

**ANA PAULA FIGUEIRA VAZ FERNANDES**

**LEVEDURAS ISOLADAS DE PRODUTOS FRUTÍCOLAS:  
CAPACIDADE FERMENTATIVA E ESTUDOS SOBRE A  
H<sup>+</sup>-ATPase DA MEMBRANA PLASMÁTICA**

Dissertação apresentada para obtenção  
do Grau de Doutor em Biologia  
(especialidade Microbiologia), pela  
Universidade Nova de Lisboa,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia.

**Lisboa**

**2008**



nº de arquivo

“Copyright”



ANA PAULA FIGUEIRA VAZ FERNANDES

**LEVEDURAS ISOLADAS DE PRODUTOS FRUTÍCOLAS:  
CAPACIDADE FERMENTATIVA E ESTUDOS SOBRE A  
H<sup>+</sup>-ATPase DA MEMBRANA PLASMÁTICA**

Dissertação apresentada para obtenção  
do Grau de Doutor em Biologia  
(especialidade Microbiologia), pela  
Universidade Nova de Lisboa,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia.

**Lisboa**

**2008**



---

## **Agradecimentos**

Quero deixar o meu agradecimento à Professora Isabel Spencer-Martins por me ter acolhido e integrado no seu grupo de trabalho, pela sua orientação e sugestões sempre preciosas e que nunca me faltaram.

À Helena Rodrigues de Sousa, pela sua orientação nesta tese. O seu entusiasmo e apoio foram importantes para a conclusão deste trabalho.

Quero deixar um agradecimento muito especial ao colega César Fonseca que sempre, e de uma forma desinteressada, se disponibilizou a ajudar-me e cuja permanente colaboração favoreceu a execução prática dos trabalhos laboratoriais. Fica a amizade que perdurará por muito e muito tempo.

Aos colegas João Inácio e Marco Coelho que sempre se disponibilizaram a ajudar e com quem partilhei momentos de grande companheirismo. Às colegas Vera, Sofia, Sílvia e à Mónica Branco. À colega Maria da Luz, pelo seu exemplo de força de trabalho e incentivo para a execução deste trabalho.

Aos colegas da Universidade Aberta: Sandra Caeiro, Ana Paula Martinho e Fernando Caetano. Às Professoras Carla Oliveira, Cristina Carapeto e Filomena Amador da Universidade Aberta.

Aos meus pais pelo incentivo e constante cuidado pela filha mais nova. À Lena que sempre me incentivou e motivou para o desenvolvimento deste trabalho. A toda a minha família.

Ao Vitor, pela compreensão e especial incentivo ao longo de todo este tempo. Ao Miguel, pelos momentos que foi privado da companhia da mãe.





---

## Resumo

São muitas as leveduras capazes de fermentar glucose produzindo etanol e dióxido de carbono. Contudo, *Saccharomyces cerevisiae* destaca-se pela velocidade com que fermenta e pela concentração de etanol que pode atingir. Algumas estirpes de *S. cerevisiae* chegam a produzir cerca de 20% v/v etanol, enquanto a maioria das outras leveduras fermentativas deixa de crescer e/ou de fermentar a partir de 6% v/v. Apesar do crescente conhecimento acerca dos alvos celulares associados à toxicidade do etanol, os mecanismos subjacentes aos desempenhos das diferentes leveduras ainda estão longe de ser totalmente conhecidos ou esclarecidos.

O objectivo principal deste projecto foi o de identificar mecanismos-chave que possam conduzir a um aumento da eficiência na produção de etanol por leveduras não-*Saccharomyces* isoladas de fruta comum na alimentação humana (ananás, banana, maçã, manga, papaia, pêsego e uva). Foram objectivos específicos do trabalho realizado: (i) desenvolver um método de hibridação *in situ* (FISH) para identificação rápida e directa de leveduras que ocorrem em produtos frutícolas; (ii) avaliar a capacidade fermentativa global de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas de produtos frutícolas; (iii) estudar a influência do etanol na H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática em leveduras não-*Saccharomyces*; e (iv) caracterizar o gene que codifica a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática em leveduras não-*Saccharomyces*.

Depois de uma introdução geral aos vários aspectos da investigação realizada, no segundo capítulo são apresentados os resultados do isolamento de leveduras e sua identificação. Descreve-se o processo de isolamento de 20 estirpes (representantes de sete espécies pertencendo a seis géneros diferentes) a partir do material escolhido, identificação morfo-fisiológica e bioquímica das leveduras isoladas e a identificação molecular, através da sequenciação da região D1/D2 do gene do RNA ribossómico da subunidade 26S, das leveduras fermentativas. Foram desenvolvidas, e aplicadas, sondas oligonucleotídicas específicas para a detecção directa e identificação, através do método de hibridação *in situ* (FISH), de quatro espécies de leveduras que ocorreram com maior frequência na fruta amostrada: *Candida quercitrusa*, *C. pseudointermedia*, *Pichia guilliermondii* e *Hanseniaspora uvarum*.

---

O terceiro capítulo incide sobre a avaliação global da capacidade fermentativa de sete leveduras seleccionadas, através da determinação de dois parâmetros: a concentração máxima de etanol produzido e as velocidades específicas de fermentação e de respiração. Tendo em vista comparar de forma expedita leveduras com capacidades fermentativas marcadamente diferentes, foi desenvolvido um método com base na perda da viabilidade celular em função da concentração de etanol adicionado ao meio de cultura e temperatura de incubação. Os ensaios foram realizados em duas condições: 11% v/v etanol/30 °C e 20% v/v etanol/16 °C. O capítulo termina com a determinação da actividade da ATPase da membrana plasmática, essencial para a célula responder com eficácia à agressão pelo etanol, das espécies de levedura isoladas. Nestes estudos foram utilizados como termo de comparação a bem estudada *S. cerevisiae* e a sua espécie muito próxima *S. bayanus*.

O quarto capítulo é dedicado à caracterização da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática das espécies de levedura seleccionadas. Foi determinado o pH ótimo para a actividade da H<sup>+</sup>-ATPase, assim como avaliada a influência do etanol presente no meio de cultura nessa actividade. Com base em regiões conservadas do gene *PMA1* da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática de leveduras cujas sequências genómicas já estão disponíveis publicamente, procedeu-se à pesquisa do gene *PMA1* nas espécies não-*Saccharomyces* seleccionadas neste estudo. Os fragmentos amplificados por PCR foram sequenciados e as sequências obtidas foram analisadas com dois objectivos: a) tentar compreender se as diferenças detectadas se poderão relacionar com as diferentes características fenotípicas observadas; e b) avaliar a possibilidade de inferir sobre relações filogenéticas entre espécies.

A dissertação termina com considerações globais sobre os resultados obtidos e apresentação de perspectivas para trabalho futuro no tópico abordado no presente trabalho.

---

## Abstract

Many yeast species are able to ferment glucose, producing ethanol and carbon dioxide. However, in contrast to *Saccharomyces cerevisiae* and closely related species, most yeasts are unable to produce ethanol at high rates and to exceed concentrations around 6% v/v. Despite the increasing knowledge on cellular targets and genes involved in ethanol toxicity, the mechanisms underlying the marked different performances of fermentative yeast species have not been systematically investigated or clearly identified.

This project meant to contribute to the identification of key mechanisms that might lead to an increased efficiency in ethanol production of non-*Saccharomyces* yeast species isolated from common fruits (pineapple, banana, apple, mango, papaya, peach and grapes). Specific objectives of the studies described were: (i) to develop a *in situ* hybridisation (FISH) method for the direct and rapid identification of yeasts occurring in fruits; (ii) to evaluate the global fermentative capacity of non-*Saccharomyces* yeast species isolated from fruits; (iii) to determine the effect of ethanol on the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in non-*Saccharomyces* yeast species; and (iv) to characterise the *PMA1* gene encoding the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in non-*Saccharomyces* yeasts.

Following a general introduction to different aspects of the investigated topic, Chapter 2 focuses firstly on the procedure used to isolate yeasts from the fruit samples and on the identification, using both phenotypic characteristics and sequencing of the D1/D2 region of the ribosomal 26S RNA gene, of the 20 isolates (representing seven species belonging to six different genera). It then reports the design, and application, of fluorescent DNA probes for the direct detection and specific identification of the four most frequently occurring species in the sampled fruit: *Candida pseudointermedia*, *C. quercitrusa*, *Pichia guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum*.

A global evaluation of the fermentative capacity shown by yeast species isolated in the course of this work is described in Chapter 3. Both the maximum ethanol concentration produced and specific fermentation/respiration rates, using the Warburg method, were determined. With a view to rapidly compare yeasts with a markedly different fermentative ability, loss of cell viability in the presence of ethanol added to the culture medium was determined at specific temperatures. Two experimental conditions were tested: 11% v/v

---

ethanol/30 °C and 20% v/v ethanol/16 °C. Finally, considering the essential role played by the plasma membrane ATPase in the response to toxic ethanol effects, the activity of this enzyme was determined for all isolated yeast species, under standard reaction conditions. For comparative purposes, the well-studied *S. cerevisiae* and its closely related species *S. bayanus* were included in the experiments performed.

Chapter 4 is centered on further characterisation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of selected isolated yeasts. The optimum pH for maximal activity was determined as well as the influence of ethanol present in the growth medium on the basal activity. Based on conserved regions of the *PMA1* gene from yeasts whose genomic sequences are available in public databases, primers were designed for PCR amplification of *PMA1* from the different isolated non-*Saccharomyces* species. The amplified fragments were sequenced and the sequences analysed with two objectives: a) to understand whether a relationship could be established between differences detected at the putative protein level and differential phenotypic properties observed; and b) to evaluate the potential usefulness of *PMA1*, as a housekeeping gene and an additional genetic marker, to distinguish between species and to infer about phylogenetic relationships in yeasts.

To conclude, overall remarks about the results obtained are presented and an outlook to future work on the topic of interest is provided.

---

## Lista de Abreviaturas

A	Adenina
A <sub>640</sub>	Absorvência ao comprimento de onda indicado
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Citosina
CMA	Meio <i>Corn Meal Agar</i>
D1/D2	Domínios 1 e 2 do rRNA 26S
DBB	Corante Azul de Diazônio B
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido-trifosfato
DTT	<i>1,4-Dithiotreitol</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
G	Guanina
GYP	Meio de glucose/ <i>Yeast Extract/ Peptone</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IGS	<i>Intergenic Spacer</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
kb	kilobases
k <sub>d</sub>	Taxa específica de morte
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MYP	Meio <i>Malt Extract/ Yeast Extract/ Soytone</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NRRL	<i>ARS Culture Collection, Peoria, USA</i>
p.s.	Peso seco
p/v	peso/volume
pb	Pares de bases
PBS	Tampão Salino de Fosfato ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
P <sub>i</sub>	Fosfato inorgânico
<i>PMA1</i>	Gene da H <sup>+</sup> -ATPase da membrana plasmática
Pma1p	Proteína PMA1
PNA	<i>Peptide Nucleic Acid</i>
ppm	Partes por milhão
PYCC	<i>Portuguese Yeast Culture Collection, FCT/UNL, Caparica, Portugal</i>
q <sub>s</sub>	Taxa específica consumo do substrato
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
S	Concentração do substrato
S <sub>0</sub>	Concentração do substrato inicial
SDS	Dodecil-sulfato de sódio ( <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> )
T	Timina

---

## Lista de Abreviaturas (Cont.)

TCA	Ácidos tricarboxílicos
TE	Tampão Tris/EDTA
$t_d$	Tempo de duplicação
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
Tween 80	Mono-oleato de polioxietileno 20 sorbitano
UFC	Unidades formadoras de colónias
$V_{max}$	Velocidade máxima
v/v	volume/volume
X	Densidade populacional
$X_0$	Densidade populacional inicial
Y	Coeficiente de rendimento
YCB	Meio <i>Yeast Carbon Base</i>
YM	Meio <i>Yeast Malt Extract</i>
YNB	Meio <i>Yeast Nitrogen Base</i>
$\Delta pH$	Gradiente pH transmembrantar
$\Delta\Psi$	Potencial de membrana
$\mu$	Taxa específica de crescimento

## Lista de Abreviaturas de Géneros de Microrganismos

C.	<i>Candida</i>
D.	<i>Debaryomyces</i>
E.	<i>Escherichia</i>
H.	<i>Hanseniaspora</i>
K.	<i>Kloeckera</i>
Kl.	<i>Kluyveromyces</i>
L.	<i>Lodderomyces</i>
N.	<i>Neurospora</i>
P.	<i>Pichia</i>
Pa.	<i>Pachysolen</i>
S.	<i>Saccharomyces</i>
Sch.	<i>Schizosaccharomyces</i>
S´codes	<i>Saccharomycodes</i>
sp. nov.	Espécie nova
T.	<i>Torulaspora</i>
Z.	<i>Zygosaccharomyces</i>
Y.	<i>Yarrowia</i>

---

# Índice de Matérias

## Capítulo 1. Introdução geral

1.1. Leveduras e sua ecologia	3
1.2. Cinética e energética do crescimento microbiano em sistema fechado	5
1.3. Tipo de metabolismo em leveduras: metabolismo de açúcares e sua regulação	8
1.4. Efeitos do etanol na actividade das leveduras	12
1.5. A importância do estudo das leveduras não- <i>Saccharomyces</i>	17
1.6. Objectivos do trabalho e plano da dissertação	17

## Capítulo 2. Leveduras de produtos frutícolas: isolamento, identificação e detecção por FISH

2.1. Introdução	23
2.1.1. Identificação fenotípica	23
2.1.2. Identificação molecular	23
2.1.3. Hibridação <i>in situ</i> com sondas fluorescentes (FISH)	26
2.1.4. Estudos descritos neste capítulo	30
2.2. Materiais e métodos	31
2.2.1. Produtos frutícolas e seu tratamento	31
2.2.2. Isolamento de leveduras	31
2.2.3. Identificação das leveduras isoladas	32
2.2.3.1. Caracterização fenotípica	32
2.2.3.2. Identificação molecular	35
2.2.4. Identificação por hibridação <i>in situ</i> – FISH	37
2.3. Resultados e discussão	40

## Capítulo 3. Caracterização fermentativa global de leveduras seleccionadas

3.1. Introdução	55
3.1.1. Fermentação alcoólica em leveduras	55
3.1.2. Avaliação da capacidade fermentativa	60
3.1.3. Influência do etanol e temperatura na viabilidade celular	61
3.1.4. Actividade da H <sup>+</sup> -ATPase da membrana plasmática	65
3.1.5. Estudos descritos neste capítulo	67
3.2. Materiais e métodos	68
3.2.1. Leveduras	68
3.2.2. Meios e condições de cultura	68
3.2.3. Determinação de glucose e etanol	70
3.2.4. Quantificação da biomassa seca	71

---

3.2.5. Determinação das taxas específicas de fermentação e de respiração .....	71
3.2.6. Quociente respiratório (QR).....	75
3.2.7. Efeito do etanol e temperatura na viabilidade celular.....	75
3.2.8. Determinação da actividade da H <sup>+</sup> -ATPase da membrana plasmática.....	76
<b>3.3. Resultados e discussão</b> .....	80
3.3.1. Capacidade de produção de etanol.....	80
3.3.2. Taxas específicas de fermentação e respiração.....	84
3.3.3. Perda de viabilidade celular por efeito combinado etanol/temperatura.....	87
3.3.4. Actividade da H <sup>+</sup> -ATPase da membrana plasmática.....	93
<b>Capítulo 4. Caracterização bioquímica e molecular da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática</b>	
<b>4.1. Introdução</b> .....	97
4.1.1. Estrutura e função da H <sup>+</sup> -ATPase da membrana plasmática em leveduras.....	97
4.1.2. Influência do pH e etanol na actividade da H <sup>+</sup> -ATPase.....	99
4.1.3. Caracterização dos genes <i>PMA1</i> e <i>PMA2</i> .....	102
4.1.4. Estudos descritos neste capítulo.....	104
<b>4.2. Materiais e métodos</b> .....	106
4.2.1. Leveduras.....	106
4.2.2. Meios e condições de cultura.....	106
4.2.3. Determinação do pH óptimo.....	107
4.2.4. Efeito do etanol na actividade da H <sup>+</sup> -ATPase da membrana plasmática.....	107
4.2.5. Amplificação e sequenciação do fragmento de <i>PMA1</i> .....	107
4.2.6. Construção de árvores filogenéticas.....	113
<b>4.3. Resultados e discussão</b> .....	114
4.3.1. Influência do pH e etanol na actividade da H <sup>+</sup> -ATPase da membrana plasmática.....	114
4.3.2. Sequências de <i>PMA1</i> e análise comparativa.....	120
4.3.3. Avaliação de relações filogenéticas.....	128
<b>Capítulo 5. Considerações finais e perspectivas</b> .....	135
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	145
<b>Apêndice I. Meios de cultura e soluções</b> .....	161
Meios de cultura.....	161
Mistura para lavagem de tubos de ensaio.....	163
Solução para detecção da produção de compostos amiláceos.....	163
Soluções para experiências de actividade da H <sup>+</sup> -ATPase membrana plasmática.....	164
Soluções para hibridação <i>in situ</i> .....	164
Soluções para extracção de DNA e visualização de bandas.....	166

---



---

Soluções para aplicação das amostras no gel de agarose.....	166
Soluções utilizadas na transformação de células <i>E. coli</i> competentes e sua selecção.....	166
Soluções para <i>minipreps</i> .....	167
<b>Apêndice II. Resultados dos testes e identificação fenotípica das leveduras isoladas.....</b>	<b>171</b>
<b>Apêndice III. Sequências nucleotídicas de <i>PMA1</i> como base para o desenho de <i>primers</i>....</b>	<b>175</b>



---

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1.</b>	Representação esquemática de uma célula de levedura.....	3
<b>Figura 1.2.</b>	Fases de crescimento de uma população de leveduras em sistema fechado.....	6
<b>Figura 1.3.</b>	Metabolismo da glucose em leveduras.....	9
<b>Figura 2.1.</b>	Representação esquemática das duas ampliações sucessivas realizadas para a sequenciação da região D1/D2 do gene do rRNA 26S.....	36
<b>Figura 2.2.</b>	Hibridação <i>in situ</i> com a sonda específica para <i>C. pseudointermedia</i> (Cps160, marcada com Cy3), utilizando 20% de formamida no tampão de hibridação. Controlo negativo - <i>C. intermedia</i> .....	44
<b>Figura 2.3.</b>	Hibridação <i>in situ</i> com a sonda específica para <i>C. quercitrusa</i> (Cqu163, marcada com Cy3), utilizando 20% de formamida no tampão de hibridação. Controlo negativo - <i>D. polymorphus</i> e <i>P. guilliermondii</i> .....	45
<b>Figura 2.4.</b>	Hibridação <i>in situ</i> com a sonda específica para <i>H. uvarum</i> (Hu508, marcada com Cy3), utilizando 20% de formamida no tampão de hibridação. Controlo negativo - <i>S. ludwigii</i> e <i>H. guilliermondii</i> .....	46
<b>Figura 2.5.</b>	Hibridação <i>in situ</i> com a sonda específica para <i>P. guilliermondii</i> (Pg362, marcada com Cy3), utilizando 20% de formamida no tampão de hibridação.....	47
<b>Figura 2.6.</b>	Detecção directa de leveduras das espécies <i>H. uvarum</i> e <i>P. guilliermondii</i> com as sondas específicas Pg362 e Hu508, desenvolvidas neste trabalho e aplicadas a suspensões celulares obtidas a partir de uva preta.....	49
<b>Figura 2.7.</b>	Detecção directa de leveduras da espécie <i>H. uvarum</i> com a sonda Hu508, desenvolvida neste trabalho e aplicada a suspensões celulares obtidas a partir de uva branca.....	50
<b>Figura 2.8.</b>	Detecção directa de leveduras da espécie <i>P. guilliermondii</i> com a sonda Pg362, desenvolvida neste trabalho e aplicada a suspensões celulares obtidas a partir de maçã.....	51
<b>Figura 2.9.</b>	Detecção directa de leveduras da espécie <i>P. guilliermondii</i> com a sonda Pg362, desenvolvida neste trabalho e aplicada a suspensões celulares obtidas a partir de ananás.....	52
<b>Figura 3.1.</b>	Ocorrência relativa de leveduras fermentativas.....	56
<b>Figura 3.2.</b>	Açúcares fermentáveis por leveduras e distribuição relativa da capacidade fermentativa no total de espécies actualmente reconhecidas.....	57
<b>Figura 3.3.</b>	Perfis de temperatura em leveduras e correspondentes efeitos da temperatura nos rendimentos em biomassa.....	63
<b>Figura 3.4.</b>	Perfis de temperatura da tolerância ao etanol do crescimento em glucose de <i>S. cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces fragilis</i> e <i>Candida wickerhamii</i> .....	64
<b>Figura 3.5.</b>	ATPases envolvidas no transporte de prótons através de membranas em leveduras.....	65

---

<b>Figura 3.6.</b>	Ilustração de um cromatograma para determinação de glucose e etanol por HPLC nas condições descritas no texto.....	70
<b>Figura 3.7.</b>	Esquema de uma unidade manométrica do aparelho de Warburg.....	72
<b>Figura 3.8.</b>	Variação do nível do Líquido de Brodie no ramo aberto do manómetro, em condições em que se verificou consumo de gases.....	73
<b>Figura 3.9.</b>	Recta de calibração para quantificação de proteína, usando como padrão albumina de soro de bovino e o <i>BCA<sup>TM</sup> protein KIT</i> (Pierce, Rockford, IL).....	77
<b>Figura 3.10.</b>	Recta de calibração para a quantificação de fosfato libertado no ensaio para determinação da actividade da ATPase, usando $\text{KH}_2\text{PO}_4$ como padrão.....	78
<b>Figura 3.11.</b>	Produção de $\text{CO}_2$ e consumo de $\text{O}_2$ em função do tempo por suspensões celulares de <i>S. cerevisiae</i> PYCC 4072 e de <i>H. uvarum</i> PYCC 5782, em glucose, pH 4,5 e 30 °C.....	84
<b>Figura 3.12.</b>	Taxas específicas de respiração (consumo de $\text{O}_2$ ) e de fermentação (produção de $\text{CO}_2$ ) de glucose, determinadas pelo método de <i>Warburg</i> , das leveduras em estudo.....	85
<b>Figura 3.13.</b>	Peso relativo da respiração e Quociente Respiratório nas leveduras em estudo....	86
<b>Figura 3.14.</b>	Efeito combinado do etanol e temperatura na viabilidade das leveduras seleccionadas. Condições: meio YM com agitação orbital (150 rpm), 11% v/v etanol e 30 °C.....	88
<b>Figura 3.15.</b>	Efeito combinado do etanol e temperatura na viabilidade das leveduras seleccionadas. Condições: meio YM com agitação orbital (150 rpm) 20% v/v etanol e 16 °C.....	89
<b>Figura 4.1.</b>	Modelo topológico da $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática de leveduras, incluindo mapa de mutações.....	99
<b>Figura 4.2.</b>	Actividade da $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática na fracção membranar total de células preparadas a partir de <i>S. cerevisiae</i> IGC 3507 III cultivadas na ausência ou presença de 6% v/v etanol, em função do pH.....	100
<b>Figura 4.3.</b>	Actividade da $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática de <i>P. stipitis</i> NRRL Y7124 cultivada em D-xilose ou D-glucose em função do pH.....	100
<b>Figura 4.4.</b>	Actividade da $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática de <i>S. cerevisiae</i> IGC 3507 III cultivada sem ou com concentrações crescentes de etanol.....	101
<b>Figura 4.5.</b>	Actividade da $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática de <i>P. stipitis</i> NRRL Y7124 cultivada em xilose ou glucose, com quantidades crescentes de etanol adicionado ao meio de cultura.....	102
<b>Figura 4.6.</b>	Influência do pH na actividade específica da $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática das leveduras. Condições de ensaio: 30 °C, $[\text{ATP}] = 2 \text{ mM}$ .....	115
<b>Figura 4.7.</b>	Efeito do etanol adicionado ao meio de cultura na actividade específica da $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática das leveduras. Condições de ensaio: 16 °C, $[\text{ATP}] = 2 \text{ mM}$ .....	117

---

- 
- Figura 4.8.** Alinhamento dos aminoácidos das proteínas putativas obtidas por tradução dos fragmentos dos genes *PMA1* comparando com a sequência de *PMA1* de *S. cerevisiae* e com as sequências homólogas de outras leveduras e fungos filamentosos disponíveis em bases de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)..... 121
- Figura 4.9.** Árvore filogenética baseada na análise das sequências proteicas putativas a partir de sequências nucleotídicas de H<sup>+</sup>-ATPases da membrana plasmática obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância baseada em matriz JTT). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições..... 130
- Figura 4.10.** Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S, obtida pelo método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 10.000 repetições..... 131



---

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 2.1.</b>	Fluorocromos mais utilizados na marcação de sondas de DNA.....	29
<b>Tabela 2.2.</b>	Sondas de DNA para identificação por FISH e respectivos alvos.....	37
<b>Tabela 2.3.</b>	Leveduras isoladas neste estudo e respectiva ocorrência relativa.....	41
<b>Tabela 3.1.</b>	Inibidores das ATPases vacuolar, da membrana plasmática e mitocondrial em <i>S. cerevisiae</i> (van der Rest <i>et al.</i> , 1995).....	66
<b>Tabela 3.2.</b>	Conteúdo dos frascos de Warburg para a determinação das taxas específicas de fermentação e de respiração das leveduras estudadas.....	73
<b>Tabela 3.3.</b>	Produção de etanol pelas leveduras seleccionadas, em meio YPD, 16 °C, com agitação, e em condições de semi-anaerobiose.....	81
<b>Tabela 3.4.</b>	Efeito combinado do etanol e temperatura na morte das leveduras seleccionadas.	91
<b>Tabela 3.5.</b>	Actividade da H <sup>+</sup> -ATPase da membrana plasmática das leveduras estudadas.....	94
<b>Tabela 4.1.</b>	Mistura utilizada nas reacções de PCR para amplificação do fragmento <i>PMA1</i> com <i>primers</i> degenerados.....	110
<b>Tabela 4.2.</b>	Mistura utilizada nas reacções de PCR para confirmação da presença de inserto com 2,1 kb no plasmídeo <i>pMOSBlue</i> .....	111
<b>Tabela 4.3.</b>	<i>Primers</i> usados na reacção de sequenciação do fragmento de <i>PMA1</i> para leveduras não- <i>Saccharomyces</i> .....	112





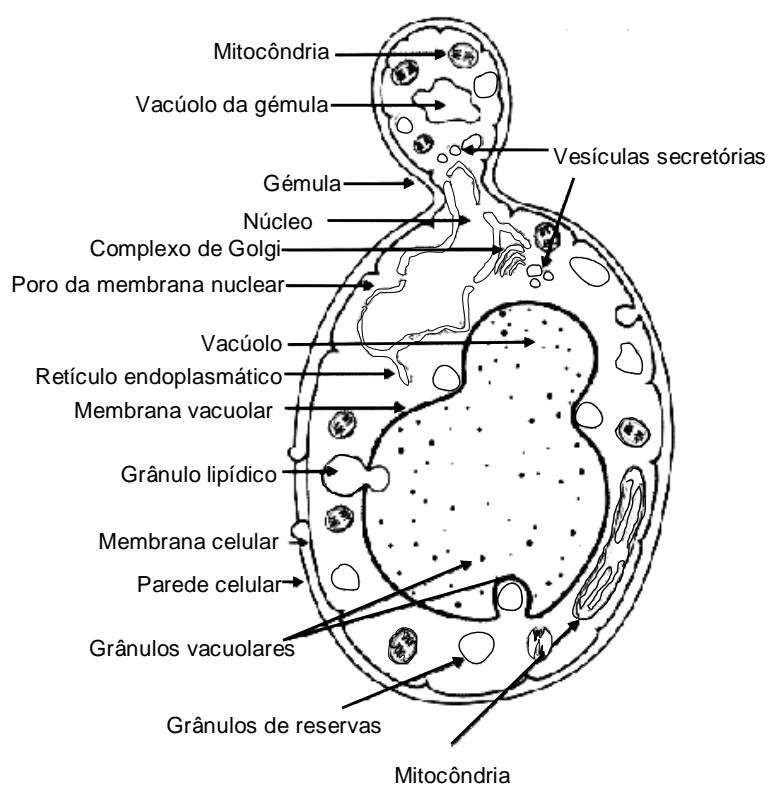
## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO GERAL**



## 1.1. Leveduras e sua ecologia

As leveduras constituem um grupo de microrganismos eucarióticos (Fig.1.1) integrado no Reino *Fungi*, domínio *Eukarya*, caracterizado por um crescimento vegetativo predominantemente unicelular e pela possibilidade de formação de estruturas sexuadas não encerradas em corpos frutíferos (Phaff *et al.*, 1978; Kurtzman, 1994). Terão evoluído de uma forma ancestral unicelular (Bandoni, 1987; Oberwinkler, 1987), compreendendo actualmente representantes dos Filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* (Swann & Taylor, 1995; Eriksson & Winka, 1997).



**Figura 1.1.** Representação esquemática de uma célula de levedura (adaptado de <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/beer/yeast/yeast2.htm>).

As leveduras, como microrganismos quimio-organo-heterotróficos, são capazes de utilizar diferentes fontes de carbono e de energia tais como D-glucose, D-galactose, D-xilose, glicerol, D-glucitol, entre muitos outros. A selecção por determinado nutriente poderá determinar a diversidade de espécies em diferentes nichos, i.e., as leveduras podem ser

altamente especializadas por *habitat* (Phaff *et al.*, 1978). Por exemplo, uma característica fisiológica presente em muitas leveduras ascomicetas é a capacidade de fermentar açúcares, o que possibilita a colonização de substratos com elevadas concentrações destes compostos, como é o caso de frutos e flores.

O tipo de substratos colonizados pelas leveduras reflecte os parâmetros que permitem o seu crescimento e sobrevivência, nomeadamente a gama de pH (geralmente entre pH 3 e 8), temperatura (geralmente são mesófilas, com uma temperatura óptima entre 25-30 °C), oxigénio (são aeróbios obrigatórios ou anaeróbios facultativos) e actividade de água (há vários exemplos de leveduras osmo-/ou halotolerantes capazes de se manterem activas na presença de concentrações saturantes de NaCl, como por exemplo *Candida sorbitophila*, ou em meios com 60% p/v de açúcar, como é o caso de *Zygosaccharomyces rouxii*).

As leveduras têm sido isoladas de ambientes muito diversos: terrestres, aquáticos e aéreos. As plantas parecem constituir os nichos mais comuns, especialmente na interface entre os nutrientes solúveis e o ambiente asséptico (por ex., a superfície das uvas). Por outro lado, no filoplano predominam as leveduras de afinidade basidiomiceta, em particular do género *Erythrobasidium* e *Rhodotorula* (Inácio *et al.*, 2002). Águas doces e salgadas são ambientes onde se encontram frequentemente leveduras do género *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Debaryomyces*. Foram encontradas leveduras marinhas (essencialmente do género *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*) em sedimento recolhido de profundidades entre 6.400 e 11.000 m (Nagahama *et al.*, 2001). A concentração de leveduras em águas do mar pode passar de um número típico de 10-100 UFC (unidades formadoras de colónias) por litro para valores pelo menos duas ordens de grandeza mais elevadas nas regiões de estuário (Walker, 1998). Para muitas leveduras, o solo é o único reservatório conhecido. *Lipomyces* e *Schwanniomyces* são géneros de leveduras exclusivamente isoladas do solo. Os solos pobres poderão acolher relativamente poucas leveduras, mas os solos ricos usados para agricultura poderão atingir cerca de  $4 \times 10^4$  UFC. por grama (Walker, 1998).

As leveduras fazem parte da microflora natural da maioria dos frutos e vegetais, apesar da sua densidade de ocorrência variar com as condições ambientais, de colheita e acondicionamento. As leveduras são raramente responsáveis pela deterioração da fruta e vegetais frescos, embora possam adquirir grande importância nestes produtos quando são processados porque a actividade de outros microrganismos (bactérias e fungos filamentosos) está reduzida pela acção de conservantes, alterações de pH e condições de armazenamento (Dennis & Buhagiar, 1980).

As populações mais densas de leveduras em ambientes naturais estão normalmente associadas a substratos que contêm açúcares e outras fontes de carbono rapidamente assimiláveis (flores, frutos, exsudados de árvores, etc.). Frequentemente isoladas a partir de flores e frutos são as espécies *Hanseniaspora uvarum*, o seu estado anamórfico *Kloeckera apiculata* e *Metshnikowia* spp., entre outras, vulgarmente de afinidade ascomiceta. Por vezes, as leveduras colonizadoras de flores e frutos ocorrem também em insectos (por ex. *Drosophila* spp.), que poderão constituir vectores para a sua propagação. São exemplos *Ambrosiozyma* spp., *Candida entomophila* e *Candida insectarum*.

## 1.2. Cinética e energética do crescimento microbiano em sistema fechado

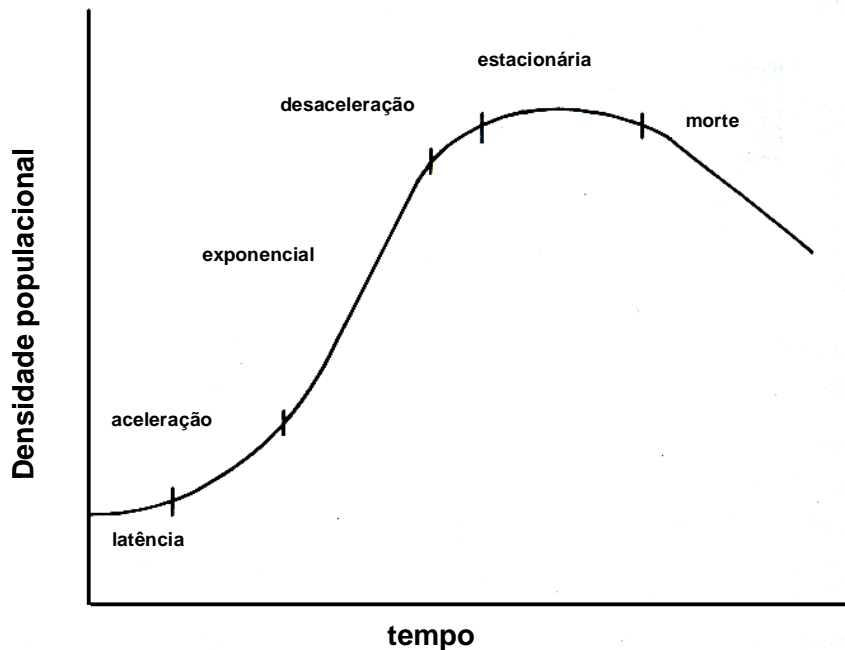
Quando um microrganismo se encontra em cultura pura num meio líquido e homogéneo, com todos os nutrientes de que necessita e em condições de pH, temperatura e tensão de oxigénio adequadas ao crescimento, a população microbiana aumenta com uma taxa constante que é característica daquele microrganismo nas condições usadas.

A cultura de microrganismos em sistema fechado ou descontínuo (tipo “batch”) corresponde ao processo mais utilizado, no qual as células são inoculadas em meio líquido contido num sistema fechado a trocas com o exterior, excepto para trocas gasosas, não havendo renovação de nutrientes nem saída dos produtos de metabolismo. As células multiplicam-se enquanto durarem as condições permissíveis (p. ex. até que acabe um ou mais dos nutrientes ou que algum dos produtos metabólicos, eventualmente tóxico para as células, se acumule). Assim, neste tipo de cultura há uma variação contínua de condições ambientais como a densidade populacional, as concentrações dos nutrientes e as dos produtos de metabolismo.

O crescimento da população microbiana num sistema deste tipo apresenta fases sucessivas distintas (Figura 1.2):

### *Fase de latência*

Nesta fase as células adaptam-se ao novo ambiente físico durante um período em que não se observa crescimento da população e ocorrem processos como a degradação e síntese de mRNA e de proteínas. Esta fase caracteriza-se pela alteração da maquinaria celular que se ajusta às novas condições e permite uma subsequente multiplicação das células. A duração desta fase depende, entre vários factores, do modo de preparação do inóculo.



**Figura 1.2.** Fases de crescimento de uma população de células de levedura em sistema fechado (adaptado de Crueger & Crueger, 1984).

#### *Fase de aceleração*

É uma fase intermédia entre a fase de latência e a fase exponencial. Nesta fase inicia-se a divisão celular com uma taxa que varia entre zero (fase de latência) e o seu valor máximo (quando se inicia a fase de crescimento exponencial).

#### *Fase exponencial*

Em condições adequadas, a cultura entra na fase de crescimento exponencial e as células dividem-se a uma velocidade máxima e constante que pode ser expressa pela equação seguinte:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1.1)$$

em que  $X$  é a densidade populacional no instante  $t$  e  $\mu$  é a taxa específica de crescimento.

Integrando (1.1) obtém-se a equação fundamental para o crescimento em “batch” e que reflecte o aumento exponencial da população microbiana com o tempo:

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (1.2)$$

Para que se verifique o crescimento exponencial da população, é fundamental que haja excesso de todos os nutrientes essenciais no meio, que não haja limitações causadas pela insuficiente agitação ou pela precipitação dos compostos do meio e que não estejam presentes inibidores.

Para a determinação experimental da taxa específica de crescimento utiliza-se a representação logarítmica da equação (1.2):

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (1.3)$$

O valor de  $\mu$  corresponde ao declive da recta que representa o logaritmo natural da concentração de biomassa em função do tempo durante a fase exponencial de crescimento. Durante esta fase, o tempo de geração ou duplicação ( $t_d$ ) pode ser facilmente calculado a partir da equação (1.3):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu} \quad (1.4)$$

#### *Fase de desaceleração*

À fase exponencial segue-se a fase de desaceleração. Durante esta fase ocorre um declínio da taxa específica de crescimento em resultado da diminuição, para valores limitantes do crescimento da população, da concentração de um (ou mais) nutrientes essenciais ao metabolismo celular e/ou do aumento da concentração de metabolitos tóxicos para as células.

#### *Fase estacionária*

Na fase estacionária deixa de haver divisão celular. No entanto, em carência de nutriente(s), as células podem manter-se viáveis durante períodos de tempo mais ou menos longos à custa das reservas endógenas, que usam em processos de manutenção.

#### *Fase de morte ou declínio*

Durante a fase final ocorre a perda da viabilidade celular (morte celular). Tal origina um decréscimo da população microbiana ao longo do tempo. A morte é exponencial e pode ser expressa por:

$$- \frac{dX}{dt} = k_d X \quad (1.5)$$

Em que  $k_d$  representa a taxa específica de morte.

A taxa de crescimento da população, ou de produção de biomassa, está relacionada com a taxa de consumo de substrato através da equação:

$$\frac{dX}{dt} = -y \frac{dS}{dt} \quad (1.6)$$

Em que a constante de proporcionalidade  $Y$  se designa por coeficiente de rendimento que pode ser definido como:

$$Y = \frac{\text{biomassa formada}}{\text{substrato consumido}} = \frac{X-X_0}{S_0-S} \quad (1.7)$$

Em que  $X_0$  e  $S_0$  representam, respectivamente, a biomassa inicial e a concentração inicial de substrato.

Dividindo ambos os membros da equação (1.6) pela densidade populacional:

$$\frac{dX}{dt} \frac{1}{X} = -y \frac{dS}{dt} \frac{1}{X} \quad (1.8)$$

Designando por  $q_s$  a taxa específica de transferência ou consumo do substrato,  $\left(-\frac{dS}{dt} \frac{1}{X}\right)$  temos então:

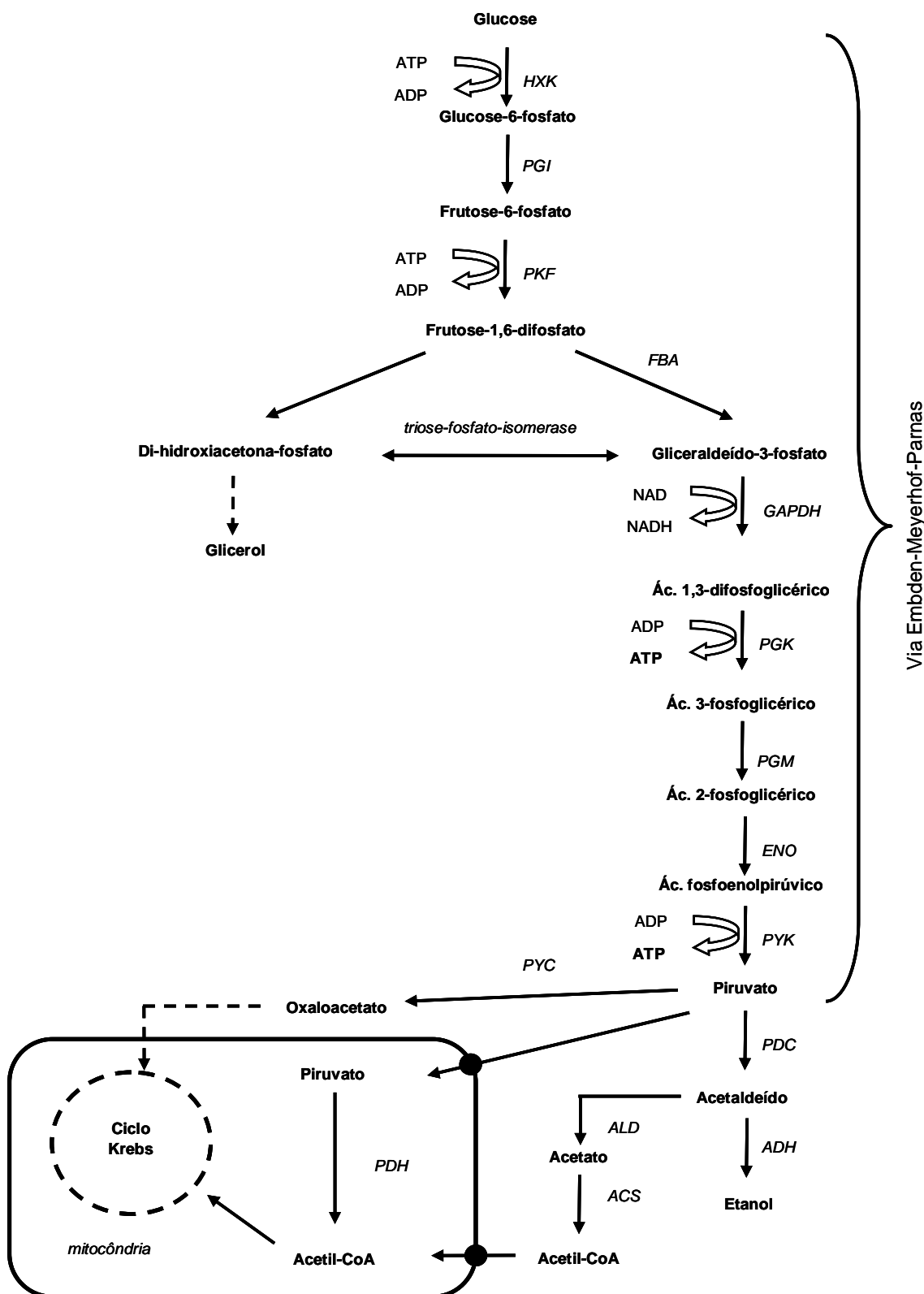
$$\mu = Y q_s \quad (1.9)$$

### 1.3. Tipo de metabolismo em leveduras: metabolismo de açúcares e sua regulação

As hexoses D-glucose, D-frutose e D-manose são utilizadas pela quase totalidade das leveduras (Barnett *et al.*, 2003). A via catabólica principal e comum a todos os fungos é a glicólise ou Via Embden-Meyerhof-Parnas (Figura 1.3), que se pode definir como um conjunto de reacções enzimáticas que conduzem à oxidação de uma molécula de glucose e sua conversão em duas moléculas de ácido pirúvico.

O ácido pirúvico pode ter três destinos metabólicos distintos (Figura 1.3): (i) carboxilado,





**Figura 1.3.** Metabolismo da glicose em leveduras. Abreviaturas das enzimas: *HXK*, Hexocinase; *PGI*, Fosfoglicose isomerase; *PKF*, Fosfofrutocinase; *FBA*, Frutose-fosfo-aldolase; *GAPDH*, Gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase; *PGK*, 3-fosfoglicerato-cinase; *PGM*, fosfoglicerato-mutase; *ENO*, enolase; *PYK*, piruvatocinase; *PDC*, Piruvato-descarboxilase; *ADH*, Álcool-desidrogenase; *PDH*, piruvato-desidrogenase; *ACS*, acetil-coenzima A-sintetase; *ALD*, acetaldeído-desidrogenase; *PYC*, piruvato-carboxilase (adaptado de: Pronk *et al.*, 1996; Stryer, 2000).

com produção de oxaloacetato que, por sua vez, entra no Ciclo de Krebs; (ii) transportado para a mitocôndria e ser oxidado a acetil-CoA que segue para o Ciclo de Krebs (Kresze & Ronft, 1981a; 1981b); e, (iii) descarboxilado pela piruvato-descarboxilase e convertido em acetaldeído (Gailiulis *et al.*, 1964). Em *Saccharomyces cerevisiae*, o  $K_m$  da reacção de oxidação do piruvato catalisada pela piruvato-desidrogenase mitocondrial é cerca de dez vezes mais baixo do que o  $K_m$  da piruvato-descarboxilase (Van Urk *et al.*, 1989b).

Assim, quando o fluxo de glucose é lento, a concentração do piruvato intracelular é baixo e este é canalizado preferencialmente para o Ciclo de Krebs. Quando o fluxo é mais rápido, a concentração de piruvato aumenta e há formação de acetaldeído. Este poderá ser reduzido a etanol pela enzima álcool-desidrogenase (Lutstorf & Megnet, 1968) ou oxidado a acetato pela enzima aldeído-desidrogenase (Jacobson & Bernofsky, 1974).

O metabolismo dos açúcares em leveduras distingue-se pelo destino do piruvato. Na via fermentativa o piruvato é convertido, essencialmente, em etanol e CO<sub>2</sub>, a chamada fermentação alcoólica. Na via respiratória o piruvato é metabolizado através do Ciclo de Krebs e há uma oxidação completa da glucose em CO<sub>2</sub> e água. Consoante o tipo de metabolismo, as leveduras podem ser obrigatoriamente aeróbias ou anaeróbias facultativas. As leveduras obrigatoriamente aeróbias são incapazes de utilizar glucose na ausência de oxigénio. Portanto, o seu metabolismo é exclusivamente respiratório e o ácido pirúvico segue apenas pelo Ciclo de Krebs para ser oxidado (Gancedo & Serrano, 1989). As leveduras anaeróbias facultativas são capazes de metabolizar glucose em condições de anaerobiose ou baixo teor de oxigénio. Neste caso, conduzem apenas uma fermentação alcoólica para gerar energia. O exemplo paradigmático é o de *S. cerevisiae*. A maioria das leveduras fermentativas são anaeróbias facultativas. No entanto, muitas espécies induzem a fermentação alcoólica em resposta à limitação de oxigénio e cessam completamente o metabolismo na ausência total deste gás. Constituem exemplos deste grupo *Candida albicans*, *Candida utilis* (sinónimo de *Pichia jadinii*), *Debaryomyces hansenii*, *Pichia anomala*, *P. stipitis* e espécies do género *Kluyveromyces* (de Deken, 1966; Visser *et al.*, 1990). As leveduras fermentativas podem crescer com metabolismo respiro-fermentativo, ou seja, respirando e fermentando simultaneamente (Gancedo & Serrano, 1989).

A sobrevivência de qualquer organismo requer a capacidade de adaptação às alterações das condições ambientais, sendo as adaptações fisiológicas normalmente muito rápidas.

Quanto ao metabolismo de açúcares, as leveduras podem exibir os chamados efeitos de Pasteur, de Crabtree, de Kluyver e de Custers. Pela sua importância para este trabalho, apenas os dois primeiros efeitos serão aqui abordados.

#### *Efeito de Pasteur*

Uma vez que a respiração é um processo metabólico energeticamente mais favorável do que a fermentação, seria de esperar que uma levedura capaz de conduzir os dois tipos de metabolismo preferisse a respiração sempre que possível. O Efeito de Pasteur corresponde à inibição da fermentação na presença de oxigénio. Nas leveduras em que este fenómeno se faz sentir há uma activação do catabolismo do açúcar em condições de anaerobiose, verificando-se uma diminuição do fluxo metabólico quando as células estão na presença de oxigénio. Este efeito observa-se de forma explícita apenas quando a respiração é a via metabólica dominante no catabolismo de um hidrato de carbono pela levedura, i. e., quando em condições aeróbias a taxa de respiração for claramente superior à taxa de fermentação (Lagunas, 1986). Exemplos de leveduras que evidenciam um forte Efeito de Pasteur são *Candida tropicalis* e *Kluyveromyces marxianus*.

#### *Efeito de Crabtree*

Algumas leveduras anaeróbias facultativas, como espécies do género *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*, apresentam um metabolismo fermentativo mesmo em aerobiose desde que a concentração de açúcar seja suficientemente elevada. A este fenómeno chama-se Efeito de Crabtree (de Deken, 1966; Fiechter *et al.*, 1981). Nestas leveduras, quando a concentração de glucose no meio é alta não se observa o Efeito de Pasteur, sendo a glucose essencialmente metabolizada por via fermentativa mesmo quando se aumenta a tensão de oxigénio (Käppeli, 1986; van Dijken & Scheffers, 1986). No entanto, quando as células são colocadas em presença de uma concentração de glucose baixa verifica-se que o peso relativo da respiração no metabolismo da glucose depende do oxigénio disponível. A mudança de um metabolismo de tipo fermentativo para um metabolismo respiratório obriga a que haja simultaneamente uma baixa da concentração de açúcar e uma quantidade suficiente de oxigénio dissolvido. Nestas condições, observa-se uma diminuição da produção de etanol, um aumento de rendimento em biomassa e uma diminuição do fluxo metabólico (Lagunas, 1986).

Os organismos que exibem Efeito de Crabtree evidenciam uma prioridade da via fermentativa sobre a via respiratória. Este mecanismo de regulação traduz um fluxo elevado de glucose com o conseqüente aumento na concentração de piruvato e a saturação da

piruvato-desidrogenase. Observa-se ainda a inibição da síntese de enzimas da via respiratória provocada pelas altas concentração de glucose.

Van Urk (1989) comparou leveduras Crabtree-positivas e Crabtree-negativas e, entre as características que as distinguem, encontrou diferenças na cinética de consumo de glucose, nos fluxos glicolíticos e na actividade de enzimas envolvidas no metabolismo do piruvato. Observou uma clara correlação positiva entre as taxas de produção de etanol e os níveis da enzima piruvato-descarboxilase, significativamente mais altos nas leveduras Crabtree-positivas. Por outro lado, as leveduras Crabtree-negativas apresentavam níveis mais altos de acetaldéido-desidrogenase e de acetil-CoA-sintetase do que as leveduras Crabtree-positivas.

#### **1.4. Efeitos do etanol na actividade das leveduras**

##### *Aspectos gerais*

O etanol é o produto metabólico principal na fermentação de açúcares por leveduras. À medida que se acumula durante a fermentação, o etanol actua como um potente factor de stresse para as células. No entanto, é sabido que células de *S. cerevisiae*, a levedura fermentativa por excelência, podem ainda permanecer viáveis e metabolicamente activas num meio em que o etanol atingiu 20% v/v.

Saber porque é que há espécies de levedura que produzem mais etanol do que outras e quais os mecanismos subjacentes a esta diferença de comportamento é um assunto que ainda continua por esclarecer. O mesmo enigma permanece no que respeita às diferentes capacidades de sobrevivência da levedura na presença do etanol por ela própria produzido. Apenas se sabe que são muitos os genes envolvidos.

Na fermentação vinária, a observação que sobressai quando se compara e caracteriza a capacidade fermentativa de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* é a de que as primeiras conseguem dominar as fermentações do mosto de uva a partir de certa altura. As não-*Saccharomyces* têm tendência a desaparecer progressivamente até que no meio se atingem concentrações de etanol em redor de 6% v/v (Fleet, 1990; Gil *et al.*, 1996). Muitos autores referem que os estadios iniciais da fermentação alcoólica são caracterizados pela actividade de leveduras não-*Saccharomyces*, nomeadamente de leveduras apiculadas dos géneros *Kloeckera* e o correspondente teleomórfico *Hanseniaspora* (Cianini & Picciotti,

1995; Gil *et al.*, 1996; Lema *et al.*, 1996; Romano *et al.*, 1997; Gutiérrez *et al.*, 1999) que ocorrem nos primeiros dois ou três dias de fermentação.

Os estudos da tolerância ao etanol em leveduras têm utilizado quase exclusivamente como modelos a espécie *S. cerevisiae* (Chi & Arneborg, 2000). Apesar de intensamente estudada, as variações intraspecíficas podem ser significativas. A concentração crescente de etanol proveniente da fermentação alcoólica inibe o crescimento da levedura e a própria fermentação em consequência da acção daquele composto na célula, a vários níveis. A cinética global deste processo é complexa por ser função dos pesos relativos dos diferentes mecanismos inibitórios, os quais podem variar de estirpe para estirpe. Para além da concentração de etanol, outros factores podem contribuir para os efeitos observados, nomeadamente o pH, a tensão de oxigénio, a temperatura, a composição do meio de crescimento e o estado fisiológico das células (van Uden, 1985).

Observou-se que o etanol produzido por *S. cerevisiae* no decorrer da fermentação tem um efeito tóxico sobre as células superior ao efeito do etanol directamente adicionado ao meio de cultura (Nagodawithana & Steinkraus, 1976). Estes resultados levaram os autores a propôr que haveria um desequilíbrio entre a taxa de produção e o fluxo através da membrana, o que acarretaria uma acumulação intracelular de etanol que explicaria o maior efeito tóxico aparente do etanol detectado no meio durante a fermentação. Outros autores sustentaram esta hipótese quando mostraram que as concentrações intracelulares de etanol eram superiores às existentes no meio de fermentação (Thomas & Rose, 1979; Novak *et al.*, 1981; Beaven *et al.*, 1982). No entanto, ensaios realizados em *S. cerevisiae* por Loureiro & Ferreira (1983) demonstraram claramente que o equilíbrio entre as concentrações intracelular e extracelular era rapidamente estabelecido, sendo a membrana plasmática altamente permeável ao etanol. Estes resultados foram corroborados mais tarde por outros autores (Guijarro & Lagunas, 1984; Dombek & Ingram, 1986), que não observaram acumulação de etanol no interior das células.

A questão da toxicidade aparente do etanol produzido ser maior do que a do etanol adicionado continua por esclarecer, mas ganhou consistência a hipótese de isso se dever à acumulação de outros produtos intermediários da fermentação que também são tóxicos, tais como ácidos gordos de cadeia curta (Lafon-Lafourcade & Ribéreau-Gayon, 1984; Sá-Correia, 1986), aldeídos, outros ácidos orgânicos e alcoóis (Maiorella *et al.*, 1983).

