

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

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL EM *Saccharomyces cerevisiae*
ASSOCIADO AO METABOLISMO DE SUBSTÂNCIAS
ORGANOLÉPTICAS NO ÂMBITO DA CACHAÇA ARTESANAL.**

ESTEBAN ESPINOSA VIDAL

Recife, PE
Abril, 2008

ESTEBAN ESPINOSA VIDAL

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL EM *Saccharomyces cerevisiae*
ASSOCIADO AO METABOLISMO DE SUBSTÂNCIAS
ORGANOLÉPTICAS NO ÂMBITO DA CACHAÇA ARTESANAL.**

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

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

Co-Orientador: **Prof. Dr. Diogo Ardaillon Simões**, Depto. de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

**Recife, PE
Abril, 2008**

Vidal, Esteban Espinosa.

Análise transcricional em *Saccharomyces cerevisiae* associado ao metabolismo de substâncias organolépticas no âmbito da cachaça artesanal / Vidal, Esteban Espinosa – Recife: O Autor, 2008.

65 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Genética, 2008.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Cachaça artesanal. 2. *Saccharomyces cerevisiae* 3. Leveduras - Fermentação. 4. Álcoois superiores. I. Título.

**663.123 CDU (2.ed.) UFPE
660.28449 CDD (22.ed.)**

CCB – 2008- 160

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
ESTEBAN ESPINOSA VIDAL

“ANÁLISE TRANSCRICIONAL EM *Saccharomyces cerevisiae* ASSOCIADO AO
METABOLISMO DE SUBSTÂNCIAS ORGANOLÉPTICAS NO ÂMBITO DA CACHAÇA
ARTESANAL”

Área de Concentração: GENÉTICA MOLECULAR

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo; sob a presidência do
primeiro, considera o candidato

ESTEBAN ESPINOSA VIDAL como APROVADO

Recife, 22 de Abril de 2008.

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

Co-orientador: : Prof. Dr. Diogo Ardaillon Simões (UFPE)

Membro Externo: Dra. Cássia Docena (LIKA-UFPE)

Membro Interno: Prof. Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz (UPE)

Membro Interno: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas (UFPE)

Coordenador do Programa: Prof. Dr. Marcos Antônio de Morais Júnior (UFPE).

***Dedico este trabalho a
Minha Querida Família
Na Argentina***

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marcos de Moraes Jr. e ao Dr. Diogo Ardaillon Simões pela orientação, o conhecimento transmitido, os conselhos e grande entusiasmo.

Ao Dr. Antonio Carlos Freitas por suas explicações e ajuda.

Ao Dr. Giovanni Beltrani e a seus orientados Douglas Bayer e Erik Amazonas pelo intercâmbio de conhecimento, material e empréstimo de reagentes.

Ao alambique São Saruê pela disponibilização de suas instalações e por ceder gentilmente o caldo de cana.

Ao Genetech e a seu pessoal por permitir-me o uso das suas instalações e pela ajuda fornecida.

Ao Dr. Ederson Kido, por permitir-me o uso do *freezer* -80°C e Dra. Tânia Riger por permitir o uso da garrafa para manter o nitrogênio líquido.

À Carolina Elsztein por sua ajuda incondicional e companheirismo.

À *Applied Biosystems*, na pessoa de Renata por ter permitido a realização deste trabalho.

Ao LIKA e seu pessoal por permitir-me o uso das instalações e pela ajuda fornecida.

Ao Laboratório de Antibióticos por ceder gentilmente L-isoleucina para a realização dos ensaios de fermentação.

Ao Prof. Alexander Shuler pela determinação realizada no cromatógrafo à gás.

Ao Prof. Paulo H. Menezes por ceder gentilmente o ácido decanoíco para usar como padrão nas determinações analíticas.

À Olga Patrícia Reyes por sua ajuda na realização das análises estatísticas.

À FACEPE-CAPES.

E especialmente queria agradecer a meus colegas de laboratório por facilitar-me enormemente o trabalho em um país estrangeiro, sobre tudo nos primeiros meses, pelo grande respeito presente no âmbito de trabalho, pelo companheirismo, pela ajuda cordial em tudo o que precisava, e por fazer-me sentir um colega do laboratório.

LISTA DE ABREVIACÕES

AATase	Atividade álcool acetil transferase
ADHs	álcool desidrogenases
ART	Açúcares redutores totais
AS	<i>Ammonium sulfate</i> / sulfato de amônia
ATP	Adenosina trifosfato
C ₁₀	Composto de dez carbonos
C ₆	Composto de seis carbonos
cel.	Células
C _T	<i>Cycle trheshold</i> / ciclo umbral
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> /Ácido Desoxirribonucléico
<i>et al.</i>	E colaboradores
ILV	Isoleucina leucina valina
Km	Constante de afinidade de substrato
L	Litro
mg	Miligramos
min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
RNA _m	<i>Ribonucleic Acid Messenger</i> / RNA mensageiro
N	Nitrogênio
<i>n</i>	Numero cromossômico
n.d.	Não determinado
ng	Nanograma
°Bx	Graus °Brix
ORF	<i>Open Reading Frame</i> / janela aberta de leitura
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reação em Cadeia da Polimerase
PDCs	Piruvato descarboxilase
PDHs	Piruvato desidrogenases
pH	Potencial hidrogeniônico

<i>qPCR</i>	<i>Quantitative PCR</i> / PCR quantitativa.
r.p.m	Revoluções por minuto
RDS	Refractometric dried substance - substâncias secas refractométricas
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> / Ácido Ribonucléico
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC	<i>Sugar cane</i> / caldo de-cana-açúcar
<i>Sp.</i>	Espécie
Taq	<i>Thermophylus aquaticus</i>
x g	Veze a força da gravidade.
(p/v)	Peso em volume
(v/v)	Volume em volume
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar

SÍMBOLOS

Δ	Delta
°C	Graus Celsius
<	Menor
%	Porcentagem
±	Mas ou menos
>	Maior
<i>r</i>	Coefficiente de correlação do momento do produto de Pearson
δ	Erro padrão

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.	2
2.1. PROCESSO FERMENTATIVO.	2
2.1.1. Elaboração da cachaça.	2
2.1.2. As leveduras da produção da cachaça.	3
2.2. SUBSTÂNCIAS ORGANOLÉPTICAS.	5
2.2.1. Conceitos gerais.	5
2.2.2. Alcoóis superiores.	5
2.2.2.1. Piruvato descarboxilase.	6
2.2.2.2. álcool desidrogenase.	7
2.2.3. Ésteres.	7
2.2.3.1. Ésteres de acetato.	7
2.2.3.1.1. Álcool acetil transferase.	7
2.2.3.1.3. Esterases.	9
2.2.4. Ésteres de ácidos graxos.	9
2.2.4.1. Ácidos graxos sintase.	9
2.5. Anabolismo de leucina.	10
2.5.1. α -isopropil malato sintetase.	10
2.2.3.4. Legislação.	11
2.2.5. A complexidade de fatores envolvidos na produção de compostos organolépticos.	12
2.3. ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA.	13
2.3.1. <i>qPCR</i> (<i>PCR</i> Quantitativo).	13

3. REFERÊNCIAS	15
4. MANUSCRITO DE ARTIGO CIENTÍFICO	21
5. ANEXO	55
5.1. Resumo resultados. Teste ANOVA para consumo de sacarose.	56
5.2. Resumo resultados. Teste ANOVA para comparação de médias dos valores de RNAm relativos obtidos entre a condição caldo de cana 14 % (p/v) e o tempo inicial de fermentação para o nível de significância de 5%.	57
5.3. Teste de Tuckey para determinação da diferenças de médias dos valores de RNAm relativos obtidos entre a condição caldo de cana 14 % (p/v) e o tempo inicial de fermentação para o nível de significância de 5%.	57
5.4. Resumo resultados. Teste ANOVA.	58
5.5. Teste de Tuckey para determinação da diferenças de médias dos valores de RNAm relativos obtidos nas diferentes condições ensaiadas.	60
5.6. Resumo do Teste de Tuckey.	62
5.7. Instruções para autores. <i>Applied Microbiology and Biotechnology.</i>	63

RESUMO

No processo de elaboração da cachaça, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* sintetiza uma ampla variedade de compostos com propriedades organolépticas. Neste estudo, foi analisado em uma cepa industrial de *S. cerevisiae* o nível de RNAm mediante *qPCR* dos genes envolvidos no metabolismo de ésteres e alcoóis superiores (*ATF1*, *ATF2*, *FAS1*, *FAS2*, *ACS2*, *EEB1*, *IAH1*, *APT1*, *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10*, *THI3*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *SFA1*, *ADH6*, *LEU4*), em ensaios fermentativos simulando condições industriais (condição de referência) e com o suplemento de altas concentrações de nitrogênio na forma de sulfato de amônio ou aminoácidos ramificados. Os genes mostraram, em geral, diferenças significativas ($\alpha = 5\%$) nos níveis de RNAm relativos quando se comparou à condição de referência no final da fermentação com o tempo inicial, não obstante apresentarem um padrão de transcrição similar em condições com alto conteúdo de nitrogênio, independentemente da fonte empregada, especialmente quando foram agrupados pelos tipos de compostos organolépticos produzidos (ésteres ou alcoóis superiores). Os resultados indicaram que a concentração e a fonte de nitrogênio no meio de cultura possuem um papel relevante nos níveis de transcrição dos genes associados à produção de ésteres e alcoóis superiores e por consequência, seriam parâmetros importantes para regular a concentração destes compostos durante o processo de elaboração da cachaça artesanal.

