

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

ESTEBAN ESPINOSA VIDAL

**INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NO PERFIL
FERMENTATIVO, TRANSCRIPTÔMICO, E NA PRODUÇÃO DE ÁLCOOIS
SUPERIORES EM *Saccharomyces cerevisiae*.**

RECIFE - PE

2012

ESTEBAN ESPINOSA VIDAL

**INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NO PERFIL
FERMENTATIVO, TRANSCRIPTÔMICO, E NA PRODUÇÃO DE ÁLCOOIS
SUPERIORES EM *Saccharomyces cerevisiae*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Genética.

Área de Concentração: Genética Molecular

Orientador: **Prof. Dr. Marcos Antônio de
Morais Júnior**, Depto. de Genética, Centro de
Ciências Biológicas, UFPE.

Co-Orientador: **Dr Jean Marie François**, INSA,
UPS, INP; INRA, UMR792 Ingénierie des
Systèmes Biologiques et des Procédés, and
CNRS, UMR5504, Toulouse, France.

Recife, PE

2012

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

V648i Vidal, Esteban Espinosa

Influência da fonte de nitrogênio no perfil fermentativo, transcriptômico, e na produção de alcoóis superiores em *Saccharomyces cerevisiae* / Esteban Espinosa Vidal. – Recife: O Autor, 2012.

90 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antônio de Moraes Júnior

Coorientador: Jean Marie François

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Genética, 2012.

Inclui referências

1. Bebidas fermentadas 2. Leveduras (Fungos) 3. Cachaça 4. Genes I. Moraes Júnior, Marcos Antônio (orientador) II. François, Jean Marie (coorientador) III. Título.

663.13

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-181

ESTEBAN ESPINOSA VIDAL

INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NO PERFIL
FERMENTATIVO, TRANSCRIPTÔMICO, E NA PRODUÇÃO DE ÁLCOOIS
SUPERIORES EM *Saccharomyces cerevisiae*.

APROVADO EM 18 de Maio de 2012.

ANCA EXAMINADORA:

Dr. Marcos Antônio de Morais Junior
Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio de Morais Junior (UFPE)

Dr. Daniel Pereira da Silva
Membro Externo: Dr. Daniel Pereira da Silva (UNIT/SE)

Dr. Tercilio Calsa Junior
Membro Interno: Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior (UFPE)

Dr. Nelson Medeiros de Lima Filho
Membro Externo: Prof. Dr. Nelson Medeiros de Lima Filho (UFPE)

Dra. Ana Paula Silveira Palm
Membro Externo: Profa. Dra. Ana Paula Silveira Palm (UFPE)

Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Coordenador do Programa: Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino (UFPE)

Recife, PE
2012

AGRADECIMENTOS

A meus colegas do laboratório “Engineering of Biological Systems and Process” do INSA, Toulouse. Especialmente a Dong-Dong.

A meus colegas de laboratório do Núcleo de Engenharia Metabólica

A Marcos Antonio Moraes Jr. pelo seu grande apoio, ajuda e confiança.

A Jean Marie François pelo seu apoio e confiança.

A Gustavo de Billerbeck pela sua grande ajuda em todos os aspectos pessoais e profissionais.

A Marie Odile pela sua grande ajuda.

A Alyne Nunes pela grande ajuda e companheirismo.

A FACEPE e a CAPES/CNPQ pelo suporte financeiro recebido.

**“O que observamos não é a natureza em si,
mas, a natureza exposta no nosso método de questionamento”**

Werner Karl Heisenberg

RESUMO

Durante o processo fermentativo de elaboração de Cachaça, a levedura *Sacharomyces cerevisiae* produz uma série de compostos com propriedades organolépticas, destacando-se por a sua importância os álcoois superiores. A sua formação depende de numerosos fatores, sendo a fonte e a concentração de nitrogênio um dos mais importantes. Nos últimos anos tem sido frequente o acréscimo de sais de amônio para melhorar o desempenho fermentativo em alambiques artesanais. Neste contexto científico e industrial, com o fim de determinar o efeito desta suplementação nutricional na formação dos álcoois superiores, e por consequência no perfil organoléptico, analisamos ao nível transcritômico e metabólico a produção de álcoois superiores pela linhagem industrial de *S. cerevisiae* JP1, empregada na produção de aguardente de cana, e pela linhagem de laboratório CEN.PK113, usada como referência, durante culturas em meio mineral com diferentes fontes de nitrogênio na forma de amônio (como sal de sulfato), leucina, isoleucina, valina, triptofano e fenilalanina. Os resultados cinéticos (μ_{max} , t_d) e parâmetros fermentativos (consumo de glicose, e produção de acetato e etanol) mostraram o melhor desempenho fermentativo para o meio sulfato de amônio e valina, e estes superiores aos obtidos para os cultivos em leucina, isoleucina e fenilalanina. Já a cultura com triptofano apresentou um crescimento deficiente. Isto confirmaria a prática usual dos produtores de cachaça de adicionar sulfato de amônio para evitar problemas de baixo rendimento. A produção dos álcoois superiores atingiu níveis de entre 300 a 1000 $\mu\text{g/L}$ nos cultivos em aminoácidos como fonte de nitrogênio, enquanto foi observada uma baixa produção ($<8 \mu\text{g/L}$) nos meios com amônio. Pela produção dos álcoois superiores, pode-se observar que o catabolismo de aminoácidos ramificados e aromáticos seguiu principalmente a via de Ehrlich. O rendimento de conversão dos aminoácidos adicionados aos álcoois correspondentes foi calculado no intervalo de 0,0042 a 0,0092%. Surpreendentemente, no meio com isoleucina foi verificada a produção de 3-metil-butanol entre 30 e 50 $\mu\text{g/L}$, composto derivado da leucina. A análise de transcrição gênica sugere que esta produção inusitada 3-metil-butanol pode ser resultado da síntese *de novo* do aminoácido leucina a partir do piruvato, e da aparente regulação temporal diferencial dos níveis de transcrição dos genes da via de Ehrlich. Ao mesmo tempo, sugerimos que a compartimentalização exercida pela mitocôndria e a atividade global das alfa-ceto ácidos descarboxilases sejam as principais causa da produção de álcoois superiores em meios nos quais não está presente o aminoácido precursor.

Palavras chaves: leveduras - cachaça - fermentação - compostos organolépticos - transcrição gênica.

ABSTRACT

During the fermentation process for Cachaça fabrication, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* produces a series of organoleptic compounds, highlighting the higher alcohols. Its formation depends on numerous factors, being the source and a nitrogen concentration one of the most important. In recent years, it has often been usual the addition of ammonium salts to improve the fermentation performance in craft stills. In this scientific and industrial context, with the aim of determine the effect of this nutritional supplementation in the formation of higher alcohols, and consequently in the flavor profile, we analyzed at transcriptomic and metabolic level the higher alcohols production of the industrial strain of *S. cerevisiae* JP1, used in the production of sugar cane, and the reference laboratory strain CEN.PK113, in mineral medium cultures with different nitrogen sources in the form of ammonium (as sulfate salt), leucine, isoleucine, valine, tryptophan and phenylalanine. The kinetic results (μ_{max} , t_d), and fermentation parameters (glucose consumption, and ethanol and acetate production) showed for the medium ammonium sulfate and valine the best performance, resulting in higher valor those obtained by the cultivation of leucine, isoleucine and phenylalanine. Already, tryptophan cultured showed poor growth. This will confirms the usual practice of cachaça producers of adding ammonium sulfate to avoid yield problems. The production of higher alcohols reached levels between 300 to 1000 $\mu\text{g/L}$ in amino acids cultures, while in medium with ammonium was low production (8 $\mu\text{g/L}$). For this reason, we noted that the catabolism of branched and aromatic amino acids mainly follows the Ehrlich pathway. The yield of conversion of the amino acid added to the corresponding alcohols was calculated in the range 0.0042 to 0.0092%. Surprisingly, it was observed in isoleucine medium the production of 3-methylbutanol from 30 to 50 $\mu\text{g/L}$, the leucine derivative compound. Analysis of gene transcription suggests that this unusual production of 3-methyl-butanol can be the result of de novo synthesis of leucine from pyruvate, and for the apparent temporal differential regulation of Ehrlich's genes transcription levels. At the same time, it is suggested that the compartmentalization exerted by mitochondria and the global activity of alpha-keto acids decarboxilases are the main cause of formation of higher alcohols in cultures where is absent the amino acid precursor.

Key words: yeast - cachaça - fermentation - organoleptic compounds – gene transcription - higher alcohol.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μ_{max}	Velocidade específica de crescimento máximo
2IE	2-indole-3-etanol
2MB	2-metil-butanol
2MP	2-metil-propanol
2PE	2-fenil-etanol
3MB	3-metil-butanol
A_{620nm}	Absorbância a 620 nanômetros
ADH1	Álcool desidrogenase 1
ADH2	Álcool desidrogenase 2
ADH3	Álcool desidrogenase 3
<i>att1Δ</i>	Mutante de <i>S. cerevisiae</i> com uma deleção no gene ATF1
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensageiro
ARO10	Fenil piruvato decarboxilase
AS	Sulfato de amônio
ATF1	Álcool acetil transferase 1
ATF2	Álcool acetil transferase 2
CEN.PK113	Linhagem de <i>S. cerevisiae</i> de laboratorio
CNPK	CEN.PK113
CoA	Coenzima A
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA copia
DNAg	DNA genómico
Família GATA	Grupo de fatores de ativação da transcrição cuja função é regulada por nitrogênio
GAAC	Sistema general de control da síntese de aminoácidos
<i>Gat1p</i>	Ativador transcricional de genes envolvidos na repressão de nitrogênio por catabólito
GC	Cromatografia gasosa
<i>Gln3p</i>	Ativador transcricional de genes envolvidos na repressão de nitrogênio por catabólito
GO	<i>Gene ontology</i>
<i>Gzf3p</i>	Proteína GATA dedos de zinc
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Iso	Isoleucina
JP1	Linhagem industrial
Leu	Leucina
LEU4	Alfa isopropil malato sintase
Lg-ATF1	Homologo a ATF1 presente numa linhagem para fazer cerveja

<i>MEP1</i>	Permease de amônio 1
<i>MEP2</i>	Permease de amônio 2
<i>MEP3</i>	Permease de amônio 3
<i>n</i>	Numero cromossômico
<i>NCR</i>	Repressão do nitrogênio por catabolito
<i>°Brix</i>	Graus °brix / índice de substâncias refractométricas
<i>OD</i>	Optic density / Densidade óptica
<i>ORF</i>	Open Reading Frame / marco aberto de leitura
<i>p</i>	p-valor ou nível descritivo
<i>PCR</i>	Polymerase Chain Reaction / Reação em Cadeia da Polimerase
<i>PDC1</i>	Piruvato descarboxilase 1
<i>PDC5</i>	Piruvato descarboxilase 5
<i>PDC6</i>	Piruvato descarboxilase 6
<i>PDR</i>	<i>Pleiotropic drug resistance</i> / Resistência pleiotrópica a drogas
<i>Phe</i>	Fenilalanina
<i>qPCR</i>	Reação em cadeia da polimerasa quantitativa
<i>Qr</i>	Quociente respiratorio
<i>r.p.m.</i>	Revoluções por minuto
<i>RT-qPCR</i>	Transcrição reversa e posterior PCR quantitativa.
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
<i>SDS</i>	Dodecil sulfato de sódio
<i>SFA1</i>	Álcool desidrogenase
<i>SGD</i>	<i>Sacharomyces Genome Database</i>
<i>SPS</i>	Sistema sensor de aminoácidos
<i>t_d</i>	Tempo de duplicação
<i>THI3</i>	Provável alfa ceto isocaproato descarboxilase
<i>Tor</i>	Proteína reguladora do sistema Tor
<i>Tryp</i>	Triptofano
<i>UASG_{CRE}</i>	<i>Sequência consenso 5´-GAGTCA-3´ que serve de sitio de ligação para Gcn4p</i>
<i>UAS_{INO}</i>	<i>Sequência consenso 5´-CATGTGAAAT-3´, sítio de ligação para Ino2p/Ino4p</i>
<i>Ure2p</i>	Regulador transcricional da Repressão do nitrogênio por catabólito
<i>YNB</i>	Nitrogênio Levedura Base
<i>YNB</i>	Yeast nitrogen base médium /meio com sais e vitaminas
<i>YPG</i>	<i>Yeast peptone Glicose médium</i> / meio contendo extrato de levedura, peptona e glicose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1. PROCESSO FERMENTATIVO	17
2.1.1. Elaboração de aguardente de cana artesanal	17
2.1.2. Leveduras: linhagens industriais e de laboratório	18
2.2. SUBSTÂNCIAS ORGANOLÉPTICAS	19
2.2.1. Generalidades	19
2.2.2. Álcoois superiores	19
2.2.2.1. 2-oxo ácido decarboxilases	22
2.2.2.2. Álcool desidrogenase	22
2.2.2.3. Relação entre anabolismo e catabolismo dos aminoácidos ramificados	23
2.3. METABOLISMO DE INOSITOL E FOSFOLÍPIDIOS	23
2.4. METABOLISMO DE IONS METÁLICOS	24
2.5. METABOLISMO DO NITROGÊNIO	26
2.5.1. Assimilação de fonte de nitrogênio	27
2.5.2. Regulação transcricional do metabolismo do nitrogênio.....	28
2.5.2.1. Influência do nitrogênio na formação de compostos organolépticos	29
2.6. ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA.....	31
2.6.1. Microarrays	31
3. OBJETIVO.....	34
3.1. objetivos específicos.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1. ENSAIO DE MICRO-FERMENTAÇÃO	35
4.1.1. Linhagem de levedura	35
4.1.2. Meio de cultura	35
4.1.3. Condições de fermentação	36
4.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS.....	37
4.2.1. Análise de açúcares e produtos do metabolismo principal	37

4.2.2. Análise de álcoois superiores	37
4.3. ANÁLISE DE TRANSCRIÇÃO	38
4.3.1. Análise de Microarranjo	38
4.3.2. Términos transcrição gênica.....	39
5. RESULTADOS	40
5.1. Analise parâmetros fermentativos	40
5.2. Analise produção de álcoois superiores	45
5.3. Analise transcricional	51
5.3.1. Abordagem geral	51
5.3.3. Genes relacionados com o metabolismo de lipídios e inositol.....	57
5.3.4. Genes relacionados com a homeostasis e o transporte de íons	58
5.3.5. Genes relacionados com o metabolismo de aminoácidos.....	58
5.3.6. Genes relacionados com a formação de álcoois superiores	60
6. DISCUSSÃO	66
6.1. Visão geral da problemática industrial.....	66
6.2. Analise dos parâmetros fermentativos.....	66
6.3. Produção de álcoois superiores.....	68
6.4. Analise transcricional no meio com isoleucina	69
6.4.1. Genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio e biotina.....	70
6.4.2. Genes relacionados com o metabolismo aeróbico, metabolismo de carboidratos, de inositol e com a assimilação de cátions.....	72
6.4.3. Grupo de genes requeridos para esporulação, formação de pseudomicelio e para o ciclo celular.....	75
6.4.4. Genes relacionados com a formação de álcoois superiores	76
7. CONCLUSÕES	79
8. REFERENCIAS	80

1. INTRODUÇÃO

A Cachaça é a bebida destilada tradicional do Brasil, produzida a partir da fermentação do suco de cana, em geral pelas leveduras da espécie *S. cerevisiae*. Durante este processo, além de produzir-se majoritariamente etanol e dióxido de carbono se elaboram uma série de compostos que afetam diretamente *obouquet* do produto final, destacando-se dentre estes os álcoois superiores. Estes metabólitos são provenientes do catabolismo dos aminoácidos ramificados e aromáticos e a sua formação depende de vários parâmetros, estando entre os mais importantes o tipo de nitrogênio assimilável assim como a regulação do padrão transcricional.

Na indústria da cachaça, existe a prática de acrescentar sais de amônio para melhorar o desempenho fermentativo das leveduras, não obstante pouco se sabe sobre o efeito da adição de nitrogênio no perfil sensorial. Até o momento só existe um estudo que relaciona a produção destes compostos com os níveis de expressão/transcrição dos genes principais nas vias metabólicas envolvidas na formação de álcoois superiores (ESPINOSA VIDAL *et al.*, 2011). Nesse contexto, o presente trabalho de tese pretende dar continuidade ao trabalho anterior de dissertação, agora com o objetivo de comparar o perfil de produção dos álcoois superiores em condições controladas de laboratório entre uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* e uma linhagem de laboratório de referência. Neste caso, empregando uma combinação de ferramentas analíticas para análises metabólicas (HPLC e GC), e genéticas (microarranjo de DNA).

Desta forma, espera-se estabelecer como as diferenças na fonte de nitrogênio influenciam no perfil fermentativo, no padrão de transcrição e por consequência nos níveis dos álcoois superiores. Dentre os vários fatores que influenciam a produção de cachaça artesanal, o uso de concentrações específicas de aminoácidos ramificados e/ou aromáticos deveria levar à produção de bebidas diferenciadas em aromas e sabores.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. PROCESSO FERMENTATIVO

2.1.1. Elaboração de Cachaça artesanal

A aguardente de cana de açúcar (Cachaça) é produzida por destilação do mosto fermentado a partir do caldo de cana. A cachaça obtida em pequena escala pelos produtores rurais em processos chamados de artesanais usando alambiques de cobre se diferencia tanto na sua elaboração como nas características sensoriais da cachaça produzida comercialmente usando colunas contínuas de aço inox (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A fabricação de cachaça artesanal começa com a moenda da cana de açúcar, que após ser filtrada é transvasada para as cubas de cobre ou aço inox onde a concentração do mosto é ajustada entre 14 e 20 °Brix. Este mosto pode ser fermentado usando dois inóculos: fermento caipira ou fermento comercial. Para o fermento caipira, o produtor prepara um inóculo natural (*pé de cuba*) que consiste em uma pasta com arroz triturado, farinha de milho e suco de limão (para acidificação) acrescido de caldo de cana a 6 °Brix, o qual permanece em repouso para que a microbiota se desenvolva de forma espontânea por 12 a 24 horas. Neste fermento, são isoladas predominantemente linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (PATARO *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2007; VILANOVA *et al.*, 2009; PBDAC). Já os fermentos comerciais consistem de linhagens de *S. cerevisiae* utilizados na panificação. Recentemente, linhagens comerciais isoladas para a produção de etanol combustível, tais como a JP1 (FILHO *et al.*, 2005), estão sendo utilizadas por pequenos produtores nos estados de Alagoas, Pernambuco e Paraná.

Dependendo do tipo de inóculo empregado, e devido à ausência de esterilidade durante o processo, a microbiota presente está em constante mudança conformando uma mistura complexa da população de leveduras, fungos e bactérias (YOUNIS e STEWART, 2000; MARINI *et al.*, 2009; VILANOVA *et al.*, 2009). Estes fatores fazem com que inóculos frescos tenham que ser preparados mais de uma vez por safra. Este é outro fator que justifica a prática recente de utilização de fermentos comerciais para padronizar os tempos de elaboração e, conseqüentemente, a qualidade do produto final.

Uma vez inoculadas, as leveduras desenvolvem-se em concentrações elevadas (na ordem de 10^9 cel/mL) até esgotar a fonte de carbono, indicado pela ausência de

liberação de dióxido de carbono. O mosto fermentado junto com as leveduras é transpassado para alambiques de cobre para destilação. O destilado é finalmente diluído com água entre 38 a 40% (v/v) de etanol para ser engarrafado, ou maturado em barris decarvalho por vários anos. A cuba de fermentação é deixada com 10 a 20% do mosto anterior (fermento pé-de-cuba), repetindo-se um novo ciclo por adição de caldo de cana fresco.

2.1.2. Leveduras: linhagens industriais e de laboratório

As linhagens industriais, linhagens selvagens isoladas do processo produtivo, apresentam adaptabilidade às condições de alto estresse, com elevadas taxas de fermentação, altos rendimentos de produto, e alta reprodutibilidade. Estas propriedades são resultado das diferenças na bagagem gênica. As linhagens de laboratório podem ser haplóides (n) ou diplóides ($2n$). Entretanto, as leveduras industriais são diplóides ($2n$), mais também podem ser triplóides ($3n$) ou tetraplóides ($4n$); apresentar aneuploidias, rearranjos cromossômicos e translocações (HAMMOND, 1995). Existe a hipótese de que a manutenção de mais de um número de cópias da maioria dos cromossomos outorgaria uma vantagem seletiva às leveduras no ambiente industrial. Da mesma maneira, o aumento no número de cópias de gene de metabolismos relacionados com esses ambientes traria a mesma vantagem (GOFFEAU *et al.*, 1996). Por exemplo, a repetição dos genes *MAL* relacionados à utilização de maltose produz um aumento na taxa de metabolização deste açúcar durante a fermentação da cerveja, já que a linhagem de laboratório S288C possui uma cópia de cada um dos genes *MAL* enquanto as linhagens de cerveja apresentam tipicamente 10 ou mais cópias destes genes (HAMMOND, 1995). Além disso, genes tais como aquele que codifica a enzima álcool acetil transferase (*Lg-ATF1*) parecem estar presente apenas em leveduras de cerveja, mas ausente no genoma da levedura S288C sequenciada. Algumas linhagens comerciais isoladas para a produção de álcool combustível apresentam repetições dos genes das vias de biossíntese de vitamina B6 (piridoxina) e B1 (tiamina), características relacionadas à adaptação daquelas células ao ambiente industrial (ANDERSON e KIRSOP, 1975).

2.2. SUBSTÂNCIAS ORGANOLÉPTICAS

2.2.1. Generalidades

Durante o processo de fermentação, as leveduras produzem um amplo espectro de substâncias aromáticas, que apesar de serem formados em pequenas quantidades, são capazes de determinar notoriamente diferenças na qualidade final dos fermentados.

Estas substâncias ativas podem ser divididas nos seguintes grupos principais: moléculas contendo enxofre, ácidos orgânicos, compostos carbonilos, álcoois alifáticos de cadeia meia ou álcoois superiores (álcoois de Fúsel), e ésteres voláteis (LAMBRECHTS e PRETORIUS, 2000; PISARNITSKII, 2001; HAZELWOOD *et al.*, 2008). Alguns destes contribuem positivamente para a qualidade final dos produtos, enquanto outros impõem sabores não desejados (*off-flavours*). Destes, os álcoois superiores representam o maior grupo e o mais importante já que são responsáveis pelos aromas florais e frutais altamente desejados nas bebidas alcoólicas (HAZELWOOD *et al.*, 2008).

2.2.2. Álcoois superiores

No processo fermentativo são produzidos álcoois com cadeias carbonadas de diferentes tamanhos que contribuem no aroma e sabor das bebidas alcoólicas. O produto majoritário obtido é etanol, mas também são produzidos álcoois alifáticos de cadeia média ou álcoois superiores, também conhecidos como álcool de fúsel (HAZELWOOD *et al.*, 2008). A contribuição sensorial desses produtos se dá na intensificação geral no sabor alcoólico e por conceder um caráter cálido na bebida (BOULTON e QUAIN, 2001). Além disso, o 2-feniletanol (2PE) confere aroma floral e de rosas e é um caráter procurado principalmente nos vinhos. As concentrações típicas dos álcoois superiores na cerveja são da ordem de 100 a 200 mg/L (BOULTON e QUAIN, 2001).

Os álcoois superiores podem ser produzidos a partir do metabolismo dos carboidratos através do piruvato, ou no metabolismo secundário na via de Ehrlich (EHRlich, 1907), rota catabólica derivada da assimilação dos aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, valina e isoleucina) e de cadeias aromáticas (Fenilalanina, triptofano e tirosina) (Figura 1).

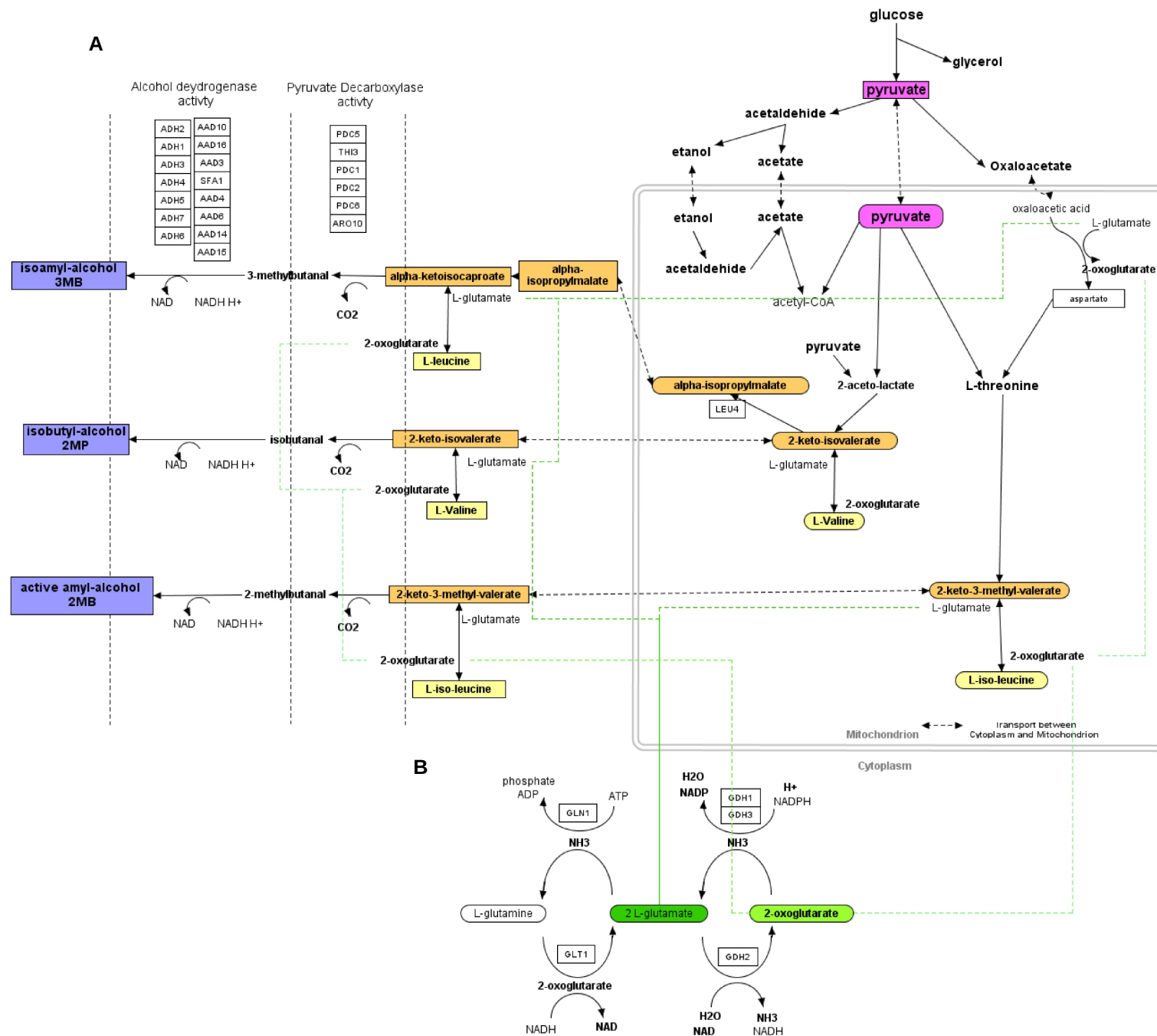


Figura 1. Vias metabólicas principais associadas à produção de alcoóis superiores. (Painel A) Anabolismo de aminoácidos ramificados e vía de Ehrlich. (Painel B) Metabolismo central do Nitrogênio. (Painel C) Anabolismo de aminoácidos aromáticos. Continua na próxima página.

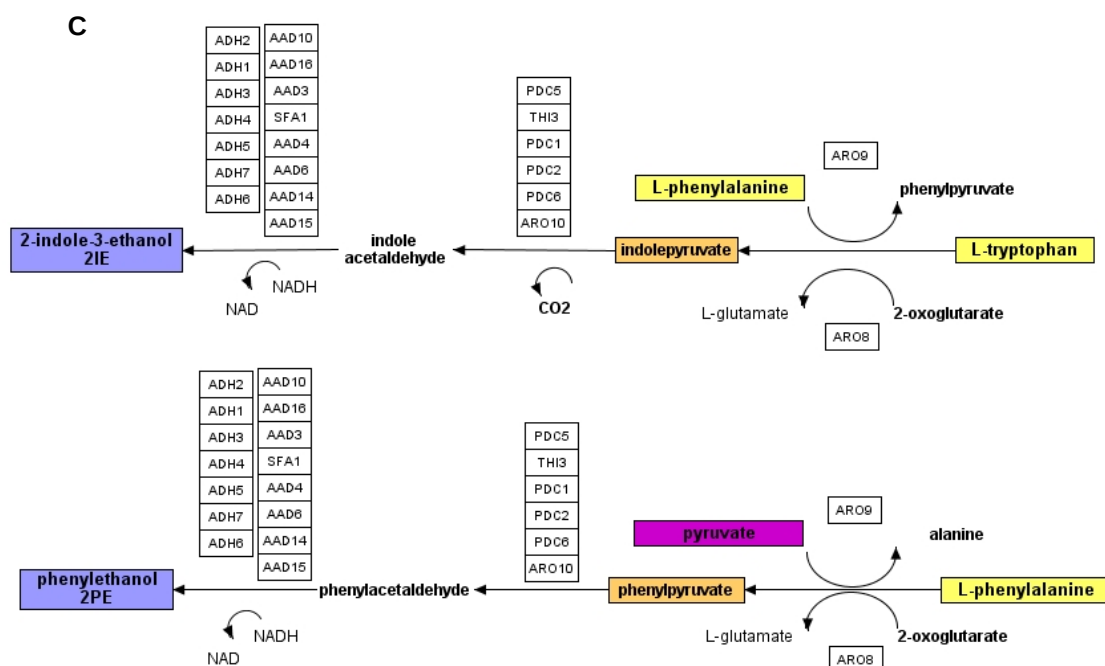


Figura 1. Vias metabólicas principais associadas à produção de álcoois superiores. (Painel A) Anabolismo de aminoácidos ramificados e via de Ehrlich. (Painel B) Metabolismo central do Nitrogênio. (Painel C) Anabolismo de aminoácidos aromáticos.

