocidade de entrada de ácido acético através da membrana plasmática foi igualmente determinada pela utilização do ácido acético radioactivo. Para as concentrações testadas a variação da quantidade de radioactividade incorporada nas células no intervalo de tempo 0 - 10 s, foi linear. Os valores das velocidades iniciais de entrada de ácido acético radioactivo (expressas em nmoles ácido acético total/s/mg peso seco), foram representadas em função da concentração de ácido acético na figura 7.10 (A). A representação de Lineweaver-Burk, isto é, os inversos das velocidades iniciais de transporte em função do inverso das concentrações de ácido acético radioactivo foi linear, indicando que, nas condições referidas, o mecanismo de entrada do ácido acético obedeceu a uma cinética de saturação do tipo Michaelis-Menten e que a entrada do ácido acético ocorreu por um mecanismo de transporte mediado, provavelmente do tipo simporte com protões.

A partir da extrapolação do gráfico de Lineweaver-Burk foram obtidos os seguintes valores para os parâmetros cinéticos do sistema: $K_m = 1,10$ mM ácido acético total e

$V_{max} = 0,53$ nmoles ácido acético total/s/mg peso seco. Estes valores são idênticos aos estimados a partir da cinética de movimentos de prótons associados à entrada de ácido acético.

No sentido de reforçar a hipótese segundo a qual a entrada do acetato em *Z. bailii* é mediada por um sistema de transporte, foram efectuados estudos sobre o efeito do ácido acético frio na velocidade inicial de entrada do isótopo radioactivo.

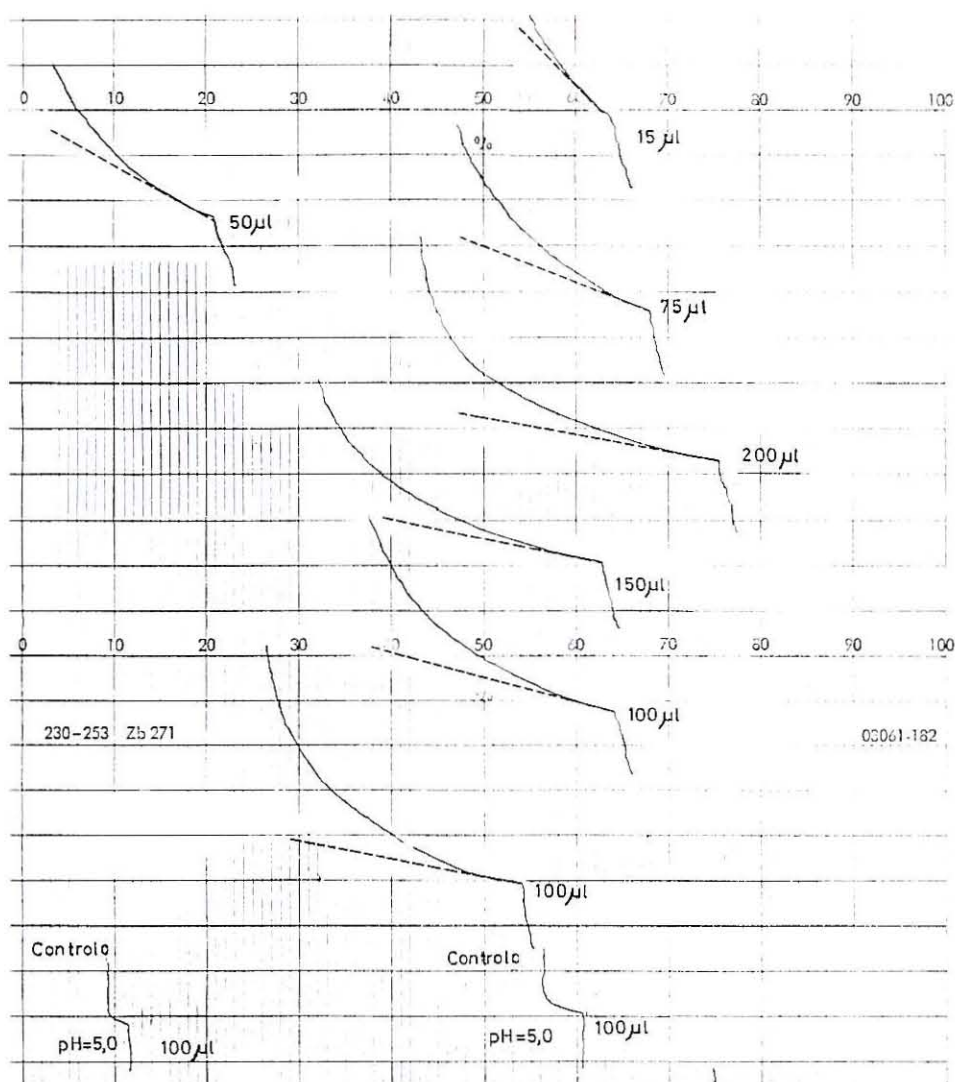


Fig. 7.8 - Registos da alcalinização extracelular correspondente à entrada do ácido acético em *Z. bailii* ISA 1307. A curva de alcalinização foi iniciada pela adição dos volumes (μ l) de ácido acético, 25 mM indicados na figura a suspensões de células provenientes de uma cultura em meio mineral e glucose (2%, p/v), a pH 5,0. Os declives das tangentes à parte inicial do sinal permitiram calcular as velocidades iniciais de movimento de prótons associadas à entrada do ácido.

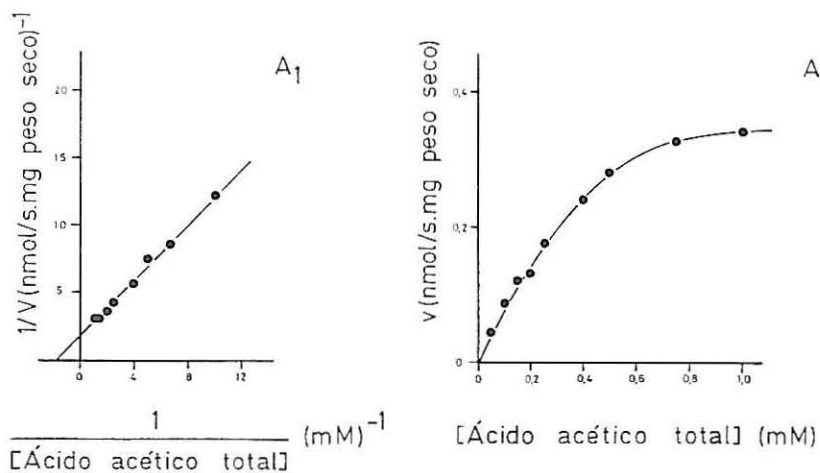


Fig. 7.9 - Cinética de entrada do ácido acético em células de *Z. bailii* ISA 1307, a pH 5.0, medida pela velocidade inicial de movimento de prótons associada à entrada de ácido acético em função da concentração de ácido acético: A, representação directa das velocidades iniciais de entrada em função da concentração de ácido acético. A₁, representação de Lineweaver - Burk dos dados representados em A.

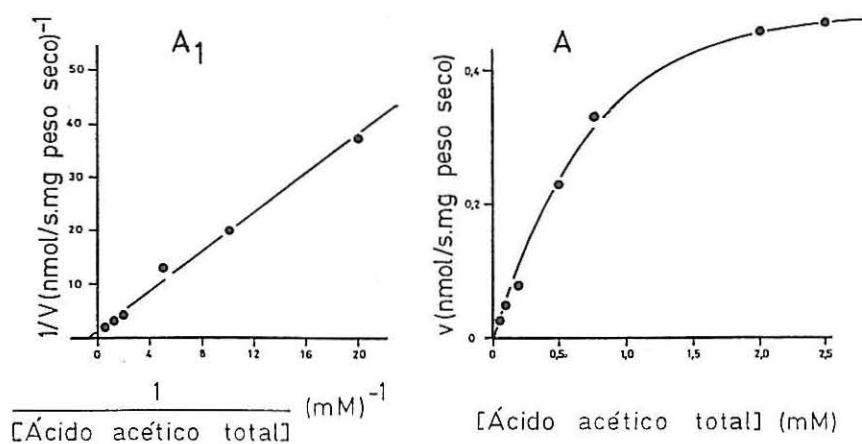


Fig. 7.10 - Cinética de entrada do ácido acético em células de *Z. bailii* ISA 1307, a pH 5.0, medida pela velocidade inicial de transporte do ácido acético radioactivo, em função da concentração de ácido acético: A, representação directa das velocidades iniciais de entrada em função da concentração de ácido acético. A₁, representação de Lineweaver - Burk dos dados representados em A.

Os valores experimentais obtidos para o inverso das velocidades iniciais $1/V$ foram representados em gráficos em função do inverso da concentração de ácido acético na figura 7.11. A figura mostra que para cada uma das concentrações de ácido acético frio (3 e 6 mM) testada a representação de Lineweaver-Burk, foi linear.

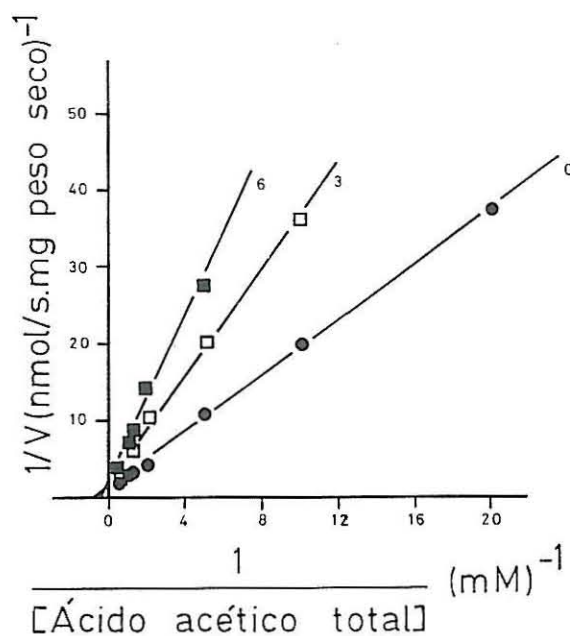


Fig. 7.11 - Representações de Lineweaver - Burk das velocidades iniciais de transporte, pH 5,0, do ácido acético radioactivo em células de *Z. bailii* ISA 1307, em função da concentração de ácido acético. (●), na ausência de ácido acético frio (□); na presença de ácido acético frio 3mM; (■) na presença de ácido acético frio 6 mM.

Os valores de K_m e V_{max} do sistema, correspondentes a cada concentração de ácido acético frio ensaiada, estão sumariados na tabela 7.2.

Tabela. 7.2

Parâmetros cinéticos do sistema de transporte do ácido acético na presença de ácido acético frio (3 e 6 mM) em *Z. bailii* ISA 1307, a 26° C, a pH 5,0.

Ácido acético frio (mM)	V_{max} * (nmoles ácido total/s/mg peso seco)	K_m * (mM ácido total)
0	0,53	1,10
3	0,65	2,10
6	0,59	2,60

* Os valores apresentados representam a média de experiências em triplicado.

A análise da tabela 7.2 indica que os valores experimentais obtidos para V_{max} , na ausência e na presença de ácido acético frio foram semelhantes. Por sua vez, a afinidade do sistema de transporte para o ácido, expressa pela constante de Michaelis-Menten aumentou à medida que aumentou a concentração de ácido no meio extracelular (Fig. 7.12). Trata-se de uma inibição do tipo competitivo. O valor obtido para o k_i (constante de inibição) a partir dos dados da figura 7.12 foi de 3,6 mM.

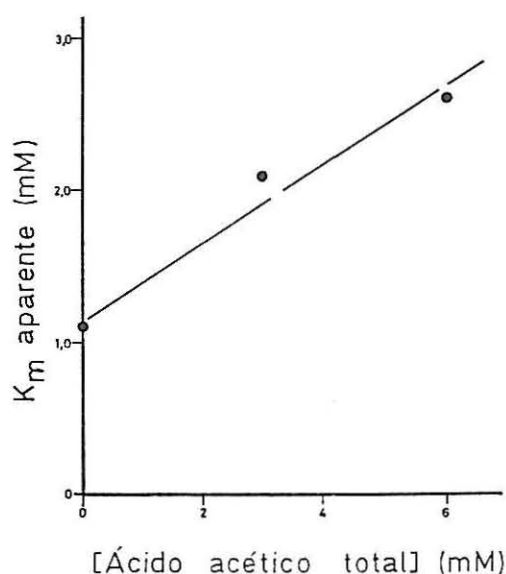


Fig. 7.12 - Variação da constante de Michaelis - Menten aparente, em função da concentração de ácido acético.

Nestas condições, observamos também que outros ácidos monocarboxílicos nomeadamente os ácidos pentanóico, sórbico e benzóico, induziam alcalinização extracelular quando adicionados à suspensão de células fracamente tamponada (pH 5,0). Os valores das velocidades iniciais de movimento de prótons associadas à entrada dos ácidos pentanóico, sórbico e benzóico, estimados pelo declive da parte inicial do sinal de alcalinização, foram representados em gráfico em função da concentração de ácido na figura 7.13. (A, B e C), tendo-se observado uma cinética de saturação. Nesta figura os resultados estão também sob a forma de gráficos de Lineweaver-Burk. As figuras mostram que a relação $1/V$ em função do inverso da concentração de ácido foi linear. Os valores estimados para V_{max} e K_m a partir da extrapolação dos gráficos de Lineweaver-Burk na figura 7.13 (A_1 , B_1 e C_1) estão sumariados na tabela 7.3.

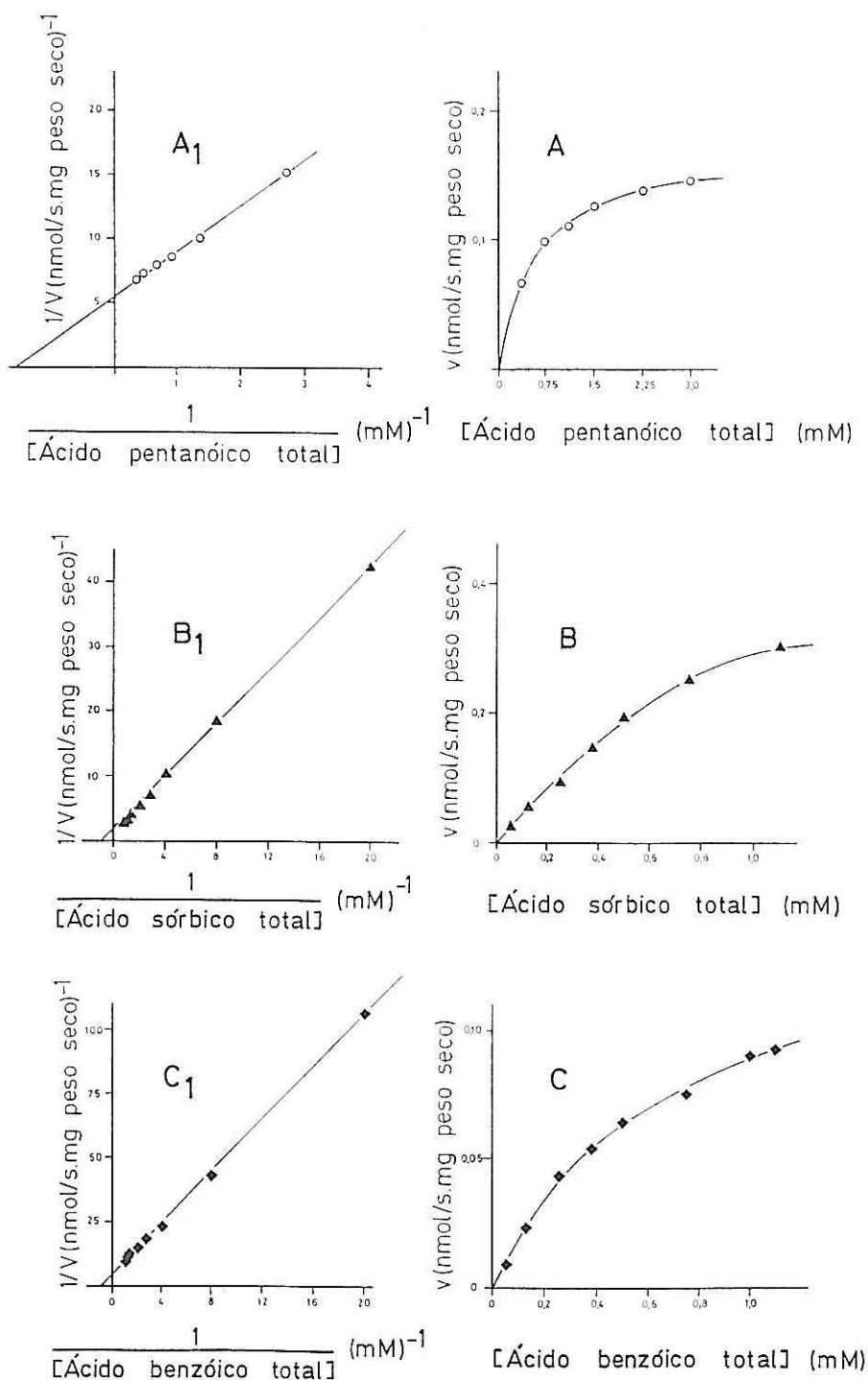


Fig. 7.13 - Cinéticas de entrada de ácidos monocarboxílicos em células de *Z. bailii* ISA 1307 crescidas em meio mineral com 2% (p/v) de glucose, a pH 5,0, medidas pelas velocidades iniciais de movimento de prótons associadas à entrada de ácidos, em função da concentração de ácido: A, B e C, representações directas das velocidades iniciais em função da concentração de ácido pentanóico, sórbico e benzóico, respectivamente A₁, B₁ e C₁, representações de Lineweaver - Burk dos dados apresentados em A, B e C.

Tabela 7.3

Parâmetros cinéticos do sistema de transporte dos ácidos monocarboxílicos em células de *Z. bailii* ISA 1307 crescidas num meio com glucose (2%, p/v) a 26° C, a pH 5,0, estimados pelas velocidades de desaparecimento de protões associadas à entrada dos ácidos.

Ácido/H ⁺	V _{max} * (nmoles ácido total/s/mg peso seco)	K _m * (mM ácido total)
Acético	0,58	0,87
Pentanóico	0,28	0,65
Sórbico	0,50	0,99
Benzóico	0,22	0,82

* Os valores apresentados representam a média de experiências em triplicado.

Adicionalmente, nestas condições, fomos testar o efeito dos ácidos sórbico e benzóico nas velocidades iniciais de entrada do ácido acético radioactivo. Os resultados obtidos mostram que estes ácidos inibiram o transporte do ácido acético radioactivo, a pH 5,0, sendo no entanto o tipo de inibição não claramente competitiva. A figura 7.14 exemplifica os resultados obtidos para o ácido sórbico. Deste modo, os resultados parecem indicar que estes ácidos não são reconhecidos pelo simporte H⁺ - acetato, e que por hipótese poderão ser transportados por outros sistemas de simporte com protões. Estudos complementares serão necessários para elucidar tal hipótese. Por outro lado, os ácidos pirúvico, butírico, fórmico, propiónico, málico, láctico, succínico e cítrico não induziram desaparecimento de protões quando adicionados a uma suspensão de células crescidas num meio com 2% (p/v) de glucose a pH 5,0.

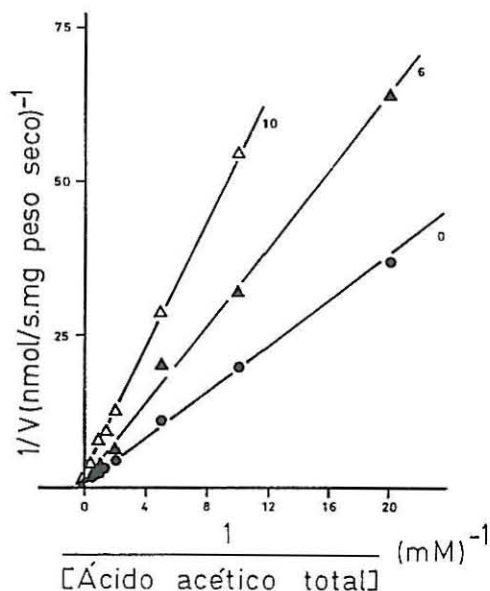


Fig. 7.14 - Representações de Lineweaver - Burk das velocidades iniciais de transporte, pH 5,0, do ácido acético radioactivo em células de *Z. bailii* ISA 1307 em função da concentração de ácido acético (●), na ausência de ácidos monocarboxílicos; (▲) na presença de ácido sórbico 6 mM; (△) na presença de ácido sórbico 10 mM.

7.3.1.2 - Efeitos do etanol no transporte do ácido acético

Nesta secção, com o objectivo fundamental de estudar os possíveis efeitos do etanol na entrada de ácido acético na levedura *Zygosaccharomyces bailii*, foram realizadas experiências de entrada de ácido [U - ¹⁴C] acético na presença de etanol a diferentes concentrações. Para tal, foram utilizadas suspensões de células provenientes de uma cultura crescida em meio mineral com glucose a pH 5,0. Os ensaios foram efectuados a 26° C e a pH 5,0. Do mesmo modo que se observou na secção 7.3.1.1., para a entrada do ácido acético na ausência de álcool, a incorporação da radioactividade na presença de etanol, variou linearmente com o tempo, no intervalo 0 - 10 s.

A partir do declive de cada uma das rectas respeitantes à incorporação de radioactividade, às diferentes concentrações de ácido acético na ausência e na presença de três concentrações de etanol, foram estimadas as velocidades iniciais de entrada. Os valores obtidos, foram representados em função da concentração extracelular de ácido acético, na figura 7.15 (A). Tal como observamos na ausência de álcool, os gráficos dos inversos das velocidades iniciais de entrada do ácido acético radioactivo, em função do inverso de concentração de ácido, foram lineares, indicando que o mecanismo de entrada obedeceu a uma cinética de saturação do tipo Michaelis - Menten Fig 7.15 (A₁).

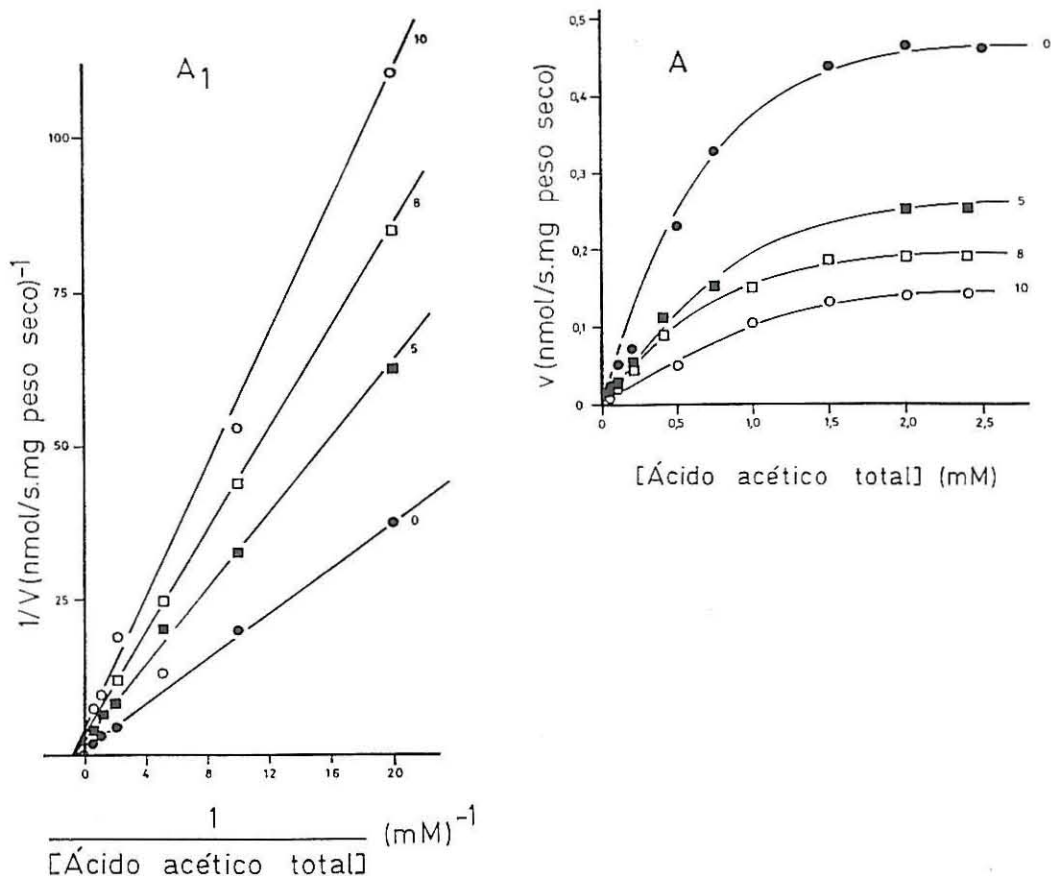


Fig. 7.15 - Representações, directa e de Lineweaver - Burk, das velocidades iniciais da entrada de ácido acético radioactivo em *Z. bailii* ISA 1307, na ausência e na presença de etanol. Os números indicam as concentrações de etanol (% (p/v))

Os parâmetros cinéticos do sistema de transporte (V_{max} e K_m), para cada uma das diferentes concentrações de etanol ensaiadas, foram calculados a partir dos respectivos gráficos das velocidades iniciais de ácido [U - ^{14}C] acético, tendo-se obtido os valores sumariados na tabela 7.4.

Os resultados na tabela 7.4 mostram que o etanol inibiu significativamente a capacidade do transporte do acetato, expressa pela velocidade inicial máxima de entrada (V_{max}) acentuando-se o efeito inibitório com o aumento da concentração de etanol no meio extracelular. Contudo, a presença de etanol pareceu não afectar a afinidade do sistema de transporte para o ácido acético, indicando a ocorrência de uma inibição do tipo não competitivo (Dixon e Webb, 1958).

Os valores relativos de V_{max} , obtidos na ausência e na presença de etanol, foram representados em gráfico semilogarítmico em função da concentração de etanol no meio extracelular na figura 7.16.