Os estudos de leveduras não-*Saccharomyces* no que respeita a mecanismos de tolerância ao etanol são ainda escassos. O recente ressurgir do interesse no papel que estas leveduras podem ter em processos industriais, como a produção de vinho ou de pão (Hansen *et al.*, 2001), conduziu à necessidade de obter mais informações acerca das suas propriedades fisiológicas e metabólicas. Os métodos mais frequentemente usados para avaliar a tolerância ao etanol incluem a capacidade para fermentar glucose, medida pela produção de CO<sub>2</sub>, assim como o efeito do etanol no crescimento e na viabilidade celular, e a determinação da concentração máxima de etanol produzido durante a fermentação (Mishra & Kaur, 1991). Um estudo recente revelou que as condições de cultura podem determinar a capacidade de sobrevivência de leveduras não-*Saccharomyces* em concentrações de etanol distintas. Este estudo evidenciou um aumento da resistência de *H. uvarum* e de *Torulaspora delbrueckii* quando cultivadas em aerobiose e a sua maior debilidade em anaerobiose, apesar da adição de ergosterol e Tween 80 ao meio (Pina *et al.*, 2004b).

São referidos de seguida aspectos específicos da toxicidade do etanol com maior relevância para o trabalho que foi desenvolvido.

#### *Efeitos do etanol na membrana plasmática*

São muitos os estudos que apontam para a membrana plasmática como sendo o primeiro e um dos principais alvos do etanol. Sabe-se que o etanol interfere com a organização das membranas biológicas, aumentando a sua fluidez e permeabilidade a pequenos iões e metabolitos e afectando as diferentes funções que desempenha, nomeadamente o transporte de solutos (Thomas *et al.*, 1978; Thomas & Rose, 1979; Ingram & Buttke, 1984; Mishra & Prasad, 1989; van Uden, 1989a; Mishra & Kaur, 1991). Estas alterações fazem parte de um sistema de regulação que assegura o reajuste da fisiologia celular às novas condições ambientais (Ingram, 1986; Sajbidor, 1997).

A toxicidade do etanol é função da sua lipossolubilidade (Leão & van Uden, 1982). Mishra & Prasad (1989) estudaram a relação entre os ácidos gordos da membrana plasmática e a tolerância ao etanol em *S. cerevisiae*, utilizando um mutante auxotrófico para ácidos gordos insaturados, e concluíram que a levedura se torna mais tolerante quando aumenta o grau de insaturação dos lípidos membranares. Para além das alterações na concentração de esteróis presentes na membrana plasmática da levedura quando cultivada em etanol, há também alterações pronunciadas no tipo de esteróis. O ergosterol contribui com cerca de 40% para os esteróis totais presentes em *S. cerevisiae* cultivada em glucose. Quando se fez

uma suplementação do meio com 6% v/v de etanol, observou-se um aumento da contribuição do ergosterol para valores acima de 80% (Walker-Caprioglio *et al.*, 1990).

Entre os efeitos nefastos para a célula resultantes das perturbações na permeabilidade da membrana plasmática na presença de etanol, está a activação do influxo de prótons e a consequente acidificação intracelular, o que por sua vez interfere negativamente na actividade metabólica. Em resposta, a célula utiliza a poderosa H<sup>+</sup>-ATPase (bomba de prótons) para manter o pH intracelular dentro de valores compatíveis com o metabolismo (Leão & van Uden, 1984).

Rosa & Sá-Correia (1991) mostraram que a presença de etanol no meio estimula a actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática em *S. cerevisiae*, de tal modo que esta atinge um valor que é cerca do triplo do da actividade basal quando as concentrações de etanol no meio atingem 6-8% v/v. Também em *Pichia stipitis* a presença de 1% v/v de etanol no meio de cultura fez duplicar a actividade da respectiva H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática (Meyrial *et al.*, 1995b).

#### *Efeitos do etanol na via glicolítica*

O etanol também parece afectar algumas enzimas glicolíticas. Este efeito pode ser indirecto e causado pela acidificação intracelular promovida pela presença de etanol. Nagodawithana & Steinkraus (1976) sugeriram que as enzimas glicolíticas seriam as responsáveis pelo controlo da cinética global de inibição pelo etanol, mas estudos posteriores sobre o efeito do etanol em doze enzimas glicolíticas de *S. cerevisiae* vieram contrariar esta proposta (Millar *et al.*, 1982). Nenhuma das enzimas foi significativamente afectada por concentrações de etanol inferiores a 5% p/v. Apenas um número reduzido de enzimas, entre as quais a fosfogliceratocinase e a piruvato descarboxilase, reduziam significativamente a sua actividade na presença de 10% de etanol. Ora, sabe-se que as taxas de crescimento e de fermentação são mais afectadas pelo aumento do etanol. Como estas enzimas estão em excesso em relação à actividade necessária para manter o fluxo glicolítico máximo, é improvável que a sua inibição pelo etanol fosse responsável pelo decréscimo da actividade global da levedura. O mesmo foi sugerido por outros estudos (Aguilera & Benitez, 1986).

O decréscimo da taxa de crescimento, a par do aumento da concentração de etanol, corresponde a uma menor disponibilidade de ATP para os processos biossintéticos. Na sequência do que foi referido sobre o efeito do etanol no influxo passivo de prótons, para além de outros processos de reparação de alvos celulares, a tentativa de manter os níveis

de pH intracelular compatíveis com o metabolismo implica um dispêndio adicional de energia.

Em *S. cerevisiae* observou-se uma baixa desnaturação das enzimas glicolíticas para concentrações de etanol próximas de 13% p/v. Aparentemente, a inibição do crescimento ou “desactivação replicativa” (Jones, 1990) causada pelo etanol também não será devida à desnaturação proteica. Numa estirpe de *H. uvarum* foi observada uma inibição não-competitiva pelo etanol das enzimas hexocinase e  $\alpha$ -glicerofosfato desidrogenase e foi sugerido que essa inibição poderia contribuir para a regulação da produção de etanol e glicerol. (Nagodawithana *et al.*, 1977). Segundo estes autores, 15% v/v de etanol provocam uma inibição de 45 e 64%, respectivamente, na actividade das enzimas em relação aos valores obtidos sem etanol. Tanto a fosfofrutocinase como a aldolase não foram afectadas pela mesma concentração de etanol.

#### *Efeitos do etanol nas relações de temperatura*

A toxicidade do etanol também depende da temperatura. Tanto a temperaturas mais altas como mais baixas há um aumento do efeito tóxico do etanol. A temperaturas relativamente elevadas esse aumento da toxicidade poderá levar ao “amuo” da fermentação, i.e., à paragem prematura do processo fermentativo sem que os açúcares presentes no meio tenham sido totalmente consumidos. Este fenómeno afecta principalmente a produção industrial de etanol e de vinhos tintos, situações em que a fermentação se desenvolve a temperaturas relativamente mais elevadas do que as utilizadas na produção de vinho branco (Leão, 1984; van Uden, 1989b).

Deve salientar-se que a temperatura de crescimento influencia a composição lipídica das membranas e, em consequência, a sua fluidez (Ohta *et al.*, 1988), o que parece traduzir uma resposta adaptativa (Lloyd *et al.*, 1993; Rose, 1993). Para além das alterações nas membranas, o aumento da temperatura de crescimento pode conduzir também à produção de proteínas de choque térmico (da família Hsp), que parecem ter um papel importante na tolerância ao calor e ao etanol em vários tipos de microrganismos (Michel & Starka, 1986; Piper *et al.*, 1994; Piper, 1995).

É interessante constatar que, na produção de vinhos, a temperatura de fermentação afecta directamente a ecologia microbiana do mosto de uva e as reacções bioquímicas das leveduras (Fleet & Heard, 1993). Alguns autores observaram que *K. apiculata* e *C. stellata* permaneciam com populações numerosas ao longo de fermentações a 10 °C, chegando



mesmo *K. apiculata* a ultrapassar *S. cerevisiae* como a espécie dominante (Sharf & Margalith, 1983; Gao & Fleet, 1988; Heard & Fleet, 1988).

É ainda de realçar que maiores produtividades em etanol requerem maiores concentrações iniciais de açúcares, o que provoca um aumento da pressão osmótica. Este factor, quando combinado com elevadas temperaturas de incubação, pode inibir ainda mais o crescimento (Grubb & Mawson, 1993).

### **1.5. A importância do estudo das leveduras não-Saccharomyces**

Uma única espécie de levedura, *S. cerevisiae*, tem sido o centro da investigação científica e tornou-se um sinónimo de levedura. O panorama tem mudado progressivamente e já é reconhecida a grande diversidade deste grupo de microrganismos (Kurtzman & Fell, 1998; Barnett *et al.*, 2003). Espécies de leveduras não-*Saccharomyces* tornaram-se alvo da atenção por diferentes razões. São disso exemplo entre muitos outros: *Kluyveromyces lactis*, pela possibilidade de produção da lactase; *Yarrowia lipolitica*, pela sua capacidade de crescimento em alcanos; *Pichia pastoris*, pela sua capacidade de produção de proteína heterólogas; e leveduras com relevância clínica, como são o caso de *Candida albicans* e de *Cryptococcus neoformans* (Flores *et al.*, 2000).

Já são cerca de vinte as leveduras que têm o seu genoma parcial ou totalmente sequenciado (Sherman *et al.*, 2006; Scannell *et al.*, 2007). Apesar da importância crescente das leveduras não-*Saccharomyces*, o conhecimento elementar acerca das enzimas envolvidas em vias metabólicas fundamentais e dos mecanismos de regulação da sua fisiologia é ainda muito incipiente.

### **1.6. Objectivos do trabalho e plano da dissertação**

*S. cerevisiae* destaca-se de todas as outras leveduras pela velocidade com que fermenta e pela concentração de etanol que pode atingir. Algumas estirpes de *S. cerevisiae* chegam a produzir cerca de 20% v/v etanol, enquanto várias outras leveduras fermentativas não conseguem ultrapassar os 6% v/v. Apesar do substancial conhecimento acerca dos alvos celulares relacionados com o etanol, os mecanismos que estão por detrás dos distintos

desempenhos das diferentes leveduras ainda estão longe de ser esclarecidos. Esta investigação pretendeu dar um contributo para esta falta de informação.

O objectivo principal do trabalho foi o de identificar mecanismos-chave para um aumento da eficiência na produção de etanol por leveduras não-*Saccharomyces*. Foram objectivos específicos: (i) desenvolvimento de um método de hibridação *in situ* (FISH) para identificação rápida e directa de leveduras que ocorrem em produtos frutícolas; (ii) avaliação da capacidade fermentativa global de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas de produtos frutícolas; (iii) estudo da influência do etanol na actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática em leveduras não-*Saccharomyces*; e (iv) análise comparativa dos genes homólogos de *PMA1* que codificam a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática em leveduras não-*Saccharomyces*.

Esta dissertação foi dividida em cinco capítulos. No capítulo introdutório apresenta-se o estado-da-arte dos temas gerais a abordar nesta investigação. Inclui uma breve revisão sobre leveduras e sua ecologia, o tipo de metabolismo e os efeitos do etanol na actividade global da levedura e em alvos específicos.

No segundo capítulo são apresentados os resultados obtidos no isolamento de leveduras obtidas a partir de fruta comum, assim como o da identificação morfo-fisiológica e molecular de leveduras seleccionadas. Este capítulo inclui também o desenho, validação e aplicação de sondas oligonucleótidas fluorescentes específicas para a identificação directa de quatro espécies de leveduras que ocorreram com maior frequência nos produtos frutícolas.

O terceiro capítulo descreve a avaliação da capacidade fermentativa global das leveduras seleccionadas através da determinação de dois parâmetros: a concentração máxima de etanol produzido e as velocidades relativas de fermentação e respiração. Neste capítulo também se descreve o desenvolvimento de um método expedito para comparar a tolerância de leveduras ao etanol através da perda da viabilidade celular a uma dada temperatura e na presença de uma determinada concentração de etanol. O capítulo termina com a caracterização da actividade da ATPase da membrana plasmática em condições padronizadas para todas as leveduras seleccionadas, utilizando *S. cerevisiae* e *S. bayanus* como termos de comparação.

O quarto capítulo incide sobre a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática das leveduras em análise. A caracterização incluiu a determinação do pH óptimo da actividade da H<sup>+</sup>-ATPase

e um estudo sobre a influência do etanol nessa actividade. O capítulo descreve ainda a identificação, nas leveduras em estudo, dos genes homólogos do gene *PMA1*, que codifica a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática em *S. cerevisiae*.

A dissertação termina com o quinto capítulo, onde são tecidas considerações gerais sobre os resultados obtidos no decurso do trabalho. São também apresentadas perspectivas para o futuro de aspectos relacionados com o tema abordado, tendo em conta o estado actual dos conhecimentos nesta área de I&D.



## **CAPÍTULO 2**

# **LEVEDURAS DE PRODUTOS FRUTÍCOLAS: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E DETECÇÃO POR FISH**



## 2.1. Introdução

### 2.1.1. Identificação fenotípica

A metodologia tradicional para identificação de leveduras envolve a aplicação de uma bateria de testes que avaliam essencialmente as características fenotípicas, entre as quais a capacidade de fermentar diferentes substratos (Kreger-van Rij, 1984; Barnett *et al.*, 2003). A utilização intensiva destes testes levou à descrição de muitas espécies novas com base em apenas uma ou poucas diferenças nos padrões morfofisiológicos e/ou bioquímicos (Phaff, 1989), resultando em classificações muitas vezes ambíguas (Kurtzman & Sugiyama 2001) e dando origem a alterações frequentes de nomenclatura (Kurtzman & Fell 1998; Barnett *et al.*, 2003). No entanto, as características fenotípicas contribuem para a caracterização global da levedura e algumas têm, certamente, valor taxonómico. São disso exemplos a capacidade fermentativa e a assimilação de compostos que envolvem uma maior complexidade metabólica, como é o caso de alguns compostos aromáticos de baixo peso molecular e dos ácidos aldáricos (Sampaio & Fonseca, 1995).

A caracterização fisiológica inclui testes de fermentação de vários açúcares (glucose, galactose, sacarose, maltose, etc.) e de assimilação de diversos compostos utilizados como fontes de carbono e energia ou como fontes de azoto. Outros testes utilizados na identificação de leveduras incluem a sensibilidade à cicloheximida, avaliação da temperatura máxima de crescimento e osmotolerância. Entre os testes bioquímicos muito utilizados estão a reacção das culturas com o corante Azul de Diazónio B (Teste do DBB) e a pesquisa da produção de urease, cujos resultados permitem diferenciar, na sua maioria, as leveduras basidiomicetas das ascomicetas, e a produção de compostos amiláceos extracelulares.

### 2.1.2. Identificação molecular

Através da caracterização fenotípica das leveduras podem surgir dificuldades de identificação devidas a uma leitura pouco clara dos resultados quer dos exames morfológicos quer dos testes bioquímicos e fisiológicos. Por outro lado, estes métodos são laboriosos, morosos e podem não ser adequados para diferenciar espécies próximas (ver e.g., Deák, 1995; Lopandic *et al.*, 2006). Ao longo das últimas décadas, foram sendo introduzidos diferentes métodos moleculares baseados em estudos comparativos de DNA que asseguram uma caracterização e identificação de leveduras mais fiável, sensível e

rápida (Kurtzman & Phaff, 1987; Fell, 1995). As aplicações destes métodos tornaram mais evidentes as ambiguidades e inconsistências dos sistemas de classificação baseados essencialmente em critérios fenotípicos.

### *Análise comparativa do genoma total*

Os primeiros métodos a serem utilizados para comparar espécies de leveduras foram a determinação do conteúdo molar em guanina e citosina (%mol G+C) do DNA genómico e a cinética de reassociação DNA-DNA. A relação entre a temperatura de desnaturação e a composição em bases do DNA foi estudada por Marmur & Doty (1962) e baseou-se no conhecimento de que se estabelecem três ligações de hidrogénio entre as bases guanina e citosina, enquanto que apenas duas ligações do mesmo tipo são estabelecidas entre a timina e a adenina. Uma maior percentagem das primeiras confere maior estabilidade à dupla cadeia e a desnaturação do DNA ocorre a temperaturas mais elevadas. Em geral, as leveduras ascomicetas apresentam genomas com valores de % G+C entre 27 e 50%, enquanto que as basidiomicetas têm um conteúdo molar em GC que varia entre 50 e 70%. Considera-se que estirpes pertencentes a uma mesma espécie não divergem em mais do que 2,0-2,5% na %mol G+C (Kurtzman & Fell, 1998). No entanto, como a composição em bases não reflecte a sequência nucleotídica do DNA, estirpes com percentagens molares idênticas podem pertencer a espécies diferentes. Composições semelhantes requerem experiências posteriores de reassociação DNA-DNA para determinação da conspecificidade.

As experiências de reassociação DNA-DNA permitem avaliar a complementaridade global das sequências nucleotídicas do DNA genómico de duas estirpes diferentes. A determinação do grau de complementaridade envolve a desnaturação térmica do DNA das amostras e a comparação das cinéticas de renaturação do DNA de cada uma das estirpes e da sua mistura em partes iguais. Estirpes com valores superiores a 70-80% de complementaridade DNA-DNA são consideradas como pertencentes à mesma espécie (Kurtzman & Phaff, 1987). Pelo contrário, são consideradas estirpes de espécies diferentes quando a complementaridade é inferior a 20-30%. Os valores intermédios, entre 30-70%, deverão ser analisados conjuntamente com outras características, podendo corresponder a variedades duma mesma espécie. Deve, no entanto, assinalar-se que existem algumas, embora raras, excepções a estas regras. A determinação do grau de reassociação DNA-DNA revelou que espécies fenotipicamente distintas correspondem, de facto, a uma mesma espécie e vice-versa, i.e., que espécies fenotipicamente indistinguíveis representam espécies diferentes (Hamamoto *et al.*, 1987; Guého & Meyer, 1989; Boekhout *et al.*, 1993; Kurtzman, 1998).



Inúmeros métodos moleculares têm sido desenvolvidos para identificação de isolados de leveduras. Entre os mais utilizados estão: a análise dos polimorfismos no comprimento dos fragmentos resultantes da aplicação de enzimas de restrição ao DNA (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*), muito usada na avaliação de diferenças entre espécies e estirpes (Magee *et al.*, 1987; Kurtzman, 1992); e vários métodos baseados em PCR, tais como a análise de polimorfismos de DNA arbitrariamente amplificado (RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*), que recorre a *primers* de tamanho reduzido (geralmente, 9 a 13 nucleótidos) e de sequências arbitrárias que hibridam com regiões complementares em ambas as cadeias de DNA. Esta técnica não exige quantidades tão grandes de DNA como a de RFLP. Em contrapartida, a ocorrência de polimorfismos semelhantes pode ocorrer por razões meramente casuais, mesmo quando os organismos em análise são diferentes. Outros métodos que se baseiam em PCR utilizam *primers* específicos (Fell, 1995; Mannarelli & Kurtzman, 1998), ou regiões mini- e microsátélites – MSP-PCR (Meyer *et al.*, 1993; Gadanho *et al.*, 2001; Sampaio *et al.*, 2001).

#### *Sequenciação de regiões da unidade de DNA ribossômico*

Em leveduras, assim como noutros eucariontes, os genes do RNA ribossômico (rRNA) estão organizados numa unidade de DNA ribossômico (rDNA) que se repete sequencialmente, podendo ocorrer em várias dezenas de cópias por genoma haplóide. Muitas leveduras apresentam os genes do rRNA das subunidades ribossômicas pequena (17-18S) e grande (26S, 5,8S e 5S) numa unidade comum, embora o gene do rRNA 5S possa ser transcrito separadamente. A unidade de rDNA tem regiões estruturais altamente conservadas, na maioria situadas nos genes de rRNA, e domínios mais variáveis, geralmente localizados nas regiões intergênicas. Estas diferenças têm permitido estabelecer relações evolutivas entre indivíduos e a sua distinção a vários níveis da hierarquia taxonômica (Kurtzman & Fell, 1998).

A utilização de rRNA na identificação molecular tem uma série de vantagens: (i) os ribossomas estão presentes em todos os organismos; (ii) são estruturas homólogas do ponto de vista funcional e evolutivo; (iii) parecem partilhar uma origem evolutiva comum, pois, apesar de serem muito conservados, revelam diferentes níveis de evolução, podendo funcionar como cronómetros moleculares; (iv) os genes do rRNA parecem não variar entre indivíduos contemporâneos, reflectindo somente as relações evolutivas entre os organismos; (v) a totalidade de mais de 6.000 nucleótidos contidos nas sequências dos genes de rRNA (26S, 18S, 5,8S e 5S) é suficientemente elevada para apreciar filogenias e fazer a respectiva análise estatística; (vi) a utilização de *primers*, para amplificação por PCR,

beneficia de fácil acesso a qualquer zona da unidade de rDNA, simplificando, deste modo, o estudo dum grande número de amostras (Fell *et al.*, 2000); e (vii) a existência de bases de dados públicas de rDNA (e.g., GenBank) permite a comparação de sequências de muitos e diversos organismos (Guého *et al.*, 1989; Peterson & Kurtzman, 1991; van de Peer *et al.*, 1999).

Actualmente, o método molecular de uso mais generalizado em estudos de taxonomia e para identificação de leveduras baseia-se na comparação de sequências da região D1/D2 do gene do rRNA 26S e/ou do gene do rRNA 18S. Outras regiões da unidade de rDNA também têm sido analisadas, como as regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e IGS (*InterGenic Spacer*). As sequências D1/D2 de todas as leveduras conhecidas têm a vantagem de estar acessíveis em bases de dados públicas, tais como NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), EMBL (<http://www.embl-heidelberg.de>), e DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>). A investigação intensiva que foi desenvolvida nas últimas décadas evidenciou que a região D1/D2 exhibe diferenças suficientes entre leveduras para que se possa avaliar relações intra- e inter-específicas (Kurtzman & Robnett, 1998; Fell *et al.*, 2000). Geralmente, estirpes da mesma espécie não apresentam diferenças nucleotídicas superiores a 1-1,5% (Peterson & Kurtzman, 1991; Kurtzman & Robnett, 1998). Por outro lado, Fell *et al.* (2000) sugerem que dois nucleótidos de diferença nos 600 pb da região D1/D2 serão suficientes para considerar que leveduras basidiomicetas representam espécies diferentes.

### **2.1.3. Hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH)**

Mais recentemente, têm sido desenvolvidas metodologias, essencialmente para o estudo de populações bacterianas, que permitem conciliar a observação morfológica com uma sensibilidade e especificidade elevadas. A hibridação *in situ* com sondas de DNA marcadas foi introduzida na bacteriologia por Giovannoni *et al.* (1988), que utilizaram oligonucleótidos de DNA marcados radioactivamente para a detecção de bactérias. Pela mesma altura, DeLong *et al.* (1989) aplicaram pela primeira vez a técnica FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), utilizando sondas marcadas com fluorocromos e dirigidas à molécula de rRNA para identificação de células microbianas individuais, passando para segundo plano as sondas radioactivas, mais perigosas, menos sensíveis e exigindo passos adicionais para serem detectadas.

A técnica FISH tem sido aplicada com muito sucesso em microrganismos de interesse médico, permitindo identificar directamente, sem necessidade de isolamento em cultura, por ex., populações bacterianas causadoras de infecção na cavidade oral (Gersdorf *et al.*, 1993), na via gastro-intestinal e no tracto respiratório (Hogardt *et al.*, 2000). Certos biomateriais implantados (cateteres, implantes ortopédicos) e culturas de sangue foram também alvo de detecção rápida e sensível de microrganismos pelo método FISH (Krimmer *et al.*, 1999; Kempf *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2006). A aplicação de sondas pela técnica FISH também tem sido efectuada na detecção de comunidades microbianas em ambientes naturais, incluindo habitats aquáticos como a água do mar ou sistemas de distribuição de água potável (Kalmbach *et al.*, 1999), solos, superfícies de raízes e superfícies de folhas (Inácio, 2003; Tavares *et al.*, 2004).

Num exemplo de utilização de FISH para detecção de leveduras em amostras alimentares, Stender *et al.* (2001) aplicaram sondas de PNA (*Peptide Nucleic Acid*) na identificação de *Dekkera bruxellensis* em amostras de vinho contaminado. Estas sondas são constituídas por uma cadeia de poliamida à qual estão ligadas bases nucleotídicas individualizadas. Este DNA simulado permite que a sonda de PNA hibride com cadeias de ácidos nucleicos complementares, obedecendo às regras de emparelhamento Watson-Crick. Sondas de PNA também foram utilizadas na detecção e identificação de *C. albicans* directamente a partir de sangue sem necessidade prévia de hemocultura (Rigby *et al.*, 2002) e para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis* (Oliveira *et al.*, 2001).

Xufre *et al.* (2006) analisaram a população de leveduras durante a fermentação vinária. Estes autores desenharam sondas de DNA para sequências-alvo na região D1/D2 da subunidade 26S rRNA, marcadas com o fluorocromo fluoresceína-isotiocianato, e específicas para diferentes espécies de leveduras envolvidas no processo de vinificação. Com a técnica FISH conseguiram identificar seis espécies de leveduras não-*Saccharomyces* presentes na fase inicial da fermentação (*Candida stellata*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *H. uvarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kl. thermotolerans* e *Toluraspota delbrueckii*), bem como *S. cerevisiae*. Os resultados mostraram que a quantificação de leveduras pelo método FISH concordava com os dados ecológicos relativamente ao mesmo ambiente fermentativo. Este trabalho também demonstrou que a hibridação *in situ* é uma técnica que permite identificar directamente leveduras que ocorrem em mosto de uva, poupando o tempo necessário para isolar e obter culturas puras.

---

A hibridação *in situ* com sondas de DNA fluorescentes não só possibilita a detecção de sequências-alvo localizadas no rRNA de células individuais intactas (Amann *et al.*, 1995; Moter & Göbel, 2000), e a observação da morfologia celular, como permite a quantificação dos microrganismos e a apreciação da sua distribuição espacial nos substratos colonizados. É particularmente importante o desenho *in silico* da sonda, uma fase que envolve a pesquisa de segmentos específicos para os organismos de interesse a partir da análise comparativa de sequências de DNA disponíveis em bases de dados públicas. É também conveniente fazer um estudo de acessibilidade da sonda desenhada, tomando como base, quando se trata de leveduras, o mapa de acessibilidades da região D1/D2 da subunidade 26S do rRNA de *S. cerevisiae* obtido por Inácio *et al.* (2003). Numa fase seguinte, deve-se realizar testes de especificidade *in vivo* utilizando estirpes de referência.

A molécula-alvo mais usada na técnica FISH tem sido a 16S/18S do rRNA e, mais recentemente, a subunidade 23S/26S (Amann *et al.*, 2001). Há quem prefira a utilização de sequências da subunidade maior do ribossoma porque as da subunidade menor não são suficientemente variáveis para distinguir espécies demasiado próximas (Amann *et al.*, 1992; Fox *et al.*, 1992). Contudo, outros autores concluíram não existirem diferenças significativas entre as duas subunidades de rRNA para este efeito (Fuchs *et al.*, 2001). Sendo assim, permanece a vantagem de utilização da subunidade maior por possuir maior número de possíveis sequências-alvo.

Na selecção da sequência-alvo para uma dada sonda deve ser tida em conta a sua especificidade (número e localização de bases nucleotídicas de diferença em relação a outros organismos filogeneticamente próximos), o seu tamanho e a composição. O oligonucleótido escolhido deverá ter entre 15 a 30 bases de comprimento e o desenho da sonda, cuja sequência é complementar da sequência nucleotídica do segmento específico de RNA, deverá obedecer aos seguintes critérios: (i) temperatura de desnaturação entre 48-60 °C; (ii) conteúdo em GC entre 40-60%; (iii) não deverá formar estruturas secundárias internas; e (iv) a localização da sequência-alvo na molécula de rRNA deverá estar acessível à sonda para obter bons sinais de hibridação (Fuchs *et al.*, 1998; 2000). As sondas para a hibridação *in situ* devem ser específicas, sensíveis e não apresentarem dificuldade em entrar nas células, o que está relacionado com o tamanho. As sondas são oligonucleótidos de síntese e são marcadas (Tabela 2.1) na extremidade 5', ou em ambas as extremidades de forma a aumentar o sinal emitido. Geralmente, a marcação é feita com fluoresceína ou derivados desta molécula, tal como o FITC (fluoresceína-isotiocianato), com derivados de rodamina, como o TRIC (tretamil-rodamina-isotiocianato) ou, mais recentemente, com as

cianinas Cy3 ou Cy5 (Moter & Göbel, 2000). Estes últimos fluorocromos têm um desempenho superior por emitirem maior fluorescência e serem mais estáveis (DeLong *et al.*, 1999; Amann & Ludwig, 2000). O fluorocromo Cy3 tem uma estrutura química linear que permite uma melhor acessibilidade ao ribossoma sendo, actualmente, o mais utilizado (Ban *et al.*, 2000).

**Tabela 2.1.** Fluorocromos mais utilizados na marcação de sondas de DNA (adaptado de Amann & Ludwig, 2000 e de Moter & Göbel, 2000)

Fluorocromo	Comprimento de onda (nm)		Cor
	Excitação	Emissão	
<b>Derivados da Fluoresceína</b>			
<b>AMCA</b> ( <i>7-amino-4-methylcoumarin-3 acetic acid</i> )	351	450	Azul
<b>FITC</b> ( <i>fluorescein-isothiocyanate</i> )	492	528	Verde
<b>FloX</b> [ <i>5-(-6-) carboxyfluorescein-N-hydroxysuccimide-ester</i> ]	488	520	Verde
<b>Derivados da Rodamina</b>			
<b>TRITC</b> ( <i>tetramethyl-rhodamine-isothiocyanate</i> )	557	576	Vermelho
<b>Texas Red</b> ( <i>sulforhodamine 101 acid chloride</i> )	578	600	Vermelho
<b>Derivados da Cianina</b>			
<b>Cy3</b> ( <i>indocarbocyanine</i> )	550	570	Laranja/Vermelho
<b>Cy5</b> ( <i>indodicarbocyanine</i> )	651	674	(Infravermelho)

Em leveduras, a fixação das células é vulgarmente feita com etanol ou com uma solução de formaldeído ou paraformaldeído 3-4% v/v (Moter & Göbel, 2000). A utilização de etanol absoluto tem a vantagem de ser mais rápida e simples, mas como é um agente precipitante a sua utilização pode provocar a lise das células e a perda do conteúdo celular. O paraformaldeído tem a vantagem de evitar a degradação das células, na medida em que as encapsula numa matriz, mas a fixação é mais demorada. Contudo, as células fixadas por este processo poderão ser guardadas a -20 °C durante meses.

A hibridação da sonda com a sequência-alvo deverá decorrer em condições de elevada restringência. A restringência da reacção é ajustada variando a temperatura de incubação ou, mais frequentemente, a concentração de formamida no tampão de hibridação, o que

permite baixar a temperatura de hibridação, pois cada 0,5% de formamida equivale a um aumento de 1 °C (Manz *et al.*, 1992). A optimização das condições reaccionais envolve também a utilização de espécies de levedura com sequências que apresentem elevada homologia com a região-alvo da sonda. Considera-se que as condições estão optimizadas quando há sinal de fluorescência com a espécie de interesse mas não com as espécies mais próximas.

A observação de preparações de hibridação *in situ* requer a utilização dum microscópio de epifluorescência equipado com o filtro selectivo adequado ao fluorocromo utilizado. Pode ser, igualmente, usado um microscópio confocal com varrimento laser (Li *et al.*, 1997). O registo dos sinais de hibridação *in situ* pode também ser feita utilizando citometria de fluxo. Esta técnica é útil para a quantificação de células e da fluorescência, mas não permite obter informações sobre a morfologia nem sobre a distribuição espacial dos microrganismos na amostra (Amann *et al.*, 1995).

Uma das limitações para a detecção de alguns grupos de microrganismos através de hibridação *in situ* é a autofluorescência que os próprios poderão apresentar, confundindo-se com os sinais de hibridação (Graham, 1983; Sorensen *et al.*, 1997). A autofluorescência do material envolvente também poderá dificultar a detecção, como é o caso do material vegetal (Moter & Göbel, 2000; Simon *et al.*, 2000). A detecção de células pelo método FISH nos seus meios naturais pode também ser dificultada por as células estarem em estado de latência ou com crescimento limitado pela escassez de nutrientes e, por consequência, com um conteúdo celular em ribossomas e rRNA mais baixo.

#### **2.1.4. Estudos descritos neste capítulo**

O objectivo da primeira fase do projecto foi o de isolar leveduras com diferentes capacidades fermentativas a partir de ambientes naturais. Como material para isolamento foram escolhidos produtos frutícolas com concentrações diferentes de açúcares fermentáveis. Neste capítulo descreve-se o isolamento de leveduras a partir de fruta comum e a identificação das leveduras isoladas através das suas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, bem como por sequenciação da região D1/D2 do gene da subunidade 26S do RNA ribossómico. Foram ainda desenhadas, validadas e aplicadas sondas de DNA específicas para a detecção directa por FISH de quatro espécies de leveduras que ocorreram mais frequentemente na fruta amostrada.

## 2.2. Materiais e métodos

### 2.2.1. Produtos frutícolas e seu tratamento

As frutas escolhidas para este estudo, adquiridas em supermercado na região da grande Lisboa, foram as seguintes: papaia, manga e banana, de origem brasileira; maçã e meloa, de origem portuguesa; pêssigo de origem espanhola; e uvas branca e preta, de origem italiana.

As peças de fruta, todas com aspecto são, foram lavadas em água corrente e cortadas em pedaços com cerca de 10×10 mm, utilizando um bisturi estéril. Um pedaço de cada foi colocado em 10 ml de água estéril, em tubos de ensaio largos, e a suspensão foi vigorosamente agitada em *vortex* durante 1 min. Foram incluídos na maceração as grainhas de uva, caroço de maçã e sementes de papaia. Cada suspensão permaneceu à temperatura ambiente, em tubo tapado com rolha de algodão, durante cerca de 24 h, após as quais se procedeu à observação, ao microscópio, do líquido sobrenadante para detecção de células leveduriformes. As suspensões de ananás, banana, maçã e uva tiveram que ser incubadas mais um dia porque não foram observadas células leveduriformes.

### 2.2.2. Isolamento de leveduras

Em caso de observação positiva para leveduras, a partir da suspensão de cada fruta em água foram realizadas diluições ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ). Alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram inoculadas por espalhamento, em duplicado, em placas de Petri contendo meio de cultura YM (ver Apêndice I) com 0,004% p/v Rosa de Bengala, um inibidor do crescimento de fungos filamentosos (Rose & Harrison, 1987), e 0,05% p/v cloranfenicol, um inibidor do crescimento bacteriano. A suspensão de meloa foi a única inoculada sem diluição porque apresentava poucas células leveduriformes.

As placas foram incubadas no escuro (Rosa de Bengala, sob o efeito da luz, inibe também o crescimento de leveduras) e à temperatura ambiente. Após três, cinco e sete dias, registou-se o número de colónias de leveduras (UFC, unidades formadoras de colónias) de cada tipo macromorfológico observado. Por vezes, a morfologia das colónias de *Aureobasidium* spp. e de outros fungos dimórficos assemelhava-se à apresentada pelas colónias de leveduras, dificultando as contagens. No entanto, com o prolongamento da incubação, essas colónias

exibiam visivelmente micélio e/ou escureciam, distinguindo-se das formadas por leveduras. Mesmo assim, as contagens foram dificultadas pela presença de fungos filamentosos. De cada placa foram recolhidas colónias representativas de cada tipo macromorfológico, posteriormente purificadas em meio de cultura YM. As culturas puras correspondentes a cada amostra de fruta foram mantidas em meio de cultura MYP (para basidiomicetas) ou YM (para ascomicetas), a 4 °C.

### **2.2.3. Identificação das leveduras isoladas**

As leveduras isoladas foram sujeitas a uma caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica. Os resultados foram avaliados com o auxílio do programa informático *Yeast Identification PC Program* (Barnett *et al.*, 1994). Também se recorreu a Barnett *et al.* (2003) para uma identificação através de chaves dicotómicas.

Foi ainda realizada a identificação molecular da maioria das leveduras isoladas neste estudo por sequenciação da região D1/D2 do gene da subunidade 26S do rRNA.

#### **2.2.3.1. Caracterização fenotípica**

##### *Crescimento em meio sólido YM*

As culturas são caracterizadas, macro- e micromorfológicamente, após crescimento em meio sólido YM durante sete dias a 25 °C. Foram registadas a textura, cor, superfície e margem das colónias, formação de micélio ou pseudomicélio, produção de esporos, forma das células e tipo de gemulação (Yarrow, 1998).

##### *Reacção com o corante Azul de Diazónio B (teste do DBB)*

Este teste permite a diferenciação entre leveduras ascomicetas e basidiomicetas, devido a diferenças na parede celular. As leveduras são inoculadas, em placa com meio YM sólido e incubadas, durante três semanas, à temperatura ambiente. Adiciona-se, então, às culturas uma solução 0,1% p/v de sal Azul de Diazónio B em tampão 0,25 M Tris, pH 7, preparada de fresco e mantida em gelo até ao momento de ser utilizada. A afinidade basidiomiceta é indicada pela mudança de cor da cultura (para castanho ou vermelho escuro), depois de



1-2 min à temperatura ambiente, enquanto as leveduras de afinidade ascomiceta não evidenciam alteração de cor nas mesmas condições.

#### *Hidrólise de ureia (produção de urease)*

Este teste permite, em geral, a diferenciação entre leveduras ascomicetas (urease-negativas) e basidiomicetas (urease-positivas). A hidrólise da ureia aumenta a alcalinidade do meio de crescimento que contém um indicador de pH (meio de Christensen, ver Apêndice I). Uma reacção positiva corresponde à alteração da cor do meio de cultura de amarelo para carmim. O meio é distribuído por tubos e deixa-se solidificar em cunha, sendo as leveduras inoculadas a partir de cultura fresca em meio YM.

#### *Crescimento em meio líquido*

O meio GYP líquido (Apêndice I) é inoculado com uma cultura fresca em meio YM e incubado, sem agitação, a 25 °C. Após dois dias procede-se à observação ao microscópio, e depois de sete dias a uma observação macroscópica (para verificar formação de película, formação de anel e formação de sedimento).

#### *Produção de micélio ou pseudomicélio*

Uma placa de Dalmau com meio CMA (*Corn Meal Agar*, Difco) (Apêndice I) é inoculada utilizando uma agulha com uma cultura fresca em meio YM. O agar é ligeiramente ferido traçando dois riscos paralelos separados de 0,5 cm e com cerca de 2,5 cm de comprimento. A parte central do inóculo é coberta com uma lamela estéril. A placa é incubada durante uma semana e pesquisa-se a produção de estruturas filamentosas, observando directamente sob a objectiva do microscópio.

#### *Fermentação de glucose e de outros açúcares*

Inocula-se um tubo (12 mm diâmetro) com meio base de fermentação (Apêndice I) suplementado com 2% p/v glucose, ou outro açúcar, e com um tubo de Durham invertido. O inóculo consiste numa gota numa suspensão forte numa cultura fresca em meio YM da levedura a testar. A capacidade fermentativa é revelada pela acumulação de CO<sub>2</sub> no tubo invertido e registada em cm. Incuba-se a 25 °C, sem agitação, e regista-se a produção de gás ao longo de três semanas.

Para as leveduras capazes de fermentar glucose, foi ainda testada a capacidade de fermentar os seguintes compostos (suplementando com 2% p/v): D-galactose, maltose,  $\alpha$ -metil-D-glucósido, sacarose,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -trealose, melibiose, lactose, celobiose, melezitose, rafinose, inulina, amido e D-xilose.

### *Assimilação de fontes de carbono*

Na pesquisa da capacidade de utilização de diferentes compostos como fontes de carbono e energia, utilizou-se o meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB, Difco) suplementado com cada composto a testar, segundo descrito por Yarrow (1998). Os compostos testados estão indicados na Tabela A.3 (Apêndice II). Foram também realizados testes de assimilação de compostos que não são tradicionalmente utilizados na identificação de leveduras (Sampaio & Fonseca, 1995): os ácidos aldáricos L(+)-, D(-)-, e *meso*-tartárico, L(-)-málico, sacárico e múxico, numa concentração final de 0,25% p/v e pH ajustado a 3,8; e os compostos aromáticos de baixo peso molecular ácidos protocatecuico, m-hidroxibenzóico, gentísico, vanílico, ferúlico, gálico e verátrico, assim como catecol e fenol, numa concentração final de 0,1% p/v e pH ajustado a 4,5.

### *Assimilação de fontes de azoto*

Na pesquisa da capacidade de utilização de diferentes compostos como fontes de azoto (nitrato, nitrito, L-lisina, etilamina, cadaverina, creatina, creatinina e D-glucosamina; concentração final de 0,5% p/v) utilizou-se o meio base *Yeast Carbon Base* (YCB, Difco) suplementado com cada composto a testar, segundo descrito por Yarrow (1998).

### *Hidrólise de arbutina*

A hidrólise de arbutina pela enzima  $\beta$ -glucosidase origina uma hidroxiquinona que adquire uma cor castanha na presença de sais de ferro. As culturas são inoculadas em meio contendo arbutina (Apêndice I), e incubadas à temperatura ambiente durante uma semana.

### *Produção de compostos amiláceos*

Algumas leveduras formam cápsula e produzem compostos amiláceos que podem ser detectados através de uma reacção com solução de iodo. Após cultura em meio líquido YNB (Difco) com glucose 0,5% p/v durante uma semana, adiciona-se uma gota de Solução de Lugol (ver Apêndice I). O aparecimento de cor azul/violeta ou verde/acastanhado indica um resultado positivo.

### *Crescimento em meio sem vitaminas*

A capacidade de crescimento na ausência de vitaminas é avaliada utilizando o meio *Vitamin Free Base* (Difco), seguindo as instruções do fabricante. A ocorrência de resultados falsos positivos é relativamente frequente. Para evitar este inconveniente, deve proceder-se à lavagem prévia dos tubos de ensaio com mistura nitro-sulfúrica (Apêndice I). Se for

observado crescimento, para confirmação deve transferir-se 0,1 ml da cultura para novo tubo com meio idêntico.

#### *Crescimento na presença de cicloheximida (100 ppm e 1000 ppm)*

Cada tubo de ensaio com o meio base contendo cicloheximida (Apêndice I) é inoculado com uma gota duma suspensão de cultura jovem (48 h) em meio YM.

#### *Crescimento a diferentes temperaturas*

A levedura é inoculada em meio YM solidificado em cunha, e cada tubo incubado em banho termostaticado a diferentes temperaturas: 25 °C, 30 °C, 35 °C, 37 °C e 40 °C. O inóculo é proveniente duma cultura jovem no mesmo meio, tendo o cuidado de evitar falsos positivos devido a excesso de inóculo.

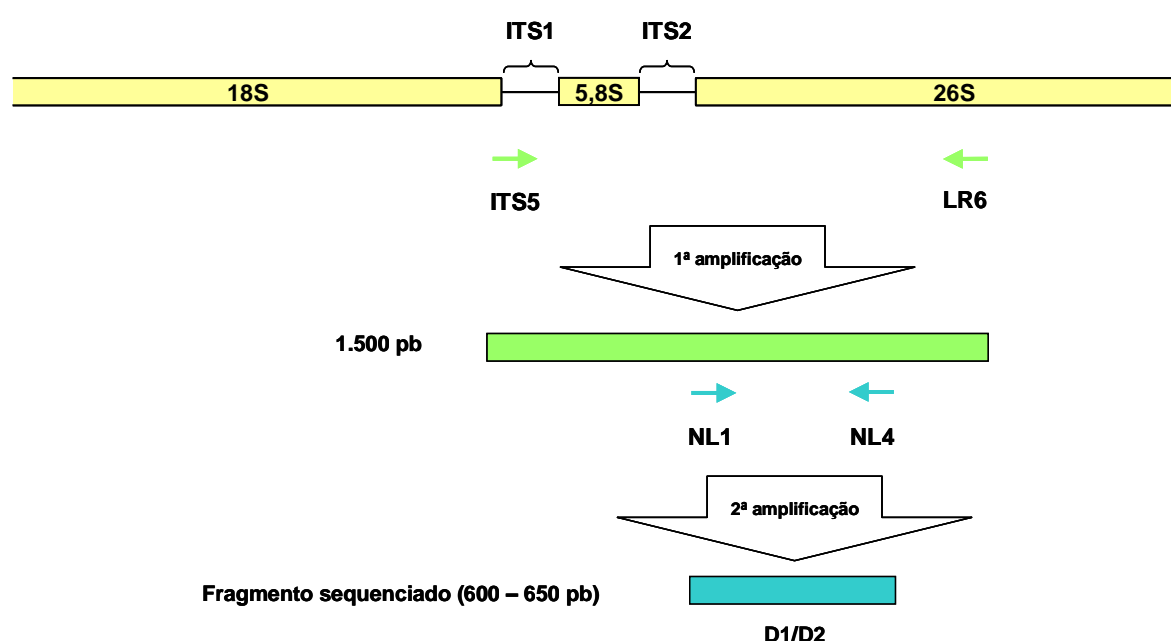
### **2.2.3.2. Identificação molecular**

#### *Extracção rápida de DNA genómico*

Extraíu-se o DNA total das leveduras a caracterizar utilizando um método de extracção rápido que, apesar de originar DNA relativamente impuro, é adequado para a amplificação por PCR. São adicionados num tubo *Eppendorf* (1,5 ml): 500 µl de Tampão de Lise (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0,3% p/v SDS, pH 8) e 200 µl de esferas de vidro esterilizadas (425-600 µm de diâmetro). Adiciona-se, com o auxílio de uma ansa, uma cultura da levedura com cerca de uma semana em meio sólido YM, de modo a obter-se uma suspensão celular muito densa. Após agitação em *vortex*, à velocidade máxima, durante 3 min, o tubo é incubado durante 1 h num banho de água termostaticado a 65 °C. Após nova agitação em *vortex* durante 3 min, o tubo é centrifugado durante 30 min (13.000 rpm, 4 °C), o sobrenadante transferido para um novo tubo *Eppendorf*, e o DNA é precipitado durante 24 h a -20 °C, após adição de 1/10 do volume de 3 M acetato de sódio e dois volumes de etanol absoluto a -20 °C. O tubo é depois centrifugado durante 20 min (13.000 rpm, 4 °C), o DNA precipitado é lavado com 800 µl de etanol a 70% v/v, seco em exsiccador, e ressuspenso em 50 µl de tampão TE (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8). Para a utilização em reacções de PCR, prepara-se alíquotas da solução após diluição 1:2.500 em água bidestilada, que são mantidas a -20 °C. O DNA mantém-se estável nestas condições durante meses ou, até, anos.

### Sequenciação da região D1/D2 do gene da subunidade 26S de rRNA

Para a sequenciação da região D1/D2 do gene do rRNA da subunidade 26S começa-se por uma primeira amplificação de um fragmento de DNA com cerca de 1.500 pb, numa reacção de PCR com os *primers* ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e LR6 (5'-CGCCAGTTCTGCTTACC-3') (Amersham Biosciences) (Figura 2.1). O programa de amplificação consistiu num passo inicial de desnaturação a 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 64 °C e 2 min a 72 °C, com um passo de extensão final a 72 °C durante 5 min.



**Figura 2.1.** Representação esquemática das duas amplificações sucessivas realizadas para a sequenciação da região D1/D2 do gene do rRNA 26S.

Em seguida, a presença do produto amplificado é confirmada por electroforese em gel de 1% p/v agarose e o fragmento de DNA é purificado com o *kit* GFX PCR DNA – *Gel Band Purification* (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. Procedeu-se a uma segunda reacção de amplificação, utilizando o par de *primers* NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), marcados com o fluorocromo Cy5 (Amersham Biosciences). A sequenciação da região D1/D2, usando como DNA-molde o fragmento amplificado na reacção de PCR anterior, foi realizada utilizando o *kit* *Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing* (RPN

2438/RPN2538, Amersham Biosciences) e um sequenciador automático ALF Express II (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. As sequências nucleotídicas das duas cadeias de DNA (sentido 5'→3' e 3'→5') da região D1/D2 foram alinhadas utilizando o programa informático *Alfwin analyser* (Amersham Biosciences). As possíveis ambiguidades detectadas foram resolvidas manualmente, obtendo-se no final deste processo sequências editadas que foram comparadas com as sequências equivalentes disponíveis numa base de dados pública (GenBank).

#### 2.2.4. Identificação por hibridação *in situ* - FISH

##### *Desenho das sequências-alvo*

Para a identificação pelo método FISH foram seleccionadas quatro espécies de levedura: *C. pseudointermedia*, *C. quercitrusa*, *H. uvarum* e *P. guilliermondii*. As sondas complementares das sequências-alvo foram desenhadas com base no alinhamento de sequências nucleotídicas da região D1/D2 do rRNA 26S de fungos e leveduras ascomicetas disponíveis numa base de dados pública (GenBank). As sequências das sondas desenhadas estão listadas na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2.** Sondas de DNA para a identificação específica por FISH e respectivos alvos

Sonda e Posição	Sequência (5'→3')	% GC	T <sub>m</sub> <sup>1</sup> (°C)	Levedura-alvo
Cps160	GGTGTGAGGTACCTACGG	58	55	<i>Candida pseudointermedia</i>
Cqu163	TAGAATTGGACACCTCATCGCAC	48	60	<i>Candida quercitrusa</i>
Cqu402	TGCTAATAAACCTCTCCACGA	44	52	<i>Candida quercitrusa</i>
Hu508	CTCAATCCCGGCTAACAGTA	50	56	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
Pg362	AATATCGAGTCTGATCTCAAACCC	42	60	<i>Pichia guilliermondii</i>
Pg381	ACGAAGGCAAGGCTCACAAAA	44	52	<i>Pichia guilliermondii</i>
Pg523	AGGCAGCATCAACGCAGGCTA	57	66	<i>Pichia guilliermondii</i>

<sup>1</sup> Temperatura de desnaturação.

Para o desenho das sondas foram seleccionados, sempre que possível, os segmentos que, para além de possibilitarem uma detecção específica das leveduras-alvo, se localizassem em zonas mais acessíveis para hibridação (Inácio *et al.*, 2003). A esta fase de construção *in silico* das sondas seguiu-se a escolha das espécies a utilizar para controlo negativo, i.e, espécies filogeneticamente próximas para testar a especificidade de cada sonda.

Como base de comparação (controlo negativo) para cada uma das leveduras analisadas neste estudo, foram utilizadas: para a espécie-alvo *C. pseudointermedia*, a espécie *C. intermedia* (PYCC 2482<sup>T</sup>), cuja região homóloga apresenta apenas uma base de diferença; para a espécie-alvo *C. quercitrusa*, as espécies *Debaryomyces polymorphus* (PYCC 4677) e *P. guilliermondii* (PYCC 3440<sup>T</sup>), cujas regiões homólogas complementares apresentam duas bases de diferença com a espécie-alvo; para a espécie-alvo *H. uvarum* foram utilizadas as espécies *Saccharomyces ludwigii* (PYCC 4385), que tem apenas uma base de diferença numa das extremidades da região homóloga complementar, e *H. guilliermondii* (PYCC 4677), cuja região homóloga complementar tem apenas duas bases de diferença a meio da sequência. A espécie-alvo *P. guilliermondii* foi comparada com a espécie próxima *C. quercitrusa* (PYCC 5789).

### *Cultura e fixação das células*

As leveduras foram cultivadas aerobiamente, em balão Erlenmeyer (25 ml de capacidade), com agitação orbital (150 rpm), em 5 ml de meio YM líquido, a 25 °C. As células foram recolhidas na fase exponencial de crescimento ( $A_{640nm} = 0,8-1,2$ ) por centrifugação durante 5 min a 10.000 rpm, ressuspendidas em tampão PBS 1X (Apêndice I), e novamente centrifugadas durante 5 min a 10.000 rpm. Adicionou-se 250 µl de tampão PBS 1X e igual volume de etanol absoluto frio. A suspensão de células obtida foi guardada a -20 °C. Em ensaios preliminares utilizou-se paraformaldeído 4% p/v para tentar otimizar a técnica de fixação de células. Contudo, optou-se por utilizar o etanol como método de fixação porque se conseguiu melhor sinal de hibridação e melhor observação morfológica das células estudadas.

### *Validação e especificidade das sondas fluorescentes de DNA*

O procedimento experimental utilizado para os ensaios de hibridação *in situ* consistiu no seguinte: i) colocação de 4 µl de suspensão celular (mantida a -20 °C) em cada um dos campos da lâmina; ii) secagem completa em câmara a 37 °C durante aproximadamente 20 min; iii) fixação das células em concentrações de etanol crescentes (3 min a 50% v/v; 3 min a 80% e 3 min a 100%); iv) secagem; v) adição de 9 µl de tampão de hibridação

(Apêndice I) com a percentagem de formamida requerida e 1 µl da solução de sonda (concentração final 30 ng/µl); vi) incubação da lâmina em câmara húmida durante 2,5 h a 46 °C; vii) lavagem suave com tampão de lavagem, seguida de incubação em tampão de lavagem durante 15 min a 46 °C; viii) secagem, ao abrigo da luz (colocar na câmara de fluxo laminar durante alguns minutos e no escuro); ix) adição de uma gota de *Vectashield* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) por cima da lâmina; e x) observação ao microscópio de epifluorescência.

As experiências de hibridação *in situ* foram realizadas em lâminas adequadas para epifluorescência (ref<sup>a</sup> 12164201, *Superior Marienfeld*, Alemanha), com campos (ou poços) rodeados por película hidrofóbica de *teflon*, previamente limpas com etanol 70% v/v. A observação da hibridação *in situ* foi realizada com um microscópio de epifluorescência OLYMPUS BX50, equipado com lâmpada de mercúrio de 100 W modelo U-ULH e um cubo de fluorescência para o fluorocromo Cy3 do tipo U-MA1007. As imagens foram registadas com o auxílio duma máquina fotográfica digital OLYMPUS, modelo C3030-ZOOM.

A optimização das condições reaccionais resultou de um compromisso entre o sinal de fluorescência emitido pela sonda na espécie-alvo e a ausência de sinal para a(s) espécie(s) próxima(s) utilizada(s) como controlo negativo. Foram testadas, para todas as estirpes, condições mínimas de restringência (sem formamida no tampão de hibridação), e com 20, 30 ou 35% p/v de formamida.

Para todas as espécies ensaiadas foi realizada hibridação *in situ* com a sonda universal para eucariontes EUK516 (5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3') Esta sonda funcionou como controlo positivo, garantindo um estado fisiológico adequado das células a testar.

#### *Detecção directa de leveduras em amostras naturais de fruta*

A possibilidade de detectar leveduras directamente em frutos, evitando o isolamento em cultura pura, foi avaliada utilizando uva preta e uva branca, banana, ananás e maçã. Foi apreciada a presença das espécies de levedura que ocorreram com maior frequência e para as quais foram desenvolvidas sondas de DNA marcadas com o fluorocromo Cy3. O procedimento para a obtenção de suspensões com as amostras naturais foi seguido tal como descrito em 2.2.1. De igual forma, a fixação das suspensões foi feita em etanol e o método de hibridação seguiu o processo atrás descrito para células provenientes de culturas puras.

## 2. 3. Resultados e discussão

### ***Leveduras isoladas e sua identificação***

A aplicação das metodologias tradicionais de isolamento neste trabalho constituiu um ponto de partida para uma noção sobre as populações de leveduras presentes na fruta seleccionada. Registou-se a ocorrência de leveduras nas suspensões preparadas a partir de todos os tipos de fruta analisados. O número total de colónias, presumidamente de leveduras, variou muito com a fruta amostrada (Tabela 2.3). Deve, contudo, referir-se que este número é apenas indicativo do nível de colonização de cada fruta, pois houve um enriquecimento de cerca de 24 h a 48 h prévio ao processo de isolamento.