Dependendo do tipo de aminoácido catabolizado pela rota de Ehrlich, podem ser obtidos alguns dos principais álcoois superiores com importantes propriedades organolépticas:

- i) álcool isoamílico (3-metil-1-butanol: 3MB) a partir de leucina;
- ii) álcool amílico ativo (2-metil-1-butanol: 2MB) a partir de isoleucina;
- iii) isobutanol (2-metil-1-propanol: 2MP) a partir de valina;
- iv) triptofol (3-Indole etil álcool: 3IE) a partir de triptofano;
- v) tirosol a partir de tirosina;
- vi) feniletanol (2-feniletanol: 2PE) a partir de fenilalanina.

A produção destes compostos pode ser diretamente influenciada pela linhagem de levedura empregada (LILLY *et al.*, 2006; CARRAU *et al.*, 2008; VILANOVA *et al.*, 2009), pela modificação da composição do mosto e manipulação das condições da fermentação, como o tipo de nitrogênio assimilável no mosto (WANG *et al.*, 2003; DE ARAÚJO VICENTE *et al.*, 2006; GODARD *et al.*, 2007; JIMÉNEZ-MARTÍ *et al.*, 2007; VILANOVA *et al.*, 2007; CARRAU *et al.*, 2008; ESPINOSA VIDAL *et al.*, 2011) e das fontes de carbono disponíveis no meio (YOUNIS e STEWART, 2000). Uma vez produzidos, esses compostos são excretados para o meio já que não podem ser utilizados como fonte de carbono auxiliar no metabolismo principal.

2.2.2.1. 2-oxo ácido decarboxilases

As enzimas-chave na via catabólica de Ehrlich são as descarboxilases, das quais asceto-ácidos descarboxilases se constituem nas principais enzimas (Figura 1). Existem três genes estruturais para esta enzima no genoma de *S. cerevisiae*: *PDC1* (YLR044c), *PDC5*(YLR134W) e *PDC6* (YGR087C), dos quais o produto do gene *PDC1* aporta cerca de 80% da atividade piruvato descarboxilase em condições normais de fermentação(DICKINSON *et al.*, 2003). O gene *PDC1* codifica uma enzima que possui afinidade tanto para o piruvato como para os 2-oxo ácidos derivados do catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada, como leucina, isoleucina e valina(DICKINSON *et al.*, 2003). Observações comprovaram que esta proteína é a responsável pela maior atividade de descarboxilação destes compostos (VURALHAN *et al.*, 2005).

Dois outros genes apresentam similaridade de sequência com a família *PDC*, levando a serem classificados como descarboxilases: o gene *ARO10* (YDR380W) e o gene *KID1/THI3* (YDL080C). O gene *ARO10* só é expresso quando as células de levedura são cultivadas na presença dos aminoácidos aromáticos fenilalanina ou tirosina, revelando que a enzima Aro10p atua principalmente na descarboxilação de fenilpiruvato ou indolpiruvato (VURALHAN *et al.*, 2003). O gene *THI3* seria o responsável pela descarboxilação de alfa-ceto isocaproato no catabolismo de leucina (DICKINSON e DAWES, 1992). Entretanto, esta enzima também possui afinidade para os 2-oxo ácidos derivados dos aminoácidos ramificados. Em culturas com baixa disponibilidade de nitrogênio amoniacal, e na presença de aminoácidos ramificados ou aromáticos, observa-se uma queda na atividade Pdc1p e a indução da atividade Aro10p (VURALHAN *et al.*, 2005). Não obstante, mais recentemente foi apresentado que a adição de altas concentrações de sulfato de amônio é capaz de induzir a expressão do gene *ARO10* em condições fermentativas similares às indústrias (ESPINOSA VIDAL *et al.*, 2011).

2.2.2.2. Álcool desidrogenase

Outro passo importante na via de Ehrlich para a formação de álcoois superiores é a reação de redução dos alfa-ceto aldeídos produzidos após a reação de descarboxilação dos alfa-ceto ácidos (Figura 1). Esta redução é realizada pela atividade álcool

desidrogenase dependente de NAD(P)H. No genoma de *S. cerevisiae* existem oito genes que codificam para álcool desidrogenases: *ADH1* (YOL086C), *ADH2* (YMR303C), *ADH3* (YMR083W), *ADH4* (YGL256W), *ADH5* (YBR145W), *SFA1* (YDL168W), *ADH6* (YMR318C) e *ADH7* (YCR105W). As enzimas Adh1p a Adh5p estão primariamente envolvidas no metabolismo de etanol, com a enzima Adh2p catalisando a reação reversível de oxidação de etanol a acetaldeído. Já as enzimas Adh6p e Adh7p são membros da família da cinnamil álcool desidrogenase que participariam primariamente na síntese de álcoois superiores (LARROY *et al.*, 2002). A enzima Sfa1p é membro do grupo de álcool desidrogenase que pode atuar numa ampliada variedade de substratos, atuando primariamente na detoxificação de compostos aldeídicos (DICKINSON e DAWES, 1992).

2.2.2.3. Relação entre anabolismo e catabolismo dos aminoácidos ramificados

Um fator importante no balanço da produção dos álcoois superiores ramificados é a integração entre as vias de biossíntese de valina e de leucina que têm como ponto em comum o intermediário alfa-cetoisovalerato (Figura 1). Este intermediário pode ser aminado para produzir valina, descarboxilado e seguidamente reduzido para produzir 2-metil-propanol ou ainda convertido a alfa-isopropilmalato pela alfa-isopropilmalato sintase, produto do gene *LEU4* (YNL104C). Deste segundo intermediário podem ser produzidos a leucina e o álcool superior 3-metil-butanol (Figura 1). Esta enzima é inibida alostericamente por retro-alimentação quando os níveis de leucina são altos (CASALONE *et al.*, 1997). Uma mutação no gene *LEU4*, que elimina esta retro-alimentação ocasiona a hiper-produção de 3-metil-butanol (OBA *et al.*, 2005).

2.3. METABOLISMO DE INOSITOL E FOSFOLIPÍDIOS

Os genes envolvidos na síntese de fosfolipídios apresentam uma complexa regulação da transcrição em relação a seus precursores, inositol e colina (PALTAUF *et al.*, 1992; GREENBERG e LOPES, 1996) assim como em relação à disponibilidade de nitrogênio (GRIAC e HENRY, 1999). O mais altamente regulado destes genes é *INO1*, o que codifica a enzima Inositol-3-fosfato sintase, envolvida na síntese de fosfatos de

inositol e inositol. Durante a fase logarítmica de crescimento o gene *INO1* e outros genes coordenadamente regulados estão desreprimidos. Se inositol é adicionado ao meio de crescimento estes genes são reprimidos (NIKOLOFF e HENRY, 1994). A co-regulação está garantida pela presença de um elemento consenso repetido (5'-CATGTGAAAT-3') (HIRSCH e HENRY, 1986; LOPES e HENRY, 1991; NIKOLOFF e HENRY, 1994) conhecido como a sequência ativadora sensível a inositol (UAS_{INO}), o qual foi detectado nos promotores de vários genes que resultaram fortemente co-induzidos junto a *INO1*, envolvidos na biosíntese de fosfolipídios, ácidos graxos e esterol (LOPES e HENRY, 1991; SANTIAGO e MAMOUN, 2003), como os genes que codificam a fosfatidilserina sintase (*CHO1*), a CDP diacilglicerol-sintase (*CDS1*), a metiltransferase fosfolipídica *OPI3*, e o transportador de inositol (*ITR1*) (SANTIAGO e MAMOUN, 2003).

Este elemento consenso UAS_{INO} é o sítio de ligação para o heterodímero composto dos produtos gênicos de *INO2* e *INO4*, cuja união ativa a transcrição do gene. Cepas contendo mutações *ino2* e *ino4* são auxotróficas para inositol e exibem outras anormalidades do metabolismo de fosfolipídeos, devido à falta de desrepressão do gene *INO1* e a outros genes do metabolismo lipídico co-regulados (LOEWY e HENRY, 1984). As mutações em um terceiro locus, *OPI1*, levam à super-expressão de *INO1* e à conseqüente superprodução de inositol.

2.4. METABOLISMO DE IONS METÁLICOS

Os íons metálicos tais como ferro, cobre e zinco são nutrientes essenciais para as células. Os íons de ferro e cobre são necessários em várias enzimas chaves na levedura *S.cerevisiae*. Por exemplo, a capacidade das células para crescer em fontes de carbono não fermentável depende da existência de um complexo ativo de citocromo-oxidase, o que requer íons de cobre e ferro como cofatores. Ao mesmo tempo, o crescimento oxidativo requer dos citocromos, que possuem na sua estrutura o grupo hemo, assim como moléculas de defesa contra intermediários reativos de oxigênio como a enzima superóxido dismutase, uma metaloenzima de cobre que funciona como detoxificador do radical de oxigênio. A metaloenzima Fet3p, é uma ferro-oxidase importante para a absorção de Fe (II), apresentando o íon cobre na sua estrutura (ASKWITH *et al.*, 1994). Uma variedade de outras oxidases e oxigenases requerem Cu (II) e Ferro (II) como

cofactor funcional em outras espécies de organismos(GROSS *et al.*, 2000). Porém, a superacumulação destes metais também pode ser tóxico. Quando o nível intracelular de um íon metálico aumenta além de algum nível crítico, pode interferir com processos vitais e resultam na morte da célula. Por tudo isto,a assimilação pela levedura é altamente regulada, dependendo ao mesmo tempo do conteúdo de oxigênio do meio.

Em condições baixas em O₂, o ferro está geralmente no estado de oxidação +2 (ferroso) em forma solúvel. Porém, em condições óxicas, o ferro está como +3 (férico), formando vários minerais insolúveis. O íon Fe (III) tem baixa solubilidade a pH neutro e por conseqüência não pode ser utilizado pelos organismos. Os sideróforos microbianos dissolvem estes íons aos complexos de Fe (III), que podem ser assimilados por mecanismos de transporte activo nas leveduras. Por exemplo, as leveduras podem absorver ferro ligado à sideróforos microbiana(GROSS *et al.*, 2000),ou também usar um mecanismo redutor. O ferro extracelular (III) é reduzido para ferro (II) pela atividade das reductases Fre1p e Fre2p localizadas na membrana plasmática(DANCIS *et al.*, 1990;GEORGATSOU e ALEXANDRAKI, 1994). O produto ferrico (II) é em seguida, o substrato de um sistema de alta afinidade de transporte composto da oxidase multi-cobre Fet3p e a permease Ftr1p(ASKWITH *et al.*, 1994; STEARMAN *et al.*, 1996). A oxidase Fet3p usa O₂ como um substrato para oxidar o Fe (II) de volta para o Fe (III) para o transporte subsequente por Ftr1p(DE SILVA *et al.*, 1995). A captação de cobre de alta afinidade também é mediada por um mecanismo redutivo. O cobre extracelular (II) é reduzido a cobre (I) pela redutase Fre1p antes do transporte através da membrana plasmática pelos transportadores *CTR1* e *CTR3*(GEORGATSOU *et al.*, 1997; ISHIDA *et al.*, 2002). Finalmente, o transporte de zinco de elevada afinidade é mediada pelas proteínas Zrt1p e Zrt2p(ZHAO e EIDE, 1996a; b).

Estes sistemas de absorção de alta afinidade são firmemente reguladas, em resposta ao estado celular de seus respectivos substratos metálicos. Condições limitantes de ferro desencadeiam aumento da expressão de genes *FRE1*, *FRE2*, *FET3*, *FTR1*, assim como varios outros genes também envolvidos na aquisição de ferro (EIDE, 2000). Esta indução é mediada por dois fatores de transcrição relacionados, *AFT1* e *AFT2*(BLAISEAU *et al.*, 2001; RUTHERFORD *et al.*, 2001). De um modo semelhante, a expressão dos genes *ZRT1* e *ZRT2* são induzidas sob a deficiência de zinco pelo fator de transcrição Zap1p (ZHAO e EIDE, 1997), entretanto que os transportadores de captação

de cobre são regulados pela proteína ativadora de resposta a cobre Mac1p(JUNGSMANN *et al.*, 1993).

Além dos sistemas de alta afinidade, os sistemas de baixa afinidade de captação para estes substratos também estão presentes em levedura, como o transportador de ferro (II) de baixa afinidade codificada pelo gene *FET4*(DIX *et al.*, 1994; DIX *et al.*, 1997). A proteína Fet4p está localizada na membrana plasmática. Em adição ao seu papel no transporte de ferro, Fet4p também tem sido demonstrado ser um transportador fisiologicamente relevante de cobre (HASSETT *et al.*, 2000; PORTNOY *et al.*, 2001)cobalto, manganês, e zinco(WATERS e EIDE, 2002). O cobre, cobalto, cádmio inibem a transcrição de *FET4*(DIX *et al.*, 1994;HASSETT *et al.*, 2000), enquanto que em condições deficientes em ferro resulta grandemente elevada, relatando que o promotor de *FET4* poderia ser alvo do Zap1p (DIX *et al.*, 1997). Estas observações fazem com que Fet4p desempenhe um papel central na acumulação de um número de íons metálicos em levedura. Também, parece que expressão de *FET4* se incrementa em condições anaeróbicas, e que esta regulação é mediada por *ROX1*, um importante repressor na regulação por oxigênio (TER LINDE *et al.*, 1999). A detecção de oxigênio por *ROX1* ocorre em resposta a hemo, a síntese de hemo requer oxigênio, portanto, as células cultivadas em condições anaeróbicas são hemo-deficientes (WATERS e EIDE, 2002).

2.5. METABOLISMO DO NITROGÊNIO

As leveduras podem utilizar como fonte de nitrogênio algo como 30 compostos diferentes, como aminoácidos, uréia, amônio, bases nitrogenadas e derivados de purina(COOPER, 1982). Estas moléculas entram nas células através de permeases, e são imediatamente utilizadas como unidades de construção em reações de biossíntese ou são catabolizadas para liberar o nitrogênio na forma de amônio (via desaminação), glutamato (via transaminação) ou ambas (COOPER, 1982; MAGASANIK, 1992). Em igual sentido, a glutamina é sintetizada pela condensação de glutamato e amônio. O glutamato e a glutamina são os dois principais doadores de nitrogênio nas reações de biossíntese celular. O amônio, o glutamato, e a glutamina estão interligados por sistemas enzimáticos específicos formando o núcleo do metabolismo do nitrogênio (COOPER, 1982; MAGASANIK, 1992) (Figura 1).

2.5.1. Assimilação de fonte de nitrogênio

Em *S. cerevisiae* o amônio pode ser incorporado diretamente através das permeases amônio-específicas codificadas pelos genes *MEP1*, *MEP2* e *MEP3*, cujas expressões são reguladas pelo sistema de repressão catabólica do nitrogênio (*Nitrogen Catabolite Repression* ou NCR)(ver 2.5.2. Regulação transcricional do metabolismo do nitrogênio). Já os aminoácidos podem ser absorvidos por 23 permeases, entre gerais e específicas, a maioria sob a regulação do NCR e do sistema SPS, podendo ser assimilados em uma seqüência estável independente das condições de fermentação empregadas(JONES e PIERCE, 1964). Esta observação proporcionou a classificação dos aminoácidos em quatro grupos. No grupo A, formado pelos aminoácidos primariamente absorvidos do meio de cultura, estão glutamina, ácido glutâmico, arginina e serina. No grupo B, formado pelos aminoácidos assimilados mais lentamente, estão valina, leucina e isoleucina. No grupo C, formado pelos aminoácidos absorvidos apenas após a completa assimilação dos aminoácidos do grupo A, se encontram fenilalanina, tirosina e triptofano. O grupo D é formado apenas pela prolina, um aminoácido de baixa absorção (O'CONNOR-COX e INGLEDEW, 1989). Porém, esses aminoácidos podem ser também classificados com base na importância como reguladores do desenvolvimento de compostos sensoriais da cerveja (Tabela 1) (QUAIN e DUFFIELD, 1985). Neste caso, a classe 1 corresponde a aminoácidos com pouca importância para a formação de compostos organolépticos já que eles podem ser assimilados a partir do meio ou sintetizados do metabolismo dos açúcares e em reações de transaminação. Deficiências na classe dois e três são de maior importância. Por exemplo, existe uma relação bem marcada entre a disponibilidade de valina e a produção de diacetil (BOULTON e QUAIN, 2001).

Tabela 1. Classificação dos aminoácidos baseados no efeito na produção de compostos sensoriais (QUAIN e DUFFIELD 1985).

classe 1	classe 2	classe 3
aspartato	isoleucina	lisina
asparagina	valina	histidina
glutamato	fenilalanina	arginina
serina	glicina	leucina
metionina	tirosina	
prolina		

2.5.2. Regulação transcricional do metabolismo do nitrogênio

O nitrogênio desempenha um papel principal em diversas funções e processos biológicos (JIMÉNEZ-MARTÍ *et al.*, 2007). Devido à sua importância, o metabolismo do nitrogênio está sujeito a um ajustado controle dependendo do tipo e fonte de nitrogênio presente no meio. Existe uma ampla rede de interações envolvidas tanto na formação de compostos nitrogenados (aminoácidos, por exemplo), como na sua degradação. No contexto das bebidas alcoólicas, o metabolismo do nitrogênio apresenta um forte impacto no conteúdo e tipo de álcoois superiores encontrados no produto final.

O controle transcricional pode ser de dois tipos: os específicos que afetam os genes de uma via anabólica, como o gene *LEU4* da biossíntese de leucina, que é regulado transcricionalmente pela presença de amônio, e os gerais como o controle geral de biossíntese de aminoácidos que afeta ao mesmo tempo várias rotas anabólicas de aminoácidos (HINNEBUSCH, 1992; KUNJI e ROBINSON, 2006). Neste último, o regulador principal é o fator de transcrição Gcn4p que ativa a expressão de um grande número de genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos. Este fator é mais ativo em células cultivadas em meios com baixos conteúdos de aminoácidos (HINNEBUSCH, 1992).

De maneira similar, existem dois tipos de controle transcricional dos genes envolvidos no transporte e catabolismo de aminoácidos: os específicos e os que afetam uma ampla variedade de genes (COOPER, 1982; WIAME *et al.*, 1985; MAGASANIK, 1992). Diversos compostos nitrogenados, como a prolina, serina, treonina, uréia e os aminoácidos aromáticos, induzem especificamente a transcrição dos genes envolvidos na sua utilização (GODARD *et al.*, 2007). No sentido contrário, existe um sistema de regulação denominado repressão catabólica do nitrogênio (*Nitrogen catabolite Repression* ou NCR), o qual é exercido reprimindo a expressão de diversos genes envolvidos na utilização de fontes de nitrogênio não preferencial, quando uma fonte de nitrogênio preferível (amônio, glutamine e asparagina, por exemplo) está disponível no meio (COOPER, 1982; WIAME *et al.*, 1985; MAGASANIK, 1992). Este sistema atua através da inibição de dois fatores de transcrição da família GATA (Gln3p e Gat1p), os quais apresentam a característica de se unir a sequência 5'-GATA-3' e ativar a transcrição dos genes-alvo (COOPER, 1982; MAGASANIK, 1992). Os fatores Gln3p e Gat1p são os mais ativos em condições de nitrogênio limitante, tais como o cultivo em meios com uréia ou

prolina (GODARD *et al.*, 2007). Na presença de nitrogênio mais assimilável, a proteína Tor dirige a inibição de Gln3p e Gat1p (BECK e HALL, 1999). A inibição de Gln3p por Tor envolve a proteína Ure2p (COSCHIGANO e MAGASANIK, 1991), enquanto que a repressão da expressão de Gat1p também depende do fator de transcrição Gzf3p/pil2p (COFFMAN *et al.*, 1997; ROWEN *et al.*, 1997; SOUSSI BOUDEKOU *et al.*, 1997).

2.5.2.1. Influência do nitrogênio na formação de compostos organolépticos

Os mostos empregados na indústria apresentam diversas fontes de carbono (principalmente sacarose, glicose e frutose) assim como nitrogênio, enxofre e outros elementos químicos essenciais para o desenvolvimento das leveduras.

A composição do nitrogênio no meio de cultura afeta o crescimento e a taxa de fermentação das leveduras. A deficiência de nitrogênio pode levar ao alongamento da fermentação (BISSON, 1991). Esta situação indesejável resulta em meios com alta concentração de açúcar residual, longos períodos de fermentação e riscos aumentados de contaminação microbiana. Na indústria do vinho, a quantidade de nitrogênio requerida para uma fermentação satisfatória está na ordem de 0,2-0,26 g N/L para algumas leveduras (MENDES FERREIRA *et al.*, 2004). Mais precisamente, no contexto da indústria do vinho, vários trabalhos apresentam meios sintéticos com alto conteúdo de nitrogênio na faixa de 0,3 g de N/L (na forma de 0,12 g de sulfato de amônio: 0,18 g de aminoácidos) e meios pobres ou com baixo conteúdo de nitrogênio com 0,06 g N/L (com a mesma proporção sulfato de amônio: aminoácidos) (ÄYRÄPÄÄ e LINDSTRÖM, 1977; JIMÉNEZ-MARTÍ *et al.*, 2007).

A correção da limitação em nitrogênio envolve a adição de sais de amônio ao mosto (CARRAU *et al.*, 2008). Esta suplementação além de incrementar as taxas fermentativas também pode produzir um efeito positivo nas propriedades sensoriais desejáveis no vinho, cerveja e uísque (HENSCHKE e JIRANEK, 1993; MENDES FERREIRA *et al.*, 2004; DE ARAÚJO VICENTE *et al.*, 2006; JIMÉNEZ-MARTÍ *et al.*, 2007; MENDES-FERREIRA *et al.*, 2007; CARRAU *et al.*, 2008). Porém, níveis excessivos deste componente podem ter consequências negativas ao produto final, tais como a formação de compostos com sabores não ansiados como por exemplo etil carbamato

(MONTEIRO *et al.*, 1989; JIMÉNEZ-MARTÍ *et al.*, 2007).

Em relação à produção de cachaça, o caldo de cana apresenta um conteúdo em sacarose de aproximadamente 120 a 180 g/L, e uma concentração de nitrogênio que ronda os 0,2 g/L na forma de sulfato de amônio (DE BARROS PITA *et al.*, 2011). Devido a este baixo conteúdo de nitrogênio se produzem inconvenientes similares aos observados na indústria vitivinícola. Nos últimos anos está sendo frequente o emprego de sais de amônio para suplementar o mosto extraído da cana de açúcar e melhorar assim o desempenho fermentativo das leveduras.

Entretanto, existem alguns estudos relacionando diferentes fontes de nitrogênio com os níveis de transcrição gênica e a produção de álcoois superiores na produção de bebidas alcoólicas, porém nenhum em cachaça. Somando-se, a grande dificuldade para comparar os resultados, já que as condições fermentativas assim como as concentrações de nitrogênio empregadas nos estudos diferem grandemente. Surge, então, a necessidade de entender como se produzem as inter-relações ao nível de expressão gênica e como estas podem ser relacionadas com o padrão de álcoois superiores produzidos no marco da produção de cachaça.

As fermentações alcoólicas são conduzidas em geral por linhagens industriais de *S. cerevisiae*. Esta levedura tem evoluído e estão adaptadas a crescer, como no caso particular da fermentação de caldo de cana, em condições fermentativas anaeróbicas com altas concentrações de açúcares e baixas concentrações de nitrogênio. Durante o processo fermentativo, as células estão submetidas a uma variedade continua de mudanças das condições ambientais, sendo classificadas como condições de estresse: osmótico pela glicose ao começo da fermentação (MAJARA *et al.*, 1996; HIGGINS *et al.*, 2003; VURALHAN *et al.*, 2003), por limitação o falta de nutrientes como nitrogênio ou aminoácido (ARITOMI *et al.*, 2004; MENDES-FERREIRA *et al.*, 2007), e toxicidade por produtos do metabolismo primário ou secundário, como etanol (VERSTREPEN, 2001; VERSTREPEN *et al.*, 2003). As mudanças contínuas observadas ao longo da fermentação têm influência direta sobre os níveis de transcrição dos genes, mecanismo necessário para a adaptação celular ao ambiente industrial. Vários estudos têm sido realizados usando a tecnologia do microarranjo de DNA para investigar estas variações.

2.6. ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA

2.6.1. Microarranjo (*Microarrays*)

A técnica de microarranjo de DNA mede os níveis de expressão de transcritos em grande escala, ao contrário de outras técnicas convencionais (*Northern Blot*) ou mais modernas (PCR quantitativo em tempo real ou RT-qPCR) que analisam a expressão de um gene por vez. Para isso dispõe de um arranjo pré-definido de pequenas moléculas de DNA (fragmentos de até 60 bases) correspondentes a cada um dos genes do organismo em estudo. Estas moléculas são ligadas quimicamente a uma superfície sólida, em geral lamina de vidro de forma que cada ponto (*spot*) corresponda a um gene específico e o conjunto dos pontos forme um arranjo (*arrays*) genômico. Para a confecção dos arranjos são utilizados robôs altamente precisos que aplicam as diferentes amostras de DNA nos pontos na lâmina em densidades aproximadas de 10.000 pontos/cm² para formar os microarranjos (*microarrays*). Para análise da expressão gênica global, ou de todo o transcriptoma em uma dada condição, o conjunto de moléculas de RNA das células é extraído e convertido por transcrição reversa a moléculas de DNA complementares (DNAc) na presença de fluorocromos como cianina 3 (Cy3) ou cianina 5 (Cy5). Em seguida, o DNA marcado é utilizado para hibridizar com os fragmentos fixados nos microarranjos. Desta maneira, se um gene tiver sido expresso nas células numa dada condição, então haverá produção do RNA correspondente que será convertido a DNAc. Então, essas moléculas de DNAc irão se ligar por complementaridade ao fragmento correspondente ao gene em um dos pontos do arranjo. Desta maneira, quanto mais o gene se expressa na célula, maior será a hibridização naquele ponto correspondente e maior a fluorescência detectada naquela posição do arranjo por escâneres de altíssima precisão. A imagem é então tratada por meio de algoritmos matemáticos que relacionam cada ponto e a sua posição na lamina com um gene específico, e correlacionando com a emissão do fluorocromo com uma intensidade de cor. E por fim, esses valores de intensidade são relativizados em relação a uma das amostras de referência. Existem dois procedimentos que são utilizados para a quantificação relativa da expressão gênica pelo microarranjo:

1. Na marcação simples, as amostras teste e de referência são marcadas com

o mesmo fluoróforo e hibridizadas em arranjos diferentes. Dessa forma, a expressão relativa se calcula pela razão entre a intensidade em um determinado ponto na amostra teste pela intensidade daquele mesmo ponto na amostra controle. Se a razão for >1 , então há mais moléculas daquele RNA na amostra teste e, portanto, o gene correspondente é dito como induzido na condição teste; se a razão for <1 , então há mais moléculas de RNA na amostra de referência e, portanto, o gene correspondente é dito como reprimido na condição teste; se a razão for próxima de um, considera-se que as duas condições possuem a mesma quantidade de RNA para aquele gene e que, portanto, aquele gene não responde à mudança imposta na condição teste.

2. Na marcação dupla (Figura 2), as amostras teste e de referência são marcadas com dois fluoróforos diferentes e utilizadas para hibridizar o mesmo arranjo. Geralmente a amostra teste é marcada com Cy5 (vermelho) e a amostra de referência com Cy3 (verde). Neste procedimento cada ponto pode ser lido pelo escâner no espectro que varia desde o vermelho intenso quando há mais moléculas daquele RNA na amostra teste e, portanto, o gene correspondente é dito como induzido na condição teste, até o verde intenso quando há mais moléculas de RNA na amostra de referência e, portanto, o gene correspondente é dito como reprimido na condição teste. Quando o ponto é lido como amarelo, no meio do espectro de emissão, considera-se que as duas condições possuem a mesma quantidade de RNA para aquele gene e que, portanto, aquele gene não responde à mudança imposta na condição teste.