Palavras chaves: leveduras - cachaça - fermentação - compostos organolépticos - transcrição - alcoóis superiores - ésteres.

RESUME

In the *cachaça* elaboration process, a great diversity of organoleptics compounds are synthesized by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In this study, we analyze the mRNA levels of some genes involved in the higher alcohols and esters metabolism (*ATF1*, *ATF2*, *FAS1*, *FAS2*, *ACS2*, *EEB1*, *IAH1*, *APT1*, *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10*, *THI3*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *SFA1*, *ADH6*, *LEU4*) from a *S. cerevisiae* industrial strain, in fermentative assays simulating industrial conditions (reference condition), and with the supplement of high nitrogen concentrations such as ammonium sulphate or branched amino acids. In general, the comparison between the initial and the final point of fermentation had shown a significant difference ($\alpha=5\%$) in the relative mRNA levels. However the transcription profile was similar with high nitrogen concentration, independently of the source, especially, when they had been grouped by the organoleptics compounds produced (higher alcohol or esters). The results indicate that the concentration and source of nitrogen in the culture imply an important role in the transcription levels of genes involved in the production of higher alcohol or esters, and hence, would be an important parameter to regulate the concentration of these compounds during the *cachaça* process.

Key word: Yeast- *cachaça* - fermentation - organolépticos compounds - transcription - higher alcohols - esters.

1. INTRODUÇÃO

A cachaça é a bebida destilada mais produzida no Brasil. Esta aguardente é obtida a partir da destilação de mosto de cana-de-açúcar fermentado. Durante este processo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é responsável pela produção de dióxido de carbono e etanol, assim como de diversos compostos com propriedades organolépticas, encontrando-se os grupos dos alcoóis superiores e dos ésteres entre os mais importantes. Estas substâncias influem notoriamente nas propriedades gustativas das bebidas alcoólicas, determinando de maneira importante a qualidade do produto final.

Vários parâmetros são considerados ao tentar modificar e padronizar as concentrações destes metabólitos durante o processo fermentativo. Entre os mais importantes estão o tipo de linhagem da levedura, concentração e espécie de compostos nitrogenados assimiláveis, temperatura, fonte e concentração de carbono, quantidade de oxigênio dissolvido e a presença de ácidos graxos no meio, entre outros.

A maior parte da produção de cachaça no Brasil ainda é feita em alambiques que continuam utilizando técnicas tradicionais, adicionado à falta de padronização do processo não favorece a formação de um mercado estável, como acontece com a cachaça industrial de coluna. Dentre os diferentes fatores que influenciam a produção de cachaça artesanal, o uso de concentrações específicas de compostos nitrogenados assimiláveis deveria levar à produção de bebidas diferenciadas em aromas e sabores.

Neste contexto científico e industrial, visamos estudar o padrão de transcrição dos principais genes de *Saccharomyces cerevisiae* (*ATF1*, *ATF2*, *FAS1*, *FAS2*, *ACS2*, *EEB1*, *IAH1*, *APT1*, *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10*, *THI3*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *SFA1*, *ADH6*, *LEU4*) que estão associados à produção de compostos organolépticos em condições similares àquelas obtidas durante a elaboração de aguardente de cana artesanal, utilizando uma linhagem de *S. cerevisiae* industrial e caldo de cana natural com diferentes concentrações de sulfato de amônio ou com aminoácidos ramificados como fonte de nitrogênio.

Desta maneira pudemos estabelecer como as diferenças na concentração e na fonte de nitrogênio influenciam nos níveis dos ésteres e alcoóis superiores no produto final.

Cabe mencionar que este trabalho é pioneiro no estudo de transcrição gênica dirigido à indústria da cachaça artesanal.

2. REVISÃO DA LITERATURA.

2.1. PROCESSO FERMENTATIVO.

2.1.1. Elaboração da cachaça.

A cachaça é uma bebida alcoólica produzida a partir da destilação do fermentado de mosto de cana-de-açúcar. Esta é a bebida tradicional brasileira, que nos últimos dez anos vem ganhando fama e mercado internacional. Existem dois processos de produção diferenciados pelo volume e equipamentos de produção: cachaça de alambique e de coluna. A cachaça de alambique, também conhecida como cachaça artesanal, é aquela produzida em pequena escala pelos produtores rurais, a qual é obtida por destilação em alambiques de cobre. Esta possui características sensoriais diferenciadas daquelas produzidas comercialmente usando colunas contínuas de aço inox (Oliveira *et al.* 2004).

A fabricação de cachaça artesanal começa com a fermentação do mosto de cana em cubas abertas de cobre ou aço, com concentração de açúcar em torno de 14 a 20 °Bx, equivalentes a 11 a 16 % (p/v) de sacarose no meio. O inóculo natural, ou pé de cuba, é preparado pelo método conhecido como fermento caipira, o qual consiste em realizar uma pasta com arroz triturado, farinha de milho, suco de limão (para baixar o pH) e o mosto de cana (Gomes *et al.* 2007). A mistura é incubada por até 24 h. Durante este período há o desenvolvimento da microbiota de bactérias e fungos, transcorrendo a fermentação de forma espontânea. Posteriormente, são promovidos ciclos sucessivos de adição de um volume de caldo de cana, e deixando a mistura repousar por 24 horas. Este processo ocorre até o enchimento das dornas, e a partir daí a fermentação prossegue até o consumo total dos açúcares do mosto (Araújo Vicente *et al.* 2006).

Após o final da fermentação o mosto é posteriormente dividido, a maior parte é enviado para o alambique onde junto com as leveduras é aquecido para gerar o vapor formado por etanol hidratado e compostos voláteis, os quais são veiculados por serpentinas de cobre para se condensarem. O destilado, que alcança valores elevados de etanol, é diluído entre 38-54% de etanol (v/v) com água destilada. Este pode ser engarrafado para consumo imediato ou envelhecido em barris de carvalho por vários anos.

O restante, é deixado na dorna, e será utilizado como inóculo na próxima batelada. Este pé-de-cuba pode ser utilizado por até oito bateladas devido à baixa viabilidade e ao detrimento na fisiologia celular. Assim, os fermentos pé-de-cuba apresentam uma microbiota bem diversa, resultado da sua formação e pela ausência de esterilidade durante o processo, com a predominância da *Saccharomyces cerevisiae*, mas também com a presença de diversas espécies de leveduras, bactérias, e fungos filamentosos (Schwan *et al.* 2001) as quais podem interferir nos rendimentos e na qualidade do produto final. Estes fatores fazem que inóculos novos tenham que ser preparados mais de uma vez por safra.

2.1.2. As leveduras da produção da cachaça.

Como foi mencionado anteriormente, nas fermentações espontâneas, existe uma sucessão de espécies e de linhagens de leveduras de diferentes espécies, entre as que se destacam *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia guilliermondii*, *Kloeckera japonica* e *Zygosaccharomyces fermentati* (Morais *et al.* 1997). Pataro e colaboradores (2000) determinaram populações de leveduras em diferentes períodos de fermentação da cachaça em três alambiques no estado de Minas Gerais. As leveduras *Saccharomyces servazzi*, *S. uniporus*, *Pichia ananassa* e *Torulaspora delbrueckii* foram exclusivamente isoladas de fermentações iniciais; *Candida glabrata*, *C. colliculosa* e *C. krusei* foram isoladas nas fermentações medianas; já no final das fermentações apenas as espécies *Schizosaccharomyces pombe* e *S. cerevisiae* foram encontradas nas dornas. Já Oliveira (2001) mostrou a presença de leveduras apiculadas (*Kloeckera japonica*) e de várias espécies de *Candida sp*, *Kluyveromyces sp* e *Pichia sp*. Recentemente, Vila Nova (2008) mostrou a sucessão das espécies *Candida sake*, *Candida milleri*, *Pichia caribbica* e *S. cerevisiae* em um alambique do Estado de Pernambuco.

A ampla variedade de espécies de leveduras frequentes nas fermentações espontâneas, resulta na formação de um vasto conjunto de compostos que contribuem no aroma e sabor das bebidas, determinando diretamente as propriedades do produto final, tanto positiva como desfavoravelmente; neste último caso, pela produção de substâncias não desejáveis tais como compostos sulfurados, aldeídos e ácidos orgânicos (Boulton and Quain 2001).

Com isso, está cada vez mais popular, principalmente nas grandes destilarias de cachaça, o uso de fermentos comerciais preparados a partir de linhagens industriais de *Saccharomyces*

cerevisiae. O fermento mais utilizado são as preparações de *S. cerevisiae* usadas para panificação (Fleischmann®, Itaquara®, Mauri®, comunicação pessoal). A utilização de leveduras comerciais, mesmo que não tenham sido desenvolvidas especificamente para produção de cachaça, economiza tempo e tende a uniformizar o processo fermentativo, inclusive a própria qualidade do produto final, qualidade desejável para as grandes destilarias de cachaça.