Foram isoladas, no total, vinte estirpes que foram primeiro tentativamente identificadas por um conjunto de características fenotípicas (Apêndice II). Através das características morfofisiológicas e bioquímicas foram identificadas dez espécies pertencentes a nove géneros diferentes (Tabela 2.3). Da totalidade das leveduras isoladas, 25% correspondiam a espécies basidiomicetas. Enquanto Trindade *et al.* (2002) isolaram 42 estirpes ascomicetas e 28 leveduras basidiomicetas a partir da polpa de fruta tropical fresca e congelada, todas as leveduras isoladas a partir de vários tipos de sumo de laranja por outros autores (Arias *et al.*, 2002; Heras-Vazquez *et al.*, 2003) eram de afinidade ascomiceta - *C. stellata*, *H. occidentalis*, *H. uvarum*, *P. fermentans*, *P. kluyveri* e *T. delbrueckii*. No presente trabalho, entre os ascomicetas isolados, 30% pareciam corresponder a *D. hansenii*.

Porque a bateria de testes utilizados para a identificação fenotípica conduziu a resultados dúbios e/ou pouco credíveis, foi necessário proceder à identificação molecular através da sequenciação da região D1/D2 do rRNA 26S (Tabela 2.3). Quatro das estirpes isoladas e identificadas morfofisiologicamente como pertencentes aos géneros *Cryptococcus*, *Pseudozyma* e *Rhodospidium/Rhodotorula* não foram identificadas por métodos moleculares porque este estudo tinha como objectivo seleccionar leveduras que fossem fermentativas. A única excepção, um aparente representante de *Cryptococcus* (ML3), serviu para aferir a qualidade da identificação fenotípica. Curiosamente, a grande maioria das leveduras basidiomicetas foi isolada de meloa.

Das dezasseis estirpes sujeitas a identificação molecular (Tabela 2.3), *C. pseudointermedia* (25%) e *H. uvarum* (19%) foram os isolados mais comuns, seguidos de *P. guilliermondii* (13%) e *P. mexicana* (13%). Os restantes isolados pertencem às espécies *C. parapsilosis*,



**Tabela 2.3.** Leveduras isoladas neste estudo e respectiva ocorrência relativa

Fruto	Identificação		Molecular *	Ocorrência relativa (%)
	Isolados	Fenotípica		
Ananás	AN1 (PYCC 5784)	<i>Candida intermedia</i> / <i>Debaryomyces hansenii</i> ou <i>Schwanniomyces occidentalis</i>	<i>Candida pseudointermedia</i>	15
	AN2	<i>Candida intermedia</i> / <i>Debaryomyces hansenii</i> / ou <i>Schwanniomyces occidentalis</i>	<i>Candida pseudointermedia</i>	3 (N = 1,3 x10 <sup>8</sup> ufc/ml)
	AN3	<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>	82
Banana	BN1 (PYCC 5789)	<i>Candida quercitrusa</i>	<i>Candida quercitrusa</i>	100 (N = 5,4 x10 <sup>8</sup> ufc/ml)
Maçã	MC1 (PYCC 5782)	<i>Hanseniaspora</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	96
	MC2	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	4
	MC3 (PYCC 5791)	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida</i> sp. nov.	<10 <sup>-4</sup> (N = 2,5 x10 <sup>8</sup> ufc/ml)
Manga	MG1	<i>Pseudozyma antarctica</i>	n.d.	100 (N = 1,0 x10 <sup>3</sup> ufc/ml)
Meloa	ML1	<i>Rhodospiridium diobovatum</i> / <i>Rhodotorula glutinis</i>	n.d.	58
	ML2	<i>Pseudozyma antarctica</i>	n.d.	30 (N = 34 ufc/ml)
	ML3	<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Cryptococcus magnus</i>	12
Papaia	Pp1	<i>Candida parapsilosis</i> / <i>Pichia etchellsii</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	100 (N = 4x10 <sup>2</sup> ufc/ml)
Pêssego	PS1	<i>Candida rugosa</i> / <i>Issatchenkia terricola</i> ou <i>Candida inconspicua</i>	<i>Issatchenkia terricola</i>	32
	PS2	<i>Cryptococcus albidus</i>	n.d.	3 (N = 5x10 <sup>3</sup> ufc/ml)
	PS4 (PYCC 5790)	<i>Pichia mexicana</i>	<i>Pichia mexicana</i>	48
	PS5	<i>Pichia mexicana</i>	<i>Pichia mexicana</i>	17
	UvBr1	<i>Candida intermedia</i> / <i>Debaryomyces hansenii</i> ou <i>Schwanniomyces occidentalis</i>	<i>Candida pseudointermedia</i>	10
Uva branca	UvBr2 (PYCC 5788)	<i>Candida intermedia</i> / <i>Debaryomyces hansenii</i> ou <i>Schwanniomyces occidentalis</i>	<i>Candida pseudointermedia</i>	6 (N = 4,9 x10 <sup>5</sup> ufc/ml)
Uva preta	UvBr3	<i>Debaryomyces hansenii</i> / <i>Pichia guilliermondii</i> ou <i>Schwanniomyces occidentalis</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>	84
Uva preta	UvPr1 (PYCC 5783)	<i>Kloeckera/Hanseniaspora</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	100 (N = 1,9 x10 <sup>5</sup> ufc/ml)

\* Sequenciação da região D1/D2 do gene do rRNA da subunidade 26S.  
n.d. – não determinada.

---

*C. quercitrusa*, *Cryptococcus magnus*, *Issatchenkia terricola*, e a uma espécie de *Candida* que aparenta corresponder a uma espécie nova.

Quatro frutas (banana, manga, papaia e uva preta) originaram culturas puras de *C. quercitrusa*, *Pseudozyma antarctica*, *C. parapsilosis* e de *H. uvarum*, respectivamente. Na maçã predominaram as leveduras apiculadas, enquanto no ananás e na uva branca *P. guilliermondii* apareceu como espécie dominante (> 80%) e no pêssigo a espécie *P. mexicana* surgiu com maior ocorrência relativa (65%). A meloa e o pêssigo foram as frutas que apresentaram maior diversidade de leveduras (três espécies de três géneros diferentes). O ananás, maçã e uva branca originaram dois tipos de colónias correspondendo a dois géneros de levedura. É bem possível, dada não só a subjectividade na observação da macromorfologia das colónias e capacidade de as distinguir como a interferência dos fungos filamentosos a crescerem no mesmo meio, que os resultados sobre as espécies isoladas fiquem qualitativa e quantitativamente aquém da realidade. De notar que todas as espécies ascomicetas isoladas são reconhecidamente fermentativas (Barnett *et al.*, 2003).

Só nos casos dos isolados AN3 (*P. guilliermondii*), BN1 (*C. quercitrusa*), MC1, MC2 e UvPr1 (*Hanseniaspora* ou *H. uvarum*), PS4 e PS5 (*P. mexicana*) se verificou uma concordância absoluta entre a identificação fenotípica e molecular.

A maioria da inconsistência entre os resultados da identificação fenotípica e os da molecular (44% no total), deve-se à ausência da observação de esporos, no caso de espécies teleomórficas como *D. hansenii* e ao reduzido número de testes na bateria de testes utilizada (Apêndice II). O crescimento com 50% p/v glucose e o crescimento em meio sem tiamina, biotina ou piridoxina foram responsáveis por quase 90% das ambiguidades ou identificações incorrectas detectadas. A ausência do teste com 50% p/v glucose ocasionou dificuldades na identificação dos isolados de ananás, meloa e uva branca. De qualquer modo, veio a verificar-se que se tratava, na maior parte, de estirpes *C. pseudointermedia* que não se encontrava sequer entre as hipóteses consideradas na identificação fenotípica. A falta dos testes de crescimento em meio sem vitaminas específicas prejudicou a identificação correcta de isolados de papaia e pêssigo (PS1). *Cryptococcus albidus* difere fenotipicamente de *Cryptococcus magnus* na assimilação de inulina e de glicerol (Barnett *et al.*, 2003).

Em estudos semelhantes, a comparação dos resultados obtidos na identificação de leveduras associadas a produtos lácteos revelou que a identificação baseada em técnicas tradicionais fenotípicas foi confirmada por métodos moleculares em apenas 54% dos casos

(Lopandic *et al.*, 2006). Segundo Xufre *et al.* (2006), numa investigação sobre a dinâmica de populações de leveduras durante uma fermentação vinária, a identificação fenotípica das leveduras isoladas foi confirmada em 97% dos casos usando a técnica FISH.

Quando comparada a sequência da região D1/D2 do gene do rRNA 26S da estirpe MC3, proveniente da maçã, com as sequências homólogas disponíveis no GenBank, verificou-se uma divergência de 26 bases (cerca de 5,4%) em relação à espécie mais próxima, *C. pseudointermedia*, o que sugere que MC3 representa uma espécie nova (Kurtzman & Robnett, 1998). As principais diferenças fenotípicas entre a estirpe isolada (ver Apêndice II) e *C. pseudointermedia* são a fermentação de D-galactose, maltose e  $\alpha$ -metil-D-glucósido, a assimilação de  $\alpha$ -metil-glucósido e o crescimento com cicloheximida 100 ppm (Barnett *et al.*, 2003). A descrição da nova espécie requer uma análise fenotípica mais completa e cuidada.

Numa referência aos ambientes naturais em que ocorrem as espécies fermentativas encontradas é de salientar o seguinte. *Candida parapsilosis* é uma levedura que causa elevado número de infecções nasomiais (Basseti *et al.*, 2006). *C. pseudointermedia* foi originalmente isolada de pasta de peixe fermentada com origem no Japão (Barnett *et al.*, 2003). *C. quercitrusa* ocorre geralmente no solo e em águas residuais (Yin *et al.*, 1998), mas há uma referência muito recente ao isolamento desta levedura na superfície de fruta e vegetais (Chanchaichaovivat *et al.*, 2007). *H. uvarum* é uma das leveduras mais comuns em uvas e mosto de uva (Torija *et al.*, 2001) ocorrendo também no solo e em flores (<http://www.cbs.knaw.nl/yeast/biolomics.aspx>). *Issatchenkia terricola* ocorre em mosto de uva, solo e água do mar (<http://www.cbs.knaw.nl/yeast/biolomics.aspx>). A presença de *P. guilliermondii* em fruta é frequente e esta espécie tem sido usada com sucesso no biocontrolo de infecções por fungos filamentosos no pimento e em frutos como citrinos, uvas, pêra e morangos (Droby *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 1999; Arras *et al.*, 2002; Chanchaichaovivat *et al.*, 2007). *P. mexicana* foi originalmente isolada de cactos no México (Barnett *et al.*, 2003) e está pouco representada em colecções de cultura (<http://www.cbs.knaw.nl/yeast/biolomics.aspx>).

### **Desenvolvimento de sondas específicas FISH**

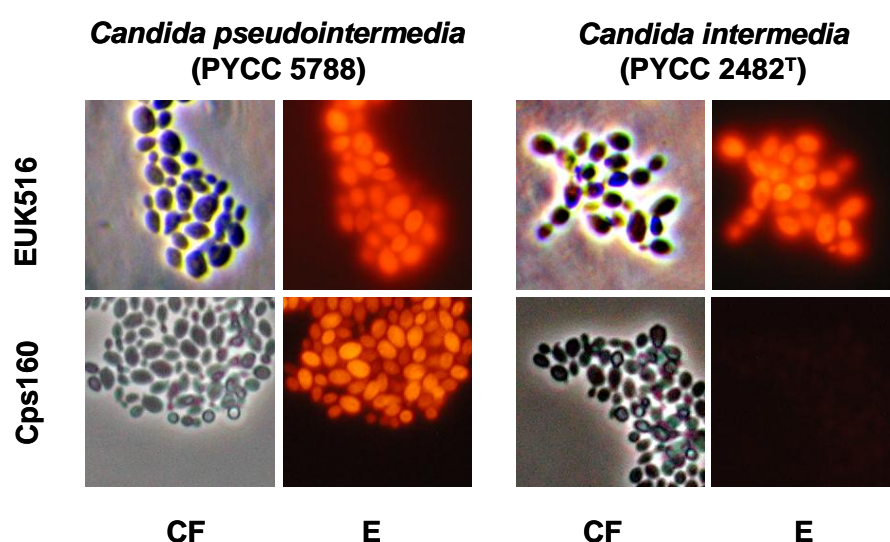
Foram desenhadas sondas para identificação pelo método FISH para quatro das espécies de levedura mais frequentemente isoladas de fruta neste trabalho (Tabela 2.3): *C. pseudointermedia*, *C. quercitrusa*, *H. uvarum* e *P. guilliermondii*. No caso de duas das

espécies, *C. quercitrusa* e *P. guilliermondii*, foi necessário desenvolver mais do que uma sonda até que os resultados fossem aceitáveis, como adiante se descreve.

Nos ensaios de validação das sondas desenhadas foram testados dois métodos de fixação das células a partir duma cultura pura, com etanol e com paraformaldeído. Os sinais obtidos com o último foram muito fracos e as células apresentaram uma morfologia alterada. Optou-se, então, por fixar com etanol.

A hibridação com a sonda universal EUK516 (Figura 2.2 a 2.5) resultou num sinal muito forte para todas as espécies de levedura incluídas neste estudo. Estes sinais fortes de fluorescência indicam que as células estavam em bom estado fisiológico, permeáveis à entrada da sonda e com um conteúdo celular em RNA elevado.

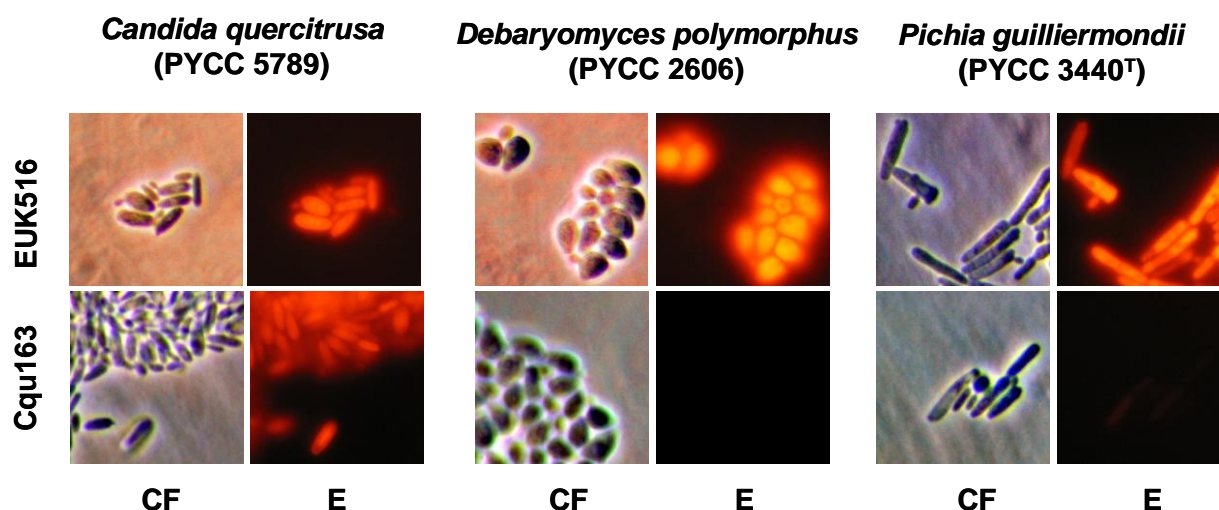
A sonda Cps160, desenvolvida para *C. pseudointermedia*, também foi ensaiada em testes de hibridação *in situ* com a estirpe *C. intermedia* PYCC 2482<sup>T</sup>, cuja região homóloga complementar a esta sonda apresenta apenas uma base de diferença. Estas duas leveduras foram testadas em paralelo, com concentrações crescentes de formamida no tampão de hibridação. Optimizadas as condições experimentais (20% de formamida), demonstrou-se que a sonda Cps160 é específica para *C. pseudointermedia* (Figura 2.2).



**Figura 2.2.** Hibridação *in situ* com a sonda específica para *C. pseudointermedia* (Cps160, marcada com Cy3), utilizando 20% de formamida no tampão de hibridação. Controlo negativo - *C. intermedia*; EUK516 – sonda utilizada como controlo positivo. CF - contraste de fase; E - epifluorescência; ampliação 40X.

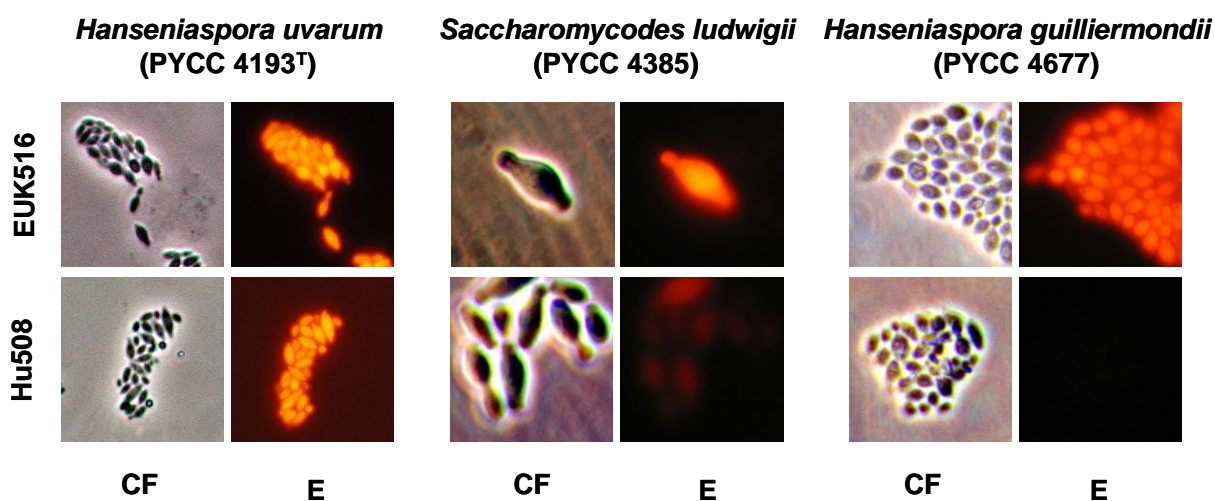
Com a sonda Cqu163, desenvolvida para *C. quercitrusa*, foram realizados testes de hibridação *in situ* com as estirpes *D. polymorphus* PYCC 4677 e *P. guilliermondii* PYCC 3440<sup>T</sup> (Figura 2.3), para as quais a região homóloga complementar a esta sonda apresenta apenas duas bases de diferença.

O desenho de uma sonda específica para *C. quercitrusa* revelou-se mais difícil do que para *C. pseudointermedia*. De início, foi escolhido um fragmento localizado na posição 402 da região D1/D2 do rRNA da subunidade 26S por se considerar (*in silico*) ser o mais adequado. No entanto, os resultados com a sonda Cqu402 e com a espécie *S. cerevisiae*, utilizada como controlo negativo por a sua região homóloga complementar a esta sonda ter apenas duas bases de diferença junto dum das extremidades, não foram reprodutíveis. Isto apesar de se terem observado sinais intensos, para ambas as espécies, com a sonda universal EUK516 e da região-alvo a sonda Cqu402 se encontrar numa zona do rRNA acessível para hibridação (Inácio *et al.*, 2003). Uma mudança de empresa fornecedora do oligonucleótido marcado com o fluorocromo Cy3 não alterou a inconsistência dos resultados. Esta dificuldade só foi ultrapassada quando se decidiu desenhar uma sonda à partida considerada menos específica, mas que se encontra numa zona de acessibilidade já comprovada para Cps160 e para outras sondas desenhadas com sucesso (Inácio *et al.*, 2003). Os resultados obtidos, utilizando como espécies-referência (controlo negativo) *D. polymorphus* e *P. guilliermondii*, revelaram que a sonda Cqu163 é específica para *C. quercitrusa* (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Hibridação *in situ* com a sonda específica para *C. quercitrusa* (Cqu163, marcada com Cy3), utilizando 20% de formamida no tampão de hibridação. Controlo negativo - *D. polymorphus* e *P. guilliermondii*; EUK516 – sonda utilizada como controlo positivo. CF - contraste de fase; E - epifluorescência; ampliação 40X.

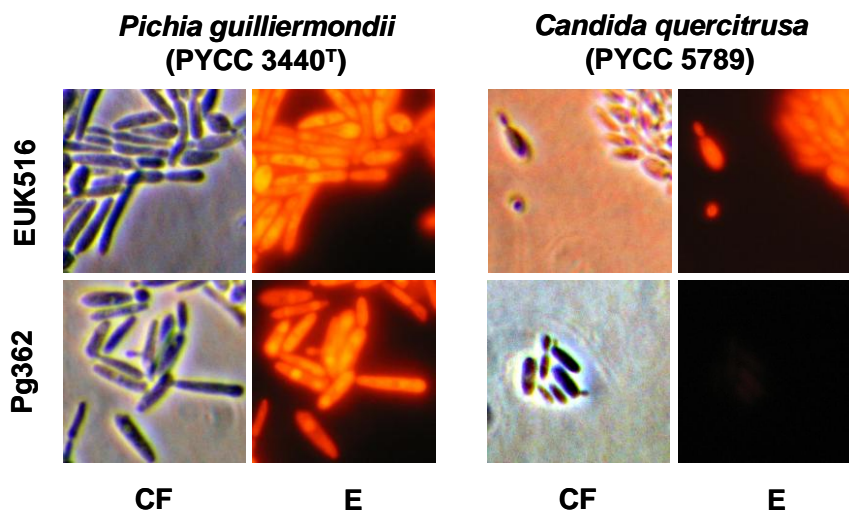
Com a sonda Hu508, desenvolvida para *H. uvarum*, foram realizados testes de hibridação *in situ* com as estirpes *S´codes ludwigii* PYCC 5385 e *H. guilliermondii* PYCC 4677, cuja regiões homólogas complementares a esta sonda apresentam apenas uma base de diferença numa das extremidades, no caso de *S´codes ludwigii*, e duas bases de diferença localizadas mais ou menos a meio da sequência, para *H. guilliermondii*. O sinal apresentado na Figura 2.4 para *S´codes ludwigii* com a sonda Hu508 foi o mais fraco observado para todas as condições reaccionais ensaiadas. Comparando este sinal de fluorescência com o sinal de hibridação obtido com a espécie-alvo, *H. uvarum*, conclui-se que é bastante mais fraco, permitindo facilmente a distinção não só desta espécie como do sinal emitido com a sonda universal EUK516. Assim, embora relativamente menos específica do que as sondas desenvolvidas para as espécies antes referidas, a sonda Hu508 também se mostrou específica para *H. uvarum* (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Hibridação *in situ* com a sonda específica para *H. uvarum* (Hu508, marcada com Cy3), utilizando 20% de formamida no tampão de hibridação. Controlo negativo – *S´codes ludwigii* e *H. guilliermondii*; EUK516 – sonda utilizada como controlo positivo. CF - contraste de fase; E - epifluorescência; ampliação 40X, excepto para *S´codes ludwigii* (100X).

No caso da sonda Pg362, desenvolvida para *P. guilliermondii*, foram realizados testes de hibridação *in situ* com a estirpe *C. quercitrusa* PYCC 5789, cuja região homóloga complementar a esta sonda apresenta, como já foi referido atrás, apenas duas bases de diferença perto duma das extremidades.

Tal como para *C. quercitrusa*, a validação duma sonda específica para *P. guilliermondii* revelou-se igualmente trabalhosa. A primeira sonda desenhada para a identificação de *P. guilliermondii* (Pg381), na posição 381 da região D1/D2 do rRNA da subunidade 26S, foi considerada a mais adequada *in silico*. A sonda foi testada em condições de restringência mínima e com 20% de formamida no tampão de hibridação. Na procura de condições reaccionais óptimas, observou-se a perda absoluta de sinal de fluorescência com esta sonda, permanecendo, contudo, um sinal muito forte para a sonda universal EUK516, o que garantia que o estado fisiológico das células era suficientemente bom. Sem encontrar uma explicação para o sucedido, optou-se por desenhar uma segunda sonda na posição 523 da mesma região D1/D2, também potencialmente específica. Os resultados foram negativos, mesmo em condições de restringência mínima (ausência de formamida no tampão de hibridação). Estas dificuldades só foram vencidas com a sonda Pg362, que se revelou específica para *P. guilliermondii* (Figura 2.5), mas que se encontra numa zona de acessibilidade aparentemente mais reduzida (Inácio *et al.*, 2003).



**Figura 2.5.** Hibridação *in situ* com a sonda específica para *P. guilliermondii* (Pg362, marcada com Cy3), utilizando 20% de formamida no tampão de hibridação. Controlo negativo – *C. quercitrusa*; EUK516 – sonda utilizada como controlo positivo. CF - contraste de fase; E - epifluorescência; ampliação 40X.



### **Aplicação do método FISH para detecção directa**

O objectivo desta parte do trabalho foi o de otimizar uma técnica molecular simples, fiável e sensível, que permitisse a detecção directa e rápida de leveduras que ocorrem com frequência em amostras naturais de fruta, sem necessidade de recorrer ao isolamento prévio.

As condições de hibridação optimizadas com culturas puras foram testadas em amostras naturais, a partir das suspensões de frutas incubadas durante dois dias em água destilada e à temperatura ambiente. A autofluorescência de fundo, observada frequentemente em amostras vegetais, tornou a interpretação dos resultados mais difíceis, embora as células de levedura fossem reconhecíveis (Figuras 2.6 a 2.9), tal como é referido por outros autores (Tavares *et al.*, 2004).

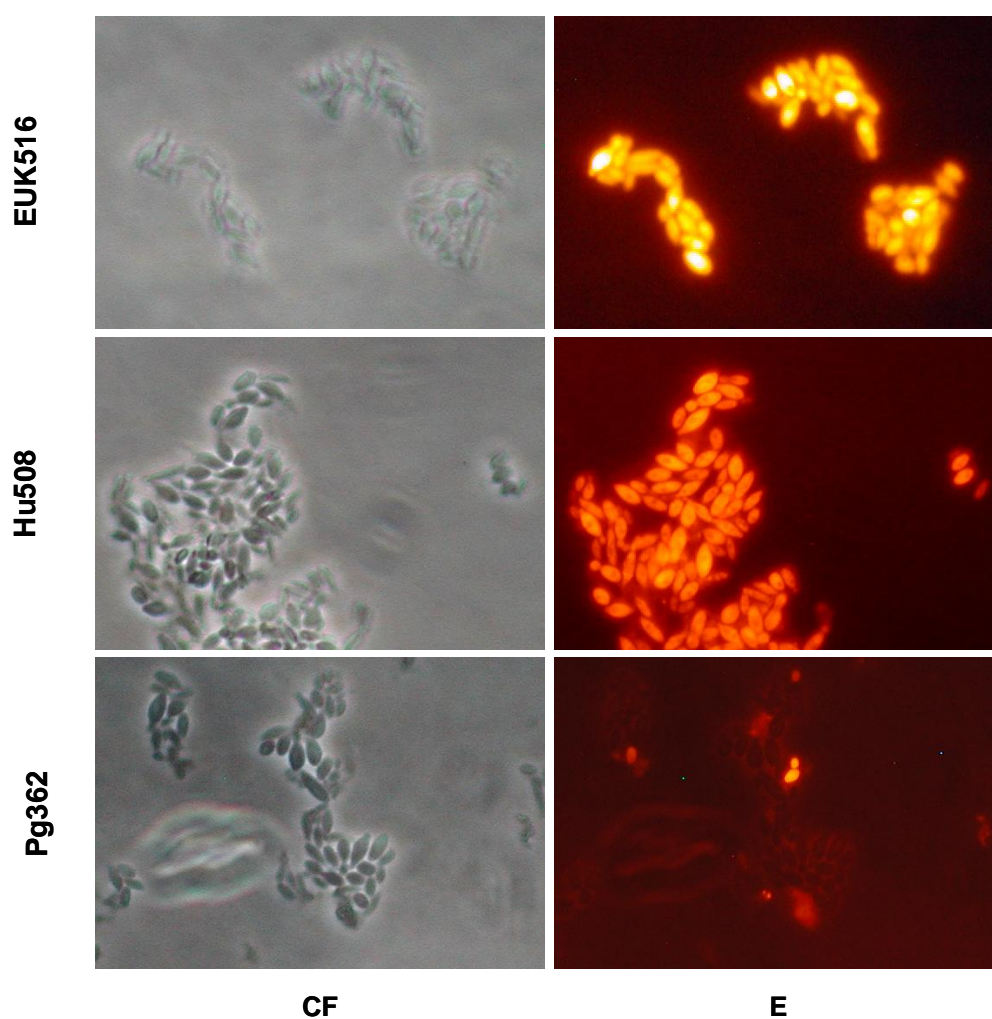
Como se pode observar nas Figuras 2.6 e 2.7, usando a sonda Hu508, a ocorrência de leveduras da espécie *H. uvarum* foi notória tanto em uva preta como em uva branca, o que concorda com o conhecimento de que estadios precoces da fermentação vinária são caracterizados pela presença de leveduras apiculadas do género *Kloeckera/Hanseniaspora* (Ciani & Piccioti, 1995; Gil *et al.*, 1996; Gutiérrez *et al.*, 1999; Xufre *et al.*, 2006). Observa-se que *H. uvarum* constituiu a quase totalidade das leveduras presentes na uva preta, enquanto que na uva branca esta espécie estava presente em menor quantidade relativa. No que se refere à uva preta os resultados estão de acordo com a identificação efectuada no início deste trabalho, ao contrário do que acontece em relação à uva branca pois *H. uvarum* não foi isolada da suspensão obtida por maceração desta fruta (Tabela 2.3).

Em uva preta também foi detectada uma célula de *P. guilliermondii* que emitiu sinal de fluorescência intensa em resultado da hibridação com a sonda Pg362 (Figura 2.6). Esta espécie não tinha sido isolada deste tipo de fruta (Tabela 2.3). Por outro lado, era de esperar a detecção de uma maioria de leveduras da espécie *P. guilliermondii* em uva branca (ver Tabela 2.3), mas tal não se verificou (resultados não mostrados).

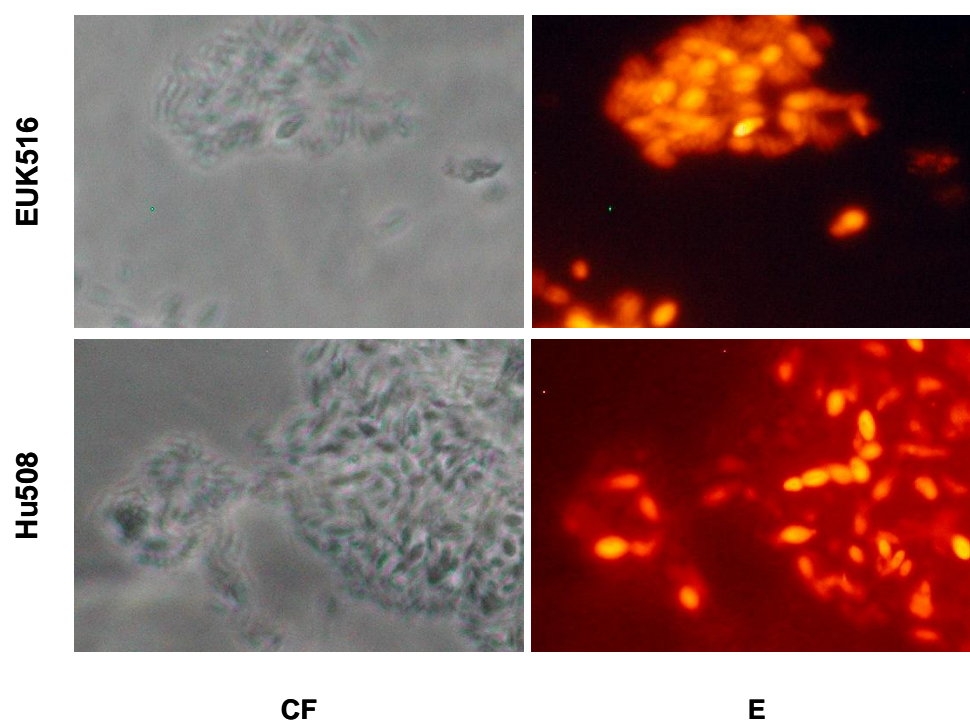
Não foram detectadas células fluorescentes quando as sondas específicas para *C. pseudointermedia* (Cps160) e *C. quercitrusa* (Cqu163) foram aplicadas às amostras de uva (resultados não mostrados). De referir que *C. pseudointermedia* tinha sido identificada em 16% das estirpes isoladas de uva branca.



É possível que as diferenças observadas entre a detecção directa pelo método FISH e a identificação molecular se devam ao facto dos dois métodos não terem sido aplicados às mesmas amostras. A origem, manuseamento e condições de conservação das uvas são, certamente, factores que podem influenciar a frequência de ocorrência das espécies nas peças amostradas.



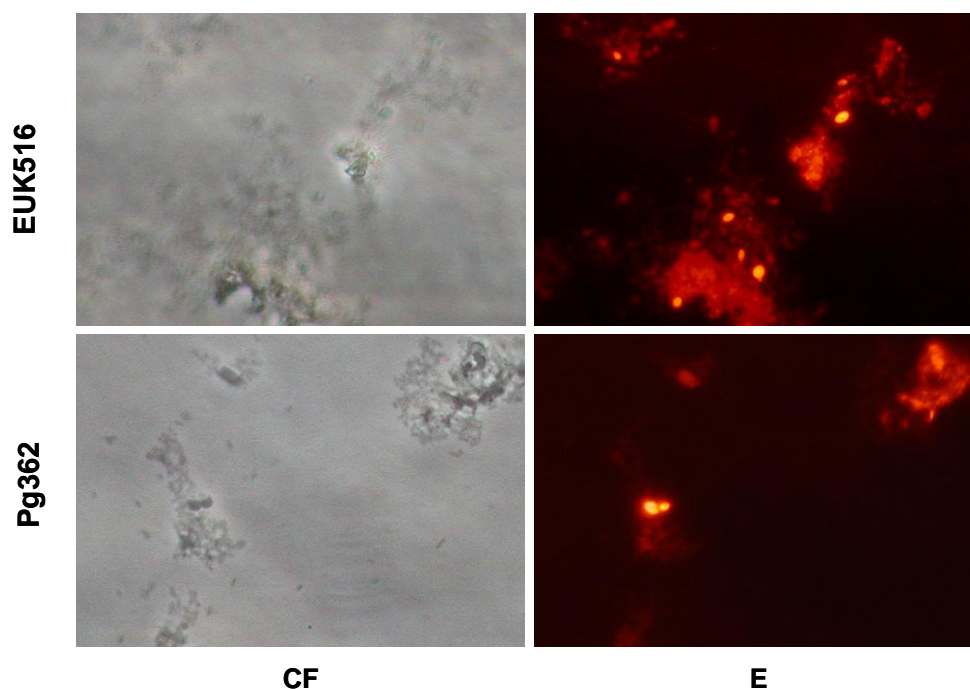
**Figura 2.6.** Detecção directa de leveduras das espécies *H. uvarum* e *P. guilliermondii* com as sondas específicas Pg362 e Hu508, desenvolvidas neste trabalho e aplicadas a suspensões obtidas a partir de uva preta. EUK516 – sonda utilizada como controlo positivo. CF - Contraste de fase; E – epifluorescência; ampliação 40X.



**Figura 2.7.** Detecção directa de leveduras da espécie *H. uvarum* com a sonda Hu508, desenvolvida neste trabalho e aplicada a suspensões obtidas a partir de uva branca. EUK516 – sonda utilizada como controlo positivo. CF - Contraste de fase; E - epifluorescência; ampliação 40X.

Na suspensão obtida a partir de maçã (Figura 2.8) foi detectada uma célula de *P. guilliermondii* que emitiu sinal de fluorescência intensa com a sonda Pg362. Não foram detectadas células fluorescentes com a aplicação de qualquer das sondas específicas para as outras espécies (resultados não mostrados). Particularmente surpreendente foi o facto de não terem sido detectadas células que hibridassem com Hu508, sonda específica para *H. uvarum*, levedura predominante nos isolamentos efectuados a partir desta fruta (Tabela 2.3). Uma das razões para esta ausência pode estar no número reduzido de células observado na amostra de maçã analisada, como se pode comprovar pela aplicação da sonda universal EUK516 (Figura 2.8).

Na amostra de maçã (Figura 2.8) foram observados fragmentos de tecidos e estruturas vegetais que dificultaram a detecção de células de levedura. A dificuldade em obter fotografias focadas de microscopia em contraste de fase poderá estar relacionada com as características mucosserosas da amostra.

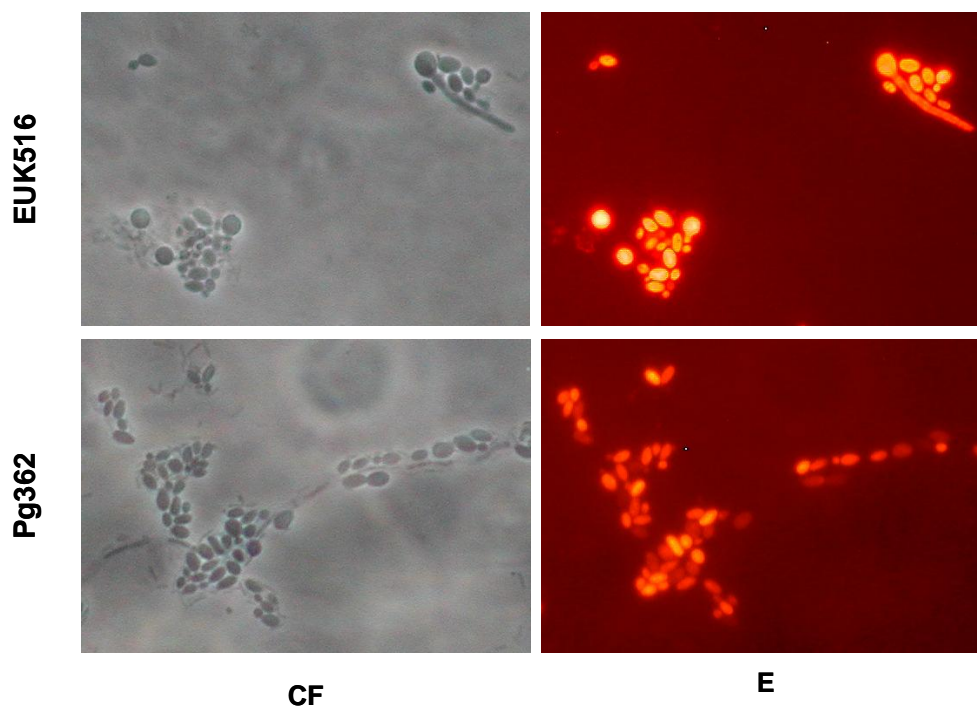


**Figura 2.8.** Detecção directa de leveduras da espécie *P. guilliermondii* com a sonda Pg362, desenvolvida neste trabalho e aplicada a suspensões obtidas a partir de maçã; EUK516 - sonda utilizada como controlo positivo. CF - Contraste de fase; E - epifluorescência; ampliação 40X.

Na amostra de ananás (Figura 2.9) foi detectado um número significativo de células com sinais intensos de fluorescência após hibridação com a sonda Pg362, específica para *P. guilliermondii*. Esta observação concorda com os resultados do isolamento realizado no início deste estudo, em que 82% das leveduras provenientes do ananás foram também identificadas como *P. guilliermondii*. Não foi encontrado sinal de fluorescência com a sonda Cps160, ao contrário do que seria de esperar com base nos isolamentos efectuados. As sondas Hu508 e Cqu163 também não hibridaram com células presentes na suspensão da amostra de ananás.

Todas as sondas específicas desenvolvidas (Cps160, Cqu163, Hu508 e Pg362) foram aplicadas a amostras de banana. Lembra-se que para esta fruta foi encontrada uma cultura pura de *C. quercitrusa* (ver Tabela 2.3). Embora na observação directa de suspensões de banana se detectasse fluorescência com a aplicação da sonda universal EUK516, nenhuma das outras sondas originou sinal positivo, sugerindo a ocorrência de espécies diferentes das analisadas. Tal como aconteceu com a maçã, o tipo de material nas amostras de

banana e a autofluorescência do material vegetal dificultaram a observação ao microscópio e a detecção de células de levedura.



**Figura 2.9.** Detecção directa de leveduras da espécie *P. guilliermondii* com a sonda Pg362, desenvolvida neste trabalho e aplicada a suspensões obtidas a partir de ananás; EUK516 - sonda utilizada como controlo positivo. CF - Contraste de fase; E - epifluorescência; ampliação 40X.

Tanto quanto se sabe, este é o primeiro trabalho sobre o tipo de leveduras que ocorrem em ananás, banana, manga, meloa ou pêssigo. Apesar da inconsistência com os resultados dos isolamentos, ficou demonstrado que essas leveduras podem ser observadas directamente a partir de suspensões de fruta utilizando o método FISH e sondas específicas, sem necessidade de cultura prévia.

## **CAPÍTULO 3**

# **CARACTERIZAÇÃO FERMENTATIVA GLOBAL DE LEVEDURAS SELECCIONADAS**



### 3.1. Introdução

#### 3.1.1 Fermentação alcoólica em leveduras

##### *Ocorrência e distribuição relativa*

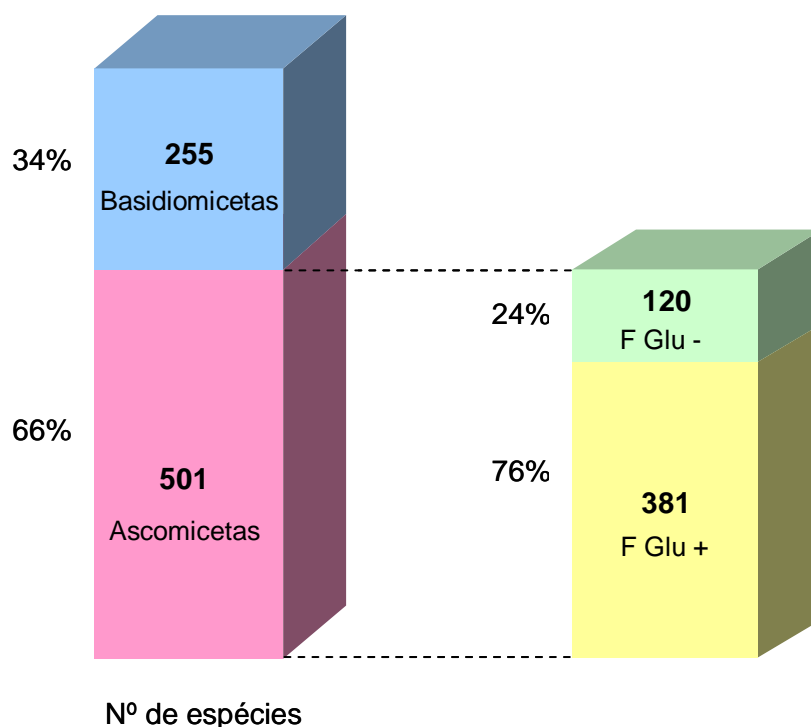
As matérias-primas usadas na produção de etanol por via fermentativa podem ser classificadas em três grandes tipos (Lin & Tanaka, 2006): (i) cana-de-açúcar, melão ou fruta; (ii) amido proveniente de cereais (por ex., milho), mandioca, batata e outros tubérculos; e, (iii) materiais lenhocelulósicos provenientes da madeira, resíduos da agricultura ou pasta de papel. Quando se trata de polissacáridos, como acontece para os dois últimos tipos de substrato, estes terão de ser primeiro hidrolisados para que os açúcares resultantes da hidrólise possam ser convertidos em etanol e anidrido carbónico.

Quanto à possibilidade de fermentar glucose, as leveduras podem ser: i) não-fermentativas; ii) fermentativas obrigatórias; ou iii) fermentativas facultativas. Cerca de metade das espécies de leveduras descritas não fermentam glucose. Em termos genéricos, com base no teste adoptado por taxonomistas para avaliar a capacidade fermentativa, entre os ascomicetas apenas 24% não fermentam D-glucose (Figura 3.1). No entanto, a capacidade de fermentar um determinado hidrato de carbono, com excepção de glucose, não se aplica necessariamente a todas as estirpes duma mesma espécie.

Para além de D-glucose, outras hexoses, como por exemplo D-galactose e D-frutose, são fermentáveis por leveduras. Apenas 23% das espécies (Figura 3.2) contêm estirpes que fermentam D-galactose, entre as quais *C. pseudointermedia*, *Debaryomyces occidentalis* e *S. cerevisiae*. A fermentação de pentoses é rara. Apesar de existirem muitas espécies que utilizam D-xilose (a pentose mais abundante em natureza) como fonte de carbono e energia, poucas são capazes de fermentar este açúcar (Figura 3.2). São exemplos: *C. shehatae*, *Pachysolen tannophilus* e *P. stipitis* (Slininger *et al.*, 1982; Toivola *et al.*, 1984; Tran & Chambers, 1986). *S. cerevisiae* é incapaz de utilizar pentoses. A capacidade de fermentar pentoses é importante devido à sua presença quantitativamente significativa em hemiceluloses, um substrato com forte potencial para a produção de bioetanol.

O metabolismo dos dissacáridos é precedido pela sua hidrólise e produção dos respectivos monómeros. Dependendo da espécie de levedura e da natureza do açúcar, esta hidrólise pode ocorrer fora da célula, no espaço periplasmático, e/ou dentro da célula, após o

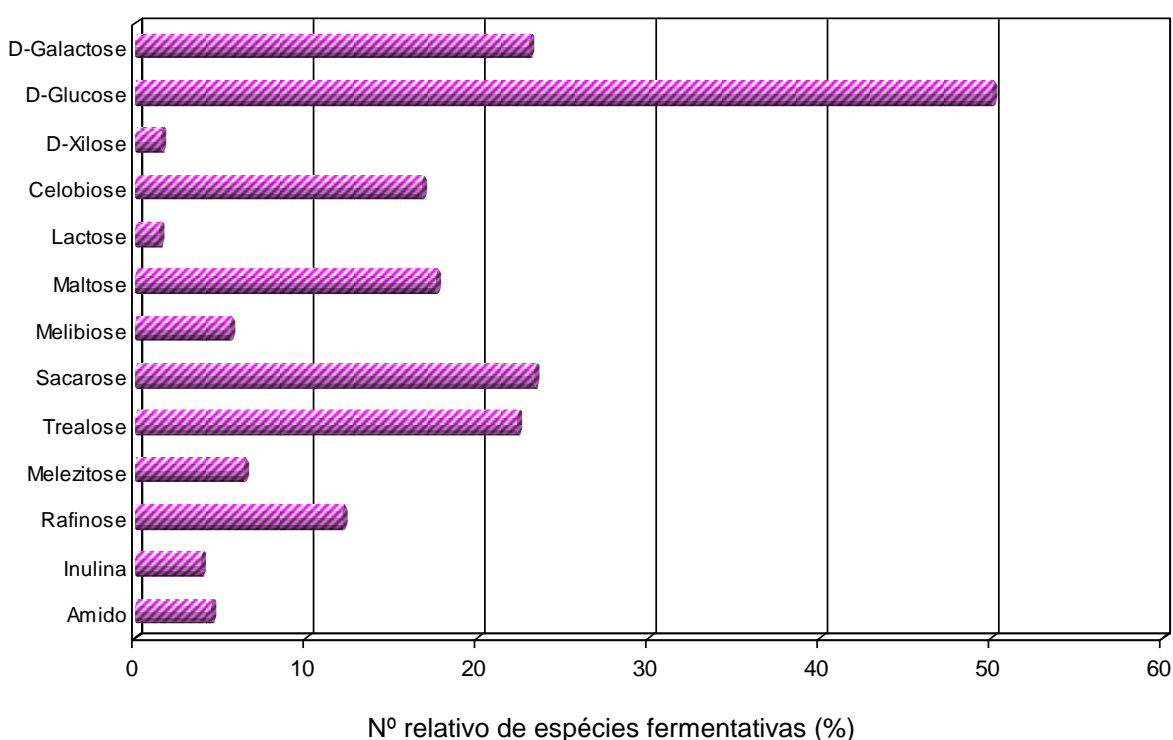
transporte do dissacárido. Cerca de 23% das leveduras fermentam sacarose (Figura 3.2), dissacárido abundante em cana-de-açúcar e beterraba sacarina. A maltose, um dissacárido que é produto da hidrólise do amido, pode ser fermentada por aproximadamente 18% das leveduras conhecidas (Figura 3.2), como por exemplo *D. hansenii*, *P. angusta* e *S. cerevisiae*. Poucas espécies (cerca de 1,5%) têm a capacidade de fermentar um outro dissacárido que é o principal hidrato de carbono do soro de leite, a lactose (Barnett, 1997b). Entre as que a possuem estão *Kl. lactis*, *Kl. marxianus* e *C. intermedia*. O género *Kluyveromyces* destaca-se porque contém espécies que conseguem produzir até 10% v/v de etanol a partir de 20% p/v de lactose (Janssens *et al.*, 1983). A celobiose, dissacárido que resulta da hidrólise da celulose pode ser fermentado por cerca de 17% das leveduras (Figura 3.2). São exemplos: *C. acidothermophilum*, *C. lusitaniae* e *C. wickerhamii* (Freer & Detroy, 1982; McCracken & Gong, 1982; Spencer-Martins & van Uden, 1984; Kadam & Schmidt, 1997). A melibiose é também um dissacárido fermentável.



**Figura 3.1.** Ocorrência relativa de leveduras fermentativas. (Fonte: <http://www.cbs.knaw.nl/yeast/biolomics.aspx>)



Os melaços, utilizados na produção de etanol e de levedura de panificação, para além de serem ricos em glucose, frutose e sacarose, também contêm o trissacárido rafinose que é decomposto por uma invertase em frutose e melibiose. São cerca de 12% as espécies de levedura capazes de fermentar rafinose, enquanto o trissacárido melezitose é fermentado apenas por cerca de 6% das leveduras (Figura 3.2). Outro trissacárido, a maltotriose, é o segundo açúcar mais abundante (15-20%) no mosto cervejeiro, logo a seguir à maltose (50-60%), e é fermentável por estirpes de *S. cerevisiae* (Zastrow *et al.*, 2001; Salema-Oom *et al.*, 2005).



**Figura 3.2.** Açúcares fermentáveis por leveduras e distribuição relativa da capacidade fermentativa no total de espécies actualmente reconhecidas. (Fonte: <http://www.cbs.knaw.nl/yeast/biolomics.aspx>)

O amido é, logo a seguir à celulose, o polissacárido mais abundante na natureza, ocorrendo principalmente em plantas superiores. Várias leveduras produzem enzimas amilolíticas (Spencer-Martins & van Uden, 1977), e o amido pode ser fermentado por cerca de 4,5% das leveduras. São exemplos: *C. shehatae*, *C. tropicalis* e *P. anomala*. Outro polissacárido, a

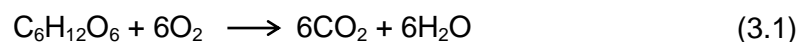
---

inulina, é composto essencialmente por frutose e também é fermentável por leveduras que produzem inulinases (Sá-Correia & van Uden, 1983b).

### *Metabolismo fermentativo*

A via de Embden-Mayerhoff-Parnas é a principal via glicolítica para a conversão, por leveduras, de D-glucose em piruvato. O destino do piruvato depende da levedura e das condições de cultura, nomeadamente da concentração de açúcar e da disponibilidade de oxigénio. Quando o metabolismo é respiratório, os açúcares são essencialmente oxidados a anidrido carbónico, enquanto na fermentação são convertidos em etanol e anidrido carbónico.

O metabolismo respiratório corresponde à reacção global:



Por sua vez, o metabolismo fermentativo pode ser traduzido globalmente pela reacção:



Na maioria das leveduras fermentativas, a respiração predomina em condições aeróbias (Efeito de Pasteur) enquanto em condições de anaerobiose, ou limitação por oxigénio, a via dominante é a fermentação. A levedura *S. cerevisiae* é uma das poucas com capacidade de crescer igualmente bem em condições de aerobiose e de anaerobiose, fermentando em qualquer dos dois casos desde que a concentração de açúcar não seja muito baixa (Efeito de Crabtree). Esta propriedade é particularmente importante para a sua vasta utilização industrial, que abrange a produção de bebidas alcoólicas e de pão. As espécies Crabtree-positivas, entre as quais também se incluem *Brettanomyces intermedius*, *H. uvarum*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Z. bailii*, só demonstram capacidade respiratória plena com concentrações baixas de açúcar e com suficiente oxigénio disponível. Entre os principais mecanismos regulatórios gerais do metabolismo de açúcares estão a repressão catabólica, também designada por efeito da glucose, e a inactivação. Podem ainda ser observados em leveduras o Efeito de Kluver (incapacidade de fermentar certos dissacáridos apesar da capacidade de fermentação dos respectivos monómeros) e o Efeito

---

de Custers (inibição da fermentação alcoólica em condições de anaerobiose) (Barnett & Entian, 2005).

Um dos parâmetros mais importantes para a ocorrência de fermentação alcoólica é a concentração de oxigénio (ou tensão de oxigénio dissolvido) no meio de cultura (Neirinck *et al.*, 1984; Visser *et al.*, 1990). Apesar de muitas leveduras serem capazes de fermentar (van Dijken *et al.*, 1986), poucas conseguem crescer sem oxigénio (Visser *et al.*, 1990). Uma boa capacidade fermentativa é um pré-requisito para o crescimento em anaerobiose, pois nenhuma das leveduras não-fermentativas consegue crescer em condições anaeróbias estritas. Contudo, uma boa capacidade fermentativa não é, por si só, suficiente para o crescimento anaeróbio, pois muitas leveduras que fermentam rapidamente não têm a capacidade de crescer em anaerobiose. *C. utilis* e *Pa. tannophilus* são exemplos de leveduras que fermentam bem em condições de limitação de oxigénio, mas são incapazes de crescer em D-glucose na ausência de oxigénio (Visser *et al.*, 1990). *S. cerevisiae*, em comparação com outras leveduras, tem a capacidade de crescer rapidamente em condições de anaerobiose estritas, desde que sejam disponibilizados no meio de cultura esteróis e ácidos gordos insaturados.

Na tentativa de compreender os mecanismos que possibilitam a fermentação alcoólica aeróbia, a maior parte da investigação tem focado no ponto da ramificação do piruvato (Postma *et al.*, 1989; van Urk *et al.*, 1989b; Pronk *et al.*, 1996) (ver Figura 1.3). Quando o fluxo metabólico é baixo, o piruvato é essencialmente oxidado a acetil-Coenzima A pelo complexo piruvato desidrogenase. Com um fluxo metabólico mais elevado, há uma saturação do complexo piruvato desidrogenase e o piruvato constitui substrato para a via fermentativa. No entanto, a acção concertada da piruvato descarboxilase, acetaldeído desidrogenase e acetil-Coenzima A sintetase também resulta na produção de acetil-Coenzima A a partir do piruvato (Gancedo & Gancedo, 1973).

O glicerol, succinato e acetato são sub-produtos do metabolismo fermentativo. O glicerol, juntamente com o succinato, são os maiores sub-produtos da fermentação alcoólica e são responsáveis pela redução do rendimento em etanol porque consomem 3-5% dos açúcares fermentáveis (Gancedo & Serrano, 1989). A produção de glicerol deriva da necessidade de, em limitação de oxigénio, oxidar o excesso de NADH formado na glicólise e que não é utilizado como co-substrato da álcool desidrogenase na redução de acetaldeído a etanol. O succinato é formado, durante o metabolismo aeróbio, na presença de elevadas

concentrações de glucose, no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Uma pequena percentagem do acetaldeído produzido a partir do piruvato pode ser desviado para a formação de acetato. Embora seja um produto secundário minoritário da fermentação alcoólica, a produção de acetato resulta num excesso de NADH que é compensado pela formação de glicerol (Gancedo & Serrano, 1989).