Tabela 7.4

Parâmetros cinéticos do sistema de transporte do ácido acético na presença de etanol em *Z. bailii* ISA 1307, a 26° C, a pH 5,0.

Etanol (M)	V_{\max} (nmoles ácido total/s/mg peso seco)	K_m (mM ácido total)
0,00	0,53	0,95
1,08	0,39	1,20
1,70	0,31	1,30
2,60	0,20	1,06

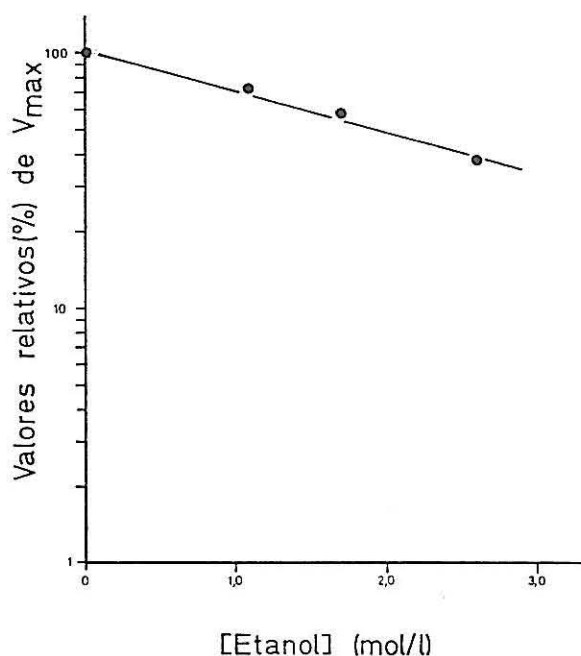


Fig. 7.16 - Gráfico semilogarítmico das velocidades iniciais máximas relativas (%) da entrada de ácido acético em *Z. bailii* ISA 1307, em função da concentração de etanol.

Os resultados apresentados nesta figura e de modo análogo ao que foi observado para o efeito do etanol no transporte da glucose, aminoácidos e do amônio em *Saccharomyces cerevisiae* por Leão (1983-a e b, 1985) indicam que a presença de etanol no meio de cultura inibiu exponencialmente a V_{\max} do transporte do ácido acético, sendo a cinética subjacente os efeitos inibidores, expressa pela seguinte equação:

$$\ln V_{\max}^X = \ln V_{\max}^0 - k (x - x_m) \quad (7.9)$$

onde V_{\max}^0 e V_{\max}^x , representam as velocidades máximas de transporte obtidas respectivamente, na ausência e na presença de etanol à concentração x ; k é a constante exponencial de inibição, característica para o etanol e x_m a concentração mínima de inibição do alanol.

A partir do declive da recta experimental obtida para a variação da V_{\max} em função da concentração de etanol, e de acordo com a equação 7.9, foi estimado o valor da constante exponencial de inibição, k para o etanol. O valor obtido foi 0,37 l/mol. Como se pode observar na figura 7.16 o valor da concentração de etanol necessária para produzir uma inibição de 50% de V_{\max} ($= \frac{\ln 2}{k}$) foi 1,87 mol/l.

7.3.2 - Rastreo de movimento de protões associados à entrada de ácidos fracos em *Zygosaccharomyces bailii* crescida em meios com diferentes fontes de carbono

7.3.2.1 - Células crescidas com glucose ou com frutose

Utilizando a metodologia descrita anteriormente procedeu-se à pesquisa de movimento de protões associado à entrada de ácidos fracos em células crescidas em meio com 2,0% de glucose e a pH 3,0. Nestas condições de crescimento observaram-se sinais de alcalinização após adição de ácidos (acético, sórbico e benzóico) a suspensões de células levemente tamponadas a pH 5,0. Para cada um dos ácidos e numa gama experimental de concentrações idêntica à utilizada na secção anterior, as velocidades iniciais de desaparecimento de protões estimadas pela tangente à parte inicial da curva de alcalinização, obedeceram a cinéticas de saturação. A partir destes gráficos que se encontram sumariados em Apêndice VII.1 (A, B e C) e VII.1 (A₁ B₁ e C₁) obtiveram-se valores para os parâmetros cinéticos, K_m e V_{\max} , que se apresentam na tabela 7.5.

Do mesmo modo, procedeu-se à pesquisa de movimento de protões associado à entrada de ácidos em células provenientes de culturas em meio com glucose (10,0 e 15,0%) ou com frutose (2,0 e 7,5%) como fonte de carbono e de energia e a pH 3,0. Os resultados sumariados em Apêndice VII.2, VII.3 e VII.4 foram em tudo análogos aos acima descritos para células crescidas na presença de 2,0% de glucose. Em todos os casos e para cada um dos ácidos testado observaram-se cinéticas de saturação para a variação das respectivas velocidades iniciais de desaparecimento de protões com a concentração de ácido, a partir das quais se estimaram os valores de K_m e V_{\max} que se encontram nas tabelas 7.5 e 7.6.

Tabela 7.5.

Parâmetros cinéticos do sistema de transporte dos ácidos monocarboxílicos em células de *Z. bailii* ISA 1307 crescidas num meio com glucose, a 26° C, a pH 3,0, estimados pelas velocidades de desaparecimento de prótons associadas à entrada dos ácidos.

Glucose (%, p/v)	Ácido	V _{max} * (nmoles ácido total/s/mg p. seco)	K _m * (mM ácido total)
2,0	Acético	0,21	0,64
	Sórbico	0,22	0,64
	Benzóico	0,18	0,56
10,0	Acético	0,28	0,81
15,0	Acético	0,15	1,10

*Os valores apresentados representam a média de experiências em triplicado.

Tabela 7.6.

Parâmetros cinéticos do sistema de transporte dos ácidos monocarboxílicos em células de *Z. bailii* ISA 1307, crescidas num meio com frutose, a 26° C, a pH 3,0, estimados pelas velocidades de desaparecimento de prótons associadas à entrada dos ácidos.

Frutose (%, p/v)	Ácido	V _{max} * (nmoles ácido total/s/mg p. seco)	K _m * (mM ácido total)
2,0	Acético	0,18	0,62
	Pentanóico	0,33	0,68
	Sórbico	0,40	0,61
	Benzóico	0,16	0,67
7,5	Acético	0,11	0,95

* Os valores apresentados representam a média de experiências em triplicado.

7.3.2.2 - Células crescidas com ácido acético

A adição dos ácidos acético, propiônico, fórmico, butírico, pentanóico, sórbico e benzóico a uma suspensão de células crescidas num meio com 0,5% (v/v) de ácido acético como única fonte de carbono e energia foi acompanhada pela observação de sinais de alcalinização. A velocidade de movimento de H^+ calculada pelo declive da parte inicial das curvas de alcalinização, variou com a concentração de ácido segundo uma cinética de Michaelis-Menten Fig. 7.17 (A, B, C, D, E, F e G). A partir da extrapolação de $1/V$ em função da concentração $1/[ácido]$ calcularam-se para cada um dos ácidos ensaiados os valores dos parâmetros K_m e V_{max} dos sistemas do transporte Fig 7.17 ($A_1, B_1, C_1, D_1, E_1, F_1$ e G_1). Os valores obtidos estão resumidos na tabela 7.7.

Tabela 7.7

Parâmetros cinéticos do sistema de transporte dos ácidos monocarboxílicos em células de *Z. bailii* ISA 1307, crescidas num meio com ácido acético, a 26° C, a pH 5,0, estimados pelas velocidades de desaparecimento de prótons associadas à entrada dos ácidos.

Ácido acético (%, p/v)	Ácido	V_{max}^* (nmoles ácido total/s/mg p. seco)	K_m^* (mM ácido total)
0,2	Acético	1,10	0,25
	Acético	1,25	0,18
0,5	Propiônico	1,33	0,95
	Fórmico	1,96	1,50
	Butírico	0,35	0,90
	Pentanóico	0,38	0,80
	Sórbico	0,10	0,62
	Benzóico	0,70	1,19
1,0	Acético	1,45	0,25
1,2	Acético	1,80	1,13

* Os valores apresentados representam a média de experiências em triplicado.

A adição dos ácidos pirúvico, láctico, málico, succínico e cítrico, a uma suspensão de células provenientes de uma cultura em meio com ácido acético não foi acompanhada pela observação de sinais de alcalinização devida ao desaparecimento de prótons do meio de cultura.

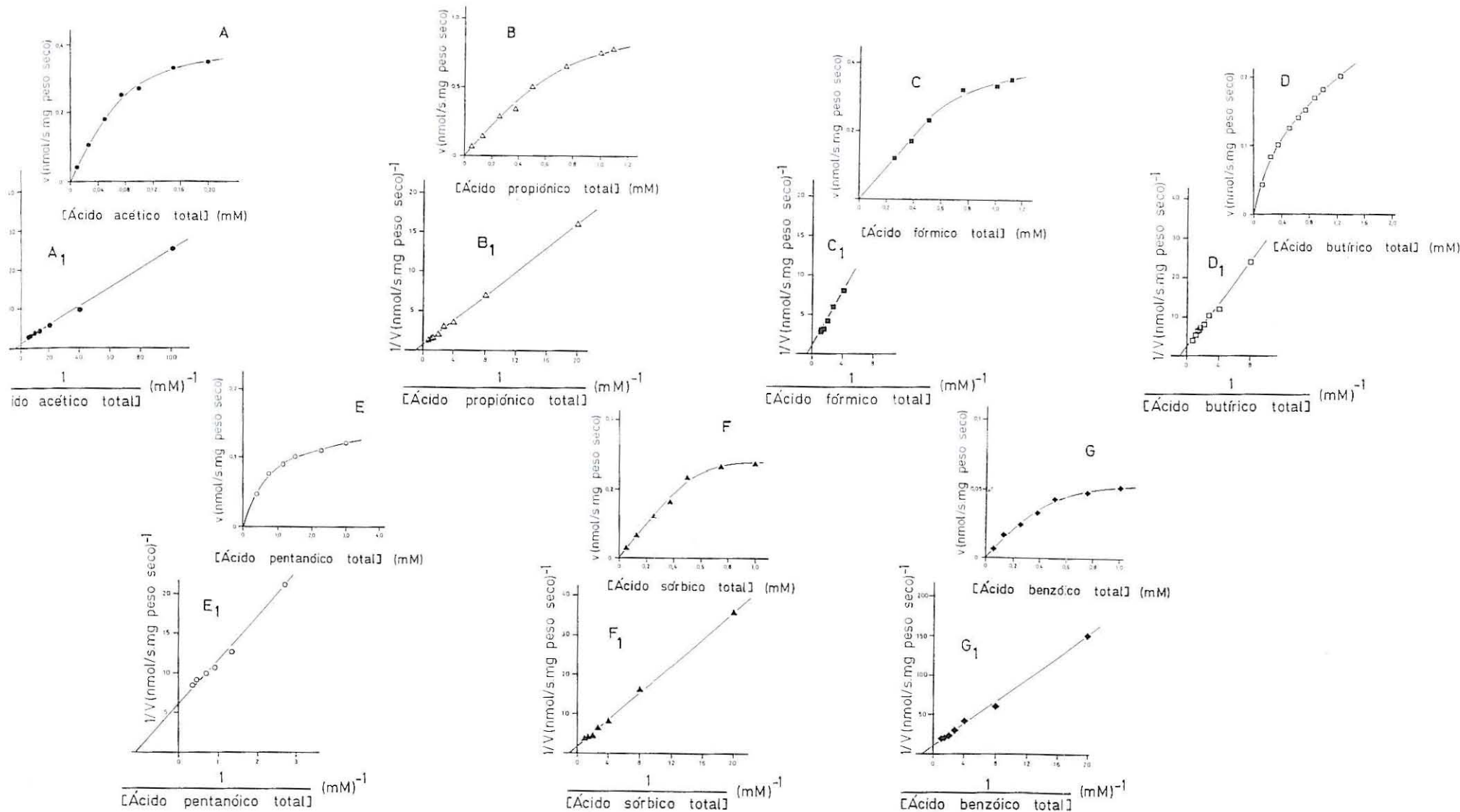


Fig. 7.17 - Cinéticas de entrada de ácidos monocarboxílicos em células de *Z. bailii* ISA 1307 crescidas em meio mineral com 0,5% (v/v) de ácido acético, a pH 5,0, medidas pelas velocidades iniciais de movimento de prótons associadas à entrada dos ácidos: A, B, C, D, E, F, e G, representações directas das velocidades iniciais de entrada em função da concentração de ácido acético, propiónico, fórmico, butírico, pentanóico, sórbico e benzóico, respectivamente. A₁, B₁, C₁, D₁, E₁, F₁ e G₁, representações de Lineweaver - Burk dos dados representados em A, B, C, D, E, F e G.

Adicionalmente nesta secção foi testada a observação de movimento de protões associado à entrada do ácido acético em suspensões de células crescidas num meio com 0,2, 1,0 e 1,2% (v/v) de ácido acético, a pH 5,0.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos estimados para células crescidas em meio com 0,5% (v/v) de ácido acético, como se observa no Apêndice VII.5. Os parâmetros cinéticos do sistema foram calculados a partir das respectivas representações de Lineweaver-Burk no Anexo VII.5. Os resultados obtidos estão sumariados na tabela 7.7.

A análise destes resultados indica, que os valores de K_m não foram significativamente afectados pela concentração de ácido acético no meio de crescimento. No entanto a capacidade de transporte do ácido acético parece aumentar à medida que aumentamos a concentração extracelular de acetato no meio de crescimento. Esta conclusão é sugerida pela observação das representações directas do movimento de protões associado à entrada do ácido acético, em função da concentração de ácido acético para concentrações crescentes de ácido acético no meio de cultura. Para confirmar esta suposição seria necessário utilizar concentrações de ácido extracelular mais elevadas dado que conforme se pode observar, à medida que aumenta a concentração de ácido no meio de crescimento, torna-se mais difícil visualizar a saturação.

7.3.2.3 - Células crescidas com outras fontes de carbono

Adicionalmente foi testada a ocorrência de movimento de protões associado à entrada de ácidos monocarboxílicos em suspensões de células crescidas num meio com etanol (0,5%, p/v), glicerol (0,5%, v/v) e ácido pirúvico (0,5%, v/v), a pH 5,0.

Os valores estimados para as velocidades iniciais de movimento de protões associado à entrada dos ácidos acético (A), propiónico (B), fórmico (C), butírico (D), pentanóico (E), sórbico (F) e benzóico (G) obtidos nas células crescidas em meio com etanol, com glicerol e com ácido pirúvico foram representados em gráfico em função da concentração de ácido nos Apêndices VII.6, VII.7 e VII.8, respectivamente. Nos mesmos Apêndices em gráficos de Lineweaver-Burk resumimos também os resultados obtidos. Os valores dos parâmetros cinéticos do sistema de transporte de cada um dos ácidos monocarboxílicos, nas várias condições de crescimento estudadas estão sumariados na tabela 7.8.

Por outro lado, os ácidos pirúvico, láctico, succínico, cítrico e málico, quando adicionados a suspensões de células crescidas num meio com etanol, ácido pirúvico e glicerol não induziram alcalinização extracelular.

Tabela 7.8

Parâmetros cinéticos do transporte dos ácidos monocarboxílicos estimados pelas velocidades iniciais do movimento de prótons associadas à sua entrada em células de *Z. bailii* ISA 1307, crescidas em etanol 0,5% (p/v), glicerol 0,5% (v/v) e ácido pirúvico 0,5% (v/v), a 26° C, a pH 5,0.

Ácido	Fontes de carbono					
	Etanol	Glicerol	Ácido pirúvico	Etanol	Glicerol	Ácido pirúvico
	V_{\max}			K_m^*		
	(nmoles ácido total/s/mg/p.seco)			(mM ácido total)		
Acético	3,00	4,40	4,00	0,41	0,30	0,56
Propiónico	0,46	1,83	0,27	0,98	0,66	0,63
Fórmico	0,90	1,84	0,60	0,74	0,86	0,60
Butírico	0,42	0,17	1,10	1,40	0,79	1,17
Pentanóico	0,27	0,12	0,47	1,30	1,54	0,90
Sórbico	0,18	0,99	0,57	0,81	0,86	1,46
Benzóico	0,17	0,26	0,11	0,81	0,71	0,93

* Os valores apresentados representam a média de experiências em triplicado.

7.3.3 - Crescimento de *Zygosaccharomyces bailii* em substratos simples e mistos: quantificação de açúcares, ácidos fracos, etanol e glicerol no meio

7.3.3.1 - Celulas crescidas num meio com ácido acético

No seguimento dos objectivos do presente trabalho foram efectuados ensaios preliminares sobre a utilização de ácidos fracos na levedura em estudo. Observou-se que esta estirpe era capaz de utilizar ácido acético como única fonte de carbono e de energia. Por sua vez, os ácidos láctico, propiónico, fórmico, butírico, pentanóico e sórbico não foram utilizados pela levedura quando adicionados ao meio de cultura como única fonte de carbono e energia. No seguimento destes resultados procedeu-se à realização de experiências de crescimento em meios com várias concentrações de ácido acético, à temperatura de 25° C e pH 3,0 e 4,5. Na figura 7.18 (A e B) apresentam-se gráficos representativos da variação da densidade óptica com o tempo nas várias condições referidas (meio suplementado com ácido a diferentes concentrações, a pH 3,0 e 4,5, respectivamente). Observou-se que a estirpe era capaz de crescimento a concentrações de ácido acético que variaram entre 0,2 e 1,5% (v/v), a pH 4,5 e 0,1 e 1,0% (v/v), a pH 3,0.

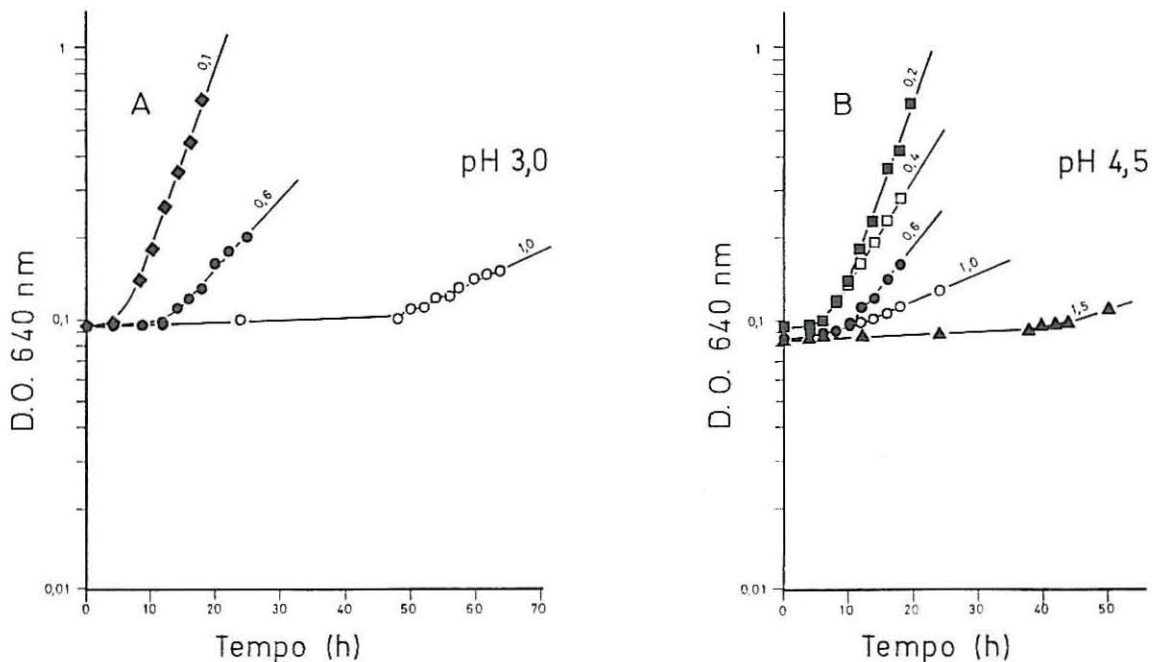


Fig. 7.18 - Gráficos semilogarítmicos da variação da densidade óptica com o tempo, em células de *Z. bailii* ISA 1307 crescidas em meio mineral com várias concentrações (v/v) de ácido acético, a 25°C, a pH 3.0 e 4.5. Os números indicam as concentrações de ácido [% (v/v)] utilizadas no meio extracelular.

Aos dois valores de pH as principais diferenças traduziram-se nos valores encontrados para as concentrações máximas de ácido permissíveis a crescimento (X_{\max}) e para os tempos de duração da fase de latência. Assim, e conforme sumariado na tabela 7.9 e representado na figura 7.18 os valores de X_{\max} , expressos em termos de ácido total, diminuíram com o abaixamento do pH, enquanto que, estes valores, quando expressos em concentração de ácido não dissociado, não variaram significativamente com o pH do meio. Adicionalmente observou-se que, os valores de X_{\max} em *Zygosaccharomyces bailii*, foram significativamente superiores aos descritos para *Saccharomyces cerevisiae*, nas mesmas condições experimentais, conforme se apresenta na tabela 7.9. Assim, por exemplo a pH 3,0, o valor da concentração de ácido máxima permissível a crescimento em *Z. bailii*, foi o dobro da obtida em *S. cerevisiae*.

Tabela 7.9

Valores das concentrações máximas de ácido acético permissíveis a crescimento (X_{\max}) em *Z. bailii*, comparativamente com *S. cerevisiae*.

pH _{ext}	X_{\max} (% v/v)			
	Ácido acético total		Ácido acético não dissociado	
	<i>Z. bailii</i>	<i>S. cerevisiae</i> a)	<i>Z. bailii</i>	<i>S. cerevisiae</i> a)
3,0	1,0	0,5	0,95	0,49
4,5	1,5	0,7	0,97	0,45

a) Valores retirados de Cardoso (1994)

7.3.3.2 - Células crescidas num meio com glucose, a pH 5,0

Nas condições experimentais definidas na secção 7.2.2 fizemos doseamentos do etanol, glicerol e ácido acético por HPLC, em suspensões de células de *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307, provenientes de culturas em meio mineral com diferentes concentrações de glucose (0,2; 2,0; 10,0; 20,0 e 30,0%, p/v), a 26° C, pH 5,0. A figura 7.19 apresenta cromatogramas representativos dos resultados obtidos.

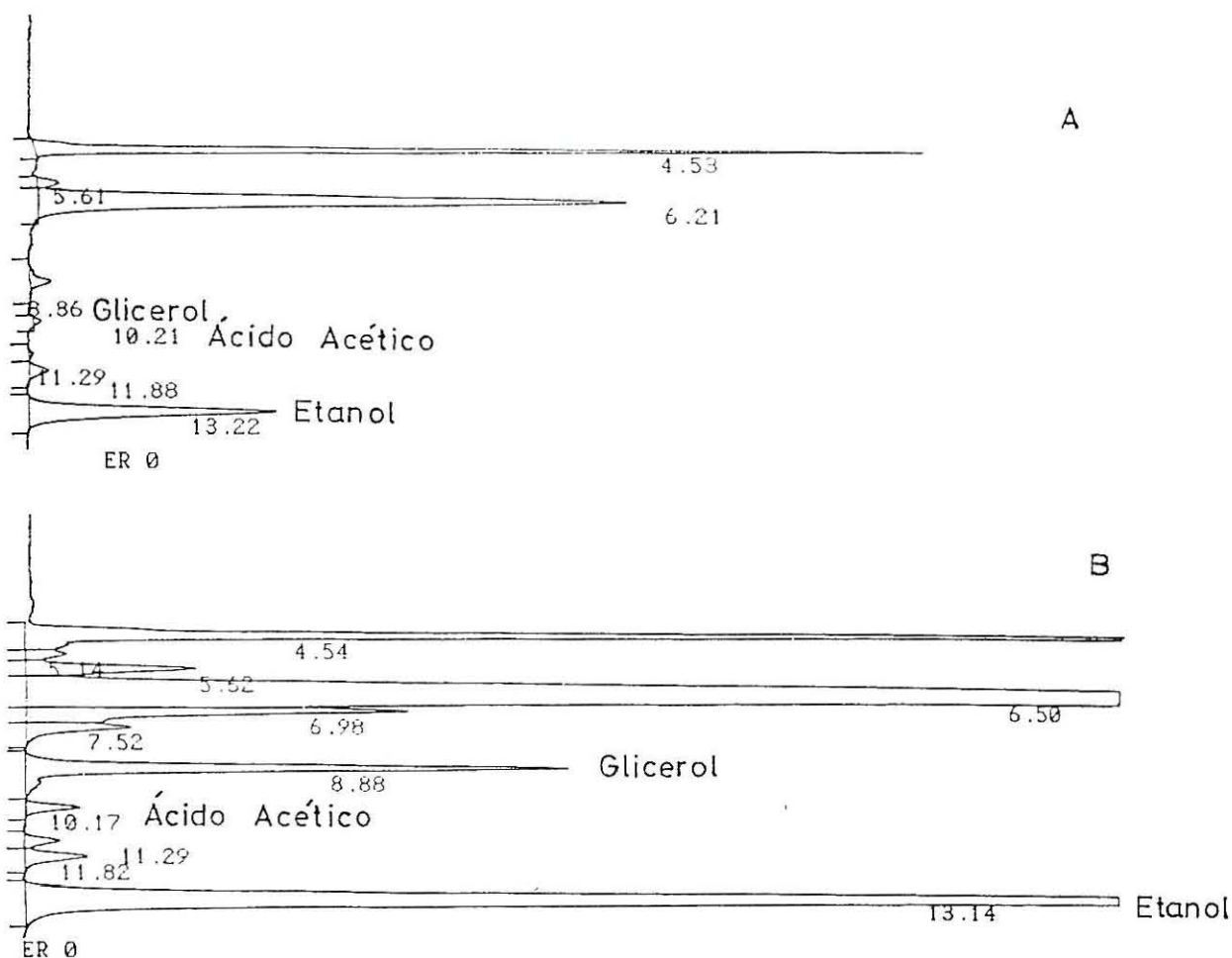


Fig. 7.19 - Registo dos ensaios cromatográficos por HPLC, em sobrenadantes de culturas de *Z. bailii* ISA 1307: A, com 2% (p/v) de glucose; B, com 10,0% (p/v) de glucose. Os dois primeiros picos do cromatograma não foram identificados.