As leveduras comerciais são produzidas a partir do isolamentos de leveduras selvagens obtidas no ambiente ou na indústria, selecionadas como tais por apresentarem ótima capacidade fermentativa, dominância e estabilidade no processo industrial, entre alguns dos critérios mais desejáveis. Estes derivam de propriedades metabólicas diferentes das presentes nas cepas laboratoriais, devido a características genéticas distintas. Por exemplo, as cepas de laboratório apresentam altas frequências de esporulação e são em sua maioria haplóides (n) ou diplóides ($2n$), entretanto as leveduras industriais são poliplóides, freqüentemente triplóides ($3n$) o tetraplóides ($4n$), possuem baixa frequência de esporulação e pouca viabilidade dos esporos (Johnston 1990, Hammond 1996). Neste sentido, de 50 cepas de espécies de *S. cerevisiae* empregadas na elaboração de bebidas alcoólicas, seis destas são diplóides, três são triplóides, 15 tetraplóides, oito pentaplóides, sete hexaplóides e as demais ainda não foram identificadas (Johnston and Oberman 1979). Da mesma maneira, as leveduras para fazer pão exibem diploidias, triploidias, tetraploidias, poliploidias ou aneuploidias (Johnston and Oberman 1979).

Outra característica das cepas industriais é a redundância gênica no número de cópias. Por exemplo, a cepa de laboratório S288C possui uma cópia do gene *MAL* envolvido na assimilação de maltose, entretanto nas cepas da indústria cervejeira se encontram tipicamente 10 ou mais conjuntos deste gene, produzindo um aumento substancial na taxa de fermentação da maltose (Hammond 1996).

Além disso, alguns genes, como o gene *Lg-ATF1* que codifica para uma enzima com atividade álcool acetil transferase foi descoberto em leveduras de cerveja porem não foi encontrado no genoma da levedura de referência S288C. Parece que estas características poderiam ser requeridas para enfrentar condições ambientais naturais como as presentes no processo de fabricação de bebidas alcoólicas (Goffeau *et al.* 1996). Todas estas observações em conjunto denotam a grande complexidade genética presente nas linhagens industriais.

2.2. SUBSTÂNCIAS ORGANOLEPTICAS.

2.2.1. Conceitos gerais.

Durante o processo de fermentação, as leveduras produzem um amplo espectro de substâncias que apesar de serem formadas somente em pequenas quantidades afetam diretamente os complexos sabores e aromas das bebidas alcoólicas. Estas podem ser divididas nos seguintes grupos principais: moléculas contendo enxofre, ácidos orgânicos, compostos carbonílicos, alcoóis superiores, e ésteres voláteis (Nykänen and Suomalainen 1983, Nykänen 1986, Hammond 1993, Lambrechts and Pretorius 2000, Pisarnitskii 2001). Destes, os alcoóis superiores e os ésteres voláteis representam o maior grupo e mais importante já que são responsáveis pelo sabor e aroma florais e frutados altamente desejados nas bebidas alcoólicas (Vestrepén *et al.* 2003a).

2.2.2. Alcoóis superiores.

No processo fermentativo são elaborados alcoóis com cadeias carbônicas de diferentes tamanhos. O produto majoritário obtido é o etanol, mas também são produzidos alcoóis alifáticos de cadeia média também conhecidos alcoóis superiores, como o isopropanol (2-propanol), o álcool isoamílico (3-metil, 1-butanol), o álcool amílico (1-pentanol), o feniletanol (2-feniletanol), o 2-metil-butanol (álcool amílico activo) e o álcool isobutílico (2-metil propanol). A contribuição destes alcoóis no aroma e sabor se dá pela intensificação no sabor alcoólico da bebida e por conferir um carácter cálido na mesma (Bulton e Quain 2001). Ainda, o 2-feniletanol, que tem aroma floral e de rosas, é considerado um carácter importante (Meilgaard 2001).

Os alcoóis superiores podem ser produzidos a partir do metabolismo dos carboidratos através do piruvato, ou a partir da via catabólica derivada do metabolismo da assimilação dos aminoácidos ramificados na via de Erlich (Figura 1). Esta última é a mais utilizada pelas leveduras para obter nitrogénio a partir dos aminoácidos ramificados, os quais são metabolizados unicamente quando o nitrogénio está em concentrações limitantes. Assim, quando o amónio é usado como fonte de nitrogénio, os alcoóis superiores são formados a partir do esqueleto carbónico proveniente do anabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (Derrick e Large 1993). Dependendo do tipo de aminoácido ramificado catabolizado, podem ser

obtidos três dos principais alcoóis superiores com importância organolépticas: a partir de L-leucina se produz álcool isoamílico (3-metil-1-butanol); de L-isoleucina se obtém álcool amílico ativo (2-metil-1-butanol); e a partir de L-valina se produz o isobutanol (2-Metil-1-propanol). Estes compostos não podem ser utilizados como fonte de carbono auxiliar e são excretados pela célula.

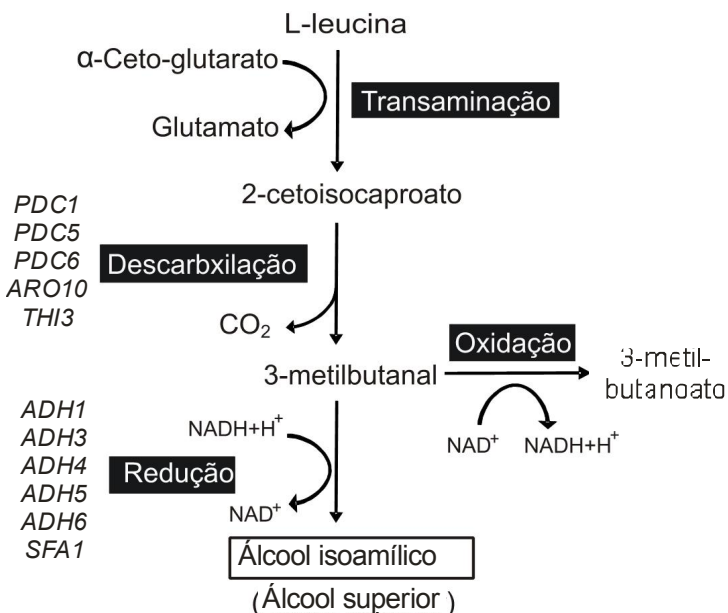


Figura 1. Catabolismo de leucina, via de Erlich (modificado de Vuralhan *et al.* 2003).

2.2.2.1. Piruvato descarboxilase.

As enzimas-chave nesta via catabólica são as piruvato descarboxilase tiamina difosfato dependente (PDCs) (Figura 1). Existem três genes estruturais para esta enzima no genoma de *S. cerevisiae* *PDC1* (YLR044C), *PDC5* (YLR134W) e *PDC6* (YGR087C). O produto do gene *PDC1* proporciona cerca de 85% da atividade piruvato descarboxilase em condições normais de fermentação (Flikweert *et al.* 1996), os restantes 15% provêm de *PDC5* (Köning 1998). 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 (Ter Schure *et al.* 1998). *PDC6* pareceria só contribuir na atividade piruvato descarboxilase durante crescimento em fonte de carbono não fermentáveis como etanol (Hohman 1991).

Ao mesmo tempo, dois outros genes, *ARO10* e *THI3*, apresentam similaridade de sequência com as PDCs, o que os levou a serem classificados no mesmo grupo. O gene *ARO10* (YDR380W) é expresso quando as células de levedura são cultivadas na presença dos aminoácidos aromáticos fenilalanina ou tirosina, revelando que esta enzima atua principalmente na descarboxilação de fenilpiruvato ou indolpiruvato (Vuralhan *et al.* 2003). Entretanto, esta enzima também possui afinidade para os 2-oxo ácidos derivados dos aminoácidos ramificados (Vuralhan *et al.* 2005). 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. O gene *THI3/KID1* (YDL080C) seria o responsável pela descarboxilação de alfa-ceto isocaproato no catabolismo de leucina (Dickinson e Dawes 1992).

2.2.2.2. álcool desidrogenase.

Outro passo importante na via de Erlich na formação de alcoóis superiores é a redução dos α -cetoaldeídos (Figura 1), reação catalisada pelas enzimas álcool desidrogenase, o que resulta no álcool superior correspondente. 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, Adh3p, Adh4p e Adh5p são responsáveis pela produção de etanol a partir do acetaldeído; já Adh2p catalisa a reação reversível de oxidação de etanol a acetaldeído. Os genes *ADH6* e *ADH7* são genes não essenciais membros da família da cinnamil álcool desidrogenase que estariam envolvidas na síntese de alcoóis superiores (Larroy *et al.* 2002). O gene *SFA1* é membro do grupo das álcool desidrogenases de classe II, enzimas que atuam sobre uma ampla variedade de substratos que incluem fenilacetaldeído, o precursor do feniletanol (Dickinson 1993).

2.2.3. Ésteres.

Os ésteres estão formados intracelularmente a partir da condensação entre dois substratos, geralmente um álcool e uma molécula contendo um grupo carboxílico. Todavia, existe uma ampla diversidade de substratos dependendo do tipo de moléculas empregadas na sua formação. Dois grupos apresentam grande influencia nas características organolépticas das bebidas fermentadas: os ésteres de acetato e os ésteres de ácido graxo.

2.2.3.1. Ésteres de acetato.

O principal contribuinte ao aroma frutal e doce nas bebidas alcoólicas é o acetato de isoamila (aroma tipo banana), apresentando também suma importância o acetato de etila (aroma tipo solvente) e acetato de feniletila (aromas florais com notas de mel) (Yoshikawa *et al.* 1999).

2.2.3.1.1. Álcool acetil transferase.

As enzimas envolvidas na síntese de ésteres de acetato são denominadas álcool acetil transferases (AATases) (Figura 2).



Figura 2. Reação de trans-esterificação.