Entre as leveduras fermentativas facultativas que apresentam valores de taxa específica de crescimento e rendimentos em biomassa e etanol muito baixos em condições de anaerobiose está *C. stellata*, uma levedura que ocorre com frequência em mosto de uva. Ciani *et al.* (2000) sugeriram que este comportamento se deve a uma baixa actividade da álcool desidrogenase (duas vezes mais baixa do que em *S. cerevisiae*) e a uma actividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase muito alta (40 vezes superior à de *S. cerevisiae*), o que, naturalmente, causa um forte desvio para a produção de glicerol. De facto, esta levedura apresenta um comportamento fermentativo peculiar, caracterizado por taxas de fermentação muito baixas e uma alta concentração relativa de produtos secundários, tais como glicerol, acetoína, acetaldeído e succinato.

Os factores ambientais, como o stress osmótico, tensão de oxigénio e dióxido de carbono, temperatura e pH, influenciam o rendimento em biomassa e em etanol. Estes factores influenciam também a energia necessária para a manutenção celular (Verduyn, 1991). Por exemplo, Eraso & Gancedo (1987) mostraram que a actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática de *S. cerevisiae* aumentava em cerca de 2-3 vezes em meio tamponizado a pH 3,5 quando comparado com meio a pH 5-6, conduzindo a um rendimento em biomassa menor. Provavelmente, para essa baixa de rendimento contribuirá o aumento do influxo passivo de protões a valores de pH baixos e à conseqüente activação da ATPase com maior dispêndio de energia.

### **3.1.2. Avaliação da capacidade fermentativa**

A capacidade fermentativa tem sido avaliada com base em diferentes parâmetros que de algum modo reflectem a produção de etanol: i) concentração máxima de etanol produzido; ii) rendimento em etanol; iii) velocidade de fermentação; iv) produtividade específica em etanol; e v) capacidade de sobrevivência na presença de etanol. Como já foi referido, os valores destes parâmetros podem ser afectados por condições ambientais como, por exemplo, a

---

concentração de açúcar no meio, a concentração de oxigénio, fluxo metabólico, produção de sub-produtos da fermentação e a presença de inibidores da via respiratória (Gancedo & Gancedo, 1973; Cabeça-Silva *et al.*, 1985; Jiménez & Benítez, 1986; Visser *et al.*, 1990).

Entre as leveduras fermentativas, *S. cerevisiae* e a sua espécie muito próxima *S. bayanus* sobressaem pelas concentrações de etanol que produzem e que chegam a atingir 16% p/v (Ciani *et al.*, 2006). Outras espécies variam muito na capacidade de produzir etanol. Seguem alguns exemplos ilustrativos.

Num estudo acerca das propriedades enológicas de leveduras não-*Saccharomyces*, Ciani & Maccarelli (1998) verificaram que as estirpes de *S. codes ludwigii* foram as que produziram mais etanol (cerca de 13% v/v) em mosto de uva com 27% p/v de açúcar inicial, seguidas de *Torulaspota delbrueckii*; que apresentou uma produção de 9% v/v, de *H. uvarum* e *C. stellata*, que produziram 6% v/v, e de *K. apiculata* (anamorfo de *H. uvarum*) que produziu cerca de 4% v/v. O comportamento fermentativo de *Candida cantarellii* também foi analisado a partir de mosto de uva fresco contendo cerca de 23% p/v de açúcares redutores, a 25 °C, sem agitação e em condições de limitação de oxigénio. Esta levedura produziu 6,45% p/v etanol, o rendimento em etanol foi de 0,48 e houve formação de 1,48% p/v glicerol, em comparação com 0,83% p/v produzido por *S. cerevisiae* (Toro & Vazquez, 2002). Num outro tipo de exemplo, entre as leveduras que melhor fermentam D-xilose, *C. shehatae*, *P. stipitis* e *Pa. tannophilus* têm capacidade para produzir até cerca de 5,4% p/v de etanol em elevadas concentrações de açúcar (du Preez & van der Walt, 1983; Dellweg *et al.*, 1984; du Preez *et al.*, 1986; du Preez, 1994; Agbogbo *et al.*, 2006). Contudo, a produtividade específica em etanol nestas leveduras em xilose pode chegar a ser cerca de 10% dos valores obtidos para *S. cerevisiae* em D-glucose. Enquanto que para *S. cerevisiae* a produtividade específica em meio com glucose é de 1,89 g h<sup>-1</sup> ps<sup>-1</sup> (Lightelm *et al.*, 1988) para *P. stipitis* estão registados valores de 0,20 g h<sup>-1</sup> ps<sup>-1</sup> em meio com D-xilose (Skoog & Hahn-Hägerdal, 1990).

### 3.1.3. Influência do etanol e temperatura na viabilidade celular

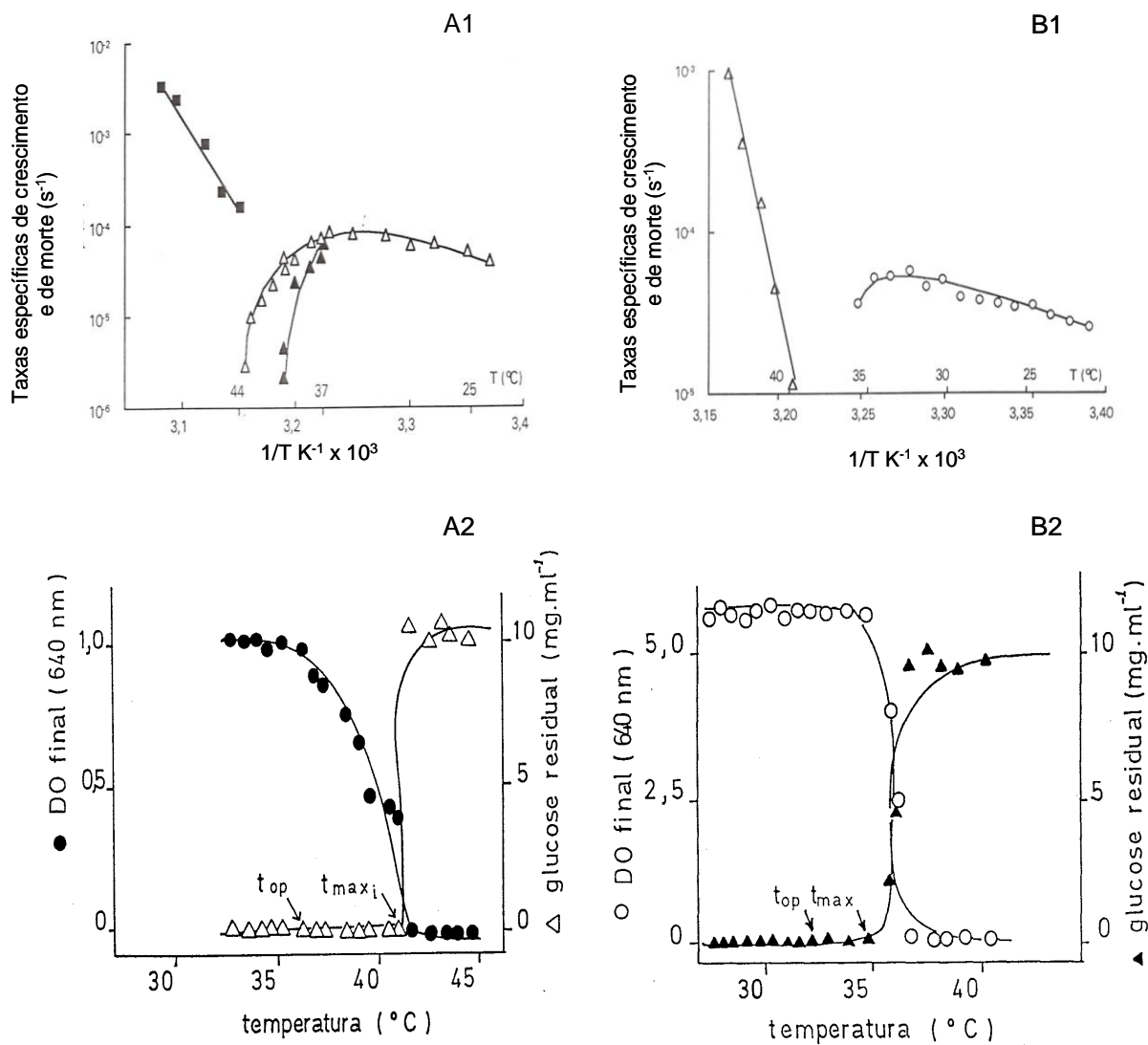
A temperatura é um dos factores que contribuem para modificar a actividade de uma levedura, sendo o seu efeito combinado com os de outras condições ambientais,

nomeadamente com a concentração de etanol como produto de fermentação. Portanto, a toxicidade do etanol é, também, uma função da temperatura (van Uden, 1989b).

O despiste da tolerância ao etanol exige a utilização de protocolos simples e rápidos. A avaliação da capacidade de sobrevivência de células expostas ao etanol parece constituir uma ferramenta útil para comparar a tolerância ao etanol de diferentes espécies e estirpes de levedura (Chi & Arneborg, 1999; 2000; Pina *et al.*, 2004a).

Como todos os outros microrganismos, as leveduras só podem multiplicar-se numa determinada gama de temperaturas permissível. As temperaturas cardinais são: (i) temperatura mínima de crescimento (temperatura abaixo da qual o crescimento não é mensurável); (ii) temperatura óptima de crescimento (temperatura à qual a taxa específica de crescimento é máxima); e (iii) temperatura máxima de crescimento (temperatura acima da qual não se observa crescimento). Foram definidos dois tipos diferentes de perfil de temperatura em leveduras, definido como um gráfico de Arrhenius modificado que representa as taxas específicas de crescimento e de morte em função do inverso da temperatura a que o organismo é cultivado em condições experimentais bem definidas (van Uden, 1984): perfil do tipo associativo, em que se verifica uma associação biológica entre o crescimento e a morte, na gama das temperaturas supra-óptimas; e perfil dissociativo, em que essa associação não existe (Figura 3.3). No caso das leveduras do tipo associativo, observa-se um segundo período de crescimento exponencial na gama de temperaturas supra-óptimas, a que corresponde um valor da taxa específica de crescimento aparente que é resultado da diferença entre a taxa específica de crescimento durante o primeiro período e a taxa específica de morte térmica a essa temperatura. Verificou-se que, em leveduras do tipo associativo, a fracção da população que morre a temperaturas supra-óptimas continua a consumir a fonte de carbono e de energia, baixando o coeficiente de rendimento em biomassa. Este parâmetro mantém-se constante até à temperatura máxima de crescimento para leveduras com perfil dissociativo (Figura 3.3) (van Uden & Cruz Duarte, 1981; Spencer-Martins & van Uden, 1982). *S. cerevisiae* apresenta um perfil do tipo associativo (Figura 3.3), e o etanol desloca este perfil globalmente para temperaturas inferiores (van Uden, 1989b).

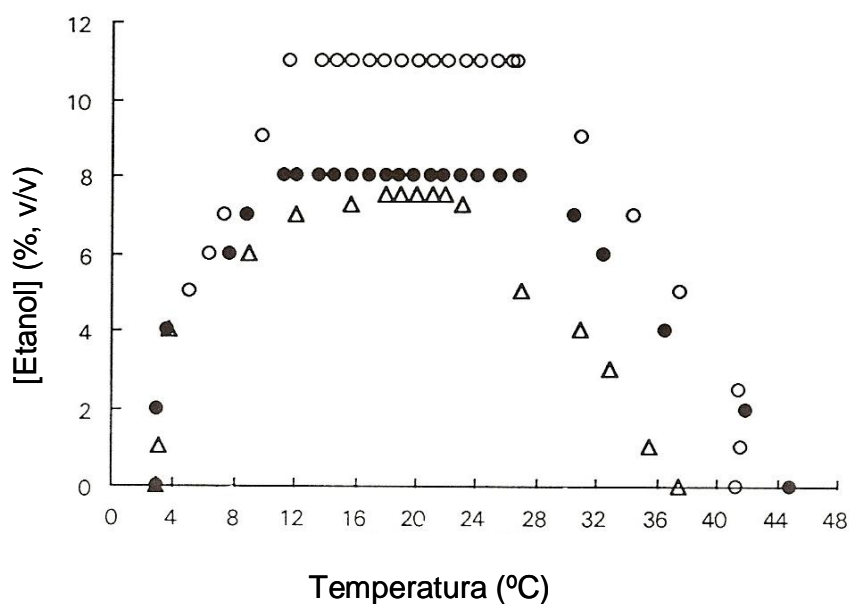
É conhecido que o etanol, à medida que vai aumentando a sua concentração durante a fermentação, induz a perda da capacidade fermentativa (Pamment, 1989). Na generalidade, as leveduras não-*Saccharomyces* apresentam muito menor resistência ao etanol do que *S. cerevisiae*, o que é reflexo de efeitos múltiplos e, frequentemente, não-específicos e



**Figura 3.3.** Perfis de temperatura em leveduras e correspondentes efeitos da temperatura nos rendimentos em biomassa. (A1 e A2), *Saccharomyces cerevisiae* IGC 3507-III: perfil associativo; (B1 e B2), *Lipomyces kononenkoae* IGC 4052: perfil dissociativo. (adaptado de van Uden & Cruz Duarte, 1981 e de Spencer-Martins & van Uden, 1982)

complexos. A maioria dos estudos efectuados sobre a toxicidade do etanol em leveduras baseia-se em efeitos da adição de etanol exógeno. Contudo, vários autores observaram que o efeito do etanol produzido durante a fermentação é significativamente diferente, e mais nocivo, provavelmente devido à acumulação de sub-produtos tóxicos, tais como o ácido acético e/ou ácidos gordos de cadeia curta (Leão & van Uden, 1982; Sá-Correia, 1986; Cardoso & Leão, 1992; Ludovico *et al.*, 2001).

Tanto em *S. cerevisiae* como em *Kl. fragilis* (van Uden & da Cruz Duarte, 1981; Sá-Correia & van Uden, 1983a), a adição de etanol ao meio de cultura provoca uma diminuição da temperatura máxima e um aumento da temperatura mínima de crescimento (Figura 3.4). A tolerância máxima da levedura ao etanol (11% e 8% v/v, respectivamente) ocorre numa gama de temperaturas intermédias. *C. wickerhamii*, uma levedura com menor capacidade fermentativa do que aquelas duas espécies, apresenta um comportamento semelhante, mas o patamar de tolerância máxima foi atingido com 7,4% v/v etanol (Cabeça-Silva *et al.*, 1985).



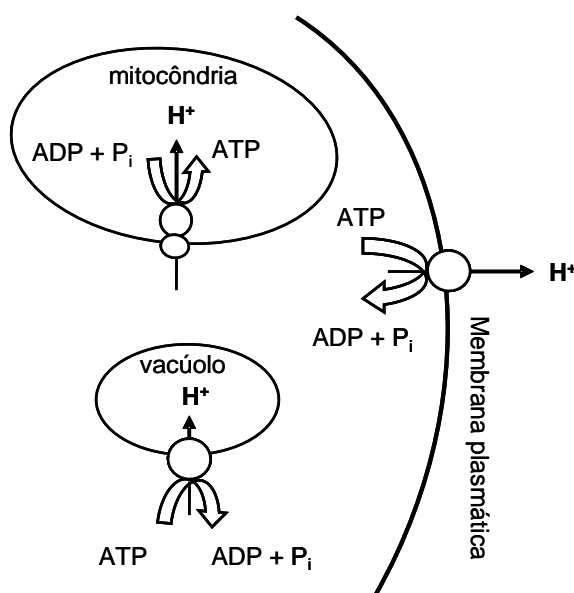
**Figura 3.4.** Perfis de temperatura da tolerância ao etanol do crescimento em glucose de *S. cerevisiae* (O), *Kl. fragilis* (●) e *C. wickerhamii* (△). Os pontos experimentais indicam a concentração de etanol acima da qual não se observa crescimento (Cabeça-Silva *et al.*, 1985).



Pina *et al.* (2004b) realizaram ensaios de perda de viabilidade celular expondo diferentes leveduras não-*Saccharomyces* (*C. stellata*, *D. hansenii*, *H. guilliermondii*, *H. uvarum* e *T. delbrueckii*) a altas concentrações de etanol à temperatura de 25 °C. Com 25% v/v etanol, estes autores observaram que: *H. uvarum* e *T. delbrueckii* apresentaram uma cinética de morte muito rápida quaisquer que fossem as condições de cultura; *H. guilliermondii* era muito mais resistente em condições de oxigenação activa e de limitação de oxigénio do que em condições de anaerobiose; e *C. stellata* evidenciou uma alta resistência ao etanol mesmo na ausência de oxigénio.

### 3.1.4. Actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática

Três classes de ATPases estão envolvidas no transporte transmembranar de protões em leveduras (Figura 3.5): ATPase da membrana plasmática, ATPase vacuolar e ATPase mitocondrial (Goffeau & Boutry, 1986; Uchida *et al.*, 1988). Estas enzimas diferem nas suas estruturas e funções, mas todas catalisam a reacção:



**Figura 3.5.** ATPases envolvidas no transporte de protões através de membranas em leveduras. (adaptado de Goffeau & Boutry, 1986)

Entre as características que as diferenciam estão o pH óptimo, o qual, para *S. cerevisiae*, é cerca de 5,5 para a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática, 8,5 para a ATPase mitocondrial e pH 7,0 para a ATPase vacuolar, assim como a sensibilidade a diferentes inibidores (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1.** Inibidores das ATPases vacuolar, da membrana plasmática e mitocondrial em *S. cerevisiae* (van der Rest *et al.*, 1995)

Inibidor	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Actividade (%)		
		ATPase vacuolar	ATPase memb. plasmática	ATPase mitocondrial
Sem inibidor	-	100	100	100
Azida sódica	2000	110	105	4
Oligomicina	47	74	74	10
Ortovanadato	100	96	50	100
Quercetrina	100	67	30	100
DES (Dietilstilbestrol)	100	48	16	95
Nitrato de miconazole	300	52	5	86

Pela importância que assume na relação entre a célula e o ambiente circundante, nomeadamente na relação com o efeito tóxico do etanol na levedura, este trabalho incidiu apenas na H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática. O funcionamento desta H<sup>+</sup>-ATPase é essencial e limitante do metabolismo celular. O gradiente electroquímico gerado pelo efluxo de prótons constitui a força motriz necessária para o transporte activo secundário de nutrientes, como por exemplo açúcares e aminoácidos, e para o transporte transmembranar de iões, permitindo a acumulação intracelular contra um gradiente de concentrações (Eddy, 1982; Sigler & Höfer, 1991; Kotyk & Dvořáková, 1992). Para além de promover a entrada de certos nutrientes, o gradiente protónico transmembranar também potencia o efluxo activo de substâncias indesejáveis, tais como os aniões de ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação (Sigler & Höfer, 1991). A actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática é, portanto, fundamental para manter o pH intracelular entre limites que permitem a actividade das enzimas citoplasmáticas, viabilizam o metabolismo e determinam a capacidade de sobrevivência da célula.

Os valores referidos na literatura para a actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática em leveduras varia muito. Em mutante respiratório de *S. cerevisiae*, sem adição de etanol ao meio de cultura, a pH 5,7 e a 30°C, variou entre 100 e 150 nmol P<sub>i</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> de proteína (Rosa & Sá-Correia, 1991; Viegas & Sá-Correia, 1991). Foram também registados valores da actividade ATPásica de estirpes de *S. cerevisiae* cultivadas em glucose entre 200 e 3000 nmol P<sub>i</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> proteína (Serrano, 1983; Eraso & Gancedo, 1987). Em outras leveduras, e a título de exemplo, a actividade da H<sup>+</sup>-ATPase de *P. stipitis* em meio com glucose, a pH 6,5 e a 30°C foi de cerca de 400 nmol P<sub>i</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> proteína (Meyrial *et al.*, 1995a).

### 3.1.5. Estudos descritos neste capítulo

Este capítulo descreve a caracterização da capacidade fermentativa global de leveduras seleccionadas a partir do isolamento de diferentes frutas, tomando como termos de comparação *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. Esta última espécie foi utilizada por ser muito próxima de *S. cerevisiae*, produzir quantidades semelhantes de etanol mas ocorrer em associação a frutos como a maçã e uva durante fermentações a temperatura mais baixa (Barnett *et al.*, 2003; Vaughan-Martini & Martini, 1987).

Foram determinados os parâmetros seguintes: concentração máxima de etanol produzido; velocidade relativa de fermentação e de respiração; e o efeito combinado do etanol e temperatura na viabilidade celular em duas condições de ensaio (11% v/v etanol, 30 °C; 20% v/v etanol, 16 °C). A última característica visou encontrar um método expedito para distinguir a resistência ao etanol de diferentes espécies de leveduras, tendo em perspectiva o melhoramento do desempenho fermentativo de não-*Saccharomyces*.

Sabendo que a presença de etanol no meio de fermentação induz um influxo mais rápido de prótons para dentro da célula, o qual é contrariado por uma activação da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática, colocou-se a hipótese das leveduras não-*Saccharomyces* terem uma H<sup>+</sup>-ATPase menos eficiente do que *S. cerevisiae* e, por isso, não conseguirem produzir concentrações tão elevadas de etanol. Para testar esta hipótese, procedeu-se a uma análise comparativa, em condições de ensaio padronizadas, da actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática das leveduras seleccionadas, usando como referências *S. cerevisiae* e *S. bayanus*.

## 3.2. Materiais e métodos

### 3.2.1. Leveduras

Foram estudadas as seguintes leveduras, seleccionadas com base no isolamento a partir de produtos frutícolas (ver Capítulo 2): *C. pseudointermedia* PYCC 5788, *C. quercitrusa* PYCC 5789, *Candida* sp. nov. PYCC 5791, *H. uvarum* (PYCC 5782 e PYCC 5783), *P. guilliermondii* PYCC 5784 e *P. mexicana* PYCC 5790. Foram ainda utilizadas, para termo de comparação, *S. cerevisiae* (PYCC 4072 e PYCC 5632) e *S. bayanus* (PYCC 4456<sup>T</sup> e PYCC 4890). Todas as culturas foram fornecidas pela Colecção Portuguesa de Culturas de Leveduras (PYCC, *Portuguese Yeast Culture Collection*), FCT/UNL, Caparica.

### 3.2.2. Meios e condições de cultura

#### *Capacidade de produção de etanol*

Para avaliar a concentração máxima de etanol produzido, os inóculos foram preparados em meio líquido YPD (Apêndice I) incubado durante a noite a 16 °C com agitação orbital (150 rpm, Gallenkamp). Os balões de ensaio (50 ml de capacidade), contendo 25 ml de meio YP com 25% p/v glucose (para leveduras não-*Saccharomyces*) ou 35% p/v glucose (para *Saccharomyces*), foram inoculados de modo a que a absorvência ( $A_{640nm}$ ) inicial fosse aproximadamente igual a 0,1. As condições de crescimento foram de semi-anaerobiose, sendo os balões vedados com rolha de borracha perfurada por duas agulhas estéreis, uma para permitir a saída de CO<sub>2</sub> e outra para a recolha periódica de amostras. As altas concentrações de glucose utilizadas visaram que esta não se tornasse limitante para a produção de etanol. Os ensaios foram realizados à temperatura de 16 °C para possibilitar uma maior tolerância ao etanol (ver Fig. 3.4). Considerou-se que a concentração máxima de etanol tinha sido atingida quando para duas amostras consecutivas, obtidas com um intervalo mínimo de um dia, a concentração de glucose no meio permanecia inalterada. Para cada levedura foram realizados dois ensaios independentes.

Para inibir completamente a via respiratória, foram também realizadas experiências para três das leveduras seleccionadas (*P. guilliermondii*, *P. mexicana* e *S. cerevisiae*) nas mesmas condições mas com 30 µM antimicina A (Sigma) no meio de cultura (a antimicina A é um antibiótico inibidor do complexo III da cadeia respiratória), adicionando 50 µl de uma solução 15 mM antimicina A em metanol. Uma vez que na ausência de oxigénio não é

possível a síntese de ergosterol e de ácido oleico (Larue *et al.*, 1980; Strydom *et al.*, 1982), também se adicionou ao meio de cultura ergosterol (0,01 g/l) e Tween 80 (0,42 g/l).

#### *Taxas de respiração e fermentação*

Para as experiências com o aparelho de Warburg, as leveduras foram cultivadas em meio YNB (Difco) com 2% p/v glucose como fonte de carbono e energia, a 30 °C num agitador orbital (150 rpm). Na fase exponencial de crescimento ( $A_{640nm}$  entre 0,8 e 1,0), as células foram recolhidas por centrifugação da cultura a 10.000 rpm durante 2 min, a 4 °C (centrífuga RC 5C Plus, Sorvall, rotor SS34). O sedimento obtido foi lavado duas vezes com tampão fosfato 100 mM (pH 4,5), e o sedimento final foi ressuspenso no mesmo tampão de forma a obter uma concentração celular entre 1,0 e 1,5 mg peso seco/ml.

#### *Efeito do etanol e temperatura na viabilidade celular*

Avaliou-se a perda de viabilidade celular utilizando duas combinações de etanol adicionado ao meio e temperatura: 11% v/v etanol/30 °C e 20% v/v etanol/16 °C.

Foram preparados inóculos em balões Erlenmeyer de 50 ml com 10 ml de meio YM (Apêndice I), incubados durante a noite com agitação orbital (150 rpm) a 25 °C. Nos ensaios foram utilizados balões Erlenmeyer de 500 ml com 50 ml de meio YM contendo 11% v/v ou 20% v/v etanol, em banho termostático a 30 °C, ou 16 °C, com agitação magnética. Para ambas as condições de ensaio, os balões foram inoculados de modo a que cada experiência fosse iniciada com cerca de  $3 \times 10^3$  células/ml no meio de cultura (para *P. mexicana* a densidade celular adoptada foi de  $2 \times 10^3$  células/ml, pois esta levedura forma pseudo-hifas que se quebram facilmente).

#### *Actividade da $H^+$ -ATPase da membrana plasmática*

Os inóculos foram preparados, partindo de culturas frescas em meio sólido, em balões Erlenmeyer de 250 ml com 100 ml de meio líquido YNB (Difco) contendo 0,5% p/v extracto de levedura, 0,5% p/v  $(NH_4)_2SO_4$  e 10% p/v glucose, com pH ajustado a 5,4, incubados durante a noite a 30 °C com agitação orbital (150 rpm). Foram inoculados balões Erlenmeyer de 500 ml com 300 ml do mesmo meio líquido, mas com 3% p/v glucose, de modo a que a  $A_{640nm}$  inicial fosse cerca de 0,35. As restantes condições de crescimento foram análogas às da preparação do inóculo.

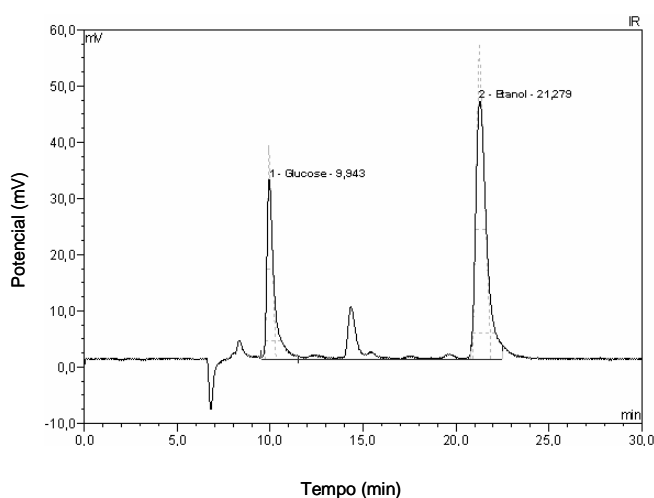
### 3.2.3. Determinação de glucose e etanol

Nas experiências realizadas para avaliar a capacidade de produção de etanol, as amostras finais para cada uma das leveduras estudadas, após paragem do consumo de glucose, foram recolhidas para determinar as concentrações correspondentes de glucose e de etanol. Cada amostra, de cerca de 200  $\mu$ l, foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 ml e imediatamente centrifugada 2 min a 13.000 rpm e à temperatura ambiente. O sobrenadante foi diluído (1:100, 1:50 ou 1:20, consoante a estimativa de glucose residual) e filtrado, usando filtros MFS-13 (Advantec MFS, Inc., Pleasanton, CA) com poro de 0,20  $\mu$ m. As concentrações de glucose e de etanol foram determinadas utilizando a técnica de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) e o sistema HPLC Dionex (Dionex, Sunnyvale, CA), equipado com uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Richmond, CA) e um detector de índice de refração (LKB, Bromma, Sweden). A coluna, a 35 °C, foi eluída com uma solução 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com um fluxo de 0,6 ml/min, durante 30 min. Um cromatograma ilustrativo dos resultados observados é apresentado na Figura 3.6.

Para calcular o rendimento em etanol ( $Y_{\text{ETOH}}$ ) utilizou-se a equação (3.4):

$$Y_{\text{ETOH}} = \frac{[\text{Etanol}]_f - [\text{Etanol}]_i}{[\text{Glucose}]_i - [\text{Glucose}]_f} \quad (3.4)$$

em que os índices f e i correspondem ao fim e início da fermentação, respectivamente.



**Figura 3.6.** Ilustração de um cromatograma para determinação de glucose e etanol por HPLC nas condições descritas no texto.

### 3.2.4. Quantificação da biomassa seca

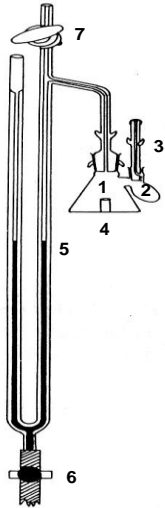
Nos ensaios para determinação das velocidades de fermentação e respiração, duas alíquotas de 10 ml de cada uma das suspensões celulares foram filtradas através de membrana Millipore (0,45  $\mu\text{m}$  de poro) previamente pesada. As membranas foram lavadas com 3 x 10 ml de água destilada e depois colocadas numa estufa a 70 °C durante cerca de 24 h, até peso constante. As membranas foram então novamente pesadas e calculou-se, por diferença, a biomassa ou peso seco.

Nas experiências para determinação da actividade da  $\text{H}^+$ -ATPase, três alíquotas de 50  $\mu\text{l}$  de cada suspensão celular foram colocadas em pequenas folhas de alumínio previamente pesadas e depois incubadas numa estufa a 70 °C durante cerca de 24 h, até peso constante. As folhas de alumínio foram então novamente pesadas e calculou-se, por diferença, a biomassa ou peso seco.

### 3.2.5. Determinação das taxas específicas de fermentação e de respiração

Para a determinação das taxas específicas de fermentação e de respiração aplicou-se o método de Warburg. Este método utiliza uma técnica manométrica baseada nas leis dos gases perfeitos e permite medir a produção ou consumo de gases em sistemas biológicos (Umbreit *et al.*, 1964). O aparelho de Warburg utilizado (B. Braun Melsungen, Alemanha) é constituído por um manómetro ligado a um frasco (Figura 3.7), o qual é imerso num banho a temperatura constante regulada por um termostato. Este sistema é agitado de modo a promover uma troca constante e homogénea de gás entre a fase líquida e a fase gasosa, bem como a saturação permanente em gás do líquido contido nos frascos.

O manómetro consiste num tubo em U com escalas graduadas nos dois ramos laterais e está ligado ao frasco. Cada frasco está munido de um braço lateral e no compartimento principal tem um lóculo central destinado à solução utilizada para a absorção de anidrido carbónico. Ambos os ramos do manómetro estão ligados a um reservatório de borracha que contém um líquido de densidade conhecida (foi utilizado o Líquido de Brodie). Este reservatório pode ser comprimido por uma mola que permite ajustar o nível do líquido no manómetro. Um dos ramos do manómetro está sempre aberto. O outro ramo, que comunica com o frasco, pode ou não estar em contacto com o exterior através de uma torneira.



**Figura 3.7.** Esquema de uma unidade manométrica do aparelho de Warburg (adaptado de Umbreit *et al.*, 1964).

- 1 – lóculo central
- 2 – braço lateral
- 3 – ventilador
- 4 – frasco
- 5 – manómetro
- 6 – reservatório e mola
- 7 – torneira

Quando a torneira está aberta, a pressão nos dois ramos é idêntica e o Líquido de Brodie fica ao mesmo nível. Ao fechar a torneira, corta-se a comunicação com o exterior do ramo que comunica com o frasco. Quando no frasco há produção ou consumo de gás isso traduz-se numa variação de volume que faz alterar o nível do líquido no manómetro. A essência do método consiste em medir a variação de pressão que resulta do aumento ou diminuição da quantidade de gás, mantendo o seu volume constante. Essa produção ou consumo de gás pode ser medida pela diferença de nível do líquido nos dois ramos do manómetro.

Os frascos a utilizar nos ensaios para determinação das taxas (em duplicado para cada uma das condições testadas) foram preparados adicionando uma solução de glucose a um volume de suspensão celular adequado (de forma a permitir que a experiência se prolongasse por 60 min) e ao volume de tampão 0,1 M fosfato, pH 4,5 (Apêndice I), necessário para perfazer 3 ml. Nos frascos em que se pretendia avaliar apenas o consumo de  $O_2$  foi ainda colocado no lóculo central um harmónio de papel Whatman nº1 embebido com 20% p/v KOH. Foram também usados dois frascos como controlo: o termobarómetro, que permitiu estimar o efeito das variações ambientais (pressão atmosférica e temperatura); e um frasco destinado a avaliar, nas condições experimentais descritas, a fermentação endógena de reservas, na ausência de glucose adicionada. O conteúdo dos diferentes frascos usados nas experiências está resumido na Tabela 3.2.

Os frascos foram fechados e ligados aos respectivos manómetros, de forma a ficarem completamente isolados do meio exterior. Para tal, foi aplicado silicone uniformemente distribuído nas zonas esmeriladas. Os frascos foram imersos no banho, a 30 °C, e deixou-se equilibrar a temperatura, com agitação e a torneira aberta, durante 10 min. Parou-se, então,

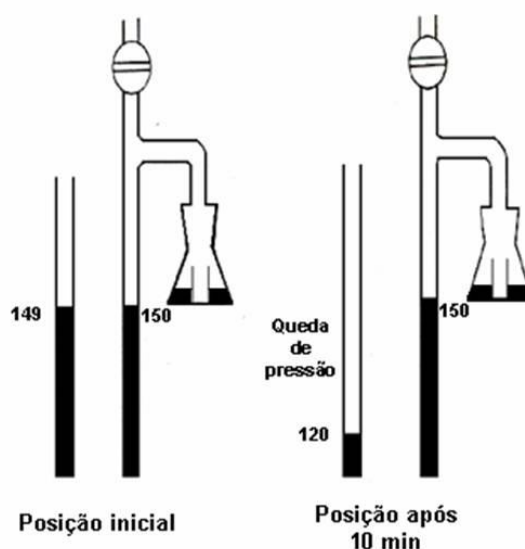


a agitação, o Líquido de Brodie foi ajustado a meio da escala em ambos os ramos do manómetro, e fechou-se a torneira para dar início à experiência (tempo zero). Periodicamente, a intervalos de tempo regulares que variaram entre 5 e 10 min, e durante o período experimental desejado, interrompeu-se a agitação e procedeu-se a uma nova leitura. Para isso, o Líquido de Brodie foi ajustado na marca situada a meio da escala (150 mm) do ramo manométrico ligado ao frasco. Em seguida, foi feita a leitura da altura do líquido no ramo manométrico em comunicação com o exterior (Figura 3.8).

**Tabela 3.2.** Conteúdo dos frascos de Warburg para a determinação das taxas específicas de fermentação e de respiração das leveduras estudadas

Frasco	Tampão fosfato 100 mM (ml)	Suspensão celular (ml)	0,3 M Glucose (ml)	20% p/v KOH* (ml)
Termobarómetro	3,0	-	-	-
Fermentação endógena	2,0	1,0	-	-
Respiração endógena	2,0	1,0	-	0,2
Consumo de O <sub>2</sub>	1,5	1,0	0,5	0,2
Produção de CO <sub>2</sub>	1,5	1,0	0,5	-

\* Solução colocada no lóculo central, embebendo um harmónio de papel de filtro Whatman nº1.



**Figura 3.8.** Variação do nível do Líquido de Brodie no ramo aberto do manómetro, em condições em que se verificou consumo de gases. (adaptado de Umbreit *et al.*, 1964)

A quantidade de O<sub>2</sub> consumido (Q<sub>O<sub>2</sub></sub>), decorrido o intervalo de tempo t, foi calculado de acordo com a equação (3.5):

$$Q_{O_2} = h \cdot k_{O_2} \quad (3.5)$$

em que h representa a diferença de nível observada (mm) entre os dois ramos do manómetro, e k<sub>O<sub>2</sub></sub> a constante do frasco dada pela seguinte expressão:

$$k_{O_2} = \frac{V_g \cdot \frac{273}{T} + V_l \cdot \alpha}{P_0} \quad (3.6)$$

em que V<sub>g</sub> é o volume da fase gasosa do frasco (µl), V<sub>l</sub> o volume do líquido no frasco (µl), T a temperatura absoluta a que a experiência foi realizada, α a solubilidade do gás no líquido (ml gás/ml líquido) à temperatura T para uma pressão atmosférica de 760 mm Hg, e P<sub>0</sub> a pressão normal (P<sub>0</sub> = 10 000 mm Líquido de Brodie = 760 mm Hg).

Uma vez que a solubilidade de cada um dos gases é praticamente independente da pressão dos outros gases, também é possível determinar a quantidade de CO<sub>2</sub> produzida (Q<sub>CO<sub>2</sub></sub>), considerando que no frasco sem KOH:

$$h = h_{O_2} + h_{CO_2} = Q_{O_2} / k_{O_2} + Q_{CO_2} / k_{CO_2} \quad (3.7)$$

Rearranjando,

$$Q_{CO_2} = \left( h - \frac{Q_{O_2}}{k_{O_2}} \right) \cdot k_{CO_2} \quad (3.8)$$

Considerando que Q<sub>O<sub>2</sub></sub> = h' · k' <sub>O<sub>2</sub></sub>, em que h' e k' <sub>O<sub>2</sub></sub> se referem ao frasco com KOH, temos que:

$$Q_{CO_2} = \left( h - \frac{h' \cdot k_{O_2}}{k_{O_2}} \right) \cdot k_{CO_2} \quad (3.9)$$

Os valores de Q<sub>CO<sub>2</sub></sub> e Q<sub>O<sub>2</sub></sub> obtidos nos frascos experimentais, depois de corrigidos com os

valores obtidos no termobarómetro e respiração endógena, permitem calcular a produção e consumo específicos (por unidade de biomassa seca presente no frasco) e avaliar a respectiva evolução em função do tempo. Se a relação obtida for linear, o declive da recta corresponde à taxa específica de produção de  $\text{CO}_2$  ( $V_{\text{CO}_2}$ ) ou de consumo de  $\text{O}_2$  ( $V_{\text{O}_2}$ ).

### 3.2.6. Quociente respiratório (QR)

O quociente, ou coeficiente, respiratório (QR) é definido como a razão entre a quantidade de  $\text{CO}_2$  total produzida e a de  $\text{O}_2$  consumida:

$$\text{QR} = \frac{\text{CO}_2^{\text{total}}}{\text{O}_2^{\text{consumido}}} \quad (3.10)$$

Esta razão informa sobre a natureza do metabolismo da levedura estudada. Assim, um valor de QR igual a 1 significa que a glucose foi completamente respirada e superior a 1 reflecte que parte da glucose foi fermentada.

### 3.2.7. Efeito do etanol e temperatura na viabilidade celular

A morte celular pode ser apreciada através da incapacidade da célula para se multiplicar, sendo determinada pela diminuição de unidades formadoras de colónias (UFC) em placa com meio sólido.

Para avaliar a morte induzida pelo etanol e temperatura, as culturas descritas em 3.2.2 foram periodicamente amostradas. Imediatamente após a inoculação (tempo zero), e em tempos adequados para cada uma das leveduras estudadas, foram recolhidas amostras de 100  $\mu\text{l}$  (em triplicado). Cada amostra foi transferida para placas de Petri com meio YM sólido, devidamente espalhada, e as placas incubadas a 25 °C. Após 2-3 dias, procedeu-se à contagem das colónias.

Por vezes, o período de morte exponencial, definida por uma taxa específica de morte - equação (1.5), é precedido por um período de latência antes de se instalar a morte.

O tempo de redução decimal (D) é definido como o tempo necessário para que uma população, sujeita a determinadas condições, seja reduzida a 10% do número de células viáveis no início da experiência.

### 3.2.8. Determinação da actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática

A actividade específica da ATPase da membrana plasmática foi calculada com base na quantidade de fosfato (P<sub>i</sub>) libertado por unidade de tempo e de proteína presente na fracção membranar total de cada uma das leveduras ensaiadas. À mistura enzimática foram adicionados inibidores específicos para as ATPases não-plasmáticas: (i) azida sódica, para inibição da ATPase mitocondrial; (ii) nitrato de potássio, para inibição da ATPase vacuolar; e (iii) molibdato de amónio, para inibição de possíveis fosfatases ácidas presentes.

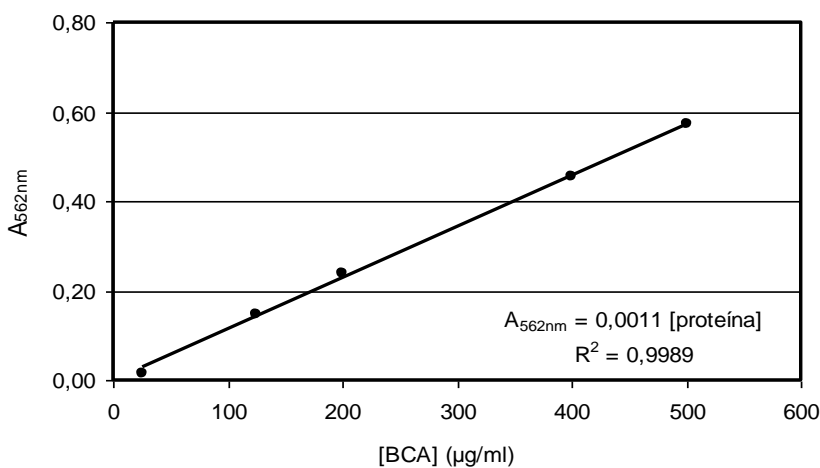
#### *Preparação da fracção membranar total*

As células foram recolhidas por centrifugação a 8.000xg, 4 °C, e 5 min (RC 5C Plus, Sorvall, rotor SS34) na fase exponencial de crescimento ( $A_{640nm} \sim 1,8$ ). O sedimento foi ressuscitado em 100 mM Tris (Sigma), 5 mM EDTA - sal tetrassódico (Sigma) e 1 mM ditiotreitól (Sigma) (Eraso & Gancedo, 1987), de modo a obter uma suspensão celular de, aproximadamente, 100 mg peso seco/ml. A suspensão foi imediatamente congelada a -80 °C em alíquotas de 400 µl distribuídas por tubos de vidro, até à preparação das fracções membranares totais.

A suspensão celular de cada levedura, congelada em alíquotas de 400 µl, foi desintegrada directamente no tubo de vidro com 3 g de esferas de vidro (425-600 µm, Sigma), agitando vigorosamente em *vortex* durante 1 min e intercalando com 1 min de imersão em gelo. Este procedimento foi repetido, em média, oito vezes para a maioria das leveduras (apenas cinco vezes foram suficientes para *P. mexicana*), até ruptura de cerca de 80% das células. Após cada tratamento, o nível de desintegração celular foi avaliado por observação ao microscópio. Ao homogeneizado resultante foram adicionados 5 ml de tampão S (Apêndice I) a 4 °C. Seguidamente, foram separadas, por centrifugação durante 3 min a 1.000xg e a 4 °C (RC 5C Plus, Sorvall, rotor SS34), as fracções membranares das esferas de vidro e das células inteiras. O sobrenadante obtido foi centrifugado a 30.000xg durante 45 min a 4 °C (centrífuga RC 5C Plus, Sorvall, rotor SS34). O sedimento obtido (fracção membranar total) foi ressuscitado cuidadosamente em 300 µl de tampão G (Apêndice I) a 4 °C.

### Quantificação da proteína

Para quantificar a proteína no sedimento, foi usado o “BCA™ protein KIT” (Pierce, Rockford, IL). Este método colorimétrico baseia-se na redução do  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  pela proteína em meio alcalino. A coloração púrpura resulta da reacção de quelação de duas moléculas de ácido bicinónico (BCA) com o ião  $\text{Cu}^+$ . O complexo hidrossolúvel exibe um pico de absorvência a 562 nm que varia linearmente com concentrações de proteína entre 20 e 500  $\mu\text{g/ml}$ . A Figura 3.9 representa a recta de calibração usada.



**Figura 3.9.** Recta de calibração para quantificação de proteína, usando como padrão albumina de soro de bovino e o *BCA™ protein KIT* (Pierce, Rockford, IL).

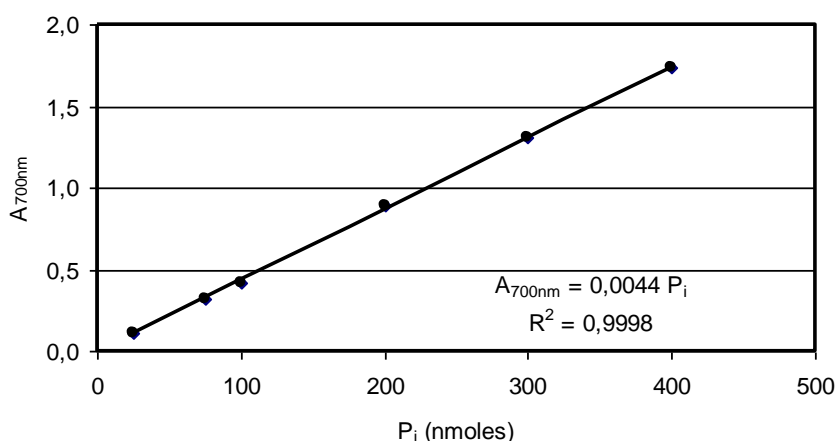
A 1 ml do *Working Reagent* (WR), que é constituído por 50 partes do reagente A e por 1 parte do reagente B, adicionou-se 50  $\mu\text{l}$  de amostra diluída 1:20 em água destilada. Após agitação e incubação a 37 °C durante 30 min, a solução foi mantida 8-10 min à temperatura ambiente e procedeu-se à leitura da absorvência ao comprimento de onda de 562 nm, contra um branco no qual se colocou água destilada em vez da amostra. A concentração de proteína presente na suspensão membranar total variou entre 4 e 12  $\text{mg/ml}$ , dependendo da levedura e do grau de desintegração das células.

### Determinação da actividade da ATPase

A determinação da actividade da ATPase da membrana plasmática na suspensão membranar total baseou-se no método descrito por Serrano (1983). O ensaio foi realizado em tampão MES a pH 5,7 (Apêndice I), com uma quantidade de proteína variável entre 50-

100 µg, num volume entre 10-25 µl de suspensão membranar total por cada 250 µl (volume total) da mistura enzimática. Após equilíbrio da mistura (tampão + suspensão membranar) a 30 °C, durante 5 min, iniciou-se a reacção enzimática adicionando 10 µl, por cada 250 µl de volume total, de uma solução 50 mM ATP - sal dissódico (Sigma) em tampão MES (pH 5,7). A reacção enzimática foi seguida durante 8 min recolhendo amostras de 250 µl nos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 min. Para parar a reacção, a cada amostra foram adicionados 250 µl de uma solução 10% p/v de ácido tricloroacético (TCA) a 4 °C. A fracção membranar foi removida por centrifugação em microcentrifuga (12.000 rpm, 2 min, à temperatura ambiente) e o  $P_i$  doseado no sobrenadante.

O doseamento do  $P_i$  libertado durante a reacção enzimática baseou-se no método espectrofotométrico de Fiske & Subbarow (1925). A 500 µl do sobrenadante obtido no passo anterior foram adicionados 450 µl de uma solução 0,8 M HCl contendo 0,5% p/v de heptamolibdato de amónio  $[(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O]$  e, em seguida, 50 µl do reagente Fiske-Subbarow - solução ANSA (Apêndice I), preparada de fresco. Esta mistura foi então agitada e incubada durante 30 min, a 30 °C. Desenvolveu-se uma cor azul, correspondente à redução do complexo fosfato-molibdato que foi quantificado através da leitura da absorvência da solução a 700 nm ( $A_{700nm}$ ) num espectrofotómetro Ultrospec 3100 pro UV/visible (Biochrom Ltd, Cambridge, UK). Utilizou-se como branco uma mistura equivalente à mistura enzimática mas em que se adicionou água destilada em vez da amostra. A quantidade de  $P_i$  presente foi calculada com base na recta de calibração traçada usando  $KH_2PO_4$  (25-400 nmoles) como padrão (Figura 3.10), com um tratamento idêntico ao das amostras.



**Figura 3.10.** Recta de calibração para a quantificação de fosfato libertado no ensaio para determinação da actividade da ATPase, usando  $KH_2PO_4$  como padrão.

Calculando a quantidade de  $P_i$  libertado ao longo do tempo de reacção, a actividade da ATPase da membrana plasmática é expressa em nmoles de  $P_i$  libertado por min e por mg de proteína presente na suspensão membranar total.

---

### 3.3. Resultados e discussão

#### 3.3.1. Capacidade de produção de etanol

Na determinação das características fermentativas, as leveduras seleccionadas foram primeiro analisadas quanto à capacidade de produção de etanol em condições de baixo teor de oxigénio. A capacidade fermentativa de leveduras não-*Saccharomyces* foi comparada com a de duas estirpes de *S. cerevisiae* (PYCC 4072 e PYCC 5632) e de duas estirpes de *S. bayanus* (PYCC 4456<sup>T</sup> e PYCC 4890). Para que a glucose não se tornasse limitante para a produção de etanol, foram utilizadas concentrações iniciais elevadas: 25% p/v para não-*Saccharomyces* e 35% p/v para *Saccharomyces*.

Variou muito a produção máxima de etanol entre as estirpes estudadas (Tabela 3.3). Todas as estirpes de *Saccharomyces* produziram mais etanol do que o grupo das não-*Saccharomyces*. Pode-se distinguir três grupos de leveduras: o grupo de *Saccharomyces*, que produziu mais do que 11% p/v etanol (entre 13,5±0,1 e 14,8±0,3% p/v); o grupo constituído por *C. quercitrusa* e *H. uvarum*, que produziram de 8% a 11% p/v de etanol (entre 7,9±0,5 e 10,8±0,9% p/v etanol); e o grupo constituído por *C. pseudointermedia*, *Candida* sp. nov., *P. guilliermondii* e *P. mexicana* que originaram quantidades médias de etanol inferiores a 5% p/v (entre 1,7±0,1 e 5,4±0,1 p/v etanol).

Não surpreende que as leveduras do género *Saccharomyces*, tradicionalmente usadas em indústrias de fermentação alcoólica, tenham produzido as concentrações mais elevadas de etanol. As concentrações de etanol obtidas com leveduras vínicas encontram-se numa gama de 11% - 16% p/v (Toro & Vazquez, 2002; Ciani *et al.*, 2006).

As duas estirpes de *H. uvarum* produziram, em média, mais etanol (9,6%±0,3 p/v e 10,8±0,9% p/v) do que o que está descrito em outros estudos. Ciani & Maccarelli (1998) e Ciani *et al.* (2006) referem, para esta levedura, concentrações máximas de etanol em meio de mosto de uva com 27% p/v de açúcar inicial, em condições de limitação de oxigénio, de 6,1% v/v a 27 °C e de 4,3% v/v a 15 °C e pH 3,1. Curiosamente, no estudo realizado à temperatura mais baixa houve menor produção de etanol.

A produção de etanol pela levedura *C. pseudointermedia* (3,9±0,3 p/v) foi semelhante ao da levedura filogeneticamente mais próxima, *C. intermedia*, que produziu 3,82% p/v de etanol em mosto de uva (Toro & Vazquez, 2002).



**Tabela 3.3.** Produção de etanol pelas leveduras seleccionadas, em meio YPD, 16 °C, com agitação, e em condições de semi-anaerobiose

Levedura	Glucose (% p/v)		Consumida	Etanol produzido (% p/v)	Y <sub>ETOH</sub> (g/g)
	Inicial	Final			
<i>Candida pseudointermedia</i> PYCC 5788	24,3 ± 0,4	16,0 ± 0,9	8,3 ± 0,5	3,9 ± 0,3	0,47 ± 0,01
<i>Candida quercitrusa</i> PYCC 5789	24,8 ± 0,3	8,8 ± 0,6	16,0 ± 0,3	7,9 ± 0,5	0,49 ± 0,02
<i>Candida</i> sp. nov. PYCC 5791	25,5 ± 0,7	14,6 ± 1,1	10,9 ± 0,4	5,4 ± 0,1	0,49 ± 0,02
<i>Hanseniaspora uvarum</i> PYCC 5782	25,1 ± 0,9	6,1 ± 2,1	19,0 ± 1,2	9,6 ± 0,3	0,50 ± 0,02
<i>Hanseniaspora uvarum</i> PYCC 5783	24,8 ± 0,5	4,3 ± 2,4	20,6 ± 1,8	10,8 ± 0,9	0,53 ± 0,00
<i>Pichia guilliermondii</i> PYCC 5784	24,8 ± 0,4	16,3 ± 0,4	8,5 ± 0,9	4,1 ± 0,2	0,49 ± 0,08
<i>Pichia mexicana</i> PYCC 5790	24,3 ± 0,1	20,2 ± 0,8	4,1 ± 0,3	1,7 ± 0,1	0,40 ± 0,02
<i>Saccharomyces bayanus</i> PYCC 4456 <sup>1</sup>	35,7	4,8	30,9	13,6	0,44
<i>Saccharomyces bayanus</i> PYCC 4890	35,1 ± 0,0	5,1 ± 0,6	30,1 ± 0,6	13,5 ± 0,1	0,45 ± 0,00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PYCC 4072	35,8 ± 0,3	1,8 ± 0,2	34,0 ± 0,2	14,8 ± 0,3	0,43 ± 0,01
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PYCC 5632	35,2 ± 0,4	2,6 ± 0,2	32,6 ± 0,2	13,9 ± 0,5	0,43 ± 0,01

Os valores representam a média ± desvio padrão de experiências realizadas pelo menos em duplicado, excepto para *S. bayanus* PYCC 4456<sup>1</sup> para a qual foi realizado um único ensaio.

Não se conhecem termos de comparação para as outras leveduras. Contudo, os valores obtidos para *C. quercitrusa* ( $7,9\pm 0,5$  p/v) e para *Candida* sp. nov. ( $5,4\pm 0,1$  p/v) não diferem muito dos encontrados para *C. cantarellii*, que produziu 6,45% p/v etanol em mosto de uva (Toro & Vazquez, 2002), e para *C. stellata* para a qual está referido um valor de 5,83% v/v etanol (Ciani & Maccarelli, 1998).

As razões para diferenças tão grandes entre a capacidade de produção de etanol das leveduras testadas podem ser várias.