Os valores estimados, para as várias condições experimentais testadas, foram representados em gráfico em função do tempo na figura 7.20 (A, B, C, D e E). Da análise destes resultados verifica-se, que para todas as concentrações de glucose ensaiadas, durante a fase exponencial de crescimento da levedura em estudo, a glucose foi utilizada, total ou parcialmente, dependendo da sua concentração no meio extracelular, com produção de etanol, de ácido acético e de glicerol, no entanto a produção dos três últimos compostos apenas ocorreu para concentrações em glucose superiores a 0,2% (p/v). A utilização da glucose bem como a acumulação de ácido acético, de etanol e de glicerol ao longo do tempo foi linear. Para

concentrações de glucose superiores ou iguais a 2,0% (p/v) o ácido acético produziu-se quer durante a fase de crescimento exponencial, quer durante a fase estacionária, sendo, no entanto, a concentração final de ácido produzido baixa, da ordem dos 0,110; 0,122 e 0,129% (v/v) num meio, respectivamente, com 10,0; 20,0 e 30,0 % (p/v) de glucose. O etanol e o glicerol apenas se produziram durante a fase estacionária de crescimento para concentrações de glucose superiores a 2,0 %, como se pode observar na figura 7.20 (C, D e E).

Adicionalmente, observou-se que para concentrações em glucose até 10,0 % (p/v) as concentrações de etanol e glicerol produzidos a partir da glucose durante a fase exponencial de crescimento aumentaram à medida que aumentamos a concentração de açúcar no meio de crescimento. Para concentrações de açúcar superiores a 10,0 % (p/v) a produção destes compostos não variou significativamente.

Por outro lado, observou-se que o crescimento de *Z. bailii* num meio mineral com 2,0% (p/v) de glucose como fonte de carbono e energia apresentou duas fases consecutivas características de crescimento bifásico. A 1ª fase correspondeu essencialmente à utilização da glucose e à produção de ácido acético, etanol e glicerol. Após exaustão do açúcar observou-se uma 2ª fase de crescimento exponencial correspondente ao metabolismo do etanol e do glicerol.

7.3.3.3 - Células crescidas num meio com glucose, a pH 3,0

De forma análoga ao descrito na secção anterior fomos também estudar a utilização da glucose em células de *Zygosaccharomyces bailii* crescidas num meio mineral com glucose (20,0 e 30,0 %), a pH 3,0. Na figura 7.21 apresentam-se gráficos semilogarítmicos representativos da variação da densidade óptica (D.O. 640nm) com o tempo, nas condições experimentais referidas. Adicionalmente, nesta figura estão representados em gráfico os valores das concentrações dos vários substratos resultantes da utilização da glucose, bem como os valores da concentração de glucose, em função do tempo.

Da análise dos resultados verifica-se, um aumento linear da utilização da glucose durante a fase de crescimento exponencial, sendo no entanto, o consumo deste açúcar incompleto. Com efeito, o valor da glucose residual foi de 2,8 e de 3,4% (p/v), respectivamente, num meio com 20,0 e 30,0% (p/v) de glucose.

Durante a fase de crescimento exponencial a produção de etanol e de glicerol aumentou linearmente com o tempo, sendo, no entanto durante a fase estacionária a acumulação destes compostos mais baixa. Por sua vez, a produção de ácido acético aumentou linearmente com o tempo, durante o período em que decorreu o estudo, embora, a concentração final de ácido produzido tenha sido baixa. Com efeito, os valores obtidos para o ácido acético final foram de 0,10 e 0,11% (v/v) respectivamente, num meio com 20,0 e 30,0% (p/v) de glucose.

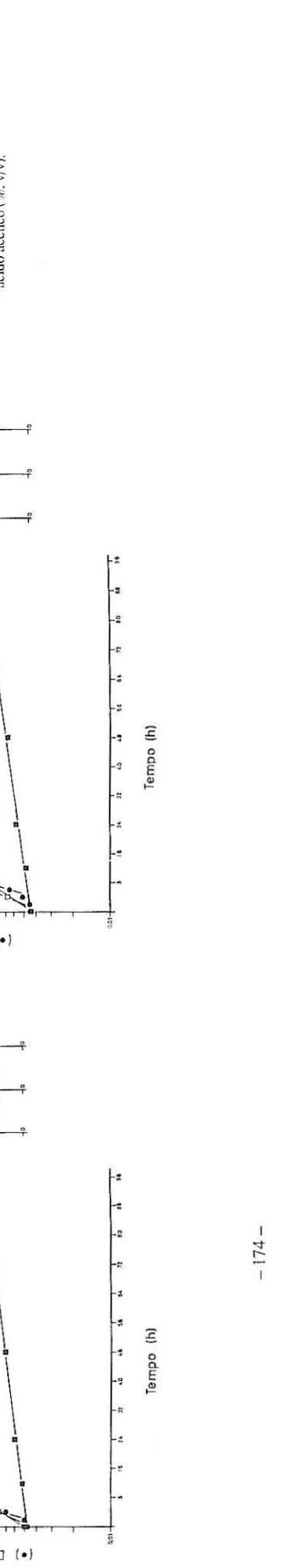
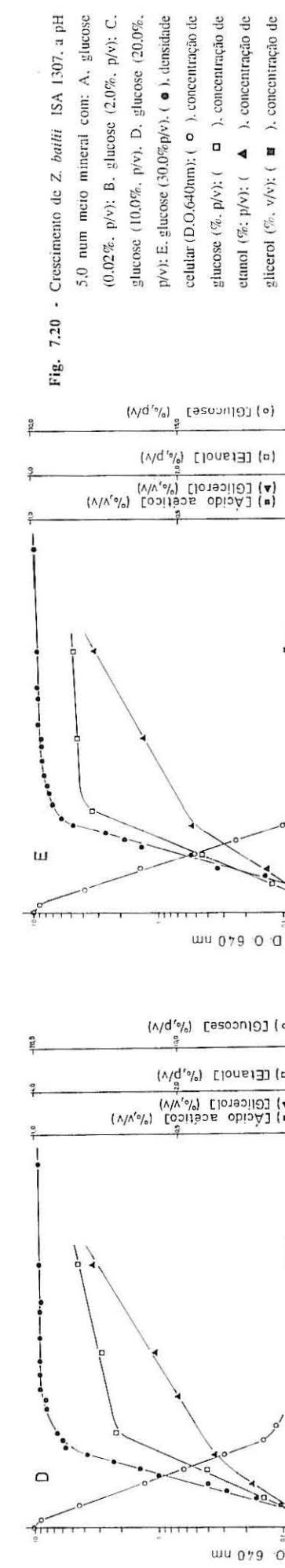
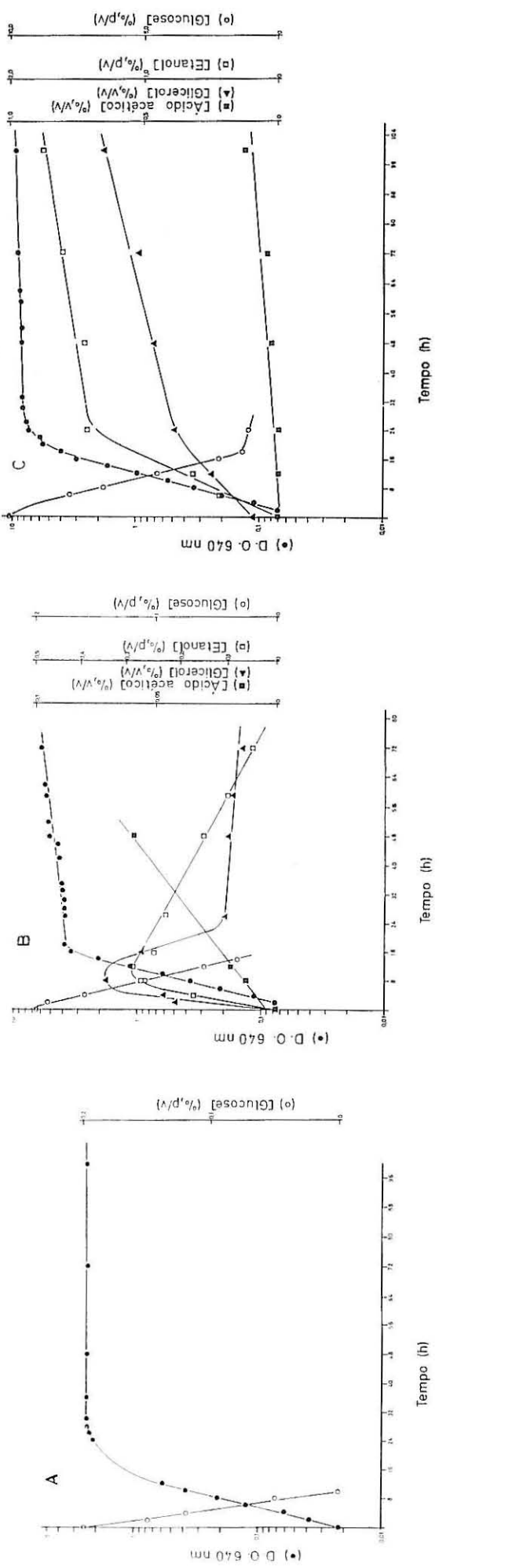


Fig. 7.20 - Crescimento de *Z. batii* ISA 1307, a pH 5.0 num meio mineral com: A, glucose (0.02%, p/v); B, glucose (2.0%, p/v); C, glucose (10.0%, p/v); D, glucose (20.0%, p/v); E, glucose (30.0% p/v); (●), densidade celular (D.O.640nm); (○), concentração de glucose (% p/v); (□), concentração de etanol (% p/v); (▲), concentração de glicerol (% v/v); (■), concentração de ácido acético (% v/v).

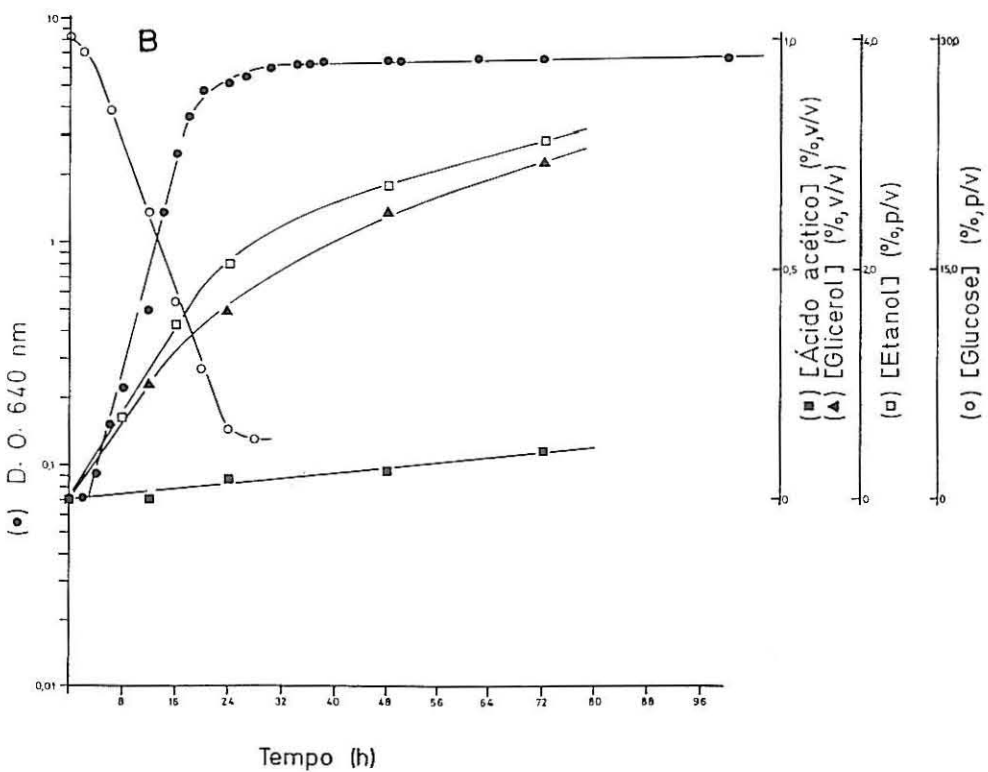
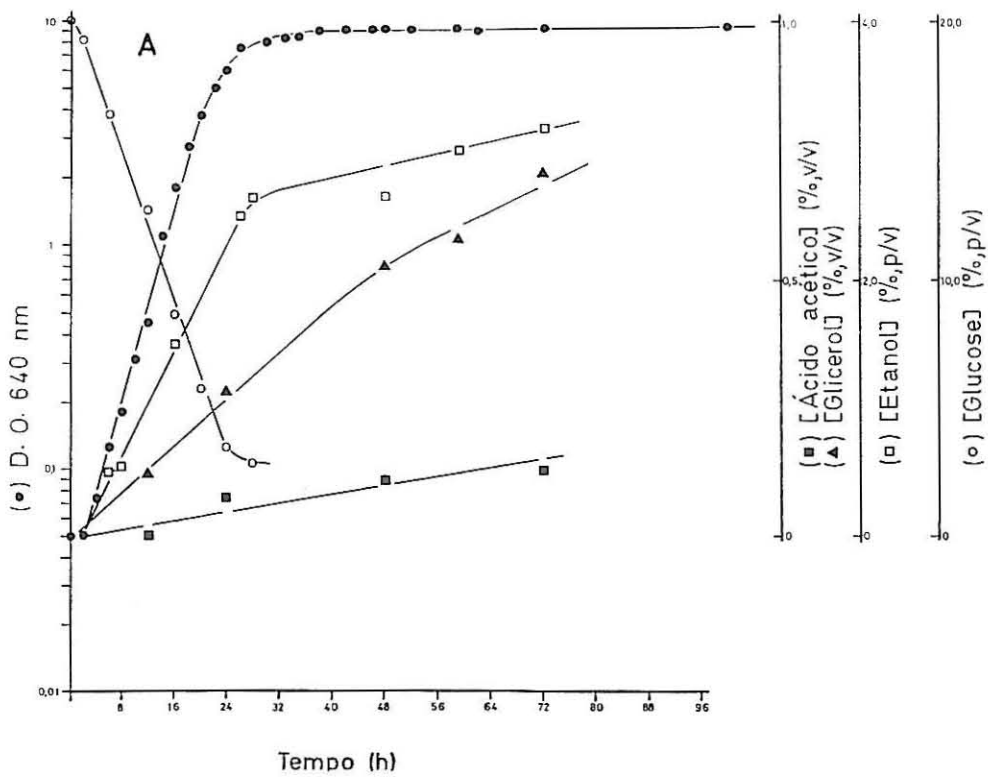


Fig. 7.21 - Crescimento de *Z. bailii* ISA 1307, a pH 3.0 num meio mineral com: A, glucose (20,0, p/v); B, glucose (30,0%, p/v). (●), densidade celular (D.O.640nm); (○), concentração de glucose (% p/v); (□), concentração de etanol (% p/v); (▲), concentração de glicerol (% v/v); (■) concentração de ácido acético (% v/v).

Por outro lado, de forma análoga ao que foi verificado a pH 5,0 observou-se que, para as concentrações de glucose estudadas (20 e 30%, p/v) a pH 3,0 a concentração final dos metabolitos resultantes da utilização da glucose não variou significativamente com a concentração de glucose no meio de crescimento.

7.3.3.4 - Células crescidas num meio com frutose, a pH 5,0

Nesta secção e utilizando a metodologia descrita anteriormente fomos quantificar os produtos resultantes da utilização da frutose em células de *Zygosaccharomyces bailii* crescidas num meio com 1 e 20,0 % (p/v) de frutose, a pH 5,0. Os resultados obtidos foram representados em gráfico em função do tempo na figura 7.22.

A análise da figura indica que, o crescimento de *Z. bailii* num meio com 1% (p/v) de frutose apresentou duas fases consecutivas. No início da primeira fase observou-se a produção de ácido acético e etanol, provavelmente a partir do metabolismo da frutose. A utilização do etanol iniciou-se no final desta 1ª fase de crescimento aparentemente, em simultâneo com a utilização da frutose. A 2ª fase exponencial de crescimento ocorreu provavelmente, após exaustão da frutose do meio extracelular, correspondendo à utilização do etanol com produção de ácido acético. A concentração final de ácido acético produzido foi baixa, da ordem dos 0,06% (v/v).

Células crescidas em meio com 20,0 % (p/v) de frutose, durante a fase exponencial de crescimento produziram ácido acético, etanol e glicerol. A produção destes compostos variou linearmente com o tempo. Durante a fase estacionária continuou a observar-se a produção simultânea dos três substratos, sendo, no entanto, a quantidade de etanol e glicerol produzida relativamente baixa quando comparada com a observada durante a fase exponencial de crescimento. Por outro lado, observou-se que a produção de ácido acético foi baixa, quer durante a fase de crescimento exponencial, quer durante a fase estacionária, e semelhante à obtida em células crescidas num meio com glucose.

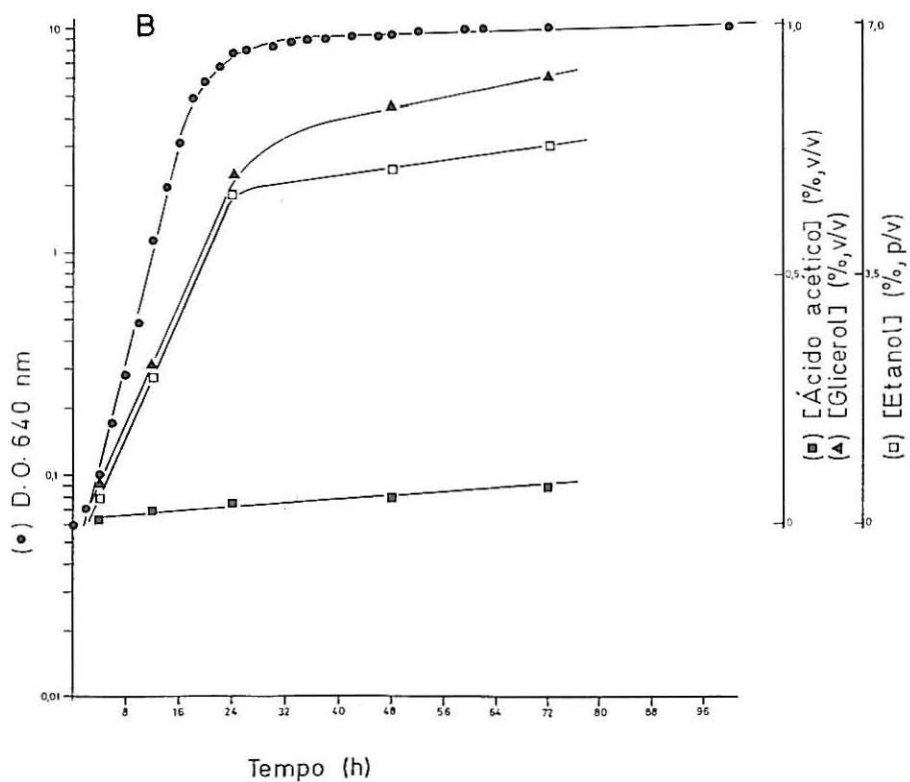
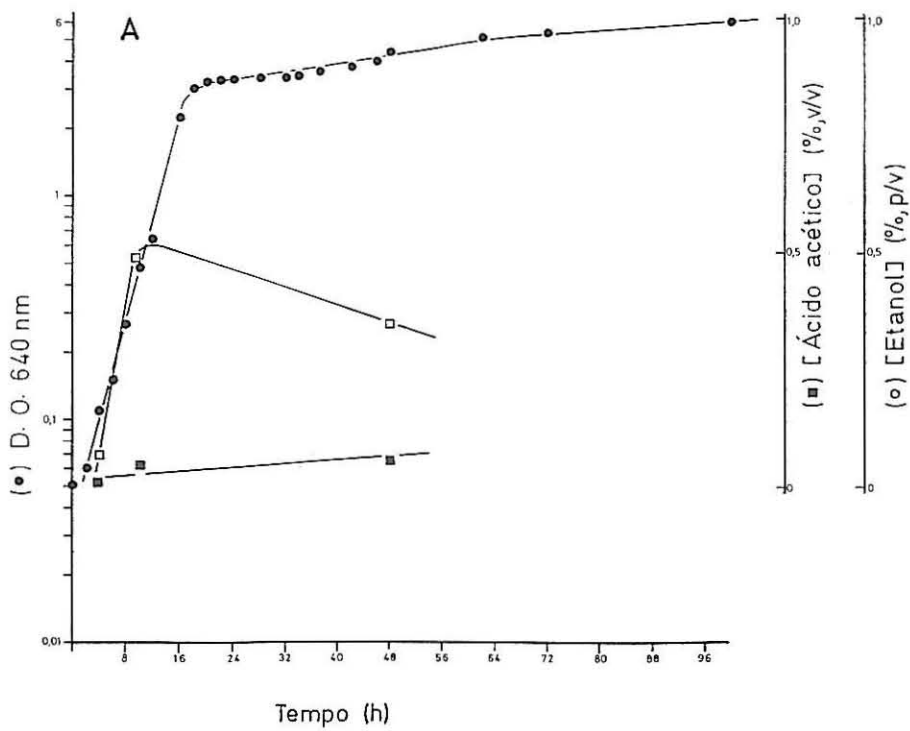


Fig. 7.22 - Crescimento de *Z. bailii* ISA 1307, a pH 5.0 em meio mineral com: A. frutose (1% p/v). B; frutose (20.0% p/v); (●), densidade celular (D.O.640nm); (□), concentração de etanol (% p/v); (▲), concentração de glicerol (% v/v). (■) concentração de ácido acético (% v/v).

7.3.3.5 - Células crescidas num meio com frutose, a pH 3,0

Adicionalmente fomos quantificar os produtos resultantes da utilização da frutose em células de *Zygosaccharomyces bailii* crescidas num meio com 20,0 % (p/v) de frutose, a pH 3,0. Os resultados experimentais obtidos, encontram-se representados na figura 7.23. Verificou-se que, nestas condições, durante a fase exponencial de crescimento, a levedura em estudo produziu ácido acético, etanol e glicerol. Durante a fase estacionária continuou a observar-se a produção simultânea dos 3 compostos. No entanto, a produção de ácido acético nas fases exponencial e estacionária do crescimento foi idêntica, enquanto que a produção de etanol e glicerol na última fase foi menos acentuada do que na primeira. De forma análoga ao verificado anteriormente constatou-se que, nestas condições a concentração final de ácido acético formado foi baixa (0,096%, v/v) e que os produtos resultantes do metabolismo do açúcar também não foram utilizados por *Z. bailii* como fonte de carbono e de energia.

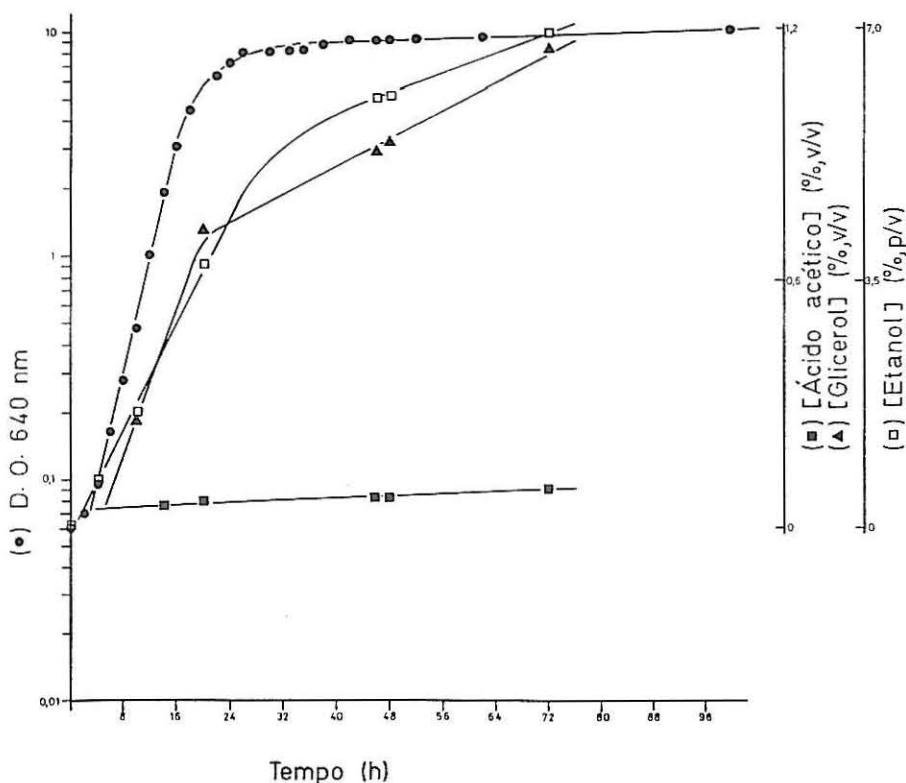


Fig. 7.23 - Crescimento de *Z. bailii* ISA 1307, a pH 3,0 em meio mineral com frutose (20,0, p/v). (●), densidade celular (D.O.640nm); (□), concentração de etanol (% p/v); (▲), concentração de glicerol (% v/v); (■) concentração de ácido acético (% v/v).

7.3.3.6 - Células crescidas com fontes de carbono mistas

• Glucose e ácido acético

De modo a testar a hipótese da levedura *Zygosaccharomyces bailii* metabolizar em simultâneo a glucose e o ácido acético fomos quantificar a utilização destes compostos em suspensões de células crescidas num meio contendo uma mistura de glucose (0,5%, p/v) e ácido acético a diferentes concentrações (0,05; 0,1 e 0,5%, v/v), a pH 4,5 e à temperatura de 26°C.

Os resultados obtidos estão sumariados na figura 7.24. Nesta figura foram também representados, em gráfico semilogarítmico e linear, respectivamente, os valores obtidos para a variação da densidade óptica ao longo do tempo e os valores determinados para o consumo da glucose em função do tempo.