A partir desta técnica é possível a análise do padrão de transcrição da grande maioria dos genes do organismo em estudo em relação a uma condição particular. No caso do presente trabalho, esta técnica permitirá a análise dos genes de *S. cerevisiae* que respondem a mudança da fonte de nitrogênio utilizada durante o crescimento celular, permitindo a identificação de genes relacionados com a produção dos álcoois superiores.

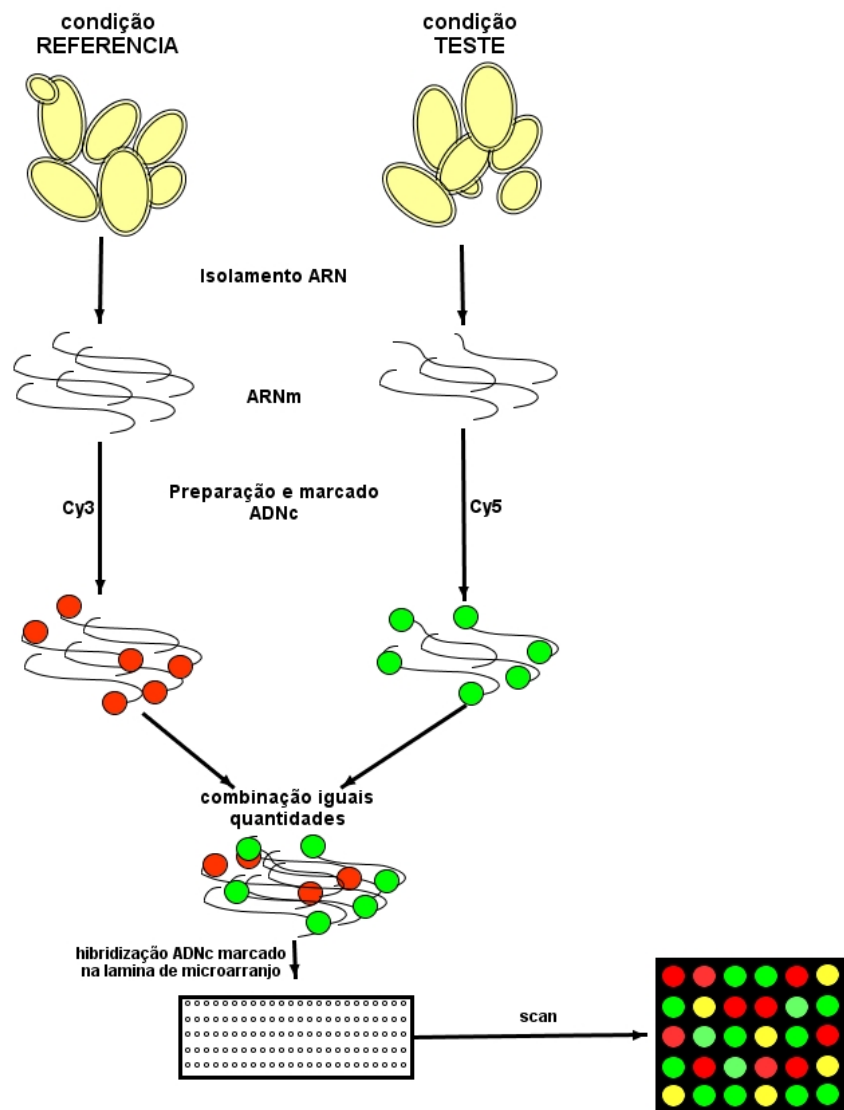


Figura 2. Esquema básico da análise da expressão gênica global relativa a partir da técnica de microarranjo de DNA empregando marcação dupla.

3. OBJETIVO.

O objetivo geral deste trabalho é decifrar os mecanismos moleculares que determinam diferenças na produção de álcoois superiores, comparando os níveis na expressão gênica e o fluxo metabólico entre uma linhagem industrial de interesse e uma linhagem de laboratório em condições fermentativas com diferentes fontes de nitrogênio assimilável.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 3.1.1. Avaliar a produção dos álcoois superiores em condições fermentativas das linhagens industriais JP1 e CNPK em meios sintéticos suplementado com diferentes fontes de nitrogênio.
- 3.1.2. Analisar o padrão de transcrição na condição fermentativa empregando isoleucina como fonte de nitrogênio.
- 3.1.3. Correlacionar a produção dos álcoois superiores com os níveis transcricionais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ENSAIO DE MICRO-FERMENTAÇÃO

4.1.1. Linhagem de levedura

Neste trabalho foi utilizada a linhagem industrial de *S. cerevisiae* JP1 (FILHO *et al.*, 2005) atualmente comercializada para destilarias de álcool combustível sob a marca Fermol Distiller® (AEB Bioquímica Latino Americana, Brasil) e que tem sido recentemente utilizada na indústria da cachaça por apresentarem critérios fermentativos favoráveis. Também foi empregada como referência a linhagem de laboratório diplóide CEN.PK113 (CNPq) (LIBSP, INSA Toulouse). Clones destas linhagens foram mantidos em estoques a -80°C em glicerol 30% até seu uso.

4.1.2. Meio de cultura

Para a preparação do pré-inóculo foi empregado o meio YPG (10 g/L de extrato de leveduras, 20 g/L de peptona, 20g/L de glicose). Para os ensaios em fermentadores de bancada foram utilizados meio sintético *yeast nitrogen base* (YNB, na forma sem nitrogênio) na concentração de 1,7 g/L, com glicose a 20 g/L como fonte de carbono e com os seguintes sais e vitaminas: fosfato de potássio 1000 mg/L, inositol 2 mg/L, sulfato de cobre 0,04 mg/L, sulfato de magnésio 500 mg/L, niacina 0,4 mg/L, iodeto de potássio 0,1 mg/L, cloreto de sódio 100 mg/L, ácido paraaminobenzóico 0,2 mg/L, cloreto férrico 0,2 mg/L, cloreto de cálcio 100 mg/L, piridoxina 0,4 mg/L, sulfato de manganês 0,4 mg/L, biotina 0,002 mg/L, riboflavina 0,2 mg/L, molibdato de sódio 0,2 mg/L, pantotenato de cálcio 0,4 mg/L, tiamina 0,4 mg/L, sulfato de zinco 0,4 mg/L, ácido fólico 0,002 mg/L, e ácido bórico 0,5 mg/L. As fontes de nitrogênio empregadas foram os aminoácidos leucina, valina, isoleucina, fenilalanina, triptofano e sulfato de amônio para atingir uma concentração final de 75 mM de nitrogênio em cada condição (Tabela 2). Nas condições em que ocorreu a suplementação com aminoácidos, a ausência do íon sulfato foi compensada por adição de uma quantidade equimolar de sulfato de potássio. As soluções concentradas dos aminoácidos e YNB foram esterilizadas mediante filtração em membrana de 0,22 µm e transferidos de forma estéril ao fermentador.

Tabela 2. Composição dos meios de cultura utilizados neste trabalho.

aminoácidos		glicose	K ₂ SO ₄	YNB	átomos nitrogênio	
	<i>g/L</i>	<i>g/L</i>	<i>g/L</i>	<i>g/L</i>	<i>mM</i>	<i>g/L</i>
AS	5	20	-	1.7	75	1.05
Val	8.76	20	3.63	1.7	75	1.05
Leu	9.84	20	3.63	1.7	75	1.05
Iso	9.84	20	3.63	1.7	75	1.05
Phe	12.39	20	3.63	1.7	75	1.05
Tryp	15.32	20	3.63	1.7	75	1.05

Foram utilizadas as seguintes fontes de nitrogênio:sulfato deamônio (AS),valina(Val),leucina(Leu),isoleucina(Iso), fenilalanina(Phe)etriptofano(Tryp).A concentração de nitrogênio elementarfina em cada meio é indicada.

4.1.3. Condições de fermentação

O pré-inóculo foi preparado a partir de um clone de cada linhagem de leveduras armazenada a -80°C, inoculando 5 mL de meio sintético YPG seguido de incubação em agitação a 200 r.p.m. a 30°C em rotação orbital toda a noite. No dia seguinte, o pré-inóculo obtido foi utilizado para semear 200 mL de meio YNB contendo a mesma fonte de nitrogênio que seria utilizada nos ensaios em fermentador de bancada. Após 12 h de incubação em agitação a 200 r.p.m. a 30°C, a cultura foi utilizada como inóculo em 2L de meio sintético YNB em fermentadores de vidro cilíndricos de 2,5 L (*Biostat® B plus*, *Sartorius*) de forma que a densidade inicial da cultura resultase em torno de 0,1 de absorbância a 620 nm (A_{620nm}). A fermentação foi conduzida com controle automático de temperatura (30°C) e do pH (5) com KOH, influxo de ar a 0,5 L/min e agitação inicial de 400 r.p.m. O sistema de controle automático do oxigênio dissolvido foi estabelecido para o mínimo de 40% relativo ao conteúdo de oxigênio no ar, de forma que quando esse valor diminuísse, a agitação e em seguida o influxo de ar fossem automaticamente aumentados para manter o valor em 40% pelo resto da fermentação. Isto assegura as condições aeróbicas do sistema. O progresso da fermentação foi conduzido por determinação direta da absorbância da cultura (A_{620nm}). Alíquotas foram tomadas de forma estéril, em volumes necessários para atingir uma quantidade celular suficiente para posterior extração de RNA. As alíquotas foram centrifugadas a máxima velocidade, a 18°C por 5 min e o

precipitado celular foi acondicionado em tubos micro-centrífuga de 2 mL e rapidamente esfriados em nitrogênio líquido, para ser armazenados a -80°C para seu uso posterior. O sobrenadante obtido foi armazenado em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL para análise de metabólitos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Cromatografia Gasosa (GC).

4.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

4.2.1. Análise de açúcares e produtos do metabolismo principal

Para determinar a concentração de etanol, acetato, glicerol, sacarose, glicose e frutose foi empregada uma coluna de exclusão *AMINEX HPX-87H*, precedido por uma pré-coluna *Micro-Guard* de intercâmbio catiônico (*Bio-Rad*), um injetor automático, um detector infravermelho e um detector ultravioleta. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 5 mM a um fluxo de 0,5 mL/min e mantida em um forno a uma temperatura de 70°C. A amostra injetada foi de 10 µL. Os compostos foram identificados por seus tempos de retenção relativos e quantificados por comparação direta com uma curva de diluição seriada dos padrões. Para este propósito, se utilizou uma solução concentrada de etanol, acetato, glicerol, sacarose, glicose e frutose (20 g/L de cada um) em água ultrapurificada.

4.2.2. Análise de álcoois superiores

Os compostos 3-metil-butanol, 2-metil-butanol, 2-metil-propanol, 2-fenil-etanol, e triptofol foram quantificados empregando um GC com uma coluna Poraplot Q (25 x 0.53) com hidrogênio como gás transportador e um detector de ionização (Hewlett Packard 5890A) e as seguintes condições: a temperatura de injeção de 250°C, temperatura inicial do forno de 115°C a uma temperatura final de 235°C, a uma taxa de 12 °C/min., uma isoterma de 10min, um fluxo do gás de 20mL/min e um volume de injeção de 10 µL. Para a determinação dos compostos foi realizada uma extração líquido/líquido a 4°C com dietil éter (50%) usando octanol (1 µg/mL) como padrão interno. A fase orgânica foi extraída por agitação mecânica em vórtex (1min), e centrifugação 5 min a velocidade máxima para separação das fases. A identificação dos compostos foi determinada por seus tempos de

retenção relativos e quantificados por comparação direta com a curva de calibração. Para este propósito, foi realizadas diluições (dez) a partir de uma solução dos compostos em 30% de etanol (1000 µg/L de cada um).

4.3. ANÁLISE DE TRANSCRIÇÃO

4.3.1. Análise de Microarranjo

A extração de ARN total, síntese de ADNc, e experimento de microarranjo, normalização e análise estatística dos dados se realizou na plataforma de genoma e transcrito *BIOPUCE* do INSA, Toulouse, França, segundo Novo e colaboradores (2007). Os chips de ADN foram produzidos na plataforma *Biochip* de Toulouse *Genopole* usando oligonucleótidos de 70-mer, representando aprox. 99% do genoma da levedura SC228.

Para a análise da expressão gênica foram utilizadas amostras provenientes dos tempos de 8h (início da fase de crescimento exponencial) e 16 h (metade da fase de crescimento exponencial) em meio isoleucina (Figura 3E). Foram utilizadas replicas técnicas, com quatro hibridações na lâmina, dois correspondentes ao tempo de 8 h e dois ao de 16 h em forma invertida. Os resultados descritos para cada gene provieram da média aritmética destes dois ensaios.

Os dados brutos foram normalizados empregando o programa *BIOPLOT* desenvolvido pela plataforma *BIOPUCE* (NOVO *et al.*, 2007). As intensidades obtidas foram corrigidas a partir do sinal do fundo, transformadas a função logaritmo (vezes *log*) e normalizado pela média da intensidade logaritmo de todos os pontos. Em toda a análise transcriptômica, as amostras correspondentes ao tempo de 16 h (metade da fase de crescimento exponencial) foram usadas como condição de interesse, e o tempo de 8 h (início da fase de crescimento exponencial) como a condição de referência. As razões logarítmicas das intensidades e normalizadas das amostras provenientes das réplicas biológicas foram testadas para significância estatística empregando o teste-t de *Student* pareados para duas caudas. O critério de decisão para determinar com significância estatística a expressão diferencial de cada gene foi mediante o emprego do valor *p* como limiar, corrigido pelo método de Benjamini e Hochberg ($p=0,01$). Ao mesmo

tempo, se utilizou como segundo critério de corte os valores de vezes *log*: $\geq 0,5$ e $\leq -0,5$. Os resultados obtidos expressos em vezes *log* foram transformados em vezes de expressão/transcrição (*fold change*) entre a condição de interesse relativo à condição de referência, usando a fórmula $\text{vezes } log = 2^{\text{vezes } log}$, devido a ter uma maior significância biológica.

Os genes regulados diferencialmente foram agrupados em grupo funcionais empregando a ferramenta *Gene OntologySlimMapper* disponível na plataforma do *Saccharomyces Genom database* (SGD) (CHERRY *et al.*, 2012), empregando como critério de agrupamento os termos GO que representam os principais processos biológicos (*Yeast GO-slim Process*).

4.3.2. Termos transcrição gênica

Neste trabalho se utilizara no concernente a transcrição gênica o termo expressão e/ou indução (ou induzido) para denotar maior nível de ARNm de um gene específico em uma condição teste relativo ao nível menor de ARNm do mesmo gene na condição referência. O mesmo critério se utilizou para o termo repressão (ou reprimido). Poderiam ser utilizados termos como “genes com maior nível de transcritos” ou “sobre transcritos” em vez de indução, Porém dificulta a escritura e o análise. Isto é devido a querer evitar ambiguidades, por ser amplamente utilizado na literatura científica em inglês.

4.4. Figuras

Todos os mapas metabólicos apresentados foram realizados empregando a ferramenta *PATHVISIO* ((VAN IERSEL *et al.*, 2008), modificando as vias enzimáticas publicas do banco de dados *WikiPathways* (KELDER *et al.*, 2012).

5. RESULTADOS

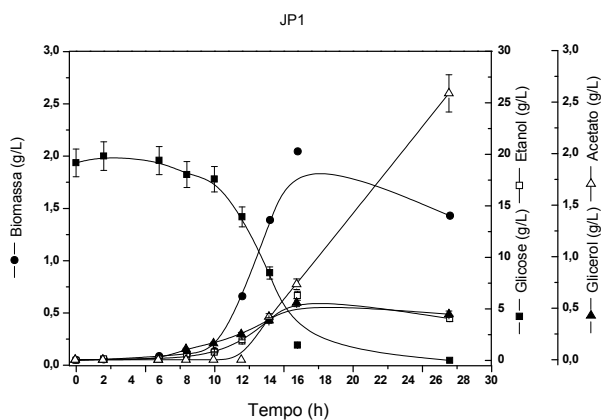
5.1. ANÁLISE PARÂMETROS FERMENTATIVOS

A figura 3 mostra o perfil fermentativo das duas linhagens nos meios com diferentes fontes de nitrogênio. Pode se observar de modo geral que em todos os meios o crescimento celular apresentou tempos de geração entre 2h30, no caso do sulfato de amônio (AS), e 5h52 no meio com fenilalanina (Phe) (Tabela 3), consumindo a totalidade da glicose presente no meio período máximo de 28 h. Já o cultivo em triptofano (Tryp) apresentou escasso consumo de glicose e por consequência escasso crescimento celular, com um tempo médio de geração prolongado de 7h45 para as duas linhagens (Figura 3I e 3J e Tabela 3), devido à possível deficiência na assimilação deste aminoácido. Por causa disso, o meio Tryp não foi usado no trabalho.

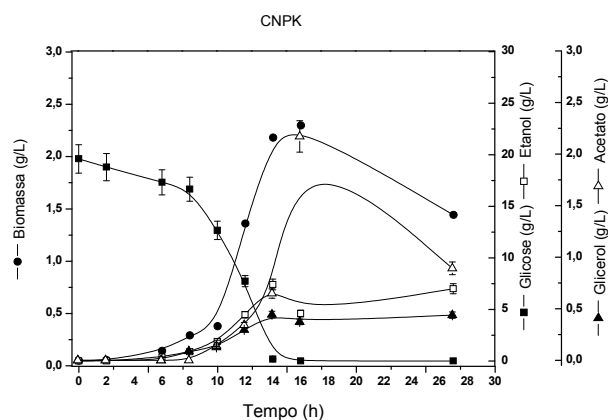
Em geral, analisando o perfil fermentativo das duas linhagens, o melhor desempenho fermentativo foi observado no meio AS (Figura 3 A e B), com consumo total da glicose nas 16 h de fermentação, com duas vezes menor tempo de geração, 64% maior taxa de consumo de glicose e 67 % maior rendimento de acetato do que nos meios com aminoácidos (Figura 4 e Tabela 3). O rendimento em etanol foi de 0,39 g/g e a produtividade média de 0,25 g/h.L Entretanto, a concentração final de etanol foi 3,2% menor do que no meio com valina (Val). Do conjunto, a concentração final de etanol foi superior a 4 g/L (com exceção do meio Tryp), atingindo um valor máximo de 7,31 g/L para a linhagem JP1 e 6,28 g/L para a linhagem CNPK no meio Val (Figura 4 e Tabela 3). Os parâmetros fisiológicos de consumo de glicose e produção glicerol e etanol foram semelhantes quando as células foram cultivadas em meio com os aminoácidos leucina (Leu), isoleucina (Iso) e fenilalanina (Phe), e inferiores àqueles apresentados nos meios AS e Val. No meio Leu foi observada a produção de acetato 35% maior que nos meios Iso e Phe (Figura 4).

SULFATO DE AMÔNIO

A

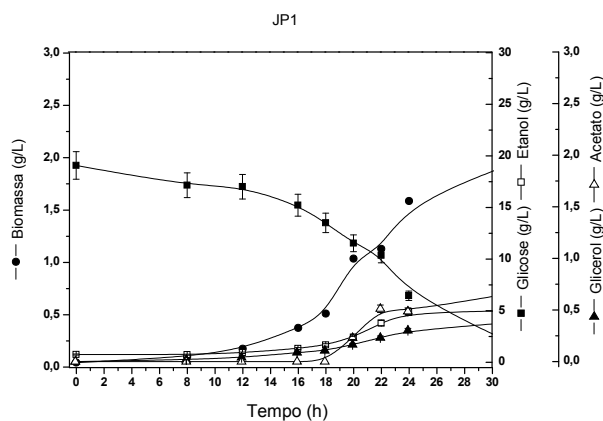


B

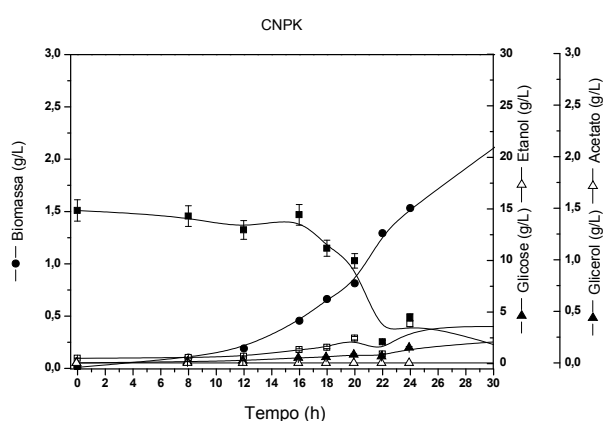


LEUCINA

C

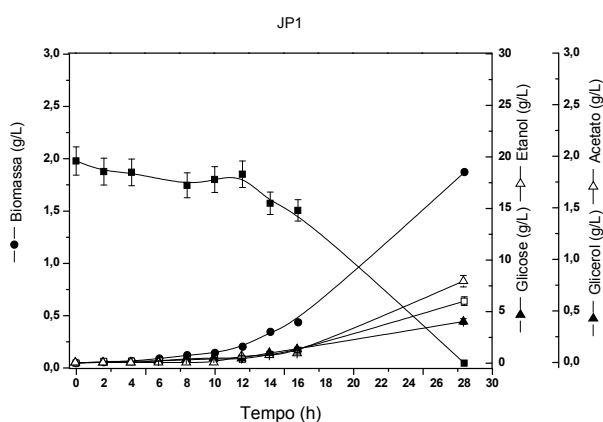


D



ISOLEUCINA

E



F

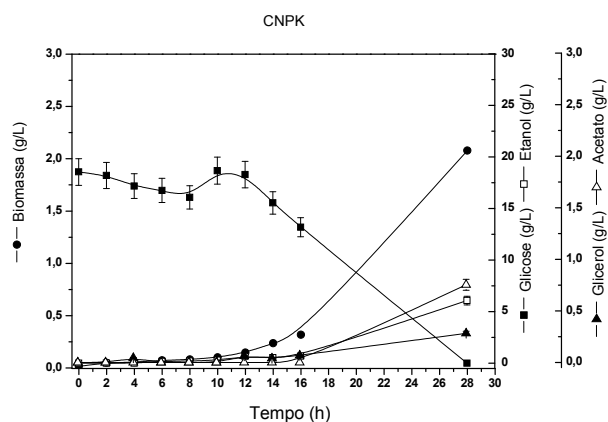
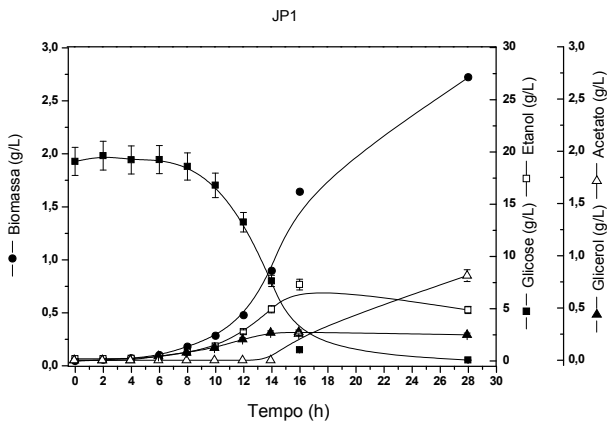


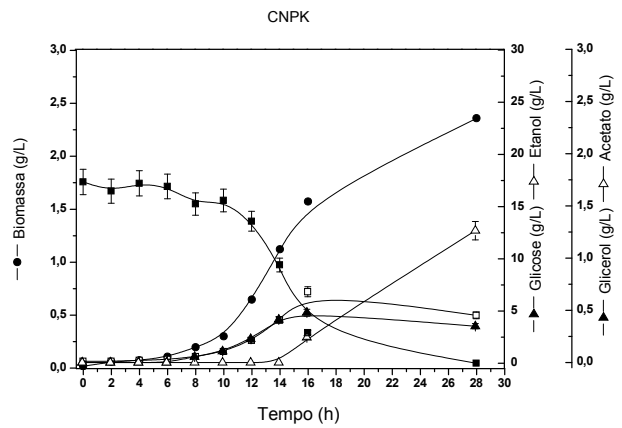
Figura 3. Perfil fermentativo das linhagens JP1 e CNPK em meio mineral contendo glicose e diferentes fontes de nitrogênio. Os dados de produção de biomassa, consumo de glicose e produção de etanol, glicerol e acetato são apresentados. Continua na próxima página.

VALINA

G

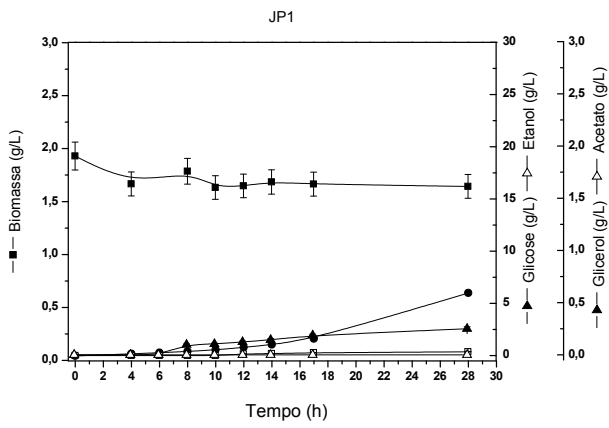


H

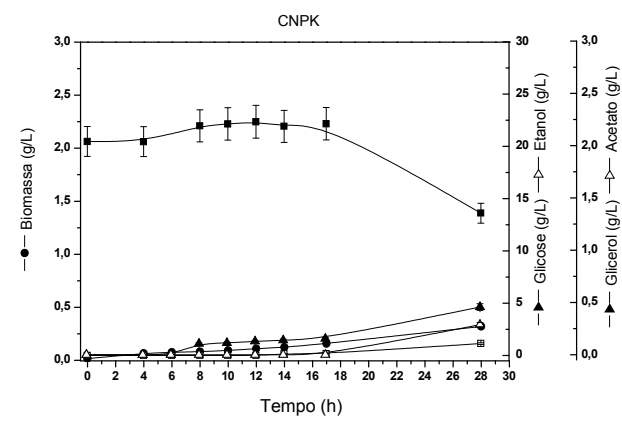


TRIPTOFANO

I

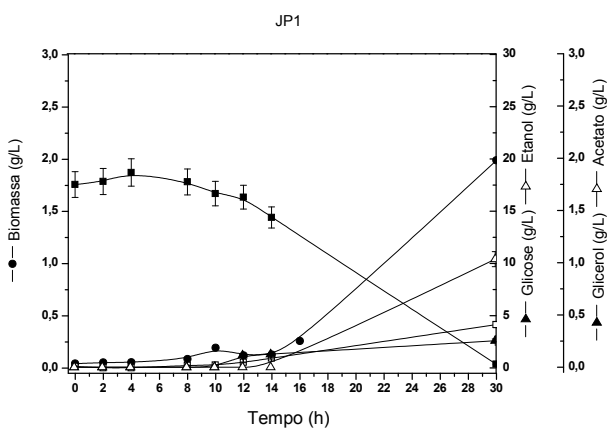


J



FENILALANINA

K



L

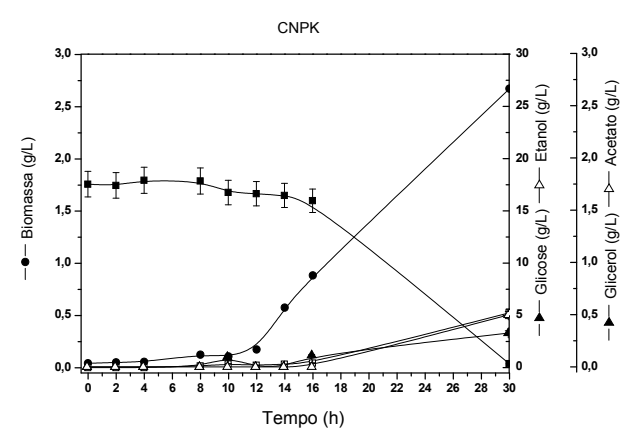


Figura 3. Perfil fermentativo das linhagens JP1 e CNPK em meio mineral contendo glicose e diferentes fontes de nitrogênio. Os dados de produção de biomassa, consumo de glicose e produção de etanol, glicerol e acetato são apresentados.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos das linhagens JP1 e CNPK em meio mineral contendo glicose e diferentes fontes de nitrogênio.

	meio	μ_{max}	t_d	Glicose		Glicerol		Acetato		Etanol		
				[final-inicial]	taxa	[Final]	Y glicerol/glicose	[Final]	Y acetato/glicose	[Final]	Y etanol/glicose	P max
		h^{-1}	h	g/L	- g/L.h	g/L	g/g	g/L	g/g	g/L	g/g	g/h.L
JP1	AS	0.30	2.30	19.17	2.69	0.55	0.03	2.58	0.13	6.28	0.33	0.23
	Val	0.28	2.46	19.02	2.21	0.27	0.01	0.81	0.04	7.31	0.38	0.26
	Leu	0.15	4.60	19.08	0.84	0.49	0.03	1.08	0.06	5.44	0.29	0.19
	Iso	0.17	4.06	19.61	1.14	0.40	0.02	0.79	0.04	6.02	0.31	0.21
	Phe	0.13	5.52	17.19	1.14	0.32	0.02	0.50	0.03	5.24	0.30	0.19
	Tryp	0.11	6.27	3.05	0.05	0.25	0.08	0.28	0.09	0.36	0.12	0.01
CNPk	AS	0.32	2.16	19.60	2.12	0.44	0.02	2.17	0.11	7.42	0.38	0.27
	Val	0.29	2.38	17.37	2.11	0.48	0.03	1.26	0.07	6.84	0.39	0.24
	Leu	0.14	4.93	14.74	0.59	0.59	0.04	1.55	0.11	4.05	0.27	0.14
	Iso	0.17	4.06	18.53	1.23	0.28	0.02	0.75	0.04	6.07	0.33	0.22
	Phe	0.15	4.54	17.19	0.88	0.25	0.01	1.03	0.06	4.14	0.24	0.15
	Tryp	0.08	8.63	3.38	0.16	0.46	0.14	0.29	0.08	1.14	0.34	0.04

São apresentados os valores de velocidade máxima de crescimento específica (μ_{max}), tempo de geração (t_d) e produtividade máxima (P_{max}). A fonte de nitrogênio foram as seguintes: valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Iso), fenilalanina (Phe) e triptofano (Tryp).