Embora se tenham utilizado condições de semi-anaerobiose, é possível que parte da glucose tenha sido respirada. Para testar essa hipótese, procedeu-se à determinação da quantidade máxima de etanol produzida com adição de 30  $\mu$ M Antimicina A ao meio de cultura. Quando comparadas as quantidades de etanol produzidas na ausência e na presença deste inibidor da respiração, não se observou qualquer alteração significativa, excepto para *C. quercitrusa* PYCC 5789 que baixou a produção de etanol de 7,9% para 4,8% p/v. Teria sido conveniente dispor de dados sobre o rendimento em biomassa para confirmar que a redução na capacidade fermentativa se devia a uma inibição do crescimento. Contudo, no presente estudo, a determinação deste parâmetro não se realizou.

Para além da incapacidade das leveduras sintetizarem ergosterol e/ou ácidos gordos insaturados na ausência de oxigénio, sabe-se que estes compostos podem actuar como “factores de sobrevivência”, permitindo às células manter a sua viabilidade e capacidade fermentativa. A adição destes componentes à cultura em anaerobiose e a consequente incorporação destes lípidos por células de *S. cerevisiae* e *H. guilliermondii* proporcionaram, aparentemente, à célula uma melhor adaptação a ambientes com altas concentrações de etanol (Pina *et al.*, 2004b). Mishra & Prasad (1989) também referiram que a adição de ergosterol e ácido oleico a culturas de *S. cerevisiae* conduz a um maior rendimento em etanol porque há um reajuste da composição da membrana lipídica. Neste trabalho, foram testadas as mesmas condições de cultura mas com a incorporação de ergosterol e de Tween 80 no meio para três estirpes com diferentes capacidades de produção de etanol (*P. guilliermondii* PYCC 5784, *P. mexicana* PYCC 5790 e *S. cerevisiae* PYCC 5632). Verificou-se que não havia diferenças significativas na quantidade máxima de etanol produzida (dados não mostrados).

As diferenças encontradas na produção de etanol não são justificáveis por uma eventual limitação pela quantidade de açúcar existente no meio, pois em todos os ensaios se detectou glucose residual. Na generalidade, verificou-se uma relação directa entre a quantidade de etanol produzido e a quantidade de glucose consumida, mantendo mais ou menos constantes os rendimentos em etanol (entre 0,40 e 0,53), que são próximos do valor máximo teórico e que sugerem não haver outras vias metabólicas relevantes para além da fermentação alcoólica. Curiosamente, as estirpes de *Saccharomyces* apresentaram, em média, rendimentos mais baixos em etanol do que as não-*Saccharomyces*, o que aponta para uma produção de sub-produtos da fermentação (por ex. glicerol e acetato) em maior quantidade naquele grupo. Rendimentos em etanol superiores ao valor teórico, observados em *H. uvarum* (Tabela 3.3), considera-se que estão dentro dos limites de erro experimentalmente aceitável, embora também se possam atribuir à fermentação dos hidratos de carbono (por ex., trealose) presentes no extracto de levedura do meio de cultura, para além da glucose adicionada (Zhang *et al.*, 2003).

A formação de sub-produtos da fermentação pode estar implicada na menor produção de etanol, com a conseqüente baixa de rendimento em etanol. No presente estudo, foi feita a pesquisa de glicerol e de acetato. Verificou-se que as concentrações atingidas não eram significativas, não constituindo, assim, um desvio metabólico que justificasse as diferenças na produção de etanol observadas entre as leveduras.

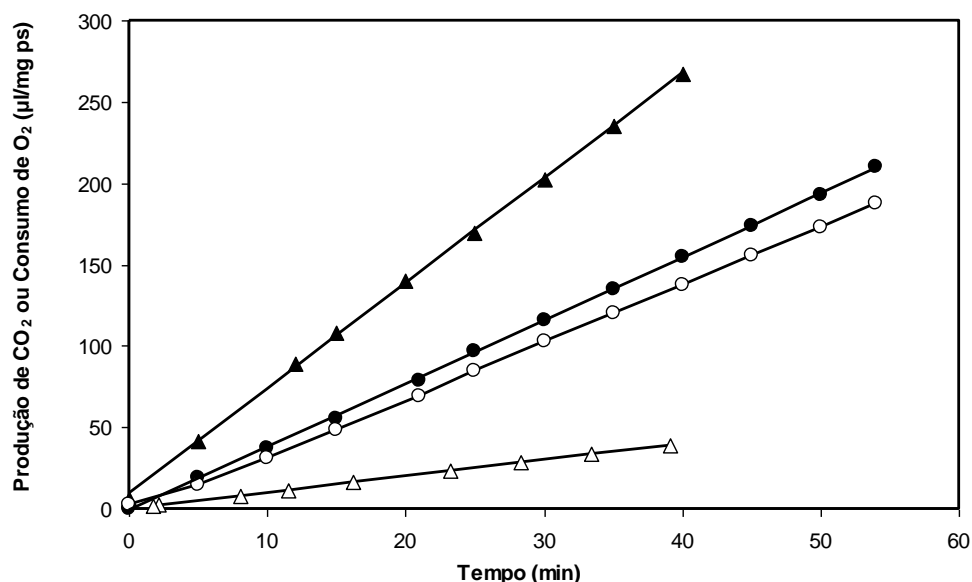
É de salientar que durante a cultura em semi-anaerobiose o oxigénio dissolvido é rapidamente consumido, podendo tornar-se limitante para o metabolismo (Visser *et al.*, 1990). Na ausência de crescimento, e não havendo produção de biomassa, a fermentação pára. A homogeneidade dos valores dos coeficientes de rendimento em etanol sugere que esta será uma das explicações mais plausíveis para as grandes diferenças observadas na capacidade de produção de etanol. *S. cerevisiae* é excepcional no que respeita a esta característica (Visser *et al.*, 1990) e, aparentemente, *H. uvarum* também apresenta uma boa capacidade para crescer em anaerobiose. Mais uma vez, teria sido importante comparar os diferentes rendimentos em biomassa. No mesmo contexto, seria de realizar experiências nas mesmas condições de cultura mas em aerobiose, aumentando o teor de oxigénio disponível, e observar se essa alteração influenciaria a quantidade de etanol produzido.

Também poderá influenciar a concentração máxima de etanol obtida a velocidade de fermentação, pois esta poderá ser inibida se muito rapidamente forem atingidas

concentrações tóxicas de etanol. As leveduras do género *Saccharomyces* produzem vários transportadores de glucose com elevada capacidade e todos do tipo difusão facilitada, permitindo um elevado fluxo metabólico. Esta característica foi relacionada com uma elevada eficiência fermentativa e com a capacidade de fermentação alcoólica aeróbia (leveduras Crabtree-positivas) (van Urk *et al.*, 1989a). Será interessante investigar o transporte de glucose em *H. uvarum*, outra levedura Crabtree-positiva.

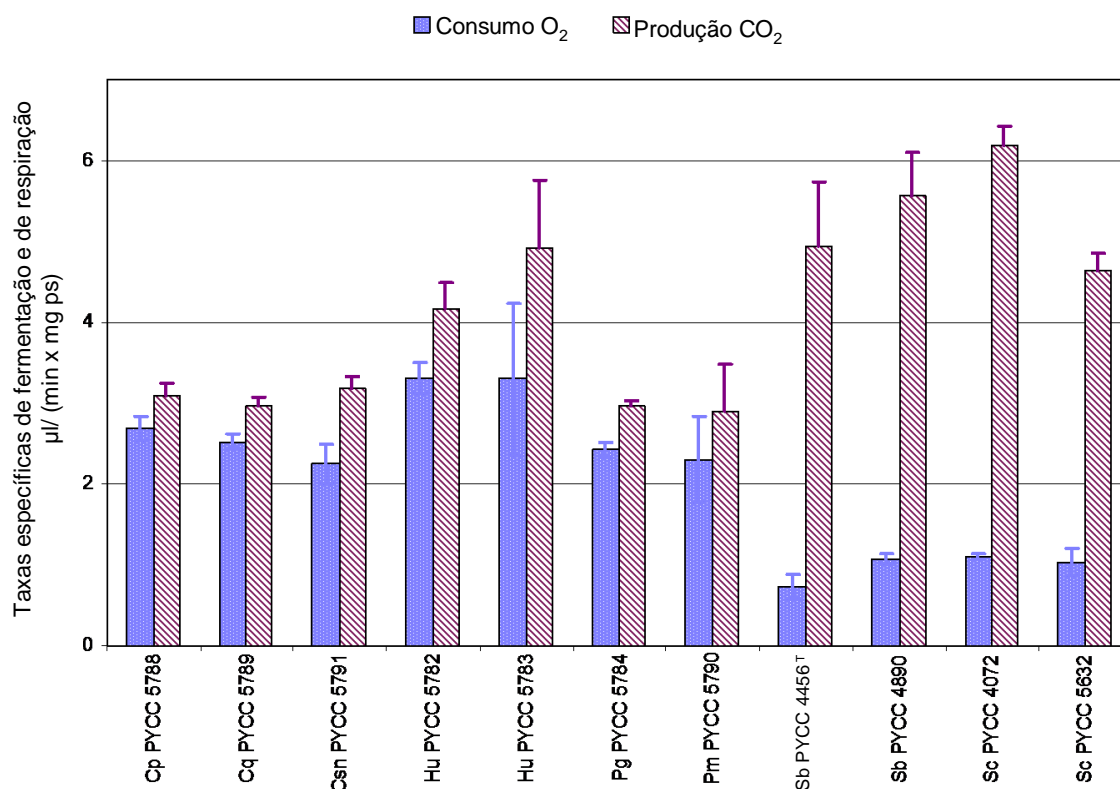
### 3.3.2. Taxas específicas de fermentação e respiração

As taxas específicas de fermentação e respiração também permitem caracterizar a capacidade fermentativa das leveduras. Assim, estes parâmetros foram determinados a 30 °C e pH 4,5, com glucose como fonte de energia, e utilizando o aparelho de Warburg. Na Figura 3.11 pode observar-se, a título ilustrativo, a variação da quantidade de CO<sub>2</sub> produzida e da quantidade de O<sub>2</sub> consumida ao longo do tempo para *H. uvarum* PYCC 5782 e para *S. cerevisiae* PYCC 4072. Os resultados obtidos para todas as estirpes estão apresentados na Figura 3.12.



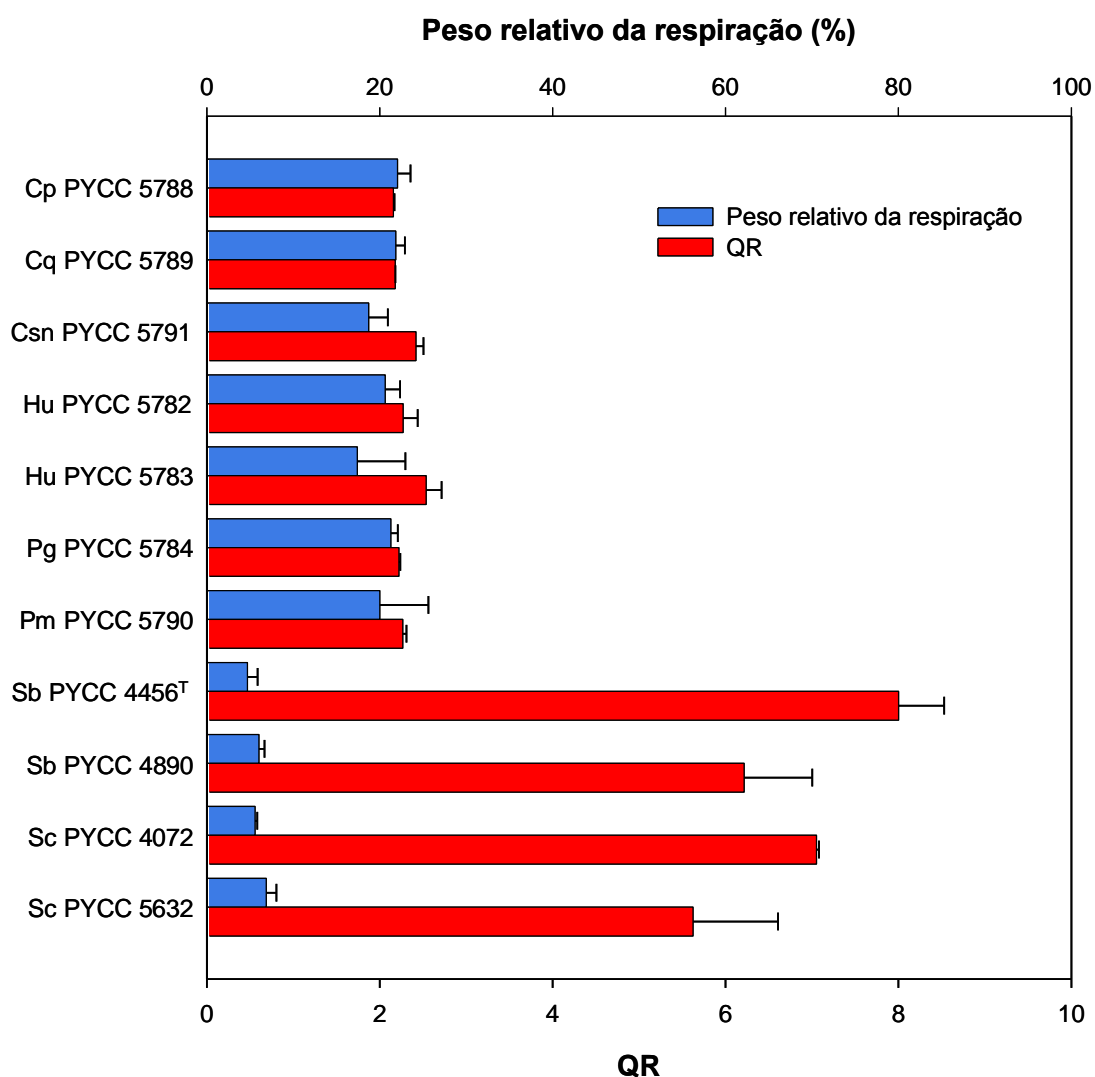
**Figura 3.11.** Produção de CO<sub>2</sub> (símbolos fechados) e consumo de O<sub>2</sub> (símbolos abertos) em função do tempo por suspensões celulares de *S. cerevisiae* PYCC 4072 (▲,△) e de *H. uvarum* PYCC 5782 (●,○), em glucose, pH 4,5 e 30 °C.

Como esperado, as leveduras do género *Saccharomyces* apresentam valores de taxas específicas de fermentação mais altos do que as não-*Saccharomyces*. Entre estas últimas, as duas estirpes de *H. uvarum* evidenciaram melhor desempenho fermentativo do que as outras espécies estudadas (Figura 3.12). As taxas de fermentação obtidas para as estirpes de *Saccharomyces* foram, aproximadamente, o dobro dos valores encontrados para a maioria das outras leveduras. No entanto, *H. uvarum* PYCC 5783 atingiu velocidades de fermentação semelhantes às das estirpes de *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. Pelo contrário, as taxas de respiração foram significativamente maiores (duas a três vezes) em leveduras não-*Saccharomyces*. Entre estas, *H. uvarum* destaca-se por apresentar maiores velocidades de respiração.



**Figura 3.12.** Taxas específicas de respiração (consumo de O<sub>2</sub>) e de fermentação (produção de CO<sub>2</sub>) de glucose, determinadas pelo método de Warburg, das leveduras em estudo. Abreviaturas: Cp, *C. pseudointermedia*; Cq, *C. quercitrusa*; Csn, *Candida* sp. nov.; Hu, *H. uvarum*; Pg, *P. guilliermondii*; Pm, *P. mexicana*; Sb, *S. bayanus*; Sc, *S. cerevisiae*. Os valores representam a média de dois ensaios independentes ± desvio padrão.

As proporções relativas de glucose respirada e fermentada também foram determinadas, utilizando as reacções globais dos dois tipos de metabolismo energético (equações 3.1 e 3.2). Podemos observar (Figura 3.13) que para *Saccharomyces* a percentagem de glucose respirada é de cerca de 5%, enquanto que para o grupo das não-*Saccharomyces* a percentagem de glucose respirada foi de cerca de 20%, o que concorda com dados conhecidos (de Deken, 1966; Gancedo & Serrano, 1989).



**Figura 3.13.** Peso relativo da respiração (■) e QR-Quociente Respiratório (■) nas leveduras em estudo. Abreviaturas: Cp, *C. pseudointermedia*; Cq, *C. quercitrusa*; Csn, *Candida* sp. nov.; Hu, *H. uvarum*; Pg, *P. guilliermondii*; Pm, *P. mexicana*; Sb, *S. bayanus*; Sc, *S. cerevisiae*. Os valores representam a média de dois ensaios independentes  $\pm$  desvio padrão.

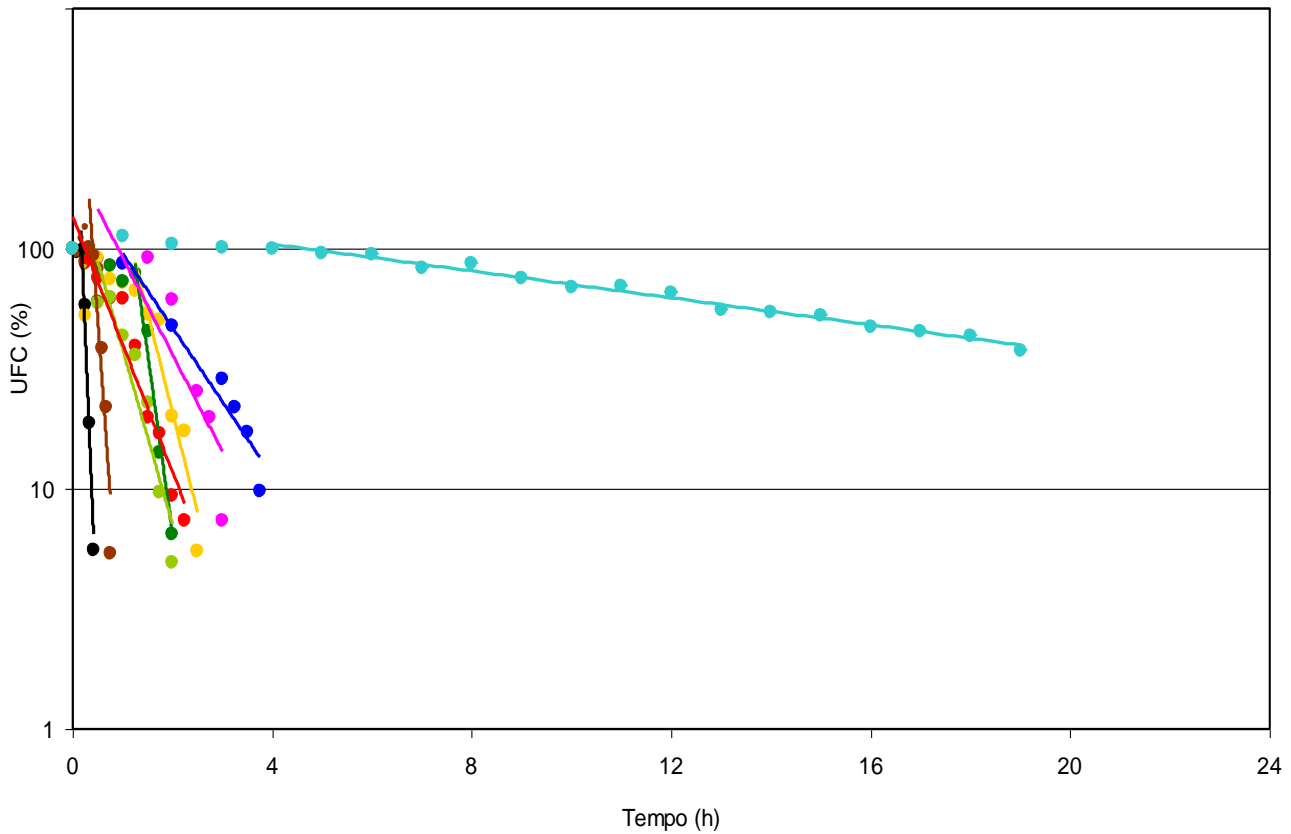
É sabido que na indústria de panificação se utiliza a concentração de açúcar na ordem dos 0,1% p/v para garantir o metabolismo respiratório por *S. cerevisiae* (van Hoek *et al.*, 1998). Sendo Crabtree-positiva, esta levedura responde a concentrações mais elevadas de açúcar com uma inibição da respiração e estimulação da fermentação, o que conduz a uma maior concentração de etanol produzido. Na experiência com o aparelho de Warburg a concentração de glucose foi de 0,9% p/v (50 mM), dando indicações sobre a existência do Efeito de Crabtree nas leveduras estudadas.

Segundo de Deken (1966), existe Efeito de Crabtree quando QR é >1. Neste estudo, as leveduras do género *Saccharomyces* apresentaram QR>5, o que confirma que são Crabtree-positivas e claramente fermentativas. O grupo de leveduras não-*Saccharomyces* apresentou um QR ~ 2. Contudo, não se poderá concluir imediatamente que estas leveduras sejam Crabtree-positivas, pois poderá haver limitação de oxigénio na suspensão celular que leve a um metabolismo respiro-fermentativo (Efeito de Pasteur) e, portanto, a um QR>1. Para se concluir se estas leveduras são Crabtree-positivas ter-se-ia de garantir condições de aerobiose. No entanto, é de salientar que outros autores indicam que *H. uvarum* é Crabtree-positiva (van Dijken & Sheffers, 1986) e que *P. guilliermondii* é Crabtree-negativa (Fonseca *et al.*, 2007).

### **3.3.3. Perda de viabilidade celular por efeito combinado etanol/temperatura**

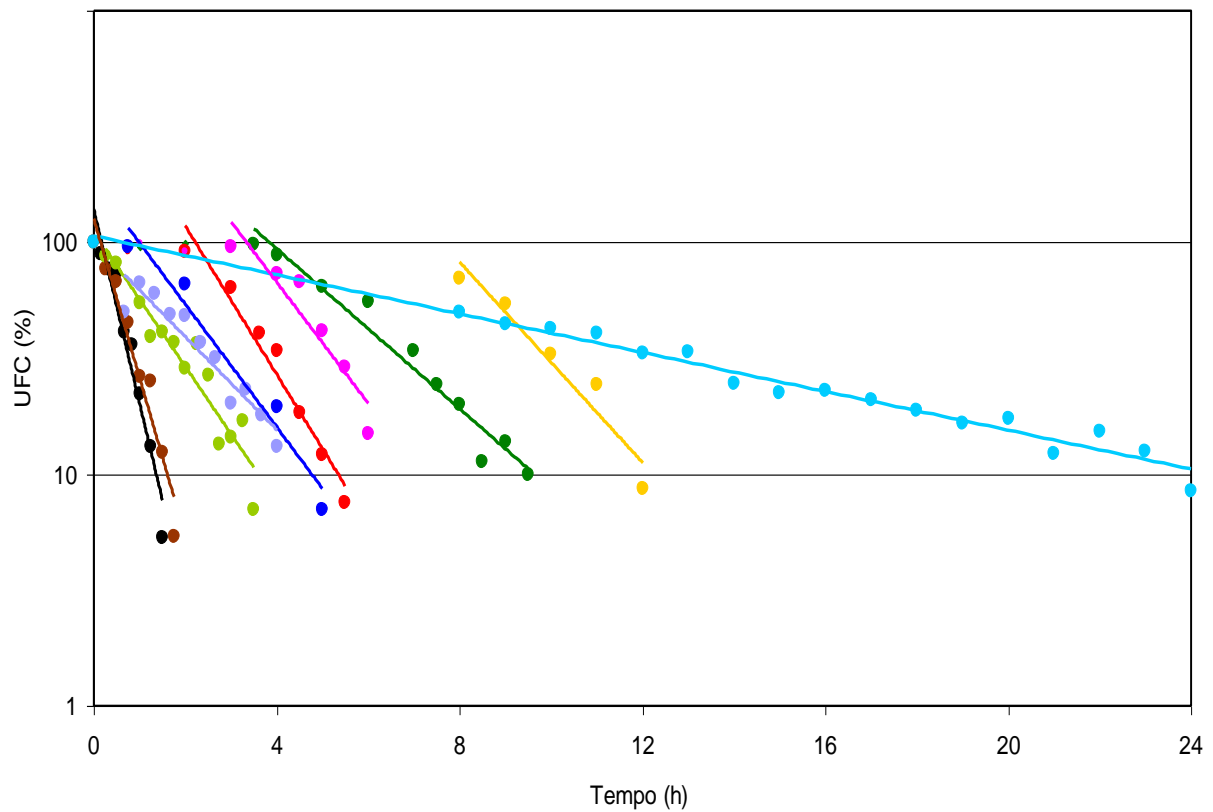
A análise da perda de viabilidade celular em função do binómio concentração de etanol/temperatura foi realizada com o objectivo de desenvolver um método expedito para comparar a resistência das leveduras ao etanol, tendo em vista uma fase posterior de melhoramento de espécies no que respeita à produção de etanol. Estudou-se o efeito na morte celular, entendida como perda de viabilidade, das condições seguintes: 11% v/v etanol/30 °C e 20% v/v etanol/16 °C.

Nas Figuras 3.14 e 3.15 estão representadas as curvas de perda de viabilidade celular na presença de 11% v/v etanol/30 °C e 20% v/v etanol/16 °C, respectivamente. As análises destes gráficos dão informação sobre três parâmetros: i) duração da fase de latência pré-morte; ii) tempo de redução decimal (D); e iii) taxa específica de morte.



**Figura 3.14.** Efeito combinado do etanol e temperatura na viabilidade das leveduras seleccionadas. Condições: meio YM com agitação orbital (150 rpm), 11% v/v etanol e 30 °C. Símbolos: (●) *C. pseudointermedia* PYCC 5788; (●) *C. quercitrusa* PYCC 5789; (●) *Candida* sp. nov. PYCC 5791; (●) *H. uvarum* PYCC 5782; (●) *H. uvarum* PYCC 5783; (●) *P. guilliermondii* PYCC 5784; (●) *P. mexicana* PYCC 5790; (●) *S. bayanus* PYCC 4890; e (●) *S. cerevisiae* PYCC 4072.





**Figura 3.15.** Efeito combinado do etanol e temperatura na viabilidade das leveduras seleccionadas. Condições: meio YM com agitação orbital (150 rpm) 20% v/v etanol e 16 °C. Símbolos: (● amarelo) *C. pseudointermedia* PYCC 5788; (● verde-claro) *C. quercitrusa* PYCC 5789; (● magenta) *Candida* sp. nov. PYCC 5791; (● preto) *H. uvarum* PYCC 5782; (● marrom) *H. uvarum* PYCC 5783; (● verde-escuro) *P. guilliermondii* PYCC 5784; (● vermelho) *P. mexicana* PYCC 5790; (● azul-claro) *S. bayanus* PYCC 4456<sup>T</sup>; (● azul-escuro) *S. bayanus* PYCC 4890; e (● ciano) *S. cerevisiae* PYCC 4072.

A duração da fase de latência foi estimada através da intersecção da regressão linear da curva de morte com 100% de viabilidade inicial. Na presença de 11% v/v etanol/30 °C verifica-se ser muito breve (entre 0,2 h e 1,5 h) a fase de latência antes de se iniciar a fase de morte para todas as leveduras, excepto para *S. cerevisiae* cuja fase de latência durou cerca de quatro horas. Curiosamente, *S. bayanus*, que é uma levedura filogeneticamente próxima de *S. cerevisiae* e produz quantidades semelhantes de etanol, inclui-se no grupo de não-*Saccharomyces* no que respeita à duração da fase de latência (1 h).

Foi também calculado o tempo de redução decimal (definido como o tempo necessário para reduzir 90% a população inicial de leveduras), um parâmetro comparativo utilizado vulgarmente na indústria alimentar (Tabela 3.4). As estirpes de *H. uvarum* foram as que apresentaram tempos de redução decimal mais curtos (0,4 h e 1,0 h). O grupo com comportamento intermédio inclui as outras não-*Saccharomyces* e *S. bayanus* PYCC 4890 (com valores de D que variaram entre 1,8 h e 4,5 h). *S. cerevisiae* PYCC 4072 foi a que apresentou, de longe, o maior tempo de redução decimal (40,5 h).

As taxas específicas de morte em função do binómio 11% v/v etanol/30 °C (Tabela 3.4) foram calculadas por aplicação da equação (1.5) aos pontos da curva correspondentes à fase de morte exponencial. Observa-se três grupos de comportamento: *H. uvarum*, com uma elevada taxa de morte (variando entre 6,8 h<sup>-1</sup> e 11,7 h<sup>-1</sup>); o grupo constituído pelas outras leveduras não-*Saccharomyces* e *S. bayanus*, para o qual se verifica um comportamento intermédio (taxa de morte variando entre 0,7 h<sup>-1</sup> e 3,5 h<sup>-1</sup>); e *S. cerevisiae*, que foi a levedura mais resistente ao choque combinado dos dois agentes ambientais estudados (taxa específica de morte = 0,06 h<sup>-1</sup>).

Porque as curvas de perda de viabilidade com 11% v/v etanol/30 °C não permitiram distinguir o comportamento das diferentes leveduras entre si, decidiu-se modificar as condições e adoptar uma concentração nitidamente mais elevada de etanol (20% v/v) e uma temperatura (16 °C) que permite tolerância máxima (Figura 3.4) e que já tinha sido utilizada para determinar a concentração de etanol máxima produzida.

A duração da fase de latência com 20% v/v etanol/16 °C apresentou-se bastante diferente da obtida no ensaio anterior. *C. quercitrusa*, *H. uvarum* e *S. bayanus* PYCC 4890 mantiveram, contudo, a duração da fase de latência inferior a 1 h. Neste conjunto de

Tabela 3.4. Efeito combinado do etanol e temperatura na morte das leveduras seleccionadas

Levedura	11% v/v etanol/30 °C				20% v/v etanol/16 °C			
	Duração da fase de latência (h)	Tempo de redução decimal (h)	Taxa esp. de morte (h <sup>-1</sup> )	Taxa esp. de morte (h <sup>-1</sup> )	Duração da fase de latência (h)	Tempo de redução decimal (h)	Taxa esp. de morte (h <sup>-1</sup> )	Taxa esp. de morte (h <sup>-1</sup> )
<i>Candida pseudointermedia</i> PYCC 5788	1,0	2,4	1,9	1,9	8,0	12,2	0,5	0,5
<i>Candida quercitrusa</i> PYCC 5789	0,3	1,8	1,7	1,7	0,3	3,6	0,7	0,7
<i>Candida</i> sp. nov. PYCC 5791	1,5	3,9	0,9	0,9	4,0	7,4	0,6	0,6
<i>Hanseniaspora uvarum</i> PYCC 5782	0,2	0,4	11,7	11,7	0,2	1,4	1,9	1,9
<i>Hanseniaspora uvarum</i> PYCC 5783	0,4	1,0	6,8	6,8	0,3	1,5	1,6	1,6
<i>Pichia guilliermondii</i> PYCC 5784	1,3	1,8	3,5	3,5	3,8	9,7	0,4	0,4
<i>Pichia mexicana</i> PYCC 5790	0,5	2,6	1,2	1,2	2,5	5,2	0,7	0,7
<i>Saccharomyces bayanus</i> PYCC 4456 <sup>†</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,3	4,8	0,6	0,6
<i>Saccharomyces bayanus</i> PYCC 4890	1,0	4,5	0,7	0,7	0,7	5,0	0,5	0,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PYCC 4072	4,0	40,5	0,06	0,06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PYCC 5632	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,0	23,6	0,1	0,1

n.d. – não determinado.

leveduras quase não existe fase de latência. *S. cerevisiae* também apresentou uma fase de latência muito curta, apesar duma perda de viabilidade lenta. As restantes leveduras apresentam uma duração da fase de latência que variou entre, aproximadamente, 1,3 h (*S. bayanus* PYCC 4456<sup>T</sup>) e 8 h (*C. pseudointermedia*).

Em relação ao tempo de redução decimal (Tabela 3.4), e como é lógico, foi menor para as leveduras que apresentaram período de latência de morte mais curto e taxa específica de morte maior. *H. uvarum* foi a que apresentou menores tempos de redução decimal (1,4 h e 1,5 h), seguida por todas as outras leveduras não-*Saccharomyces* e por *S. bayanus* (entre 3,6 h e 12,2 h), e por *S. cerevisiae* PYCC 5632, que apresentou o maior tempo de redução decimal (cerca de 24 h).

Na taxa específica de morte celular em presença de 20% v/v etanol e a 16 °C (Figura 3.15), é possível distinguir três grupos de leveduras: *H. uvarum* PYCC 5782 e PYCC 5783 destacam-se de todas as outras por morrerem mais depressa, tal como se observou nas condições anteriormente ensaiadas; no grupo com resistência intermédia encontram-se as duas estirpes de *S. bayanus* (PYCC 4456<sup>T</sup> e PYCC 4890) e todas as outras leveduras não-*Saccharomyces*; e *S. cerevisiae* que, claramente, é a mais resistente à presença de etanol nas condições ensaiadas.

As taxas de morte calculadas nestas condições foram significativamente mais baixas do que as obtidas nas condições anteriores para todas as leveduras analisadas em ambas e, em particular, para *H. uvarum* (1,9 h<sup>-1</sup> e 1,6 h<sup>-1</sup>, a 20% v/v etanol/16 °C vs 11,7 h<sup>-1</sup> e 6,8 h<sup>-1</sup>, a 11% v/v etanol/30 °C). As outras leveduras não-*Saccharomyces*, e também *S. bayanus*, originaram valores entre 0,4 h<sup>-1</sup> e 0,7 h<sup>-1</sup> e pouco variáveis, enquanto para *S. cerevisiae* a taxa de morte foi a mais baixa observada (0,1 h<sup>-1</sup>).

Este método, perda de viabilidade celular a 20% v/v etanol/16 °C, revelou-se expedito na comparação da diferente resistência ao etanol das leveduras seleccionadas, conseguindo diferenciá-las melhor do que as condições de etanol e temperatura ensaiadas anteriormente.

Seria de esperar que *S. bayanus* apresentasse um comportamento semelhante ao de *S. cerevisiae*, dada a semelhança das duas espécies. No entanto, *S. bayanus* comportou-se como uma levedura não-*Saccharomyces*. A produção de etanol no processo de fermentação alcoólica em *S. bayanus* poderá ser acompanhado de mecanismos protectores da sua

---

resistência ao próprio etanol produzido, fenómeno que não ocorrerá quando se sujeita a levedura ao choque por etanol adicionado/temperatura. Será interessante investigar, no futuro, as razões subjacentes a esta diferença.

A perda de viabilidade celular nas condições testadas parece não estar relacionada com a produção máxima de etanol. Por exemplo, *P. mexicana* apenas produziu 1,7% p/v de etanol e, no entanto, apresenta maior resistência do que *H. uvarum*, que é uma levedura que embora possa produzir cerca de 10% p/v etanol foi a que menor resistência ofereceu às condições ensaiadas. Esta observação sugere que serão diferentes os mecanismos que determinam a concentração máxima de etanol produzida por diferentes espécies de leveduras.

Esta parte do trabalho permitiu identificar um binómio concentração de etanol/temperatura que poderá constituir um instrumento útil para despiste rápido de resistência relativa ao etanol em estudos futuros de melhoramento de espécies.

#### 3.3.4. Actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática

Em complemento dos estudos efectuados sobre a actividade fermentativa das espécies em análise, e pela importância de que se reveste, a actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática foi determinada em condições padronizadas, seguindo as condições óptimas para *S. cerevisiae*. Os valores da actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática das leveduras estudadas variaram significativamente (Tabela 3.5).

As leveduras do género *Saccharomyces* apresentaram valores de actividade ATPásica, entre 33,2±5 e 109,8±2 nmol P<sub>i</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> proteína, enquanto que as leveduras não-*Saccharomyces* apresentaram valores de actividade entre 105,4±15 e 250,0±63 nmol P<sub>i</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> proteína.

Em *Saccharomyces*, *S. cerevisiae* PYCC 4072 foi a que apresentou actividade ATPásica mais elevada, quase o dobro do valor obtido para *S. cerevisiae* PYCC 5632 e *S. bayanus* PYCC 4456<sup>T</sup>. *S. bayanus* PYCC 4890 apresentou a actividade ATPásica mais baixa de todas as estirpes ensaiadas. De entre as leveduras não-*Saccharomyces*, *C. quercitrusa* destaca-se por ter a actividade ATPásica mais alta, enquanto *H. uvarum* PYCC 5782 apresentou a actividade mais baixa. As restantes leveduras deste grupo originaram valores

de actividade de ATPase da membrana plasmática próximas entre si, variando entre  $125,1 \pm 23$  e  $153,4 \pm 23$ .

**Tabela 3.5** Actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática das leveduras estudadas

Leveduras	Actividade H <sup>+</sup> -ATPase (nmol Pi · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> proteína)*
<i>Candida pseudointermedia</i> PYCC 5788	153,4 ± 23
<i>Candida quercitrusa</i> PYCC 5789	250,0 ± 63
<i>Candida</i> sp. nov. PYCC 5791	125,3 ± 26
<i>Hanseniaspora uvarum</i> PYCC 5782	105,4 ± 15
<i>Hanseniaspora uvarum</i> PYCC 5783	139,7 ± 15
<i>Pichia guilliermondii</i> PYCC 5784	134,1 ± 15
<i>Pichia mexicana</i> PYCC 5790	125,1 ± 23
<i>Saccharomyces bayanus</i> PYCC 4456 <sup>T</sup>	59,6 ± 0
<i>Saccharomyces bayanus</i> PYCC 4890	33,2 ± 5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PYCC 4072	109,8 ± 2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PYCC 5632	59,2 ± 7

Condições de ensaio: 30 °C; pH 5,7; [ATP] = 2 mM.

\* média ± desvio padrão de pelo menos dois ensaios independentes.

Estes resultados não favorecem a hipótese inicial de que uma capacidade para produzir mais etanol poderá estar relacionada com uma ATPase mais activa. Como se sabe que o etanol estimula a actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática em *S. cerevisiae* e *P. stipitis* (Rosa & Sá-Correia, 1991; Meyrial *et al.*, 1995a), colocou-se, então, a hipótese de haver um limiar máximo de actividade ATPásica e que este limiar seja atingido com concentrações de etanol mais baixas para as leveduras com actividade basal mais alta. O trabalho realizado para explorar esta hipótese está descrito no capítulo seguinte.

## **CAPÍTULO 4**

# **CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DA H<sup>+</sup>-ATPase DA MEMBRANA PLASMÁTICA**





---

## 4.1 Introdução

### 4.1.1 Estrutura e função da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática em leveduras

A ATPase é a proteína mais abundante da membrana plasmática de leveduras, constituindo cerca de 15% da proteína desta membrana e 0,3% da proteína celular total (Serrano, 1988; Nakamoto & Slayman, 1989). Tem um consumo elevado de ATP (estimado em 40-60% do ATP total produzido metabolicamente), o que torna a bomba de H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática a principal fonte de consumo de energia em leveduras (Goffeau & Slayman, 1981; Serrano, 1988).

As H<sup>+</sup>-ATPases associam a hidrólise de ATP ao efluxo de protões através das membranas celulares (Figura 3.5). Originam um gradiente electroquímico transmembranar de protões, com uma componente química ( $\Delta\text{pH}$ ), o gradiente protónico, e uma componente eléctrica ( $\Delta\psi$ ), o potencial de membrana. No caso das leveduras, o funcionamento da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática está directamente associado à sua capacidade para crescerem em ambientes ácidos (Serrano, 1988) e/ou se adaptarem a situações adversas, nas quais é necessária a manutenção de um  $\Delta\text{pH}$  elevado e de um pH citoplasmático compatível com o metabolismo.

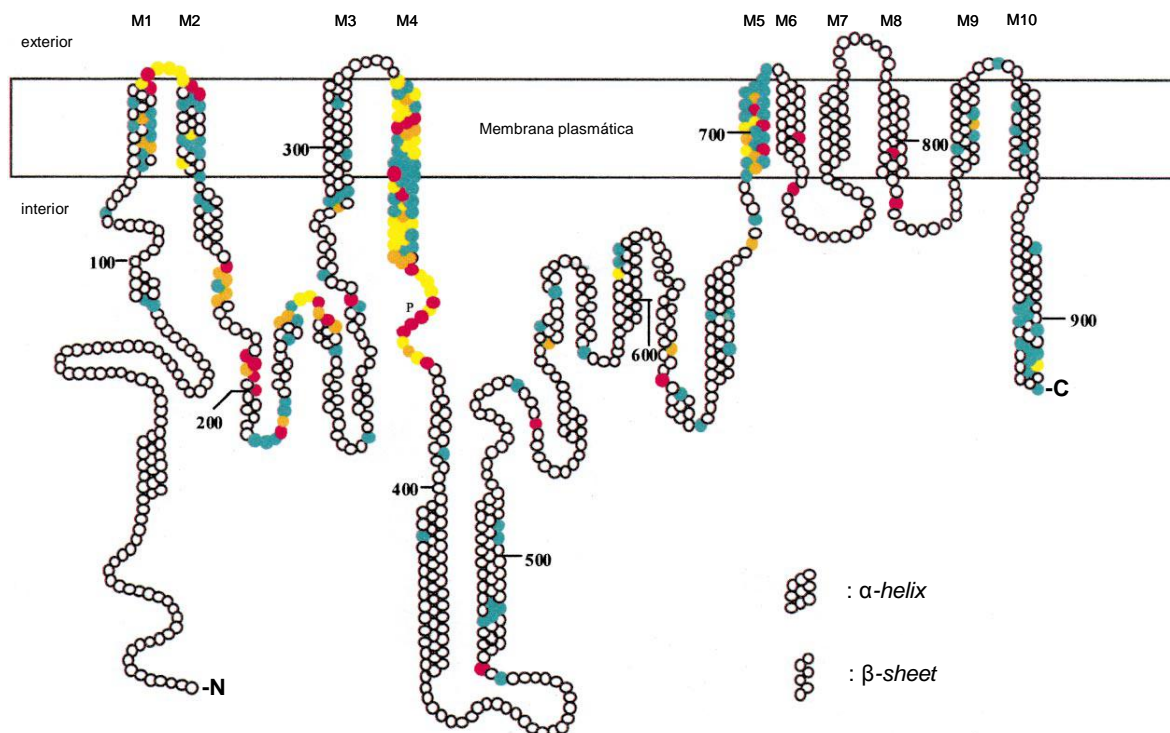
A H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática de fungos foi descoberta nos finais da década de 1970, apesar da sua existência ter sido anteriormente prevista através de medições electrofisiológicas do ATP e potencial de membrana existente em células de *Neurospora crassa* (para uma revisão, ver Rao & Slayman, 1996). Nos anos seguintes foram desenvolvidos métodos para a purificação desta H<sup>+</sup>-ATPase, primeiro a partir de duas espécies de leveduras - *Schizosaccharomyces pombe* (Dufour & Goffeau, 1978) e *Saccharomyces cerevisiae* (Malpartida & Serrano, 1980), e posteriormente a do fungo filamentoso *N. crassa* (Addison & Scarborough, 1981; Bowman *et al.*, 1981). Verificou-se que a proteína era composta por um polipéptido simples com 100 kDa de peso molecular, firmemente inserido na bicamada fosfolipídica e exigindo a presença de detergentes para a sua solubilização (Ambesi *et al.*, 2000). Paralelamente, e ainda em inícios da década de 80, estudos feitos com marcação do ATP com <sup>32</sup>P apontaram para um mecanismo de hidrólise de ATP que envolvia a formação de um intermediário, o  $\beta$ -aspartil-fosfato (Amory *et al.*, 1980; Dame & Scarborough, 1980; 1981; Amory & Goffeau, 1982), para além de evidenciarem uma sensibilidade a baixas concentrações de ortovanadato (Bowman & Slayman, 1979).

Todos estes estudos contribuíram para se definir uma família de H<sup>+</sup>-ATPases denominada de

ATPases do Tipo P (Goffeau & Slayman, 1981; Nakamoto & Slayman, 1989; Henschke & Rose, 1991). Esta família pode ser dividida, resumidamente, em duas sub-famílias: Tipo P1, que transportam metais pesados e se encontram em bactérias; e Tipo P2, ao qual pertencem as ATPases em apreço neste estudo. Entre as de Tipo P2 estão as P2A, que incluem as Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases e H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases, que estão envolvidas na troca de Na<sup>+</sup> e H<sup>+</sup>, respectivamente, por K<sup>+</sup>, e as de Tipo P2B, representadas pelas ATPases transportadoras de Ca<sup>2+</sup> que se encontram no retículo sarco-endoplasmático e pelas H<sup>+</sup>-ATPases de plantas e fungos (Lutsenko & Kaplan, 1995).

A identificação e sequenciação do gene *PMA1* que codifica a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática de *S. cerevisiae* e *Sch. pombe* permitiu aprofundar o conhecimento das estruturas primárias daquela proteína (Serrano, 1988). A análise da sequência de aminoácidos obtida por tradução das sequências nucleotídicas e a comparação dos respectivos perfis de hidrofobicidade permitiram construir o correspondente modelo topológico da H<sup>+</sup>-ATPase (Figura 4.1). É uma proteína que durante o seu ciclo reaccional é fosforilada covalentemente no aminoácido aspartato (número 378 em *S. cerevisiae*). A Pma1p está ancorada na camada bifosfolipídica da membrana plasmática por quatro segmentos hidrofóbicos transmembranares na extremidade amino (N-terminal) da molécula e por seis na extremidade carboxilo (C-terminal). A região central situa-se no citoplasma e contém uma zona altamente conservada que constitui o local de ligação do ATP (no domínio N) e o local de fosforilação (no domínio P) (Morsomme *et al.*, 2000). A identificação de domínios funcionais específicos foi realizada recorrendo a estudos de mutantes, nomeadamente em *S. cerevisiae* com alterações no gene estrutural *PMA1* e através de mutagénesse dirigida a substituições singulares de aminoácidos em regiões diversas da cadeia polipeptídica (para uma revisão, consultar Morsomme *et al.*, 2000). A Figura 4.1 ilustra a distribuição das mutações estudadas e o seu efeito na actividade da ATPase.

A possibilidade de factores ambientais activarem *in vivo* a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática de leveduras tem sido evidenciada por vários grupos. Foram identificadas as condições seguintes: (i) glucose (Serrano, 1983; Meyrial *et al.*, 1995a); (ii) maltose, trealose e galactose (Sychrová & Kotyk, 1985); (iii) pH ácido (Eraso & Gancedo, 1987); (iv) privação de fonte de azoto na presença de um açúcar fermentável (Benito *et al.*, 1992); (v) etanol (Rosa & Sá-Correia, 1991; 1992); (vi) temperaturas de crescimento supra-óptimas (Viegas *et al.*, 1995); (vii) ácidos succínico e acético (Carmelo *et al.*, 1997); e (viii) ácido octanóico (Viegas & Sá-Correia, 1991).



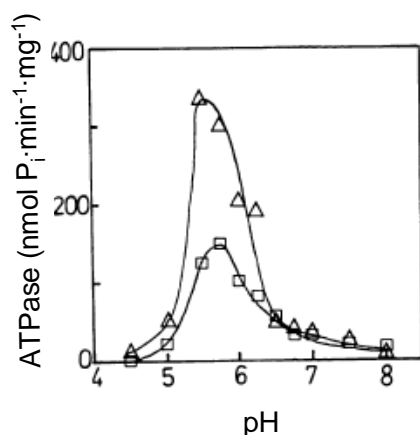
**Figura 4.1.** Modelo topológico da  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática de leveduras, incluindo mapa de mutações. Os resíduos estão coloridos de acordo com o efeito da mutação. **Verde:** mutação sem efeito no crescimento ou actividade da ATPase; **Amarelo:** mutação que baixa a actividade ATPásica pelo menos 50%; **Laranja:** mutação que reduz a actividade ATPásica pelo menos 10% ou é letal recessiva; **Vermelho:** mutação que é letal dominante. M1-M10 – domínios transmembranares (Morsomme *et al.*, 2000).

#### 4.1.2 Influência do pH e etanol na actividade da $H^+$ -ATPase

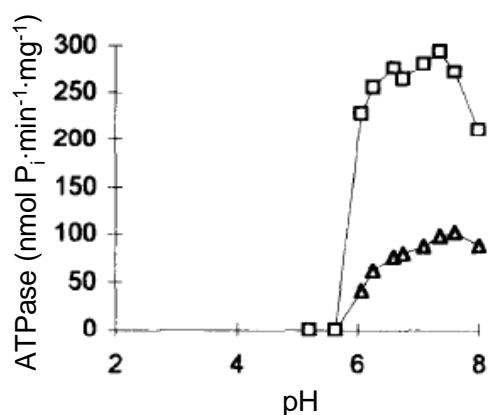
##### *pH*

A activação da  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática constitui um mecanismo de sobrevivência da célula de levedura para manter o pH interno em valores entre 6 e 7,5 durante a cultura em meio ácido (Salhany *et al.*, 1975; Borst-Pauwels & Peters, 1977). Eraso & Gancedo (1987) verificaram que a actividade da  $H^+$ -ATPase duplica ou triplica quando o pH do meio desce de 5,5 para valores inferiores a 3,5. Este aumento da actividade parece derivar dum aumento da afinidade da ATPase para o ATP, aparentemente não modificando o pH óptimo, e observa-se tanto na fase exponencial como na fase estacionária. Ao contrário do que acontece com a activação em meio ácido, a activação induzida pela glucose é mais forte na fase exponencial do que na fase estacionária (Eraso & Gancedo, 1987).

A actividade específica da ATPase da membrana plasmática foi caracterizada em diferentes espécies de levedura e verificou-se haver diferentes valores de pH óptimos para a hidrólise do ATP: 5,7 em *S. cerevisiae* (Figura 4.2), 6,3 em *Kluyveromyces marxianus* (Rosa & Sá-Correia, 1991) e na gama 7,3-7,5 em *P. stipitis* (Figura 4.3) (Meyrial *et al.*, 1995a).



**Figura 4.2.** Actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática de *S. cerevisiae* IGC 3507 III, cultivada na ausência (□) ou presença (Δ) de 6% v/v etanol, em função do pH (Rosa & Sá-Correia, 1991).



**Figura 4.3.** Actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática de *P. stipitis* NRRL Y7124, cultivada em D-xilose (Δ) ou D-glucose (□), em função do pH (Meyrial *et al.*, 1995a).

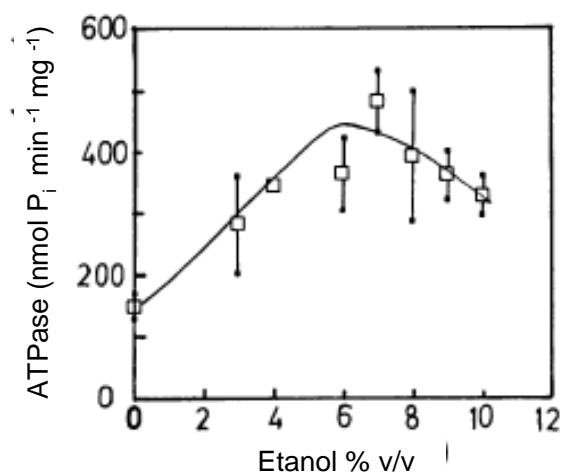
O crescimento duma população de levedura e a própria sobrevivência das células são influenciados não só pelo pH extracelular mas também pelo tipo e concentração de ácido

presente no meio (Carmelo *et al.*, 1997). Quando a acidificação é causada pela presença de um ácido forte, há um aumento da concentração de prótons no exterior da célula. No entanto, se a acidificação resulta da presença de um ácido fraco, a sua forma não dissociada é lipossolúvel e difunde através da membrana para dentro da célula. A dissociação do ácido no citoplasma, devida a um pH próximo da neutralidade, conduz a uma acidificação intracelular e a uma possível acumulação do anião respectivo. McCusker *et al.* (1987) mostraram que mutantes de *S. cerevisiae* no gene *PMA1* não conseguem crescer a pH baixo ou na presença de concentrações significativas de ácidos fracos, indicando que a eficácia de expulsão de prótons da célula é essencial para a sua sobrevivência.

### *Etanol*

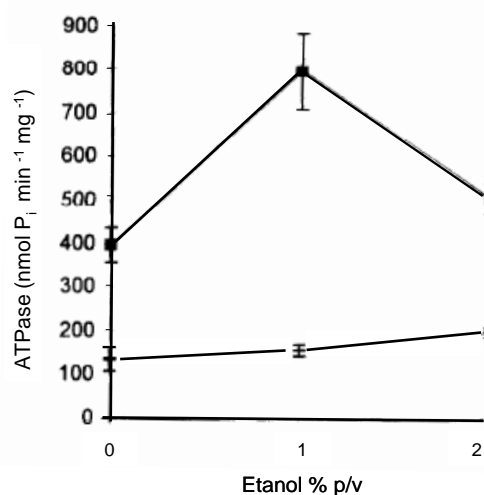
Como já foi amplamente demonstrado em leveduras, o etanol é um composto inibidor do crescimento e da viabilidade celular, modifica a fluidez da membrana plasmática e afecta vários sistemas de transporte, inibe algumas enzimas glicolíticas e tem sido associado à degradação do DNA mitocondrial (Nagodawithana & Steinkraus, 1976; Leão & van Uden, 1982; Ingram & Buttke, 1984; D'Amore *et al.*, 1990; Bisson, 1999; Chi & Arneborg, 1999).

A actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática *in vivo*, tanto em *S. cerevisiae* como em *Kluyveromyces marxianus*, é estimulada pelo etanol (ver Figura 4.2), pelo menos quando em cultura na presença de concentrações de etanol ainda longe da concentração máxima que permite crescimento (Rosa & Sá-Correia, 1991;1992). Em *S. cerevisiae*, observou-se uma actividade máxima da ATPase na presença de 6% v/v de etanol três vezes maior do que em células cultivadas na ausência de etanol (Figura 4.4).



**Figura 4.4.** Actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática de *S. cerevisiae* IGC 3507-III cultivada com concentrações crescentes de etanol (Rosa & Sá-Correia, 1991).

Para *Kl. marxianus*, a actividade máxima foi 1,4 vezes superior em células cultivadas na presença de 3% v/v de etanol relativamente à actividade obtida sem etanol adicionado ao meio de cultura (Rosa & Sá-Correia, 1992). Em *P. stipitis*, que apresenta um bom crescimento com 3% v/v etanol, também se observou a activação da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática para o dobro quando se adicionou 1% v/v de etanol ao meio de crescimento com glucose. O mesmo não aconteceu quando se adicionou etanol ao meio com xilose (Figura 4.5), sugerindo que a activação pelo etanol pode depender da fonte de carbono usada para crescimento (Meyrial *et al.*, 1995b).



**Figura 4.5.** Actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática de *P. stipitis* NRRL Y-7124 cultivada em xilose (-) ou glucose (■) com concentrações crescentes de etanol (Meyrial *et al.*, 1995b).

#### 4.1.3 Caracterização dos genes *PMA1* e *PMA2*

O gene estrutural que codifica a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática (*PMA1*) em *S. cerevisiae* é essencial à viabilidade celular, sendo considerado um dos mais proeminentes genes *housekeeping* nesta levedura (Serrano *et al.*, 1986). A manipulação genética da expressão de *PMA1* demonstrou que a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática regula a taxa de crescimento celular, e que mutações que anulem a expressão do gene são letais para a célula (Serrano *et al.*, 1986; Ghislain *et al.*, 1987). A sua expressão parece estar controlada por uma proteína activadora do promotor, o factor TUF (Capioux *et al.*, 1989).