Estas enzimas catalisam a trans-esterificação de um álcool com a acetil coenzima A (acetil-CoA). As enzimas AATases apresentam grupos sulfidríla no sítio ativo que reagem com acetil-CoA, ou acil-CoA, com alta afinidade ($K_m \sim 0,19 \text{ mM}$) e com vários alcoóis com diferentes afinidades ($K_m > 10 \text{ mM}$) (Fukuda *et al.* 1998). A taxa de produção de ésteres é influenciada principalmente pela presença dos precursores (Yoshioka e Hashimoto 1981, Thurston *et al.* 1982, Calderbank and Hammond 1993), assim como pelo controle da atividade acetil transferase. Durante a fermentação alcoólica a taxa de produção de ésteres de acetatos segue um padrão correspondente à atividade de AATases (Malcorps *et al.* 1991).

A purificação das enzimas que sintetizam ésteres de acetato levou à identificação de três AATases diferentes. A enzima AATase I é codificada pelo gene *ATF1* (YOR377W) apresenta alta homologia com *Lg-ATF1*, gene encontrado na levedura *Sacharomyces bayanus* (Yoshimoto *et al.* 1998, Kurtzman and Fell 1998, Barnett *et al.* 2000, Dufour *et al.* 2002). A enzima AATase II é codificada pelo gene *ATF2* (YGR177C). A ação em conjunto das enzimas Atf1p e Atf2p é responsável pela produção total dos ésteres de acetato, embora Atf1p seja responsável pela maior parte (Verstrepen *et al.* 2003a).

Em relação à regulação da atividade AATase, sabe-se que o gene *ATF1* é fortemente reprimido em condições aeróbicas e pela presença de ácidos graxos instaurados no meio de cultura (como o ácido linoléico), com conseqüente diminuição na produção de ésteres de acetato (Äyräpää e Lindström 1973, Äyräpää e Lindström 1977, Fujii *et al.* 1997). A expressão do gene *ATF1* é induzida pela adição de glicose a culturas anaeróbicas de células de leveduras, a partir de uma cascata regulatória que depende da ação da proteína quinase A e da disponibilidade de AMP cíclico (Versterpen *et al.* 2003 b). Por outro lado, esta expressão é afetada negativamente pela escassez de nitrogênio e pelos fenômenos de choque térmico e de estresse etanólico (Versterpen *et al.* 2003 b).

A super-expressão do gene *ATF1* em células de levedura proporcionou o aumento de mais de dez vezes na produção de acetato de etila, acetato de isoamila e acetato de feniletila, com um

pequeno, mas significativo aumento na produção dos ésteres de ácidos graxos (Lilly *et al.* 2000). Atualmente, acredita-se que a função fisiológica destas AATs esteja relacionada com a reutilização da coenzima A liberada tanto de acetil-CoA na esterificação de álcool e acetato, como dos resíduos de acil-Coenzima A (acil-CoA), na transesterificação de álcool e ácidos graxos.

Experimentos com a linhagem de *S. cerevisiae* mutante *aft1Δ* mostraram atividades de acetil isoamila transferase e acetil etanol transferase mais baixas do que nas linhagens tipo selvagem. Isto resultou no decréscimo de 80 % na produção de acetato de isoamila e de 30 % na produção de acetato de etila, em comparação com as leveduras selvagens (Fujii *et al.* 1996). Estes experimentos mostraram a produção de alguns ésteres de acetato, indicando a existência de outras atividades éster sintase no proteoma de *S. cerevisiae* (Verstrepen *et al.* 2003a). Estas atividades enzimáticas podem ser os produtos dos genes *EHT1* e *EEB1*, os quais poderiam estar envolvidos também na síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeias curtas e médias. Estes genes ainda não estão bem caracterizados. O gene *EHT1* (YBR177C) codifica uma enzima com atividade de serina hidrolase. O gene *EEB1* (YPL095C) codifica uma enzima que apresenta atividade de acil-CoA:etanol aciltransferase, e utiliza preferencialmente ácidos graxos de cadeias curtas como substrato.

2.2.3.1.2. Esterases.

Outro fator importante que influencia na concentração de ésteres é a degradação produzida pela atividade esterásica, a qual é representada no genoma de *S. cerevisiae* pela enzima acetato de isoamila esterase, uma carboxilesterase do tipo serina codificada pelo gene *IAH1*. Desta forma, o balanço das atividades AATase/esterase determinaria a presença dos ésteres durante o processo fermentativo (Fukuda *et al.* 1998).

2.2.4. Ésteres de ácidos graxos.

Outros compostos com importantes propriedades organolépticas produzidas pelas leveduras são ésteres de ácidos graxos de cadeia média (C₆-C₁₀), produzidos pela condensação do acil-CoA e de um álcool (geralmente etanol). Dentre os mais importantes se encontram o caproato de etila (hexanoato de etila) (Yoshikawa *et al.* 1999), e caprilato de etila (octanoato de etila), os quais apresentam aroma de maçã e mamão, respectivamente (Meilgaard 2001). Com

relação aos níveis de ésteres de ácidos graxo em células de leveduras, dados prévios mostram que tanto a síntese como o acúmulo são dependentes da presença dos precursores (etanol e ácido graxo) assim como pelo controle da enzimas AATases (Verstrepen *et al.* 2003a).

2.2.4.1. Ácidos graxos sintase.

A formação de ácidos graxos de cadeia média depende da atividade enzimática dos genes *FAS1* (YKL182W) e *FAS2* (YPL231W) que codificam as enzimas ácidos graxos sintase, do gene *ACCI* (YNR016C) que codifica a acetil-CoA carboxilase e do gene *ACS2* (YLR153C) que codifica uma acetil-CoA sintetase. A expressão do gene *FAS1* é reprimida pela adição de inositol ao meio de cultura, o que resulta na diminuição da produção de caproato de etila pelas células de levedura (Furukawa *et al.* 2003). Com respeito ao *FAS2*, Aritomi *et al.* (2004) mostraram que algumas mutações pontuais resulto em um incremento na atividade enzimática do produto gênico gerando um aumento na produção de caproato de etila.

2.2.5. Anabolismo de leucina.

2.2.5.1. α -isopropil malato sintase.

Um fator importante na formação do éster acetato de isoamila é a presença do precursor do álcool isoamílico, o qual pode ser sintetizado a partir de α -ceto isocaproato, um intermediário na biossíntese de leucina (Figura 3). Nesta via, a enzima α -isopropil malato sintase, codificada pelo gene *LEU4* (YNL104C) promove a conversão de α -ceto isovalerato em α -isopropil malato. Esta enzima é inibida por retro-alimentação quando os níveis de L-leucina são altos (Casalone *et al.* 1997). Neste caso, ocorre um decréscimo na síntese de álcool isoamílico (Ashida *et al.* 1987, Cavaliere *et al.* 1999). Recentemente, foi demonstrado que uma mutação no gene *LEU4* eliminou a regulação por retro-alimentação da leucina ocasionando a hiper-produção de álcool isoamílico (Oba *et al.* 2005).

2.2.6. A complexidade de fatores envolvidos na produção de compostos organolépticos.

Sobre a regulação dos genes envolvidos na formação de ésteres e alcoóis superiores no contexto industrial, existem numerosos estudos relacionando estes aspectos no processo de produção de vinho, cerveja e saquê. Por exemplo, durante a produção de cerveja a produção dos

ésteres depende diretamente tanto da regulação dos genes envolvidos (Dufour *et al.* 2002, Dufour *et al.* 2003, Verstrepen *et al.* 2001, Verstrepen *et al.* 2003b) (figura 4), como das linhagens de leveduras utilizadas (Nykänen and Nykänen 1977, Peddie *et al.* 1996) e de parâmetros fermentativos como temperatura (Engan *et al.* 1977, Sablayrolles and Ball 1995) e pressão osmótica (Renger *et al.* 1992, Landaud *et al.* 2001).

Além disso, têm um grande impacto na taxa de produção destes compostos a concentração e a espécie de nitrogênio assimilável presentes no mosto (Hammond *et al.* 1993, Calderbank *et al.* 1994,

Sablayrolles and Ball 1995, Araújo Vicente *et al.* 2006), as fontes de carbono utilizadas (Pfisterer *et al.* 1975, White *et al.* 1979, Younis and Stewart 1998, Younis and Stewart 2000), a concentração de oxigênio dissolvido (Anderson and Kirsop 1975a, Anderson and Kirsop 1975b, Avhenainen and Mäkinen 1989, Sablayrolles and Ball 1995) e a presença de ácidos graxos no meio (Thurston *et al.* 1981, Thurston *et al.* 1982).

Assim, a qualidade do produto final é influenciada por complexa combinação de diversos mecanismos genéticos, como níveis de expressão dos genes, e metabólicos, que são ativados por condições específicas do cultivo (figura 4). Neste sentido, existem várias técnicas capazes de quantificar os níveis de RNAm em diferentes condições de ensaio, sendo a *PCR* quantitativa umas das mais empregadas.