Considerando o perfil fermentativo da linhagem CNPK, não houve diferença significativa na produção de etanol e glicerol quando cultivadas nos meios AS e Val, e a produção de acetato foi 40% no meio AS (Figura 4 e Tabela 3). Neste mesmo meio a produção de etanol foi 8% maior que no meio Val, 30% maior do que no meio Iso e 40% maior do que nos meios Leu e Phe. Em média observou-se 30% mais de glicerol e 50% mais de acetato no meio Leu do que nos meios Iso e Phe. (Figura 4 e Tabela 3).

Já em relação à linhagem JP1, o cultivo no meio Val apresentou um rendimento em etanol de 0,38 g/g e produtividade de 0,26 g/h.L, o que representa 14% mais etanol produzido do que nos meios AS e Iso, e 25% mais do que nos meios Phe e Leu (Figura 4). A produção de glicerol foi semelhante para os meios AS e Leu, duas vezes superior em relação aos meios Val e Phe. Já a produção de acetato no meio AS foi 2,4 vezes maior em relação ao meio Leu e até 5,2 vezes em relação ao meio Iso e Phe.

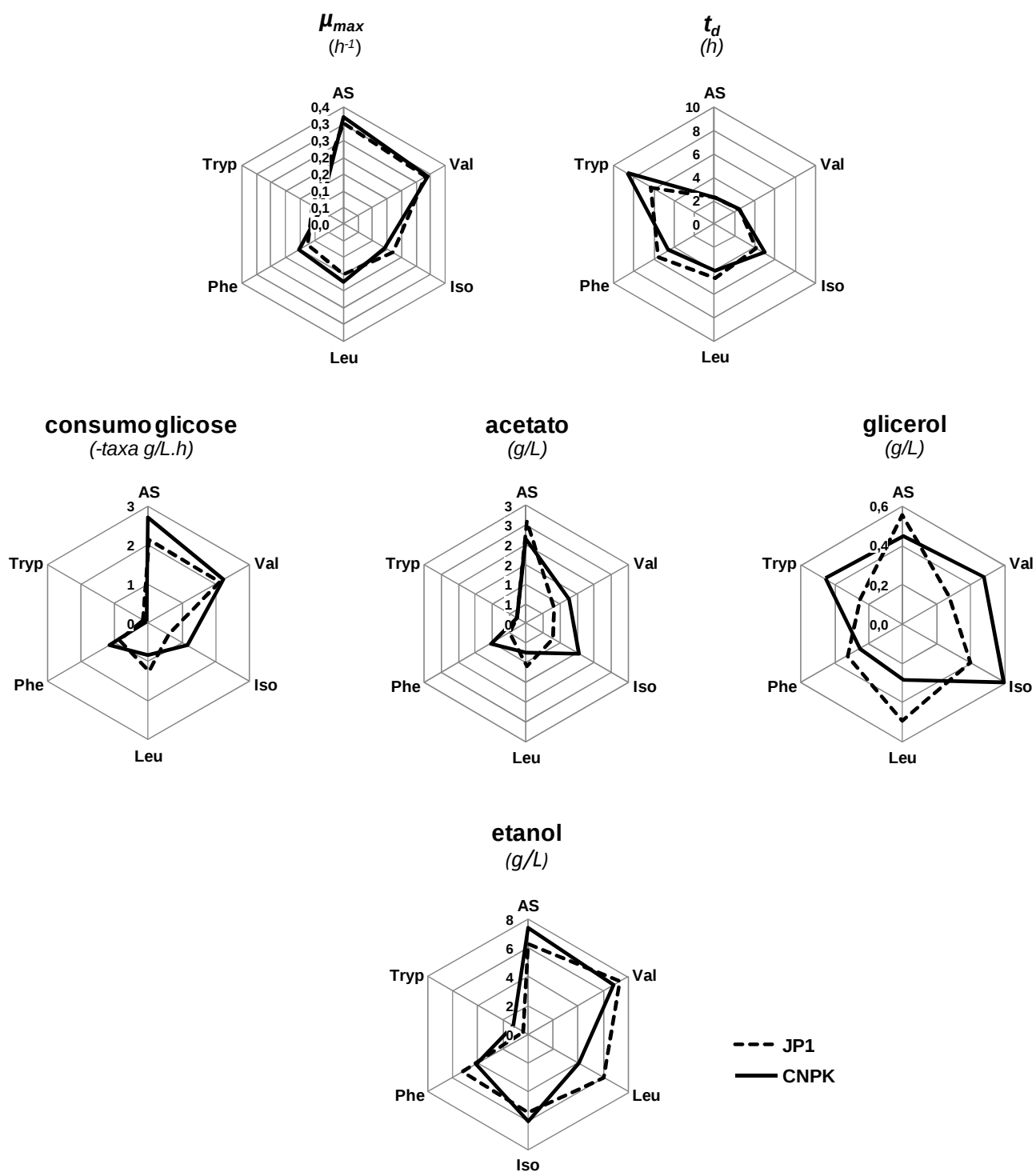


Figura 4. Comparação gráfica dos dados fermentativos entre as linhagens JP1 e CNPK cultivadas em meios sintéticos contendo as diferentes fontes de nitrogênio: valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Iso), Fenilalanina (Phe) e triptofano (Tryp).

5.2. ANALISE PRODUÇÃO DE ÁLCOOIS SUPERIORES

Comparando a produção das duas linhagens em relação à fonte de nitrogênio empregada pode-se observar que a menor produção obtida foi para o composto 3IE na faixa de 13,81 µg/L no meio com Tryp para as duas linhagens. Por outro lado, a maior produção obtida foi para o composto 2PE na faixa de 1020,84µg/L no meio Phe para as duas linhagens. Interessantemente, o meio Val apresentou a menor produtividade máxima de seu álcool correspondente (2MP) em relação aos álcoois correspondentes nos meios com os outros aminoácidos ramificados e no meio com fenilalanina (Figura 5 e Tabela 4). O meio AS apresentou a formação de todos os álcoois superiores analisados, Porém em concentrações menores a 7,45 µg/L (Figura 5A e B).

Em termos de eficiência de conversão do aminoácido no meio no álcool superior correspondente, observa-se que a linhagem CNPK apresenta maiores produtividades (P_{max}) (Figura 6) e por consequência maiores valores de conversão e concentrações finais do álcool superior em relação à linhagem JP1 (Tabela 4) nas seguintes relações: 11% a mais de 2MP no meio Val, 7,8% a mais de 3MB no meio Leu 26% a mais de 2PE no meio Phe (Figura 5 e Tabela 4). Apenas a conversão de isoleucina para 2MB foi semelhantes entre as linhagens (Tabela 4)

Tabela 4. Concentração final, produção máxima (P_{max}) e conversão do aminoácido em álcool superior pelas linhagens JP1 e CNPK em fermentações com diferentes fontes de nitrogênio.

Meio	Álcool superior	Linhagen					
		CNPK			JP1		
		[final]	P_{max}	conversão	[final]	P_{max}	conversão
		µg/L	µg/H.L	%	µg/H.L	%	%
Val	2MP	417.36	14.906	0.0048	370.92	13.247	0.0042
Leu	3MB	902.30	32.225	0.0092	831.84	29.709	0.0085
Iso	2MB	744.77	26.599	0.0076	736.20	26.293	0.0075
Phe	2PE	1020.84	36.459	0.0082	753.06	26.895	0.0061
Tryp	3IE	17.56	0.627	0.0001	10.07	0.360	0.0001

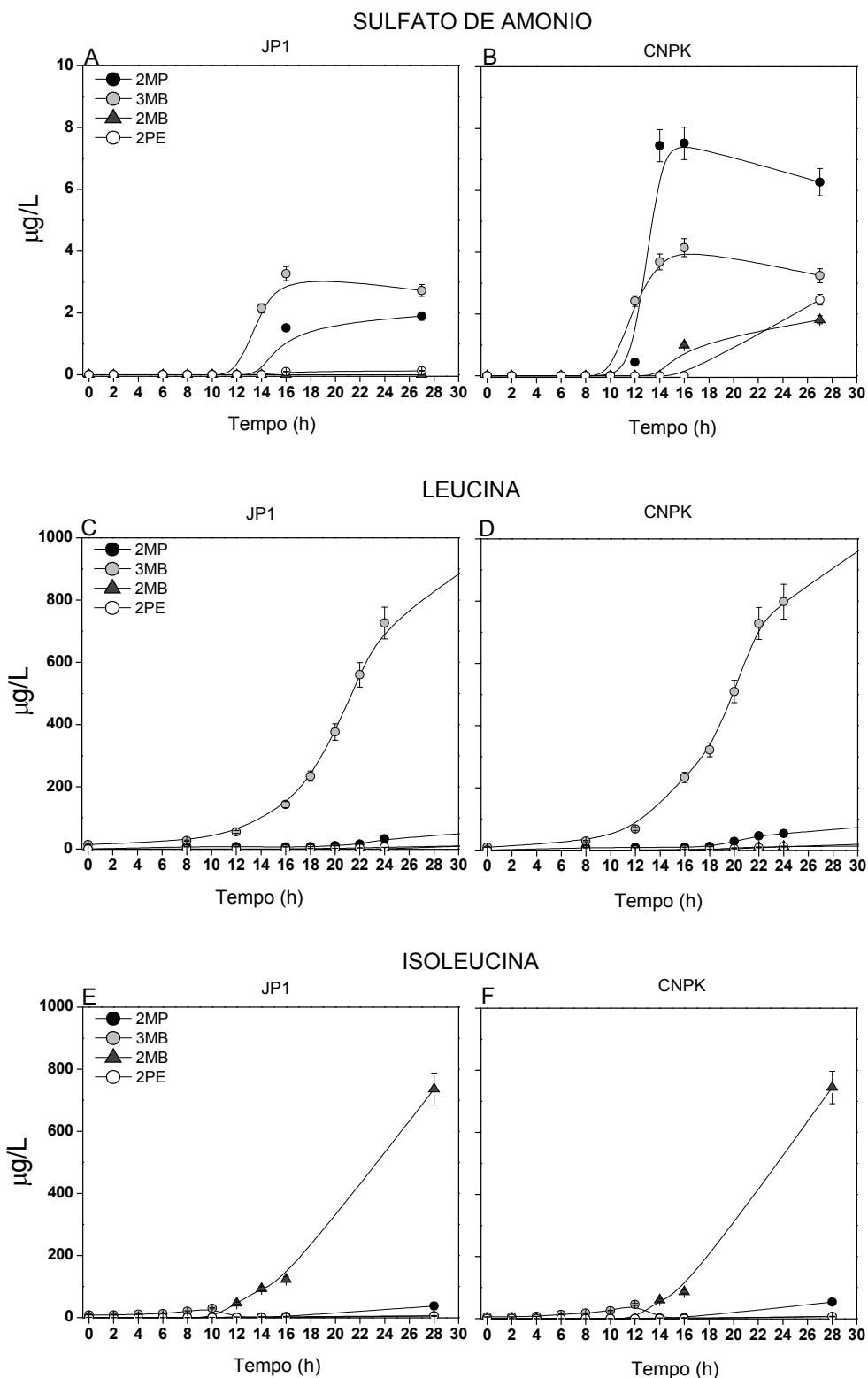


Figura 5. Cinética de produção de 3-metil-1-butanol (3MB), 2-metil-1-butanol (2MB), 2-metil-1-propanol (2MP), 2-indole-3-etanol (2IE) e 2-feniletanol (2PE) pelas linhagens JP1 e CNPK durante o cultivo em meio mineral contendo glicose e diferentes fontes de nitrogênio. Continua na próxima pagina.

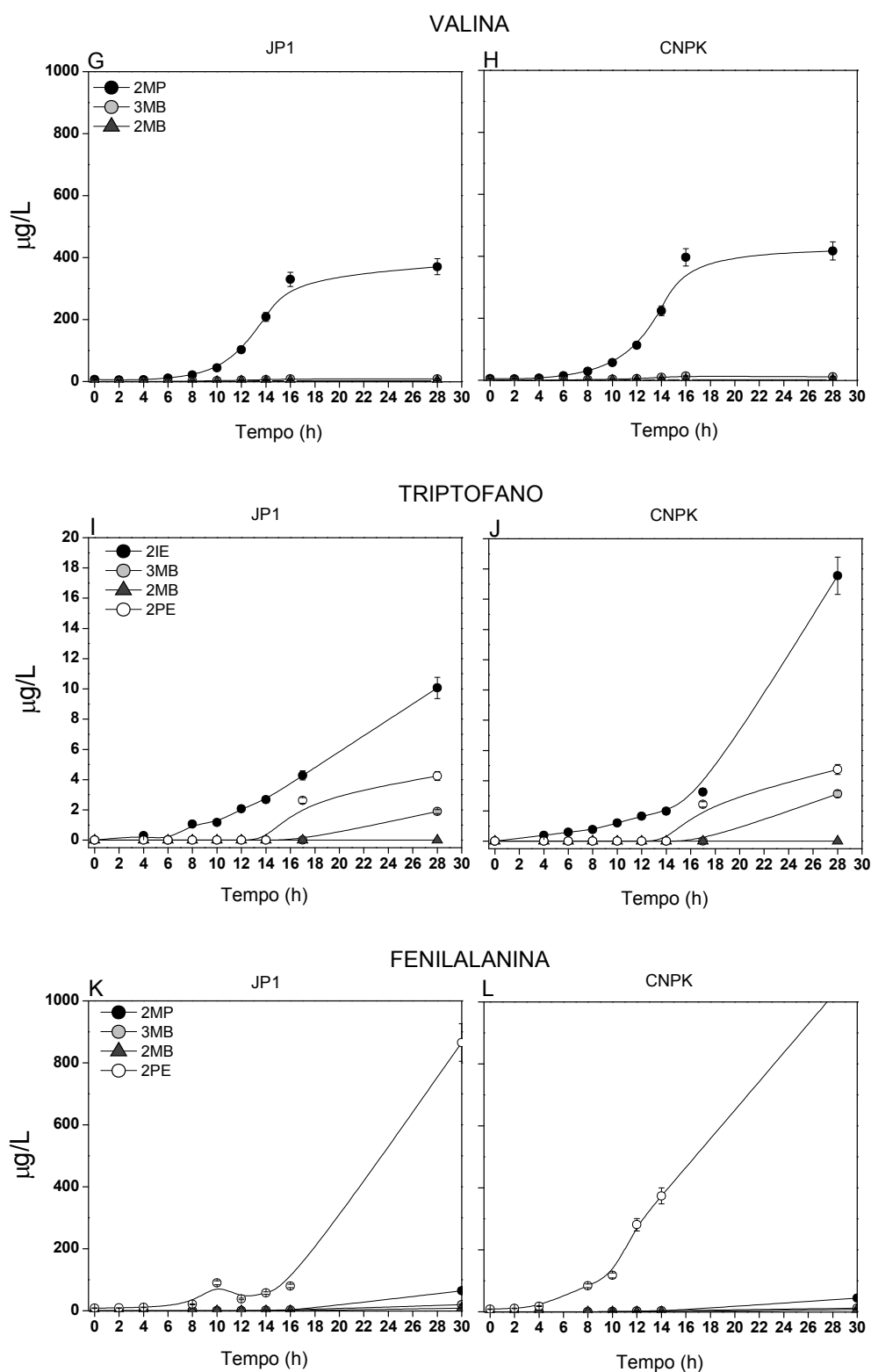


Figura 5. Cinética de produção de 3-metil-1-butanol (3MB), 2-metil-1-butanol (2MB), 2-metil-1-propanol (2MP), 2-indole-3-etanol (2IE) e 2-feniletanol (2PE) pelas linhagens JP1 e CNPK durante o cultivo em meio mineral contendo glicose e diferentes fontes de nitrogênio.

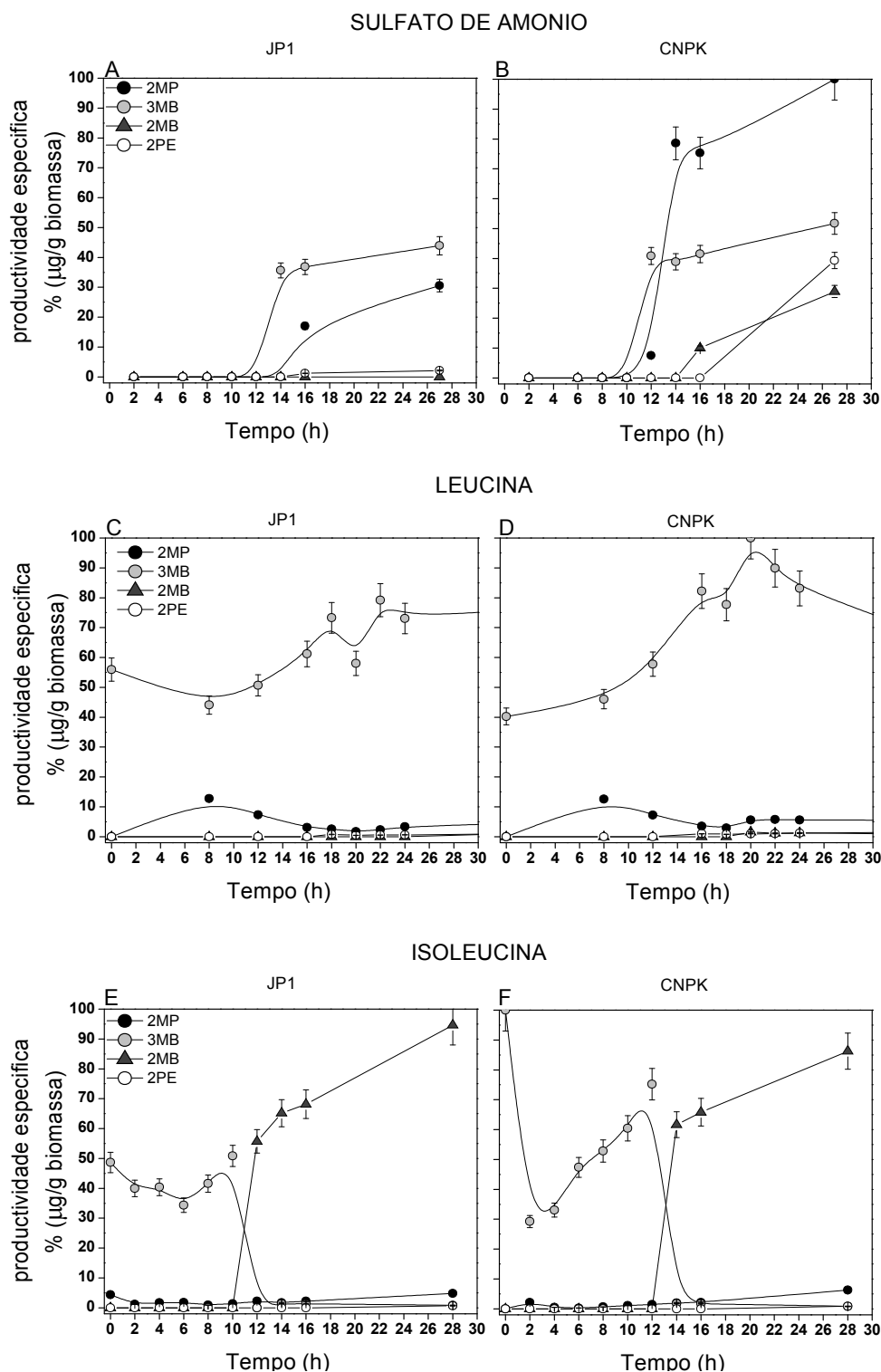


Figura 6. Productividade específica de 3-metil-1-butanol (3MB), 2-metil-1-butanol (2MB), 2-metil-1-propanol (2MP), 2-indole-3-etanol (2IE) e 2-feniletanol (2PE) pelas linhagens JP1 e CNPK durante o cultivo em meio mineral contendo glicose e diferentes fontes de nitrogênio. Continua na próxima página.

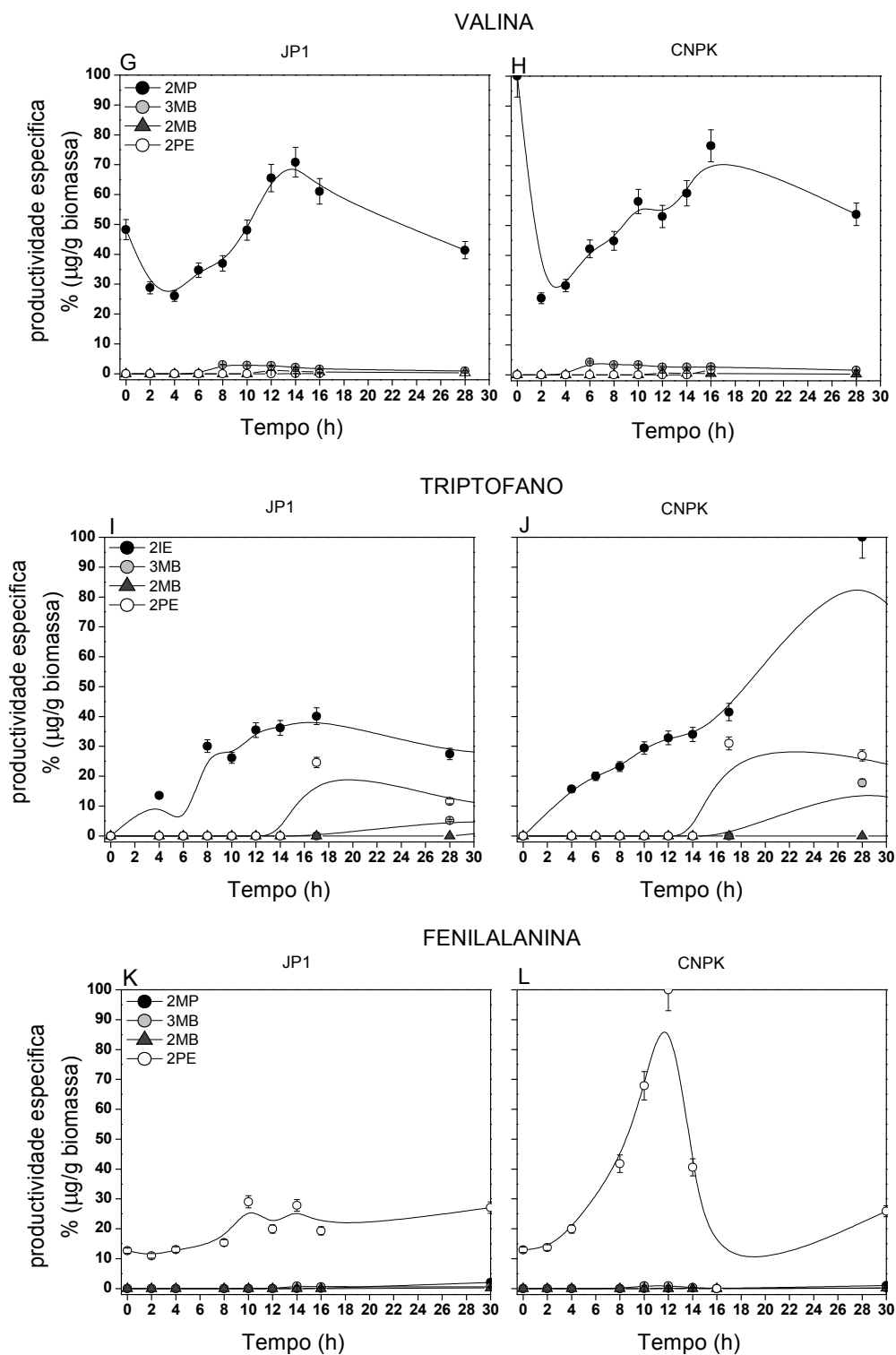


Figura 6. Productividade específica de 3-metil-1-butanol (3MB), 2-metil-1-butanol (2MB), 2-metil-1-propanol (2MP), 2-indole-3-etanol (2IE) e 2-feniletanol (2PE) pelas linhagens JP1 e CNPK durante o cultivo em meio mineral contendo glicose e diferentes fontes de nitrogênio.

Surpreendentemente, no meio com isoleucina foi verificada a produção de 3MB a 40 µg/L por ambas as linhagens estudadas, dez vezes a mais que para o produzido no meio AS (Figura 5E e F). Este metabólito está, em princípio, relacionado apenas com o catabolismo da leucina e não com o catabolismo da isoleucina. Já a formação de 2MB, produto esperado da isoleucina, só foi detectada a partir do momento em que a produção do 3MB foi finalizada, na metade da fase exponencial de crescimento para as duas linhagens. Também foi observada a produção de 2MB nos meios AS, Val, Leu e Phe, Porém em concentrações menores do que 8 µg/L (Figura 5).

A cinética do consumo de O_2 , produção de CO_2 , da variação da pressão parcial de oxigênio (PO_2) e do quociente respiratório (Q_r) foi acompanhada para as culturas das células da linhagem JP1 em meio Iso (Figura 7). Os resultados de Q_r e de pressão parcial de oxigênio dissolvido relativos aos dois momentos da amostragem em 8 h ($O_2=96,5\%$ e $Q_r=1,33$) e 16 h ($O_2=91\%$ e $Q_r= 9,94$) de cultivo indicam que a cultura não estava em condições limitantes de O_2 (pressões parciais maiores do que 20% são consideradas não limitantes). Isto sugere que o metabolismo mudou de um regime aeróbico no início do crescimento logarítmico ($Q_r<1$) para respiro-fermentativo ($Q_r>1$) na transição 3MB para 2MB.

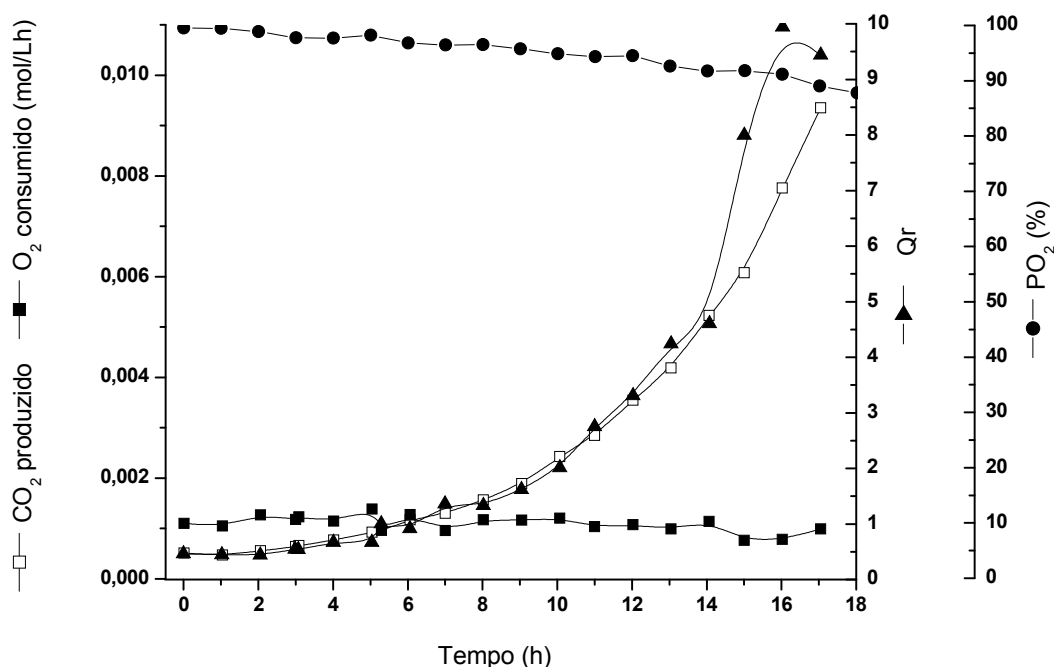


Figura 7. Consumo de O_2 , produção de CO_2 , pressão parcial de oxigênio relativa (PO_2) e quociente respiratório (Q_r) da linhagem JP1 no meio usando como fonte de nitrogênio isoleucina.