Um segundo gene estrutural, o *PMA2*, codificante da mesma proteína, foi identificado em *S. cerevisiae* (Schlesser *et al.*, 1988) e em *Sch. pombe* (Ghislain & Goffeau, 1991). O *PMA2* apresenta uma elevada homologia com o *PMA1*, de cerca de 90% de identidade ao nível da proteína (Schlesser *et al.*, 1988). Todavia, estas duas isoformas exibem diferentes características cinéticas e de regulação, sugerindo diferentes funções. Os genes *PMA1* e *PMA2* são funcionalmente intercambiáveis (Supply *et al.*, 1993), muito embora o gene *PMA2* seja expresso muito fracamente e considerado não essencial (Schlesser *et al.*, 1988; Ghislain & Goffeau, 1991; Fernandes & Sá-Correia, 1999). Apesar da inactivação do gene *PMA2* não modificar a cinética de crescimento celular, pelo menos em condições normais de pH (Goffeau *et al.*, 1990; Ghislain & Goffeau, 1991), mutantes *pma2* de *S. cerevisiae* revelaram-se mais sensíveis a meios de crescimento ácidos e menos sensíveis a condições alcalinas, em consonância com o facto do gene *PMA2* codificar uma proteína com actividade de H<sup>+</sup>-ATPase (Goffeau *et al.*, 1990).

A expressão dos genes *PMA1* e *PMA2* foi avaliada durante o crescimento em meio com glucose e concentrações crescentes de etanol usando fusões *PMA1-lacZ* e *PMA2-lacZ* e análise por *Northern blot* com RNA total e uma sonda para o gene *PMA1* (Monteiro *et al.*, 1994). Verificou-se que a presença de concentrações sub-letais de etanol (6% v/v) aumentou a expressão de *PMA2*, enquanto que a expressão de *PMA1* foi reduzida. Observou-se também que, apesar de existir uma aparente correspondência entre a activação da ATPase da membrana plasmática e o aumento da expressão de *PMA2*, o nível máximo de expressão de *PMA2* permaneceu, aproximadamente, 200 vezes mais baixo do que o nível de *PMA1*. Por outro lado, o etanol activou a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática de uma estirpe que expressava apenas a Pma1p, não activando a da estirpe que apenas expressava a Pma2p. Os mesmos autores demonstraram ainda que, na presença de etanol, é a Pma1p que é activada, provavelmente por um mecanismo pós-tradução que não parece afectar a Pma2p.

O domínio regulador envolvido na activação da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática induzida pela acidificação do meio exterior ou pela presença de glucose parece ser o terminal carboxilo da ATPase, o qual, independentemente do mecanismo envolvido, aparece como o único domínio da ATPase responsável pela modulação da actividade da enzima (Portillo *et al.*, 1989; 1991; Benito *et al.*, 1992; Eraso & Portillo, 1994; Monteiro & Sá-Correia, 1998). Foram identificados alguns aminoácidos (por ex., S911A e T912A) que, quando alterados, são capazes de suprimir os efeitos das mutações originais e tornam a ATPase inactivável pela glucose (Portillo *et al.*, 1991; Eraso & Portillo, 1994).

O gene *PMA1* já foi sequenciado em inúmeras espécies de leveduras e de fungos filamentosos. Foi verificada uma elevada homologia entre si (com excepção das sequências terminais amino e carboxilo) e com as sequências dos genes das ATPases que transportam diferentes catiões (mono- e divalentes) da membrana plasmática de leveduras. A homologia também é elevada com as ATPases de células animais e vegetais.

A análise e comparação dos genomas de diferentes espécies - genómica comparativa - tem contribuído de forma acentuada tanto para o conhecimento e melhor compreensão de como as espécies evoluem como para a determinação da função e estrutura de genes e de regiões não codificantes do genoma. A genómica comparativa poderá também contribuir para melhor entender até que ponto as variações em certos aminoácidos em proteínas homólogas poderão ser responsáveis pelas diferenças nas características e respostas a estímulos. O poder desta abordagem complementa a análise experimental e é elevada em termos de sensibilidade e precisão (Kellis *et al.*, 2003). O genoma completo de *S. cerevisiae* está disponível desde 1996 (Goffeau *et al.*, 1996) e, desde então, tem sido um instrumento poderoso para a aquisição de informação biológica e uma base de comparação de sequências de genomas de inúmeros organismos próximos (outras leveduras e fungos filamentosos) entretanto conhecidas.

#### **4.1.4. Estudos descritos neste capítulo**

A necessidade de manutenção do pH intracelular entre valores metabolicamente aceitáveis durante a fermentação alcoólica e o conhecimento de que o etanol provoca um aumento do influxo passivo de prótons através da membrana plasmática conduziram à hipótese de que uma maior capacidade fermentativa se poderia relacionar com uma ATPase mais eficiente. Esta hipótese foi, aparentemente, contrariada pelos resultados descritos no capítulo anterior, que mostram que leveduras com maior capacidade fermentativa (*S. cerevisiae* e *S. bayanus*) apresentam actividades ATPásicas mais baixas do que leveduras que produzem menos etanol (por ex., *P. mexicana*). Sabendo que o etanol estimula a actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática em *S. cerevisiae* e *P. stipitis*, decidiu-se averiguar se esta resposta seria generalizada e se haveria uma relação com a capacidade de produção de etanol pelas diferentes leveduras. Para tentar responder a esta questão, estudou-se o efeito do etanol na actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática de leveduras não-*Saccharomyces*, em comparação com as de *S. cerevisiae* e de *P. stipitis*, espécies já estudadas por outros autores. Como primeiro passo, foram determinados os valores de pH óptimos para as ATPases das diferentes leveduras analisadas.



Adicionalmente, procedeu-se a uma análise comparativa das sequências da Pma1p das leveduras investigadas neste trabalho. Esta comparação, para além de permitir uma apreciação preliminar sobre regiões variáveis e o estabelecimento de possíveis correlações com características bioquímicas diferenciais das várias ATPases estudadas, visou avaliar se o gene *PMA1* será útil para inferir sobre relações filogenéticas em leveduras.

## 4.2. Materiais e métodos

### 4.2.1. Leveduras

Três das leveduras isoladas, e que apresentaram diferentes actividades ATPásicas, foram seleccionadas para estudar a influência do pH e efeito do etanol na actividade da ATPase da membrana plasmática (ver Capítulo 3): *C. quercitrusa* PYCC 5789, *H. uvarum* PYCC 5782 e *P. mexicana* PYCC 5790. Nos ensaios para a determinação do pH óptimo foram também utilizadas, para comparação, *P. stipitis* PYCC 4374<sup>T</sup>, *S. bayanus* PYCC 4890 e *S. cerevisiae* PYCC 4072. Para o mesmo efeito, nos estudos com etanol foram também ensaiadas *P. stipitis* PYCC 4374<sup>T</sup>, *S. cerevisiae* PYCC 5632 e *S. cerevisiae* PYCC 3507-III. A amplificação e sequenciação dum fragmento de *PMA1* incidiram em seis das leveduras isoladas: *C. pseudointermedia* PYCC 5788, *C. quercitrusa* PYCC 5789, *Candida* sp. nov. PYCC 5791, *H. uvarum* PYCC 5782, *P. guilliermondii* PYCC 5784 e *P. mexicana* PYCC 5790. Também se utilizou a estirpe-tipo de *S. cerevisiae* (PYCC 4455<sup>T</sup>) como controlo.

### 4.2.2. Meios e condições de cultura

Nos ensaios para a determinação de pH óptimo foram utilizadas as condições descritas por Serrano (1978; 1983; 1984). Os inóculos foram preparados, partindo de culturas frescas em meio sólido, em balões Erlenmeyer (250 ml) com 100 ml de meio líquido YNB (Difco) contendo 0,5% p/v extracto de levedura, 0,5% p/v (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 10% p/v glucose, com pH ajustado a 5,4, incubados durante a noite a 30 °C (150 rpm). Para as experiências, foram inoculados balões Erlenmeyer (500 ml) com 300 ml do mesmo meio líquido, mas com 3% p/v glucose, de modo a que a A<sub>640nm</sub> inicial fosse cerca de 0,35, mantendo as restantes condições de crescimento.

Para a determinação do efeito do etanol na actividade ATPásica, procedeu-se de modo semelhante mas adicionando aos meios de cultura (pré-inóculo e inóculo) concentrações diferentes de etanol, conforme indicado, e incubando a 16 °C (150 rpm) até se obter uma A<sub>640nm</sub> entre 0,35-0,40. As concentrações de etanol que permitiram crescimento variaram com a espécie: até 5% v/v para *C. quercitrusa* PYCC 5789; até 4% v/v para *H. uvarum* PYCC 5782; até 6% v/v para *P. mexicana* PYCC 5790; até 2% v/v para *P. stipitis* PYCC 4374<sup>T</sup>; e até 10% v/v para *S. cerevisiae* PYCC 3507-III. Como controlo, foram sempre realizadas culturas na ausência de etanol.

### 4.2.3. Determinação do pH óptimo

Para a determinação do pH óptimo da actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática, a preparação da fracção membranar total, quantificação da proteína e determinação da actividade da H<sup>+</sup>-ATPase foram realizadas da forma descrita em 3.2.8., com as alterações a seguir indicadas.

Os ensaios para a determinação da actividade específica da H<sup>+</sup>-ATPase plasmática em função do pH foram realizados com tampão MES na gama entre 4,5 e 7,3 (Apêndice I). Igualmente, o pH da solução de ATP foi ajustado ao pH do ensaio.

A quantidade de proteína utilizada em cada reacção variou entre 40-100 µg, correspondendo a um volume que variou entre 9-17 µl de suspensão membranar total por cada 250 µl (volume total) da mistura enzimática.

### 4.2.4. Efeito do etanol na actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática

Para o estudo do efeito do etanol na actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática, a preparação da fracção membranar total, quantificação da proteína e determinação da actividade da H<sup>+</sup>-ATPase foram realizadas como descrito em 3.2.8, com as alterações a seguir indicadas.

Para cada uma das leveduras em análise, as misturas enzimáticas foram ajustadas ao valor de pH óptimo determinado neste trabalho ou ao valor já referido na literatura para a espécie em causa: *C. quercitrusa* PYCC 5789 - pH 5,8; *H. uvarum* PYCC 5782 - pH 5,4; *P. mexicana* PYCC 5790 - pH 6,0; *P. stipitis* PYCC 4374<sup>T</sup> - pH 6,0 (Meyrial *et al.*, 1995a); *S. cerevisiae* PYCC 3507-III (Rosa & Sá-Correia, 1991) e PYCC 5632 - pH 5,7.

A quantidade de proteína utilizada em cada reacção foi de cerca de 100 µg, correspondendo a um volume que variou entre 9-25 µl de suspensão membranar total por cada 250 µl (volume total) da mistura enzimática.

### 4.2.5. Amplificação e sequenciação do fragmento de *PMA1*

#### *Desenho de primers para amplificação do gene PMA1*

O desenho de *primers* constituiu o primeiro passo para a amplificação por PCR do fragmento de *PMA1* das espécies não-*Saccharomyces* isoladas neste trabalho. Com base em sequências dos genes *PMA1* de leveduras, disponíveis em bases de dados públicas

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), procedeu-se ao alinhamento das sequências das respectivas proteínas comparando com a proteína Pma1p (918 aminoácidos) de *S. cerevisiae* (nº de acesso CAA96708), por análise *BLAST* (Altschul *et al.*, 1990; 1997) em NCBI. As sequências filogeneticamente mais próximas foram novamente alinhadas (Apêndice III), utilizando o programa *Bioedit* (desenvolvido por Hall, 1999) e aplicando *ClustalW multiple alignment* (Higgins & Sharp, 1988; Higgins, 1994). Foram identificadas as zonas de homologia e pesquisadas regiões altamente conservadas que estivessem o mais próximo possível das extremidades 5´ e 3´ para desenho dos *primers* no sentido *forward* e *reverse*, respectivamente. Deste modo, foi assegurada a amplificação dum fragmento contendo a maior parte do gene *PMA1* nas diferentes espécies em estudo. Foram desenhados três *primers* degenerados (fornecidos por STAB Vida, Portugal): PMA1-FW-CORR (5´-CCIATY CARTTYGTYATGGA-3´), PMA1-REV1 (5´-GTRAYGAARATSARCCARTT-3´) e PMA1-REV2 (5´-CCAIGAWGGRATDGA DGACCA-3´).

O fragmento a amplificar com os *primers* seleccionados corresponde a cerca de 76% do gene (aproximadamente 2.100 pb, Apêndice III).

#### *Extracção de DNA*

O método de extracção de DNA das leveduras a estudar foi adaptado de Sambrook *et al.* (1989). Num tubo *ependorf* de 1,5 ml, com aproximadamente 200 µl de esferas de vidro (0,4-0,6 mm diâmetro) e 500 µl de tampão de lise (Apêndice I), obteve-se uma suspensão celular muito densa adicionando duas ansas de cultura fresca proveniente de meio sólido YM (Apêndice I). Para a lise das células, agitou-se fortemente a suspensão durante 4 min, seguida de incubação em banho a 65 °C durante 1 h. Em seguida, agitou-se durante 4 min e centrifugou-se durante 15 min a 13.000 rpm, à temperatura ambiente. Recuperou-se o sobrenadante (aprox. 500 µl), ao qual foi adicionado 1 vol de fenol a pH 8 (Apêndice I). Após agitação, as fases foram separadas por centrifugação, 15 min a 13.000 rpm, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo *ependorf*. A extracção fenólica foi repetida até desaparecer a interface esbranquiçada correspondente às proteínas. Ao último sobrenadante adicionou-se 1 vol da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agitou-se no *vortex*. Após centrifugação durante 15 min a 13.000 rpm, à temperatura ambiente, recolheu-se a fase aquosa. Adicionou-se 5M NaCl (concentração final 0,2 M) e 2 vol de etanol absoluto a -20 °C. Incubou-se o tubo a -20 °C durante pelo menos 30 min, podendo ficar durante a noite, para precipitação do DNA. Subsequentemente, centrifugou-se durante 30 min a 13.000 rpm (4 °C), lavou-se o precipitado duas vezes com etanol 70% v/v frio (-20 °C) retirando sobrenadante após centrifugação (5 min, 13.000 rpm, 4 °C). Deixou-se secar o precipitado que

foi, por fim, ressuspendido em 80 µl de água bidestilada estéril. Diluições (1:750) desta solução de DNA foram distribuídas em alíquotas de 100 µl e guardadas a -20 °C.

Todas as soluções e material usado em contacto com as células foram previamente esterilizados.

Para confirmação da integridade do DNA, foi realizada uma electroforese em gel de agarose 1% p/v em tampão 1X TAE utilizando 5 µl da solução de DNA extraído de cada estirpe.

### *Amplificação do gene PMA1*

Utilizando os três *primers* desenhados, foram optimizadas as condições de PCR para as leveduras não-*Saccharomyces*, utilizando *S. cerevisiae* PYCC 4455<sup>T</sup> como controlo positivo. Os *primers* PMA1-FW-CORR e PMA1-REV1 foram escolhidos por apresentarem amplificações mais consistentes.

Em cada tubo de reacção *ependorf* de 0,2 ml, foram adicionados os diferentes reagentes conforme indicado na Tabela 4.1. No tubo correspondente ao controlo negativo o DNA foi substituído por água bidestilada estéril. O programa de PCR (termociclador Uno II *Thermal Cycler*, Biometra) para amplificação do fragmento de *PMA1* consistiu numa desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos de uma desnaturação de 30 s a 95 °C, hibridação durante 1 min a 53 °C, extensão durante 2,5 min a 72 °C, e de uma extensão final de 7 min a 72 °C. O tempo de extensão foi escolhido tomando como referência 1 min por cada 1 kb e considerando um DNA molde com mais de 2 kb e a degenerescência dos *primers*.

Os produtos de amplificação foram obtidos por electroforese em gel de agarose (GIBco, BRL), revelado com brometo de etídio (Apêndice I). Aplicou-se o volume total de PCR (100 µl) de cada amostra num gel de 1% p/v agarose em TAE 0,5X (Apêndice I) com brometo de etídio incorporado. O marcador de pesos moleculares utilizado foi *GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus®* (Fermentas). Após electroforese a 50 V durante 45 min (*Horizontal Gel Electrophoresis System*, GIBco BRL), as bandas foram visualizadas num transiluminador (*Universal Hood II*, Bio-Rad) e as imagens captadas com o programa *Quantity One, 1-D Analysis Software*, V. 4.5.0 (Bio-Rad).

O fragmento pretendido, com cerca de 2,1 kb, foi excisado e transferido para tubo *ependorf* de 1,5 ml previamente pesado. O DNA foi purificado com o *kit* GFX PCR DNA – *Gel Band Purification* (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante, e quantificado por electroforese adicionando 1 µl de cada amostra, 2 µl de *loading buffer* (Apêndice I) e 9 µl de água bidestilada esterilizada. A electroforese decorreu durante 45 min a 50 V (*MINNIE Submarine, Mode HE33*, Hoefer Scientific Instruments).

**Tabela 4.1.** Mistura utilizada nas reacções de PCR para amplificação do fragmento *PMA1* com *primers* degenerados

Reagente	Concentração final	Volume
Tampão 10 X Taq	1X	10,0 µl
dNTPs (1,25 mM cada)	0,25 mM cada dNTP	20,0 µl
PMA1-FW-CORR (10 µM)	0,8 µM	8,0 µl
PMA1-Rev1 (10 µM)	0,8 µM	8,0 µl
DNA diluído 1:750	1:3750	20,0 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	10,0 µl
Taq polimerase (Fermentas)	1 U	1,2 µl
Água bidestilada	-	22,8 µl
		<b>Total: 100,0 µl</b>

### Clonagem e sequenciação

Procedeu-se primeiro à ligação do fragmento amplificado ao vector *pMOSBlue* (*pMOSBlue blunt ended cloning kit*, Amersham Pharmacia Biotech), seguindo as instruções do fabricante.

Para a clonagem, em cada tubo de 0,2 ml foram colocados 20 µl de células de *Escherichia coli* competentes, descongeladas lentamente em gelo durante cerca de 30 min, e adicionados 2 µl do produto da ligação. A mistura foi incubada 30 min em gelo, seguidos de choque térmico a 42 °C durante 40 s em banho termostatizado e, novamente, em gelo durante 2 min. Foram, então, adicionados 80 µl de meio SOC (Apêndice I) e a suspensão colocada a 37 °C durante 1 h com agitação orbital em Gallenkamp (200 rpm). A suspensão (100 µl) foi depois plaqueada em meio sólido LB + Amp<sup>100</sup> + Tet<sup>15</sup>, com 40 µl de X-Gal (20 mg/ml) e 4 µl de IPTG (200 mg/ml) (Apêndice I), previamente adicionados por espalhamento. As placas foram incubadas a 37 °C e os transformantes (colónias brancas) transferidos para tubos de 0,2 ml com 20 µl de água bidestilada estéril.

Para confirmação da presença do inserto pretendido no plasmídeo *pMOSBlue*, transformado em *E. coli*, utilizaram-se 2 µl da suspensão duma colónia branca em 20 µl de água bidestilada como molde para a reacção PCR (Tabela 4.2). O programa de PCR consistiu numa desnaturação inicial de 8 min a 94 °C, seguida de 36 ciclos de amplificação: desnaturação de 30 s a 94 °C, hibridação dos *primers* T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e U19 (5'-GTTTTCCCAGTCACGACGT-3') durante 30 s a 50 °C e extensão de 2 min a 72 °C. A extensão final decorreu 4 min a 72 °C. O produto total de PCR (10 µl) de cada colónia analisada foi confirmado por electroforese, utilizando o procedimento atrás descrito.

**Tabela 4.2.** Mistura utilizada nas reacções de PCR para confirmação da presença de inserto com 2,1 kb no plasmídeo *pMOSBlue*

Reagente	Concentração final	Volume
Tampão 10 X Taq	1X	1,0 µl
dNTPs (1,25 mM cada)	0,25 mM cada dNTP	2,0 µl
T7 (10 µM)	0,4 µM	0,4 µl
U19 (10 µM)	0,4 µM	0,4 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	0,6 µl
Taq polimerase (Fermentas)	0,8 U	0,1 µl
Suspensão celular	-	2,0 µl
Água bidestilada	-	3,5 µl
		Total: 10,0 µl

Confirmou-se a existência do inserto de tamanho esperado (2,1 kb) em quatro estirpes não-*Saccharomyces*: *C. pseudointermedia* PYCC 5788, *C. quercitrusa* PYCC 5789, *Candida* sp. nov. PYCC 5791 e *P. guilliermondii* PYCC 5784. Para *H. uvarum* PYCC 5782 e *P. mexicana* PYCC 5790 não se conseguiu obter transformantes, pelo que o trabalho prosseguiu com o produto de PCR purificado.

Para a extracção do DNA plasmídico, foram distribuídos 1,5 ml da cultura por tubos *ependorf* de 1,5 ml estéreis e centrifugou-se 2 min à velocidade máxima. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se ao sedimento 100 µl de Solução 1 - GET (Apêndice I). Ressuspendeu-se e colocou-se no gelo durante 5 min. De seguida, adicionou-se 200 µl de Solução 2 (Apêndice I), agitou-se o tubo por inversão e colocou-se novamente 5 min no gelo. Foram, então, adicionados 150 µl de Solução 3 (Apêndice I), agitou-se fortemente em *vortex* e conservou-se 5 min no gelo. Esta mistura foi centrifugada durante 5 min a 0 °C, e o sobrenadante resultante (cerca de 400 µl) foi transferido para novo *ependorf* estéril. Adicionou-se 2 vol (cerca de 800 µl) de etanol absoluto a -20 °C. Os tubos foram guardados a -20 °C durante no mínimo 1 h para o DNA plasmídico precipitar. Após precipitação, centrifugou-se 15 min a 14.000 rpm, 0 °C, e o sedimento, contendo o DNA plasmídico, foi lavado com 500 µl de etanol 70% v/v a -20 °C. Deixou-se secar o precipitado à temperatura ambiente e, de seguida, ressuspendeu-se em 25 µl de ddH<sub>2</sub>O. A solução de DNA foi conservada a -20 °C.

A sequenciação dos fragmentos de *PMA1* foi realizada para as seis leveduras estudadas. Para as quatro estirpes que foi possível obter clones e para as quais se confirmou a existência de inserto, procedeu-se à realização de PCR para sequenciação. Esta consistiu numa desnaturação inicial de 2 min a 95 °C, seguida de 26 ciclos de amplificação: desnaturação de 30 s a 95 °C, hibridação dos *primers* T7 e U19 marcados com o fluorocromo Cy5 (Amersham

Biosciences) durante 30 s a 50 °C, e extensão única de 45 s a 72 °C. As sequências dos *primers* usados estão indicadas na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3.** *Primers* usados na reacção de sequenciação do fragmento de *PMA1* para leveduras não-*Saccharomyces*

Designação	Espécie analisada	Sequência (5'→3')
PMA1-Fw-int-2	Cp, Cq, Csn, Pg	ACCTTCACTGGTAGAGCTCA
PMA1-Rev-int-3	Cp, Cq, Csn, Pg	TCTTGTCAGCATCGTAAATGT
PMA1-Rev-int-5	Cp, Cq, Csn, Pg	GAACACAAGATTTTCGACACCA
5791+57xxAFwd570	Cp, Cq, Csn, Pg	GCCTTCTTCAAAGATGGG
5791_AFrV660	Csn	CAGTCGGTTTGCCAGCTG
5791-Rev-int	Csn	CTTGTCAGCGTCGTAAATGTTAGT
5791-Rev-to-Start	Csn	CAGCTGGCAAACCGACTG
5791-fwd-to-End	Csn	CCCATCTTTGAAGAAGGC
578x-Rev-Start	Cq, Csn, Hu, Pg	GTAGAAACAAGCAACCCACACAA
578x-fwd-End	Cq, Csn, Hu, Pg	GGTATTATGCCTTGTATGGACCCTC
5782-90fwd873	Hu e Pm	CTTTTTTCCAAACCTACGGTAACTA
5782-5790-fwd1	Hu e Pm	GAAAAAAGGTTTGGATGCCATTGAT
5782+5790-Rev1	Hu e Pm	ATCAATGGCATCCAAACCTTTTTTTC
5782+5790-fwd2	Hu e Pm	TTATGCCATGTATGGATCCTCCAA
5782+5790-Rev2	Hu e Pm	TTGGAGGATCCATACATGGNATAA
5790-Rev-1A	Pm	AGAAACAAGCAACCCAGACAACCT

Abreviaturas: Cp, *C. pseudointermedia*; Cq, *C. quercitrusa*; Csn, *Candida* sp. nov.; Hu, *H. uvarum*; Pg, *P. guilliermondii*; Pm, *P. mexicana*.

A sequenciação do fragmento amplificado na reacção anterior foi realizada utilizando o *kit Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing* (RPN 2438/RPN2538, Amersham Biosciences) e um sequenciador automático ALF Express II (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. As sequências nucleotídicas das duas cadeias de DNA foram alinhadas entre si utilizando o programa informático *Alfwin Analyser* e comparadas com as existentes em bases de dados públicas (GenBank).

Foi possível obter aproximadamente 700 pb por cada reacção de sequenciação, pelo que foi necessário o desenho de vários *primers* à medida que se ia tendo conhecimento das sequências parciais para sequenciar o fragmento de cerca de 2,1 kb.



Como já se referiu, por terem falhado as tentativas de clonagem, foram os primeiros produtos de amplificação correspondentes às estirpes *H. uvarum* PYCC 5782 e *P. mexicana* PYCC 5790 que foram sequenciados (STAB Vida). Também esta sequenciação teve de avançar em fases, envolvendo diferentes *primers* decorrentes do conhecimento gradual das sequências parciais. As sequências foram obtidas para ambos os sentidos das cadeias de DNA.

#### 4.2.6. Construção de árvores filogenéticas

A análise das sequências proteicas de Pma1 deduzidas das sequências nucleotídicas obtidas neste trabalho foi feita utilizando *BLASTp* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), por comparação com as sequências disponíveis em bases de dados de Pma1p de diferentes leveduras e de fungos filamentosos. Fez-se o alinhamento múltiplo das sequências de P-ATPases dos organismos seleccionados usando o programa T-COFFEE (Notredame *et al.*, 2000). A árvore filogenética foi construída usando os programas PHYLIP, PROTDIST e NEIGHBOUR (desenvolvidos por Felsenstein, 2005). O desenho final da árvore foi obtido com o programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). A distância entre sequências foi determinada usando o método baseado na matriz JTT (Jones *et al.*, 1992), e testado o suporte estatístico da árvore filogenética obtida com uma análise *bootstrap* utilizando 1.000 réplicas.

Também se construiu uma árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene de rRNA 26S para o mesmo conjunto de espécies fúngicas cujas sequências de Pma1p foram investigadas. O alinhamento das sequências de DNA foi realizado com o programa ClustalW (Higgins & Sharp, 1988; Higgins, 1994). A árvore filogenética foi obtida com o programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) usando o método *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987). As distâncias entre sequências foram determinadas usando o modelo *Kimura 2-parameter* (K2P) (Kimura, 1980), e testado o suporte estatístico da árvore filogenética obtida com uma análise *bootstrap* utilizando 10.000 réplicas.

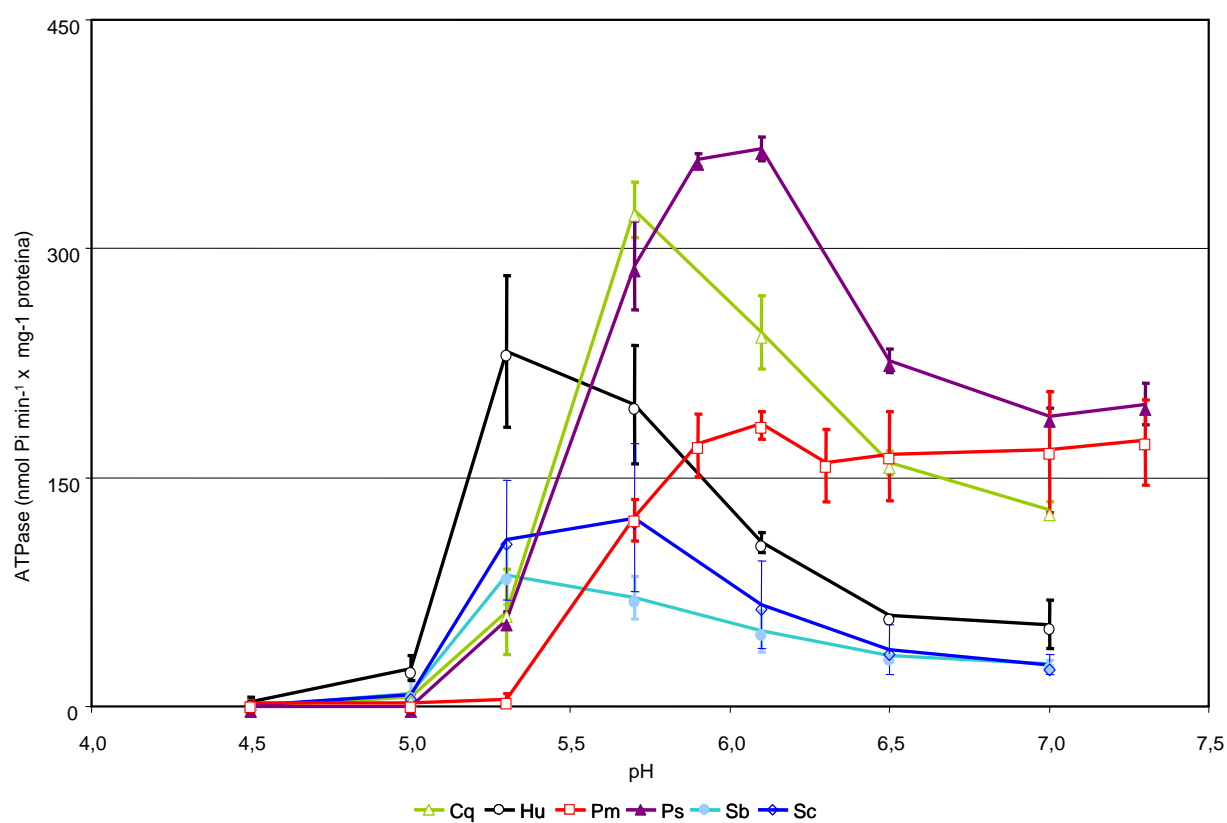
### 4.3. Resultados e discussão

#### 4.3.1. Influência do pH e etanol na actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática

Como descrito no capítulo anterior, leveduras com maior capacidade fermentativa (*S. cerevisiae* e *S. bayanus*) apresentaram, em média, uma actividade ATPásica mais baixa do que a das espécies que apresentaram produção de etanol mais fraca. Esta observação parece contrariar a hipótese de uma correlação entre a capacidade de produzir etanol e a eficiência da ATPase. Sabendo que o etanol activa a ATPase da membrana plasmática em *S. cerevisiae* (Rosa & Sá-Correia, 1991) e em *P. stipitis* (Meyrial *et al.*, 1995b), colocou-se a hipótese de haver um limiar máximo da actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática e que esse limiar fosse atingido com uma menor concentração de etanol para as leveduras com menor capacidade fermentativa. Para estudar esta possibilidade, foi decidido avaliar o efeito do etanol na actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática.

Tendo sido observado que em *S. cerevisiae* e *P. stipitis* o pH óptimo para a actividade da ATPase da membrana plasmática é significativamente diferente (Figuras 4.2 e 4.3), foi em primeiro lugar determinado o valor de pH óptimo para seis leveduras: três isoladas neste trabalho, *C. quercitrusa* PYCC 5789, *H. uvarum* PYCC 5782 e *P. mexicana* PYCC 5790, e as restantes para comparação (*P. stipitis* PYCC 4374<sup>T</sup>, *S. bayanus* PYCC 4890 e *S. cerevisiae* PYCC 4072). A selecção das espécies teve em conta o apresentarem diferentes actividades de H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática (ver Tabela 3.11), assim como diferentes capacidades fermentativas (Figura 3.3).

A actividade ATPásica foi determinada nas suspensões membranares totais em função do pH da reacção, à temperatura de 30 °C com uma concentração de ATP 2 mM. Os resultados obtidos mostraram que os valores de pH óptimo variam com a levedura (Figura 4.6) e que se situam na gama entre 5,3 e 6,1, tendo o valor mais baixo sido encontrado para *H. uvarum* e para *S. bayanus*, enquanto que as ATPases de *P. stipitis* e de *P. mexicana* mostraram uma actividade mais elevada a valores próximos de 6,1. Os valores de pH óptimos foram mais ou menos bem pronunciados para todas as leveduras (Figura 4.6), com excepção de *P. mexicana*, para a qual a actividade da ATPase se manteve aproximadamente constante entre pH 5,9 e pH 7,3. A actividade ATPásica máxima também variou com a levedura, atingindo valores entre 85,8 nmol P<sub>i</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> proteína (*S. bayanus*) e 365,5 nmol P<sub>i</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> proteína (*P. stipitis*).



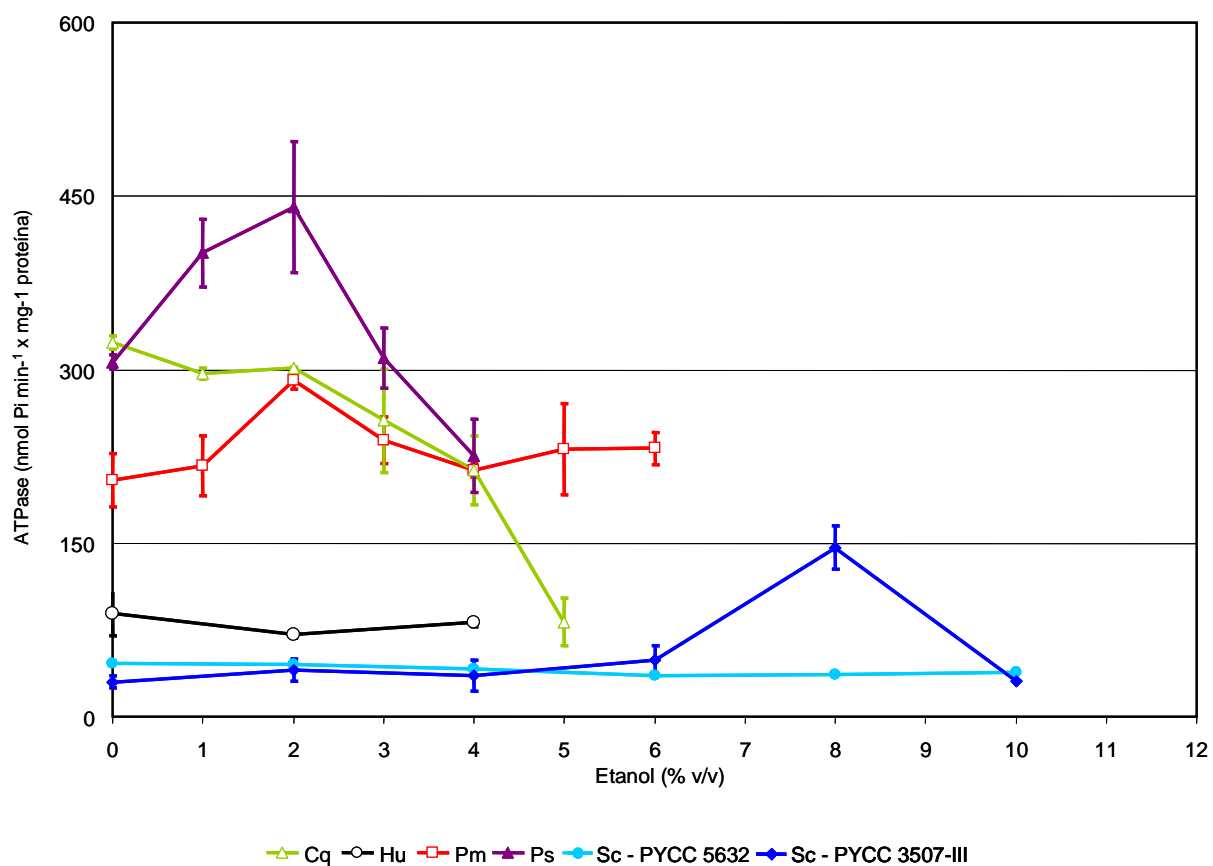
**Figura 4.6.** Influência do pH na actividade específica da  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática das leveduras seguintes: Cq - *C. quercitrusa* PYCC 5789; Hu - *H. uvarum* PYCC 5782; Pm - *P. mexicana* PYCC 5790; Ps - *P. stipitis* PYCC 4374<sup>T</sup>; Sb - *S. bayanus* PYCC 4890; e Sc - *S. cerevisiae* PYCC 4072. Condições de ensaio: 30 °C, [ATP] = 2 mM. Os dados obtidos representam a média de dois ou mais ensaios (culturas independentes), sendo cada ensaio realizado em duplicado.

Actividades ATPásicas semelhantes ou superiores a  $200 \text{ nmol P}_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína, em condições de pH óptimo, foram observadas em *C. quercitrusa*, *H. uvarum* e *P. mexicana*. Estes resultados corroboram os obtidos a pH 5,7 (ver Capítulo 3), pois mais uma vez os valores mais baixos foram evidenciados por estirpes de *Saccharomyces*.

Nas suspensões membranares totais ensaiadas estão presentes, para além da ATPase da membrana plasmática, as ATPases associadas à membrana mitocondrial e vacuolar (Serrano, 1978; Goffeau & Boutry, 1986; Uchida *et al.*, 1988). A contribuição das duas últimas para a actividade medida na suspensão membranares foi, contudo, minimizada pela adição de inibidores específicos (azida sódica e nitrato de potássio) à mistura de reacção (ver Tabela 3.1). Foi também utilizado um inibidor (molibdato de amónio) das fosfatases ácidas na tentativa de eliminar, ou pelo menos minimizar, a sua contribuição para a actividade total.

A possibilidade do etanol estimular a actividade ATPásica foi investigada a valores de pH óptimo para cada levedura (Figura 4.7): *C. quercitrusa* PYCC 5789 - pH 5,7; *H. uvarum* PYCC 5782 - pH 5,4; *P. mexicana* PYCC 5790 - pH 6,0; *P. stipitis* - PYCC 4374<sup>T</sup> - pH 6,0; e *S. cerevisiae* PYCC 5632 e *S. cerevisiae* PYCC 3507-III - pH 5,7 (Rosa & Sá-Correia, 1991; Viegas & Sá-Correia, 1991). Nos ensaios para a determinação do efeito do etanol na actividade específica da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática foram usadas as fracções membranares extraídas de células de levedura cultivadas na presença de etanol na gama de concentrações que permitiram crescimento. Assim, para *C. quercitrusa* PYCC 5789 determinou-se a actividade ATPásica entre 0 e 5% v/v etanol; para *H. uvarum* PYCC 5782 entre 0 e 4% v/v etanol; para *P. mexicana* PYCC 5790 entre 0 e 6% v/v etanol; para *P. stipitis* PYCC 4374<sup>T</sup> entre 0 e 5% v/v etanol; e para *S. cerevisiae* (PYCC 4072 e PYCC 3507-III) entre 0 e 10% v/v etanol adicionado ao meio de cultura. As outras condições foram idênticas às utilizadas para a determinação da actividade ATPásica sem adição de etanol ao meio e descritas no Capítulo 3 (3.2.2.), excepto a temperatura de crescimento que foi de 16 °C em vez de 30 °C. Optou-se por esta temperatura pelas razões já apontadas no estudo sobre a capacidade de produção de etanol e efeito deste na perda de viabilidade celular (ver Capítulo 3).

A análise dos resultados do estudo sobre a influência do etanol na actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática das leveduras estudadas revelou três grupos: i) um grupo para o qual não se verificou activação na presença de etanol - *H. uvarum* PYCC 5782 e *S. cerevisiae* PYCC 5632; ii) um segundo grupo de leveduras que exibiram activação da ATPase - *P. mexicana* PYCC 5790, *P. stipitis* PYCC 4374<sup>T</sup> e *S. cerevisiae* PYCC 3507-III; e iii) um grupo singular que



**Figura 4.7.** Efeito do etanol adicionado ao meio de cultura na actividade específica da  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática das leveduras seguintes: Cq - *C. quercitrusa* PYCC 5789; Hu - *H. uvarum* PYCC 5782; Pm - *P. mexicana* PYCC 5790; Ps - *P. stipitis* PYCC 4374<sup>T</sup>; e Sc - *S. cerevisiae* PYCC 3507-III e PYCC 4072. Condições de ensaio: 16 °C, [ATP] = 2 mM. Os dados obtidos representam a média de dois ou mais ensaios (culturas independentes), sendo cada ensaio realizado em duplicado.

---

inclui a única levedura para a qual se observou redução de actividade da ATPase com o aumento da concentração de etanol no meio de cultura - *C. quercitrusa* PYCC 5789.

No presente estudo não se encontraram valores para a actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Figuras 4.6 e 4.7) tão elevados como os referidos noutros trabalhos. A actividade determinada variou entre cerca de 30 (Figura 4.7) e 120 nmol P<sub>i</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> proteína (Figura 4.6), enquanto que outros autores referem valores de 100 a 200 nmol P<sub>i</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> proteína (Serrano, 1983; Rosa & Sá-Correia, 1991; Viegas & Sá-Correia, 1991). Deve ser salientado que, para a preparação das fracções membranares totais, as células foram desintegradas através de uma forte agitação durante oito períodos de 1 min, processo semelhante ao referido por Serrano (1983). As condições de desintegração (apenas 2 min) utilizadas por Rosa & Sá-Correia (1991) proporcionaram valores mais elevados para a actividade específica da ATPase da membrana plasmática mas menores rendimentos em proteína (3,1 vs. 6,7 mg proteína ml<sup>-1</sup>).

Apesar de não se terem observado actividades tão elevadas como as referidas por outros, verificou-se que a percentagem de activação variou com a estirpe e até, num dos casos, foi um pouco maior neste estudo. Assim, enquanto que Rosa & Sá-Correia (1991) determinaram um valor da actividade da ATPase, para concentrações na gama dos 6-8% v/v, quase triplo do verificado na ausência de etanol, no presente trabalho houve uma activação de cerca de 4,8 vezes quando *S. cerevisiae* PYCC 3507-III foi activada na presença de 8% v/v etanol.

O pH óptimo para a actividade específica da H<sup>+</sup>-ATPase de *P. stipitis* PYCC 4374<sup>T</sup> situou-se entre 5,9 e 6,1, tendo sido decidido realizar os ensaios com quantidades crescentes de etanol no meio de cultura a um pH de 6,0. A actividade ATPásica obtida na ausência de etanol foi de cerca de 300 nmol P<sub>i</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> proteína. A adição de 1 e de 2% v/v de etanol ao meio de crescimento activou a H<sup>+</sup>-ATPase, tendo sido obtida uma actividade 1,5 vezes superior na presença de 2% etanol v/v em relação à actividade encontrada quando não foi adicionado etanol ao meio de cultura. Outros autores observaram actividades em *P. stipitis* PYCC 4374<sup>T</sup> de aproximadamente 400 nmol P<sub>i</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> proteína (Meyrial *et al.*, 1995a). Estes autores, no entanto, observaram que o pH óptimo se situava entre 7,3 e 7,5, embora tenham utilizado uma temperatura de ensaio de 35 °C (Meyrial *et al.*, 1995a), em contraste com os 30 °C usados no presente trabalho. O mesmo grupo (Meyrial *et al.*, 1995b) verificou que a actividade ATPásica da membrana plasmática de *P. stipitis*, determinada a pH 6,5, duplicou na presença de 1% p/v etanol, resultados semelhantes ao deste estudo. Como não foram usadas concentrações

---

superiores a 2% p/v etanol, não é possível comparar com o decréscimo obtido na actual investigação (Figura 4.7).

A adição de etanol ao meio de crescimento de *H. uvarum* PYCC 5782 não revelou activação da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática a pH 5,4. De notar que a valores de pH mais ácidos se observa uma queda brusca da actividade (Figura 4.6). À semelhança do observado neste trabalho, também Alexandre & Charpentier (1994) não obtiveram qualquer activação da H<sup>+</sup>-ATPase da espécie anamórfica de *H. uvarum*, *Kloeckera apiculata*, quando adicionaram etanol ao meio de crescimento. No entanto, estes autores obtiveram uma actividade específica de H<sup>+</sup>-ATPase de cerca de 7.000 nmol P<sub>i</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> proteína em *K. apiculata*, muito superior, embora em condições experimentais diferentes (35 °C; pH 6,0; 4 mM ATP). Uma nota curiosa foi a da actividade a pH óptimo e 0% v/v etanol ser cerca de 2,6 vezes mais baixa quando se cultivou a levedura a 16 °C e pH 5,4 (88,9 ± 18,9 nmol P<sub>i</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> proteína; Figura 4.7) relativamente aos valores obtidos a 30 °C e pH 5,3 (233 ± 49,6 nmol P<sub>i</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> proteína; Figura 4.6), o que sugere que a H<sup>+</sup>-ATPase de *H. uvarum* é mais sensível à temperatura de crescimento do que a das outras leveduras isoladas neste trabalho. Como já foi referido, é possível que o mesmo aconteça com *S. cerevisiae* PYCC 3507-III.

Para as restantes leveduras não se observaram diferenças relevantes entre as actividades ATPásicas (30 °C, pH óptimo) após crescimento a 16 °C, sem adição de etanol ao meio de cultura, e após crescimento a 30 °C, o que não é de estranhar pois as diferenças entre os valores de pH utilizados nas várias reacções (entre 5,4 e 6,0) não divergem muito do valor padronizado de pH 5,7 utilizado nos primeiros ensaios (ver Capítulo 3).

A actividade específica da H<sup>+</sup>-ATPase de *C. quercitrusa* PYCC 5789 a pH 5,8 não evidenciou qualquer activação em células cultivadas na presença de etanol. Pelo contrário, a partir de 3% e até 5% v/v etanol, observou-se um abaixamento abrupto da actividade da ATPase da membrana plasmática. Esta levedura foi a que exibiu maior reprodutibilidade nos valores da actividade desta enzima nas diferentes condições testadas neste trabalho.

A actividade específica da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática de *P. mexicana* PYCC 5790 foi activada em cerca de 1,4 vezes a pH 6,0 e com 2% v/v de etanol no meio de cultura (204 nmol P<sub>i</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> proteína na ausência de etanol vs. 290 nmol P<sub>i</sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> proteína). Este máximo não é, no entanto, estatisticamente significativo. É interessante verificar que *P. mexicana*, uma levedura que não produzira mais do que 1,7% p/v etanol (ver Tabela 3.3),

apresentou um bom crescimento em concentrações mais elevadas de etanol (até 6% v/v etanol), e que a ATPase se mantém activa até esses valores.

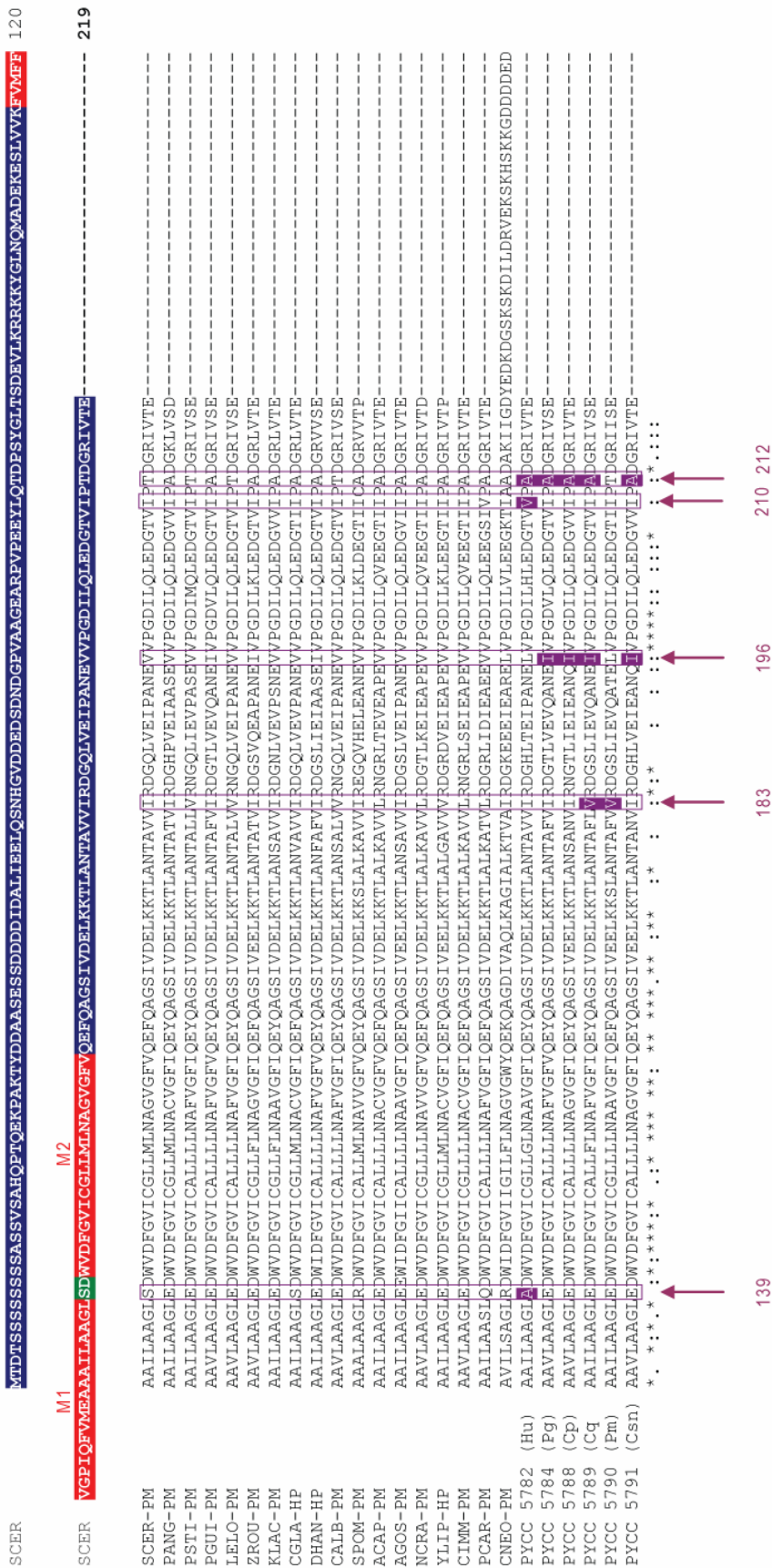
Os resultados obtidos contrariam a hipótese de existir um limiar máximo de actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática em leveduras, mas apontam para que a actividade desta enzima não determine a capacidade máxima de produção de etanol pela levedura nas condições experimentais ensaiadas.

#### 4.3.2. Sequências de *PMA1* e análise comparativa

No decurso deste trabalho foram obtidas sequências dum fragmento do gene *PMA1*, homólogas do gene que codifica a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática em *S. cerevisiae*, para seis das espécies isoladas de produtos frutícolas: *C. pseudointermedia* PYCC 5788, *C. quercitrusa* PYCC 5789, *Candida* sp. nov. PYCC 5791, *H. uvarum* PYCC 5782, *P. guilliermondii* PYCC 5784 e *P. mexicana* PYCC 5790. O fragmento sequenciado tem cerca de 2.100 pb, que corresponde a aproximadamente 76% da sequência do gene conhecido *PMA1* em *S. cerevisiae* (2.757 pb) (Serrano *et. al.*, 1986).

As sequências putativas dos aminoácidos nos polipéptidos foram deduzidas por tradução *in silico* dos fragmentos de DNA sequenciados. Com base na sequência conhecida do gene *PMA1* de *S. cerevisiae*, os aminoácidos foram alinhados para as Pma1p putativas das diferentes espécies de leveduras analisadas usando o programa T-COFFEE (<http://www.igs.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>). A Figura 4.8 apresenta esse alinhamento que inclui também diferentes espécies de leveduras e fungos filamentosos cujos genes se encontram disponíveis em bases de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O alinhamento mostra que a Pma1p é uma proteína muito conservada, o que é consistente com os dados da literatura (Serrano *et al.*, 1986). De facto, de um total de 634 aminoácidos alinhados (correspondentes a 69% da proteína Pma1p), 360 (57%) são iguais nas 24 proteínas alinhadas. Dos restantes, 130 (21%) são similares, verificando-se nessas posições a existência de alternância entre unicamente dois aminoácidos. De um modo geral, parece poder concluir-se que: i) existe uma maior variabilidade em aminoácidos da região proteica localizada no exterior da célula, não se observando aminoácidos iguais aos de *S. cerevisiae* nas outras 23 espécies analisadas (região marcada a verde na Figura 4.8); ii) se detecta um maior grau de conservação em aminoácidos correspondentes aos domínios transmembranares (M1 a M7); e iii) se observa grande heterogeneidade inter-específica nos aminoácidos situados na porção





**Figura 4.8.** Alinhamento dos aminoácidos das proteínas putativas obtidas por tradução dos fragmentos dos genes homólogos a *PMA1* comparando com a sequência de *PMA1* de *S. cerevisiae* e de outras leveduras e fungos filamentosos disponíveis em bases de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). HP – Proteína hipotética; PM – Proteína da membrana plasmática. Abreviaturas: ACAP, *Aspergillus capsulatus*; AGOS, *Ashbya gossypii*; CALB, *Candida albicans*; CGLA, *Candida glabrata*; CIMM, *Coccidioides immitis*; CNEO, *Cryptococcus neoformans*; DHAN, *Debaryomyces hansenii*; KLAC, *Kluyveromyces lactis*; LELO, *Lodderomyces elongisporus*; NCRA, *Neurospora crassa*; PANG, *Pichia angusta*; PCAR, *Pneumocystis carinii*; PGUI, *Pichia guilliermondii*; PSTI, *Pichia stipitis*; SCER, *Saccharomyces cerevisiae*; SPOM, *Schizosaccharomyces pombe*; YLIP, *Yarrowia lipolytica*; ZROU, *Zygosaccharomyces rouxii*. Leveduras em que o fragmento do gene *PMA1* foi sequenciado no decurso deste trabalho: *Hanseniaspora uvarum* PYCC 5782; *Pichia guilliermondii* PYCC 5784; *Candida pseudointermedia* PYCC 5788; *Candida quercitrusa* PYCC 5789; *Pichia mexicana* PYCC 5790 e *Candida* sp. nov. PYCC 5791. Na 1ª linha do alinhamento apresenta-se a sequência de *S. cerevisiae* onde se assinala o modelo da topologia da proteína (Morsomme et al., 2000). Azul - Domínios citoplasmáticos; Verde - Domínios extracelulares; e Vermelho - Domínios transmembranares (M1 a M10). Roxo: diferenças comentadas no texto. A numeração do aminoácido indicada corresponde à sequência correspondente de *S. cerevisiae*. A verde está assinalado o aminoácido aspartato em três das leveduras. O asterisco (\*) significa que diferentes nas duas estirpes de *Pichia guilliermondii*. A verde está assinalado o aminoácido conservado; e um ponto (.) assinala as substituições semi-conservadas. Os aminoácidos são idênticos; dois pontos (:) indicam as substituições conservadas; e um ponto (.) assinala as substituições semi-conservadas.