A análise da figura indica que, nas nossas condições experimentais o crescimento de *Z. bailii* foi bifásico. No início da 1ª fase, o crescimento estava associado ao consumo simultâneo da glucose e do ácido acético com a acumulação de etanol e de glicerol. No final desta fase para além da glucose e do ácido acético foram também utilizados o etanol e o glicerol produzidos. Após exaustão do açúcar do meio, ocorreu uma 2ª fase correspondente à utilização integral do ácido acético, do etanol e do glicerol.

Na figura 7.25 (A e B) foram representados os resultados experimentais obtidos em células de *Z. bailii* crescidas num meio com 0,3% (v/v) de ácido acético e 1,0% (p/v) de glucose (A), a pH 3,5 e num meio com glucose 0,2% (p/v) suplementado com 0,5% (v/v) de ácido acético, a pH 4,5 (B).

Os resultados apresentados nesta figura, foram idênticos aos obtidos anteriormente, ou seja, utilização simultânea da glucose e do ácido acético no início da 1ª fase exponencial de crescimento, reforçando a ideia de que em *Z. bailii* na presença de glucose a utilização do ácido acético, não está sujeita a repressão.

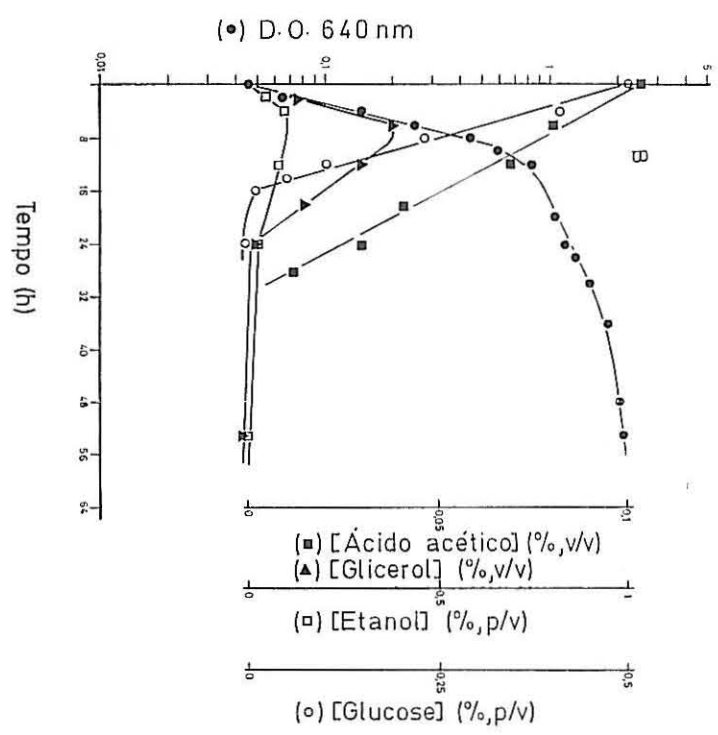
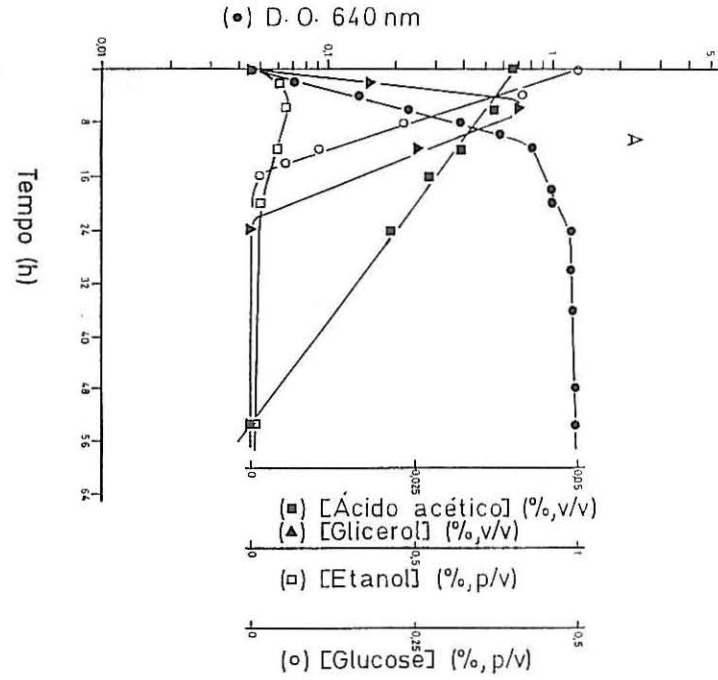
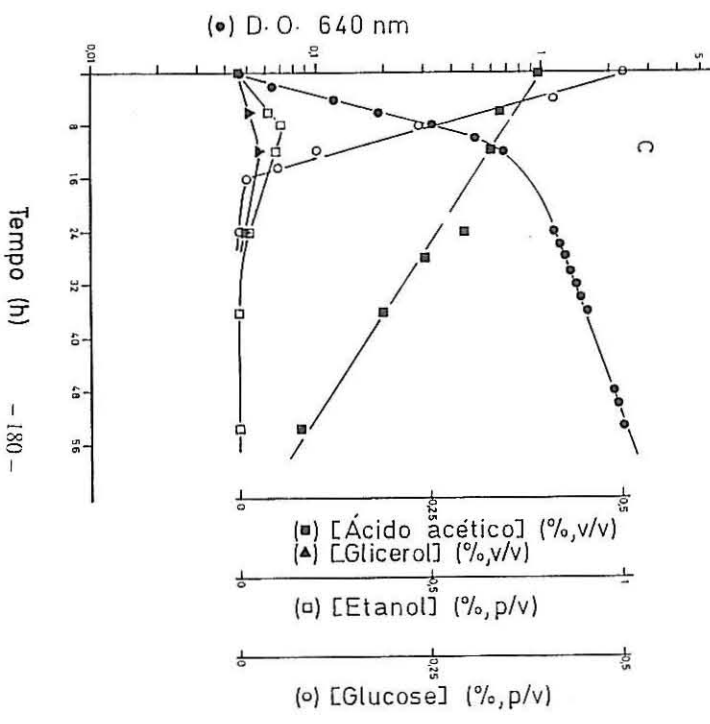


Fig. 7.24 - Crescimento de *Z. baillii* ISA 1307, a pH 4,5 em meio mineral com: A, glucose (0,5, p/v) e ácido acético (0,05%, v/v); B, glucose (0,5%, p/v) e ácido acético (0,1%, v/v); C, glucose (0,5%, p/v) e ácido acético (0,5%, v/v). (●), densidade celular (D.O.640nm); (○), concentração de glucose (% p/v); (◻), concentração de etanol (% p/v); (▲), concentração de glicerol (% v/v); (■), concentração de ácido acético (% v/v).

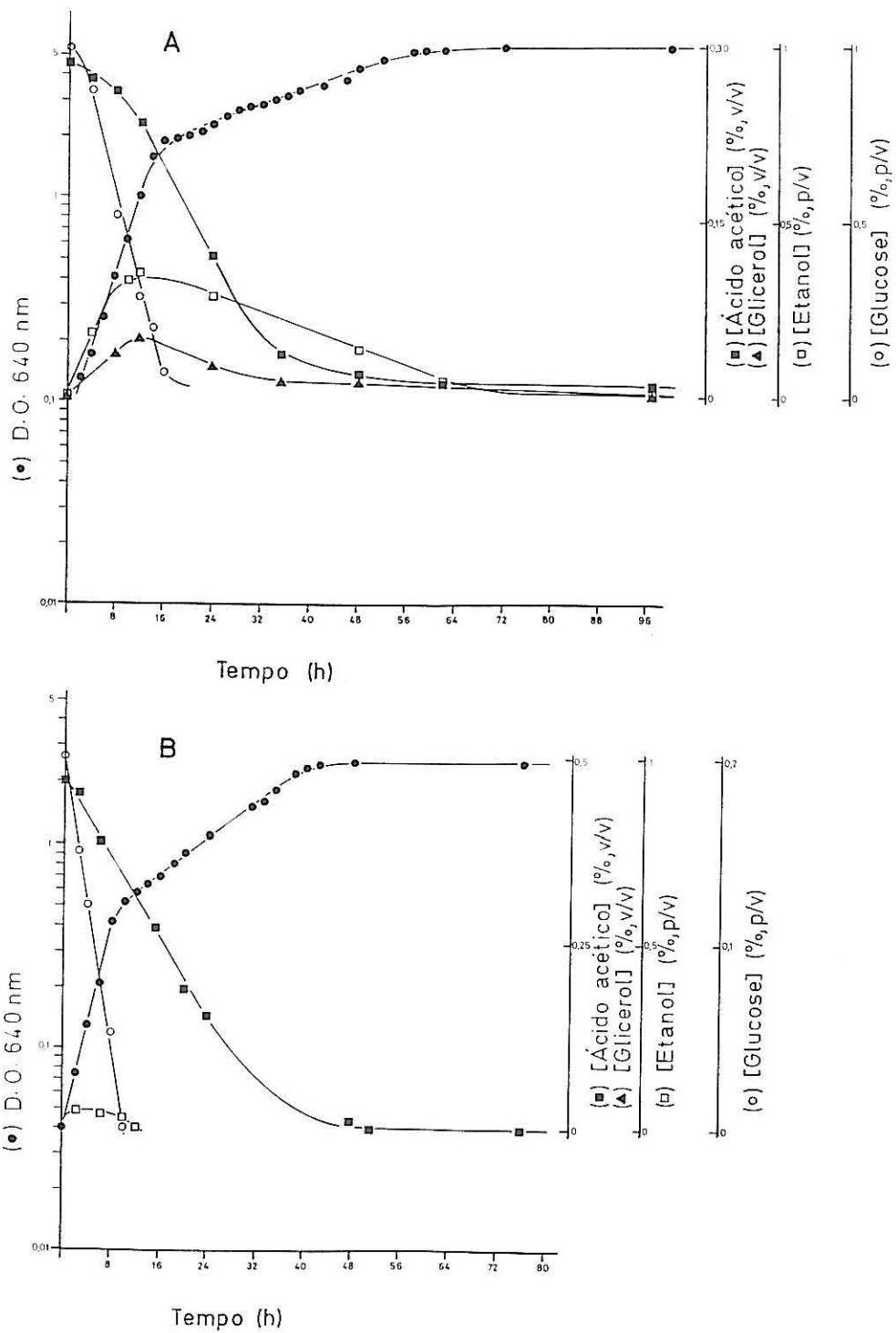


Fig. 7.25 - Crescimento de *Z. bailii* ISA 1307, a pH 3,5 e 4,5, respectivamente em meio mineral com glucose (1,0, p/v) e ácido acético (0,3%, v/v) (A) e em meio mineral com glucose (0,2%, p/v) e ácido acético (0,5%, v/v) (B). (●), densidade celular (D.O.640nm); (○), concentração de glucose (% p/v); (□), concentração de etanol (% p/v); (▲), concentração de glicerol (% v/v); (■), concentração de ácido acético (% v/v).

• Frutose e ácido acético

Adicionalmente foi avaliada a utilização da frutose na presença de ácido acético num meio contendo uma mistura de 0,3% (v/v) de ácido acético e 1,0% (p/v) de frutose, a pH 3,5. Os resultados obtidos, nestas condições experimentais estão representados na figura 7.26, onde adicionalmente se apresentam os resultados estimados para a variação da densidade óptica (D.O. 640nm) com o tempo. De forma análoga ao observado para as células crescidas num meio com glucose e ácido acético, verificou-se que o crescimento de *Zygosaccharomyces bailii* foi bifásico. Durante o início da 1ª fase de crescimento exponencial, apesar de não termos quantificado o consumo da frutose, provavelmente, este açúcar foi utilizado em simultâneo com o ácido acético com produção de etanol e glicerol. Na parte final desta fase observou-se a utilização conjunta da frutose, ácido acético, etanol e glicerol.

Após exaustão da frutose, o ácido acético, o etanol e o glicerol residuais foram utilizados integralmente num 2º período de crescimento exponencial.

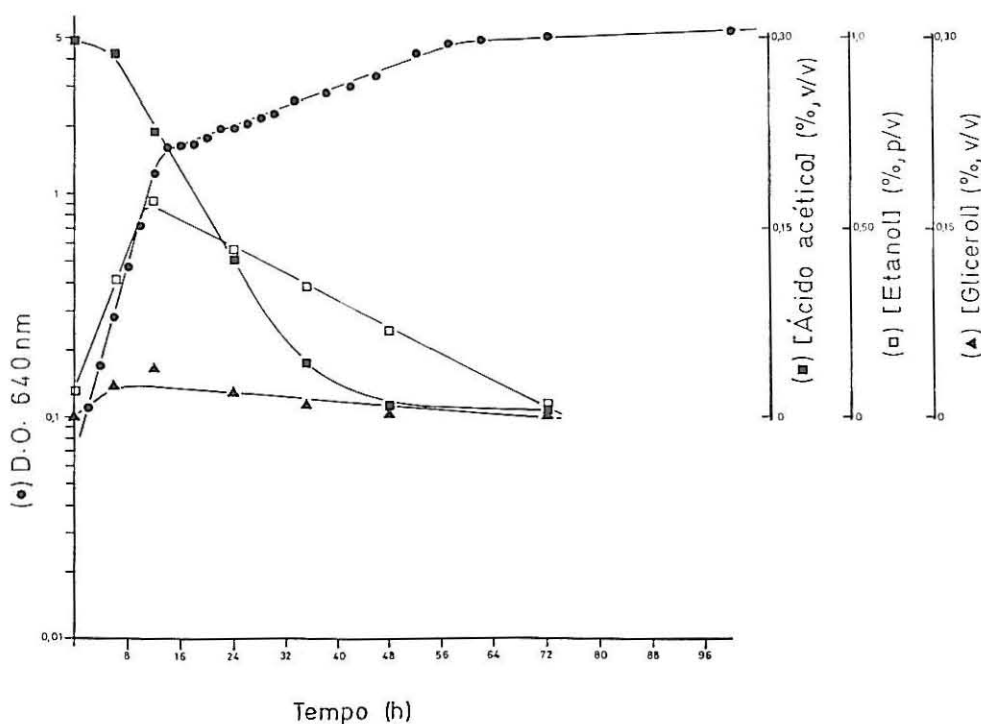


Fig. 7.26 - Crescimento de *Z. bailii* ISA 1307, a pH 3,5 em meio mineral com frutose (1,0%, p/v) e ácido acético (0,3%, v/v). (●), densidade celular (D.O.640nm); (□), concentração de etanol (% p/v); (▲), concentração de glicerol (% v/v); (■), concentração de ácido acético (% v/v).

• Glucose e etanol

Fomos também avaliar a utilização da glucose na presença de etanol num meio com 0,2% (p/v) de glucose suplementado com etanol (0,5%, p/v), a pH 4,5 e à temperatura de 26° C, de acordo com a metodologia descrita anteriormente. Na figura 7.27 apresentamos os resultados experimentais obtidos, bem como os valores determinados para a densidade óptica ao longo do tempo. Nestas condições, a curva de crescimento apresentou duas fases distintas. A uma primeira fase de crescimento exponencial, correspondente à utilização exclusiva da glucose como fonte de carbono e energia, seguiu-se, imediatamente após esgotamento da glucose, uma segunda fase de crescimento exponencial, em que a levedura utilizou o etanol como fonte de carbono e de energia.

Adicionalmente, verificou-se que os valores das concentrações de glucose e de etanol consumidos ao longo do tempo, quando representados em gráfico variaram linearmente com o tempo.

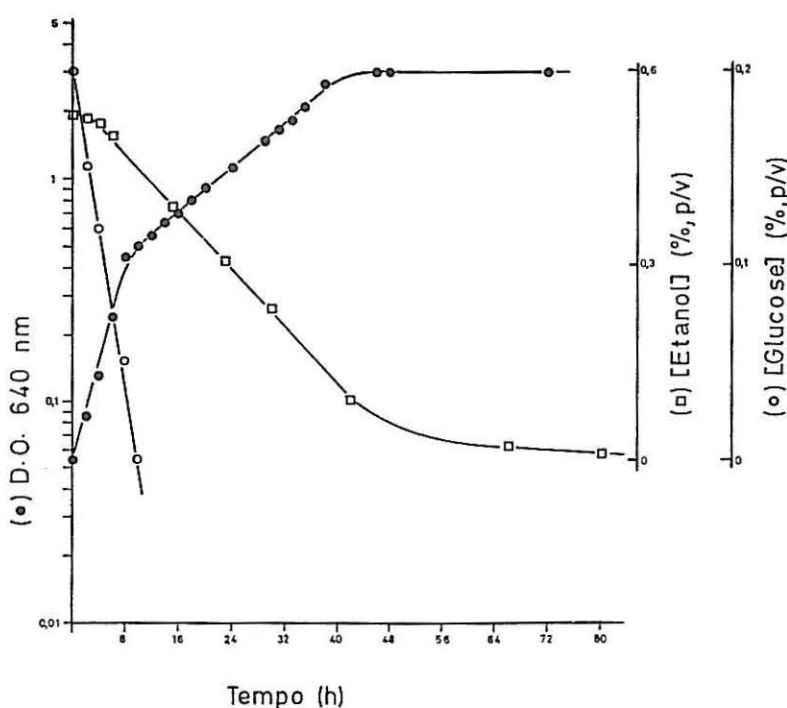


Fig. 7.27 - Crescimento de *Z. bailii* ISA 1307, a pH 4,5 em meio mineral com glucose (0,2%, p/v) e etanol (0,5%, p/v) (●) densidade celular (D.O.640nm); (○), concentração de glucose (% p/v); (□), concentração de etanol (% p/v); (▲), concentração de glicerol (% v/v); (■), concentração de ácido acético (% v/v).

• Glucose, etanol e ácido acético

De forma análoga foram também realizadas experiências com células provenientes de uma cultura em meio contendo uma mistura de glucose (0,5%, p/v), etanol (0,5%, p/v) e ácido acético (0,2%, v/v) a pH 4,5, a T = 26° C. Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 7.28. Nestas condições a glucose o etanol e o ácido acético foram utilizados em simultâneo no início da 1ª fase exponencial do crescimento, com produção essencialmente de glicerol. Na parte final do 1º período de crescimento exponencial para além da glucose, ácido acético e etanol foi também utilizado o glicerol. A 2ª fase de crescimento exponencial ocorreu após exaustão da glucose do meio extracelular e do glicerol produzido e correspondeu à utilização integral do ácido acético e do etanol.

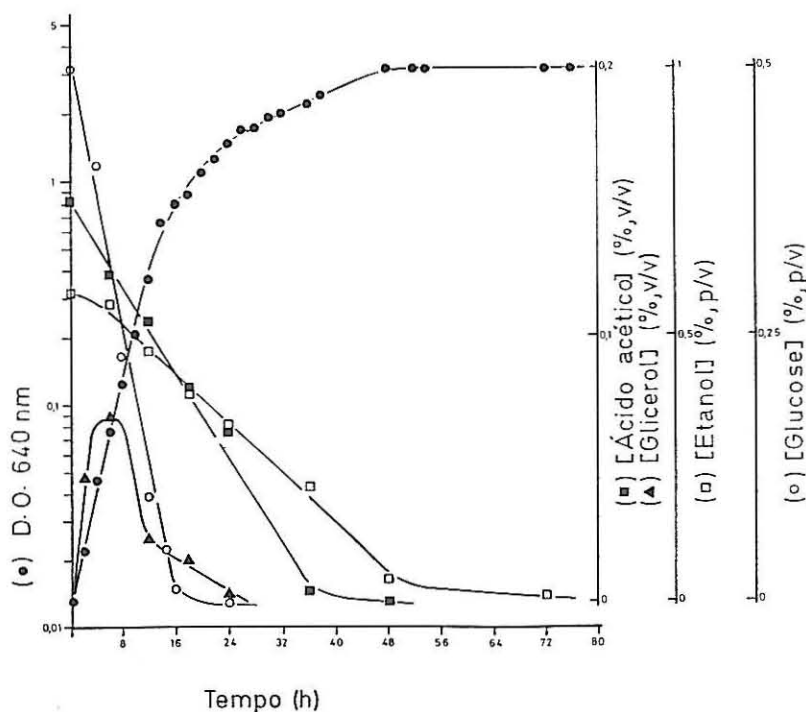


Fig. 7.28 - Crescimento de *Z. bailii* ISA 1307, a pH 4,5 em meio mineral com glucose (0,5%, p/v), etanol (0,5%, p/v) e ácido acético (0,2%, v/v). (●), densidade celular (D.O.640nm); (○), concentração de glucose (% p/v); (□), concentração de etanol (% p/v); (▲), concentração de glicerol (% v/v); (■), concentração de ácido acético (% v/v).

7.4 - Discussão

7.4.1 - Transporte de ácido acético em *Zygosaccharomyces bailii*. Efeitos do etanol

Os resultados apresentados neste capítulo, indicaram que na levedura *Zygosaccharomyces bailii*, nas nossas condições experimentais, a entrada do acetato para a célula obedeceu a um mecanismo de transporte mediado provavelmente um mecanismo de transporte activo secundário do tipo simporte com H^+ . Esta hipótese foi apoiada pelas seguintes evidências experimentais:

- Observação de uma cinética de saturação do tipo Michaelis-Menten subjacente à entrada de ácido acético radioactivo.
- Observação de alcalinização do meio extracelular associada à adição de ácido, a suspensões de células, sendo a variação das velocidades iniciais de desaparecimento de protões do meio extracelular com concentração de ácido também expressa por uma cinética de saturação.
- Inibição competitiva pelo ácido acético frio (3,0 e 6,0 mM), $K_i = 3,6$ mM.
- Inibição não competitiva pelo etanol.

De acordo com os dados na literatura (ver ref. na introdução), em várias espécies de leveduras, os sistemas de transporte mediados, presentes para a forma aniónica dos ácidos fracos são indutivos. Adicionalmente, os transportadores e/ou o metabolismo intracelular do ácido estão sujeitos a repressão catabólica pela glucose. Assim, nestas leveduras, quando crescidas num meio com glucose, o ácido acético e outros ácidos fracos atravessam a membrana plasmática, na forma não dissociada, por um mecanismo de difusão simples. Se o pH extracelular é mais baixo do que o pH intracelular, o ácido dissociar-se-á com a possível acumulação da forma aniónica associada a abaixamento do pH intracelular, podendo ocorrer efeitos tóxicos. Para o caso de *Z. bailii*, foi observado um comportamento diferente. Quando a levedura foi crescida num meio com glucose ou frutose, observou-se actividade de um transportador para o acetato.

Por outro lado, verificou-se que a presença de etanol no meio extracelular conduziu a uma inibição não competitiva sobre o transporte do ácido acético. Além disso a capacidade de transporte do ácido acético diminuiu exponencialmente com a concentração de etanol. Estes resultados foram idênticos aos descritos para os efeitos inibitórios do etanol sobre o transporte do ácido málico e glucose em *Schizosaccharomyces pombe* (Sousa *et al.*, 1992) bem como da glucose, de aminoácidos e do amónio, em *Saccharomyces cerevisiae* (Leão e van Uden, 1983-a e b; 1985).

Por outro lado, nas nossas condições experimentais (células crescidas num meio com glucose como única fonte de energia e carbono) os ácidos sórbico e benzóico inibiram o transporte do ácido acético a pH 5,0. No entanto, o tipo de inibição não foi claramente competitiva.

7.4.2 - Rastreo de protões associado à entrada de ácidos fracos

Na sequência dos resultados obtidos sobre o transporte de acetato em células crescidas num meio com 2% de glucose, e como primeira abordagem à possível elucidação dos mecanismos de regulação do transporte de ácidos fracos em *Zygosaccharomyces bailii*, procedeu-se a um rastreo de ocorrência de movimento de protões associados ao seu transporte utilizando suspensões de células provenientes de culturas com diferentes fontes de carbono. As situações testadas e conforme se descreve na secção dos resultados, foram desde crescimento em meio com glucose (2,0-15,0%, p/v) ou frutose (2,0 e 7,5%,p/v) passando por meio com ácido acético ou pirúvico até meio com glicerol ou etanol, como fonte de carbono e de energia. No seu conjunto, os resultados poder-se-ão interpretar como indicativos da presença de possíveis sistemas de transporte, do tipo simporte com protões para a entrada da forma aniónica dos ácidos. No entanto, estudos complementares e aprofundados sobre a cinética e energética de transporte, serão obviamente necessários para consubstanciar tal hipótese. Como tem sido frequentemente descrito na literatura, no caso particular de ácidos fracos, a simples ocorrência de sinais de alcalinização associados à entrada do ácido, não pode constituir prova definitiva da presença de um mecanismo de simporte com protões para a forma aniónica do ácido. Com efeito, a entrada da forma não dissociada por difusão facilitada, poderá igualmente dar origem a alcalinização do meio extracelular devido, não à entrada de protões acoplada ao transporte, mas sim ao reestabelecimento do equilíbrio químico alterado pela entrada do ácido (para uma discussão aprofundada ver por exemplo Cássio *et al*, 1993).

7.4.3 - Crescimento de *Zygosaccharomyces bailii* em substratos simples (ácido acético ou açúcares) e mistos (açúcares e ácido acético e/ou etanol)

Quanto à utilização de ácidos fracos, observou-se que a estirpe em estudo era capaz de utilizar ácido acético como única fonte de carbono e de energia. Por sua vez, os ácidos láctico, propiónico, butírico, pentanóico e sórbico não foram utilizados pela levedura quando adicionados ao meio de cultura como única fonte de carbono e energia.

Quanto à utilização de açúcares, verificou-se que células de *Zygosaccharomyces bailii* crescidas em meio mineral com vitaminas com várias concentrações de glucose como fonte de energia e carbono, a pH 3,0 e 5,0, a glucose foi utilizada total ou parcialmente, dependendo da sua concentração no meio de crescimento com produção essencialmente de etanol e glicerol. A acumulação de ácido acético foi muito baixa, quer durante a fase de crescimento exponencial, quer durante a fase estacionária, e idêntica para os dois valores de pH.