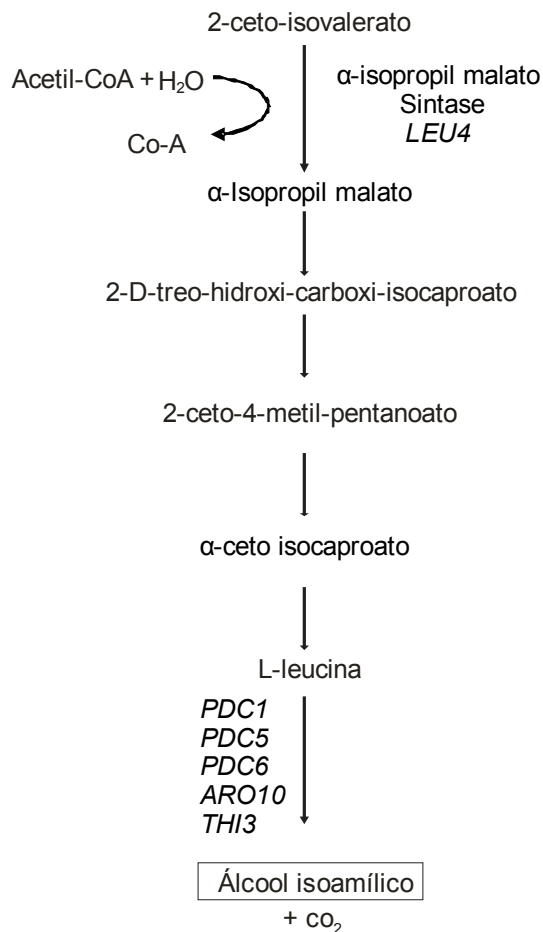


Figura 3. Síntese de leucina em *S. cerevisiae* (modificado de www.biocyc.org).

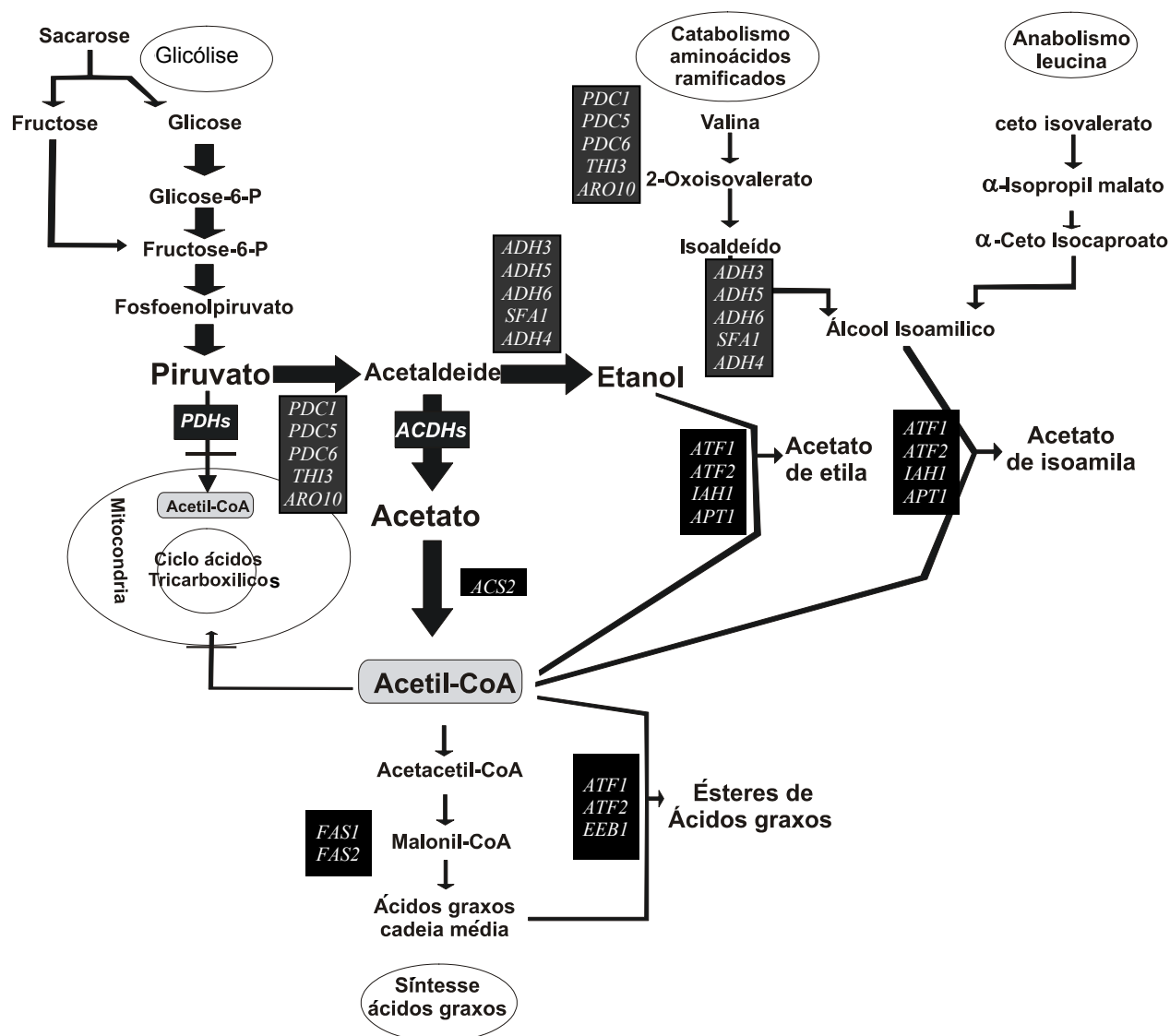


Figura 4. Resumo das principais rotas metabólicas em condições anaeróbicas envolvidas na produção de compostos organolépticos e os principais genes envolvidos. Os genes envolvidos estão no lado em quadros negros. Os tamanhos das flechas indicam o tamanho do fluxo metabólico. As flechas com uma linha cruzada indicam rotas metabólicas não ativas nesta condição.

2.3. ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA.

2.3.1. *qPCR* (*PCR* Quantitativo).

Nos últimos anos tem se verificado o avanço na análise do padrão de transcrição gênica devido ao advento da técnica de *qPCR* (reação em cadeia da DNA polimerase em tempo real). A

técnica se fundamenta na detecção e quantificação de um doador fluorescente, cuja intensidade vai aumentando proporcionalmente à quantidade de produto amplificado na reação. O processo é feito em um termociclador que possui um sistema acoplado de detecção ótico que adquire o sinal no final de cada ciclo. A informação obtida se representa em forma de curva de amplificação, observando a diferença entre a fluorescência basal e a resultante em determinado ciclo (figura 5).

Na zona exponencial da curva de amplificação da *PCR*, a quantidade de moléculas molde no começo de cada ciclo é duplicada ao final do ciclo. Por isso se emprega esta zona para comparar as diferentes curvas de amplificação mediante um parâmetro denominado C_T (do inglês, *cycle threshold*), o qual deriva do ponto de intersecção da curva de amplificação na zona exponencial e um valor arbitrário de fluorescência limiar (*threshold*) (Figura 5). Este parâmetro se utiliza para calcular o número inicial de moléculas molde na amostra com uma grande precisão dentro de um amplo espectro de concentrações (Schmittgen *et al.* 2000).

A *qPCR* apresenta numerosas vantagens com respeito a outras técnicas de identificação. Pode se destacar a alta especificidade e sensibilidade, a possibilidade de quantificação e a grande rapidez dos resultados, já que não é necessária a análise dos produtos de *PCR* por eletroforese.

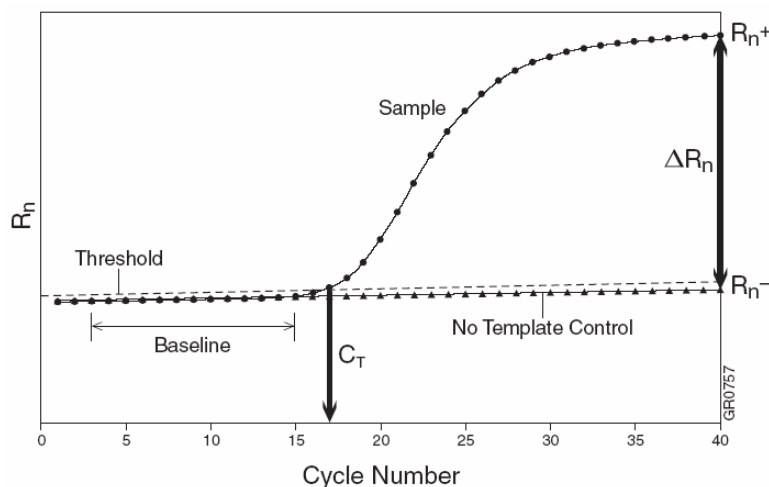


Figura 5. Modelo da curva de amplificação, mostrando os termos utilizados habitualmente em *PCR* quantitativa (Buletin users Applied Biosystems).

R_n = diferencial de fluorescência.
 R_n^- = fluorescência basal.
 R_n^+ = fluorescência em cada ciclo.
Threshold = limiar.

Baseline = linha de base.
Cycle number = número de ciclo.
Sample = amostra.

Os sistemas de detecção de fluorescência se fundamentam na utilização de agentes intercalantes de DNA ou de sondas. No sistema não específico de detecção o agente intercalante mais utilizado é o *SYBR Green I*, o qual se une somente a DNA dupla fita produzindo um aumento na fluorescência a medida que aumenta a quantidade de produto. Com relação à detecção específica se usam principalmente dos tipos de sondas fluorescentes: sondas de hidrólise e sondas de hibridação. A sonda de hidrólise mais utilizada é denominada sonda *Taqman* e se caracteriza por ter unidos um fotocromo emissor de fluorescência (*Reporter*) e um fotocromo que absorve fluorescência (*Quencher*). Quando ambos fotocromos estão unidos à sonda, o doador não emite sinal. Entretanto, quando os iniciadores se unem nos sítios alvos e a sonda se une à sequência de interesse durante a reação de PCR, a atividade exonucleásica da *Taq* polimerase libera o fotocromo emissor da sonda, permitindo a emissão de um sinal fluorescente. O sinal fluorescente do doador é acumulado nos sucessivos ciclos de PCR. Já as sondas de hibridação modificam sua estrutura secundária durante a fase de hibridação, o que resulta em um incremento da distância que separa o doador do receptor.