5.3. ANALISE TRASCRIPTÔMICA

A partir dos resultados obtidos relacionados com a produção de álcoois superiores, despertou especial interesse o fato de que 3MB foi produzido até atingir a concentração de 40 µg/L pelas células das duas linhagens nas primeiras 10 horas de cultivo em meio contendo isoleucina, já que nesse meio só era esperada a produção de 2MB como produto do catabolismo. Depois desse período foi observada a produção esperada de 2MB. Portanto, amostras celulares foram coletadas no tempo de 8 h (fase de produção de 3MB, sem produção de 2MB) e de 16 h (fase de produção de 2MB sem a produção de 3MB) no intuito de determinar se há algum tipo de ajuste do transcriptoma que explique a mudanças rápidas no perfil de produção desses metabólitos.

5.3.1. Abordagem geral

Observou-se que do total de 6227 genes analisados, 388 genes (6,23% do genoma) apresentaram alterações significativas nos níveis de transcrição (Figura 8 e Tabela 5): 232 genes apresentaram aumento da expressão (indução), dos quais 186 genes (3,73% do genoma) de ORFs conhecidas, enquanto 156 genes apresentaram diminuição da expressão (repressão), dos quais 128 genes (2,06% do genoma) de ORFs conhecidas. Isto significa que na transição do período de produção de 3MB para o período de produção de 2MB cerca de 59,79% dos genes que sofreram alteração no padrão de expressão foram induzidos enquanto 40,21% foram reprimidos. A partir da classificação desses genes de acordo ao processo biológico participante baseado na ontologia gênica (*Gene Ontology* - GO) (Figura 8), pode-se verificar que diferentes genes em uma dada categoria apresentam perfis de expressão opostas, tais como aqueles envolvidos no metabolismo e transporte de lipídeos (25 genes induzidos e 8 genes reprimidos), homeostase e transporte de íons (20 genes induzidos e 5 genes reprimidos), metabolismo e transporte de aminoácidos (18 genes induzidos e 13 genes reprimidos), metabolismo e transporte de carboidratos (17 genes induzidos e 13 genes reprimidos), transporte transmembrana (16 genes induzidos e 12 genes reprimidos), resposta geral a estresse (31 genes induzidos e 29 genes reprimidos), na biossíntese de vitaminas (5 genes induzidos e 5 genes reprimidos) e na via de Ehrlich (11 genes induzidos e 12 genes reprimidos).

Tabela 5. Genes cuja expressão foi alterada durante o cultivo das células da linhagem JP1 em meio mineral contendo glicose e isoleucina.

	GENES INDUZIDOS			GENES REPRIMIDOS		
	<i>numero genes</i>	<i>%¹</i>	<i>%²</i>	<i>numero genes</i>	<i>%¹</i>	<i>%²</i>
ORF	232	3.73	59.79	156	2.51	40.21
ORF caracterizadas	186	2.99	47.94	128	2.06	32.99
ORF sem caracterizar	46	0.74	11.86	28	0.45	7.22
Fold change $\geq 2 \leq$	53	28.5 ³		20	15.6 ³	

¹ porcentagem relativo ao total de 6227 genes analisados

² porcentagem relativo ao total de 338 genes transcritos diferencialmente

³ porcentagem relativo ao total de ORF caracterizadas

De maneira específica as categorias que apresentaram a indução de seus genes foram aquelas envolvidas com transcrição gênica (45 genes), síntese de proteínas (27 genes), geração de precursores e energia (15 genes), metabolismo de cofactores (12 genes), sinalização (9 genes), crescimento em pseudo-hifas (6 genes) e respiração celular (5 genes). Por outro lado, as categorias que apresentam apenas genes reprimidos foram aquelas envolvidas na organização e biogêneses da parede celular (12 genes), esporulação (9 genes) e organização da mitocôndria (7 genes).

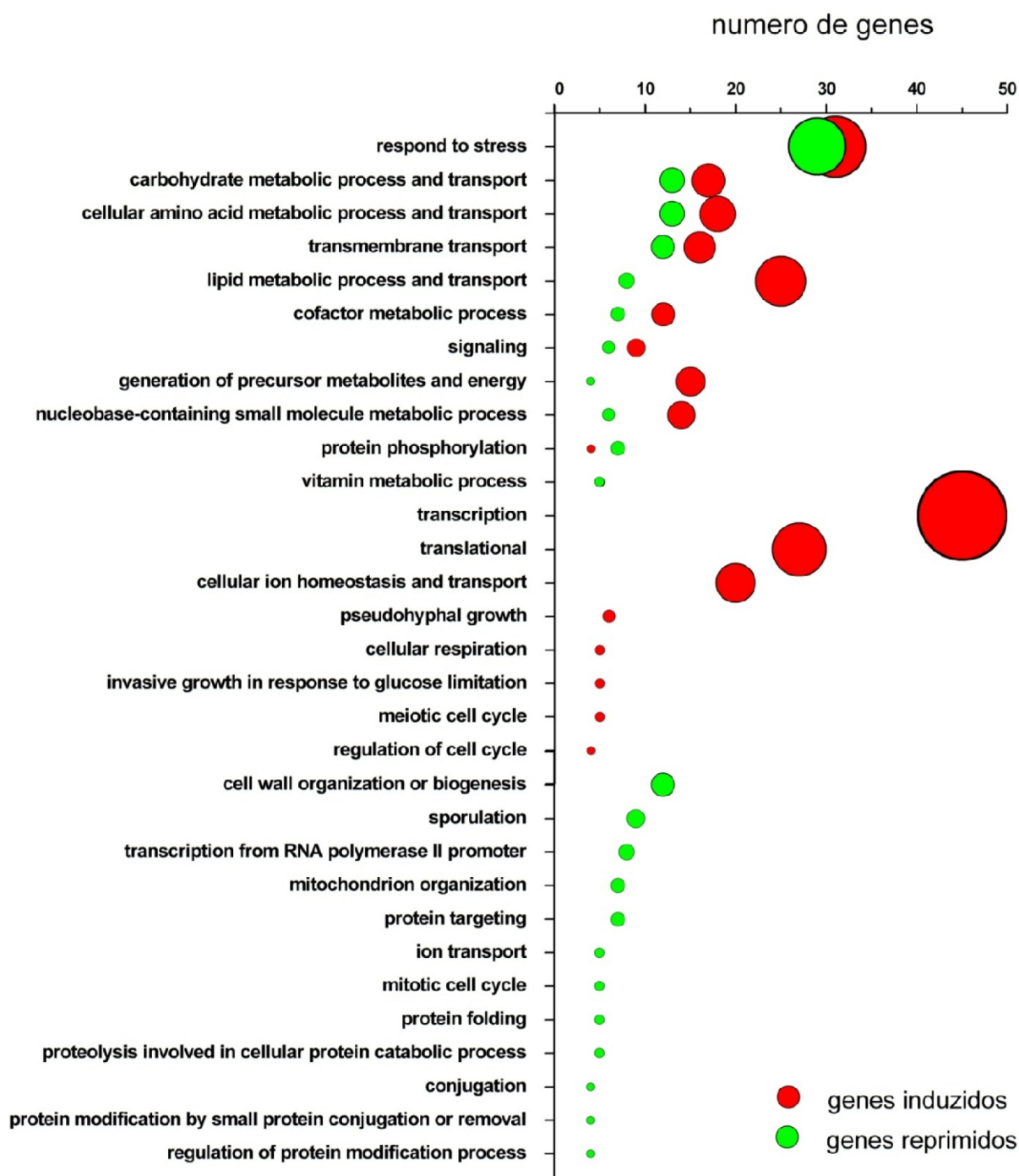


Figura 8. Relação entre a categoria funcional e o número de genes com alterações no padrão de expressão durante o cultivo das células da linhagem JP1 em meio mineral contendo glicose e isoleucina comparando o início com a metade do crescimento logarítmico.

Os círculos em vermelho e em verde representam os genes que foram induzidos ou reprimidos no tempo de 16 h em relação ao tempo 8 h. O tamanho de cada círculo é proporcional ao número de genes em cada categoria. (ver 4.3.1. Análise de Microarranjo).

5.3.2. Genes relacionados com o metabolismo respiro-fermentativo e de carboidratos.

Neste grupo resultaram induzidos alguns genes essenciais requeridos para crescimento respiratório (Figura 9A), tais como: *HTD2*, que codifica uma 3-hidroxiacil-CoA deidratase mitocondrial envolvida na síntese de ácidos graxos (KASTANIOTIS *et al.*, 2004); *RSF1*, o qual codifica o fator de transcrição regulador que media a transição para o crescimento respiratório (LU *et al.*, 2003); *COX5B*, o qual codifica a subunidade da citocromo oxidase C integrante final da cadeia respiratória (HODGE *et al.*, 1989) junto com *CYC7*, que traduz para a isoforma 2 do citocromo oxidase C cuja transcrição é sujeita a repressão catabólica (BURKE *et al.*, 1997); e o gene *UTR5*, essencial para crescimento aeróbico (LÓPEZ e BAKER, 2000). Por outro lado, resultaram reprimidos os genes *SDH2*, o qual codifica a subunidade do complexo succinate desidrogenase que acopla o ciclo de ácidos tricarboxílicos com a cadeia respiratória transferindo os elétrons da oxidação de succinate para ubiquinona (OYEDOTUN e LEMIRE, 2004), e o gene *NDI1*, o qual codifica uma NADH:ubiquinona redutase que transfere os elétrons do NADH para ubiquinona na cadeia respiratória (MARRES *et al.*, 1991).

No grupo dos genes regulados por glicose (Figura 9D), resultando induzidos alguns genes efetores da repressão por glicose. Por exemplo, o gene *ISF1* apresentou 5,25 vezes de aumento de expressão. Este gene codifica uma proteína que suprime o fenótipo dos mutantes $\Delta hap2p$, $\Delta hap3p$ e $\Delta hap4p$, cuja indução este baixo controle da glicose (ALTAMURA *et al.*, 1994). No mesmo sentido, o próprio gene *HAP4* apresentou indução de 2,19 vezes na transição da produção de 3MB para 2MB. Este gene codifica para um ativador transcricional regulador da expressão dos genes respiratórios (FORSBURG e GUARENTE, 1989). Outro gene que resultou induzido foi *RGI2*, que tem sido relatado como induzido em condições limitantes de carbono e reprimido em alta concentração de glicose (BOER *et al.*, 2003). Além desses, os genes *NRG1* e *NRG2* apresentaram indução da expressão. Esses dois genes codificam proteínas repressoras da transcrição dos genes que são reprimidos por glicose (VYAS *et al.*, 2001; ZHOU e WINSTON, 2001). Também apresentou indução o gene *TYE7* que contribui para a ativação de genes glicolíticos (LÖHNING e CIRIACY, 1994).

A			D		
Metabolismo respiro-fermentativo		FC	Metabolismo de carboidratos		FC
CYC7	CYtochrome C	3.08	ISF1	Increasing Suppression Factor	5.25
USB1	U Six Biogenesis	1.89	RG11	Respiratory growth induced	3.55
HTD2	Hydroxyacyl-Thioester Dehydratase	1.86	NRG2	Negative Regulator Glucose-controlled	2.62
UTR5	Unidentified TRanscript	1.76	HAP4	Heme Activator Protein	2.19
RSF1	ReSpiration Factor	1.63	PDC5	Pyruvate DeCarboxylase	2.14
ANB1	ANaeroBically induced	1.56	NRG1	Negative Regulator Glucose-repressed	2.12
COX5B	Cytochrome c OXidase	1.48	TYE7	Ty-mediated Expression	2.01
SDH2	Succinate DeHydrogenase	-1.42	PGM2	PhosphoGlucoMutase	1.93
NDI1	NADH Dehydrogenase Internal	-1.42	RGS2	Regulator of heterotrimeric G protein	1.77
YAR068W	Fungal-specific protein of unknown function	-2.23	RG12	Respiratory growth induced	1.70
B			E		
Metabolismo de inositol e lipídeos		FC	Síntese Protéica		FC
INO1	INOsitol requiring	11.85	SAP30	SIT4 protein phosphatase Associated Protein	1.89
INO2	INOsitol requiring	2.91	KRE33	Killer toxin REsistant	1.78
PSD1	PhosphatidylSerine Decarboxylase	2.61	MOD5	tRNA MODification	1.68
POT1	Peroxisomal Oxoacyl Thiolase	2.47	ENP2	Essential Nuclear Protein	1.67
CHO1	CHoline requiring	2.25	SSN3	Suppressor of SNf1	1.65
INO4	INOsitol requiring	2.16	RPA135	RNA Polymerase A	1.64
UPS2	UnProceSsed	2.14	DHR2	DEAH-box RNA helicase	1.62
EEB1	Ethyl Ester Biosynthesis	2.11	URB1	Unhealthy Ribosome Biogenesis	1.59
OPI3	OverProducer of Inositol	2.03	SPB1	Suppressor of PaB1 mutant	1.57
PLB2	PhosphoLipase B	1.79	ANB1	ANaeroBically induced	1.56
OPI1	OverProducer of Inositol	1.73	RPA43	RNA Polymerase A	1.55
CDS1	CDP-Diacylglycerol Synthase	1.69	SDA1	Severe Depolymerization of Actin	1.55
GPI18	GlycosylPhosphatidylInositol	1.64	UTP14	U Three Protein	1.52
URA7	URAcil requiring	1.61	KT112	Kluveromyces lactis Toxin Insensitive	1.52
URA8	URAcil requiring	1.58	RPF2	processing of pre-rRNA	1.51
ITR1	myo-Inositol TRansporter	1.57	KRR1	contains KRR-R motif	1.51
HNM1	Hyper-resistance to Nitrogen Mustard	1.54	ARX1	Ribosomal eXport complex	1.49
NEM1	Nuclear Envelope Morphology	1.52	BMS1	BMh Sensitive	1.49
PKH2	Pkb-activating Kinase Homolog	-1.55	BUD27	BUD site selection	1.49
CRG1	Cantharidin Resistance Gene	-1.74	MTR4	Mrna TRansport	1.49
YSR3	Yeast Sphingolipid Resistance	-1.87	YHC1	Yeast Homolog of human U1C	1.47
C					
Metabolismo de íons metálicos		FC			
FET4	FErrous Transport	3.32	RRP5	Ribosomal RNA Processing	1.47
FET3	FErrous Transport	2.89	RIT1	Ribosylation of Initiator tRNA	1.47
HAL5	HALotolerance	2.05	UTP23	U Three-associated Protein	1.47
SIT1	Siderophore Iron Transport	2.03			
IZH4	Implicated in Zinc Homeostasis	1.99			
FRE3	Ferric REductase	1.77			
ENA1	Exitus NATru (Latin, "exit sodium")	1.66			
CTR1	Copper TRansport	1.59			
HMX1	HeMe oXygenase	1.51			
ENB1	ENteroBactin	1.42			
QDR2	QuiniDine Resistance 2	-1.63			
ENA2	Exitus NATru (Latin, "exit sodium")	-3.16			
PHO89	PHOSphate metabolism	-3.82			

Figura 9. Expressão dos genes de diferentes categorias funcionais das células da linhagem JP1 cultivadas em meio mineral contendo glicose e isoleucina em relação ao início com a metade do crescimento logarítmico. Continua na próxima página.

A-I: Mapa de intensidades (FC: vezes de expressão - Fold change). As cores em vermelho e em verde representam os genes que foram induzidos ou reprimidos no tempo de 16 h (metade do crescimento logarítmico) em relação ao tempo de 8 h (início do crescimento logarítmico). A intensidade da cor indica o aumento ou a diminuição no valor.

H: Genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio. NCR: sistema de repressão por catabolismo do nitrogênio. GAA: sistema de controle general da biosíntese de aminoácidos.

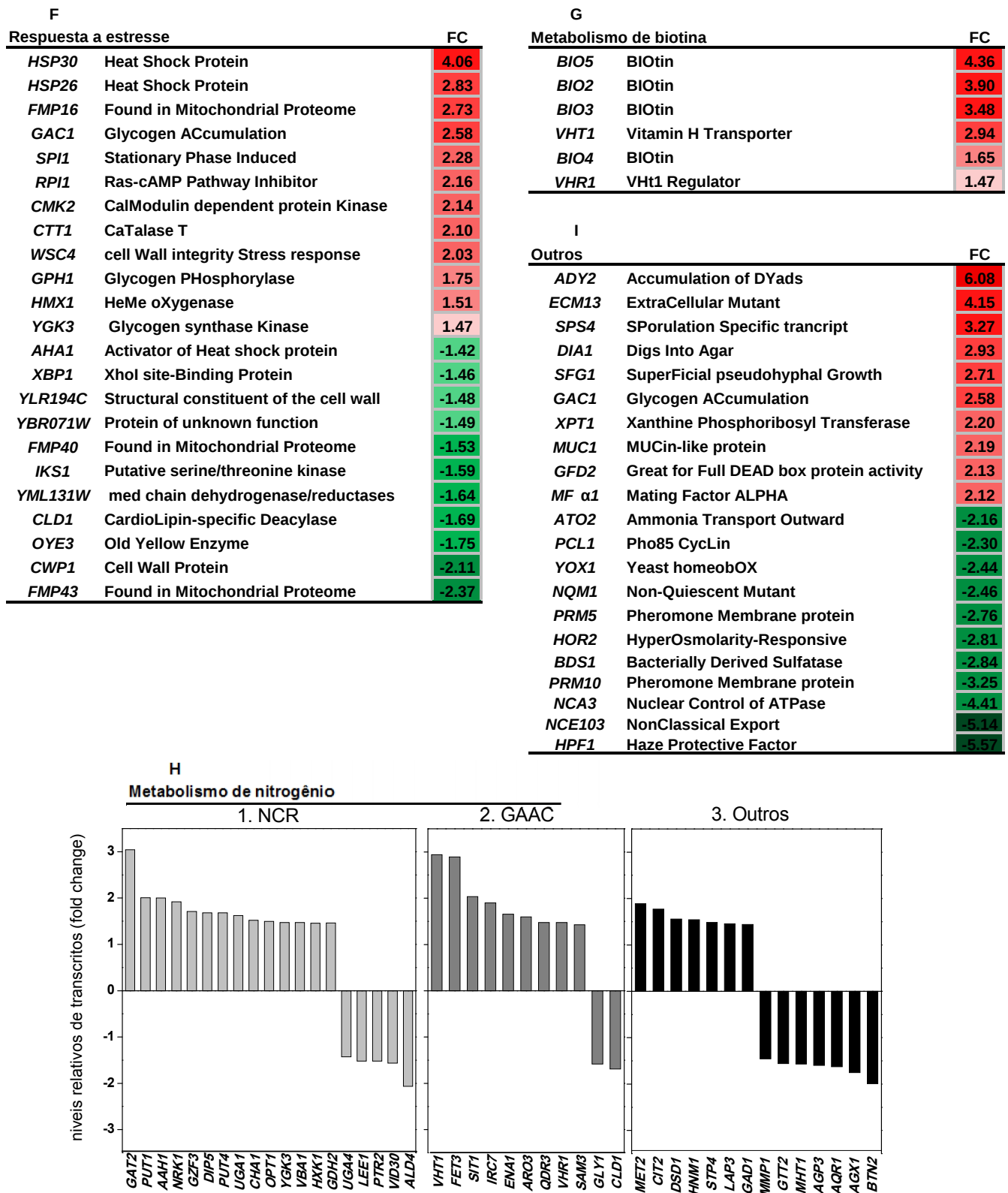


Figura 9. Expressão dos genes de diferentes categorias funcionais das células da linhagem JP1 cultivadas em meio mineral contendo glicose e isoleucina em relação ao início com a metade do crescimento logarítmico.

A-I: Mapa de intensidades (FC: vezes de expressão - Fold change). As cores em vermelho e em verde representam os genes que foram induzidos ou reprimidos no tempo de 16 h (metade do crescimento logarítmico) em relação ao tempo de 8 h (início do crescimento logarítmico). A intensidade da cor indica o aumento ou a diminuição no valor.

H: Genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio. NCR: sistema de repressão por catabolismo do nitrogênio. GAA: sistema de controle general da biosíntese de aminoácidos.

Um subgrupo de genes que resulto também afetado foi dos transportadores de hexosas. Um transportador de hexosas de alta afinidade resultou induzido (*HXT6*), entanto que três resultarem reprimidos, dois de alta afinidade *HXT4*, *HXT2*, e um de afinidade moderada *HXT5* (ÖZCAN e JOHNSTON, 1999).

5.3.3. Genes relacionados com o metabolismo de lipídios e inositol

Outro grupo que demonstro vários genes estar afetados a regulação foi o metabolismo de inositol, intimamente relacionado com o metabolismo de lipídeos (Figura 9B). O gene *INO1* apresentou o maior nível de indução neste estudo (11,85 vezes). Este gene codifica a inositol-3-fosfato sintase que está envolvida na síntese de inositol (DONAHUE e HENRY, 1981). Este gene é regulado positivamente pelo um ativador transcricional formado pelo heterodímero Ino2p/Ino4p, produtos dos genes *INO2* e *INO4* que também foram induzidos no período de transição das fases em estudo. Este heterodímero também atua na desrepressão dos genes de biossíntese de fosfolipídeos em resposta a diminuição na concentração de inositol intracelular (AMBROZIAK e HENRY, 1994). Em consonância com estes resultados, observou-se também a indução dos seguintes genes: *ITR1* que codifica a proteína transportadora de myo-inositol (NIKAWA *et al.*, 1991); *GPI18* que codifica uma manosil transferase com função na biossíntese de glicosil fosfatidilinositol (KANG *et al.*, 2005); *PLB2* que codifica a fosfolipase B com atividade transilase (FYRST *et al.*, 1999); *CDS1* que codifica a fosfatidate-citidil transferase (SHEN *et al.*, 1996); *URA7* e *URA8* que codificam isoenzimas CTP sintases envolvidas na biossíntese de fosfolipídios (NADKARNI *et al.*, 1995); e *OPI1* e *OPI3* que codificam fatores de regulação que participam na regulação negativa da biossíntese de fosfolipídeos e na biossíntese de fosfatidilcolina, respectivamente (SANTIAGO e MAMOUN, 2003).

Os poucos genes que apresentaram repressão neste grupo foram *PKH2* e *YSR3*, que codificam respectivamente uma kinase e uma fosfatase envolvidas no metabolismo da esfingomielina (MAO *et al.*, 1997; ROELANTS *et al.*, 2002), e *CRG1* que codifica uma metil transferase envolvida na homeostasis de lipídios (NIEWMIERZYCKA e CLARKE, 1999).

5.3.4. Genes relacionados com a homeostasis e o transporte de íons

Nesta categoria foram identificados os seguintes genes relacionados com o metabolismo de ferro induzidos durante a transição 3MB para 2MB: *FET4* que codifica um transportador de baixa afinidade de ferro; *FET3* que codifica uma oxido-redutase com alta afinidade por ferro; *SIT1* que codifica um sideróforo de ferro; *FRE3* que codifica uma Fe-redutase; *ENB1* que codifica um transportador endossomal de ferro. Estes três últimos genes são normalmente induzidos em resposta à deficiência de ferro no meio. Também apresentaram indução os seguintes genes: *CTR1* que codifica um transportador de alta afinidade por cobre induzível por deficiência em cobre, *ENA1* que codifica uma bomba dependente de ATP envolvido no efluxo de sódio e lítio como mecanismo de tolerância a sais, e *IZH4* que codifica uma proteína envolvida na homeostasis de zinco. Dentre os genes reprimidos foram identificados: *ENA2* que codifica outra bomba dependente de ATP envolvida no efluxo de sódio, Porém não de lítio, *PHO89* que codifica um co-transportador Na^+/Pi descrito como ativo no começo do crescimento celular, e *QDR2* que codifica um transportador de amplo espectro.

5.3.5. Genes relacionados com o metabolismo de aminoácidos.

Como era de esperar, o grupo dos genes sensíveis a nitrogênio foi o que apresentou um maior número de elementos regulados (Figura 9H). Foram identificados dois subgrupos principais compostos por genes regulados por o sistema de repressão por catabolismo do nitrogênio (NCR) e por genes regulados por sistema de controle geral da biosíntese de aminoácidos (GAAC).

Pode-se agrupar os genes como regulados ou sensíveis a NCR como aqueles cuja expressão responde a pelo menos algum regulador transcricional positivo (fatores GATA como Gln3p, Gat2p ou Gat1p) e pelo menos a um regulador transcricional negativo (Dal80p, Gzr3p, ou Ure2p). Baseados no trabalho de Godard e colaboradores (2007), foram adicionados aos 41 genes já descritos mais um conjunto de 44 genes que correspondem a esta descrição. A Figura 8H.1 apresenta o padrão de expressão dos 19 genes que pertencem ao grupo sensível a NCR que sofreram algum tipo de alteração no padrão de expressão nas condições empregadas no presente trabalho. As regiões

promotoras destes genes tipicamente contém várias sequências 5'-GATA-3' reconhecidos pelo fatores de transcrição da família GATA (COOPER, 1996; COOPER, 2002). Uma análise mais aprofundada mostrou genes que estariam sujeitos a outros tipos de mecanismos regulatórios além do NCR. Dentre esses genes, parece haver um subgrupo de genes induzidos que estariam envolvidos no metabolismo dos aminoácidos, tais como os genes *UGA1* que é especificamente induzível por GABA (TALIBI *et al.*, 1995), *PUT1* e *PUT4* que são induzidos por prolina (BRANDRISS, 1987), *DIP5* que codifica uma permease de afinidade mediana, mas com alta atividade de transporte dos aminoácidos dicarboxílicos como glutamate e aspartato, e o gene *VBA1* que codifica uma permease vacuolar de aminoácidos básicos. Além disso, soma-se a este subgrupo o gene *HXK1* que codifica a hexokinase1 envolvida no metabolismo de glicose. A outra categoria são os genes que são primariamente regulados pelo NCR. Nesta categoria encontram-se fortemente induzido o gene *GAT2* (3 vezes) e o gene *GZF3* (quase duas vezes), os quais codificam para fatores de transcrição membros da família GATA.

Considerando os principais genes envolvidos no metabolismo de amônio os resultados mostraram indução do gene *GDH2* que codifica a glutamato desidrogenase catabólica (Figura 1). Esta enzima em *S. cerevisiae* está mais relacionada com a desaminação do glutamato (MAGASANIK e KAISER, 2002) e seu gene fora previamente apresentado como regulado pelo NCR (MAGASANIK, 1992). Dentre os genes regulados pelo NCR que apresentaram repressão na transição 3MB para 2MB destacam-se *ALD4*, que codifica uma aldeído desidrogenase, e *UGA4*, uma permease requerida para assimilação de prolina.

Em adição, 12 outros genes que apresentaram alteração no padrão de expressão (Figura 8H. 2) estão descritos como regulados pelo GAAC. Uma análise mais aprofundada permitiu a separação de dois subgrupos principais. Um dos subgrupos que resultou fortemente induzido correspondeu a genes também regulados pelo metabolismo dos íons metálicos: *FET3* uma ferro oxidase, *SIT1*, um transportador de sideroforos de ferro, *IRC7*, uma beta-liase envolvida na síntese do grupo tiol, cuja expressão é induzida por limitação de nitrogênio em forma dependente de *GLN3* e *GAT1* e regulada pelos níveis de cobre via Mac1p, e o gene *ENA1*, uma bomba de ATPase envolvida no efluxo de sódio e lítio (ver 5.3.4. Genes relacionados com a homeostasis e o transporte de íons). Outro subgrupo de genes sensíveis a GAAC resultarem envolvidos ao metabolismo de biotina: o gene *VHR1*,

que codifica um ativador transcricional que regula a indução de *VHT1* (transportador de biotina de alta afinidade) também sensível a GAAC que resultou fortemente induzido (aproximadamente 3 vezes), e regulador da expressão de *BIO5* (requerido para a assimilação de ácido 7,8-diamino-pelargônico na biossíntese de biotina) em resposta a baixas concentrações de biotina. O gene *BIO5* resultou fortemente induzido (4,36 vezes) no nosso ensaio, junto com os genes *BIO2*, que codifica uma biotina sintase (3,92 vezes), o gene *BIO3* que traduz para uma ácido 7,8-diamino-pelargônico aminotransferase (3,48 vezes) e o gene *BIO4* que codifica uma detiobiotina sintetase (1,65 vezes). Estes genes catalisam os últimos passos na via de biossíntese de biotina.