FHPFDPVSKKVTAVVESP... SCER -PM  
FHPFDPVSKKVTAVVESP... PANG -PM  
FHPFDPVSKKVTAVVESP... PSTI -PM  
FHPFDPVSKKVTAVVESP... PGUI -PM  
FHPFDPVSKKVTAVVESP... LELO -PM  
FHPFDPVSKKVTAVVESP... ZROU -PM  
FHPFDPVSKKVTAVVESP... KLAC -PM  
FHPFDPVSKKVTAVVESP... CGLA -HP  
FHPFDPVSKKVTAVVESP... DHAN -HP  
FHPFDPVSKKVTAVVESP... CALB -PM  
FHPFDPVSKKVTAVVESP... SPOM -PM  
FHPFDPVSKKVTAVVESP... AGOS -PM  
FHPFDPVSKKVTAVVESP... NCRA -PM  
FHPFDPVSKKVTAVVESP... YLIP -HP  
FHPFDPVSKKVTAVVESP... PCAR -PM  
FHPFDPVSKKVTAVVESP... CNEO -PM  
PYCC 5782 (Hu)  
PYCC 5784 (Pg)  
PYCC 5788 (Cp)  
PYCC 5789 (Cq)  
PYCC 5790 (Pm)  
PYCC 5791 (Csm)

TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... SCER  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... SCER -PM  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... PANG -PM  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... PSTI -PM  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... PGUI -PM  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... LELO -PM  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... ZROU -PM  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... KLAC -PM  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... CGLA -HP  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... DHAN -HP  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... CALB -PM  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... SPOM -PM  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... AGOS -PM  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... NCRA -PM  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... YLIP -HP  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... CMM -PM  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... PCAR -PM  
TCRQLGLGTNIYNAERLGLGG... CNEO -PM  
PYCC 5782 (Hu)  
PYCC 5784 (Pg)  
PYCC 5788 (Cp)  
PYCC 5789 (Cq)  
PYCC 5790 (Pm)  
PYCC 5791 (Csm)

Figura 4.8. (continuação)



---

citoplasmática, com domínios muito conservados, nomeadamente nos locais susceptíveis de fosforilação e de ligação do ATP.

No alinhamento (Figura 4.8), a espécie *P. guilliermondii* está representada por duas estirpes: uma cujo genoma sequenciado é público (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e a estirpe isolada neste trabalho (PYCC 5784). Curiosamente, verifica-se que de entre os 634 aminoácidos analisados, apenas três diferem nas duas estirpes (caixa amarela na Figura 4.8). Destes três aminoácidos, dois encontram-se em regiões da proteína no exterior da célula (posições 321 e 715), que apresentam maior variabilidade entre as 24 proteínas comparadas, o outro (posição 746) situa-se no *loop* intracelular entre os domínios transmembranares M6 e M7, numa zona onde também se observa uma maior variabilidade entre as diferentes espécies analisadas. As diferenças entre as duas estirpes são as seguintes: na posição 321 há substituição de alanina por prolina em PYCC 5784, ambos aminoácidos não-polares e neutros; na posição 715 há substituição de lisina por arginina, ambos aminoácidos polares e básicos; e na posição 746 a alanina (aminoácido não-polar e neutro) é substituída em PYCC 5784 por ácido glutâmico (polar e ácido). É bem possível que as diferenças encontradas não se reflectam em alterações estruturais significativas. No entanto, seria interessante proceder a um estudo bioquímico comparativo das H<sup>+</sup>-ATPases das duas estirpes e investigar se eventuais características diferenciais se relacionam com os aminoácidos referidos.

Vários estudos têm incidido sobre a estrutura da proteína e a função dos aminoácidos de Pma1p, essencialmente em *S. cerevisiae*. Dos 918 aminoácidos que constituem a H<sup>+</sup>-ATPase Pma1p, mais de 200 já foram alterados e as proteínas daí resultantes estudadas, nomeadamente quanto ao efeito no crescimento ou na actividade ATPásica (Morsomme *et al.*, 2000). A análise do efeito de duas mutações simultâneas revelou que muitos dos efeitos de uma dada mutação podem ser revertidos por outra, mesmo que por vezes numa posição distante (Morsomme *et al.*, 2000).

Com base no alinhamento dos fragmentos correspondentes a Pma1p putativas foram pesquisadas as diferenças nas sequências proteicas, como primeiro contributo para estabelecer uma relação entre estas diferenças e as variações nas características bioquímicas observadas na H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática das diferentes leveduras estudadas. A análise comparativa com *S. cerevisiae* revelou alguns aspectos surpreendentes. Certas mutações que se tem demonstrado ser lesivas para o desempenho da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática em *S. cerevisiae*, ou mesmo letais para a célula, foram encontradas nas sequências putativas das proteínas homólogas de Pma1p das espécies em estudo. A análise

---

específica destas alterações é apresentada de seguida, sendo organizada por aminoácido e posição da mutação com reconhecido efeito fenotípico em *S. cerevisiae*.

**Serina 139:** Seto-Young *et al.* (1994) estudaram em *S. cerevisiae* o efeito da mutação em Pma1p da serina situada na posição 139 (S139) para alanina (A) e ácido glutâmico (E). Segundo estes autores, a substituição da S139 provocou uma redução da actividade da H<sup>+</sup>-ATPase em ambas as situações, verificando-se que a substituição por A tinha efeitos mais drásticos do que por E e conduzia a actividades inferiores a 30% da original. A análise do fenótipo de crescimento destes mutantes de *S. cerevisiae* revelou que S139A apresentava crescimento muito fraco a pH 2,5 (o que pode ser sinal da incapacidade da H<sup>+</sup>-ATPase para regular o pH intracelular), ao contrário da estirpe selvagem e do mutante S139E, sendo este último ligeiramente afectado na mesma característica. Curiosamente, a mutação S139E, e ao contrário da S139A, tornou o mutante resistente a Higromicina B e resultou numa incapacidade da célula em manter o potencial de membrana (Perlin *et al.*, 1988). Como se pode observar na Figura 4.8, encontrou-se A139 na Pma1p de *H. uvarum* PYCC 5782 e E139 foi a forma mais comum encontrada entre as espécies analisadas. Sabendo que a alanina (A) é um aminoácido hidrofóbico e a serina (S) é um aminoácido hidrofílico, é possível que haja pequenas deslocações da proteína no espaço transmembranar (ver Figura 4.1) e, conseqüentemente, influência na actividade ATPásica. Seria interessante testar o efeito duma mutação A139S na actividade da H<sup>+</sup>-ATPase de *H. uvarum*.

**Isoleucina 183:** Soteropoulos & Perlin (1998) verificaram que a substituição da isoleucina 183 por valina (I183V) reduz, em *S. cerevisiae*, a actividade de hidrólise do ATP pela Pma1p para 14%, mantendo no entanto o crescimento a pH baixo e a sensibilidade à Higromicina B semelhantes aos da estirpe selvagem. Encontrou-se V183 em duas das espécies cujas Pma1p foram sequenciadas neste trabalho, *C. quercitrusa* PYCC 5789 e *P. mexicana* PYCC 5790, para além de se observar também em *C. albicans* e *P. stipitis*. Esta alteração poderá não ser muito relevante porque são aminoácidos com propriedades semelhantes (alifáticos, hidrofóbicos e neutros).

**Valina 196:** Wang *et al.* (1996) concluíram que a substituição da valina 196 por isoleucina (V196I) na Pma1p de *S. cerevisiae* corresponde a uma mutação letal dominante. Contudo, encontrou-se a isoleucina na posição 196 (I196) na H<sup>+</sup>-ATPase de *P. guilliermondii* (ambas as estirpes), *C. pseudointermedia* PYCC 5788, *C. quercitrusa* PYCC 5789 e *Candida* sp. nov. PYCC 5791. Aparece ainda em outras duas espécies, *D. hansenii* e *Z. rouxii*. De salientar que

---

tanto valina como isoleucina são aminoácidos alifáticos, hidrofóbicos e neutros, e não é previsível que a sua substituição cause uma alteração significativa de fenótipo.

*Isoleucina 210*: Wang *et al.* (1996) também estudaram mutações diversas na I210 que, segundo os autores, se situa numa região da proteína Pma1p muito tolerante a mutações. A substituição da isoleucina 210 por valina (I210V) provou, no entanto, ser também letal dominante em *S. cerevisiae*. Curiosamente, encontrou-se V210 em *H. uvarum* PYCC 5782.

*Treonina 212*: O efeito da substituição de treonina 212 por alanina (T212A) foi ainda estudado por Wang *et al.* (1996). O mutante produzido não foi significativamente afectado na resistência a Higromicina B e na actividade da H<sup>+</sup>-ATPase, mas apresentou uma redução do tempo de duplicação a 24 °C e 37 °C em cerca de 20%. A alanina na posição 212 existe na grande maioria das proteínas analisadas, como se pode ver na Figura 4.8, com excepção de *P. mexicana* PYCC 5790 que apresentou T212.

*Glicina 328*: Ambesi *et al.* (1996) estudaram a substituição da glicina 328 por alanina (G328A) em Pma1p de *S. cerevisiae* e verificaram que o mutante obtido exibia redução da actividade ATPásica da membrana plasmática e do transporte de prótons em, aproximadamente, 30% relativamente à estirpe selvagem. Curiosamente, de entre todas as sequências analisadas, *S. cerevisiae* é a única espécie com a posição 328 ocupada por G. As restantes proteínas Pma1p têm A328, com excepção de *C. neoformans* que apresenta isoleucina nesta posição. De salientar que A, G e I são aminoácidos com propriedades semelhantes.

*Glicina 648*: A substituição da glicina 648 por serina foi estudada por Eraso & Portillo (1994). Segundo estes autores, G648S provoca um aumento do valor de  $V_{max}$  e uma redução do valor de  $K_m$  da H<sup>+</sup>-ATPase relativamente à estirpe selvagem de *S. cerevisiae*. O efeito foi mais pronunciado em células incubadas na ausência de glucose. Em ambas as situações (presença ou ausência de glucose), o mutante G648S apresentou um desvio do pH óptimo para valores mais altos relativamente à estirpe selvagem. Encontrou-se S648 unicamente em *C. quercitrusa* PYCC 5789. Será interessante investigar se a presença de serina por troca de G648 está relacionada com a actividade elevada da ATPase em *C. quercitrusa* quando comparada com a maioria das leveduras. No entanto, a actividade também é elevada em *P. stipitis* (Figura 4.7), levedura com G648 na Pma1p (Figura 4.8).

*Serina 690*: Dutra *et al.* (1998) verificaram que a substituição da serina 690 por alanina provocava no mutante de *S. cerevisiae* um aumento em 25% na hidrólise de ATP e em 20% no

transporte de H<sup>+</sup>, relativamente aos valores obtidos para a estirpe selvagem. No presente estudo, é de notar que a presença de A690 na Pma1p parece corresponder a uma maior actividade ATPásica (Figuras 4.7 e 4.8).

A H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática de leveduras pode alternar entre duas configurações principais, E1 e E2, e a hidrólise de ATP envolve a formação transiente de um intermediário fosforilado (Goffeau & Slayman, 1981; Serrano, 1988; Nakamoto & Slayman, 1989). Estes dois aspectos do funcionamento da H<sup>+</sup>-ATPase plasmática constituem a base do acoplamento entre a hidrólise de ATP e o transporte de protões. A formação do intermediário β-aspartil-fosfato ocorre após a ligação da molécula de ATP ao centro catalítico da enzima. Este localiza-se na posição 378 e é um aminoácido-chave e altamente conservado em todas as P-ATPases.

É de realçar a presença do aminoácido aspartato na posição 392 apenas nas leveduras *C. quercitrusa*, *N. crassa* e *P. stipitis* (Ref<sup>a</sup> ABN64423 de *GenBank*). Curiosamente, estes organismos apresentam actividades ATPásicas elevadas (Figura 4.7; Hager *et al.*, 1986), praticamente o dobro da actividade encontrada nas outras espécies estudadas. Esta relação de valores poderá indicar uma conformação diferente do centro catalítico. Para testar esta hipótese, poder-se-ia recorrer a estudos estruturais *in silico* e/ou a mutagénese dirigida, alterando o aminoácido E392 em *S. cerevisiae* para D392 e determinando o efeito da mutação na actividade ATPásica.

Para além das substituições apontadas, os alinhamentos revelaram a existência em *H. uvarum* PYCC 5782 de um aminoácido suplementar entre as posições 588 e 589 (numeração de *S. cerevisiae*). Este aminoácido situa-se no *loop* intracelular entre os domínios transmembranares M4 e M5. Apesar de não se terem observado mais casos de aminoácidos suplementares entre os 634 aminoácidos analisados, o alinhamento das sequências completas de aminoácidos correspondentes aos poucos genes *PMA1* totalmente conhecidos revela que, mais próximo das extremidades N- e C-terminal (zonas menos conservadas das proteínas), existem vários exemplos de outras ATPases com mais um ou dois aminoácidos suplementares numa dada posição (resultados não apresentados).

### 4.3.3. Avaliação de relações filogenéticas

Como já foi referido, a genómica comparativa pode ajudar a entender a evolução molecular e ter uma utilidade preditiva quanto à função de proteínas agrupadas por elevada homologia.



---

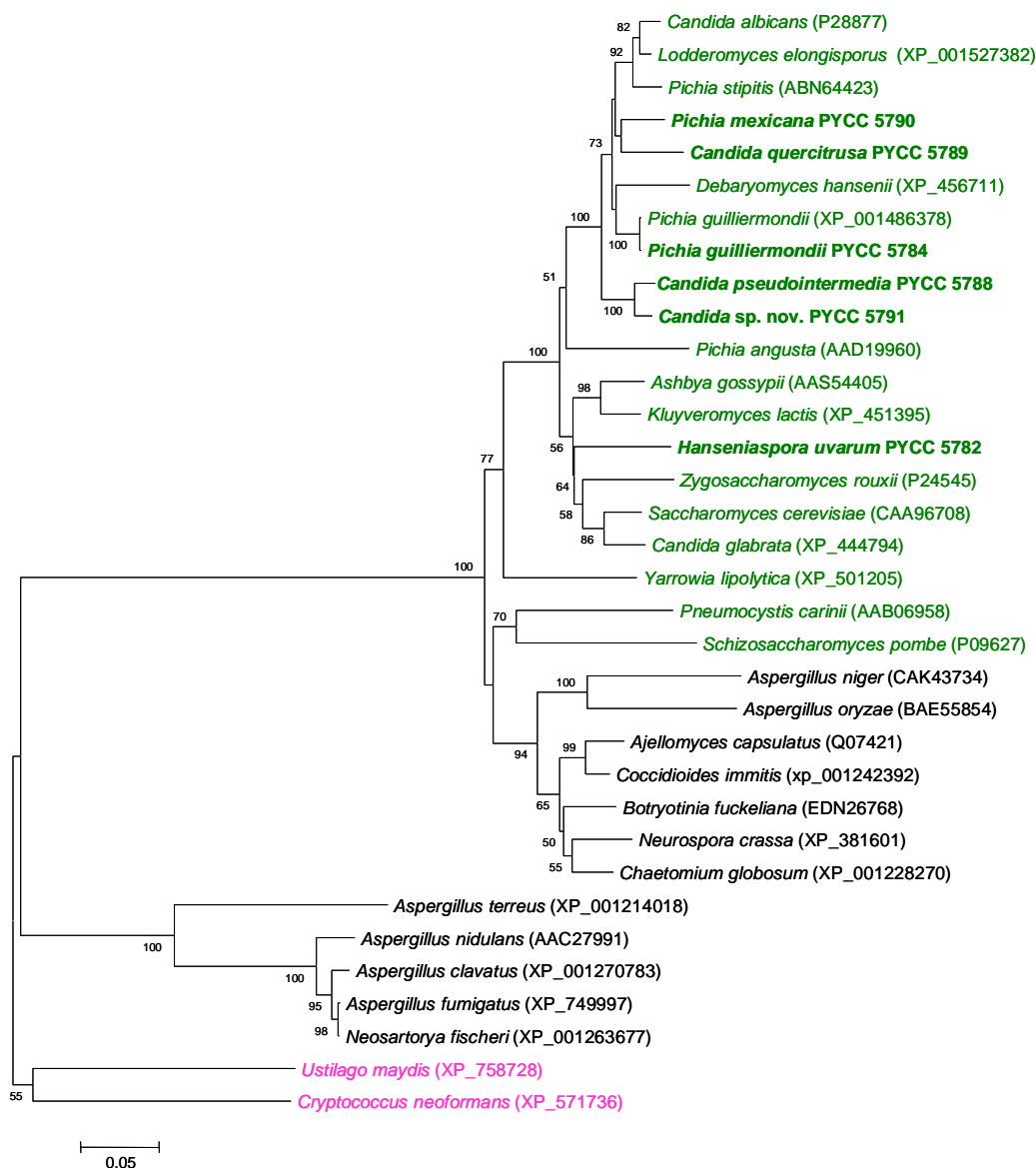
Pode contribuir também para melhor compreender até que ponto as alterações de aminoácidos nas proteínas investigadas poderão corresponder a diferenças nas características fenotípicas observadas.

Obtidas as sequências parciais (634 aminoácidos) da proteína Pma1 para as diferentes espécies analisadas neste estudo, foi avaliada se esta proteína fundamental para a célula poderia servir como base para avaliar relações filogenéticas. Com vista a essa avaliação, foi construída uma árvore filogenética (Figura 4.9) a partir da análise de sequências proteicas. Para além das Pma1p putativas das leveduras alvo de estudo, foram também incluídas sequências de Pma1p de leveduras ascomicetas e basidiomicetas assim como as de alguns fungos filamentosos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Esta árvore filogenética foi desenhada constituindo como *outgroup* os organismos *Cryptococcus neoformans* e *Ustilago maydis*. Como termo de comparação, utilizou-se a árvore filogenética construída a partir das sequências D1/D2 do rDNA 26S (Figura 4.10) para o mesmo conjunto de espécies fúngicas, constituindo como *outgroup* os mesmos organismos.

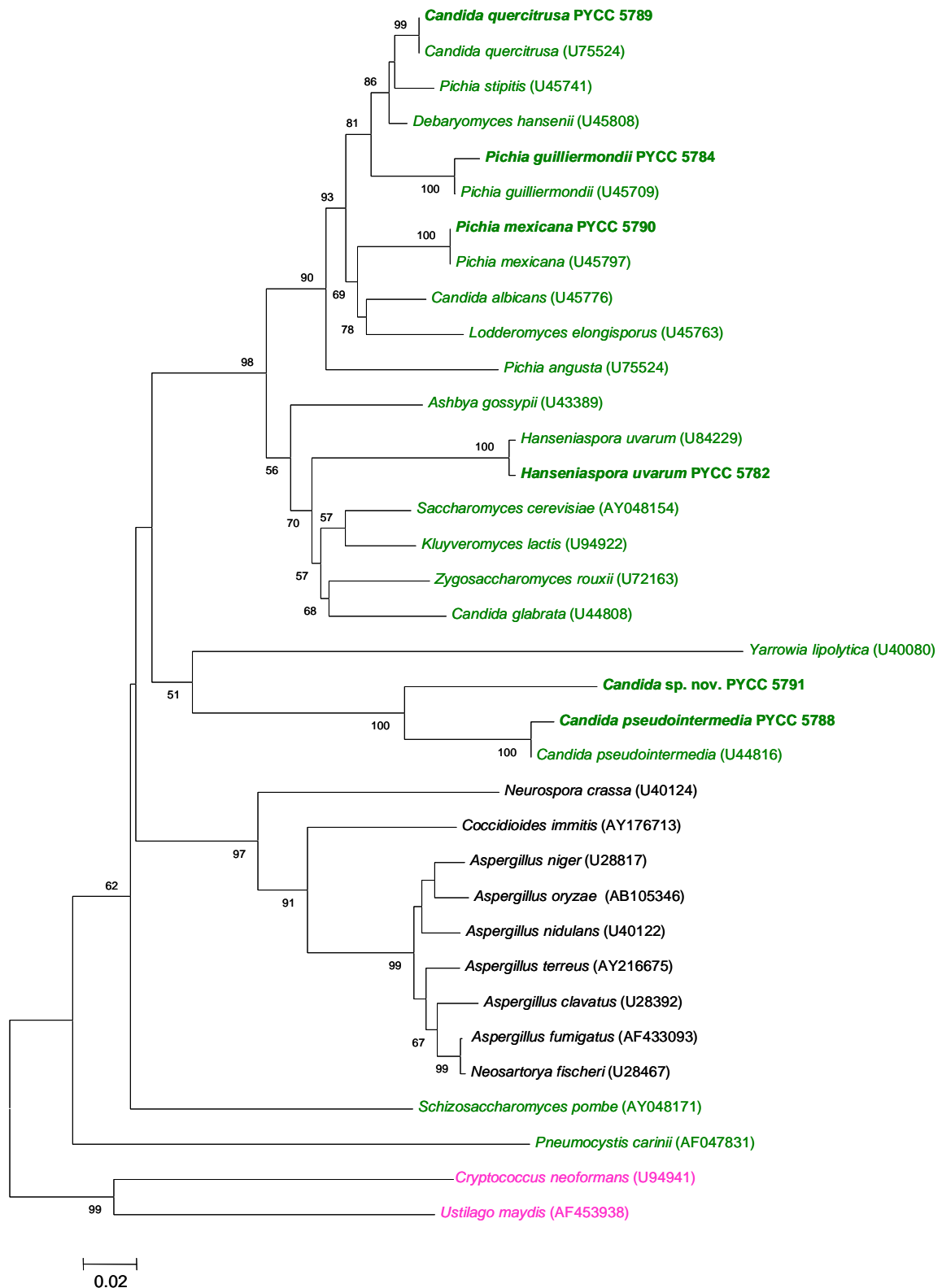
As sequências PMA1 das leveduras analisadas neste trabalho ficaram agrupadas entre as leveduras ascomicetas (Figura 4.9), distribuídas por dois *clusters*. As proteínas Pma1 das estirpes de *Candida* e de *Pichia* num dos grupos e a Pma1p de *H. uvarum* PYCC 5782 no grupo mais relacionado com *S. cerevisiae*. Este último grupo engloba as leveduras Crabtree-positivas *S. cerevisiae*, *Z. rouxii* e *C. glabrata*. Num sub-grupo deste grupo encontra-se *Ashbya gossypii* e *Kl. lactis*. A este propósito, vale a pena assinalar que embora *Kl. lactis* seja reconhecida como levedura Crabtree-negativa (de Deken, 1966; Gancedo & Serrano, 1989), há autores que a referem como capaz de fermentação alcoólica aeróbia (Mulder *et al.*, 1995; Wésolowski-Louvel *et al.*, 1996).

É curioso observar que, com base na sequência do fragmento de Pma1p, *C. pseudointermedia* PYCC 5788 e *Candida* sp. nov. PYCC 5791 estão muito próximas. Como se viu no Capítulo 2, *Candida* sp. nov. PYCC 5791 é considerada uma espécie nova, e a espécie mais próxima é *C. pseudointermedia*. *P. guilliermondii* (XP\_001486378) e *P. guilliermondii* PYCC 5784 possuem Pma1p com homologia muito elevada, o que seria de esperar, pois pertencem à mesma espécie.

Fazendo uma análise comparativa da árvore baseada nas sequências de Pma1p com a árvore construída a partir das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S das espécies analisadas (Figura 4.10), poder-se-á, numa primeira abordagem, afirmar que a



**Figura 4.9.** Árvore filogenética baseada na análise das sequências proteicas putativas derivadas das sequências nucleotídicas de H<sup>+</sup>-ATPases da membrana plasmática. A robustez da árvore, obtida pelo método *Neighbor-Joining* (distância baseada em matriz JTT), foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1.000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 locais. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente. Código de cores: rosa, leveduras basidiomicetas; preto, fungos filamentosos ascomicetas; verde, leveduras ascomicetas; negrito, sequências determinadas neste estudo.



**Figura 4.10.** Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S. A robustez da árvore, obtida pelo método *Neighbor-Joining* (distância: K2P), foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 10.000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente. Código de cores: rosa, leveduras basidiomicetas; preto, fungos filamentosos ascomicetas; verde, leveduras ascomicetas; negrito, sequências determinadas neste estudo.

H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática confirma, na sua maioria, as relações filogenéticas conhecidas e o gene *PMA1* é potencialmente útil para inferir sobre a evolução das espécies. O grupo para o qual a capacidade de diferenciação através do fragmento sequenciado de *PMA1* parece não ser tão boa como a das sequências D1/D2 é o grupo que inclui *P. mexicana* e *C. quercitrusa*. A sequência proteica aponta para uma relação próxima entre estas duas espécies (Figura 4.9), enquanto a região D1/D2 do gene ribossômico as demarca claramente (Figura 4.10). Sabendo que as sequências de Pma1p utilizadas para construir a árvore correspondem apenas a 634 aminoácidos (para um total de 918 aminoácidos em *S. cerevisiae*), é possível que a sequência completa do gene conduza a um maior poder de resolução inter-específica.

## **CAPÍTULO 5**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS**



## 5.1. Considerações finais

Apesar de há muito se ter conhecimento de que as leveduras com capacidade fermentativa variam imenso na produção de etanol a partir de glucose, o hidrato de carbono mais facilmente fermentável, poucos estudos existem dedicados a compreender as bases fundamentais para essas diferenças. *Saccharomyces cerevisiae*, a protagonista de processos fermentativos industriais como a panificação, vinificação, indústria cervejeira e produção de bioetanol, destaca-se de todas as outras leveduras pela velocidade com que fermenta e pela concentração máxima de etanol que pode atingir. O interesse crescente noutras leveduras fermentativas, para produção de etanol a partir de inulina, xilose ou celobiose, entre vários substratos que se foram tornando economicamente apelativos, chamou a atenção dos investigadores para a fraca eficiência de outras espécies de leveduras que naturalmente demonstravam capacidade para fermentar açúcares inacessíveis a *S. cerevisiae* mas que, na sua maioria, são relativamente lentas a produzir etanol e produzem-no em concentrações que não ultrapassam 6% v/v. Alguns grupos têm-se debruçado sobre esta questão que, todavia, continua longe de ser elucidada. O interesse em contribuir para o esclarecimento gradual dos mecanismos que determinam as limitações referidas motivou o presente trabalho.

### *Leveduras isoladas de produtos frutícolas*

Para a selecção de leveduras com capacidades fermentativas diferenciadas, a utilizar nos estudos subsequentes, poder-se-ia ter recorrido ao conhecimento disponível na literatura da especialidade e a uma colecção de culturas. Optou-se, no entanto, por proceder ao seu isolamento a partir de produtos frutícolas comuns (ananás, banana, maçã, manga, meloa, papaia, pêsego e uva), mas na sua maior parte pouco explorados para o fim em vista. Não se conhecem mesmo trabalhos que incidam na ocorrência de leveduras em banana, manga, meloa, papaia ou pêsego. Deve ainda salientar-se que o procedimento experimental adoptado para o isolamento não confere significado estatístico aos resultados, pois apenas foi amostrado um pedaço de cada peça de fruta com uma única proveniência e houve um pré-enriquecimento de 24 a 48 h em água antes do isolamento. O objectivo não foi o de alcançar dados significativos quanto à ocorrência de leveduras em cada uma das frutas amostradas e/ou diversidade de espécies em cada uma. Esta fase do trabalho visou essencialmente a obtenção de leveduras com diferentes capacidades fermentativas e o desenvolvimento de sondas específicas para a sua identificação directa pelo método FISH. Esses objectivos foram alcançados. Feita esta ressalva, são a seguir salientados alguns aspectos dos resultados obtidos.

As leveduras isoladas foram primeiro identificadas por métodos convencionais, fenotípicos. O número de testes utilizado foi manifestamente insuficiente para se chegar a uma identificação fidedigna ao nível da espécie. Após identificação molecular, através da sequenciação da região D1/D2 do gene do rRNA 26S, verificou-se que apenas para 10% dos isolados, os pertencentes a *H. uvarum* ou a *P. mexicana*, os resultados da identificação molecular coincidiam com a da fenotípica. Cerca de 75% das leveduras que colonizavam a superfície da fruta amostrada eram ascomicetas (todas fermentativas), uma supremacia nítida em relação às de afinidade basidiomiceta. A meloa e a maçã foram as que deram origem a um número mais reduzido de colónias, numa abundância relativa de cerca de quatro ordens de grandeza inferior à encontrada em várias outras frutas. Quatro tipos de fruta originaram culturas puras: banana (*C. quercitrusa*), manga (*Ps. antarctica*, identidade não confirmada por métodos moleculares), papaia (*C. parapsilosis*) e uva preta (*H. uvarum*). A maior diversidade de leveduras foi encontrada na meloa e no pêssigo, cada uma dando origem a três espécies pertencentes a três géneros diferentes. As leveduras basidiomicetas ocorreram apenas na manga, meloa e pêssigo, neste em clara minoria (3%). Tanto na manga como na meloa foram detectadas apenas leveduras basidiomicetas. Enquanto na manga *Ps. antarctica* apareceu como cultura pura, na meloa, para além da mesma espécie de *Pseudozyma*, também surgiu uma levedura do género *Cryptococcus* e *Rhodospiridium/Rhodotorula* foi a levedura dominante (48%). A serem confirmados, estes resultados merecem ser investigados com maior profundidade, pois é natural que se relacionem com a composição destas frutas e com a presença de compostos mais passíveis de serem utilizados como fontes de C e/ou N por basidiomicetas e/ou com a existência de inibidores do crescimento de ascomicetas. Surpreendentemente, na uva branca não se verificou a ocorrência de leveduras apiculadas que costumam predominar neste ambiente, embora na uva preta a espécie apiculada *H. uvarum* fosse a única encontrada. Aliás, esta espécie, juntamente com *C. pseudointermedia*, *C. quercitrusa* e *P. guilliermondii* foram as isoladas com maior frequência no conjunto das frutas amostradas. É também de referir o isolamento de *P. mexicana*, uma levedura nunca antes referida como ocorrendo neste tipo de *habitat*, a partir de papaia e de pêssigo. Um dos isolados parece corresponder a uma espécie nova de *Candida*. Esta levedura deverá ser alvo de atenção especial no futuro para a sua classificação.

Uma parte deste trabalho foi dedicada ao desenvolvimento de um método molecular para a detecção e identificação de leveduras directamente na fruta natural, evitando recorrer à sua cultura e isolamento prévios. A técnica implementada foi a hibridação *in situ* com sondas de DNA fluorescentes (FISH). Foram desenhadas, validadas com estirpes referência, e aplicadas quatro sondas oligonucleotídicas específicas, complementares das zonas alvo



localizadas na região D1/D2 do rRNA 26S, para as leveduras mais frequentemente isoladas de fruta neste trabalho. Embora a acessibilidade dos locais de hibridação se revista, geralmente, de particular importância para obter sinais de fluorescência mais intensos que facilitam a detecção e identificação das células, para duas das leveduras (*C. quercitrusa* e *P. guilliermondii*), foi preciso escolher locais aparentemente menos acessíveis para que as sondas possibilitassem uma identificação específica. O método mostrou ser adequado para a identificação de *H. uvarum* e/ou *P. guilliermondii* em amostras naturais de uvas, ananás e maçã. Houve, no entanto, grande discrepâncias com os resultados dos isolamentos realizados no início. Essas inconsistências poderão ser justificadas pelos números baixos de células na fruta, variações na proveniência e sazonalidade da fruta, assim como pela existência de fragmentos de tecidos e estruturas vegetais na observação directa, que dificultam a detecção de células de leveduras.

Para estudos subsequentes foram seleccionadas sete das leveduras isoladas: *C. pseudointermedia* PYCC 5788, *C. quercitrusa* PYCC 5789, *Candida* sp. nov. PYCC 5791, *H. uvarum* (PYCC 5782 e PYCC 5783), *P. guilliermondii* PYCC 5784 e *P. mexicana* PYCC 5790.

#### *Capacidade fermentativa e sua relação com a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática*

Para uma comparação das leveduras quanto ao seu comportamento fermentativo foram escolhidos dois parâmetros: a concentração máxima de etanol atingida em condições de semi-anaerobiose e com concentração elevada de glucose, para que esta não se tornasse limitante para a produção de etanol; e as velocidades de fermentação/respiração avaliados com o método manométrico de Warburg.

A produção de etanol pelas diferentes leveduras nas condições ensaiadas atingiu um amplo espectro de concentrações, variando entre 1,7±0,1% p/v (*P. mexicana*) e 14,8±0,3% p/v (*S. cerevisiae*). Para a maior parte das espécies, as concentrações obtidas rondaram valores de 6±2% p/v etanol, o que está em consonância com o que se sabe para o número reduzido de espécies não-*Saccharomyces* para as quais estes valores são conhecidos. Excepcional foi o comportamento de *H. uvarum*, a levedura que mais se aproximou de *S. cerevisiae*, produzindo 11-12% p/v etanol. Estes valores ultrapassam significativamente os referidos na literatura para esta espécie. As diferenças poderão ser explicadas pelas diferentes condições experimentais utilizadas e/ou por diferenças nas características tecnológicas das estirpes.

As mesmas experiências forneceram dados sobre os coeficientes de rendimento em etanol, variando pouco os valores encontrados (0,43 - 0,52). Esta semelhança de valores deriva de se ter verificado que a concentração máxima de etanol era inversamente proporcional à

concentração de glucose residual, *i.e.*, quando deixaram de produzir etanol as leveduras também deixaram de consumir glucose.

Em contraste com a heterogeneidade de valores encontrados para a concentração de etanol alcançada pelas várias leveduras analisadas, as velocidades de fermentação e de respiração não variaram de forma tão acentuada. Em comparação com *S. cerevisiae* e com *S. bayanus*, e de acordo com o expectável, as espécies isoladas apresentaram taxas específicas de fermentação cerca de 50% mais baixas e um consumo de oxigénio aproximadamente duas vezes superior. A única excepção foi, novamente, *H. uvarum*. Não só fermentou a taxas mais próximas das obtidas para *Saccharomyces*, apenas 10 a 30% reduzidas, como também exibiu velocidades de respiração mais elevadas do que qualquer outra das leveduras estudadas. Isto significa que o metabolismo desta levedura foi, nas condições ensaiadas, o mais rápido de todos os investigados, com um aumento de 20 a 30% em relação aos valores determinados para *Saccharomyces*. Será interessante estudar se esta levedura possui sistemas de transporte para glucose particularmente eficientes, superiores aos conhecidos para *Saccharomyces*.

Como se pretendia dispor de um método simples e rápido para avaliar a tolerância ao etanol das diferentes leveduras, com o objectivo de poder vir a comparar as que pudessem vir a ser melhoradas por manipulação genética em termos de produção de etanol, foram realizados estudos do efeito combinado do etanol e da temperatura na viabilidade das leveduras seleccionadas. Uma boa capacidade de diferenciação entre espécies foi conseguida com o binómio 20% v/v etanol/16 °C. A espécie que pior resistiu a estas condições foi *H. uvarum* (PYCC 5782 e PYCC 5783). No outro extremo, situou-se *S. cerevisiae*. O grupo de resistência intermédia inclui *S. bayanus* e todas as restantes leveduras não-*Saccharomyces*. Apesar do melhoramento de espécies não ter seguido por diante, o método que se aplicou poderá constituir um instrumento útil em trabalho futuro.

É habitualmente reconhecido que, em *S. cerevisiae*, a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática funciona abaixo da sua capacidade máxima, o que é interpretado como um modo de evitar que a célula consuma energia desnecessariamente. Porém, esta enzima membranar desempenha um papel crítico na fisiologia de leveduras, sendo fundamental para a regulação do pH intracelular. A sua actividade não só é essencial para viabilizar crescimento celular como também limita a velocidade desse crescimento (Serrano, 1988). Assim, a activação da bomba H<sup>+</sup>-ATPase poderá surgir em resposta a sinais metabólicos e em resultado de agressões ambientais que possam conduzir a uma absoluta necessidade da célula em activar a H<sup>+</sup>-ATPase com vista a contrariar a sua acção. É exemplo desse tipo de agressões a presença de etanol, que estimula o influxo de protões para dentro da célula. A grande eficiência de *Saccharomyces* na produção de etanol, relativamente às

---

não-*Saccharomyces*, levou à hipótese inicial de que *Saccharomyces* teria uma maior actividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática e essa maior actividade se traduziria numa bomba de protões mais eficiente, que contrariasse o efeito do etanol. Para responder a esta questão foram determinadas as actividades da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática nas diferentes espécies de levedura isoladas no presente estudo, assim como em *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. Ao contrário do que se esperava, a actividade da H<sup>+</sup>-ATPase foi, em média, significativamente mais baixa em *Saccharomyces* do que em não-*Saccharomyces*. Por exemplo, *P. mexicana*, aparentemente com fraca capacidade para produzir etanol, apresentou uma actividade cerca de quatro vezes superior à duma estirpe vínica de *S. cerevisiae*. De notar também que uma das estirpes de *S. cerevisiae* testada exibiu uma actividade muito semelhante ao valor da actividade encontrado para uma estirpe de *H. uvarum*. A possibilidade de haver um limiar máximo de actividade ATPásica e que este limiar seja atingido com concentrações de etanol mais baixas para as leveduras com actividade mais alta, foi a hipótese a seguir colocada. O efeito do etanol na actividade ATPásica foi avaliado a valores de pH óptimo para cada uma das leveduras alvo de estudo: três das leveduras isoladas neste trabalho (*C. quercitrusa* PYCC 5789, *H. uvarum* PYCC 5782 e *P. mexicana* PYCC 5790) e três leveduras usadas como termo de comparação (*P. stipitis* PYCC 4374<sup>T</sup>, *S. bayanus* PYCC 4890 e *S. cerevisiae* PYCC 4072). Os resultados obtidos vieram contrariar a hipótese referida, mas ampliaram o conhecimento no que respeita à actividade ATPásica de leveduras não-*Saccharomyces* e demonstraram que a activação da H<sup>+</sup>-ATPase pelo etanol não é um fenómeno generalizado. Quando ocorreu, essa activação nunca foi superior a 20-30%, o que contraria os dados conhecidos para *S. cerevisiae*.

No seu conjunto, os resultados dos estudos fisiológicos e bioquímicos apontam para que sejam diversos os mecanismos-chave que determinam o limite máximo para a produção de etanol por uma levedura específica. Assim, as possibilidades de recombinação genética para melhoramento variariam também com a espécie. No caso de *H. uvarum*, uma levedura que poderá fermentar tão depressa quanto estirpes de *Saccharomyces* e também é capaz de fermentação aeróbia (Crabtree-positiva), é possível que se atinjam rapidamente concentrações de etanol conducentes à perda de viabilidade celular. A levedura deixa de produzir etanol porque morre. Quais as razões para esta morte celular? Esta questão terá de ser esclarecida no futuro. Não se descarta a hipótese de uma H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática mais eficiente (mesma capacidade de extrusão de protões para uma menor actividade e, portanto, o mesmo trabalho com menor custos energéticos) poder vir a melhorar ligeiramente a capacidade fermentativa desta levedura, aparentemente já adaptada a ambientes com elevadas concentrações de açúcar mas que perde no confronto

com *Saccharomyces*. Para as outras leveduras não-*Saccharomyces* investigadas neste trabalho, as razões para o seu fraco comportamento fermentativo parecem ser outras. São, aparentemente, todas Crabtree-negativas, o que significa que o metabolismo fermentativo é estritamente regulado pelo oxigénio disponível. No entanto, em condições anóxicas o metabolismo cessa completamente e, portanto, deixam também de fermentar. Actividades ATPásicas muito elevadas, e eventualmente pouco eficientes em termos de bomba de prótons, poderão contribuir para dispêndios de energia maiores, penalizando a produção de biomassa. Para produzirem mais etanol (quanto?), seria necessário que as condições de cultura incluíssem uma permanente tensão de oxigénio baixa. Também é possível que para algumas leveduras a pressão osmótica elevada, devida à concentração de açúcar utilizada, seja um factor negativo adicional.

Vale a pena assinalar as diferenças que foram encontradas entre *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. Quer com a combinação 11% v/v etanol/30°C quer com 20% v/v etanol/16°C, esta última espécie perdeu a capacidade de se multiplicar com uma cinética semelhante à das espécies não-*Saccharomyces* (com excepção de *H.uvarum*), e em oposição ao que foi observado para *S. cerevisiae*. Enquanto nas primeiras condições esse comportamento não surpreende, pois *S. bayanus* tem uma temperatura máxima de crescimento consideravelmente mais baixa do que *S. cerevisiae* e próxima de 30 °C, já não era esperado para o segundo conjunto de condições pois sabe-se que, em regra, *S. bayanus*, suporta melhor concentrações um pouco mais elevadas de etanol. Seria interessante aprofundar, no futuro, este aspecto.

### *O gene PMA1 e sua utilidade para o estabelecimento de relações filogenéticas*

Foram dados os primeiros passos para uma caracterização molecular da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática das leveduras não-*Saccharomyces* seleccionadas para este estudo. A amplificação de um fragmento de genes homólogos ao gene *PMA1*, que codifica a H<sup>+</sup>-ATPase em *S. cerevisiae*, serviu de base para uma análise comparativa das sequências putativas dos polipéptidos (aminoácidos, representando cerca de 70% da proteína Pma1p) deduzidas por tradução *in silico* dos fragmentos sequenciados. No decorrer da investigação, foi conhecida a sequência do genoma de *P. guilliermondii*, o que permitiu uma comparação com a estirpe isolada na primeira fase do trabalho.

Os fragmentos obtidos apresentaram um grau de homologia muito elevado, estando as regiões mais variáveis localizadas no domínio extracelular. Verificou-se a presença de um aminoácido aspartato na posição 392 (estirpe referência *S. cerevisiae*) nas leveduras que apresentavam as actividades ATPásicas mais elevadas, o dobro da actividade encontrada na maior parte das outras espécies seleccionadas. Esta relação de valores encontrada

poderá indicar uma variação ao nível do centro catalítico. Fica a curiosidade de avaliar qual o efeito duma mutação E392D na actividade ATPásica de *S. cerevisiae* e, no contexto dos objectivos do estudo presente, se se observasse um aumento significativo da actividade determinar a influência deste aumento na capacidade de produção de etanol.

A comparação da árvore filogenética obtida a partir de sequências proteicas putativas, deduzidas das sequências nucleotídicas, parecem confirmar, na sua grande maioria, as relações filogenéticas baseadas nas sequências da região D1/D2 do gene da subunidade 26S do rRNA. Estes resultados apontam para que o gene *PMA1* seja um marcador genético adequado para a identificação ao nível da espécie e para ser incluído em estudos de evolução molecular.

## 5.2. Perspectivas

Este projecto teve início com o intuito último de fazer uma tentativa para melhorar a capacidade fermentativa, i.e., produzir mais etanol e mais rapidamente, duma levedura que tivesse esta característica fraca. Este grande objectivo não foi atingido, mas foram obtidos resultados que contribuem para que ele se possa vir a consumir no futuro.

Para além de aspectos mais específicos e que têm vindo a ser referidos ao longo desta dissertação, ficou por aprofundar os que se relacionam com a velocidade de fermentação. O controlo exercido pela velocidade de entrada de açúcar fermentável na célula de levedura é elevado quando o substrato se encontra presente em abundância. Estão identificados e sequenciados os genes que codificam transportadores de glucose e/ou frutose em *Saccharomyces* e em algumas outras leveduras fermentativas. São também conhecidos os parâmetros cinéticos das reacções mediadas pelas proteínas transportadoras e os mecanismos de transporte respectivos. Como perspectiva para o futuro, é de tentar melhorar a produtividade das fermentações alcoólicas através da sobre-expressão de genes de transportadores de hexoses (e.g. *HXT*), assim retirando vantagem do papel do transporte no controlo do fluxo metabólico.

À luz dos dados obtidos no trabalho aqui descrito, oxigénio, temperatura, osmolaridade, H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática e transportadores de glucose/frutose são, portanto, factores a merecer particular atenção em investigações futuras sobre o tema que se abordou.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**





- Addison, R., Scarborough, G. A. 1981. Solubilization and purification of the *Neurospora crassa* H<sup>+</sup>-ATPase deduced from gene sequence. *J. Biol. Chem.* **261**: 14896-14901.
- Agbogbo, F. K., Coward-Kelly, G., Torry-Smith, M., Wenger, K. S. 2006. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochemistry* **41**: 2333-2336.
- Aguilera, A., Benitez, T. 1986. Ethanol sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **143**: 337-344.
- Alexandre, H., Charpentier, C. 1994. The plasma membrane ATPase of *Kloeckera apiculata*: purification, characterization and effect of ethanol on activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 704-708.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Miller, W., Lipman D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Amann, R. I., Fuchs, B. M., Behrens, S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. *Cur. Opin. Biotechnol.* **12**: 231-236.
- Amann, R. I., Lin, C., Key, R., Montgomery, L., Stahl, D. A. 1992. Diversity among *Fibrobacter* isolates: towards a phylogenetic classification. *System. Appl. Microbiol.* **15**: 23-31.
- Amann, R. I., Ludwig, W. 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 555-565.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Ambesi, A. Miranda, M., Petrov, V. V., Slayman, C. W. 2000. Biogenesis and function of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Experim. Biol.* **203**: 155-160.
- Ambesi, A., Pan, R. L., Slayman, C. W. 1996. Alanine-scanning mutagenesis along membrane segment 4 of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol.Chem.* **271**: 22999-23005.
- Amory, A., Foury, F., Goffeau, A. 1980. The purified plasma membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe* forms a phosphorylated intermediate. *J. Biol. Chem.* **255**: 9353-9357.
- Amory, A., Goffeau, A. 1982. Characterization of the  $\beta$ -aspartyl phosphate intermediate formed by the H<sup>+</sup>-translocating ATPase from the yeast *Schizosacchamyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **257**: 4723-4730.
- Arias, C. R., Burns, J. K., Friedrich, L. M., Goodrich, R. M., Parish, M. E. 2002. Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1955-1961.
- Arras, G., Scherm, B., Migheli, Q. 2002. Improving biocontrol activity of *Pichia guillermondii* against post-harvest decay of oranges in commercial packing-houses by reduced concentrations of fungicides. *Biocontrol Sci. Technol.* **12**: 547-553.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P., Steitz, T. A. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**: 905-920.
- Bandoni, R. J. 1987. Taxonomic overview of the Tremellales. *Stud. Mycol.* **30**: 87-110.
- Barnett, J. A. 1997b. Introduction: a historical survey of the study of yeasts. *In* *Yeast Sugar Metabolism*. F. K. Zimmermann, K. D. Entian (Eds.), pp 1-33. Technomic Publishing, Switzerland.
- Barnett, J. A., Entian, K. D. 2005. A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast* **22**: 835-894.
- Barnett, J., Payne, R., Yarrow, D. 1994. Yeast identification PC Program, Version 4. Norwich, U.K.
- Barnett, J., Payne, R., Yarrow, D. 2003. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 4<sup>th</sup> edition, Cambridge University Press. Cambridge, UK.

- Bassetti, M., Righi, E., Costa, A., Fasce, R., Molinari, M. P., Rosso, R., Pallavicini, F. B., Viscoli, C. 2006. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect. Dis.* **6**: 21-26.
- Beaven, M. J., Charpentier, C., Rose, A. H. 1982. Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1447-1455.
- Benito, B., Portillo, F., Lagunas, R. 1992. *In vivo* activation of the plasma membrane ATPase during nitrogen starvation. Identification of the regulatory domain that controls activation. *FEBS Lett.* **300**: 271-274.
- Bisson, L. F. 1999. Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* **50**: 107-119.
- Boekhout, T., Fonseca, Á., Sampaio, J. R., Golubev, W. I. 1993. Classification of heterobasidiomycetous yeasts: characteristics and affiliation of genera to higher taxa of heterobasidiomycetes. *Can. J. Microbiol.* **39**: 276-290.
- Borst-Pauwels, G. W. F. H., Peters, P. H. J. 1977. Effect of the medium pH and the cell pH upon the kinetical parameters of phosphate uptake by yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **466**: 488-495.
- Bowman, B. J., Blasco, F., Slayman, C. W. 1981. Purification and characterization of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **256**: 12343-12249.
- Bowman, B. J., Slayman, C. W. 1979. The effect of vanadate on the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **254**: 2928-2934.
- Cabeça-Silva, C., Madeira-Lopes, A., van Uden, N. 1985. The temperature profiles of growth, thermal death and ethanol tolerance of the cellobiose-fermenting yeast *Candida wickerhamii*. *J. Basic Microbiol.* **25**: 221-224.
- Capieux, E., Vignais, M. L., Sentenac, A., Goffeau, A. 1989. The yeast H<sup>+</sup>-ATPase gene is controlled by the promotor binding factor TUF. *J. Biol. Chem.* **264**: 7437-7446.
- Cardoso, H., Leão, C. 1992. Mechanisms underlying the low and high enthalpy death by short-chain monocarboxylic acids and ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 388-392.
- Carmelo, V., Santos, H., Sá-Correia, I. 1997. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1325**: 63-70.
- Chanchaichaovivat, A., Ruenwongsa, P., Panijpan, B. 2007. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biological Control* **42**: 326-335.
- Chi, Z., Arneborg, N. 1999. Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 1047-1052.
- Chi, Z., Arneborg, N. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance exhibit different adaptative responses to produced ethanol. *J. Ind. Biotech.* **24**: 75-78.
- Ciani, M., Beco, L., Comitini, F. 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeasts fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **108**: 239-245.
- Ciani, M., Ferraro, L., Fatichenti, F. 2000. Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **27**: 698-703.
- Ciani, M., Maccarelli, F. 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotech.* **14**: 199-203.
- Ciani, M., Picciotti, G., 1995. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making process. *Biotechnol. Lett.* **17**: 1247-1250.
- Crueger, W., Crueger, A. 1984. *Biotechnology. A Textbook of Industrial Microbiology.* Science Tech. Inc., Madison.
- D'Amore, T., Panchal, C. J., Russell, I., Stewart, G. G. 1990. A study of ethanol tolerance in yeast. *Crit. Rev. Biotechnol.* **9**: 287-304.

- Dame, J. B., Scarborough, G. A. 1980. Identification of the hydrolytic moiety of the *Neurospora* plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and demonstration of a phosphoryl-enzyme intermediate in its catalytic mechanism. *Biochemistry* **19**: 2931-2937.
- Dame, J. B., Scarborough, G. A. 1981. Identification of the phosphorylated intermediate of the *Neurospora plasma* membrane H<sup>+</sup>-ATPase as beta-aspartyl phosphate. *J. Biol. Chem.* **256**: 10724-10730.
- de Deken R. H. 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.* **44**: 149-156.
- Deák, T. 1995. Methods for the rapid detection and identification of yeasts in foods. *Trends Food Sci. Technol.* **6**: 287-292.
- Dellweg, H., Rizzi, M., Methner, H., Debus, D. 1984. Xylose fermentations by yeasts 3. Comparison of *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Lett.* **6**: 395-400.
- DeLong, E. F., Taylor, L., Marsh, T., Preston, C. 1999. Visualization and enumeration of marine planktonic archaeae and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5554-5563.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S., Pace, N. R. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**: 1360-1363.
- Dennis, C., Buhagiar, R. W. 1980. Yeast spoilage of fresh and processed fruits and vegetables, *In Biology and Activities of Yeasts*. F. A. Skinner, S. M. Passmore, R. R. Davenport (Eds.), pp. 123-133. Academic Press, UK.
- Dombek, K. M., Ingram, L. O. 1986. Determination of intracellular concentration of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 197-200.
- Droby, S., Wisniewski, M. E., Cohen, L., Weiss, B., Touitou, D. 1997. Influence of CaCl<sub>2</sub> on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. *Phytopathology* **87**: 310-315.
- du Preez, J. C. 1994. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 944-956.
- du Preez, J. C., Boschm M., Prior, B. A. 1986. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. *Enzyme Microbiol. Technol.* **8**: 360-364.
- du Preez, J. C., van der Walt, J. P. 1983. Fermentation of D-xylose by a strain of *Candida shehatae*. *Biotechnol. Lett.* **5**: 357-362.
- Dufour, J. P., Goffeau, A. 1978. Solubilization by lysolecithin and purification of the plasma membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **253**: 7026-7032.
- Dutra, M. B., Ambesi, A., Slayman, C. W. 1998. Structure-function relationships in membrane segment 5 of the yeast Pma1 H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**: 17411-17417.
- Eddy, A. A. 1982. Mechanisms of solute transport in selected eukaryotic microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* **23**: 1-78.
- Eraso, P., Gancedo, C. 1987. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.* **224**: 187-192.
- Eraso, P., Portillo, F. 1994. Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by glucose. *J. Biol. Chem.* **269**: 10393-10399.
- Eriksson, O. E., Winka, K. 1997. Supraordinal taxa of Ascomycota. *Myconet* **1**: 1-16.
- Fell, J. W. 1995. rDNA target oligonucleotide primers for the identification of pathogenic yeasts in a polymerase chain reaction. *J. Ind. Microbiol.* **14**: 475-477.
- Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, Á., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1351-1371.

- Felsenstein, J. 2005. PHYLIP Phylogeny Inference Package, version 3.6. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.
- Fernandes, A. R., Sá-Correia, I. 1999. Comparative effects of *Saccharomyces cerevisiae* cultivation under copper stress on the activity and kinetic parameters of plasma membrane-bound H<sup>+</sup>-ATPases PMA1 and PMA2. *Arch. Microbiol.* **171**: 273-278.
- Fiechter, A., Fuhrmann, G. F., and Käppeli, O. 1981. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv. Microb. Physiol.* **22**: 123-183.
- Fleet, G. H. 1990. Growth of yeasts during wine fermentations. *J. Wine Res.* **1**: 211-223.
- Fleet, G. H., Heard, G. M. 1993. Yeasts-growth during fermentation. *In Wine Microbiology and Biotechnology*. G. H. Fleet (Eds.), pp. 27-54. Harwood Academic Publishers, Switzerland.
- Flores, C-L., Rodríguez, C., Petit, T., Gancedo, C. 2000. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 507-529.
- Fonseca, C., Spencer-Martins, I., Hahn-Hägerdal, B. 2007. L-Arabinose metabolism in *Candida arabinoferrantans* PYCC 5603<sup>1</sup> and *Pichia guilliermondii* PYCC 3012: influence of sugar and oxygen on product formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**:303–310.
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, P. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 166-170.
- Freer, S. N., Detroy, R. W. 1982. Direct fermentation of cellodextrins to ethanol by *Candida wickerhamii* and *C. lusitanae*. *Biotechnol. Lett.* **4**: 453-458.
- Fuchs, B. M., Glöckner, F. O., Wulf, J., Amann, R. 2000. Unlabeled helper oligonucleotides increase the *in situ* accessibility to 16S rRNA of fluorescently labelled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3603-3607.
- Fuchs, B. M., Syutsubo, K., Ludwig, W., Amann, R. 2001. *In situ* accessibility of *Escherichia coli* 23S rRNA to fluorescently labelled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 961-968.
- Fuchs, B. M., Wallner, G., Beiseker, W., Schwippl, I., Ludwig, W., Amann, R. 1998. Flow cytometric analysis of the *in situ* accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA to fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4973-4982.
- Gadanho, M., Sampaio, J. P., Spencer-Martins, I. 2001. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospordium*: *R. azoricum* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* **47**: 213-221.
- Gailiuis, J., Rinne, R. W., Benedict, C. R. 1964. Pyruvate-oxaloacetate exchange reaction in baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **92**: 595-601.
- Gancedo, C., Serrano, R. 1989. Energy yielding metabolism. *In The Yeasts*. A. H. Rose, J. S. Harrison (Eds.), pp. 205-259. Academic Press, London.
- Gancedo, J. M., Gancedo, C. 1973. Concentrations of intermediary metabolites in yeast. *Biochimie* **55**: 205-211.
- Gao, C., Fleet, G. H. 1988. The effect of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Bacteriol.* **65**: 405-409.
- Gersdorf, H., Pelz, K., Göbel, U. B. 1993. Fluorescence *in situ* hybridization for direct visualization of Gram-negative anaerobes in subgingival plaque samples. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **6**: 109-114.
- Ghislain, M., Goffeau, A. 1991. The PMA1 and PMA2 H<sup>+</sup>-ATPase from *Schizosaccharomyces pombe* are functionally interchangeable. *J. Biol. Chem.* **266**: 18276-18279.
- Ghislain, M., Schlessner, A., Goffeau, A. 1987. Mutation of a conserved glycine residue modifies the vanadate sensitivity of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **262**: 17549-17555.
- Gil, J. V., Jiménez, M. M., Pastor, A., Huerta, T. 1996. Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts. *J. Food Sci.* **1**: 1247-1249.
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J., Pace, N. R. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* **170**: 720-726.