Todos estes sistemas de fluorescência possuem vantagens e inconvenientes que determinam sua escolha, mas a utilização de um sistema ou outro dependerá do grau de especificidade que se quer obter. Por exemplo, para sistemas simples, econômicos e fáceis de usar se escolhe o sistema *SYBR green*. Não obstante, durante a reação de PCR este pode unir-se a dímeros de iniciadores e a outros produtos inespecíficos resultando em uma sobre-estimação da concentração de DNA alvo. Contudo, se é desejada uma maior especificidade a melhor escolha é o sistema com sonda de hibridação. Recentemente, o uso simultâneo de varias sondas fluorogénicas permite a discriminação de múltiplos *amplicons* na mesma reação (*multiplex PCR*).

3. REFERÊNCIAS

- Anderson RG, and Kirsop BH (a). (1975). Oxygen as a regulator of ester accumulation during the fermentation of worts of high specific gravity. *J. Inst. Brew.* 81:111-115.
- Anderson, RG and Kirsop BH (b). (1975). Quantitative aspects of the control by oxygenation of acetate ester formation of worts of high specific gravity. *J. Inst. Brew.* 81:296-301.
- Araújo Vicente M, Gomes Fietto L, Miranda Castro I, Gonçalves dos Santos AN, Coutrim X and Lopes Brandão R. (2006). Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of “cachaça” the Brazilian sugarcane spirit. *International Journal of Food Microbiology.* 108;1:51-59.
- Aritomi K, Hirosawa I, Hoshida H, Shiigi M, Nishizawa Y, Kashiwagi S and Akada R. (2004). Self-cloning yeast strains containing novel FAS2 mutations produce a higher amount of ethyl caproate in Japanese sake. *Biosci. Biotechnol Biochem.* 68;1:206-14.
- Ashida SE. Ichikawa, Suginami K and Imayasu S. 1987. Isolation and application of mutants producing sufficient isoamyl acetate, a sake flavor component, *Agric. Biol. Chem.* 51:2061–2065.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD and Smith JA. (1989). *Current protocols in molecular biology*, vols 1 and 2. John Willey & Sons, Inc. New York, USA.
- Avhenainen J and Mäkinen V. (1989). The effect of pitching yeast aeration on fermentation and beer flavor. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 22:517-519.
- Äyräpää T and Lindström I. (1973). Influence of long-chain fatty acids on the formation of esters by brewer's yeast. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 14:271-283.
- Äyräpää T and Lindström I. (1977). Aspects of the influence of exogenous fatty acids on the fatty acid metabolism of yeast. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 16:507-517.
- Barnett, JA, Payne RW and Yarrow D. (2000). Yeasts, characteristics and identification, 2nd ed. *Cambridge University Press*, Cambridge, United Kingdom.
- Boulton C and Quain D. (2001). Brewing yeast and fermentation. *Blackwell Science Ltd.* Malden, USA.
- Brasil. (1997). Decreto no 2.314 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre o registro, classificação, padronização, produção e fiscalização das bebidas. Diário Oficial da União, Brasília, Brasil.
- Brasil. (2003). Decreto no. 4.851 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento de 2 de outubro de 2003. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto n. 2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a

- inspeção, a produção e a fiscalização. Diário Oficial da União, Brasília, Brasil.
- Calderbank J and Hammond JRM. (1994). Influence of higher alcohol availability on ester formation by yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52:84-90.
- Casalone E, Fia G, Barberio C, Cavalieri D, Turbanti L and Polsinelli M. (1997). Genetic and biochemical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to trifluoroleucine, *Res. Microbiol.* 148:613–623.
- Cavalieri D, Casalone E, Bondoni B, Fia G, Barberio C, Polsinelli M and Barberio C (1999). Trifluoroleucine resistance and regulation of α -isopropyl malate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.* 261:152–160.
- Derrick S and Large PJ. (1993). Activities of the enzymes of the Ehrlich pathways and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* And *Candida utilis* grown continues culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. *J Gen Microbiol* 139: 2783-2792.
- Dickinson, JR and Dawes IW. (1992). The catabolism of branched-chain amino acids occurs via 2-oxoacid dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 138:2029-2033.
- Dufour JP, Malcorps P and Silcock P. (2003). Control of ester synthesis during brewery fermentation, p. 213-233. In K. Smart (ed.), *Brewing yeast fermentation performance*, 2nd ed., vol. 2. Blackwell Science, Oxford, United Kingdom.
- Dufour J-P, Verstrepen KJ, and Derdelinckx G (2002). Brewing yeasts. In T. Boekhout and V. Robert (ed.), *Yeasts in food*. Behr's Verlag GmbH & Co., Hamburg, Germany. 347-388
- Engan S and Aubert O. (1977). Relations between fermentation temperature and the formation of some flavour components. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 16:591-607.
- Flikweert MT, Van Der Zanden L, Janssen WM, Steensma HY, Van Dijken JP, Pronk JT (1996). Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast.* 12;3:247-57
- Fujii T, Kobayashi O, Yoshimoto H, Furukawa S, and Tamai Y. (1997). Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:910-915.
- Fujii T, Yoshimoto H, and Tamai T. (1996). Acetate ester production by *Saccharomyces cerevisiae* lacking the ATF1 gene encoding the alcohol acetyltransferase. *J. Ferment. Bioeng.* 81:538-542.
- Fukuda K, Yamamoto N, Kiyokawa Y, Yanagiuchi T, Wakai Y, Kitamoto K, Inoue Y and Kimura A (1998). Balance of Activities of Alcohol Acetyltransferase and Esterase in *Saccharomyces cerevisiae* Is Important for Production of Isoamyl Acetate. *Appl Environ Microbiol.* 64;10: 4076–4078.

- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H and Oliver SG. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*. 25: 546.
- Gomes FCO, Silva CLC, Marini MM, Oliveira ES, and Rosa CA. (2007). Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*. 1364:50-72.
- Hammond, JRM. (1993). Brewer's yeast, p. 7-D7. In H. A. Rose and J. S. Harrison (ed.), *The yeasts*, vol. 5. Academic Press, London, United Kingdom.
- Hammond JRM. (1996). Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century. Progress to date. *Yeast*. 1;6:1613-1627.
- Johnston J.R. and Oberman H. (1979). Yeast genetics in industry. Progress in Industrial Microbiology 15, 151-191.
- Johnston L H. (1990). Periodic events in the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 274–279.
- Kurtzman CP and Fell JW. (1998). The yeasts a taxonomic study, 4th ed. *Elsevier*, Amsterdam, The Netherlands.
- Lambrechts MG and Pretorius IS. (2000). Yeast and its importance to wine aroma: a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21:97-129.
- Landaud S, Latrille E, and Corrieu G. (2001). Top pressure and fermentation control the fusel alcohol/ester ratio through yeast growth in beer fermentation. *J. Inst. Brew.* 107:107-117.
- Larroy C, Parés X and Biosca JA. (2002) Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family. *European Journal of Biochemistry*. 269; 22:5738–5745.
- Lilly M, Lambrechts MG, Pretorius IS (2000). Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl Environ Microbiol.* 66;2:744-53
- Malcorps P, Cheval JM, Jamil S, and Dufour J-P. (1991). A new model for the regulation of ester synthesis by alcohol acetyl transferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 49:47-53.
- Meilgaard MC. (2001). Effects on flavour of innovations in brewery equipment and processing: a review. *J. Inst. Brew.* 107:271-286.
- Morais PB, Rosa CA, Linardi VR, Pataro C and Maia A.B.R.A. (1997). Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentation for Brazilian sugar-cane “aguardente” production. *World J. Microbiol Biotechnol.* 13,:241–243.
- Nykänen L. (1986). Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled

- alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.* 37:84-96.
- Nykänen L and Nykänen I. (1977). Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations. *J. Inst. Brew.* 83:30-31.
- Nykänen I, and Suomalainen H. (1983). Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages. *Reidel Publishing Company*, Dordrecht, The Netherlands.
- Oba T, Nomiya S, Hirakawa H, Tashiro K and Kuhara S. (2005). Asp578 in Leu4p is one of the key residues for leucine feedback inhibition release in sake yeast, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:1270-1273.
- Oliveira, E.S. (2001) Características fermentativas, formação de compostos voláteis; e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais. Tese de doutorado, UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, Brasil.
- Oliveira ES, Rosa CA, Morgano MA, and Serra GE. (2004). Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* . 20:19-24.
- Pataro C, Santos A, Correa SR, Morais PB, Linardi VR, and Rosa CA. (1998). Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. *Revista de Microbiologia* 29, 69-73.
- Pataro C, Guerra JB, Petrillo-Peixoto ML, Mendonça-Hagler LC, Linardi VR, Rosa CA. (2000). Yeast communities genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 88:1-9.
- Peddie HAB. (1996). Ester formation in brewery fermentations. *J. Inst. Brew.* 96:327-331.
- Pfisterer E, and Stewart GG. (1975). Some aspects on the fermentation of high gravity worts. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 15:255-267.
- Pisarnitskii AF. (2001). Formation of wine aroma: Tones and imperfections caused by minor components (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 37:552-560.
- Renger RS, Van Hateren SH, and Luyben KCAM. (1992). The formation of esters and higher alcohols during brewery fermentation the effect of carbon dioxide pressure. *J. Inst. Brew.* 98:509-513.
- Sablayrolles JM, and Ball CB. (1995). Fermentation kinetics and the production of volatiles during alcoholic fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 53:71-78.
- Schmittgen TD, Zakrajsek, BA, Mills AG, Gorn V, Singer, MJ and Reed MW. (2000). Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem.* 285:194-204.