5.3.6. Genes relacionados com a formação de álcoois superiores

A primeira via metabólica para a produção de álcoois superiores está relacionada com metabolismo principal de assimilação de glicose, a partir da qual piruvato, etanol, acetato e glicerol são os produtos principais (Figura 1). Pode se observar na Figura 10 que alguns dos genes da via glicolítica apresentaram indução na transição 3MB para 2MB, tais como *HXK2* que codifica a hexoquinase, *PFK2* que codifica a 6-fosfofruto quinase, *GPM3* que codifica a fosfoglicerato mutase, e *TDH1* que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Por outro lado, apresentaram repressão o gene *PYK2* que codifica a isoenzima 2 da piruvato kinase que converte fosfoenolpiruvato em piruvato, e os genes envolvidos na síntese de glicerol como os genes homólogos que codificam as glicerol-3-fosfato desidrogenases *GPD2* e *GPD1*, enzimas requeridas para regular o metabolismo sob condições anóxicas, e os genes *HOR2* e *RHR2* que codificam para glicerol-3-fosfatases induzidas durante a fase diáuxica.

Os genes *ILV1*, *ILV2*, *ILV3*, *ILV5* e *ILV6*, envolvidos na biossíntese de isoleucina, leucina e valina e regulados pelo metabolismo geral dos aminoácidos, apresentaram indução moderada. O mesmo perfil foi observado para o gene *LEU4* que codifica a alfa-isoprópil malato sintase, o ponto de união entre a via biosintética de valina e de leucina, assim como da via de produção de 3MB e 2MP (Figura 11). Esses genes participam da formação de precursores diretos para a constituição de álcoois superiores a partir da assimilação dentro da mitocôndria de piruvato e de ácido oxalacético, e dos intermediários ceto-ácidos do metabolismo de aminoácidos ramificados e aromáticos.

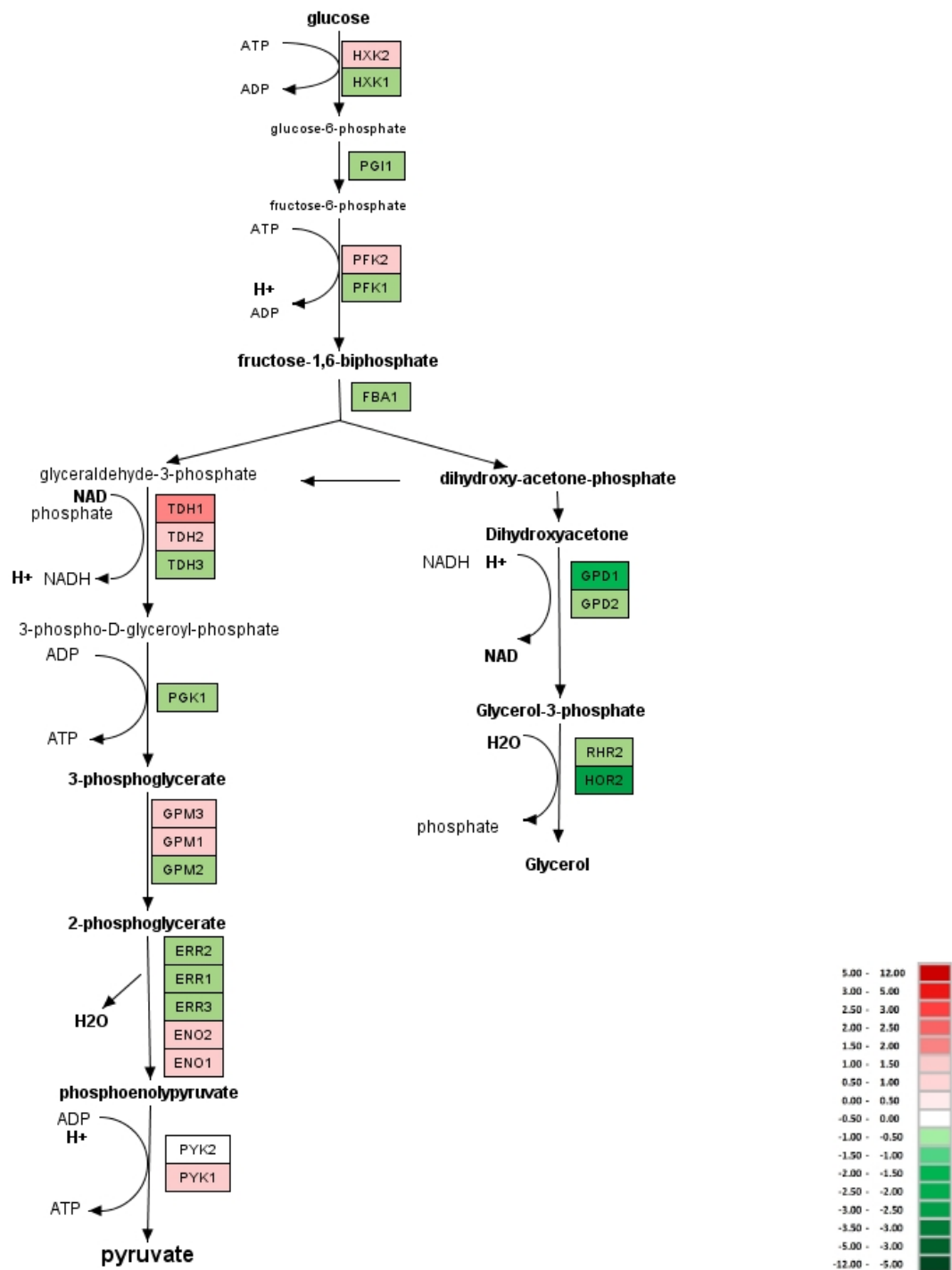


Figura 10. Mapa metabólico do metabolismo central na levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresentando o nível de expressão dos genes correspondentes na linhagem JP1 cultivadas em meio mineral contendo glicose e isoleucina comparando o início com a metade do crescimento logarítmico. (FC: vezes de expressão - *Fold change*).

A escala em cor na direita indica a relação em vezes. A cor vermelho significa indução gênica, enquanto que a verde indica um gene reprimido, com a intensidade do cor indicando o aumento ou diminuição.

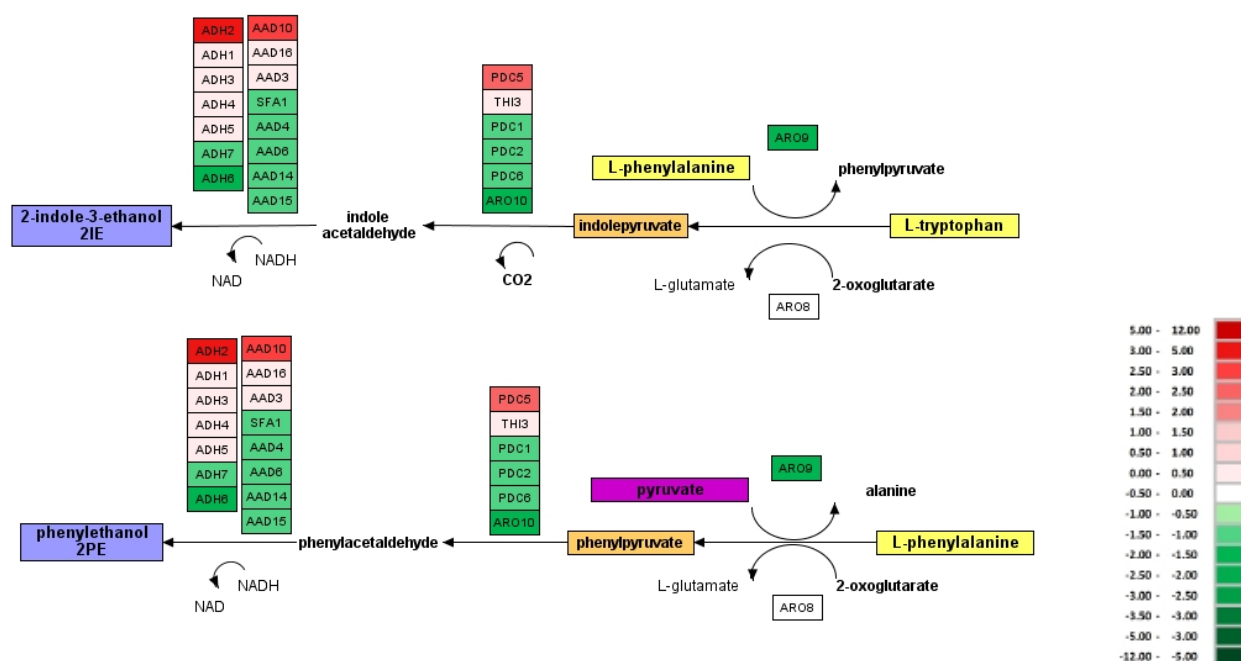


Figura 11. Rotas metabólicas dos precursores e da via de Ehrlich para a produção dos álcoois superiores na levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresentando o nível de expressão dos genes correspondentes na linhagem JP1 cultivadas em meio mineral contendo glicose e isoleucina comparando o início com a metade do crescimento logarítmico (FC: vezes de expressão - Fold change).

A escala em cor na direita indica a relação em vezes. A cor vermelho significa indução gênica, enquanto que a verde indica um gene reprimido, com a intensidade do cor indicando o aumento ou diminuição.

No caso dos genes envolvidos especificamente na via de Ehrlich (Figura 11), observou-se a indução dos genes *BAT1* e *BAT2* que codificam para as aminotransferases envolvidas no primeiro passo do catabolismo dos aminoácidos ramificados. Por outro lado, apresentou repressão os genes *ARO9*, que codifica a aminotransferase envolvida no catabolismo dos aminoácidos aromáticos, *ARO80* que codifica o fator regulador da transcrição envolvido na expressão dos genes *ARO8* e *ARO9*. Dentre os genes codificadores de cetó-ácido descarboxilases, apresentaram indução os genes *PDC5*, que codifica a piruvato descarboxilase secundária, e *THI3*, que codifica uma proteína requerida para atividade do complexo descarboxilase. Por outro lado, os genes *PDC1*, *PDC2*, *PDC6* e *ARO10* apresentaram repressão. No próximo passo da via de Ehrlich apresentaram-se moderadamente induzidos os genes *ADH1*, *ADH3*, *ADH4* e *ADH5*, e fortemente induzidos os genes *ADH2* que codifica a enzima que catalisa a conversão de etanol para acetaldeído e o gene *AAD10* que codifica a aril-alcool

desidrogenases. Já os outros genes codificadores de álcool desidrogenases *SFA1*, *AHD6*, *ADH7*, *AA15*, *AAD14*, *AAD4* e *AAD6* apresentaram repressão.

O outro caminho possível de metabolização dos ceto-ácidos produzidos pelas descarboxilases é a conversão para ácidos carboxílicos ramificados pela atividade aldeído desidrogenase. Os genes *ALD6*, que codifica a isoforma citosólica, e *ALD4*, que codifica a isoforma mitocondrial, apresentaram repressão na transição 3MB para 2MB (Figura 11).

5.3.7. Outros genes

Foram também determinado a regulação de outros grupos de genes de interesse. Por exemplo, o grupo envolvido na síntese de proteínas (Figura 9 E). Neste grupo resultarem regulados genes envolvidos na transcrição e na tradução. Por exemplo, genes envolvidos no processado do ARNr: *KRR1*, uma metil transferase (GROMADKA *et al.*, 1996), o gene *PRP43*, que codifica uma ARN helicasa (MARTIN *et al.*, 2002), o gene *UTP22*, que codifica a proteína tipo U3 envolvida na maturação do ARNr 18S (SAMANTA e LIANG, 2003), o gene *FAF1*, proteína requerida para o processado do ARNr (KARKUSIEWICZ *et al.*, 2004), a ARN helicasa *MTR4* associada ao processado e degradação do RNA nuclear (DE LA CRUZ *et al.*, 1998). Também resultarem induzidos gene envolvido nas biogêneses da subunidade ribossomal menor *ENP2* e *KRE33*, e maior, como os genes *URB1*, *SDA1*, *UTP23* (FROMONT-RACINE *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2009; HOAREAU-AVEILLA *et al.*, 2011); e genes envolvidos na tradução, como *BUD27*, *PRP43*, *ANB1* (GSTAIGER *et al.*, 2003; SAINI *et al.*, 2009) , entre alguns .

Outros grupos que resultarem informativo para nosso ensaio que foram fortemente induzidos foi o dos genes requeridos para esporulação, como o gene *ADY2* (RABITSCH *et al.*, 2001), que resultou induzido seis vezes, e o gene *SPS4* induzido 3,27 vezes (HEPWORTH *et al.*, 1995), assim como na formação de pseudomicelio por *DIA1*, *SFG1*, *MUC1* induzidos > 2 vezes (PALECEK *et al.*, 2000; FUJITA *et al.*, 2005). O gene *MUC1* (alias *FLO1*) codifica para uma glicoproteína de superfície mais importante requerida para a formação de pseudoifas, o crescimento invasivo, floculação, e biofilmes, necessário para a formação de interligações entre as células de colônia em uma estirpe selvagem de *S. cerevisiae* (DOUGLAS *et al.*, 2007). No outro sentido, resultarem fortemente reprimidos (> 2 vezes) a transcrição de vários genes envolvidos no ciclo celular, como a

ciclina *PCL1* (HUANG et al., 2007), o regulador do ciclo *YOX1* (MESSENGUY e DUBOIS, 2003), e varias feromonas reguladoras das proteínas de membrana *PRM5/10* (JUNG e LEVIN, 1999; HEIMAN e WALTER, 2000). Também resultou reprimido o gene *NCE103* (-3,25 vezes), uma anidrasa carbonica não expressa em condições altas de CO₂ (GÖTZ et al., 1999), assim como o gene *HPF1* (> 5 vezes), que codifica uma manoproteína que reduz o tamanho dos agregados protéicos descrito em vinhos brancos (BROWN et al., 2007).

6. DISCUSSÃO

6.1. VISÃO GERAL DA PROBLEMÁTICA INDUSTRIAL.

Nas últimas décadas numerosos trabalhos reportaram a identificação de compostos com propriedades sensoriais derivados do metabolismo das leveduras em distintos contextos fermentativos industriais (O'CONNOR-COX e INGLEDEW, 1989; LAMBRECHTS e PRETORIUS, 2000; MENDES FERREIRA *et al.*, 2004; SWIEGERS e PRETORIUS, 2005; HAZELWOOD *et al.*, 2008; SAERENS *et al.*, 2008). Destes trabalhos se conclui a importância destes compostos na percepção sensorial das distintas bebidas espirituosas, sendo requerida mais informação sobre a regulação fisiológica e transcricional destes compostos em benefício da indústria das bebidas alcoólicas.

No contexto da cachaça não há conhecimento acerca da importância da suplementação com nitrogênio sobre a produção dos álcoois superiores de relevância para a qualidade sensorial da bebida. Este trabalho pretendeu contribuir para o entendimento da importância da suplementação do processo fermentativo no contexto industrial. Para isso, apresentamos um estudo inicial da resposta celular à adição de diferentes fontes de nitrogênio durante o processo fermentativo. Analisamos o efeito de várias fontes de nitrogênio nas formas de amônio, aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina e valina) e aminoácidos aromáticos (triptofano e fenilalanina), em relação à conduta fermentativa e ao perfil de produção de compostos do metabolismo principal (glicerol, etanol e acetato) e de compostos com propriedades sensoriais como os álcoois superiores. Isto foi feito comparando-se o desempenho fermentativo da linhagem industrial JP1, inicialmente selecionada para a produção de etanol combustível, com a linhagem de laboratório CNPK utilizada para estudos fermentativos, fisiológicos e genômicos por vários laboratórios europeus.

6.2. ANÁLISE DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS.

Trabalhos prévios colocam a JP1 como uma linhagem com qualidades interessantes para o processo fermentativo e para a produção de compostos sensoriais

(FILHO *et al.*, 2005; ESPINOSA VIDAL *et al.*, 2011). No presente trabalho, concluímos que nas condições de laboratório empregadas (elevada aeração, meio sintético, concentração de glicose em 20 g/L, inóculo inicial de 0,1 (OD: A_{620nm}) e concentração de nitrogênio em 75mM), essa linhagem não apresenta diferenças fermentativas significativas nos meios AS, Leu, Iso, Phe e Val em relação à linhagem de laboratório CNPK. nos meios correspondentes. A valina foi o único aminoácido dos estudados que permitiu crescimento celular adequado, ou pelo menos, similar ao sulfato de amônio, enquanto triptofano proporcionou crescimento escasso e tirosina não foi capaz de sustentar crescimento celular algum.

A presença de nitrogênio em níveis superiores dos requeridos confere uma série de efeitos estimulatórios no desenvolvimento celular, e por consequência, no processo fermentativo. Isto é resultado das elevadas taxa de síntese protéica, as enzimas estão em na maior concentração fisiológica resultando em uma elevada atividade enzimática. Ao mesmo tempo, isto permite uma ativa absorção de nutrientes, induzindo máximas taxas fermentativas, com altos rendimentos em produção de metabolitos. No mesmo sentido, o amônio possui um efeito estimulante da fermentação, devido a que decresce a relação ATP: ADP, já que a assimilação de amônio de carga positiva produza uma diminuição no potencial de membrana e este, resulta na estimulação da ATP-ase associada à membrana (O'CONNOR-COX e INGLEDEW 1987). No caso dos aminoácidos, varias características possibilitam que uma linhagem apresente um melhor desempenho fermentativo. Já foi descrito que os aminoácidos classificados como de primeira classe (ver 2.5.1. Assimilação de fonte de nitrogênio) são usados também como fonte de carbono, uma vez que a cadeia carbonada resultante da assimilação do grupo amino na reação de transaminação pode ser assimilada no metabolismo central (MAGASANIK e KAISER, 2002). Outros fatores influenciam o crescimento nestas fontes de nitrogênio, tais como a disponibilidade e funcionalidade de transportadores na membrana citoplasmática, a eficiência das transaminases para adequada assimilação do grupo amino e a possibilidade de detoxificação dos ceto-aldeídos formados na segunda reação da via de Ehrlich, seja pelas álcoois desidrogenase para formação dos álcoois superiores, seja pelas aldeído desidrogenase para formação dos ceto-ácidos (HAZELWOOD *et al.*, 2008). E finalmente, deve-se levar em consideração o grau de toxicidade do álcool superior produzido, que deve causar perda da viabilidade celular e consequente parada do crescimento da cultura.

Os resultados mostraram que independente da linhagem o amônio e a valina se constituem em eficientes fontes de nitrogênio comparadas ao restante dos aminoácidos analisados. Estes resultados corroboram aqueles publicados por Godard e colaboradores (GODARD *et al.*, 2007) utilizando a linhagens de *S. cerevisiae* S1278b e 21 meios com fontes diferentes de nitrogênio. Os tempos de geração celular obtidos naquele trabalho foram similares aos obtidos no presente trabalho para os mesmos aminoácidos. Portanto, pudemos corroborar a classificação proposta para as fontes de nitrogênio com duas outras linhagens celulares: 1) amônio, 2) valina, 3) fenilalanina, isoleucina e leucina, 4) triptofano. Isto se constitui na evidência científica que aprova o empirismo da prática usual dos enologistas e dos produtores de cachaça de adicionar sulfato de amônio para evitar problemas de baixa atividade celular e baixo rendimento em biomassa.

6.3. PRODUÇÃO DE ÁLCOOIS SUPERIORES

Também no aspecto de produção dos álcoois superiores pode-se verificar a semelhança entre as duas linhagens estudadas. Em geral, os resultados mostraram que o emprego de concentrações altas de nitrogênio (75 mM) resultou na produção de álcoois superiores com valores entre 300 e 1000 µg/L. Também foi comprovada a produção em grandes quantidades de um determinado álcool superior quando o aminoácido correspondente foi utilizado como fonte de nitrogênio. A produção dos álcoois superiores foi observada já no início dos cultivos celulares em uma cinética dependente da biomassa, apresentando um efeito acumulativo no decorrer do tempo (Figura 5). Entretanto, pode-se observar maior produtividade específica no início do crescimento celular nos meios com leucina (Figura 6C e D), isoleucina (Figura 6E e F), valina (Figura 6G e H) e em menor intensidade para fenilalanina (Figura 6K e L). De maneira geral, os meios que proporcionaram menores tempos de geração celular, ou seja, maiores taxas específicas de crescimento (μ_{max}) também apresentaram maiores produtividades específicas e maiores concentrações finais de álcoois superiores correspondente ao aminoácido presente no meio. Estes fatos podem ser resultados do requerimento ativo de nitrogênio para a síntese de proteínas, para manutenção dos processos metabólicos e para a divisão celular na formação de biomassa. A isto também se sumaria um mecanismo alternativo regulatório do balanço redox. Isto é, nas condições fermentativas reinantes, as

células requerem uma forma de manter o estado óxido-redutivo apropriado, re-oxidando o NADH formado gerado na glicólise, ou em reações que utilizam a oxidação do piruvato para formar acetato ao invés de reduzi-lo a etanol. Porém, a produção de álcoois superiores poderiam também oferecer um mecanismo a mais de ajuste fino na regeneração dos NAD^+ (QUAIN e DUFFIELD, 1985) já que a sua formação envolve o consumo de NADH. Desta forma, a decarboxilação e posterior redução dos ceta-ácidos e consequente desvio do anabolismo dos aminoácidos ramificados ajudaria a manter o balanço redox celular.

Interessantemente, o meio com valina apresentou umas das maiores μ_{max} junto com o meio AS, menores tempo de geração, assim como a maior produção de etanol, porém com a menor produtividade de 2MP. Sabemos que a valina não pertence à classe 1 de aminoácidos que podem ser utilizados como fonte de nitrogênio. Porém, estes resultados em conjunto sugerem que a valina poderia ser empregada como fonte de carbono no metabolismo central. Isto discordaria com a maioria dos trabalhos afirmam que os aminoácidos ramificados não poderiam ser empregados como fonte de carbono. Não obstante, Pierce (1987) sugere que a disponibilidade de valina seria crítica no final da fermentação já que serviria como principal fonte de esqueletos carbonados.

6.4. ANALISE TRANSCRICIONAL NO MEIO COM ISOLEUCINA

Durante o curso dos cultivos celulares realizados pudemos observar as três fases características do crescimento celular: as primeiras seis horas relativas à fase *lag*, seguida pela fase de crescimento logarítmico que durou até 28 horas, e finalmente a fase estacionária (Figura 3). Em especial, no cultivo em meio com isoleucina foi observada a transição da fase de produção de 2MB, que ocorreu principalmente durante a fase *lag*, e a fase de produção de 2MB que ocorreu durante a fase *log*. Nessa transição ocorreu uma mudança significativa na taxa de consumo de glicose de 0,28 g/L.h para 1,4 g/L.h que é seguida pela produção de etanol, glicerol e acetato.

Neste contexto fisiológico foram evidentes as diferenças no número de genes induzidos ou reprimidos entre os dois estados metabólicos, com maior proporção de genes induzidos (59%) do que reprimidos (40%) (Tabela 5). Os resultados mostraram a

co-regulação de grupos de genes envolvidos em processos biológicos diretamente relacionados com a resposta geral ao conteúdo de nitrogênio, com o metabolismo de biotina, de inositol, de íons metálicos e com a produção de álcoois superiores.

6.4.1. Genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio e biotina.

Dois genes que codificam reguladores transcricionais principais da família GATA (*GAT2* e *GZF3*) e de 17 genes regulados pelo do sistema NCR apresentaram variação na expressão na transição 3MB para 2MB. Como mencionamos anteriormente (Ver 2.5.2. Regulação transcricional do metabolismo do nitrogênio), este sistema de regulação é exercido reprimindo a expressão de diversos genes envolvidos na utilização de fontes de nitrogênio não preferencial, quando uma fonte de nitrogênio preferencial (amônio, glutamine e asparagina, por exemplo) está disponível no meio (COOPER, 1982; WIAME *et al.*, 1985; MAGASANIK, 1992). Atualmente, a família de proteínas GATA é composta por cinco membros, três agindo como ativadores transcricionais (Gln3p, Gat2 e Gat1p) e dois como repressores nos promotores (Dal80p e Gzf3p). Destes, o gene *GAT2* é desreprimido por leucina. No presente trabalho, este gene apresentou forte indução pela isoleucina, enquanto o gene *GZF3* tenha apresentado indução moderada. O gene *GZF3* codifica uma proteína dedo de zinco que regula negativamente a expressão dos genes NCR, competindo com Gat1p e possivelmente com Gat2p pelo sítio de ligação GATA. A forte indução do gene *GAT2* sugere que os genes NCR seriam induzidos pela proteína Gat2p. Além disso, a moderada indução do *GZF3* sugere que os genes NCR estariam em geral sob o controle de uma intrincada rede regulatória de trans e auto-regulação (COFFMAN *et al.*, 1997; ROWEN *et al.*, 1997; BOCZKO *et al.*, 2005). Portanto, os resultados obtidos mostraram que os genes sensíveis a NCR (Figura 8 H1) são regulados também em função da presença de isoleucina no meio, sugerindo que o sistema NCR estaria ativo nestas condições. Trabalhos anteriores (GODARD *et al.*, 2007) sugerem que o sistema NCR só seria ativo com células crescendo em meios com aminoácidos preferenciais e inativos em aminoácido não preferenciais, como a isoleucina.

Foi avaliada a expressão de 12 genes envolvidos no sistema GAAC, todos com a sequência consenso 5'-GAGTCA-3' denominada UASG_{CRE} na região promotora, a qual serve de sítio de ligação para Gcn4p. Contrariamente a NCR, o sistema GAAC está

descrito como ativo em meios com aminoácidos ramificados como fonte de nitrogênio (GODARD *et al.*, 2007). Interessantemente, este grupo de genes são tipicamente induzidos em concentrações altas de leucina, isoleucina, metionina, treonina, triptofano, tirosina (NATARAJAN *et al.*, 2001; GODARD *et al.*, 2007), sugerindo que GAAC é ativado em células crescendo nestas fontes de nitrogênio. Parece que além de ser mais ativo nestas condições o sistema GAAC é também importante para o ótimo crescimento nestes substratos nitrogenados (GODARD *et al.*, 2007). Em adição, esta ativação de GAAC poderia se suceder ao desequilíbrio de aminoácidos ramificados causado pela inibição por retroalimentação das enzimas envolvidas na síntese destes aminoácidos.

Por tudo isto, os dados juntos sugerem uma possível regulação cruzada entre os dois principais controles transcricionais do metabolismo central do nitrogênio e da isoleucina, e por consequência dos aminoácidos ramificados em *S. cerevisiae*. Mais experimentos serão necessários para investigar possíveis ligações moleculares entre NCR e GAAC.

Por outro lado, sabe-se que os álcoois ramificados derivados destes aminoácidos são tóxicos e, assim, excretados pela célula. Os mecanismos envolvidos na excreção de aldeídos e álcoois superiores permanecem desconhecidos. A este respeito, foi observado que no crescimento em triptofano (e em menor extensão em tirosina) ocorreu a indução de vários genes conhecidos como regulados pelo sistema PDR de resposta a drogas. Os genes PDR codificam para transportadores de membrana plasmática conhecidos por promover a excreção de drogas, tais como Qdr3p que tem atividade próton *antiporters* (NELISSE *et al.*, 1997). No presente trabalho, o gene *QDR3* foi induzido em meio com isoleucina, sugerindo que essa proteína pode desempenhar um papel direto na excreção de certa derivados de catabolismo de isoleucina, tais como 2MB.

Adicionalmente, foram fortemente induzidos o gene *BIO5* (regulado pelo sistema GAAC) juntamente com os genes *BIO2*, *BIO3* e *BIO4* (não regulados pelo sistema GAAC), todos envolvidos nos últimos passos da via de síntese de biotina. A Biotina (vitamina B7) é essencial para todos os organismos, sendo considerado um importante fator de promoção do crescimento celular. Este composto é um cofator das enzimas carboxilases, portanto, necessária para a biossíntese de ácidos graxos e para o metabolismo de aminoácidos e dos carboidratos (PHALIP *et al.*, 1999). Apesar de ser auxotrófica para a biotina, levedura *S.cerevisiae* pode ser cultivada em meio suplementado com os

precursores de biotina: o 7-ceto-ácido 8-aminopelargónico, o ácido 7,8-diaminopelargónico e a detiobiotina, os quais são metabolizados pelo produto dos genes *BIO2*, *BIO5*, *BIO3* e *BIO4*. Estes precursores não são muito distribuídos na natureza, ocorrendo somente na biosíntese de biotina. Nos ensaios realizados neste trabalho a concentração inicial de biotina foi 0,002 mg/L, sugerindo que na transição 3MB para 2MB as células de levedura conseguem esgotar a biotina presente, requerendo induzir fortemente os genes envolvidos na sua síntese.