Nas nossas condições experimentais, para cada uma das concentrações de glucose estudadas, a variação do pH de crescimento não se traduziu numa variação significativa da concentração dos metabolitos produzidos. Estes resultados não são em tudo análogos aos previamente descritos para 13 espécies de *Saccharomyces cerevisiae*, por Radler (1993) em que, a concentração de ácido acético resultante da utilização da glucose, dependeu do pH; a valores de pH abaixo de 3,2 e superiores a 4,0, verificou-se o estímulo da produção de acetato. Adicionalmente, verificou-se que para concentrações em glucose até 10,0% (p/v) a acumulação de etanol, glicerol e ácido acético aumentava, à medida que a concentração de açúcar aumentava no meio extracelular. No entanto, para concentrações de açúcar mais elevadas, a produção destes compostos não variou significativamente com a concentração extracelular de glucose.

Células crescidas em meio mineral com frutose a diferentes concentrações, a pH extracelular 3,0 e 5,0 durante a fase de crescimento exponencial produziram principalmente etanol e glicerol.

Por outro lado observou-se que, o valor da taxa específica de crescimento não variou significativamente com o pH do meio, nem com o açúcar utilizado como fonte de energia e carbono. As principais diferenças observadas com a variação do açúcar utilizado como fonte de carbono e energia, traduziram-se nos valores encontrados para as concentrações de etanol e glicerol produzidos. Assim, por exemplo, para o caso do etanol, a concentração a pH 3,0 num meio com glucose (20,0%), p/v) foi cerca de metade da obtida para as células crescidas em meio mineral com frutose (20,0%, p/v), ao mesmo valor de pH.

O crescimento de *Z. bailii* num meio mineral com 2,0% (p/v) de glucose, a pH 5,0 foi bifásico. No início da 1ª fase observou-se a utilização do açúcar associada à produção de ácido acético, de etanol e de glicerol. No final desta fase o ácido acético, o etanol e o glicerol foram utilizados simultaneamente com a glucose. A 2ª fase de crescimento exponencial iniciou-se imediatamente a seguir à exaustão dos açúcares do meio, estando associada ao metabolismo do ácido acético, do etanol e do glicerol. Comportamento semelhante foi observado em células crescidas num meio com 1% (p/v) de frutose, a pH 3,5, no entanto, neste caso não se observou produção de glicerol durante o 1º período de crescimento exponencial. A não ocorrência da 2ª fase de crescimento para concentrações de glucose ou frutose no meio de crescimento elevadas

(superiores a 10,0%, p/v), pensamos poder atribuir-se ao facto da concentração residual de açúcar (>2,2%) ser suficientemente elevada, podendo conduzir à inibição das enzimas da respiração, impedindo a utilização do ácido acético do etanol e do glicerol.

Células de *Z. bailii* crescidas num meio mineral contendo uma mistura de glucose a diferentes concentrações e ácido acético a várias concentrações, a pH 3,5 e 4,5, apresentaram duas fases exponenciais distintas de crescimento. A glucose e o ácido acético foram consumidos simultaneamente durante o início da 1ª fase com produção de etanol e glicerol. Os últimos substratos começaram a ser utilizados em simultâneo com a glucose e com o ácido no final desta 1ª fase exponencial de crescimento. Após exaustão do açúcar do meio ocorreu a 2ª fase de crescimento associada à utilização exclusiva do ácido acético, do etanol e do glicerol. Resultados idênticos foram obtidos em suspensões de células crescidas em meio mineral com 1,0% (p/v) de frutose e ácido acético (0,3%, v/v), a pH 3,5.

Num meio com glucose (0,2%, p/v) e etanol (0,5%, p/v) observaram-se duas fases consecutivas características de crescimento bifásico. Durante a 1ª fase de crescimento foi utilizada, exclusivamente, a glucose, sendo o 2º período correspondente à assimilação de etanol que ocorreu imediatamente após consumo da glucose do meio.

Quando o crescimento ocorreu num meio mineral com glucose (0,5%, p/v), etanol (0,5%, p/v) e ácido acético (0,2%, v/v) observaram-se igualmente duas fases de crescimento exponencial. No início do 1º período a glucose e o ácido acético foram metabolizados simultaneamente com a produção essencialmente de glicerol. No final desta fase observou-se a utilização da glucose, do ácido acético, do etanol e do glicerol, em simultâneo. Após consumo total da glucose extracelular e do glicerol produzido iniciou-se um 2º período correspondente à utilização do ácido acético e do etanol.

CAPÍTULO 8

CONSIDERAÇÕES FINAIS¹⁾

No âmbito do presente trabalho de tese foram desenvolvidos estudos tendo como objectivo principal contribuir para a elucidação de possíveis mecanismos subjacentes à presença da levedura *Zygosaccharomyces bailii* em ambientes extremos. Muito em particular, foram considerados meios ácidos com etanol, como os presentes em produtos alimentares e bebidas, seleccionando-se, como referência, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que habitualmente não sobrevive a tais ambientes extremos. Dada a vastidão do tema, foram fundamentalmente desenvolvidos estudos sobre os efeitos tóxicos de ácidos orgânicos fracos, na presença e ausência de etanol, na actividade metabólica da levedura. Nesta perspectiva, uma parte considerável do trabalho incluiu estudos ao nível da resposta da população celular à presença destes compostos, em termos de crescimento, morte celular, respiração/fermentação da glucose, pH intracelular e sua correlação com a morte celular. Uma última vertente do trabalho contemplou estudos sobre a utilização de ácidos fracos, na presença e ausência de açúcares, incluindo abordagens preliminares sobre o transporte membranar dos ácidos.

No que diz respeito ao crescimento observou-se que, numa gama de temperaturas compreendia entre 20 e 39° C, a presença de qualquer um dos ácidos estudados (acético, propiónico, butírico, pentanóico e sórbico) ou de etanol induzia efeitos negativos sobre a taxa específica do crescimento, que se acentuava com a concentração de ácido e/ou etanol no meio de crescimento. A dependência dos efeitos observados com a temperatura traduziu-se basicamente num deslocar das temperaturas, óptima e máxima, características da estirpe em estudo, para valores mais baixos. Por sua vez, a adaptação das células ao ácido acético não se traduziu, de uma forma global, num aumento significativo da tolerância de *Z. bailii* aos ácidos. No entanto, para o caso do ácido sórbico foram encontradas diferenças significativas entre células adaptadas e não adaptadas. Com efeito, a adaptação ao ácido sórbico traduziu-se numa diminuição do valor da constante exponencial de inibição do crescimento bem como, num aumento das concentrações mínimas e necessárias para reduzir em 50% a taxa específica do crescimento.

¹⁾ Ao longo do texto deste capítulo não se introduziram referências bibliográficas quando, para efeitos de análise comparativas, se referiram trabalhos de outros autores dado que, em todos os casos, se tratava de estudos já referenciados na apresentação dos respectivos capítulos.

Estes resultados obtidos em *Z. bailii*, de um modo global qualitativamente análogos aos descritos para *S. cerevisiae* foram, no entanto, em termos quantitativos distintos, tendo sido os efeitos inibitórios significativamente inferiores. De um modo sistemático, observou-se que os valores das concentrações de ácido ou de etanol mínimas necessárias para induzir efeitos inibitórios mensuráveis na taxa específica do crescimento foram mais elevados para *Z. bailii*, do que para *S. cerevisiae*. Além disso, a toxicidade dos ácidos, a temperatura constante e quando expressa pelo parâmetro constante exponencial de inibição do crescimento, foi do mesmo modo muito mais baixa em *Z. bailii*.

No que diz respeito aos estudos de viabilidade celular foram testados os efeitos dos ácidos e do etanol em células crescidas num meio com glucose. Nestas condições de crescimento, os ensaios de morte celular foram conduzidos quer a temperaturas elevadas, tipicamente associadas à ocorrência de morte térmica, quer a temperaturas intermédias e baixas que, em *S. cerevisiae*, têm sido associadas à ocorrência de morte celular de baixa entalpia na presença de ácidos ou de etanol. Os resultados obtidos em *Z. bailii* mostraram que a presença destes compostos no meio extracelular induzia efeitos estimuladores na morte celular que, basicamente, foram expressos por:

- gráficos de Arrhenius das taxas específicas de morte na presença de concentrações crescentes de ácido ou etanol, constituindo uma única família de rectas paralelas entre si; o valor de ΔH^\ddagger (entalpia de activação da morte celular) não foi significativamente afectado pela presença de qualquer um dos compostos em estudo, mantendo-se num valor aproximadamente igual ao da morte térmica na ausência de ácido ou etanol;
- os efeitos tóxicos reflectiram-se exclusivamente nos valores de ΔS^\ddagger (entropia de activação da morte celular) que, para cada um dos compostos, aumentou linearmente com a sua concentração extracelular; a partir do declive de cada uma das rectas e de acordo com a equação respeitante à respectiva cinética, foi possível estimar o valor do coeficiente entrópico na fase aquosa, característico de cada um dos compostos e que traduziu o grau de toxicidade de cada um deles em termos de efeitos negativos sobre a perda de viabilidade celular;
- em condições isotérmicas, e em toda a gama experimental de temperaturas, a presença de ácidos ou de etanol estimulou a morte celular para cada um dos compostos, acima da respectiva concentração mínima de estimulação, o efeito aumentou exponencialmente com a sua concentração extracelular;
- os valores das constantes exponenciais de estimulação de cada um dos ácidos e do etanol, estimados a partir do declive das respectivas rectas experimentais das experiências de morte conduzidas em condições isotérmicas, foram independentes da

temperatura e análogos aos valores obtidos para os coeficientes entrópicos na fase aquosa; além disso, observou-se que os valores das constantes estavam directamente correlacionados com a lipossolubilidade dos compostos aumentando com o respectivo coeficiente de repartição lípido/tampão;

- experiências de morte na presença de ácidos, a temperatura constante e a diferentes valores de pH, indicaram que o efeito estimulador era dependente do pH extracelular quando as concentrações de ácido eram expressas em ácido total. No entanto, quando as mesmas foram expressas em ácido não dissociado, os efeitos estimuladores não diferiram significativamente para os diferentes valores de pH experimentais;
- não foi observada ocorrência de morte de baixa entalpia, isto é, morte a temperaturas intermédias e baixas caracterizada por valores de ΔH^\ddagger muito mais baixos do que os da morte térmica;
- no que diz respeito aos efeitos conjuntos de ácido acético e sórbico na presença de etanol, não foram observados efeitos estimuladores significativos do etanol sobre a morte induzida pelos ácidos.

Como conclusão global, e no que diz respeito aos estudos de viabilidade celular, os resultados indicaram que o etanol e os ácidos estudados afectaram negativamente a viabilidade celular. Em todos os casos e tal como descrito para *S. cerevisiae* as cinéticas de estimulação foram exponenciais e os efeitos dependentes da lipossolubilidade dos compostos. No entanto, quando se comparam, em ambas as leveduras, os valores absolutos obtidos, para os parâmetros utilizados para expressar a toxicidade dos compostos, de novo se verificou que os efeitos foram muito menos pronunciados em *Z. bailii* do que em *S. cerevisiae*. Com efeito, conforme se pode constatar dos resultados no capítulo 3, os valores das concentrações mínimas estimuladoras de morte obtidos para cada um dos ácidos e etanol foram superiores aos descritos para *S. cerevisiae*. Por sua vez, os valores das constantes exponenciais de estimulação foram muito mais baixos em *Z. bailii*.

No seguimento dos objectivos do presente trabalho de tese, os estudos prosseguiram no sentido de elucidar os efeitos dos ácidos na taxa de fermentação e respiração da glucose. Numa primeira abordagem observou-se que, em termos do metabolismo da glucose, a estirpe de *Z. bailii* em estudo era capaz de respirar e fermentar a glucose, sendo o peso relativo de cada um dos processos de 25 e 75%, respectivamente. Por outro lado, observou-se que, a temperatura e pH constantes, a adição de ácidos ou de etanol ao meio extracelular era acompanhada por efeitos negativos nas taxas de fermentação e de respiração acentuando-se os

efeitos com a concentração extracelular do ácido ou do etanol. De um modo análogo ao descrito para a morte celular, em ambos os casos, respiração ou fermentação, os efeitos inibitórios foram expressos por cinéticas exponenciais, a partir das quais se estimaram os valores das respectivas constantes exponenciais de inibição. Em termos comparativos com o comportamento de *S. cerevisiae* verificou-se que a resposta da fermentação à presença de etanol extracelular, expressa pela constante exponencial de inibição, foi idêntica em ambas as leveduras. Por outro lado, no que diz respeito ao efeito do ácido acético, o valor da constante exponencial de inibição da fermentação encontrado para *Z. bailii*, foi significativamente inferior ao descrito para *S. cerevisiae*. Observou-se ainda, que o etanol estimulava levemente os efeitos inibitórios induzidos pelos ácidos acético e sórbico na fermentação ou respiração. Estes efeitos estimuladores do etanol foram cerca de metade dos descritos para *S. cerevisiae*. Os resultados indicaram ainda que a fermentação da glucose não era significativamente afectada por concentrações de ácidos para as quais o crescimento era completamente inibido, indicando que a fermentação é menos sensível do que o crescimento aos efeitos negativos daqueles agentes tóxicos, conforme já descrito para outras leveduras.

Uma outra vertente do trabalho incidiu na elucidação da resposta de *Z. bailii* à presença de ácidos em termos de acidificação intracelular. Basicamente, e tomando como referência os resultados apresentados no capítulo 5 observou-se que, a 25° C, a presença de ácido acético ou pentanóico no meio extracelular não afectava o valor do pH intracelular, para concentrações experimentais que induziram acidificação significativa do citosol em *S. cerevisiae*. Acidificação mensurável, em *Z. bailii*, somente ocorreu a concentrações de ácido muito mais elevadas. Adicionalmente, não foi encontrada em *Z. bailii* correlação entre o abaixamento do pH intracelular e o estímulo de morte celular induzidos pelos ácidos acético e pentanóico, em condições isotérmicas, na gama de temperaturas típicas de ocorrência de morte celular de baixa entalpia em *S. cerevisiae*. Do mesmo modo, a análise comparativa dos efeitos do ácido acético no pH intracelular com os observados na fermentação, indicou ausência de correlação entre os efeitos inibidores sobre a fermentação e os estimuladores da acidificação do citosol. Os resultados parecem assim indicar que a acidificação intracelular não estará directamente associada aos efeitos negativos induzidos pelos ácidos quer na fermentação, quer na morte celular de *Z. bailii*.

Quando os resultados são analisados de uma forma global, é possível concluir que, em *Z. bailii*, todos os processos estudados e referidos nos parágrafos anteriores, foram afectados negativamente pelos ácidos e etanol de uma maneira exponencial, que pode ser expressa pela seguinte expressão geral:

$$C_x = C_0 e^{\pm k (X - X_m)} \quad (8.1)$$

em que C_0 e C_x são as constantes de velocidade do processo, respectivamente, na ausência e presença de ácido ou etanol na concentração X ; X_m é a concentração mínima acima da qual os efeitos foram mensuráveis e k é a constante exponencial característica do agente tóxico. O sinal de k será positivo ou negativo, conforme os efeitos induzidos são estimuladores ou inibidores. No primeiro caso situaram-se os efeitos induzidos na morte térmica e na acidificação do citosol, e no segundo os efeitos inibidores induzidos no crescimento celular e na fermentação e respiração da glucose. Este comportamento foi, em termos cinéticos, em tudo análogo ao previamente descrito para *S. cerevisiae* e para o qual foi originalmente proposta uma equação do tipo da eq. 8.1, conforme referido e discutido ao longo dos capítulos desta tese respeitantes à apresentação destes resultados. Conforme se pode observar de forma resumida e comparativa na tabela 8.1. A diferença fundamental residiu nos valores absolutos obtidos para X_m e para a constante k . Em *Z. bailii*, os valores da constante k foram, de um modo geral e sistematicamente inferiores aos descritos para *S. cerevisiae*. Por sua vez os valores de X_m foram superiores em *Z. bailii*, e ao contrário do descrito para a levedura *S. cerevisiae*, verificou-se que concentrações de etanol e/ou de ácido acético, idênticas às usualmente presentes na maioria das fermentações alcoólicas ou às de ácido acético permissíveis para a maioria dos produtos alimentares, não afectam significativamente os diferentes processos metabólicos estudados. Adicionalmente, e neste caso de um modo idêntico ao descrito para *S. cerevisiae*, observou-se que em todos os processos estudados, a constante exponencial de inibição ou de estimulação dos ácidos estava correlacionada positivamente com o respectivo coeficiente de repartição lípido/tampão, reforçando o envolvimento da forma não dissociada do ácido nos efeitos negativos observados e sugerindo as regiões hidrofóbicas das membranas como alvos de acção dos ácidos.

Na parte final deste trabalho de tese, foram desenvolvidos estudos respeitantes ao transporte e utilização de ácidos orgânicos fracos em *Z. bailii* ISA 1307. No que diz respeito à utilização e metabolismo dos ácidos pela levedura, numa primeira série de experiências observou-se que, entre os ácidos estudados, láctico, sórbico, benzóico, propiónico, fórmico e acético, apenas o último era utilizado pela estirpe em estudo, como única fonte de carbono e de energia. Por outro lado, a estirpe em estudo, quando crescida num meio com glucose (0,2; 2,0; 10,0; 20,0 e 30,0%, p/v) ou frutose (20,0%, p/v) como única fonte de carbono e energia, a pH 3,0 e 5,0, evidenciou capacidade de utilização de qualquer um dos açúcares com produção, essencialmente, de etanol e de glicerol, sendo, no entanto, a produção de ácido acético insignificante, quer durante a fase exponencial quer durante a fase estacionária de crescimento. Além disso, os valores das taxas específicas do crescimento não variaram significativamente com o pH do meio nem o açúcar utilizado. As principais diferenças observadas traduziram-se

Resumo das constantes exponenciais de inibição/estimulação e das concentrações mínimas inibitórias/estimulatórias de ácidos fracos e do etanol nos vários processos estudados em *Z. bailii*, a diferentes valores pH, comparativamente com *S. cerevisiae*.

Processo	pH	Etanol/Ácido fraco	Constante do processo (l/mol)		X _{min} (mM)	
			<i>Z. bailii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Z. bailii</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Crescimento	4,00	Etanol	1,20	1,40	900,00	869,00 ^{a)}
		Acético				
		células não adaptadas	12,78	184,41	67,00	16,60
		células adaptadas	10,09	—	67,00	—
		Propiónico				
		células não adaptadas	22,80	176,29	16,00	1,35
		Butírico				
		células não adaptadas	42,47	249,55	9,04	0,93
		Pentanóico				
		células não adaptadas	116,64	1300,08	2,50	0,685
Morte	4,00	Sórbico				
		células não adaptadas	281,73	1684,15	2,00	0,00
	células adaptadas	215,07	—	3,60	—	
	3,00	Etanol	2,00	2,62 - 2,82	nd	—
		Acético				
	células não adaptadas	19,00	84,55 - 74,42	*	—	
	células adaptadas	14,10	—	*	—	
	4,00	Acético				
		células não adaptadas	13,00	—	*	—
	células adaptadas	10,25	—	*	—	
3,00	Propiónico					
	células não adaptadas	26,00	46,30	*	—	
3,00	Butírico					
	células não adaptadas	36,00	69,95	*	—	
3,00	Pentanóico					
	células não adaptadas	106,00	215,90	*	—	
4,00	Sórbico					
	células não adaptadas	232,00	511,00	*	—	
células adaptadas	147,58	—	*	—		
4,00	Acético + etanol (8%)					
	células não adaptadas	18,50	—	*	—	
células adaptadas	13,90	—	*	—		
4,00	Sórbico + etanol (8%)					
	células não adaptadas	264,57	—	*	—	
células adaptadas	171,43	—	*	—		
Acidificação intracelular	3,50	Acético				
		células não adaptadas	0,79	17,50	333,10	199,87
		Pentanóico				
		células não adaptadas	3,44	30,00	34,00	97,90
Fermentação ^{c)}	3,50	Acético	9,22	32,08	100,00	10,00 ^{b)}
		Acético + etanol (10%)	11,00	61,75	10,00	0,00
	4,50	Acético	6,00	34,91	120,00	20,00
		Acético + etanol (10%)	7,20	55,13	20,00	5,00
	5,50	Acético	4,40	10,20	240,00	50,00
		Acético + etanol (10%)	5,20	16,04	160,00	10,00
	3,50	Sórbico	300,00	—	0,50	—
		Sórbico + etanol (10%)	461,00	—	0,00	—
	4,50	Sórbico	183,70	—	3,50	—
		Sórbico + etanol (10%)	272,30	—	2,00	—
5,50	Sórbico	84,50	—	6,20	—	
	Sórbico + etanol (10%)	110,00	—	3,00	—	
Respiração ^{c)}	3,50	Acético	11,01	—	150,00	—
		Acético + etanol (10%)	13,80	—	10,00	—
	4,50	Acético	9,10	—	180,00	—
		Acético + etanol (10%)	10,50	—	45,00	—
	5,50	Acético	5,90	—	300,00	—
		Acético + etanol (10%)	7,10	—	200,00	—
	3,50	Sórbico	113,72	—	1,50	—
		Sórbico + etanol (10%)	163,45	—	0,00	—
	4,50	Sórbico	84,10	—	3,80	—
		Sórbico + etanol (10%)	131,60	—	1,00	—
5,50	Sórbico	40,80	—	8,00	—	
	Sórbico + etanol (10%)	58,00	—	3,00	—	

nd - não determinado

a) valores retirados de Cardoso (1994)

b) valores retirados de Pampulha (1989)

c) todas as experiências respeitantes à fermentação e respiração foram realizadas com células provenientes de um meio de cultura com 2% (p/v) de glicose - células não adaptadas

nos valores encontrados para as concentrações de etanol e glicerol. Em células crescidas num meio com frutose os valores das concentrações daqueles metabolitos foram cerca do dobro dos obtidos nas culturas com glucose. Adicionalmente, nas nossas condições experimentais, o crescimento de *Z. bailii* num meio contendo uma mistura de glucose (0,2 e 0,5%, p/v) e ácido acético (concentrações que variaram entre 0,01 e 0,5%, v/v) ou frutose (1,0%, p/v) e ácido acético (0,3%, v/v), a pH 4,5 e 3,5, apresentaram duas fases exponenciais distintas. Durante a primeira fase, observou-se um consumo simultâneo do açúcar e do ácido acético sendo a segunda fase correspondente ao esgotamento do ácido acético em simultâneo com a utilização do etanol e glicerol produzidos durante a 1ª fase de crescimento. Do mesmo modo, o crescimento da levedura num meio com uma mistura de glucose (0,5%, p/v), etanol (0,5%, p/v) e ácido acético (0,2%, v/v), foi bifásico. A glucose, o etanol e o ácido acético foram utilizados simultaneamente durante a 1ª fase com produção de essencialmente de glicerol. Após a exaustão do açúcar no meio e do glicerol produzido ocorreu o 2º período de crescimento correspondente à completa assimilação do ácido acético associada ao consumo do etanol. Comportamento análogo foi observado em células crescidas num meio contendo uma mistura de glucose (0,2%, p/v) e etanol (0,5%, p/v). Neste caso, durante a 1ª fase de crescimento foi utilizada exclusivamente a glucose, sendo o 2º período correspondente à assimilação do etanol que ocorreu imediatamente após consumo da glucose do meio.

Por outro lado, o crescimento de *Z. bailii* num meio com 2,0% (p/v) de glucose foi bifásico. A uma 1ª fase de crescimento exponencial, correspondente à utilização da glucose como fonte de carbono e de energia, seguiu-se imediatamente após esgotamento da glucose, uma segunda fase de crescimento exponencial, em que a levedura utilizou o etanol, o ácido acético e o glicerol como fonte de carbono e de energia. Para concentrações de glucose elevadas (10,0; 20,0 e 30,0%, p/v) não ocorreu segunda fase de crescimento exponencial, possivelmente devido à concentração residual de açúcar (superior a 2,2%, p/v) ser suficientemente elevada podendo conduzir à inibição das enzimas da respiração, impedindo assim, a utilização do etanol, do ácido acético e do glicerol.

De acordo com os dados da literatura e conforme referido ao longo deste trabalho de tese, em várias espécies de leveduras, incluindo *S. cerevisiae*, o transporte e metabolismo de ácidos fracos estão sujeitos a repressão catabólica pela glucose. Nestas leveduras, quando crescidas num meio com glucose, verifica-se que a membrana plasmática é ainda permeável à forma não dissociada do ácido que a atravessa por difusão simples. Se o valor de pH extracelular for mais baixo do que o intracelular, o ácido, uma vez no interior da célula, dissociar-se-á, e na ausência de um transportador para o efluxo do anião, acumular-se-á em função do Δ pH. Poderá então ocorrer acidificação do citosol associada a posteriores efeitos negativos na actividade metabólica da levedura. No caso de *Z. bailii* e de acordo com os nossos

resultados, uma situação bem diferente parece ocorrer. Assim, células desta levedura crescidas num meio com glucose ou frutose como única fonte de carbono e de energia, a pH 5,0 revelaram actividade para um sistema de transporte mediado para o acetato, cujo comportamento foi consistente com um mecanismo de simporte com H^+ . Resultados preliminares mostraram também que o transporte de ácido acético radioactivo não era inibido competitivamente pelos ácidos sórbico e benzóico, indicando que muito provavelmente estes dois ácidos não utilizam o mesmo transportador. Do mesmo modo, os ácidos propiónico, fórmico e butírico aparentemente não foram reconhecidos pelo transportador do acetato. Serão, no entanto, necessários estudos complementares para a elucidação deste transportador presente em células crescidas num meio com glucose e aparentemente exibindo elevada especificidade para o acetato. Células crescidas em meio com ácido acético, pirúvico, etanol ou glicerol evidenciaram também actividade para um sistema de transporte mediado para ácidos fracos cujo comportamento foi igualmente consistente com o envolvimento de um simporte com prótons para a forma aniónica dos ácidos. A especificidade deste transportador foi, no entanto, mais alargada, sendo capaz de reconhecer, para além de acetato, outros monocarboxilatos como propionato, formato e butirato.