- Schwan RF, Mendonça AT, da Silva JJ, Rodrigues V, e Wheals A. (2001) Microbiology e physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek* 79:89-96.
- Romano P, Suzzi G, Comi G and Zironi R. (1992). Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*. 73,126-130.
- ter Schure EG, Flikweert MT, van Dijken JP, Pronk JT, Verrips CT. (1998) Pyruvate decarboxylase catalyzes decarboxylation of branched-chain 2-oxo acids but is not essential for fusel alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 64;4:1303-7.
- Thurston PA, Quain DE, and Tubb RS. (1982). Lipid metabolism and the regulation of volatile synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* 88:90-94.
- Thurston PA, Taylor R and Avhenainen J. (1981). Effects of linoleic acid supplements on the synthesis by yeast of lipids and acetate esters. *J. Inst. Brew.* 87:92-95.
- Verstrepen, KJ, Moonjai N, Derdelinckx G, Dufour J-P, Winderickx J, Thevelein JM, Pretorius IS, and Delvaux FR. (b) (2003). Genetic regulation of ester synthesis in brewer's yeast: new facts, insights and implications for the brewer. *Brewing yeast fermentation performance*, 2nd ed., vol. 2. Blackwell Science, Oxford, United Kingdom. 234-248.
- Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Dufour J-P, Winderickx J, Thevelein JM, Pretorius IS, and Delvaux FR. (a) (2003). Flavour-active esters: adding fruitiness to beer. *J. Biosci. Bioeng.* 96;2:110-118.
- Verstrepen, KJ, Bauer FF, Winderickx J, Derdelinckx G, Dufour J-P, Thevelein JM, Pretorius IS, and Delvaux FR. (2001). Genetic modification of *Saccharomyces cerevisiae*: fitting the modern brewer's needs. *Cerevisiae*. 26:89-97.
- Vila Nova M. (2008). Análise das leveduras da fermentação alcoólica em três alambiques com diferentes níveis de qualidade de produção de cachaça em Pernambuco. Tese de Doutorado. UFPE.
- Vuralhan Z, Morais MA, Tai SL, Piper M D and Pronk JT. (2003). Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *S. cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 69:4534-4541.
- Vuralhan Z, Luttik MAH, Tai SL, Boer V, Morais MA, Schipper D, Almering MJH, Kötter P, Dickinson JR, Daran J-M and Pronk JT. (2005). Physiological characterization of the *ARO10*-dependent, broad-substrate specificity 2-oxo-acid-decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 71;6:3276–3284.
- White FH, and Portno AD. (1979). The influence of wort composition on beer ester levels. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 17:447-480.
- Yoshikawa, K. (1999). Sake: production and flavor. *Food Rev. Int.* 15:83–107.

- Yoshimoto H, Momma T, Fujiwara D, Sone H, Kaneko Y, and Tamai T. (1998). Characterization of the *ATF1* and *Lg-ATF1* genes encoding alcohol acetyltransferases in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*. *J. Ferment. Bioeng.* 88:15-20.
- Yoshioka K, and Hashimoto N. (1981). Acetyl-CoA of brewer's yeast and formation of acetate esters. *Agric. Biol. Chem.* 48:207-209.
- Younis OS, and Stewart GG. (1998). Sugar uptake and subsequent ester and higher alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* 104:255-264.
- Younis OS, and Stewart GG. (2000). The effect of wort maltose content on volatile production and fermentation performance in brewing yeast, *Brewing yeast fermentation performance*, vol. 1. Blackwell Science, Oxford, United Kingdom.170-178.

4. MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO

Análise transcricional em *Saccharomyces cerevisiae* associado ao metabolismo de substâncias organolépticas no âmbito da cachaça artesanal.

Manuscrito a ser enviado para a revista:

APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

(Editora, Springer-Verlag)

Local. ISSN: 00253-007-1194-3.

Análise transcricional em *Saccharomyces cerevisiae* associado ao metabolismo de substâncias organolépticas no âmbito da cachaça artesanal.

E. Espinosa Vidal¹, D. Ardaillon Simões², M.A de Moraes Jr¹.

¹Núcleo de Engenharia Metabólica - Depto. de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade federal de Pernambuco, Brasil.FPE.

² Núcleo de Engenharia Metabólica - Depto. de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.FPE.

RESUMO

No processo de elaboração da cachaça, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* sintetiza uma ampla variedade de compostos com propriedades organolépticas. Neste estudo, foi analisado em uma cepa industrial de *S. cerevisiae* o nível de RNAm mediante *qPCR* dos genes envolvidos no metabolismo de ésteres e alcoóis superiores (*ATF1*, *ATF2*, *FAS1*, *FAS2*, *ACS2*, *EEB1*, *IAH1*, *APT1*, *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10*, *THI3*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *SFA1*, *ADH6*, *LEU4*), em ensaios fermentativos simulando condições industriais (condição de referência) e com o suplemento de altas concentrações de nitrogênio na forma de sulfato de amônio ou aminoácidos ramificados.

Os níveis de RNAm relativos mostraram, em geral, diferenças significativas ($\alpha=5\%$) quando se comparou a condição de referência no final da fermentação com o tempo inicial, não obstante apresentarem um padrão de transcrição similar em condições com alto conteúdo de nitrogênio, independentemente da fonte empregada, especialmente quando foram agrupados pelos tipos de compostos organolépticos produzidos (ésteres ou alcoóis superiores).

Os resultados indicam que a concentração e a fonte de nitrogênio no meio de cultura possuem um papel relevante nos níveis de transcrição dos genes associados à produção de ésteres e alcoóis superiores e por consequência, seriam parâmetros importantes para regular a concentração destes compostos durante o processo de elaboração da cachaça artesanal.

Palavras chaves: leveduras - cachaça - fermentação - compostos organolépticos - transcrição - alcoóis superiores - ésteres.

*Autor para correspondência. Tel - Fax: +55 (81) 21268522

Direção de correio eletrônico: esteban.espinosa.vidal@gmail.com.

INTRODUÇÃO

A aguardente de cana (cachaça) é a bebida destilada mais produzida no Brasil. Esta é obtida pela destilação do caldo de cana fermentado. Durante esse processo, células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* produzem um amplo espectro de metabólitos com propriedades organolépticas, os quais afetam diretamente os complexos sabores das bebidas alcoólicas

fermentadas, determinando sua qualidade e valor. Dentre esses, os alcoóis superiores (que agregam aromas florais) e os ésteres de acetato e de ácidos graxos (aromas frutal-floral e de solvente) representam o maior e mais importante grupo de compostos responsáveis pelo sabor e aroma altamente desejados nas bebidas alcoólicas (Vestrepén *et al.* 2003a).

A natureza e quantidade dos compostos sintetizados dependem de múltiplos fatores, dos quais se destacam a concentração e a natureza da fonte de nitrogênio, a qualidade mineral do mosto e a linhagem de levedura empregada (Lambrechts e Pretorius 2000, Swiegers *et al.* 2006).

Os alcoóis superiores podem ser produzidos no metabolismo dos carboidratos a partir do piruvato, ou na via de assimilação dos aminoácidos ramificados, denominada via de Erlich. Esta consiste no primeiro passo de desaminação do respectivo aminoácido pelas trans-aminases (aminoácido ramificado + α -cetoglutarato $\rightarrow$ α -cetoácido + glutamato) codificadas pelos genes *BAT1* e *BAT2*, seguida da descarboxilação do α -ceto-ácido formado pelas descarboxilases (α -cetoácido $\rightarrow$ α -cetoaldeído + CO_2) codificadas pelo genes *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10* e *THI3/KID1*. Os α -ceto-aldeídos formados devem ser reduzidos ao álcool superior respectivo pela ação das álcool desidrogenases (α -cetoaldeído + $\text{NADH} \rightarrow$ álcool + NAD^+) codificadas pelos genes *ADH1*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *SFA1*, *ADH6* e *ADH7*.

Alternativamente, dependendo do estado redox da célula, os α -ceto-aldeídos podem ser oxidados aos ácidos carboxílicos correspondentes (Vuralhan *et al.* 2003). Dependendo do tipo de aminoácido ramificado catabolizado podem ser obtidos três dos principais alcoóis superiores com importância organoléptica: o álcool isoamílico (3-metil-1-butanol) a partir de L-leucina; o álcool amílico ativo (2-metil-1-butanol) a partir de L-isoleucina; e o álcool isobutílico (2-Metil-1-propanol) a partir de L-valina. Estes compostos não podem ser utilizados como fonte de carbono auxiliar e são excretados da célula. Esta via é a mais utilizada pelas leveduras para obter nitrogênio a partir dos aminoácidos ramificados, que são metabolizados unicamente quando outras fontes de nitrogênio preferenciais (por exemplo, o íon amônia) estão em concentrações limitantes. Assim, quando existe disposição de amônio no meio, os alcoóis superiores são formados a partir do esqueleto carbônico proveniente do anabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (Derrick e Large 1993).

Especificamente na via de síntese de leucina, a enzima chave é uma α -isopropil malato sintase, codificada pelo gene *LEU4*, que produz ao final da via alternativamente álcool isoamílico.