6.4.2. Genes relacionados com o metabolismo aeróbico, metabolismo de carboidratos, de inositol e com a assimilação de cátions

A concentração inicial de glicose em 20 g/L deste trabalho resultou na indução inicial dos genes envolvidos no transporte de hexosas (Figura 9D), genes envolvidos na glicolisis (Figura 10) e na repressão de genes que codificam enzimas envolvidas na respiração mitocondrial (Figura 9A). Isto poderia ser resultado do efeito Crabtree que se manifesta em *S. cerevisiae* a concentrações maiores que 5 mM de glicose (0,9 g/L) (WALKER, 1998). No decorrer do crescimento celular, oito horas após, a concentração de glicose diminui, produzindo a indução dos genes envolvidos no metabolismo de carboidratos (*ISF1*, *HAP4*, *NRG1*, *NRG2*, *RGI1*e*RGI2*) (Figura 9B), e de genes respiratorios tais como *SDH2* (do ciclo do ácido tricarboxílico), *COX5B*, *CYC7* e *NDI1* (da cadeia respiratória) *RSF1* (requeridos para o crescimento respiratório) e *HTD2* (gene mitocondrial) (Figura 9A). Estudos de expressão gênica mostram que este metabolismo fermentativo em condições não limitantes de oxigênio envolve um incremento do fluxo de carbono para a via glicolítica (SANTIAGO *et al.*, 2011). Por exemplo, os genes *TDH2/3* que codificam as isoenzimas II e III da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase apresentarem os maiores níveis de indução em vários meios naturais e sintéticos (PUIG e PÉREZ-ORTÍN, 2000). No mesmo sentido, todos os genes glicolíticos atingiram os máximos níveis de expressão durante as primeiras 24 a 48 h de fermentação, coincidindo com o crescimento celular e com a máxima taxa de fermentação. A continuação, as quantidades de ARNm diminuem progressivamente durante a fase estacionária em paralelo com a redução na taxa fermentativa (PUIG e PÉREZ-ORTÍN, 2000). Nossos resultados, em concordância com a literatura, mostraram o gene com

maior nível de expressão foi *TDH1*, a isoenzima I da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, enquanto os outros genes integrantes da via glicolítica foram moderadamente induzidos. Este grande fluxo de carbono atravessando as enzimas glicolíticas e direcionado para o ciclo do ácido tricarboxílico a través do piruvato. Porém, o complexo enzimático piruvato desidrogenase não alcança metabolizar grandes quantidades de piruvato, desviando-se parte para a formação de acetaldeído e consequente formação de etanol. Estas observações, somadas aos dados fisiológicos que mostram que a cultura está em condições não limitantes de oxigênio (Figura 6), e que apresenta uma limitada produção de etanol, mostram que o crescimento celular em meio com isoleucina nas condições empregadas é em todo momento resultado de um balanço entre o regime aeróbico e o fermentativo, passando de um regime mais aeróbico no início da fase a um mais respiratório-fermentativo na metade da fase de crescimento logarítmico com a diminuição no conteúdo de glicose.

Vários genes relacionados com o metabolismo do inositol e colina apresentaram indução na transição 3MB para 2MB, em especial o gene *INO1* com elevação de 11,85 vezes na sua transcrição, o qual codifica a inositol-1-fosfatase sintase. Inositol e colina são metabólitos intimamente relacionados com o metabolismo de lipídios já que são precursores de vários mensageiros secundários, como fosfatidilinositol e fosfatidilcolina. Griac e colaboradores (1999) mostraram que o promotor do gene *INO1* é reprimido rapidamente em resposta a condições limitantes de nitrogênio e à adição de inositol ao meio, sendo esta inibição o resultado da ligação da proteína repressora Opi1p no motivo UAS_{INO} daquele promotor. Estas características comuns sugerem que as sinalizações convergem em um único mecanismo de regulação envolvido na repressão de controle do gene *INO1* à limitação de nitrogênio e ao excesso de inositol. No presente trabalho, constatamos a presença de inositol no meio de cultura na concentração de 2 mg/L. Além disso, deve-se destacar que o conteúdo de isoleucina inicial foi quase 50 vezes maior do que a quantidade de nitrogênio adequada no contexto das fermentações vinícolas (MENDES FERREIRA *et al.*, 2004). Sugerimos, então, expandir a hipótese apresentada por Griac e colaboradores (1999) de forma que elevadas concentrações de nitrogênio na forma de isoleucina permitem manter a desrepressão do gene *INO1* e dos outros genes co-regulados com efeito dominante sobre o efeito repressor do inositol. Para comprovar esta hipótese seria interessante realizar crescimentos com diferentes concentrações e fontes de nitrogênio na presença ou ausência de inositol.

Outro grupo de genes que apresentou modificação no padrão de expressão foi aquele envolvido na assimilação de cátions, especialmente ferro e cobre. Nosso ensaio apresentou a indução dos genes *FRE2*, *FET3*, *CTR1*, e *SIT1*, os quais estão envolvidos na assimilação com alta afinidade de ferro e cobre. Ao mesmo tempo, também foi induzido o gene *FET4* que codifica um transportador de ferro de baixa afinidade e relevante no transporte de cobre (HASSETT *et al.*, 2000; PORTNOY *et al.*, 2001), cobalto, manganês, e zinco (WATERS e EIDE, 2002). Todos estes elementos são firmemente reprimidos na presença dos seus respectivos substratos metálicos (EIDE, 2000). Esta regulação é mediada pelos fatores de transcrição codificados pelos genes *AFT1*, *AFT2*, *ZRT1*, *ZRT2*, *MAC1* e *ZAP1*. Embora não tenha sido observada neste trabalho a indução destes genes repressores, existem evidências indiretas que nos permitem sugerir a atividade destes fatores. Por exemplo, o gene *HMX1* que apresentou indução no presente trabalho parece ser induzido em condições limitantes de ferro e é reprimido por Aft1p; a indução da ORF *YER130C* é regulada por Zap1p; a expressão do gene *IRC7* é dependente dos níveis de cobre e da proteína Mac1p.

Além disso, o oxigênio representa um parâmetro importante na regulação dos genes de assimilação de cátions. Existe bastante controvérsia neste ponto, dado que foi descrito que os genes *FET3*, *FTR1*, e *SIT1* são induzidos ou reprimidos em condições anaeróbicas (HASSETT *et al.*, 1998; TER LINDE *et al.*, 1999; VASCONCELLES *et al.*, 2001; JENSEN e CULOTTA, 2002). Entretanto, a indução de *FET3* em condições anaeróbicas não parece ter respaldo metabólico, já que codifica uma oxidase dependente de O₂ e consequentemente este sistema de alta afinidade parece funcional unicamente em condições aeróbicas (DE SILVA *et al.*, 1995). Por outro lado, existem fortes evidências que o gene *FET4* é induzido em condições limitantes de oxigênio (HASSETT *et al.*, 1998; TER LINDE *et al.*, 1999; VASCONCELLES *et al.*, 2001; JENSEN e CULOTTA, 2002; WATERS e EIDE, 2002). Esta indução se explicaria pela maior capacidade de sua proteína de transportar do ferro esta no estado de oxidação Fe (II), mais comum em condições anaeróbicas. O aumento na expressão de *FET4* em células anaeróbicas pode ser necessário para manter a acumulação de ferro adequada, passando Fet4p a desempenhar um papel predominante no acúmulo de ferro em condições anaeróbicas (WATERS e EIDE, 2002).

Nos cultivos realizados o meio empregado apresenta concentrações não limitantes

de metais (sulfato de cobre 0,04 mg/L, sulfato de magnésio 500 mg/L, cloreto férrico 0,2 mg/L e sulfato de zinco 0,4 mg/L) capazes de produzir a repressão dos genes. Em adição, o cociente respiratório da cultura ($Q_r > 1$) na transição 3MB para 2MB mostra que as células se encontravam no metabolismo respiro-fermentativo (Figura 7). Em conjunto, nossos resultados mostrarem discordância com os estudos anteriores, observando uma forte indução dos genes *FET3* e *FET4* em condições aeróbicas. Poderíamos sugerir, baseados nas co-induções observadas nestes genes, que as células na metade da fase de crescimento logarítmico tenham extenuado os metais. Alternativamente, indicamos que poderia ser resultado do estado oxido-redutivo das células, medidos em função da relação do consumo de O_2 e produção de CO_2 , que poderia ter maior importância no mecanismo de regulação dos genes envolvidos no metabolismo de íons metálicos como ferro e cobre citados anteriormente. Portanto, parece que a regulação desses genes depende não apenas da disponibilidade dos nutrientes metálicos no meio como também do estado de oxido-redução das células.

6.4.3. Grupo de genes requeridos para esporulação, formação de pseudomicelio e para o ciclo celular

Outro grupo que resultou fortemente induzido foi dos genes *DIA1*, *SFG1* e *MUC1* (> 2 vezes) envolvidos na formação de pseudomicelio. Sabe-se que o crescimento na presença de álcoois superiores, tais como 3MB, 2PE e 3IE induzem o crescimento pseudoifal e o crescimento invasivo (DICKINSON e NORTE, 1993; KERN *et al.*, 2004). Parece que se produz uma comunicação tipo *quorum-sensing*, onde se conectaria à detecção ambiental com a morfogênese. Segundo Chen e colaboradores (2006) mostrarem, do mesmo modo que nossos resultados, que o 2PE estimula modificações morfológicas por indução da expressão de *MUC1*. Do mesmo modo, nos fungos *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* o 2PE e o 3MB produzidos durante o crescimento estimularam a formação de biofilme. Baseados em estes reportes, pareceria que uma das funções da via de Ehrlich é formar moléculas sinais capazes de induzir a diferenciação, participando na adaptação de células de levedura às mudanças ambientais (HAZELWOOD *et al.*, 2008).

6.4.4. Genes relacionados com a formação de álcoois superiores

Apesar dos achados interessantes relativos ao ajuste metabólico das células apresentados na seção anterior, o objetivo primeiro desta análise de expressão gênica foi a de identificar eventuais pequenos ajustes gênicos que explicariam a produção sequencial de 3MB e 2MB no meio com isoleucina, no qual só era esperada a formação de 2MB (Figura 5E e F).

No começo da fase de crescimento logarítmico no meio isoleucina deve haver um fluxo de nitrogênio derivado da assimilação do grupo amino proveniente da isoleucina, e canalizado na formação de aminoácidos utilizados na síntese de proteínas para o crescimento celular. Isto coincide com a indução do gene *ARO9* que codifica uma aminotransferase encarregada de transferir o grupo amino para o alfa-cetoglutarato na formação de glutamato. Ao mesmo tempo foi observada a repressão dos genes *ILV1* e *ILV2*, cujas proteínas estão envolvidas nos primeiros passos na síntese de isoleucina. Esta repressão deve ser consequência da alta concentração do produto final daquela via anabólica, ou seja, a própria isoleucina, no mecanismo de inibição do tipo *feedback*, o que também ocasionaria uma auxotrofia parcial para valina e leucina (HINNEBUSCH e NATARAJAN, 2002). Esta situação permitiria explicar a formação do alfa-cetoisocaproate, precursor da leucina e do próprio 3MB. Ao mesmo tempo, uma elevada atividade descarboxilase citosólica envolvida na conversão do piruvato no metabolismo central parece ser iniciada, denotada pela produção de acetato e etanol. Segundo nossos resultados, o produto do gene *ARO10* pode ser encarregado por esta atividade, já que este apresentou maior nível de expressão na fase de produção de 3MB e que sua proteína com atividade fenilpiruvato descarboxilase também tem afinidade pelo alfa-cetoisocaproate (VURALHAN *et al.*, 2005). Entretanto, não se pode descartar a contribuição de Pdc1p e a atividade regulatória de Pdc2p. Diferente dos outros cetos-ácidos, a formação de alfa-ceto-isocaproate ocorre no citoplasma. Isto permite sua metabolização pela Aro10p, desviando-se da formação de leucina na síntese para o aldeído 3-metilbutanal. Em seguida, a indução dos genes *ADH6* e *AAD14* fariam com que suas álcool desidrogenases correspondentes reduzisse este aldeído ao 3MB. Tudo isto explicaria a formação inesperada de 3MB nos meios amônio sulfato e isoleucina.

Entretanto, na metade do crescimento logarítmico o panorama é modificado. Os

genes envolvidos na síntese de aminoácidos ramificados estão induzidos, como os genes das famílias *LEU* e *ILV*. Ao mesmo tempo, a assimilação do grupo amino continua talvez a partir de um fluxo maior pela atividade dos produtos gênicos de *BAT1/2*, gerando grandes concentrações de 2-ceto-3-metil-valerato. Em paralelo, verificou-se a repressão do gene *ARO10* e indução do gene *PDC5*, o que modificaria o perfil da atividade de descarboxilação que teria mais afinidade por aquele cetó-ácido. Desta maneira se produziria a conversão do 2-ceto-3-metil-valerato no aldeído 2-metil-butanal. Não podemos descartar também a influencia do grau de afinidade pelos cetó-ácidos. Ao mesmo tempo, ocorreu a mudança no painel dos genes que codificam álcool desidrogenase, com a forte indução dos genes *ADH2* e *AAD10* e repressão dos genes *ADH6* e *AAD14*. As desidrogenases codificadas reduziriam o 2-metil-butanal ao 2MB. Dependendo do estado oxido-redutivo das células, não podemos descartar a formação dos ácidos ramificados pela atividade aldeído desidrogenase, produto gênico dos genes *ALD6* e *ALD4*.

O análise do perfil transcricional permite também fazer inferências sobre a produção de alcoóis superiores em meios onde não estão presentes os precursores amino ácidos. No meio com amônio como fonte de nitrogênio observou-se a produção pequena mais significativa de 2MP, 3MB, 2MB e 2PE de até 8 µg/L. Do mesmo modo, foi observada a produção de 2MB nos meios Val, Leu e Phe. Uma possibilidade de explicar a produção de alcoóis superiores é a partir do catabolismo de aminoácidos sintetizados *de novo* em excesso a partir de piruvato (Figura 1). Porém, é pouco provável que ocorra esta degradação já que as células estão em condições não limitantes de nitrogênio. Portanto, sugerimos a possibilidade de que esta produção de alcoóis superiores seja inespecífica. Isto quer dizer que nestas condições as células estão metabolizando grandes quantidades do aminoácido para assimilação do grupo amino para a síntese de glutamato e consequentemente de proteínas. Este dá como resultado uma elevada concentração intracelular de compostos intermediários dessas vias anabólicas, entre os quais se encontram os cetó-ácidos.

Conseqüentemente, devido à atividade descarboxilase presente envolvida no decarboxilação de piruvato na formação de acetaldeído (indicado pela formação de etanol e acetato), se produziria a conversão do cetó-ácidos nos cetó-aldeído correspondentes, desviando o fluxo da síntese de aminoácidos para a produção final de alcoóis superiores.

Embora a biossíntese de valina, isoleucina e a maior parte de leucina estão compartimentalizadas dentro da mitocôndria (Figura 1), existem descritos 11 transportadores específicos de ceto-ácidos mitocondriais (KUNJI e ROBINSON, 2006) que poderiam conduzir o excesso de ceto-ácidos da mitocôndria para o citoplasma expondo estes à ação das enzimas descarboxilases. Esta hipótese se sustenta no fato que a os últimos três passos na via anabólica de leucina a cargo das enzimas Leu1p e Leu2p e Bat2p são extra-mitocondriais, o que explicaria a prematura aparição de 3MB (derivado da leucina) nos meios AS e Iso. Também se sustenta pela regulação gênica temporal dos genes envolvidos na via de Ehrlich observadas no presente trabalho. Da mesma maneira, também podemos explicar a formação de 2PE nos meios nos quais fenilalanina não está presente. A via anabólica de aminoácidos aromáticos emprega o composto eritrose-4-fosfato, um intermediário do ciclo da pentose fosfato que serve como precursor através do esquimato. Esta via pode formar *de novo* fenilalanina, requerida para a biossíntese de proteínas e um excesso do fenilpiruvato intermediário poderiam ser desviado na formação de 2PE.

De esta maneira, a produção de diferentes álcoois superiores dependendo do tipo de aminoácidos empregados seria de grande ajuda no contexto da produção de cachaça. O emprego de combinações mensuradas de aminoácidos ramificados e aromáticos junto com sulfato de amônio em fermentações industriais poderia outorgar à cachaça características organolépticas diferenciadas de alto valor comercial.

7. CONCLUSÕES

No meio sulfato de amônio observo-se o melhor desempenho fermentativo, confirmando a prática usual dos produtores de cachaça e vinho de adicionar sulfato de amônio para evitar problemas de baixo rendimento.

O meio com valina apresentou um perfil fermentativo similar ao meio sulfato de amônio. Foi o único aminoácido dos estudados que permitiu crescimento celular adequado sugerindo que a valina poderia ser empregada como substrato no metabolismo central.

Os aminoácidos ramificados e aromáticos são capazes de produzir concentrações de 300 a 1000 µg/L de álcoois superiores, 30 a 100 vezes a mais em comparação com o produzido no meio de sulfato de amônio.

Foi corroborada a via de Ehrlich proposta para o metabolismo de aminoácidos ramificados e aromáticos.

Observou-se uma relação direta entre o menor tempo de geração celular e a produção do álcool superior.

Os dados de expressão gênica sugerem que diferenças na concentração de isoleucina produzem uma possível regulação cruzada entre os dois principais controles transcricionais do metabolismo central do nitrogênio, o sistema NCR e GAAC.

Ao mesmo tempo, sugerimos que elevadas concentrações de nitrogênio na forma de isoleucina permitiriam manter a desrepressão do gene *INO1* e dos outros genes co-regulados, com efeito dominante sobre o efeito repressor do inositol.

O conteúdo de oxigênio no meio poderia ter um papel preponderante no mecanismo de regulação de genes envolvidos na assimilação de íons metálicos.

A análise de transcrição gênica sugere que a produção inusitada de 3MB no meio isoleucina pode ser resultado da síntese *de novo* do aminoácido leucina a partir do piruvato, e da aparente regulação temporal diferencial dos níveis de transcrição dos genes da via de Ehrlich.

Ao mesmo tempo, sugerimos que a compartimentalização exercida pela mitocôndria e o grau de afinidade e atividade global das alfa-ceto ácidos descarboxilases sejam as principais causa da produção de álcoois superiores em meios nos quais não está presente o aminoácido precursor.

8. REFERÊNCIAS

- ALTAMURA, N.; DUJARDIN, G.; GROUDINSKY, O.; SLONIMSKI, P. P. **Two adjacent nuclear genes, ISF1 and NAM7/UPF1, cooperatively participate in mitochondrial functions in *Saccharomyces cerevisiae*.** Molecular and General Genetics MGG, v. 242, n. 1, p. 49-56, 1994.
- AMBROZIAK, J.; HENRY, S. A. **INO2 and INO4 gene products, positive regulators of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, form a complex that binds to the INO1 promoter.** Journal of Biological Chemistry, v. 269, n. 21, p. 15344-15349, 1994.
- ANDERSON, R.; KIRSOP, B. **Oxygen as a regulator of ester accumulation during the fermentation of wort of high specific gravity.** J. Inst. Brew, v. 81, p. 111-115, 1975.
- ARITOMI, K.; HIROSAWA, I.; HOSHIDA, H.; SHIIGI, M.; NISHIZAWA, Y.; KASHIWAGI, S.; AKADA, R. **Self-cloning yeast strains containing novel FAS2 mutations produce a higher amount of ethyl caproate in Japanese sake.** Bioscience, biotechnology, and biochemistry, v. 68, n. 1, p. 206-214, 2004.
- ARVANITIDIS, A.; HEINISCH, J. J. **Studies on the function of yeast phosphofructokinase subunits by in vitro mutagenesis.** Journal of Biological Chemistry, v. 269, n. 12, p. 8911-8918, 1994.
- ASKWITH, C.; EIDE, D.; VAN HO, A.; BERNARD, P. S.; LI, L.; DAVIS-KAPLAN, S.; SIPE, D. M.; KAPLAN, J. **The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake.** Cell, v. 76, n. 2, p. 403, 1994.
- ÄYRÄPÄÄ, T.; LINDSTRÖM, I. **Aspects of the influence of exogenous fatty acids on the fatty acid metabolism of yeast alcoholic drinks.** 1977. European Brewery Convention.
- BECK, T.; HALL, M. N. **The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors.** Nature, v. 402, n. 6762, p. 689-692, 1999.
- BELTZER, J. P.; MORRIS, S.; KOHLHAW, G. **Yeast LEU4 encodes mitochondrial and nonmitochondrial forms of alpha-isopropylmalate synthase.** Journal of Biological Chemistry, v. 263, n. 1, p. 368-374, 1988.
- BISSON, L. F. **Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes.** 1991. American Society for Enology and Viticulture, ASEV. p.78-89.
- BLAISEAU, P. L.; LESUISSE, E.; CAMADRO, J. M. **Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast.** Journal of Biological Chemistry, v. 276, n. 36, p. 34221-34226, 2001.
- BOCZKO, E. M.; COOPER, T. G.; GEDEON, T.; MISCHAIKOW, K.; MURDOCK, D. G.; PRATAP, S.; WELLS, K. S. **Structure theorems and the dynamics of nitrogen catabolite repression in yeast.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 102, n. 16, p. 5647, 2005.
- BOER, V. M.; DE WINDE, J. H.; PRONK, J. T.; PIPER, M. D. W. **The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur.** Journal of Biological Chemistry, v. 278, n. 5, p. 3265-3274, 2003.
- BOLES, E.; SCHULTE, F.; MIOGA, T.; FREIDEL, K.; SCHLÜTER, E.; ZIMMERMANN, F. K.; HOLLENBERG, C. P.; HEINISCH, J. J. **Characterization of a glucose-repressed pyruvate kinase (Pyk2p) in *Saccharomyces cerevisiae* that is catalytically insensitive to fructose-1, 6-bisphosphate.** Journal of bacteriology, v. 179, n. 9, p. 2987-2993, 1997.
- BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing yeast and fermentation.** Wiley Online Library, 2001.
- BRANDRISS, M. C. **Evidence for positive regulation of the proline utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.** Genetics, v. 117, n. 3, p. 429-435, 1987.

- BROWN, S. L.; STOCKDALE, V. J.; PETTOLINO, F.; POCOCK, K. F.; DE BARROS LOPES, M.; WILLIAMS, P. J.; BACIC, A.; FINCHER, G. B.; HØJ, P. B.; WATERS, E. J. **Reducing haziness in white wine by overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* genes YOL155c and YDR055w.** Applied microbiology and biotechnology, v. 73, n. 6, p. 1363-1376, 2007.
- BURKE, P. V.; RAITT, D. C.; ALLEN, L. A.; KELLOGG, E. A.; POYTON, R. O. **Effects of oxygen concentration on the expression of cytochrome c and cytochrome c oxidase genes in yeast.** Journal of Biological Chemistry, v. 272, n. 23, p. 14705-14712, 1997.
- CARRAU, F. M.; MEDINA, K.; FARINA, L.; BOIDO, E.; HENSCHKE, P. A.; DELLACASSA, E. **Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains.** FEMS Yeast Res, v. 8, n. 7, p. 1196-207, Nov 2008.
- CASALONE, E.; FIA, G.; BARBERIO, C.; CAVALIERI, D.; TURBANTI, L.; POLSINELLI, M. **Genetic and biochemical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to trifluoroleucine.** Research in microbiology, v. 148, n. 7, p. 613-623, 1997.
- CHEN, H.; FINK, G. R. **Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols.** Genes & development, v. 20, n. 9, p. 1150-1161, 2006.
- CHERRY, J. M.; HONG, E. L.; AMUNDSEN, C.; BALAKRISHNAN, R.; BINKLEY, G.; CHAN, E. T.; CHRISTIE, K. R.; COSTANZO, M. C.; DWIGHT, S. S.; ENGEL, S. R. ***Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast.** Nucleic acids research, v. 40, n. D1, p. D700-D705, 2012.
- COFFMAN, J. A.; RAI, R.; LOPRETE, D. M.; CUNNINGHAM, T.; SVETLOV, V.; COOPER, T. G. **Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*.** Journal of bacteriology, v. 179, n. 11, p. 3416, 1997.
- COLÓN, M.; HERNÁNDEZ, F.; LÓPEZ, K.; QUEZADA, H.; GONZÁLEZ, J.; LÓPEZ, G.; ARANDA, C.; GONZÁLEZ, A. ***Saccharomyces cerevisiae* Bat1 and Bat2 Aminotransferases Have Functionally Diverged from the Ancestral-Like *Kluyveromyces lactis* Orthologous Enzyme.** PloS one, v. 6, n. 1, p. e16099, 2011.
- COOPER, T. **Allantoin degradative system—an integrated transcriptional response to multiple signals.** Mycota, v. 3, p. 139-169, 1996.
- COOPER, T. G. **Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** Cold Spring Harbor Monograph Archive, v. 11, n. 0, p. 39-99, 1982.
- COOPER, T. G. **Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots.** FEMS microbiology reviews, v. 26, n. 3, p. 223-238, 2002.
- COSCHIGANO, P. W.; MAGASANIK, B. **The URE2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione s-transferases.** Molecular and cellular biology, v. 11, n. 2, p. 822, 1991.
- CULLIN, C.; BAUDIN-BAILLIEU, A.; GUILLEMET, E.; OZIER-KALOGEROPOULOS, O. **Functional analysis of YCL09C: evidence for a role as the regulatory subunit of acetolactate synthase.** Yeast, v. 12, n. 15, p. 1511-1518, 1996.
- DANCIS, A.; KLAUSNER, R.; HINNEBUSCH, A.; BARRIOCANAL, J. **Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*.** Molecular and cellular biology, v. 10, n. 5, p. 2294-2301, 1990.
- DE ARAÚJO VICENTE, M.; FIETTO, L. G.; DE MIRANDA CASTRO, I.; GONCALVES DOS SANTOS, A. N.; COUTRIM, M. X.; BRANDAO, R. L. **Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of.** International journal of food microbiology, v. 108, n. 1, p. 51-59, 2006.

- DE BARROS PITA, W.; LEITE, F. C. B.; DE SOUZA LIBERAL, A. T.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS, M. A. **The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes.** *Antonie van Leeuwenhoek*, p. 1-9, 2011.
- DE LA CRUZ, J.; KRESSLER, D.; TOLLERVEY, D.; LINDER, P. **Dob1p (Mtr4p) is a putative ATP-dependent RNA helicase required for the 3' end formation of 5.8 S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*.** *The EMBO journal*, v. 17, n. 4, p. 1128-1140, 1998.
- DE SILVA, D. M.; ASKWITH, C. C.; EIDE, D.; KAPLAN, J. **The FET3 gene product required for high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 3, p. 1098, 1995.
- DELNERI, D.; GARDNER, D. C. J.; OLIVER, S. G. **Analysis of the seven-member AAD gene set demonstrates that genetic redundancy in yeast may be more apparent than real.** *Genetics*, v. 153, n. 4, p. 1591-1600, 1999.
- DICKINSON, J. R.; DAWES, I. W. **The catabolism of branched-chain amino acids occurs via 2-oxoacid dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of general microbiology*, v. 138, n. 10, p. 2029, 1992.
- DICKINSON, J. R.; NORTE, V. **A study of branched-chain amino acid aminotransferase and isolation of mutations affecting the catabolism of branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEBS letters*, v. 326, n. 1-3, p. 29-32, 1993.
- DICKINSON, J. R.; SALGADO, L. E. J.; HEWLINS, M. J. E. **The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 10, p. 8028, 2003.
- DIX, D.; BRIDGHAM, J.; BRODERIUS, M.; EIDE, D. **Characterization of the FET4 protein of yeast.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 18, p. 11770-11777, 1997.
- DIX, D. R.; BRIDGHAM, J. T.; BRODERIUS, M. A.; BYERSDORFER, C. A.; EIDE, D. J. **The FET4 gene encodes the low affinity Fe (II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 42, p. 26092-26099, 1994.
- DONAHUE, T.; HENRY, S. **myo-Inositol-1-phosphate synthase. Characteristics of the enzyme and identification of its structural gene in yeast.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 256, n. 13, p. 7077-7085, 1981.
- DOUGLAS, L. M.; LI, L.; YANG, Y.; DRANGINIS, A. **Expression and characterization of the flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein with homotypic properties of adhesion.** *Eukaryotic cell*, v. 6, n. 12, p. 2214-2221, 2007.
- EHRlich, F. **Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe.** *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, v. 40, n. 1, p. 1027-1047, 1907.
- EIDE, D. J. **Metal ion transport in eukaryotic microorganisms: insights from *Saccharomyces cerevisiae*.** *Advances in microbial physiology*, v. 43, p. 1-38, 2000.
- ERIKSSON, P.; ANDRÉ, L.; ANSELL, R.; BLOMBERG, A.; ADLER, L. **Cloning and characterization of GPD2, a second gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in *Saccharomyces cerevisiae*, and its comparison with GPD1.** *Molecular microbiology*, v. 17, n. 1, p. 95-107, 1995.
- ESPINOSA VIDAL, E.; DE BILLERBECK, G.; SIMÕES, D.; SCHULER, A.; FRANÇOIS, J.; DE MORAIS, M. A. J. **Influence of nitrogen supplementation on flavors-related gene transcription and aroma profile of *Sacharomyces cerevisiae* on sugar cane juice fermentation for cachaça production.** submetido a *FOOD MICROBIOLOGY*., 2011.