Como conclusão final, pensamos que os estudos desenvolvidos ao longo desta tese poderão contribuir para a compreensão de alguns dos mecanismos subjacentes à elevada resistência de *Z. bailii* a meios ácidos com etanol. Estudos adicionais serão, no entanto, necessários para aprofundar muitos dos aspectos e hipóteses formuladas na sequência dos resultados obtidos. Muito em particular, os estudos sobre o transporte transmembranar de ácidos orgânicos fracos realizados no âmbito desta tese deverão ser considerados preliminares sendo necessárias abordagens complementares sobre a natureza e regulação dos sistemas de transporte. É, no entanto, de referir que a presença de sistemas de transporte mediados para o acetato em células de *Z. bailii*, crescidas num meio com glucose, poderá constituir uma forma de controlo da concentração intracelular de ácido e portanto um modo de protecção para a célula contra possíveis efeitos tóxicos do ácido. Por outro lado, foi ainda possível observar que a presença de etanol no meio extracelular iniba a capacidade de transporte de acetato, expressa pela sua velocidade inicial máxima de entrada, aumentando o efeito inibidor com a concentração extracelular do álcool. Aparentemente, o etanol parece assim constituir um meio adicional de protecção para as células de *Z. bailii*, em meios ácidos, inibindo a sua entrada e por consequência diminuindo os possíveis efeitos tóxicos do ácido sobre a levedura. Estes resultados associados à ocorrência de metabolismo do ácido na presença de açúcares poderão estar correlacionados com a elevada resistência evidenciada por *Z. bailii*, a ambientes habitualmente adversos a outras leveduras como *S. cerevisiae* nas quais o transporte do acetato e o seu metabolismo estão sujeitos a repressão catabólica pela glucose. No futuro e na

sequência dos nossos estudos torna-se particularmente importante aprofundar e avaliar tal possibilidade de correlação entre a presença na membrana plasmática de sistemas de transporte mediados para ácidos em *Z. bailii* e a sua capacidade de sobreviver a meios ácidos.

Por último, consideramos que as abordagens de índole fisiológico e bioquímica desenvolvidas ao longo desta tese, para além da sua importância na elucidação dos mecanismos subjacentes ao comportamento da levedura *Z. bailii* em meios ácidos com etanol, poderão constituir uma base sólida para futuros trabalhos no domínio da genética. Muito em particular, no seguimento dos nossos resultados e extrapolando para *S. cerevisiae*, poder-se-á postular que a optimização de fermentação alcoólicas conduzidas por esta levedura, poderá passar pela obtenção de estirpes de *S. cerevisiae*, manipuladas geneticamente, capazes de transportar e metabolizar acetato na presença de glucose. Tal poderá passar pela clonagem do gene responsável pela proteína transportadora do acetato e sua expressão constitutiva em *S. cerevisiae*. De acordo com os nossos resultados obtidos na levedura *Z. baillii* (modelo de elevada resistência às condições presentes em fermentações alcoólicas) e com as hipóteses formuladas no seu seguimento, será de prever que tais estirpes de *S. cerevisiae* venham a evidenciar resistência mais elevada a meios ácidos com etanol, como são os que habitualmente estão presentes no processo final de vinhos.

Apêndice I

COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Nesta secção serão descritos os meios de cultura utilizados nesta tese, e apresentados com a designação atribuída no texto.

Meio de cultura para manutenção

As leveduras utilizadas neste trabalho foram mantidas, no laboratório, a 17° C em tubos de meio inclinado para manutenção (meio M solidificado), com a seguinte composição:

Glucose (BDH)	2,0% (p/v)
Peptona (Difco).....	1,0% (p/v)
Extracto de levedura (Difco)	0,5% (p/v)
Agar (Difco).....	2,0% (p/v)
Água desmineralizada.....	q.b

O meio foi inicialmente liquefeito no autoclave durante 5 minutos (\pm 5 ml/tubo), seguindo-se a esterilização no autoclave a 1 atmosfera durante 25 minutos. Após esterilização, o meio foi deixado solidificar, inclinando os tubos cerca de 10° C.

Este meio foi também utilizado para contagem de colónias em placa, nas experiências de morte. O meio com a composição descrita anteriormente, foi esterilizado em autoclave, durante 25 minutos, a 1 atmosfera e depois vertido em placas de petri estéreis.

Meios de cultura para crescimento

Nas experiências efectuadas nos capítulos 2,3 e 4 foi usado um meio líquido com a mesma composição que o meio utilizado em placas de petri para contagem de colónias nas experiências de morte, com a diferença que não conteve agar. Este meio é designado no texto por meio M líquido especificando-se, para cada caso em particular, a fonte de carbono utilizada.

As suspensões de células utilizadas nos ensaios experimentais efectuados nos capítulos 6 e 7 foram preparadas a partir de culturas em meio mineral completo. Este meio de cultura, descrito por van Uden (1967) era constituído por meio mineral base solução de vitaminas, solução de oligoelementos A, solução de oligoelementos B e pela fonte de carbono, com a seguinte composição:

(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck).....	0,5 (p/v)
KH ₂ PO ₄ (Merck).....	0,5 (p/v)
Mg SO ₄ 7H ₂ O (Merck)	0,05 (p/v)
Cl O ₄ 2 2H ₂ O (Merck - pró-análisi).....	0,0132% (p/v) (dissolvido, separadamente)
Fonte de carbono	(ver Tab. I.1)
Água desmineralizada.....	q.b.

De acordo com o tipo de ensaio, foram adicionados ao meio base diferentes fontes de carbono conforme descrito na tabela I.1.

– Solução de oligoelementos A

H ₃ BO ₃ (Merck).....	1,0% (p/v)
KI (Merck).....	0,2% (p/v)
Na ₂ Mo O ₄ . 2H ₂ O (M&B).....	0,4% (p/v)
Água desmineralizada.....	q-b.

– Solução de oligoelementos B

Cu SO ₄ . 5H ₂ O (M & B).....	0,08% (p/v)
Fe Cl ₃ . 6H ₂ O (Merck).....	0,4% (p/v)
Mn SO ₄ . 4 H ₂ O (Merck).....	0,8% (p/v)
Zn SO ₄ . 7 H ₂ O (Merck)	0,8% (p/v)
Água desmineralizada.....	q.b.

– Solução de vitaminas

Biotina (BPH)	0,001% (p/v)
Pantotenato de cálcio (Merck).....	0,08% (p/v)

Mio-inositol (BDH)	4,0% (p/v)
Niacina (Merck).....	0,16% (p/v)
Hidrocloreto de Tiamina (Sigma)	0,16 (p/v)
Hidrocloreto de Piridoxina (BDH).....	0,16% (p/v)
Água desmineralizada.....	q.b.

As soluções de vitaminas e oligoelementos foram preparados em concentração dez vezes superior à concentração final pretendida e esterilizadas em separado por filtração em filtros de amianto.

Tabela I.1

Fontes de carbono utilizadas nos vários meios de cultura

Fonte de carbono	Concentração	pH
Glucose	Concentrações indicadas no texto	Valores indicados no texto
Frutose	Concentrações indicadas no texto	Valores indicados no texto
Ácido acético	Concentrações indicadas no texto	Valores indicados no texto
Ácido pirúvico	0,5% (v/v)	5,0
Etanol	0,5% (p/v)	5,0
Glicerol	0,5% (v/v)	5,0

Quando a fonte de carbono era um ácido orgânico imediatamente a seguir à adição do ácido, o pH do meio era pré-ajustado ao valor desejado, pela adição de uma solução de NaOH (10 M) ou HCl (1M), sendo depois esterilizado por autoclavagem a 1 atmosfera durante 25 minutos.

Quando a fonte de carbono era um açúcar, preparamos separadamente uma solução de glucose com uma concentração dez vezes superior à concentração final pretendida no meio. Após esterilização em autoclave à pressão de 1 atmosfera durante 25' era adicionada, em condições de assépsia, ao meio base, previamente esterilizado por autoclavagem. No caso do etanol e do glicerol, estes forma adicionados assepticamente ao meio base previamnte esterilizado. O meio mineral completo era suplementado, em condições de assepsia, com as soluções de vitaminas e oligoelementos A e B numa concentração de 0,05% (v/v).

Apêndice II

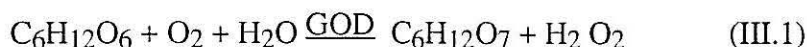
ESTIMATIVAS DA BIOMASSA PELA DETERMINAÇÃO DO PESO SECO

Para quantificação da biomassa presente foi utilizado o método de determinação do peso seco. O peso seco expresso em mg/ml foi determinado colocando um volume conhecido da suspensão de células (20 ou 100 μ l) numa membrana Sartorius Type 11306, com diâmetro de poro de 0,45 μ m, previamente pesada. Posteriormente, esta foi submetida a secagem numa estufa a 80° C até peso constante (aproximadamente 24 horas) e pesada novamente.

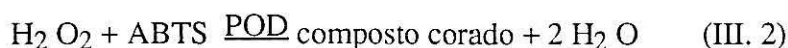
Apêndice III

DOSEAMENTO DA GLUCOSE (MÉTODO DA GLUCOSE - OXIDASE/PEROXIDASE).

Trata-se de um método enzimático, específico para a glucose. Em presença da enzima glucose-oxidase (GOD) a glucose é oxidada a ácido glucónico, com produção simultânea de peróxido de hidrogénio.



Pela acção do enzima peroxidase (POD), o peróxido de hidrogénio formado vai oxidar o 2,2' - azino-bis (3 - etilbenzotiazolina - 6 - sulfonato) de diamónio (ABTS) dando origem a um composto de cor verde azulada.



A concentração do composto corado formado é proporcional à concentração de glucose presente.

Reagentes:

Reagentes para o doseamento de glucose fornecido pela Boehringer Mannheim GmbH e que contém:

- Tampão fosfato (100 mM, pH = 7,0)
- GOD
- POD
- ABTS (1 mg/ml)

Técnica:

Adicionar a 0,5 ml de amostra (concentração de glucose entre 5 e 60 mg/l) 2,5 ml do reagente Boehringer. Agitar suavemente. Incubar durante 35 minutos à temperatura ambiente e ler a absorvância a 560 nm contra um branco preparado em idênticas condições mas utilizando 0,5 ml de água como amostra. Traçar uma curva de calibração para concentrações entre 5 e 60 mg/l.

Apêndice IV

COMPOSIÇÃO DO LÍQUIDO DE CINTILAÇÃO

O líquido de cintilação utilizado tinha a seguinte composição (Hash, 1972):

Naftaleno (Merck)	10% (p/v)
(PPO) 2,5 - difeniloxazole (BDH).....	0,7% (p/v)
(POPOP) (1,4 - di - 2- (5 - feniloxazolilbenzeno) (Merck).....	0,03% (p/v)
Dioxano (Merck).....	q.b.

O líquido de cintilação foi mantido à temperatura ambiente num frasco pipetador ao abrigo do ar.

Apêndice V

PARÂMETROS DE ACTIVAÇÃO DA MORTE TÉRMICA: DEDUÇÃO DAS EQUAÇÕES SEGUNDO A TEORIA DAS TAXAS ABSOLUTAS DE REACÇÃO

a) Consideremos uma reacção química simples:



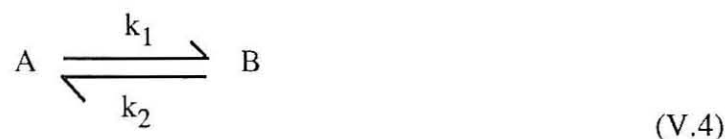
A velocidade desta reacção no sentido 1, v , pode ser expressa em termos de desaparecimento de **A** ou aparecimento de **B**, para um intervalo de tempo t :

$$v = -\frac{dA}{dt} = \frac{dB}{dt} \quad (V.2)$$

Por seu lado, a velocidade da reacção é proporcional à concentração dos reagentes:

$$v = k [A] \quad (V.3)$$

sendo k a constante de velocidade. Deste modo, podem ser definidas as constantes k_1 e k_2 , de acordo com:



Arrhenius demonstrou que esta constante de velocidade de uma reacção aumenta exponencialmente com o inverso da temperatura absoluta (T), com base na equação:

$$k = A e^{-\frac{E}{R} \frac{1}{T}} \quad (V.5)$$

em que R é a constante dos gases perfeitos, E a "energia de activação", A uma constante empírica e T a temperatura absoluta, a que se realiza a reacção.

Aplicando logaritmos:

$$\ln k = \ln A - \frac{E}{RT} \quad (V.6)$$

esta equação é formalmente equivalente à equação de Van't Hoff:

$$\ln k_{eq} = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{R} \frac{1}{T} \quad (V.7)$$

em que k_{ed} é a constante de equilíbrio de uma reacção, S^0 e H^0 as suas entropia e entalpia padrão. Esta relação termodinâmica exprime a forma como a reacção química depende da temperatura.

A semelhança entre as equações (V. 5) e (V. 6) tem um significado físico explícito. De acordo com a teoria das taxas absolutas de reacção (Johnson *et al.*, 1954) para analisar a reacção química (V. 1) parte-se dos seguintes pressupostos:

a) A transformação das espécies **A** na **B** passa através da forma activada A^\ddagger (complexo activado). A diferença de energia livre entre uma mole de A^\ddagger e uma mole de **A**, no respectivo estado padrão é ΔG^\ddagger — energia livre de activação.

b) As espécies químicas **A** e A^\ddagger estão sempre em equilíbrio:

$$k_{eq} = \frac{[A^\ddagger]}{[A]} \quad (V.8)$$

Esta k_{eq} está relacionada com a energia de activação ΔG^\ddagger pela equação:

$$\Delta G^\ddagger = -R T \ln k_{eq}^\ddagger \quad \text{ou} \quad (V.9)$$

$$- \frac{\Delta G^\ddagger}{R} = \frac{1}{T}$$

$$k_{eq}^\ddagger = e \quad (V.10)$$

Por seu lado, a energia livre de activação obedece à seguinte expressão:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (V.11)$$

Donde:

$$\frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} = \frac{1}{T}$$

$$k_{eq}^\ddagger = e \quad (V.12)$$

em que ΔS^\ddagger e ΔH^\ddagger representam respectivamente a entropia e entalpia de activação de uma mole de **A** no seu padrão.

c) A transformação das moléculas activadas A^\ddagger em **B**, ocorre de acordo com a equação:

$$\frac{dB}{dt} = \frac{dA^\ddagger}{dt} = \frac{K_B T}{h} [A^\ddagger] \quad (V.13)$$

em que K_B é a constante de Boltzmann, ($1,38045 \times 10^{-16}$ erg/ k^{-1}), T a temperatura absoluta e h a constante de Planck ($6,6262 \times 10^{-27}$ erg. seg). A expressão $\frac{K_B T}{h}$ representa a constante de velocidade universal, que é, por definição independente da natureza química das moléculas activadas. Considerando de novo a equação (V. 4):

$$\frac{dB}{dt} = k_1 [A] \quad (\text{V.14})$$

que conjugada com (V. 13) permite obter:

$$k_1 = \frac{K_B T}{h} \frac{[A^\ddagger]}{[A]} \quad (\text{V.15})$$

Substituindo (V. 8) em (V. 15), obtem-se a equação:

$$k_1 = \frac{K_B T}{h} k_{eq}^\ddagger \quad (\text{V.16})$$

que, incluída na equação (V. 12) permite obter uma equação que exprime a constante de velocidade de uma reacção química em bases termodinâmicas.

$$k_1 = \frac{K_B T}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} - \frac{1}{T}} \quad (\text{V.17})$$

ou, generalizando, na sua forma logarítmica:

$$\ln k = \ln \frac{K_B T}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} - \frac{1}{T} \quad (\text{V.18})$$

Relacionando $\ln k$ com $\frac{1}{T}$, obtem-se a representação de Arrhenius descrita no capítulo 3, para a morte térmica.

Apêndice VI

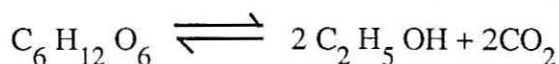
EXEMPLO DE CÁLCULO DA PERCENTAGEM (%) DE CONTRIBUIÇÃO DA FERMENTAÇÃO E DA RESPIRAÇÃO PARA O CATABOLISMO DA GLUCOSE.

Nesta secção apresentamos os cálculos respeitantes à determinação da percentagem de contribuição da fermentação e da respiração para o catabolismo da glucose.

Conforme descrito no capítulo 6, e a título exemplificativo, apresentamos os valores experimentais das taxas específicas de fermentação e respiração da glucose, a pH 3,5.

$$Q_{\text{CO}_2} = 10,2 \mu\text{l CO}_2/\text{min}/\text{mg peso seco}$$

$$Q_{\text{O}_2} = 10,1 \mu\text{l O}_2/\text{min}/\text{mg peso seco}$$



$$1 \text{ mol O}_2 = 22,4 \text{ l} = 22,4 \times 10^6 \mu\text{l}$$

Respiração

$$22,4 \times 10^6 \mu\text{l} \quad \text{_____} \quad 1 \text{ mol}$$

$$10,1 \mu\text{l de O}_2 \quad \text{_____} \quad x$$

$$x = 4,51 \times 10^{-7} \text{ mol} = 0,455 \mu \text{ mol de O}_2$$

$$1 \text{ mole de glucose} \quad \text{_____} \quad 6 \text{ moles de O}_2$$

$$x \quad \text{_____} \quad 0,455 \mu \text{ mol de O}_2$$

$$x = 0,07515 \mu \text{ mol de glucose respirada}$$

Fermentação

$$22,4 \times 10^6 \mu\text{l} \quad \text{_____} \quad 1 \text{ mol}$$

$$10,2 \mu\text{l de CO}_2 \quad \text{_____} \quad x$$

$$x = 4,46 \times 10^{-7} \text{ mol} = 0,446 \mu \text{ mol de CO}_2$$

$$1 \text{ mole de glucose} \quad \text{_____} \quad 2 \text{ moles de CO}_2$$

$$x \quad \text{_____} \quad 0,446 \mu \text{ mol de CO}_2$$

$$x = 0,223 \mu \text{ mol de glucose fermentada}$$

% de contribuição fermentação 75,0%

% de contribuição respiração 25,0%

Apêndice VII

CINÉTICAS DE MOVIMENTO DE H⁺ ASSOCIADAS À ENTRADA DE
ÁCIDOS FRACOS EM *ZYGOSACCHAROMYCES bailii* QUANDO
CRESCIDA EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO.

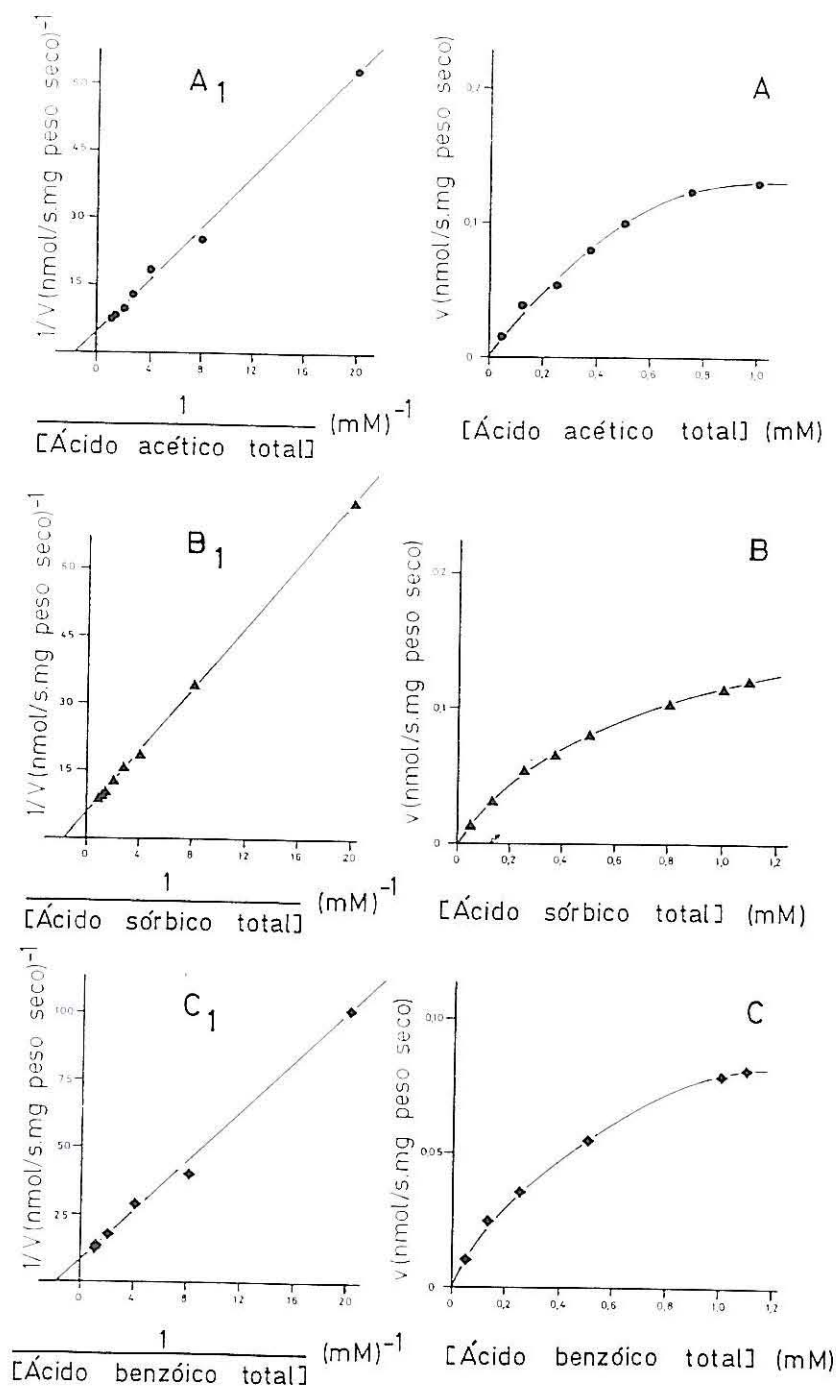


Fig. 1 - Cinéticas de entrada de ácidos monocarboxílicos em células de *Z. bailii* ISA 1307 crescidas em meio mineral com 2% (p/v) de glucose, a pH 3.0, medidas pelas velocidades iniciais de movimento de prótons associadas à entrada de ácidos: A, B e C, representações directas das velocidades iniciais em função da concentração de ácido acético, sórbico e benzóico, respectivamente. A₁, B₁ e C₁, representações de Lineweaver - Burk dos dados representados em A, B, e C.

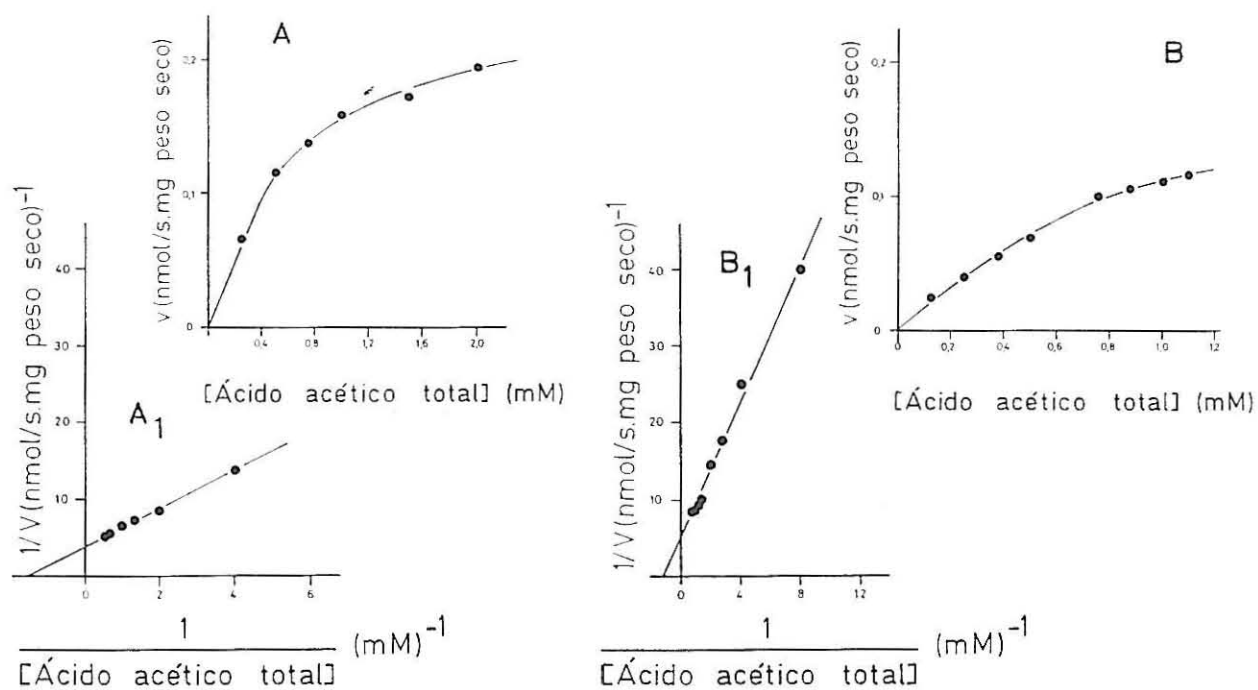


Fig. 2. - Cinéticas de entrada de ácidos monocarboxílicos em células de *Z. bailii* ISA 1307 crescidas em meio mineral com 10% (p/v) (A e B), e 15% (p/v) (B e B₁) de glicose, a pH 3,0, medidas pelas velocidades iniciais de movimento de prótons associadas à entrada de ácido acético: A e B, representações directas das velocidades iniciais de entrada em função da concentração de ácido acético. A₁ e B₁, representações de Lineweaver - Burk dos dados representados em A, e B.