- Goffeau, A., Ghislain, M., Navarre, C., Purnelle, B., Supply, P. 1990. Novel transport ATPases in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1018**: 200-202.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Loius, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S. G. 1996. Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546-567.
- Goffeau, A., Boutry, M. 1986. Three proton-pumping ATPases in yeast. *Microbiol. Sci.* **3**: 164-168.
- Goffeau, A., Slayman, C. W. 1981. The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **639**: 197-223.
- Graham, A. R. 1983. Fungal autofluorescence with ultraviolet illumination. *Am. J. Clin. Pathol.* **79**: 231-234.
- Grubb, C. F., Mawson, A. J. 1993. Effects of elevated solute concentrations on the fermentation of lactose by *Kluyveromyces marxianus* Y-113. *Biotechnol. Lett.* **15**: 621-626.
- Guého, E., Kurtzman, C. P., Peterson, S. W. 1989. Evolutionary affinities of heterobasidiomycetous yeasts estimated from 18S and 25S RNA sequence divergence. *System. Appl. Microbiol.* **12**: 230-236.
- Guého, E., Meyer, S. 1989. A reevaluation of the genus *Malassezia* by means of genome comparison. *Antonie van Leeuwenhoek* **55**: 245-251.
- Guijarro, J. M., Lagunas, R. 1984. *Saccharomyces cerevisiae* does not accumulate ethanol against a concentration gradient. *J. Bacteriol.* **160**: 874-878.
- Gutiérrez, A. R., Santamaria, P., Epifanio, S., Garijo, P., López, R. 1999. Ecology of spontaneous fermentations in one winery during 5 consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**: 411-415.
- Hager, K. M., Mandala, S. M., Davenport, J. W., Speichert, D. W., Benz, E. J., Slayman, C. 1986. Amino acid sequence of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*: deduction from genomic and cDNA sequences. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **83**: 7693-7697.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Hamamoto, M., Sujiyama, J., Komagata, K. 1987. DNA-DNA reassociation studies of strains in the genera *Rhodospiridium* and *Rhodotorula*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **33**: 57-73.
- Hansen, H. E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J. C., Arneborg, N. 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed cultures fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* **91**: 541-547.
- Heard, G. M., Fleet, G. H. 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* **65**: 23-28.
- Henschke, P. A., Rose, A. H. 1991. Plasma membranes. *In* The Yeasts, Vol 4. A. H. Rose, J. S. Harrison (Eds.), pp. 297-340. 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press, London.
- Heras-Vazquez, F. J., Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jimenez, J. M., Rodriguez-Vico, F. 2003. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Res.* **3**: 3-9.
- Higgins, D. G., Sharp, P. M. 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**: 237-244.
- Higgins, D. G., 1994. CLUSTAL V: multiple alignments of DNA and protein sequences. *Meth. Mol. Biol.* **25**: 307-318.
- Hogardt, M., Trebesius, K., Geiger, A. M., Hornef, M., Rosenecker, J., Heesemann, J. 2000. Specific and rapid detection by fluorescent *in situ* hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 818-825.
- Inácio, J. 2003. Ocorrência e Diversidade de Leveduras no Filoplano de Plantas Seleccionadas do Parque Natural da Serra da Arrábida. Tese de Doutorado. pp. 167-215. Universidade Nova de Lisboa.

- Inácio, J., Behrens, S., Fuchs, B. M., Fonseca, A., Spencer-Martins, I., Amann, R. 2003. *In situ* accessibility of *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA to Cy3-labeled oligonucleotide probes comprising the D1 and D2 domains. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2899-2905.
- Inácio, J., Pereira, P., de Carvalho, M., Fonseca, Á., Amaral-Collaço, M. T., Spencer-Martins, I. 2002. Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a Mediterranean-type ecosystem in Portugal. *Microbiol. Ecol.* **44**: 244-353.
- Ingram, L. O. 1986. Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane. *Trends Biotechnol.* **4**: 40-45.
- Ingram, L. O., Buttke, T. M. 1984. Effects of alcohols on microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* **25**: 253-300.
- Jacobson, M. K., Bernofsky, C. 1974. Mitochondrial acetaldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys. Acta* **350**: 277-291.
- Janssens, J. H., Burris, N., Woodward, A., Bailey, R. B. 1983. Lipid-enhanced ethanol production by *Kluyveromyces fragilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 598-602.
- Jiménez, J., Benítez, T. 1986. Characterization of wine yeasts for ethanol production. *Appl. Microb. Biotechnol.* **25**: 150-154.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., Thornton, J. M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comp. Appl. Biosci.* **8**: 275-82.
- Jones, R. P. 1990. Roles of replicative inactivation in yeast ethanol fermentations. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10**: 205-222.
- Kadam, K. L., Schmidt, S. L. 1997. Evaluation of *Candida acidothermophilum* in ethanol production from lignocellulosic biomass. *Appl. Microb. Biotechnol.* **48**: 709-713.
- Kalmbach, S., Manz, W., Wecke, J., Szewzyk, U. 1999. *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three *in situ* dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 769-777.
- Käppeli, O. 1986. Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Adv. Microbiol. Physiol.* **28**: 181-209.
- Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B., Lander, E. S. 2003. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* **423**: 241-254.
- Kemph, V. A., Trebeius, K., Autenrieth, L. B. 2000. Fluorescent *in situ* hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 830-838.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**:111-120.
- Kotyk, A., Dvořáková, M. 1992. Are proton symports in yeast directly linked to H<sup>+</sup>-ATPase acidification? *Biochim. Biophys. Acta* **1104**: 293-298.
- Kreger-van Rij, N. J. W. 1984. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 3<sup>rd</sup> edition, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Kresze, G. B., Ronft, H. 1981a. Pyruvate dehydrogenase complex from Baker's yeast. 1. Properties and some kinetic and regulatory properties. *Eur. J. Biochem.* **119**: 573-579.
- Kresze, G. B., Ronft, H. 1981b. Pyruvate dehydrogenase complex from Baker's yeast. 2. Molecular structure, dissociation, and implications for the origin of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **119**: 581-587.
- Krimmer, V., Merkert, H., von Eiff, C., Frosch, M., Eulert, J., Löhr, J. F., Hacker, J., Ziehbur, W. 1999. Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed *in situ* hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2667-2673.
- Kurtzman, C. P. 1992. rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships among yeasts. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 1-6.
- Kurtzman, C. P. 1994. Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast* **10**: 1727-1740.

- Kurtzman, C. P. 1998. Nuclear DNA hybridization: quantification of close genetic relationships. *In* The Yeasts, a Taxonomic Study. C. P. Kurtzman, J. W. Fell (Eds.), 4<sup>th</sup> edition, pp 63-68, Elsevier, Amsterdam.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. 1998. The Yeasts. A Taxonomic Study, 4<sup>th</sup> edition, Elsevier Science, Amsterdam.
- Kurtzman, C. P., Phaff, H. J. 1987. Molecular taxonomy. *In* The Yeasts, Vol. 1, A. H. Rose, J. S. Harrison (Eds.), 2<sup>nd</sup> edition, pp. 63-94. Academic Press, London.
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 331-371.
- Kurtzman, C. P., Sugiyama, J. 2001. Ascomycetous yeasts and yeast like taxa. *In* The Mycota VII part A: Systematics and Evolution, McLaughlin, McLaughlin, Lemke (Eds.), pp. 179-200. Springer-Verlag, Berlin.
- Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P. 1984. Developments in the microbiology of wine production. *Prog. Indust. Microbiol.* **19**: 1-45.
- Lagunas, R. 1986. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2**: 221-228.
- Larue, F., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P. 1980. Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 808-811.
- 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., van Uden, N. 1982. Effects of ethanol and other alcohols on the kinetics and the activation parameters of thermal death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.* **24**: 1581-1590.
- Leão, C., van Uden, N. 1984. Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **774**: 43-48.
- Lema, C., Garcia-Jares, C., Orriols, I., Ângulo, L., 1996. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* **47**: 206-216.
- Li, S., Spear, R. N., Andrews, J. H. 1997. Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Aureobasidium pullulans* on microscope slides and leaf surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3261-3267.
- Lightelm, M. E., Prior, B. A., du Preez, J. C. 1988. The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 63-68.
- Lima, G., Arru, S., De Curtis, F., Arras, G. 1999. Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 223-229.
- Lin, Y., Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**: 627-642.
- Lloyd, D., Morell, S., Carlsen, H. N., Degn, H., James, P. E., Towlands, C. C. 1993. Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**: 825-833.
- Lopandic, K., Zelger, S., Bánszky, L. K., Eliskases-Lechner, F., Prillinger, H. 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol.* **23**: 341-350.
- Loureiro, V., Ferreira, H. G. 1983. On the intracellular accumulation of ethanol in yeast. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 2263-2269.
- Ludovico, P., Sousa, M. J., Silva, M. T., Leão, C., Corte-Real, M. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology* **147**: 2409-2415.
- Lutsenko, S., Kaplan, J. H. 1995. Organization of P-type ATPases: Significance of structural diversity. *Biochemistry* **34**: 15607-15613.
- Lutstorf, U., Megnet, R. 1968. Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**: 933-944.

- Magee, B. B., D'Souza, T. M., Magee, P. T. 1987. Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species. *J. Bacteriol.* **169**: 1639-1643.
- Maiorella, B., Blanche, H. W., Wilke, C. R. 1983. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 103-121.
- Malpartida, F., Serrano, R. 1980. Purification of the yeast plasma membrane ATPase solubilized with a novel zwitterionic detergent. *FEBS Lett.* **11**: 69-72.
- Mannarelli, B. M., Kurtzman, C. P. 1998. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeast by using short oligonucleotides in a PCR. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1634-1641.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K. H. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* **15**: 593-600.
- Marmur, J., Doty, P. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* **5**: 109-118.
- McCracken, L. D., Gong, C. S. 1982. Fermentation of cellulose and hemicellulose carbohydrates by thermotolerant yeasts. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **12**: 91-102.
- McCusker, J. H., Perlin, D. S., Haber, J. E. 1987. Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **7**: 4082-4088.
- Meyer, W., Mitchell, T. G., Freedman, E. Z., Vilgalys, R. 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2274-2280.
- Meyrial, V., Delgenes, J. P., Romieu, C., Moletta, R., Gunot, A. M. 1995a. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Pichia stipitis* grown on D-xylose or D-glucose. *Enz. Microbiol. Technol.* **17**: 535-540.
- Meyrial, V., Delgenes, J. P., Romieu, C., Moletta, R., Gunot, A. M. 1995b. *In vivo* ethanol activation of the plasma membrane ATPase of *Pichia stipitis*: effect of the carbon source. *J. Biotechnol.* **42**: 109-116.
- Michel, G. P., Starka, J. 1986. Effect of ethanol and heat stress on the protein pattern of *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* **165**: 1040-1045.
- Millar, D. G., Griffiths-Smith, K., Algar, E., Scopes, R. K. 1982. Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnol. Lett.* **4**: 601-606.
- Mishra, P., Kaur, S. 1991. Lipids as modulators of ethanol tolerance in yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 697-702.
- Mishra, P., Prasad, R. 1989. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 294-298.
- Monteiro, G. A., Sá-Correia, I. 1998. *In vivo* activation of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by ethanol: effect on the kinetic parameters and involvement of the carboxyl-terminus regulatory domain. *Biochim. Biophys. Acta* **1370**: 310-316.
- Monteiro, G. A., Supply, P., Goffeau, A., Sá-Correia, I. 1994. The *in vivo* activation of *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by ethanol depends on the expression of the *PMA1* gene, but not of the *PMA2* gene. *Yeast* **10**: 1439-1446.
- Morsomme, P., Slayman, C. W., Goffeau, A. 2000. Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**: 133-157.
- Moter, A., Göbel, U. B. 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualisation of microorganisms. *J. Microb. Meth.* **41**: 85-112.
- Mulder, W., Scholten, I. H. J. M., Grivell, L. A. 1995. Carbon catabolite regulation of transcription of nuclear genes coding for mitochondrial proteins in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Curr. Genet.* **28**: 267-273.



- Nagahama, T., Hamamoto, M., Nakase, T., Takami, H., Horikoshi, K. 2001. Distribution and identification of red yeasts in deep-sea environments around the northwest Pacific Ocean. *Antonie Leeuwenhoek* **80**: 101-110.
- Nagodawithana, T. W., Steinkraus, K. H. 1976. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation". *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 158-161.
- Nagodawithana, T. W., Whitt, J. H., Cutaia, A. J. 1977. Study of the feedback effect of ethanol on selected enzymes of the glycolytic pathway. *J. Am. Soc. Brew.* **35**: 179-193.
- Nakamoto, R. K., Slayman, C. W. 1989. Molecular properties of the fungal plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Bioenerg. Biomemb.* **21**: 621-632.
- Neirinck, L. G., Maleszka, R., Schneider, H. 1984. The requirement of oxygen for incorporation of carbon from D-xylose and D-glucose by *Pachysolen tannophilus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **228**:13-21.
- Notredame, C., Higgins, D. G., Heringa, J. 2000. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* **302**: 205-217.
- Novak, M., Strehaiano, P., Moreno, M., Goma, G. 1981. Alcoholic fermentation on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 201-211.
- Oberwinkler, F. 1987. Heterobasidiomycetes with ontogenic yeast-stages. Systematic and phylogenetic aspects. *Stud. Mycol.* **30**: 61-74.
- Ohta, K., Wijeyaratne, S. C., Hayashida, S. 1988. Temperature-sensitive mutants of a thermotolerant yeast, *Hansenula polymorpha*. *J. Ferm. Technol.* **66**: 455-459.
- Oliveira, K., Haase, G., Kurtzman, C. P., Hyldig-Nielsen, J. J., Stender, H. 2001. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent *in situ* hybridization with peptide nucleic acid probes. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 4138-4141.
- Pamment, N. B. 1989. *In Alcohol Toxicity in Yeast and Bacteria*. N. Van Uden editions, pp. 1-75. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Perlin, D. S., Brown, C. L., Habern, J. E. 1988. Membrane potential defect in hygromycin β-resistant *pma1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **263**: 18118-18122.
- Peters, R. P. H., Savelkout, P. H. M., Simoons-Smit, A. M., Danner, S. A., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., van Agtmael, M. A. 2006. Faster identification of pathogens in positive blood cultures by fluorescence *in situ* hybridization in routine practice. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 119-123.
- Peterson, S. W., Kurtzman, C. P. 1991. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *System. Appl. Microbiol.* **14**: 124-129.
- Phaff, H. J., 1989. Trends in yeast systematics. *Yeast* **5**: S341-S349.
- Phaff, H. J., Miller, M. W., Mrak, E. M. 1978. *The Life of Yeasts*. 2<sup>nd</sup> edition, Harvard University Press, Cambridge (USA) and London.
- Pina, C., Couto, J. A., Hogg, T. 2004a. Inferring ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts by progressive inactivation. *Biotech. Lett.* **26**: 1551-1527.
- Pina, C., Santos, C., Couto, J. A., Hogg, T. 2004b. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of different culture conditions. *Food Microbiol.* **21**: 439-447.
- Piper, P. W. 1995. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**: 121-127.
- Piper, P. W., Talreja, K., Panaretou, B., Moradas-Ferreira, P., Byrne, K., Praekelt, U. M., Meacock, P., Recnacq, M., Boucherie, H. 1994. Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above critical threshold. *Microbiology* **140**: 3031-3038.
- Portillo, F., de Larriona, I. F., Serrano, R. 1989. Deletion analysis of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and identification of a regulatory domain at the carboxyl-terminus. *FEBS Lett.* **247**: 381-385.

- Portillo, F., Eraso, P., Serrano, R. 1991. Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by direct mutagenesis and intragenic suppression. *FEBS Lett.* **287**: 71-74.
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P. 1989. Enzymic analysis of the Crabtree Effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 468-477.
- Pronk, J. T., Steensma, H. Y., van Dijken, J. P. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**: 1607-1633.
- Rao, R., Slayman, C. W. 1996. Plasma membrane and related ATPases. *In The Mycota*, Vol. 3, R. Brambl, G. A. Marzluf (Eds.), pp. 29-56. Springer, Berlin.
- Rigby, S., Procop, G. W., Haase, G., Wilson, D., Hall, G., Kurtzman, C. P., Oliveira, K., Von Oy, S., Hyldig-Nielsen, J. J., Coull, J., Stender, H. 2002. Fluorescence *in situ* hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 2182-2186.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., Maifreni, M. 1997. Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **82**: 615-618.
- Rosa, M. F., Sá-Correia, I. 1991. *In vivo* activation by ethanol of plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 830-835.
- Rosa, M. F., Sá-Correia, I. 1992. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enz. Microbiol. Technol.* **14**: 23-27.
- Rose, A. H. 1993. Composition of the envelop layers of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 110S-118S.
- Rose, A. H., Harrison, J. S. (Eds.), 1987. *The Yeasts*, Vol. I, 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press, London.
- 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., van Uden, N. 1983a. 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.
- Sá-Correia, I., van Uden, N. 1983b. Effect of ethanol on the fructose transport system of *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnol. Lett.* **5**: 413-418.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-25.
- Sajbidor, J. 1997. Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**: 87-103.
- Salema-Oom, M., Valadão Pinto, V., Gonçalves, P., Spencer-Martins, I. 2005. Maltotriose utilization by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains: characterization of a new member of the  $\alpha$ -glucosidase transporter family. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5044-5049.
- Salhany, J. M., Yamane, T., Shulman, R. G., Ogawa, S. 1975. High resolution <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance studies of intact yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 4966-4970.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sampaio, J. P., Fonseca, Á. 1995. Physiological aspects in the systematics of heterobasidiomycetous yeasts. *Stud. Mycol.* **38**: 29-46.
- Sampaio, J. P., Gadanho, M., Santos, S., Duarte, F. L., Pais, C., Fonseca, Á., Fell, J. W. 2001. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospiridium*: *Rhodospiridium kratochvilovae* and related anamorphic species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 687-697.

- Scannell, D. R., Frank, A. C., Conant, G. C., Byrne, K. P., Woolfit, M., Wolfe, K. H. 2007. Independent sorting-out of thousands of duplicated gene pairs in two yeast species descended from a whole-genome duplication. *PNAS* **104**: 8397-8402.
- Schlesser, A., Ulaszewski, S., Ghislain, M., Goffeau, A. 1988. A second transport ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **263**: 19480-19487.
- Serrano, R. 1978. Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **130**: 235-239.
- Serrano, R. 1983. In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* **156**: 11-14.
- Serrano, R. 1984. Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. *Curr. Top. Cell. Reg.* **23**: 87-126.
- Serrano, R. 1988. Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membrane of plant and fungi. *Biochim. Biophys. Acta* **947**: 1-28.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C., Fink, G. R. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature* **319**: 689-693.
- Seto-Young, D., Na, S., Monk, B. C., Haber, J. E., Perlin, D. S. 1994. Mutational analysis of the first extracellular loop region of the H<sup>+</sup>-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**: 23988-23995.
- Sharf, R., Margalith, P. 1983. The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 311-313.
- Sherman, D., Durrens, P., Iragne, F., Beyne, E., Nikolski, M., Souciet, J.-L. 2006. Génolevures complete genomes provide data and tools for comparative genomics of hemiascomycetous yeasts. *Nucleic Acid Res.* **34**: D432-D435.
- Sigler, K., Höfer, M. 1991. Mechanisms of acid extrusion in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1071**: 375-391.
- Simon, N., Campbell, L., Örnolfsdottir, E., Groben, R., Guillou, L., Lange, M., Medlin, L. K. 2000. Oligonucleotide probes for the identification of three algae groups by dot blot and whole fluorescent whole-cell hybridization. *J. Euk. Microbiol.* **47**: 76-84.
- Skoog, K., Hahn-Hägerdal, B. 1990. Effects of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3389-3394.
- Slininger, P. J., Bothast, R. J., van Cauwenberge, J. E., Kurtzman, C. P. 1982. Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 371-384.
- Sorensen, A. H., Torsvic, V. L., Torsvic, T., Poulsen, L. K., Ahring, B. K. 1997. Whole-cell hybridization of *Methanosarcina* cells with two new oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3043-3050.
- Soteropoulos, P., Perlin, D. S. 1998. Genetic probing of the stalk segments associated with M2 and M3 of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**: 26426-26431.
- Spencer-Martins, I., van Uden, N. 1977. Yields of yeast growth on starch. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **4**: 29-35.
- Spencer-Martins, I., van Uden, N. 1982. The temperature profile of growth, death and yield of the starch-converting yeast *Lipomyces kononenkoe*. *Z. Allg. Mikrobiol.* **22**: 503-505.
- Spencer-Martins, I., van Uden, N. 1984. Catabolite interconversion of glucose transport systems in the yeast *Candida wickerhamii*. *Biochim. Biophys. Acta* **812**: 168-172.
- Stender, H., Kurtzman, C. P., Hyldig-Nielsen, J. J., Sorensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., Perry-O'Keefe, H., Sage, A., Young, B., Coull, J. 2001. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 938-941.
- Strydom, M., Kirschbaum, A. F., Tromp, A. 1982. Ergosterol concentration of several different *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *S. Afric. J. Vitic.* **3**: 23-28.
- Stryer, L. 2000. Biochemistry. 4<sup>th</sup> edition, W. H. Freeman Company, New York.

- Supply, P., Wach, A., Thinès-Sempoux, D., Goffeau, A. 1993. Proliferation of intracellular structures upon overexpression of the PMA2 ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**: 19744-19752.
- Swann, E. C., Taylor, J. W. 1995. Toward a phylogenetic systematics of the basidiomycota: Integrating yeasts and filamentous basidiomycetes using 18S RRNA gene sequences. *Stud. Mycol.* **38**: 147-161
- Sychrová, H., Kotyk, A. 1985. Conditions of activation of yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* **183**: 21-24.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* **10**.1093/molbev/msm092.
- Tavares, S., Inácio, J., Fonseca, Á., Oliveira, C. 2004. Direct detection of *Taphrina deformans* on peach trees using molecular methods. *Eur. J. Plant Pathol.* **110**: 973-982.
- Thomas, D. S., Hossack, J. A., Rose, A. H. 1978. Plasma membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **117**: 239-245.
- Thomas, D. S., Rose, A. H. 1979. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. *Arch. Microbiol.* **122**: 49-55.
- Toivola, A., Yarrow, D., van den Bosch, E., van Dijken, J. P., Scheffers, W. A. 1984. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 1221-1223.
- Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamanón, J. M., Mas, A. 2001. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**: 345-352.
- Toro, M. E., Vazquez, F. 2002. Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 347-354.
- Tran, A. V., Chambers, R. P. 1986. Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by the yeast *Pichia stipitis* CBS 5776. *Enz. Microbiol. Technol.* **8**: 439-444.
- Trindade, R. C., Resende, M. A., Silva, C. M., Rosa, C. A. 2002. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of brazilian tropical fruits. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 294-300.
- Uchida, E., Ohsumi, Y., Anraku, Y. 1988. Purification of yeasts vacuolar membrane H<sup>+</sup>-ATPase and enzymological discrimination of three ATP-driven proton pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *Meth. Enzimol.* **157**: 544-561.
- Umbreit, W. W., Burris R. H., Stauffer J. F. 1964. *Manometric Technics*, 4<sup>th</sup> edition, Burgess Publishing, Minneapolis, Minesota.
- van de Peer, Y., Robbrecht, E., De Hoog, S., Caers, A., De Rijk, P., De Wachter, P. 1999. Database on the structure of small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **27**: 179-183.
- van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., Konings W. N. 1995. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.* **59**: 304-322.
- van Dijken J. P., Scheffers, W. A. 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 199-224.
- van Dijken, J. P., van den Bosch, E., Hermans, J. J., de Miranda, L. R., Scheffers, W. A. 1986. Alcoholic fermentation by 'non-fermentative' yeasts. *Yeast* **2**: 123-127.
- van Hoek, P., van Dijken, J. P., Pronk, J. T. 1998. Effect of growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4226-4233.
- van Uden, N. 1984. Temperatures profiles of yeasts. *Adv. Microbiol. Physiol.* **25**: 195-248.
- van Uden, N. 1985. Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. *Ann. Rep. Ferment. Proc.* **8**: 12-58.
- van Uden, N. 1989a. Effects of alcohols on membrane transport in yeasts. *In Alcohol toxicity in yeasts and Bacteria*, N. van Uden (Eds.), pp. 135-146, CRC Press, Boca Raton, Florida

- van Uden, N. 1989b. Effects of alcohols on the temperature relations of growth and death in yeasts. *In Alcohol Toxicity in Yeasts and Bacteria*, N. van Uden (Eds.), pp. 77-88, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- van Uden, N., da Cruz Duarte, H. 1981. Effects of ethanol on the temperature profile of *Saccharomyces cerevisiae*. *Z. Allg. Mikrobiol.* **21**: 743-750.
- van Urk, H. 1989. Transient Responses of Yeasts to Glucose Excess. pp. 9-30. PhD Thesis, University of Delft, The Netherlands.
- van Urk, H., Postma, E., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P. 1989a. Glucose transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2399-2406.
- van Urk, H., Shipper, D., Breedveld, G. J., Mak, P. R., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P. 1989b. Localization and kinetics of piruvate-metabolizing enzymes in relation to aerobic alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621. *Biochim. Biophys. Acta* **992**: 78-86.
- Vaughan-Martini, A, Martini, A. 1987. Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoek* **53**: 77-84.
- Verduyn, C. 1991. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie van Leeuwenhoek* **60**: 325-353.
- Viegas, A. C., Sá-Correia, I., 1991. Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 645-651.
- Viegas, A. C., Sá-Correia, I., Novais, J. M. 1985. Nutrient enhanced production of remarkably high concentrations of ethanol by *Saccharomyces bayanus* through soy flour supplementation. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1333-1335.
- Visser, W., Sheffers, W. A., Batenburg-van der Vegte, W. H., van Dijken, J. P. 1990. Oxygen requirements of yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3785-3792.
- Walker, G. M. 1998. Introduction to yeasts. *In Yeast Physiology and Biotechnology*. pp 1-10. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- Wang, G., Tamás, M. J., Hall, M. J., Pascual-Ahuir, A., Perlin, D. S. 1996. Probing conserved regions of the cytoplasmic LOOP1 segment linking transmembrane segments 2 and 3 of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol Chem.* **271**: 25438-25445.
- Wésolowski-Louvel, M., Breunig, K. D., Fukuhara, H. 1996. *Kluyveromyces lactis*. *In Nonconventional Yeasts in Biotechnology*. K. Wolf (Eds.), pp. 139-202. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer-Martins, I., Gírio, F. 2006. Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **108**: 376-384.
- Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. *In The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4<sup>th</sup> edition, C. P. Kurtzman, J. W. Fell (Eds.), Elsevier, Amsterdam.
- Yin, P., Bai, F., Zhou, P. 1998. Studies on the yeasts and yeast like fungi degrading trinitrotoluene. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **38**: 295-299.
- Zastrow, C. R., Hollatz, C., de Araujo, P. S., Stambuk, B. U. 2001. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 34-38.
- Zhang, J., Reddy J., Buckland, B., Greasham R. 2003. Toward consistent and productive complex media for industrial fermentations: studies on yeast extract for a recombinant yeast fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* **82**: 640-652.



## **APÊNDICE I**

### **MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES**





---

## Meios de Cultura

### *Meio GYP*

Glucose	2,0% p/v
Extracto de levedura	0,5%
Peptona	1,0%
Água desmineralizada	q.b.

Autoclavar 15 min a 121 °C

### *Meio CMA (Corn Meal Agar)*

<i>Corn meal infusion</i> (Difco)	3,9% p/v
Agar	1,5%

Autoclavar 15 min a 121 °C

### *Meio MYP*

Extracto de levedura	0,05% p/v
Extracto de malte	0,7%
<i>Soytone</i> (Difco)	0,25%
Agar	1,5%
Água desmineralizada	q.b.

Autoclavar 15 min a 121 °C

### *Meio YM*

Extracto de levedura	0,3% p/v
Extracto de malte	0,3%
Peptona	0,5%
Glucose	2%
Agar (para meio sólido)	2%
Água desmineralizada	q.b.

Autoclavar 15 min a 121 °C

### *Meio YPD*

Extracto de levedura	2% p/v
Extracto de malte	1%
Peptona	1%
Glucose	2%
Água desmineralizada	q.b.

Autoclavar 15 min a 121 °C

*Meio YP*

Extracto de levedura	2% p/v
Extracto de malte	1%
Peptona	1%
Água desmineralizada	q.b.

Autoclavar 15 min a 121 °C

Para meios com diferentes concentrações de glucose, adicionar solução de glucose a 40% p/v, previamente esterilizada por filtração, depois do meio YP estar esterilizado, de forma a obter a concentração desejada.

*Meio de Christensen (produção de urease)*

Peptona	0,1% p/v
NaCl	0,5%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2%
Glucose	0,1%
Vermelho de fenol	0,0012%
Agar	2%

Ajustar a pH 6,8

Esterilizar por filtração uma solução aquosa de ureia a 20% p/v, a adicionar (0,5 ml) ao meio esterilizado (4,5 ml). Distribuir por tubos esterilizados e inclinar para solidificação do meio em cunha.

*Meio de arbutina*

Arbutina	0,5% p/v
Extracto de levedura	0,5%
Agar	1,5%
Água da torneira	q.b.

Após dissolução dos ingredientes, o meio é distribuído por tubos de ensaio (5 ml por tubo) e autoclavado 15 min a 121 °C. Imediatamente após esterilização, adicionar 2-3 gotas de citrato de amónio férrico 1% p/v. Agitar os tubos suavemente e inclinar para solidificação do agar em cunha.

*Meio base de fermentação*

Extracto de levedura	0,5% p/v
Peptona	0,75%
Azul de bromotimol	um pitada (até o meio ficar verde)
Água desmineralizada	q.b.

Distribuir porções de 2 ml por tubos de ensaio pequenos, adicionar os tubos de Durham invertidos e esterilizar em autoclave. Os tubos de Durham deverão ser arrefecidos dentro do autoclave, lentamente, para facilitar a saída de ar dos tubos. Após autoclavar, adicionar a cada tubo 1 ml de solução estéril de glucose a 6% p/v.

### *Meio com cicloheximida (100 ppm e 1000 ppm)*

O meio base é preparado 10X concentrado. Dissolver 0,1 g (para 100 ppm) ou 1 g (para 1000 ppm) de cicloheximida (actidiona) em 2,5 ml de acetona. A solução de acetona é adicionada a uma solução de 6,7 g de YNB (Difco) e 10 g de glucose em 100 ml de água desmineralizada, sendo a mistura esterilizada por filtração. Porções de 0,5 ml deste meio base são pipetados para tubos de ensaio contendo 4,5 ml de água desmineralizada.

### *Meio SOC*

Depois de preparado o meio SOB, arrefecer até 60 °C e adicionar 20 ml de uma solução estéril de glucose 1M (esta solução é preparada com 18 g de glucose e 100 ml de água desmineralizada).

### *Meio SOB*

Triptona	20 g
Extracto de levedura	5 g
NaCl	0,5 g
Água desmineralizada	q.b.

Adicionar 10 ml de uma solução de 250 mM KCl (esta solução é preparada dissolvendo 1,86 g de KCl em 100 ml de água destilada). Ajustar o pH a 7,0 com 5N NaOH (~0,2 ml). Ajustar o volume da solução a 1 litro. Esterilizar em autoclave 15 min a 121 °C.

Antes de usar, adicionar 5ml de uma solução estéril de 2M MgCl<sub>2</sub> (esta solução é preparada adicionando 19 g de MgCl<sub>2</sub> a 90 ml de água desmineralizada. Ajustar o volume a 100 ml com água destilada e esterilizar em autoclave).

### **Mistura para lavagem de tubos de ensaio**

#### *Mistura nitro-sulfúrica para lavagem de tubos de ensaio*

Vinte partes de ácido sulfúrico para uma parte de ácido nítrico. Emergir os tubos durante 20 min e lavar seguidamente com água abundante. A mistura pode ser re-utilizada.

### **Solução para detecção de produção de compostos amiláceos**

#### *Solução de Lugol*

Iodo	0,33% p/v
Iodeto de potássio	0,66%
Água desmineralizada	q.b.

---

**Soluções para experiências de actividade da H<sup>+</sup>-ATPase membrana plasmática**
*Tampão S*

Sacarose (Sigma)	0,33 M
EDTA (sal tetrasódico, Aldrich)	5 mM
Ditiotreitol (Sigma)	2 mM
Tampão 0,1 M Tris	q.b.

Ajustar a pH 8,0 com HCl

*Tampão G*

Glicerol (Merck)	20% v/v
EDTA (sal tetrasódico, Aldrich)	0,1 mM
Ditiotreitol (Sigma)	0,1 mM
Tris	10 mM

Ajustar a pH 7,5 com NaOH

*Tampão MES (ajustado a pH variável)*

MES (Sigma)	50 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 mM
KCl	50 mM
KNO <sub>3</sub>	100 mM
NaN <sub>3</sub>	5 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,2 mM

Ajustar a pH requerido com 2,5 M Tris.

*Solução ANSA*

ANSA (ácido 1-amino-2-naftol-sulfónico)	0,25% p/v
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	15%
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	1%
Água desmineralizada	q.b.

Aquecer e agitar. Esta solução é feita "de fresco".

**Soluções para hibridação *in situ****Tampão PBS 1X*

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM

Ajustar a pH 7,2

*Tampão de Hibridação (para 2 ml)*

Formamida	variável (para 20% v/v, 400 µl formamida)
NaCl	360 µl
Tris/HCl 1M, pH 8	40 µl
Água desmineralizada	variável (para 20% formamida, 1198 µl)
SDS 10% p/v	2 µl (adicionar no fim)

*Tampão de Lavagem (para 50 ml)*

Tris/HCl 1M, pH 8	1 ml
NaCl	ver tabela junta
EDTA	ver tabela junta
água destilada	q.b.
SDS 10% p/v	50 µl (adicionar em último)

**Tabela A.1.** Equivalência entre a concentração de formamida no Tampão de Hibridação e as concentrações de cloreto de sódio e de EDTA no Tampão de Lavagem

Concentração de formamida (% p/v) no tampão de hibridação	Concentração de NaCl (M) no tampão de lavagem	Quantidade a adicionar ao tampão de lavagem (para vol. final 50 ml)	
		NaCl (µl)	EDTA 0,5 M, pH 8 (µl)
0	0,900	9000	0
5	0,636	6300	0
10	0,450	4500	0
15	0,318	3180	0
20	0,225	2150	500
25	0,159	1490	500
30	0,112	1020	500
35	0,800	700	500
40	0,56	460	500
45	0,40	300	500
50	0,028	180	500
55	0,20	100	500
60	0,014	40	500
65	0,010	0	500
70	0,007	0	850
75	0,005	0	750
80	0,0035	0	675

---

**Soluções para extracção de DNA e visualização de bandas***Tampão de Lise*

Tris	50 mM
NaCl	250 mM
EDTA (sal tetrasódico, Aldrich)	50 mM
SDS (dodecil sulfato de sódio)	0,3% p/v

Ajustar a pH 8

*Tampão TE*

Tris	0,1M
EDTA	0,1M

Ajustar a pH 8

*Tampão TAE 50x*

Tris	242 g
ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M (pH 8)	100 ml
água bidestilada	q. b. para 1 litro

*Brometo de etídio (EtBr)*

Brometo de etídio	2 mg/ml
-------------------	---------

**Solução para aplicação das amostras no gel de agarose**

Glicerol	30% p/v
Azul de bromofenol	0,25%
EDTA	2 mM

**Soluções utilizadas na transformação de células de *E. coli* competentes e sua selecção***Meio LB*

Triptona	1% p/v
Extracto de levedura	0,5%
NaCl	1%
Água desmineralizada	q.b.

Autoclavar 15 min a 121 °C

**Ampicilina (solução “stock”)**

Ampicilina numa concentração de 100 mg/ml dissolvida em água desmineralizada. Esterilizar por filtração e armazenar a -20°C, protegendo da luz.

**Tetraciclina (solução “stock”)**

Tetraciclina numa concentração de 5 mg/ml dissolvida em etanol absoluto.

**Meio LB + Amp<sup>100</sup> + Tet<sup>15</sup>**

Triptona	10 g
Extracto de levedura	5 g
NaCl	10 g
Agar	20 g
Água desmineralizada	q.b.

Autoclavar 15 min a 121 °C

Depois de arrefecer até cerca de 50 °C, adicionar ampicilina (concentração final = 100 µg/ml) e Tetraciclina (concentração final = 15 µg/ml). Para 1 litro usar 1 ml de solução stock ampicilina (100 µg/ml) e usar 3 ml de solução “stock” tetraciclina (5 µg/ml).

**Soluções para minipreps****Solução 1 (GET)**

Glucose	50 mM
EDTA	10 mM; pH 8
Tris/HCl, pH 8	25 mM

**Solução 2**

NaOH	0,4 M
SDS (dodecil sulfato de sódio)	2% p/v

A Solução 2 é composta por uma mistura de cada componente em igual volume (1:1) que é feita na altura da sua utilização.

**Solução 3**

Acetato de Sódio	3M
Ajustar a pH 4,8	

*X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)*

Diluir 100 mg de X-Gal em 5 ml de Dimetilformamida (DMF)

Distribuir em alíquotas de 2 ml. Proteger da luz, embrulhando em papel de alumínio e guardar a -20 °C

*IPTG (isopropyl-  $\beta$  -D-thiogalactopyranoside)*

200 mg/ml

Dissolver 2 g de IPTG em 8 ml de água bidestilada. Ajustar o volume a 10 ml com água desmineralizada e esterilizar por filtração. Preparar alíquotas de 1 ml e guardar a -20°C.



## **APÊNDICE II**

### **RESULTADOS DOS TESTES DE IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DAS LEVEDURAS ISOLADAS**



**Tabela II.1.** Resultados, ao fim de três semanas (Kurtzman & Fell, 1998) dos testes de identificação fenotípica das leveduras isoladas neste trabalho.

Testes	(AN1) <i>Candida pseudointermedia</i>	(AN2) <i>Candida pseudointermedia</i>	<i>Pichia guilliermondii</i> (AN3) PYCC 5784 (AN3)	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (MC1) PYCC 5782 (MC1)	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (MC2) PYCC 5791 (MC3)	<i>Candida sp. nov.</i> (MC3) PYCC 5791 (MC3)	<i>Candida quercitrusa</i> (BN1) PYCC 5789 (BN1)	<i>Rhodotorula sp.</i> (ML1) Pseudozyma antarctica (ML2) Crytococcus magnus (ML3)	<i>Candida parapsilosis</i> (FP1) <i>Pichia kluyveri</i> (PS1)	<i>Cryptococcus albidus</i> (PS2)	<i>Pichia mexicana</i> (PS4) PYCC 5790 (PS4)	<i>Pichia mexicana</i> (PS5)	<i>Candida pseudointermedia</i> (UVBR1)	<i>Candida pseudointermedia</i> (UVBR2) PYCC 5788 (UVBR2)	<i>Pichia guilliermondii</i> (UVBR3)	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (UVPR1) PYCC 5783 (UVPR1)	<i>Pseudozyma antarctica</i> (MG1)	
Fermentação	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		
D-Glucose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
D-Galactose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
L-Sorbose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
D-Glucosamina	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
D-Ribose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
D-Xilose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
L-Arabinose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
D-Arabinose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
L-Ramnose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Sacarose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Maltose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
α, α-Trealose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Metil-D-glucósido	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Celobiose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Salicina	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Melibiose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Lactose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Rafinose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Melezitose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Inulina	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Amido	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Xilose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Fonte de carbono e energia	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
D-Glucose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
D-Galactose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
L-Sorbose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
D-Glucosamina	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
D-Ribose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
D-Xilose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
L-Arabinose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
D-Arabinose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
L-Ramnose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Sacarose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Maltose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
α, α-Trealose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Metil-D-glucósido	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Celobiose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Salicina	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Melibiose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Lactose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Rafinose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Melezitose	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Inulina	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Amido	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Glicerol	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
meso-Eritritol	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Ribitol	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
Xilitol	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
D-Glucitol	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++
D-Manitol	++	+++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	++	++	+		++

D - crescimento lento; w - crescimento fraco

(cont.)

Tabela II.1. (continuação)

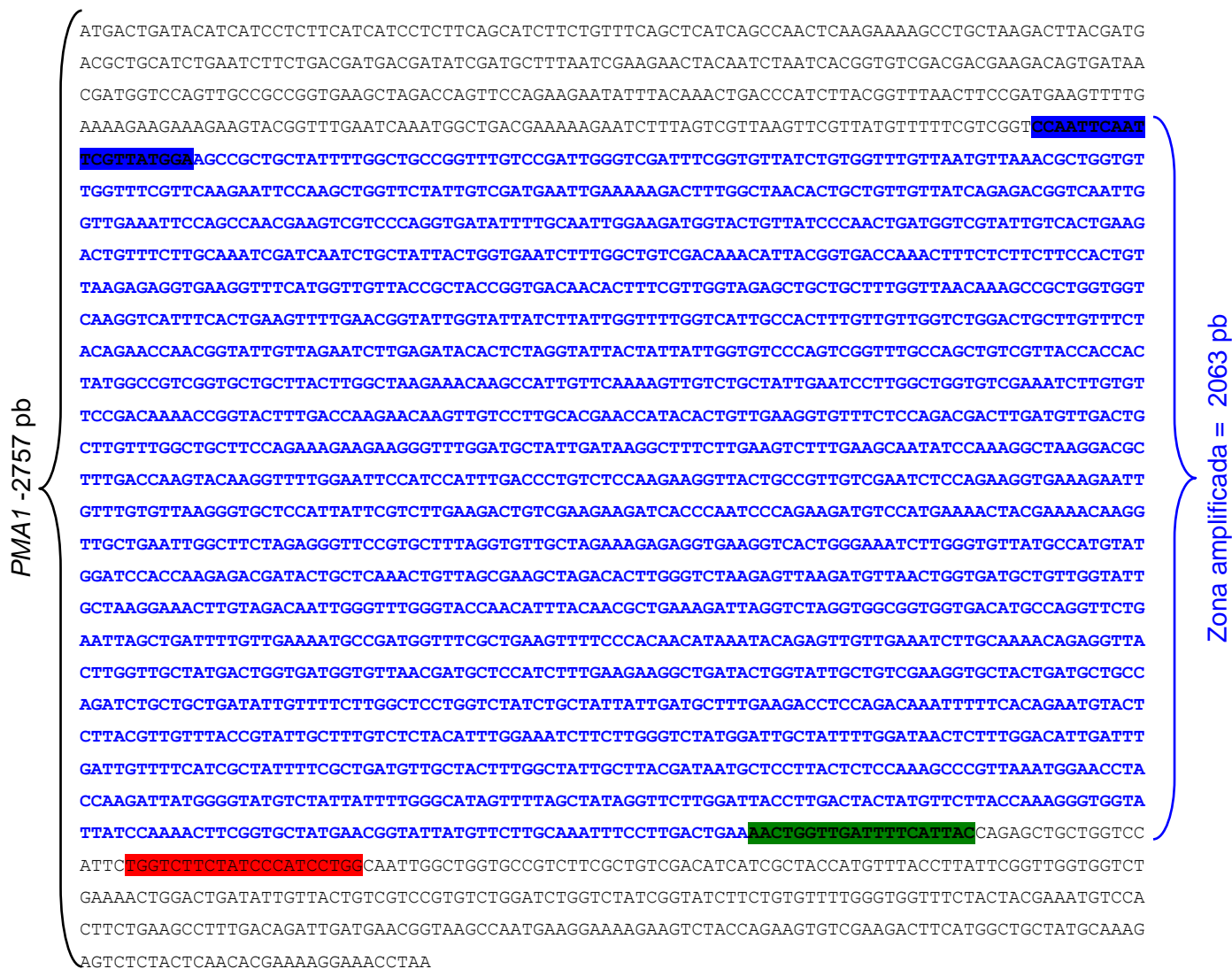
Testes	(AN1)	(AN2)	<i>Pichia guilliermondii</i> (AN3)	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (MC1)	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (MC2)	<i>Candida sp. nov.</i> (MC3)	<i>Candida quercitrusa</i> (BN1)	<i>Rhodotorula sp.</i> (ML1)	<i>Pseudozyma antarctica</i> (ML2)	<i>Cryptococcus magnus</i> (ML3)	<i>Candida parapsilosis</i> (Pp1)	<i>Pichia kluyveri</i> (PS1)	<i>Cryptococcus albidus</i> (PS2)	<i>Pichia mexicana</i> (PS4)	<i>Pichia mexicana</i> (PS5)	<i>Candida pseudointermedia</i> (UVBR1)	<i>Candida pseudointermedia</i> (UVBR2)	<i>Pichia guilliermondii</i> (UVBR3)	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (UVPR1)	<i>Pseudozyma antarctica</i> (Mg1)
Fonte de carbono e energia																				
Galactitol																				
myo-Inositol																				
Glucono- $\delta$ -lactona																				
D-Gluconato																				
D-Gluconato																				
D, L-Lactato																				
Succinato																				
Citrato																				
Metanol																				
Etanol																				
Ác. L-Málico																				
Ác. L-Tartárico																				
Ác. D-Tartárico																				
Ác. m-Tartárico																				
Ác. Sacárico																				
Ác. Múcico																				
Ác. L-Protocatecuico																				
Ác. Vanílico																				
Ác. Ferúlico																				
Ác. Ventrírico																				
Ác. p-Hidroxi-benzóico																				
Ác. m-Hidroxi-benzóico																				
Ác. Gálico																				
Ác. Silícico																				
Ác. Genísico																				
Catecol																				
Fenol																				
Fonte de azoto																				
Nitrato																				
Nitrito																				
Etilamina																				
L-Lisina																				
Cadaverina																				
Creatina																				
Creatinina																				
Outros																				
Crescimento sem Vitaminas																				
Cicloheximida 100 ppm																				
Cicloheximida 1000 ppm																				
Hidrólise da Arbutina																				
Prod. Compostos Amiláceos																				
Crescimento 25 °C																				
Crescimento 30 °C																				
Crescimento 35 °C																				
Crescimento 37 °C																				

D - crescimento lento; w - crescimento fraco

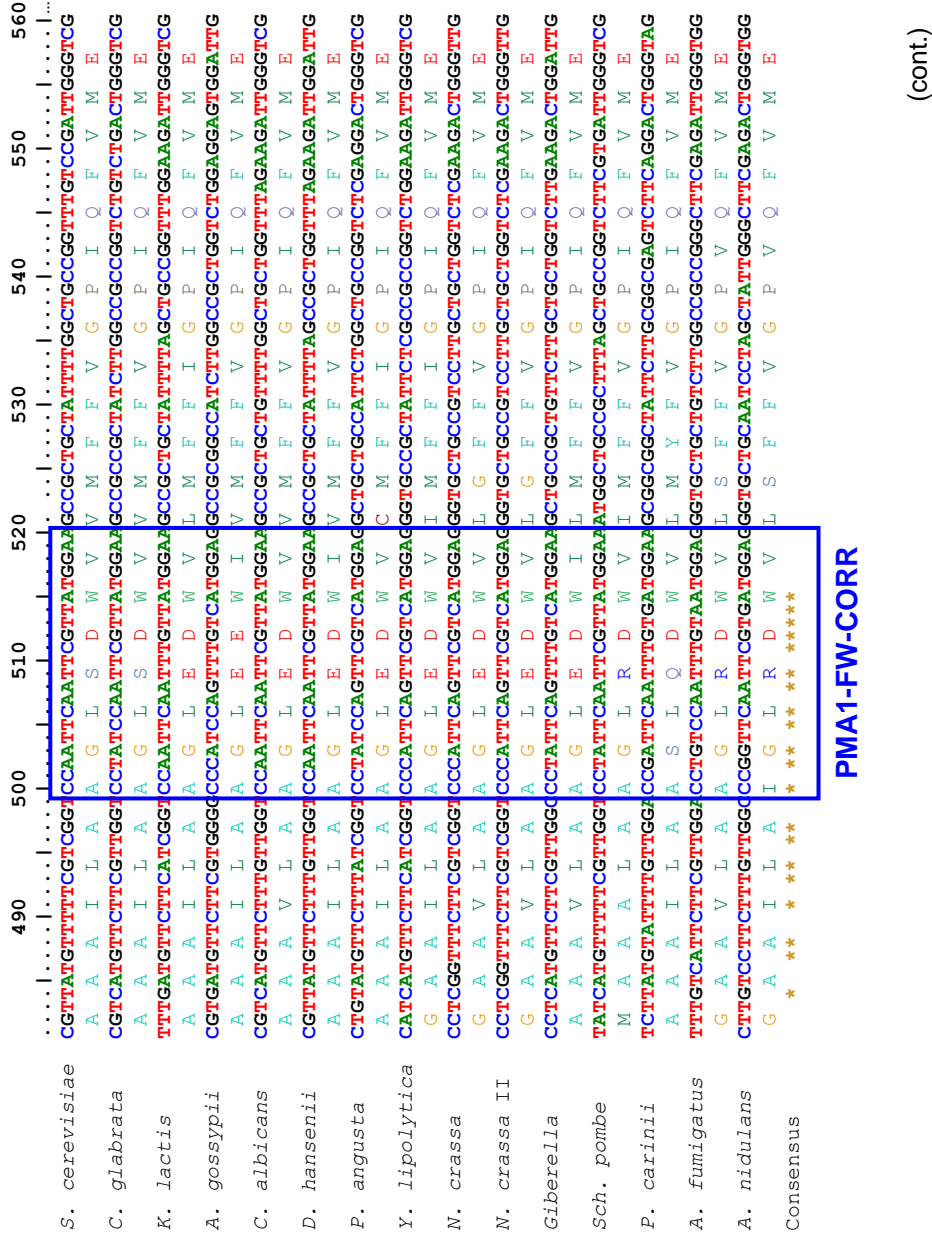
## **APÊNDICE III**

### **SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DE *PMA1* COMO BASE PARA O DESENHO DE *PRIMERS***





**Figura III.1.** Sequência nucleotídica do gene *PMA1* em *S. cerevisiae*. Letras a azul - zona amplificada com os *primers* degenerados desenhados neste trabalho; caixa azul - localização de *primer* PMA1-FW-CORR; caixa verde - *primer* PMA1-REV1; e caixa vermelha - *primer* PMA1-REV2.



**Figura III.2.** Alinhamento de seqüências de aminoácidos de PMA1 das leveduras e fungos filamentosos considerados para o desenho dos primers degenerados (caixas) utilizados no presente estudo.



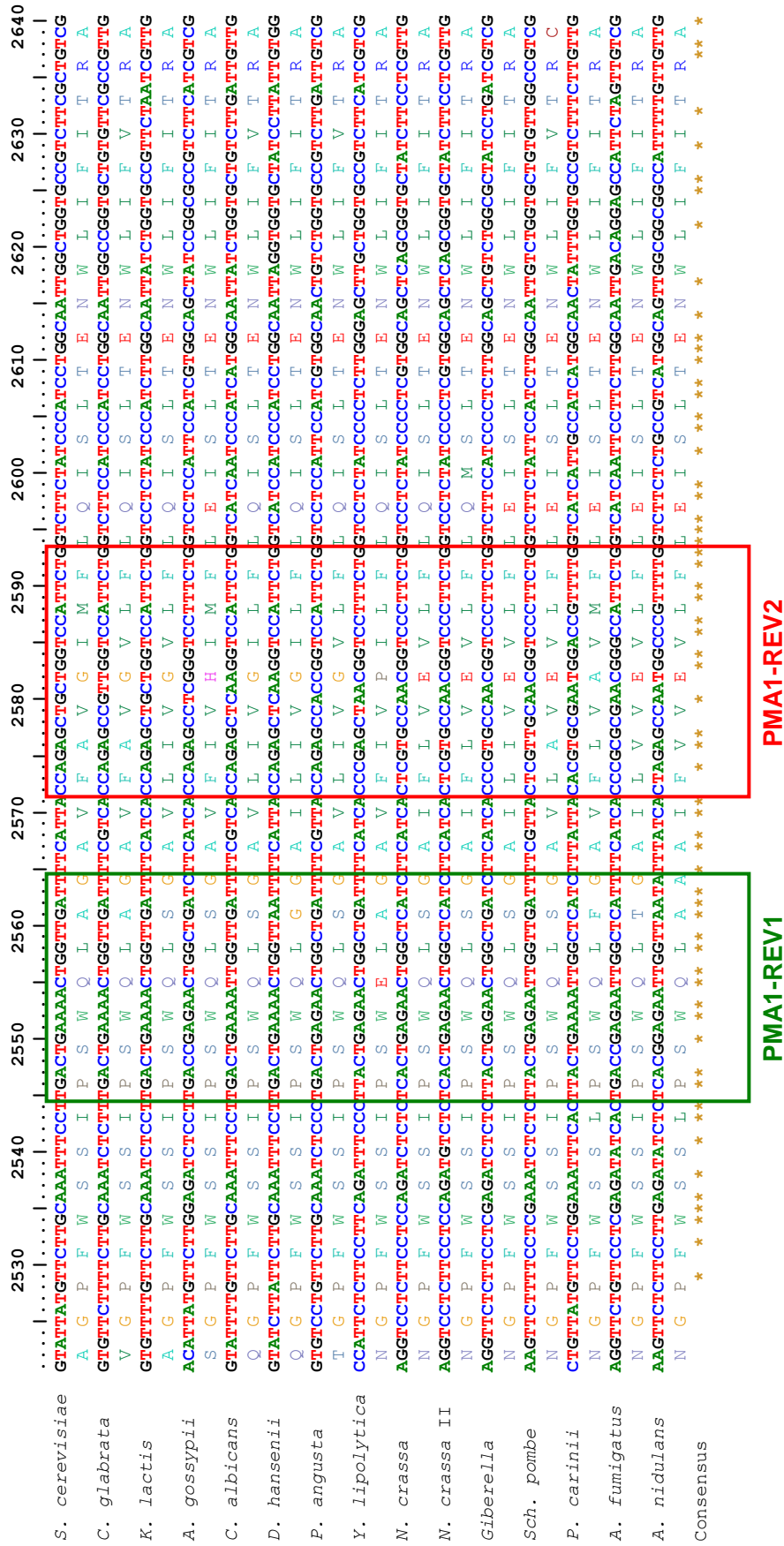


Figura III.2. (continuação)