- FILHO, E. A. S.; DE MELO, H. F.; ANTUNES, D. F.; SANTOS, S. K. B.; RESENDE, A. M.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS JR, M. A. **Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 32, n. 10, p. 481-486, 2005.
- FORSBURG, S. L.; GUARENTE, L. **Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer.** Genes & development, v. 3, n. 8, p. 1166, 1989.
- FROMONT-RACINE, M.; SENGER, B.; SAVEANU, C.; FASIOLO, F. **Ribosome assembly in eukaryotes.** Gene, v. 313, p. 17-42, 2003.
- FUJITA, A.; HIROKO, T.; HIROKO, F.; OKA, C. **Enhancement of superficial pseudohyphal growth by overexpression of the SFG1 gene in yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** Gene, v. 363, p. 97-104, 2005.
- FYRST, H.; OSKOUIAN, B.; KUYPERS, F. A.; SABA, J. D. **The PLB2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* confers resistance to lysophosphatidylcholine and encodes a phospholipase B/lysophospholipase.** Biochemistry, v. 38, n. 18, p. 5864-5871, 1999.
- GEORGATSOU, E.; ALEXANDRAKI, D. **Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*.** Molecular and cellular biology, v. 14, n. 5, p. 3065-3073, 1994.
- GEORGATSOU, E.; MAVROGIANNIS, L. A.; FRAGIADAKIS, G. S.; ALEXANDRAKI, D. **The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator.** Journal of Biological Chemistry, v. 272, n. 21, p. 13786-13792, 1997.
- GODARD, P.; URRESTARAZU, A.; VISSERS, S.; KONTOS, K.; BONTEMPI, G.; VAN HELDEN, J.; ANDRÉ, B. **Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** Molecular and cellular biology, v. 27, n. 8, p. 3065, 2007.
- GOFFEAU, A.; BARRELL, B.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.; JACQ, C.; JOHNSTON, M. **Life with 6000 genes.** Science, v. 274, n. 5287, p. 546, 1996.
- GOMES, F.; SILVA, C.; MARINI, M.; OLIVEIRA, E.; ROSA, C. **Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil.** Journal of applied microbiology, v. 103, n. 6, p. 2438-2447, 2007.
- GÖTZ, R.; GNANN, A.; ZIMMERMANN, F. K. **Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect.** Yeast, v. 15, n. 10A, p. 855-864, 1999.
- GREENBERG, M. L.; LOPES, J. M. **Genetic regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.** Microbiological reviews, v. 60, n. 1, p. 1, 1996.
- GRIAC, P.; HENRY, S. A. **The yeast inositol-sensitive upstream activating sequence, UASINO, responds to nitrogen availability.** Nucleic acids research, v. 27, n. 9, p. 2043-2050, 1999.
- GROMADKA, R.; KANIAK, A.; SLONIMSKI, P.; RYTKA, J. **A novel cross-phylum family of proteins comprises a KRR1 (YCL059c) gene which is essential for viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells.** Gene, v. 171, n. 1, p. 27-32, 1996.
- GROSS, C.; KELLEHER, M.; IYER, V. R.; BROWN, P. O.; WINGE, D. R. **Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays.** Journal of Biological Chemistry, v. 275, n. 41, p. 32310-32316, 2000.
- GSTAIGER, M.; LUKE, B.; HESS, D.; OAKELEY, E. J.; WIRBELAUER, C.; BLONDEL, M.; VIGNERON, M.; PETER, M.; KREK, W. **Control of nutrient-sensitive transcription programs by the unconventional prefoldin URI.** Science's STKE, v. 302, n. 5648, p. 1208, 2003.

- HAMMOND, J. R. M. **Genetically modified brewing yeasts for the 21st century. Progress to date.** *Yeast*, v. 11, n. 16, p. 1613-1627, 1995.
- HASSETT, R.; DIX, D.; EIDE, D.; KOSMAN, D. J. **The Fe (II) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochemical Journal*, v. 351, n. Pt 2, p. 477, 2000.
- HASSETT, R. F.; ROMEO, A. M.; KOSMAN, D. J. **Regulation of High Affinity Iron Uptake in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 13, p. 7628, 1998.
- HAZELWOOD, L. A.; DARAN, J. M.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T.; DICKINSON, J. R. **The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism.** *Applied and environmental microbiology*, v. 74, n. 8, p. 2259, 2008.
- HEIMAN, M. G.; WALTER, P. **Prm1p, a pheromone-regulated multispinning membrane protein, facilitates plasma membrane fusion during yeast mating.** *The Journal of cell biology*, v. 151, n. 3, p. 719-730, 2000.
- HEINISCH, J. J.; MÜLLER, S.; SCHLÜTER, E.; JACOBY, J.; RODICIO, R. **Investigation of two yeast genes encoding putative isoenzymes of phosphoglycerate mutase.** *Yeast*, v. 14, n. 3, p. 203-213, 1998.
- HENSCHKE, P.; JIRANEK, V. **Yeasts–metabolism of nitrogen compounds.** *Wine microbiology and biotechnology*, p. 77-164, 1993.
- HEPWORTH, S. R.; EBISUZAKI, L. K.; SEGALL, J. **A 15-base-pair element activates the *SPS4* gene midway through sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Molecular and cellular biology*, v. 15, n. 7, p. 3934-3944, 1995.
- HIGGINS, V. J.; BECKHOUSE, A. G.; OLIVER, A. D.; ROGERS, P. J.; DAWES, I. W. **Yeast genome-wide expression analysis identifies a strong ergosterol and oxidative stress response during the initial stages of an industrial lager fermentation.** *Applied and environmental microbiology*, v. 69, n. 8, p. 4777-4787, 2003.
- HINNEBUSCH, A. G. **General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*.** *The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: gene expression*, p. 319–414, 1992.
- HINNEBUSCH, A. G.; NATARAJAN, K. **Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress.** *Eukaryotic cell*, v. 1, n. 1, p. 22, 2002.
- HIRAYARNA, T.; MAEDA, T.; SAITO, H.; SHINOZAKI, K. **Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Molecular and General Genetics MGG*, v. 249, n. 2, p. 127-138, 1995.
- HIRSCH, J. P.; HENRY, S. A. **Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* inositol-1-phosphate synthase (INO1) gene is regulated by factors that affect phospholipid synthesis.** *Molecular and cellular biology*, v. 6, n. 10, p. 3320-3328, 1986.
- HOAREAU-AVEILLA, C.; FAYET-LEBARON, E.; JÁDY, B. E.; HENRAS, A. K.; KISS, T. **Utp23p is required for dissociation of snR30 small nucleolar RNP from preribosomal particles.** *Nucleic acids research*, 2011.
- HODGE, M. R.; KIM, G.; SINGH, K.; CUMSKY, M. G. **Inverse regulation of the yeast COX5 genes by oxygen and heme.** *Molecular and cellular biology*, v. 9, n. 5, p. 1958-1964, 1989.
- HUANG, D.; FRIESEN, H.; ANDREWS, B. **Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast.** *Molecular microbiology*, v. 66, n. 2, p. 303-314, 2007.

- IRAQUI, I.; VISSERS, S.; ANDRÉ, B.; URRESTARAZU, A. **Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae***. Molecular and cellular biology, v. 19, n. 5, p. 3360-3371, 1999.
- IRAQUI, I.; VISSERS, S.; CARTIAUX, M.; URRESTARAZU, A. **Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* ARO8 and ARO9 genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily**. Molecular and General Genetics MGG, v. 257, n. 2, p. 238-248, 1998.
- ISHIDA, S.; LEE, J.; THIELE, D. J.; HERSKOWITZ, I. **Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 99, n. 22, p. 14298, 2002.
- JENSEN, L. T.; CULOTTA, V. C. **Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* FET4 by oxygen and iron**. Journal of molecular biology, v. 318, n. 2, p. 251-260, 2002.
- JIMÉNEZ-MARTÍ, E.; ARANDA, A.; MENDES-FERREIRA, A.; MENDES-FAIA, A.; DEL OLMO, M. **The nature of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a *Saccharomyces cerevisiae* strain in synthetic must affects gene expression and the levels of several volatile compounds**. Antonie van Leeuwenhoek, v. 92, n. 1, p. 61-75, 2007.
- JONES, M.; PIERCE, J. **Absorption of amino acids from wort by yeasts**. J. Inst. Brew, v. 70, p. 307-315, 1964.
- JUNG, U. S.; LEVIN, D. E. **Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway**. Molecular microbiology, v. 34, n. 5, p. 1049-1057, 1999.
- JUNGSMANN, J.; REINS, H. A.; LEE, J.; ROMEO, A.; HASSETT, R.; KOSMAN, D.; JENTSCH, S. **MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast**. The EMBO journal, v. 12, n. 13, p. 5051, 1993.
- KANG, J. Y.; HONG, Y.; ASHIDA, H.; SHISHIOH, N.; MURAKAMI, Y.; MORITA, Y. S.; MAEDA, Y.; KINOSHITA, T. **PIG-V involved in transferring the second mannose in glycosylphosphatidylinositol**. Journal of Biological Chemistry, v. 280, n. 10, p. 9489-9497, 2005.
- KARKUSIEWICZ, I.; REMPOLA, B.; GROMADKA, R.; GRYNBERG, M.; RYTKA, J. **Functional and physical interactions of Faf1p, a *Saccharomyces cerevisiae* nucleolar protein**. Biochemical and biophysical research communications, v. 319, n. 2, p. 349-357, 2004.
- KASTANIOTIS, A. J.; AUTIO, K. J.; SORMUNEN, R. T.; HILTUNEN, J. K. **Htd2p/Yhr067p is a yeast 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase essential for mitochondrial function and morphology**. Molecular microbiology, v. 53, n. 5, p. 1407-1421, 2004.
- KELDER, T.; VAN IERSEL, M. P.; HANSPERS, K.; KUTMON, M.; CONKLIN, B. R.; EVELO, C. T.; PICO, A. R. WikiPathways: building research communities on biological pathways. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. D1301-D1307, 2012.
- KERN, K.; NUNN, C. D.; PICHOVÁ, A.; DICKINSON, J. R. **Isoamyl alcohol-induced morphological change in *Saccharomyces cerevisiae* involves increases in mitochondria and cell wall chitin content**. FEMS yeast research, v. 5, n. 1, p. 43-49, 2004.
- KUNJI, E. R. S.; ROBINSON, A. J. **The conserved substrate binding site of mitochondrial carriers**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, v. 1757, n. 9, p. 1237-1248, 2006.
- LAMBRECHTS, M.; PRETORIUS, I. **Yeast and its importance to wine aroma-a review**. South African Journal of Enology and Viticulture (South Africa), 2000.
- LARROY, C.; PARES, X.; BIOSCA, J. A. **Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP (H) dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family**. European Journal of Biochemistry, v. 269, n. 22, p. 5738-5745, 2002.

- LI, Z.; LEE, I.; MORADI, E.; HUNG, N. J.; JOHNSON, A. W.; MARCOTTE, E. M. **Rational extension of the ribosome biogenesis pathway using network-guided genetics.** PLoS biology, v. 7, n. 10, p. e1000213, 2009.
- LILLY, M.; BAUER, F. F.; STYGER, G.; LAMBRECHTS, M. G.; PRETORIUS, I. S. **The effect of increased branched chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates.** FEMS yeast research, v. 6, n. 5, p. 726-743, 2006.
- LOEWY, B. S.; HENRY, S. A. **The INO2 and INO4 loci of Saccharomyces cerevisiae are pleiotropic regulatory genes.** Molecular and cellular biology, v. 4, n. 11, p. 2479-2485, 1984.
- LÖHNING, C.; CIRIACY, M. **The TYE7 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes a putative bHLH-LZ transcription factor required for Tyl-mediated gene expression.** Yeast, v. 10, n. 10, p. 1329-1339, 1994.
- LOPES, J. M.; HENRY, S. A. **Interaction of trans and cis regulatory elements in the INO1 promoter of Saccharomyces cerevisiae.** Nucleic acids research, v. 19, n. 14, p. 3987-3994, 1991.
- LÓPEZ, M. C.; BAKER, H. V. **Understanding the Growth Phenotype of the Yeast gcr1 Mutant in Terms of Global Genomic Expression Patterns.** Journal of bacteriology, v. 182, n. 17, p. 4970-4978, 2000.
- LU, L.; ROBERTS, G.; SIMON, K.; YU, J.; HUDSON, A. P. **Rsf1p, a protein required for respiratory growth of Saccharomyces cerevisiae.** Current genetics, v. 43, n. 4, p. 263-272, 2003.
- LUCENA, B.; SILVA-FILHO, E.; COIMBRA, M.; MORAIS, J.; SIMÕES, D.; MORAIS JR, M. **Chromosome instability in industrial strains of Saccharomyces cerevisiae batch cultivated under laboratory conditions.** Genetics and Molecular Research, v. 6, n. 4, p. 1072-1084, 2007.
- MAGASANIK, B. **Regulation of nitrogen utilization.** The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: gene expression, v. 2, p. 283-317, 1992.
- MAGASANIK, B.; KAISER, C. A. **Nitrogen regulation in Saccharomyces cerevisiae.** Gene, v. 290, n. 1-2, p. 1-18, 2002.
- MAJARA, M.; O'CONNOR-COX, E.; AXCELL, B. **Trehalose: an osmoprotectant and stress indicator compound in high and very high gravity brewing.** American Society of Brewing Chemists, v. 54, 1996.
- MAO, C.; WADLEIGH, M.; JENKINS, G. M.; HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. **Identification and characterization of Saccharomyces cerevisiae dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatase.** Journal of Biological Chemistry, v. 272, n. 45, p. 28690-28694, 1997.
- MARINI, M. M.; GOMES, F. C. O.; SILVA, C. L. C.; CADETE, R. M.; BADOTTI, F.; OLIVEIRA, E. S.; CARDOSO, C. R.; ROSA, C. A. **The use of selected starter Saccharomyces cerevisiae strains to produce traditional and industrial cachaça: a comparative study.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 25, n. 2, p. 235-242, 2009.
- MARRES, C.; VRIES, S.; GRIVELL, L. **Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from Saccharomyces cerevisiae.** European Journal of Biochemistry, v. 195, n. 3, p. 857-862, 1991.
- MARTIN, A.; SCHNEIDER, S.; SCHWER, B. **Prp43 is an essential RNA-dependent ATPase required for release of lariat-intron from the spliceosome.** Journal of Biological Chemistry, v. 277, n. 20, p. 17743-17750, 2002.
- MCALISTER, L.; HOLLAND, M. **Differential expression of the three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes.** Journal of Biological Chemistry, v. 260, n. 28, p. 15019-15027, 1985.
- MENDES-FERREIRA, A.; DEL OLMO, M.; GARCIA-MARTINEZ, J.; JIMENEZ-MARTI, E.; MENDES-FAIA, A.; PEREZ-ORTIN, J.; LEAO, C. **Transcriptional response of Saccharomyces cerevisiae to different nitrogen concentrations during alcoholic fermentation.** Applied and environmental microbiology, v. 73, n. 9, p. 3049, 2007.

- MENDES FERREIRA, A.; MENDES FAIA, A.; LEAO, C. **Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry.** Journal of applied microbiology, v. 97, n. 3, p. 540-545, 2004.
- MESSENGUY, F.; DUBOIS, E. **Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development.** Gene, v. 316, p. 1-21, 2003.
- MONTEIRO, F. F.; TROUSDALE, E. K.; BISSON, L. F. **Ethyl carbamate formation in wine: Use of radioactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea.** American journal of enology and viticulture, v. 40, n. 1, p. 1, 1989.
- NADKARNI, A. K.; MCDONOUGH, V. M.; YANG, W. L.; STUKEY, J. E.; OZIER-KALOGEROPOULOS, O.; CARMAN, G. M. **Differential biochemical regulation of the URA7-and URA8-encoded CTP synthetases from *Saccharomyces cerevisiae*.** Journal of Biological Chemistry, v. 270, n. 42, p. 24982-24988, 1995.
- NATARAJAN, K.; MEYER, M. R.; JACKSON, B. M.; SLADE, D.; ROBERTS, C.; HINNEBUSCH, A. G.; MARTON, M. J. **Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast.** Molecular and cellular biology, v. 21, n. 13, p. 4347-4368, 2001.
- NELISSEN, B.; WACHTER, R.; GOFFEAU, A. **Classification of all putative permeases and other membrane plurispansers of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*.** FEMS microbiology reviews, v. 21, n. 2, p. 113-134, 1997.
- NIEWMIERZYCKA, A.; CLARKE, S. **S-Adenosylmethionine-dependent Methylation in *Saccharomyces cerevisiae* IDENTIFICATION OF A NOVEL PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE.** Journal of Biological Chemistry, v. 274, n. 2, p. 814-824, 1999.
- NIKAWA, J.; TSUKAGOSHI, Y.; YAMASHITA, S. **Isolation and characterization of two distinct myo-inositol transporter genes of *Saccharomyces cerevisiae*.** Journal of Biological Chemistry, v. 266, n. 17, p. 11184-11191, 1991.
- NIKOLOFF, D.; HENRY, S. A. **Functional characterization of the INO2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. A positive regulator of phospholipid biosynthesis.** Journal of Biological Chemistry, v. 269, n. 10, p. 7402-7411, 1994.
- NOVO, M.; BELTRAN, G.; ROZES, N.; GUILLAMON, J. M.; SOKOL, S.; LEBERRE, V.; FRANÇOIS, J.; MAS, A. **Early transcriptional response of wine yeast after rehydration: osmotic shock and metabolic activation.** FEMS yeast research, v. 7, n. 2, p. 304-316, 2007.
- O'CONNOR-COX, E.; INGLEDEW, W. **Their Use by Brewing: A Review.** ASBC J, v. 4, p. 102-108, 1989.
- OBA, T.; NOMIYAMA, S.; HIRAKAWA, H.; TASHIRO, K.; KUHARA, S. **Asp578 in LEU4p is one of the key residues for leucine feedback inhibition release in sake yeast.** Bioscience, biotechnology, and biochemistry, v. 69, n. 7, p. 1270-1273, 2005.
- OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; MORGANO, M. A.; SERRA, G. E. **Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 20, n. 1, p. 19-24, 2004.
- OYEDOTUN, K. S.; LEMIRE, B. D. **The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase.** Journal of Biological Chemistry, v. 279, n. 10, p. 9424-9431, 2004.
- ÖZCAN, S.; JOHNSTON, M. **Function and regulation of yeast hexose transporters.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 63, n. 3, p. 554-569, 1999.
- PALECEK, S. P.; PARIKH, A. S.; KRON, S. J. **Genetic analysis reveals that FLO11 upregulation and cell polarization independently regulate invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*.** Genetics, v. 156, n. 3, p. 1005-1023, 2000.

PALTAUF, F.; KOHLWEIN, S. D.; HENRY, S. A. **Regulation and compartmentalization of lipid synthesis in yeast.** The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: gene expression, v. 2, p. 415-500, 1992.

PATARO, C.; GUERRA, J.; PETRILLO PEIXOTO, M.; MENDONÇA HAGLER, L.; LINARDI, V.; ROSA, C. **Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil.** Journal of applied microbiology, v. 89, n. 1, p. 24-31, 2000.

PATHVISIO. ver Van Iersel *et al* 2008.

PBDAC. **Programa Brasileiro De Desenvolvimento Da Cachaça.**2012. Disponível em: <www.pbdac.com.br>.

PETERSEN, J. G. L.; HOLMBERG, S. **The ILVS gene of *Saccharomyces cerevisiae* is highly expressed.** Nucleic acids research, v. 14, n. 24, p. 9631-9651, 1986.

PHALIP, V.; KUHN, I.; LEMOINE, Y.; JELTSCH, J. M. **Characterization of the biotin biosynthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and evidence for a cluster containing BIO5, a novel gene involved in vitamer uptake.** Gene, v. 232, n. 1, p. 43-51, 1999.

PIERCE, J. **The role of nitrogen in brewing.** Journal of the Institute of Brewing, v. 93, n. 5, p. 378-381, 1987.

PISARNITSKII, A. **Formation of Wine Aroma: Tones and Imperfections Caused by Minor Components.** Applied Biochemistry and Microbiology, v. 37, n. 6, p. 552-560, 2001.

PORTNOY, M.; SCHMIDT, P.; ROGERS, R.; CULOTTA, V. **Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*.** Molecular Genetics and Genomics, v. 265, n. 5, p. 873-882, 2001.

PUIG, S.; PÉREZ-ORTÍN, J. E. **Expression levels and patterns of glycolytic yeast genes during wine fermentation.** Systematic and applied microbiology, v. 23, n. 2, p. 300-303, 2000.

QUAIN, D.; DUFFIELD, M. **A metabolic function for higher alcohol production by yeast.** 1985. p.307-314.

RABITSCH, K. P.; TÓTH, A.; GÁLOVÁ, M.; SCHLEIFFER, A.; SCHAFFNER, G.; AIGNER, E.; RUPP, C.; PENKNER, A. M.; MORENO-BORCHART, A. C.; PRIMIG, M. **A screen for genes required for meiosis and spore formation based on whole-genome expression.** Current Biology, v. 11, n. 13, p. 1001-1009, 2001.

RODRIGUEZ, A.; DE LA CERA, T.; HERRERO, P.; MORENO, F. **The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*.** Biochemical Journal, v. 355, n. Pt 3, p. 625, 2001.

ROELANTS, F. M.; TORRANCE, P. D.; BEZMAN, N.; THORNER, J. **Pkh1 and pkh2 differentially phosphorylate and activate ypk1 and ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity.** Molecular biology of the cell, v. 13, n. 9, p. 3005-3028, 2002.

ROWEN, D. W.; ESIÖBU, N.; MAGASANIK, B. **Role of GATA factor Nil2p in nitrogen regulation of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*.** Journal of bacteriology, v. 179, n. 11, p. 3761, 1997.

RUTHERFORD, J. C.; JARON, S.; RAY, E.; BROWN, P. O.; WINGE, D. R. **A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 98, n. 25, p. 14322, 2001.

SAERENS, S.; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J.; DELVAUX, F. **Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation.** Applied and environmental microbiology, v. 74, n. 2, p. 454, 2008.

- SAINI, P.; EYLER, D. E.; GREEN, R.; DEVER, T. E. **Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation**. *Nature*, v. 459, n. 7243, p. 118-121, 2009.
- SAINT-PRIX, F.; BÖNQUIST, L.; DEQUIN, S. **Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation**. *Microbiology*, v. 150, n. 7, p. 2209-2220, 2004.
- SAMANTA, M. P.; LIANG, S. **Predicting protein functions from redundancies in large-scale protein interaction networks**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 22, p. 12579, 2003.
- SANTIAGO, A. V. C.; MUÑOZ, R.; GARCIA, R. G. **Molecular Wine Microbiology**. Academic Press, 2011.
- SANTIAGO, T. C.; MAMOUN, C. B. **Genome expression analysis in yeast reveals novel transcriptional regulation by inositol and choline and new regulatory functions for Opi1p, Ino2p, and Ino4p**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 40, p. 38723-38730, 2003.
- GENE ONTOLOGY SLIM MAPPER.SGD. 2012. Disponível em: <<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goSlimMapper.pl>>.
- SHEN, H.; HEACOCK, P. N.; CLANCEY, C. J.; DOWHAN, W. **The CDS1 gene encoding CDP-diacylglycerol synthase in *Saccharomyces cerevisiae* is essential for cell growth**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 2, p. 789-795, 1996.
- SOUSSE BOUDEKOU, S.; VISSERS, S.; URRESTARAZU, A.; JAUNIAUX, J. C.; ANDRÉ, B. **Gzf3p, a fourth GATA factor involved in nitrogen regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae***. *Molecular microbiology*, v. 23, n. 6, p. 1157-1168, 1997.
- STEARMAN, R.; YUAN, D. S.; YAMAGUCHI-IWAI, Y.; KLAUSNER, R. D.; DANCIS, A. **A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast**. *Science*, v. 271, n. 5255, p. 1552-1557, 1996.
- SWIEGERS, J. H.; PRETORIUS, I. S. **Yeast modulation of wine flavor**. *Advances in applied microbiology*, v. 57, p. 131-175, 2005.
- TALIBI, D.; RENSON, M.; ANDRE, B. **Cis-and trans-acting elements determining induction of the genes of the gamma-aminobutyrate (GABA) utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae***. *Nucleic Acids Res*, v. 23, p. 550-557, 1995.
- TER LINDE, J.; LIANG, H.; DAVIS, R.; STEENSMA, H.; VAN DIJKEN, J.; PRONK, J. **Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae***. *Journal of bacteriology*, v. 181, n. 24, p. 7409-7413, 1999.
- TESSIER, W. D.; MEADEN, P. G.; DICKINSON, F. M.; MIDGLEY, M. **Identification and disruption of the gene encoding the K⁺-activated acetaldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae***. *FEMS microbiology letters*, v. 164, n. 1, p. 29-34, 1998.
- VAN IERSEL, M.; KELDER, T.; PICO, A.; HANSPERS, K.; COORT, S.; CONKLIN, B.; EVELO, C. **Presenting and exploring biological pathways with PathVisio**. *BMC bioinformatics*, v. 9, n. 1, p. 399, 2008.
- VASCONCELLES, M. J.; JIANG, Y.; MCDAID, K.; GILOOLY, L.; WRETZEL, S.; PORTER, D. L.; MARTIN, C. E.; GOLDBERG, M. A. **Identification and Characterization of a Low Oxygen Response Element Involved in the Hypoxic Induction of a Family of *Saccharomyces cerevisiae* Genes**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 17, p. 14374, 2001.
- VELASCO, J. A.; CANSADO, J.; PENA, M. C.; KAWAKAMI, T.; LABORDA, J.; NOTARIO, V. **Cloning of the dihydroxyacid dehydratase-encoding gene (ILV3) from *Saccharomyces cerevisiae***. *Gene*, v. 137, n. 2, p. 179-185, 1993.

- VERSTREPEN, K. **Genetic modification of *Saccharomyces cerevisiae*: fitting the modern brewer's needs**. *Cerevisia: Belgian journal of brewing and biotechnology*, v. 26, n. 2, p. 89-97, 2001.
- VERSTREPEN, K.; MOONJAI, N.; BAUER, F.; DERDELINCKX, G.; DUFOUR, J.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J.; PRETORIUS, I.; DELVAUX, F. **22 Genetic Regulation of Ester Synthesis in Yeast: New Facts, Insights and Implications for the Brewer**. *Brewing yeast fermentation performance*, p. 234, 2003.
- VILANOVA, M.; UGLIANO, M.; VARELA, C.; SIEBERT, T.; PRETORIUS, I. S.; HENSCHKE, P. A. **Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts**. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 77, n. 1, p. 145-157, 2007.
- VILANOVA, M. X.; SCHULER, A. R. P.; BRASILEIRO, B. T. R. V.; MORAIS JR, M. A. **Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil**. *Food microbiology*, v. 26, n. 5, p. 460-466, 2009.
- VURALHAN, Z.; LUTTIK, M. A. H.; TAI, S. L.; BOER, V. M.; MORAIS, M. A.; SCHIPPER, D.; ALMERING, M. J. H.; KOTTER, P.; DICKINSON, J. R.; DARAN, J. M. **Physiological characterization of the ARO10-dependent, broad-substrate-specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae***. *Applied and environmental microbiology*, v. 71, n. 6, p. 3276, 2005.
- VURALHAN, Z.; MORAIS, M. A.; TAI, S. L.; PIPER, M. D. W.; PRONK, J. T. **Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae***. *Applied and environmental microbiology*, v. 69, n. 8, p. 4534, 2003.
- VYAS, V. K.; KUCHIN, S.; CARLSON, M. **Interaction of the repressors Nrg1 and Nrg2 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae***. *Genetics*, v. 158, n. 2, p. 563-572, 2001.
- WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. Wiley, 1998.
- WANG, X.; BOHLSCHIED, J.; EDWARDS, C. **Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid**. *Journal of applied microbiology*, v. 94, n. 3, p. 349-359, 2003.
- WATERS, B. M.; EIDE, D. J. **Combinatorial control of yeast FET4 gene expression by iron, zinc, and oxygen**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 37, p. 33749-33757, 2002.
- WIAME, J. M.; GRENSON, M.; ARS JR, H. N. **Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi**. *Advances in Microbial Physiology*, v. 26, p. 1-88, 1985.
- XIAO, W.; RANK, G. **The yeast ILV2 gene is under general amino acid control**. *Genome*, v. 30, n. 6, p. 984-986, 1988.
- YOUNIS, O.; STEWART, G. **The effect of wort maltose content on volatile production and fermentation performance in brewing yeast**. *Brewing yeast fermentation and performance*, v. 1, p. 170-176, 2000.
- ZHAO, H.; EIDE, D. **The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, n. 6, p. 2454, 1996a.
- ZHAO, H.; EIDE, D. **The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae***. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 38, p. 23203-23210, 1996b.
- ZHAO, H.; EIDE, D. J. **Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae***. *Molecular and cellular biology*, v. 17, n. 9, p. 5044-5052, 1997.
- ZHOU, H.; WINSTON, F. **NRG1 is required for glucose repression of the SUC2 and GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae***. *BMC genetics*, v. 2, n. 1, p. 5, 2001.