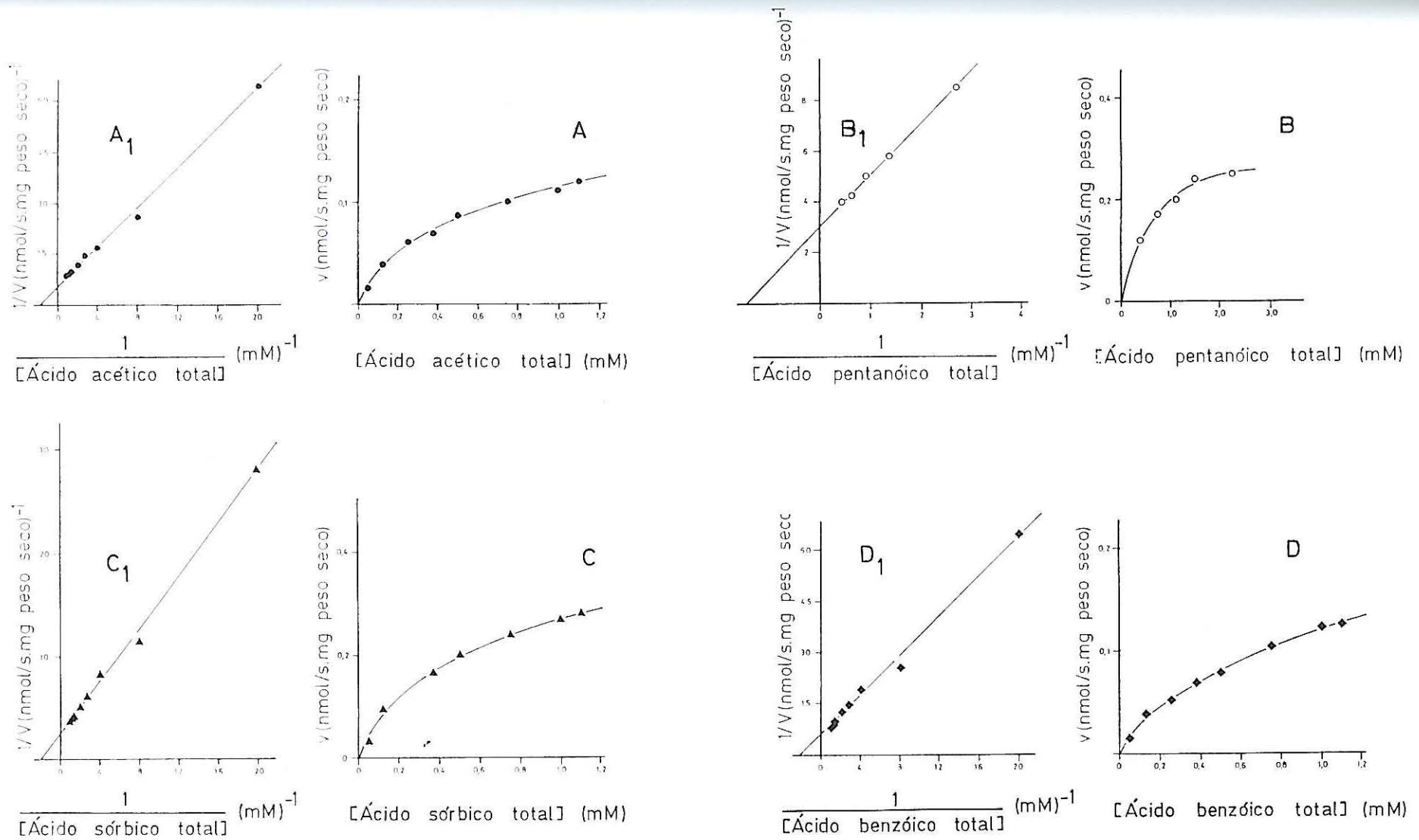


Fig. 3 - Cinéticas de entrada de ácido acético em células de *Z. bailii* ISA 1307 crescidas em meio mineral com 2% (p/v) de frutose, a pH 3,0, medidas pelas velocidades iniciais de movimento de prótons associadas à entrada de ácidos: A, B C e D representações directas das velocidades iniciais de entrada em função da concentração de ácido acético, pentanóico, sórbico e benzóico respectivamente. A₁, B₁, C₁ e D₁, representações de Lineweaver - Burk dos dados representados em A, B, C e D.

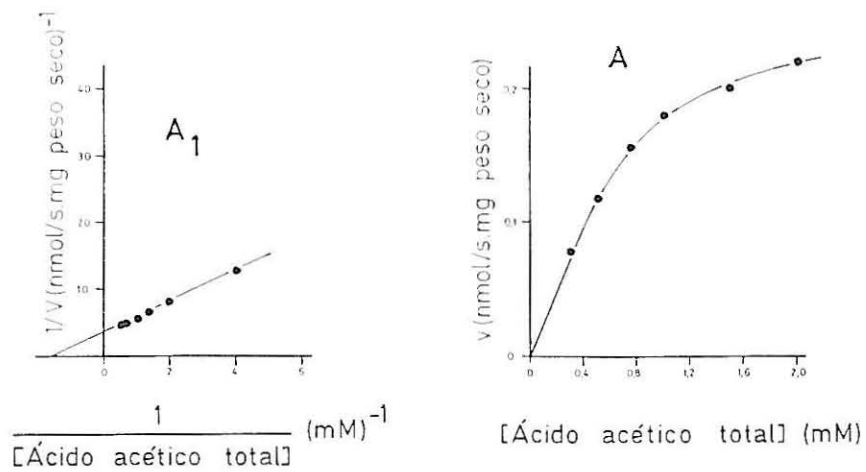


Fig. 4 - Cinética de entrada do ácido acético em células de *Z. bailii* crescidas em meio mineral com 7.5% (p/v) de frutose, a pH 3.0, medida pela velocidade inicial de movimento de prótons associada à entrada de ácido acético: A, representação directa da velocidade inicial em função da concentração do ácido acético. A₁, representação de Lineweaver - Burk dos dados representados em A.

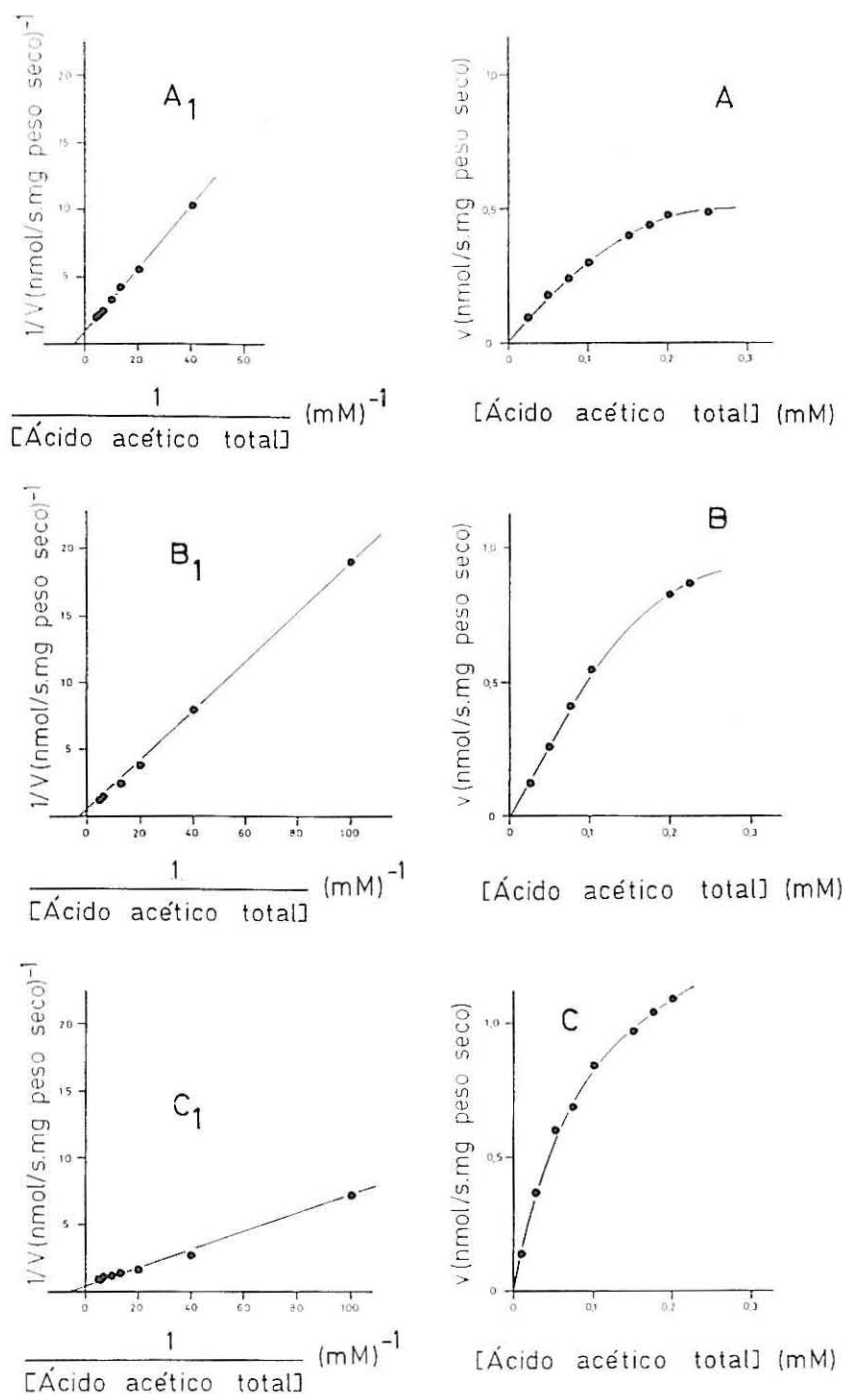


Fig. 5 - Cinéticas de entrada do ácido acético em células de *Z. bailii* ISA 1307 crescidas em meio mineral com 0.2% (v/v) (A e A₁), 1.0% (v/v) (B e B₁) e 1.2% (v/v) (C e C₁) de ácido acético, a pH 5.0, medidas pelas velocidades iniciais de movimento de prótons associadas à entrada de ácido acético: A, B e C, representações directa da velocidade inicial de entrada em função de concentração do ácido acético. A₁, B₁ e C₁, representações de Lineweaver - Burk dos dados representados em A, B e C.

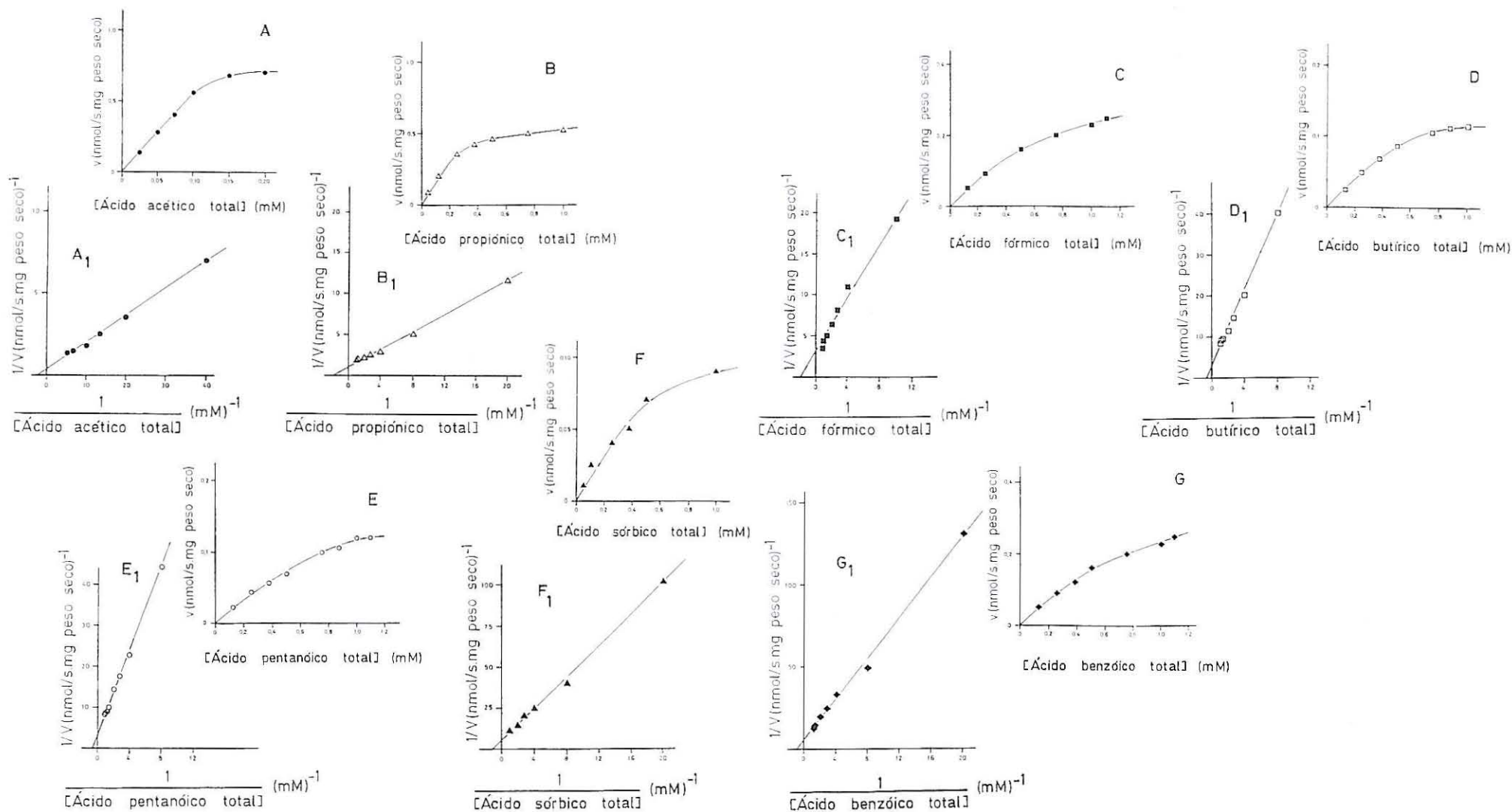


Fig. 6 - Cinéticas de entrada de ácidos monocarboxílicos em células de *Z. bailii* ISA 1307 crescidas em meio mineral com 0,5% (p/v) de etanol, a pH 5,0, medidas pelas velocidades iniciais de movimento de prótons associadas à entrada de ácido: A, B, C, D, E, F e G, representações directas das velocidades iniciais em função da concentração de ácido acético, propiónico, fórmico, butírico, pentanóico, sórbico e benzóico, respectivamente. A₁, B₁, C₁, D₁, E₁, F₁ e G₁, representações de Lineweaver - Burk dos dados representados em A, B, C, D, E, F e G.

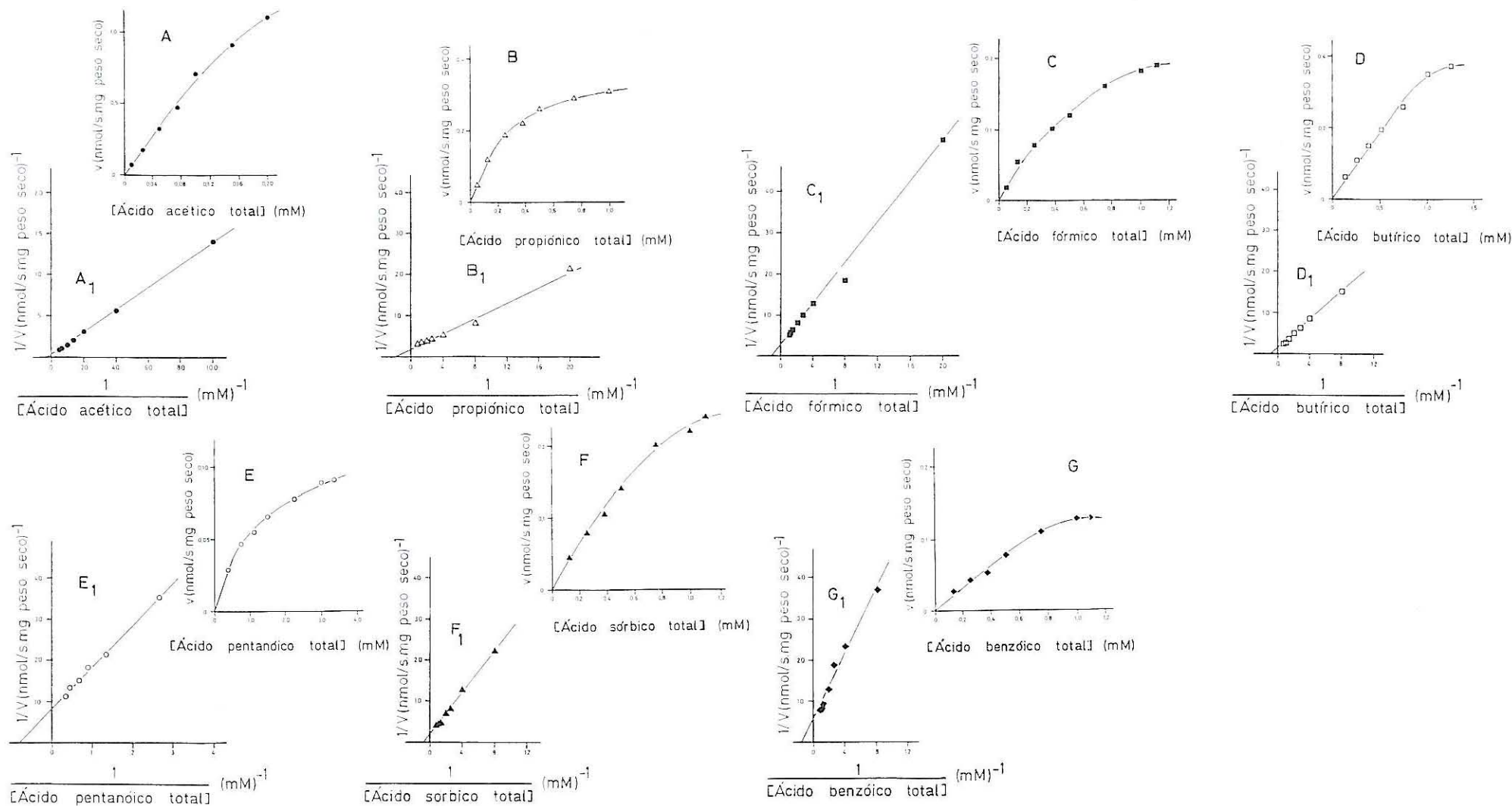


Fig. 7 - Cinéticas de entrada de ácidos monocarboxílicos em células de *Z. bailii* ISA 1307 crescidas em meio mineral com 0,5% (v/v) de glicerol, a pH 5,0, medidas pelas velocidades iniciais de movimento de prótons associadas à entrada dos ácidos: A, B, C, D, E, F e G, representações directas das velocidades iniciais em função da concentração do ácido acético, propiónico, fórmico, butírico, pentanóico, sórbico e benzóico, respectivamente. A₁, B₁, C₁, D₁, E₁, F₁ e G₁, representações de Lineweaver - Burk dos dados representados em A, B, C, D, E, F e G.

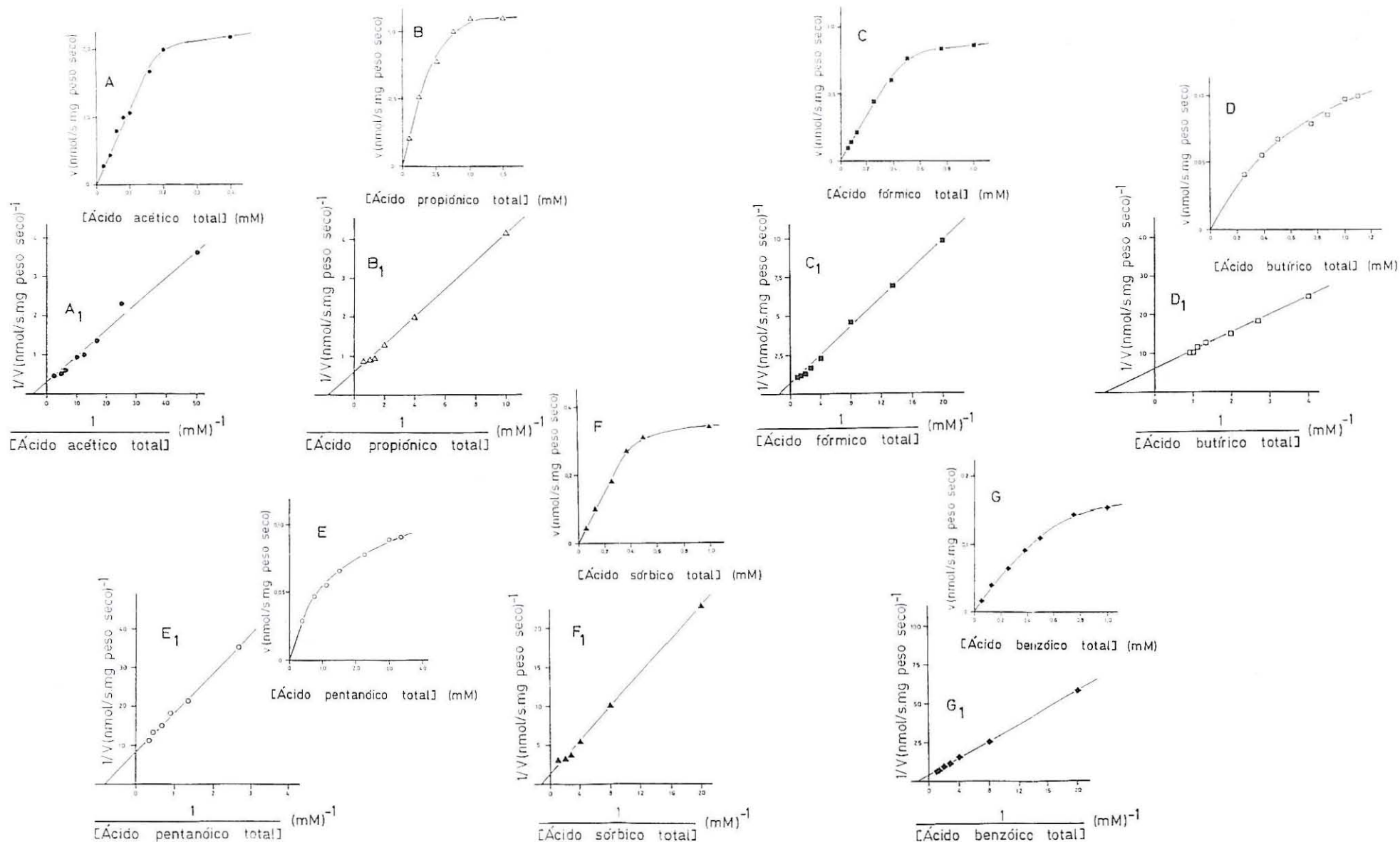


Fig. 8 - Cinéticas de entrada de ácidos monocarboxílicos em células de *Z. bailii* ISA 1307 crescidas em meio mineral com 0,5% (v/v) de ácido pirúvico, a pH 5,0, medidas pelas velocidades iniciais de movimento de prótons associadas à entrada dos ácidos: A, B, C, D, E, F e G, representações directas das velocidades iniciais em função da concentração do ácido acético, propiónico, fórmico, butírico, pentanoico, sórbico e benzóico, respectivamente. A₁, B₁, C₁, D₁, E₁, F₁ e G₁, representações de Lineweaver - Burk dos dados representados em A, B, C, D, E, F e G.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baranowski, K. e Radler, F. (1984). The glucose - dependent transport of L- malate in *Zygosaccharomyces bailii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 50, 329 - 340.
- Barnett, J. A. (1976). The utilization of sugars by yeasts. *Chemistry and Biochemistry*, 32, 125 - 234.
- Barnett, J. A., Payne, R. W. e Yarrow, D. (1990). *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press.
- Baronofsky, J. J., Schreurs, W. J. A. e Kashket, E. R. (1984). Uncoupling by acetic acid limits growth of and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl. Environm. Microbiol.*, 48, 1134 - 1139.
- Blumenthal, H. J. (1968). Glucose Catabolism in Fungi. *Wallerstein Lab. Commun.*, 31, 171-191.
- Borst - Pauwels, G. W. F. H. (1981). Ion transport in yeast. *Bioch. Biophys. Acta*, 650, 88 - 127.
- Brock, T. D. e Madigan, M. T. (1991). *Biology of Microorganisms* (6th. ed.). Prentice - Hall, Inc., London.
- Brown, S. W., Oliver S. G., Harrison, D. E. F. e Richelato, R. C. (1981). Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: differences in the magnitude and complexity of the effect. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 151 - 155.
- Bruinenberg, P. M., van Dijken, J. P. e Scheffers, W. A. (1986-a). A radiorespirometric study on the contribution of the hexose monophosphate pathway to glucose metabolism in *Candida utilis* CBS 621 grown in glucose - limited chemostat cultures. *J. Gener. Microbiol.*, 132, 221 - 229.
- Bruinenberg, P. M., Waslander, G. W., van Dijken, J. P. e Scheffers, W. A. (1986-b). A comparative radiorespirometric study of glucose metabolism in yeast. *Yeast*, 2, 117 - 121.

- Cardoso, H (1994). Toxicidade do Ácido Acético e outros Ácidos Monocarboxílicos de Cadeia Curta em *Saccharomyces cerevisiae*. *Tese de doutoramento*, Universidade do Minho, Braga.
- Cardoso, H. e Leão, C. (1992). Mechanisms underlying the low and high enthalpy death induced by short - chain monocarboxylic acids and ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 388 - 392.
- Carmo - Sousa, L. (1969). Distribution of Yeast in Nature. *In: The Yeasts*, vol.1, (Biology of Yeasts), ed. A. H. Rose e J. S. Harrison, 79 - 105, Academic Press, Londres e Nova Iorque.
- Casal, M. e Leão, C. (1992). Short-chain monocarboxylic acids transport in the yeast *Torulaspota delbruechii*. *Eighth International Symposium on Yeasts*. Georgia, USA.
- Casal, M. e Leão, C. (1995). Short-chain monocarboxylic acids transport in the yeast *Torulaspota delbruechii*. *Biochim. Biophys. Acta*, 24158, in press.
- Cássio, F. (1994). Estudos Sobre Sistemas de Transporte de Ácidos Carboxílicos de Cadeia Curta na Levedura *Candida utilis*. Mecanismos de Regulação. *Tese de doutoramento*, Universidade do Minho, Braga.
- Cássio, F. e Leão, C. (1991). Low - and high - affinity transport systems for citric acid in the yeast *Candida utilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3623 - 3628.
- Cássio, F. e Leão, C. (1993). A comparative study on the transport of L (-) malic acid and other short-chain carboxylic acids in the yeast *Candida utilis*: evidence for a general organic acid permease. *Yeast*, 9, 743-752.
- Cássio, F., Leão, C. e van Uden, N. (1987). Transport of lactate and other short - chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 509 - 513.
- Cássio, F., Côrte-Real, M. e Leão, C. (1993). Quantitative analysis of proton movements associated with the uptake of weak-carboxylic acids. The yeast *Candida utilis* as a model. *Biochim. Biophys. Acta*, 1153, 59-66.
- Cirillo, V. P. (1968). Relationship between sugar structure and competition for the sugar transport system in baker's yeast. *J. Bacteriol.*, 95, 603 - 611.

- Cole, M. B. e Keenan, M. H. J. (1986). Synergistic effects of weak - acid preservatives and pH on the growth of *Zygosaccharomyces bailii*. *Yeast*, 2, 93 - 100.
- Cole, M. B e Keenan, M. H. J. (1987). Effects of weak acids and external pH on the intracellular pH of *Zygosaccharomyces bailii*, and its implications in weak - acid resistance. *Yeast*, 3, 23 - 32.
- Corlett, D. e Brown, M. (1980). pH e acidez. *In: Ecologia Microbiana dos Alimentos* (vol. 1). International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Acriba, Zaragoza. Cap.5, 97-117.
- Côrte Real, M.M. (1990). Transporte e Utilização do Ácido Málico em Leveduras. Mecanismos Fundamentais e Construção de Mutantes de Interesse Vínico. *Tese de doutoramento*, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto.
- Côrte Real, M. M. e Leão, C. (1990). Transport of malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Hansenula anomala*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1109 - 1113.
- Côrte Real, M. M., Leão, C. e van Uden, N. (1989). Transport of L (-) malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Candida sphaerica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 551 - 555.
- De Voe, R. e Maloney, P. C. (1980). Principles of cell homeostasis. *In: Medical Physiology*, vol 1. V. B. Mountcastle (ed.) 14th Ed., C. V. Mosby Company, London, 3 - 45.
- Delfini, C (1988). Refermentation potential in bottled sweet wines of yeasts adapted to sulphur dioxide. *Chemie Mikrobiol. Technol. der Lebensmittel*, 11, 137-142.
- Dixon, M., e Webb, E. C. (1958). *Enzymes*, Longmans, Green and Co., Londres.
- Eddy, A. A. (1982). Mechanism of solute transport in selected eukaryotic microorganisms. *Adv. Microbial Physiol.*, 23, 1 - 78.
- Eddy, A. A. e Nowacki, J. A. (1971). Stoichiometrical proton and potassium ion movements accompanying the absorption of amino-acids by the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *The Biochem. J.*, 122, 701-711.
- Eklund, T. (1983). The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *J. Appl. Bacteriol.*, 54, 383 - 389.

- Eklund, T. (1985). Inhibition of microbial growth different pH levels by benzoic and propionic acids and esters of p - hydroxybenzoic acid. *Internac. J. Food Microbiol.*, 2, 159 - 167.
- Emmerich, W. e Radler, F. (1983). The anaerobic metabolism of glucose and fructose by *Saccharomyces bailii*. *J. General Microbiol.*, 126, 3311 - 3318.
- Evans, C. T. e Ratledge, C. (1984). Induction of xylulose - 5 - phosphate phosphoketolase in a variety of yeasts growing on D - xylose: the key to efficient xylose metabolism. *Arch. Microbiol.*, 139, 48 - 52.
- Eyring, H. (1935). The activated complex and the absolute rate of chemical reactions. *Chem. Rev.*, 17, 65-77.
- Farrel, J. e Rose, A. H. (1967). Temperature effects on microorganisms. *In: Thermobiology*. Rose A. H. (ed.). A. C. Press, Londres.
- Fletcher, A. e Seghezzi, W. (1992). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells - Minireview. *J. Biotchn.*, 27, 27 - 45.
- Fonseca, A., Spencer - Martins, I e van Uden, N. (1991). Transport of lactic acid in *Kluyveromyces marxianus*: evidence for a monocarboxylate uniport. *Yeast*, 7, 775 - 780.
- Freese, E., Sheu, C. W. e Galliers, E. (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 241, 321 - 325.
- Gancedo, J. M. e Lagunas, R. (1973). Contribution of the pentose - phosphate pathway to glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: a critical analysis on the use of labelled glucose. *Plant Sci. Lett.*, 1 - 193.
- Gancedo, C. e Serrano, R. (1989). Energy- yielding metabolism. *In: The Yeasts*, vol. 3, pp. 205 - 259, Rose, A. H. e Harrison, J. S. (eds). Academic Press Limited, London.
- Giudici, P. (1989). Ethanol influence on plasma membrane ATPase activity in wine yeast. *Resumos XIII International Specialized Symposium on Yeasts*. Leuven, 1989.
- Goffeau, A. e Boutry, M. (1986). Three proton - pumping ATPase in yeast. *Microbiol. Science*, 3, 164-168.
- Gomez, R. F. e Herrero, A. A. (1983). Chemical Preservation of Food. *In: Rose, A. H., (ed.). lit. Food Microbiol*. London: Academic Press, 77 - 116.

- Gong, C. S. (1983). Recent advances in D - xylose conversion by yeasts. *Annual Reports on Fermentation Processes*, 6, 253 - 297.
- Hammond, S. M., Whiteley, L. e Beech, F. (1976). The effects of sulphur dioxide and sorbic acid on the microbiological stability of wines. *Long Ashton Report: 141*.
- Harold, F. M. (1986). *The Vital Force: a Study of Bioenergetics*. Freeman.
- Hash, J. H. (1972). Liquid Scintillation Counting in Microbiology. In: *Methods of Microbiology* vol VI B: 110 - 115. J. R. Norris, D. W. Ribbons (Eds).
- Herrero, A. A., Gomez, R. F., Snedecor, B., Tolman, C. J. e Roberts, M. F. (1985). Growth inhibition of *Clostridium thermocellum* by carboxylic acid: a mechanism based on uncoupling by weak acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 53 - 62.
- Herzberger, E. e Radler, F. (1988). How hexoses and inhibitors influence the malate transport system in *Zygosaccharomyces bailii*. *Arch. Microbiol.*, 150, 37-41.
- Höfer, M. (1968). Estimation of pathways of glucose catabolism in *Rhodotorula gracilis*. *Foila Microbiol.*, 13 - 373.
- Jay, J. M. (1986). *Modern Food Microbiology.*, (3 ed.). New York: Van Nostrand Reinhold Company.
- Johnson, F. H., Eyring, H. e Polissar, M. J. (1954). *The Kinetics Basis of Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Käppeli, O. (1986). Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeast. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 28, 181 - 209.
- Kotyk, A. (1989). Methods of Determining Intracellular pH with Electrodes. In: Kotyk, A. e Slavík, J. *Intracellular pH and its Measurement*. Boca Raton: CRC Press, Inc., 29 - 36.
- Krebs, H. A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A. e Bedoya, F. (1983). Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem. J.*, 214, 657 - 663.
- Kreger-van Rij, N. J. W. (ed. lit.) (1984). *The Yeast a Taxonomic Study*. (3 ed.). Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V.
- Kurita, N. e Koike, S. (1983). Synergistic antimicrobial effect of ethanol, sodium chloride, acetic acid and essential oil components. *Agr. Biol. Chem.*, 47, 67-75.

- Larpent, J. P. (1991). *Biotechnologie des Levdures*. Masson, Paris.
- Leão, C. (1984). Toxicidade do Etanol e outros Alcanóis para a Levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Alvos e Mecanismos de Acção. *Tese de doutoramento*, Universidade do Minho, Braga.
- Leão, C. e van Uden, N. (1982). Effects of ethanol and other alkanols on the kinetics and the activation parameters of thermal death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 1581 - 1590.
- Leão, C. e van Uden, N. (1983-a). Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2601 - 2604.
- Leão, C. e van Uden, N (1983-b) - Effects of ethanol and other alkanols on the ammonium transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 2085 - 2090.
- Leão, C., van Uden, N. (1984-a). Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 774, 43-48.
- Leão, C. e van Uden, N. (1984-b) Effects of ethanol and other alkanols on the general amino-acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 26,403 - 405.
- Leão, C. e van Uden, N (1985). Effects of ethanol and other alkanols on the temperature relations of glucose transport and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Biotechnol.*, 22, 359 - 363.
- Leão, C. e van Uden, N. (1986). Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Candida utilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 289 - 293.
- Legan, J. D. e Voysey, P. A.(1991) Yeast spoilage of bakery products and ingredients. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 361-371.
- Liewen, M. e Marth, E. H. (1985) Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid: a Review. *J. Food Protect.*, 48, 364-375.
- Lehninger, A. L. (1977). *Biochemistry* (2ª ed.), Worth Publishers Inc., Nova Iorque.
- Leo, A., Hansch , C. e Elkins, D. (1971). Partition coefficient and their uses. *Chemical Reviews*, 71, 525 - 616.

- Loureiro, V. B. (1984). Toxicidade do Etanol em Leveduras: Efeitos sobre o Crescimento e Viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae*. *Tese de doutoramento*, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Loureiro, V. B. e van Uden, N. (1982). Effects of ethanol on the maximum temperature for growth of *Saccharomyces cerevisiae*: a model. *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 1881 - 1884.
- Loureiro - Dias, M. C. e Peinado, J. M. (1984). Transport of maltose in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of pH and potassium ions. *The Biochem. J.*, 22, 293-298.
- Loureiro - Dias, M. C., Pampulha, E. e Santos, H. (1989). Studies on the effect of ethanol and of acetic acid on yeast performance. *In: Resumos do XIII International Specialized Symposium on Yeasts*. Leuven, Bélgica.
- Madeira - Lopes, A. (1974). Inheritance of the maximum temperature for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciênc. Biol. (Portugal)*, 1, 89-92.
- Madeira - Lopes, A. (1982). Efeitos da Temperatura no Crescimento e na Morte de Populações de Leveduras. Relatório - Síntese apresentado ao Instituto Gulbenkian de Ciência, Lisboa.
- Madeira - Lopes, A. (1987). Efeitos da Temperatura e de Drogas nas Relações entre a Morte Térmica e o Crescimento em Leveduras. *Tese de doutoramento*, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Madeira - Lopes, A. (1992). Thermobiology of yeast: a sketch. *In: Profiles on Biotechnology. (Separata)* Vella, T. G e Abalde, J. (Eds.). Universidade de Santiago de Compostela, 155-172.
- Maiorella, B., Blanch, H. W. e Wilke, C. R. (1983). By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 103 - 121.
- Malfeito - Ferreira, M. (1990). Ecologia, Fisiologia e Controlo Microbiológico de Leveduras de Alteração de Alimentos. Síntese bibliográfica apresentada para provas de aptidão pedagógica e capacidade científica, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Malfeito - Ferreira, M., St Aubyn, A. e Loureiro, V. B. (1989). Rapid testing to differentiate between fermenting and spoilage yeast in wine. *Yeast*, 5, s47 - s51.
- Malpartida, F. e Serrano, R. (1981-a). Reconstitution of the proton translocating adenosine triphosphate of yeast plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, 256, 4175 - 4177.

- Malpartida, F. e Serrano, R. (1981-b). Yeast plasma membrane ATPase reconstituted in liposomas. *FEBS Lett.*, 131, 351 - 354.
- Millar, D. G., Griffiths - Smith, K., Algar, E. e Scopes, R. K. (1982). Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnol. Lett.*, 4(9), 601 - 606.
- Mitchell, P. (1961) - Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191, 144 - 148.
- Moon, N. J. (1983). Inhibition of growth of acid tolerant yeast by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *J. Appl. Bacteriol.*, 55, 453 - 460.
- Neal, A. L., Weinstock, J. O., Lampen, J. O. (1965). Mechanisms of fatty acid toxicity for yeast. *J. Bacteriol.*, 90, 126 - 131.
- Neumayr, L., Heyderhoff, G. e Krämer, J. (1989). Differences in the resistance between vegetative cells and ascospores of selected yeast - strains against disinfectants on the basis of biguanides, peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *Yeast*, 5 (Special issue), 17 - 22.
- NP - 1735. (1986). Aditivos alimentares. Definição, classificação e princípios de aplicação. Lisboa, Instituto Português da Qualidade.
- NP - 4136. (1991). Aditivos alimentares. Conservantes. Definição e designação pureza, acondicionamento e marcação. Lisboa, Instituto Português da Qualidade.
- Ohsumi, Y e Anraku, Y. (1981). Active transport of basic aminoacids by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol.Chem.*, 265(5), 2079-2082.
- Okorokov, L. A. (1985). *Main Mechanisms of Ion Transport and Regulation of Ion Concentration in the Yeast Cytoplasm. In: Environmental Regulation of Microbial Metabolism.* Kulaev, I. S., Dawes, E. A., Tempest, D. W. (Eds.). Academic Press, London, 339-350.
- Okorokov, L. A. e Lichko, L. P. (1983). The identification of a proton pump on vacuoles of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *FEBS Lett.*, 155, 102 - 106.
- Osothsilp, C. e Subden, R. E. (1986). Malate transport in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.*, 168, 1439 - 1443.

- Pampulha, M. E. (1989). Efeito do Ácido Acético na Fermentação e nos Parâmetros de Crescimento em *Saccharomyces cerevisiae*. *Tese de doutoramento*, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Pampulha, M. E. e Loureiro, V. (1989). Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Let.*, *11*, 269 - 274.
- Pampulha, M. E. e Loureiro - Dias, M. C. (1989). Combined effects of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *31*, 547 - 550.
- Pampulha, M. E. e Loureiro - Dias, M. C. (1990). Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *34*, 375 - 380.
- Pelczar, M., Reid, R. e Chan, E. C. S. (1980). *Microbiologia*. vol. I Editora McGraw - Hill do Brasil, Brasil.
- Phaff, H. J., Miller, M. W. e Mrak, E. M. (1978). *The Life of Yeasts*, (2nd. ed.). Harvard University Press, Boston, USA.
- Pilkington, B. J. e Rose, A. H. (1989). Accumulation of sulphit by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* as affected by phospholipid fatty - acyl unsaturation and chain length. *J. Gen. Microbiol.*, *135*, 2423 - 2428.
- Pinto I., Cardoso, H., Leão, C. e van Uden, N. (1989) - High enthalpy and low enthalpy death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by acetic acid. *Biotechnol. Bioeng.* *33*, 1350 - 1352.
- Pitt, J. I. (1974). Resistance of some food spoilage yeasts to preservatives. *Food. Techn. in Australia*, *6*, 238 - 241.
- Pitt, J. I. e Hocking, A. (1985). *Fungi and Food Spoilage*. Academic Press, Sydney.
- Portugal. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. Decreto - Lei nº 192/89. D. R.: I Série, 89/06/08 (131), 2254 - 2256.
- Portugal. Ministérios do Planeamento e da Administração do Território, da Agricultura, Pescas e Alimentação e da Saúde. Portaria nº 833/89. D. R.: I Série, 89/9/22 (219), 4227 - 4237.

- Portugal. Ministérios da Agricultura, Pescas e Alimentação, da Saúde e do Ambiente e Recursos Naturais. Portaria nº 882/91. D.R.: I Série - B, 91/8/28 (197), 4451 - 4453.
- Put, H. M. C. e De Jong. J. (1982). Heat resistance studies of yeasts: vegetative cells versus ascospores: erythromycin inhibition of sporulation in *Kluyveromyces* and *Saccharomyces* species. *J. Appl. Bacteriol.*, 53, 70 - 73.
- Quintas, C. (1993). Efeito do Ácido Benzoico no Crescimento de *Zygosaccharomyces bailii*. *Tese de mestrado*, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Radler, F. (1986). Microbial Biochemistry. *Experientia*, 42, 884 - 893.
- Radler, F. (1993). Yeasts - Metabolism of Organic Acids. *In: Wine Microbiology and Biotechnology*. Fleet, G. H. (ed). Harwood Academic Publishers, Sidney.
- Radler, F. e Schütz, H. (1982). Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*. *Am. J. Enol. Vitic.*, 33 (1), 36-40.
- Ramos, M. T. e Madeira - Lopes, A. (1990). Effects of acetic acid on the temperature profile of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, 3 (22), 229 - 234.
- Rankine, B. C. e Pilone, D. A. (1973). *Saccharomyces bailii*, a resistant yeast causing serious spoilage of bottled table wine. *Americ. J. Enol. Vitic.*, 24 (2), 55 - 58.
- Ribéreau - Gayon, J. Peynaud, E., Ribéreau - Gayon, P. e Sudraud, P. (1982). *Traité d'Oenologie. Sciences e Tecnic du Vin*. vol. 1, 2^e Edition, Bordas.
- Restaino, L., M. Lenovich, M. e Bills S. (1982) Effects of acids and sorbate combinations on the growth of four osmophilic yeasts. *J. Food Protect.*, 45, 1138-1142.
- Rodrigues Alves, A., Morais - Janeiro, M. e Madeira - Lopes, A. (1992). Effects of acetic acid on the temperature range of ethanol tolerance in *Candida shahetae* growing on D - xylose. *Biotechnol. Lett.*, 14, 1181 - 1186.
- Rose, A. H. (1977). History and scientific basis of alcoholic beverage production. *In: Economic Microbiology - Alcoholic Beverages*. vol.1 A. H. Rose (ed.) Academic Press, 1 - 37.
- Rottenberg, H. (1979). The measurement of membrane potencial and pH in cells, organelles and vesicles. *In: Methods in Enzymology*. Fleischer, S. and Packer, L. (eds). Academic Press, New York.

- Sá - Correia, I. (1986). Synergistic effects of ethanol, octanoic and decanoic acids on the kinetics and the activation parameters of thermal death in *Saccharomyces bayanus*. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 761 - 763.
- Sá - Correia, I. e van Uden, N. (1982). Effects of ethanol on thermal death and on the maximum temperature for growth of the yeast *Kluyveromyces fragilis*. *Biotchnol. Lett.*, 4 (12), 805 - 808.
- Sá - Correia, I. e van Uden, N. (1983). Temperature profiles of ethanol tolerance: effects of ethanol on the minimum and the maximum temperatures for growth of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 1665 - 1667.
- Schlegel, H. G. (1986). *General Microbiology* (6th ed.). Cambridge University Press.
- Seiler, D. A. (1980). Yeast Spoilage of Bakery Products. *In: Biology and Activities of Yeasts* Ed. Skinner, F. A., Passmore, S. M. e Davenport, R. R., Academic Press. Inc., London, 135 - 152.
- Serrano, R. (1977). Energy requirements for maltose transport in yeast. *Europ. J. Biochem.*, 80, 97-102.
- Serrano, R. (1984). Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. *Curr. Top. Cell Regul.*, 23, 87 - 126.
- Serrano, R. (1988). Structure function of proton translocation ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim. Biophys. Acta*, 947, 1 - 28.
- Sierkstra, L. N., Nouvew, N. P., Verbakel, J. A. e Theo Verrips, C. (1993). Regulation of glycolytic enzymes and crabtree effect in galactose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 9, 787-795.
- Simões - Mendes, B., Madeira - Lopes, A. e van Uden, N. (1978). Kinetics of petite mutation and thermal death in *Saccharomyces cerevisiae* at superoptimal temperature. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 18, 275 - 279.
- Singer, S. J. e Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, 720 - 731.

- Sousa, M. J. (1993). Utilização do Ácido Málico pela Levedura *Schizosaccharomyces pombe*. Estudos Fundamentais e Aplicação na Desacidificação de Vinhos Verdes. *Tese de doutoramento*, Instituto de Ciências de Abel Salazar da Universidade do Porto, Porto.
- Sousa, M. J., Mota, M. e Leão, C (1992). Transport of malic acid in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: evidence for a proton dicarboxylate symport. *Yeast*, 8, 1025- 1031.
- Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. e Painter, P. R. (1986). *The Microbial World*. (5ª ed.) Prentice - Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Taillandier, N. W. e Orton, W. L. (1975). Malate utilization by *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotechnol. Lett.*, 10, 469 - 472.
- Tanaka, A., Osumi, M. e Fukui, S. (1982). Peroxisomes of alkane-grow yeast: fundamental and practical aspects. *Annals of the New York Academy of Science*, 386, 183-199.
- Thomas, D. S. e Davenport, R. R. (1985). *Zygosaccharomyces bailii* - a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiol.*, 2, 157 - 169.
- Tilbury, R. H. ed. lit. (1980). *Developments in Food Preservatives - 1*. London: Appl. Science Publishers.
- Umbreit, W. W., Burris, R. H. e Stauffer, J. F. (1964). *Manometric Techniques*. 4 th ed. Minneapolis, Minnesota: Burgess Publishing Comp.
- Vallejo, C. G. e Serrano, R. (1989). Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane H⁺ - ATPase. *Yeast*, 5, 307 - 309.
- Verduyn, C. (1991-a). Energetic Aspects of Metabolic Fluxes in Yeast. *Tese de Doutoramento*, Delft University of Technologie, Delft.
- Verduyn, C. (1991-b). Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie van Leeuwenhoek*, 60, 325 - 353.
- van Dijken, J. P. e Scheffers, W. A. (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Reviews*, 32, 199 - 224.
- van Uden, N. (1967). Transport limited fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* and its competitive inhibition. *Arch. Microbiol.*, 58, 155 - 168.

- van Uden, N. (1969). Kinetics of nutrient-limited growth. *Ann. Rev. Microbiol.*, 23, 473-486.
- van Uden, N. (1971). Kinetics and Energetics of Yeast Growth. *In: The Yeast*. Rose, A. e Harison, J. S (eds), 2, Academic Press, London.
- van Uden, N. (1974). Aspectos Cinéticos, Energéticos e Ecológicos da Morte Celular. Estudos Teóricos e Experimentais com Leveduras. *Tese de doutoramento*, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- van Uden, N. (1983). Temperature profiles of yeasts. *In: Advances in Microbiol. Physiol.*, 25, 000 - 000. Academic Press, London.
- van Uden, N. (1984-a). Temperature profiles of yeasts. *Advances in Microbiol. Physiology*, 25, 195-251.
- van Uden, N. (1984-b). Cardinal temperatures of yeasts. *CRC Critical Rev., Biotechnol.*, 6,1-8.
- van Uden, N. (1985). Ethanol Toxicity and Ethanol Tolerance. *In: Yeasts. Ann. Rep. Ferm. Proc.*
- van Uden, N. (1989-a). Alcohol Toxicity in Yeasts and Bacteria. N. van Uden (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- van Uden, N. (1989-b). Effects of alcohols on the temperature relations of growth and death in yeasts. *In: Alcohol Toxicity in Yeasts and Bacteria*. N. van Uden (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- van Uden, N. (1989-c). Effects of alcohols on membrane transport in yeasts. *In: Alcohol Toxicity in Yeasts and Bacteria*. N. van Uden (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- van Uden, N. e Cruz Duarte, H. (1981). Effects of ethanol on the temperature profile of *Saccharomyces cerevisiae*. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 21,743-750.
- van Uden, N. e Madeira - Lopes, A. (1970). Concurrent exponential growth and death of cell population of *Saccharomyces cerevisiae* at superoptimal growth temperatures. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 10, 515 - 526.

- van Uden, N. e Madeira - Lopes, A. (1975). Dependence of the maximum temperature for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on nutrient concentration. *Archiv. Microbiol.*, 104, 23 - 28.
- van Uden, N. e Madeira - Lopes, A. (1976). Yield and maintenance relations of yeasts growth in the chemostat at superoptimal temperatures. *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 791 - 804.
- van Uden, N. e Vidal - Leiria, M. M. (1976). Thermodynamic compensation in microbial thermal death. Studies with yeasts. *Archiv. Microbiol.*, 108, 293 - 298.
- van Uden, N., Abranches, P. e Cabeça - Silva, C. (1968). Temperature functions of thermal death in yeasts and their relation to the maximum temperature for growth. *Archiv. Microbiol.*, 61, 381 - 393.
- Warth, A. D. (1977). Mechanism of resistance of *Saccharomyces bailii* to benzoic, sorbic and other weak acids used as food preservatives. *J. Appl. Bacteriol.*, 43, 215 - 230.
- Warth, A. D. (1986). Effect of nutrients and pH on the resistance of *Zygosaccharomyces bailii* to benzoic acid. *Inter. J. Food Microbiol.*, 3, 263 - 271.
- Warth, A. D. (1988). Effect of benzoic acid on growth yield of yeasts differing in their resistance to preservatives. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2091 - 2095.
- Warth, A. D. (1989-a). Transport of benzoic and propanoic acids by *Zygosaccharomyces bailii*. *J. of Gen. Microbiol.*, 135, 1383 - 1390.
- Warth, A. D. (1989-b). Relationship among cell size, membrane permeability, and preservative resistance in yeast species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2995 - 2999.
- Warth, A. D. (1991-a). Mechanism of action of benzoic acid on *Zygosaccharomyces bailii*: effects on glycolytic metabolite levels, energy production, and intracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3410 - 3414.
- Warth, A. D. (1991-b). Effect of benzoic acid on glycolytic metabolite levels and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3415 - 3417.
- Whiteley, L. e Simpson, D. (1978). The microbiological stability of white wines. *Long Ashton Report: 174 - 176*.
- Willians, B. L. e Wilson K. (Eds) (1981). A Biologist's guide to Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Second edition, Arnold.