Entre os ésteres de acetato, o acetato de isoamila (aroma tipo banana) é o principal contribuinte ao aroma frutal e doce nas bebidas alcoólicas, assim como o acetato de etila (aroma tipo solvente) e acetato de feniletila (aromas florais com notas de mel) (Yoshikawa *et al.* 1999). Em *Saccharomyces cerevisiae* os ésteres de acetato resultam da condensação de uma molécula de acetil-CoA com uma molécula de álcool, por ação das álcool acetil transferase codificadas pelos genes *ATF1* e *ATF2* (Verstrepen *et al.* 2003a). A síntese de acetil-CoA é feita pelas enzimas acetil-CoA sintetase codificadas pelos genes *ACSI* e *ACS2*.

Dentre os ésteres de ácido graxos se destacam o caproato de etila (hexanoato de etila) (Yoshikawa *et al.* 1999) e o caprilato de etila (octanoato de etila), responsáveis pelos aromas de maçã e de mamão, respectivamente (Meilgaard 2001). Os ácidos graxos são sintetizados pelo complexo ácido graxo sintetase, codificado pelos produtos dos genes *FAS1* e *FAS2*. Alternativamente, parece haver outras atividades éster sintetase no proteoma de *S. cerevisiae* codificadas pelos genes *EHT1* e *EEB1*, os quais poderiam estar também envolvidos na síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeias curtas e médias (Verstrepen *et al.* 2003a).

Um fator importante que influencia na concentração dos ésteres é a degradação pela atividade de esterases. Em *S. cerevisiae* estão descritos duas proteínas com atividade acetato de isoamila esterase (produto do gene *IAH1*) e acil tioesterase (produto do gene *ATP1*) que ainda não estão bem caracterizadas. Desta forma, o balanço das atividades acetil/acil álcool transferase e esterase determinariam o balanço na concentração dos ésteres durante o processo fermentativo (Fukuda *et al.* 1998). Estas atividades apresentam diferentes níveis de regulação, tanto em nível de transcrição gênica como de atividade enzimática, os quais são influenciados de maneira direta pelas condições de fermentação empregadas.

A cachaça artesanal apresenta condições fermentativas particulares de produção. A concentração de açúcar é geralmente entre 14-20 °Brix [equivalentes a 11 a 16% (p/v) de sacarose], a concentração celular gira em torno de 12 a 20% (p/v) e conteúdos de nitrogênio relativamente baixos (200 a 390 mg de N/L) (Alves 2004). Devido a isto, em vários alambiques do Brasil existe a prática de adição de sulfato de amônia no processo fermentativo. No entanto, pouco se sabe sobre a influência dessa adição em relação ao metabolismo das vias de produção dos aromas desejados.

O Brasil apresenta um grande potencial para a produção de aguardente de cana de qualidade. Hoje em dia, grande parte da produção artesanal ainda se concentra em alambiques

que continuam utilizando técnicas tradicionais e junto com a falta de padronização do processo não impulsiona a formação de um mercado estável, como acontece com a cachaça industrial de coluna. Dentre os diferentes fatores que influenciam a produção de cachaça artesanal, o uso de concentrações específicas de compostos nitrogenados assimiláveis deveria levar à produção de bebidas diferenciadas nos aromas e sabores.

Neste contexto científico e industrial, o objetivo deste trabalho foi estudar o padrão de transcrição dos principais genes (*ATF1*, *ATF2*, *FAS1*, *FAS2*, *ACS2*, *EEB1*, *IAH1*, *APT1*, *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10*, *THI3*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *SFA1*, *ADH6*, *LEU4*) que estão associados à produção de ésteres e alcoóis superiores em condições similares nas obtidas durante o processo de elaboração de aguardente de cana artesanal, utilizando uma linhagem de *S. cerevisiae* industrial e caldo de cana com diferentes concentrações de sulfato de amônio ou com aminoácidos ramificados como fonte de nitrogênio.

Os resultados demonstraram que a concentração e a fonte de nitrogênio no meio de cultura possuem um papel relevante nos níveis de transcrição dos genes associados à produção de ésteres e alcoóis superiores. Por consequência, estes seriam parâmetros importantes para regular de forma precisa a concentração destes compostos durante a processo de elaboração da cachaça artesanal, gerando assim um salto de qualidade no produto final.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagem.

Neste trabalho foi utilizada a linhagem comercial de *S. cerevisiae* JP-1 (Fermol Distiller®, AEB Bioquímica Latino Americana, Brasil) isolada do processo de fermentação de álcool combustível (Silva-Filho et al, 2005) e atualmente comercializada para destilarias de álcool combustível e de cachaça. Esta é comercializada na forma liofilizada, por isso, as células foram ativadas antes dos ensaios fermentativos pela suspensão e incubação em água destilada estéril (25 % p/v) por 30 minutos sob agitação (instruções do fornecedor).

Condições de fermentação.

Os experimentos micro-fermentativos foram conduzidos usando caldo de cana natural, fornecido pelo produtor da cachaça artesanal São Saruê, no município de Igarassú, Pernambuco. O caldo de cana foi extraído de um único terno da moenda, clarificado por ebulição por 5 minutos e decantado por 12 horas a 4°C. Logo após, o caldo foi filtrado em papel de filtro com algodão, esterilizado a 121°C por 15 minutos e armazenado em garrafas de vidro a 4°C até seu uso. No momento de utilização, o caldo de cana foi diluído com água destilada estéril a fim de padronizar a concentração inicial de sacarose em 12% (p/v).

O valor de referência utilizado para determinar a diluição foi observado na escala do refratômetro manual que indica o índice de substâncias secas refractométricas (RDS) em graus °Brix (°Bx) da amostra. Para isso, os valores obtidos foram transformados em porcentagem de sacarose usando o fator de conversão 1,25 (1% = 1,25 °Bx). Antes dos ensaios de fermentação o caldo de cana foi suplementado com os antibióticos ácido nalidíxico (50 µg/ml) e ampicilina (50 µg/ml) para impedir contaminação bacteriana.

Os ensaios de micro-fermentação consistiram em inocular as células hidratadas na concentração de 12% (p/v) em 50 mL de meio caldo de cana a 12% de sacarose (meio SC) ou em meio de caldo de cana suplementado com sulfato de amônio a 0,44 g/L (Sigma), correspondendo a concentração final de nitrogênio de 93 mg/L (3,32 mM de N) (meio SC/AS90), com sulfato de amônio a 5,83 g/L, correspondendo a concentração final de nitrogênio de 1.230 mg/L (9,35 mM de N) (SC/AS1000) ou com uma mistura de L-isoleucina (3,84 g/L) (Sigma), L-valina (3,43 g/L) (Sigma) e L-leucina (3,84 g/L) (Sigma) para atingir uma concentração final de nitrogênio assimilável de 1230mg/L (9,35mM de N) (meio SC/ILV1000). Nesta última condição, a ausência do íon sulfato foi compensada pela adição de uma quantidade equimolar de sulfato de potássio (4,23 g/L) (Tabela 1).

A fermentação ocorreu durante nove horas a 32°C e com agitação de 50 r.p.m, suficiente para impedir a sedimentação das células mas sem proporcionar aeração ao meio. Aliquotas de 1,5 mL em triplicata foram coletadas no tempo inicial e após nove horas em forma asséptica empregando um sistema de seringas. A concentração celular foi determinada por contagem ao microscópio utilizando-se hematocitómetro (câmara de Neubauer) e o açúcar residual foi determinado em refratômetro manual. As amostras coletadas foram rapidamente centrifugadas a 14.000 r.p.m por 30 segundos a temperatura ambiente, o sobrenadante removido foi armazenado

a -20°C para determinação de etanol e álcool isoamílico, e o sedimento celular foi rapidamente submergido em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C. Os ensaios micro-fermentativos foram conduzidos consecutivamente em dois experimentos independentes.

	Carbono (sacarose) (% p/v)	Nitrogênio		Concentração Nitrogênio suplemento		Concentração Nitrogênio final		C:N
		Fonte	(g/L)	(mg/L)	mM	(mg/L)	mM	
SC	12	- NH ₄ ⁺	- traços*	- -	- -	428,5*	3,25	280.05
SC/AS90	12,40	(NH ₄ ⁺) ₂ (SO ₄ ⁻)	0,44	93	0,7	521	3,96	238.00
SC/AS1000	12,48	(NH ₄ ⁺) ₂ (SO ₄ ⁻)	5,83	1230	9,35	1658,5	12,8	75.37
SC/ILV1000	13,60	L-isoleucina	3,84	1230	9,35	1685,5	12,8	80.69
		L-leucina	3,84					
		L-valina	3,43					

Tabela 1. composição dos meios de cultura utilizados neste ensaio.

* (segundo Alves 2004)

Extração de RNA total.

As amostras de RNA foram isoladas a partir das células congeladas segundo descrito por Schmitt *et al.* (1990) com algumas variações. As células foram descongeladas rapidamente e ressuspensas em 600 µl de acetato de sódio 50 mM a pH 5.3 e EDTA 10 mM (solução AE) e transferidas para microtubos de 1,5 ml. Em seguida foram adicionando 40 µl de SDS 10 % e 600 µl de uma solução de fenol, previamente equilibrado com solução AE. A mistura foi novamente agitada e incubada a 65 °C por 4 min. Depois de resfriados a 4 °C durante 5 minutos, os tubos foram centrifugados por 2 min a 14.000 r.p.m para separar a fase aquosa da orgânica. A fase aquosa superior foi transferida para um tubo novo no qual foi adicionado um mesmo volume de uma mistura de fenol/clorofórmio (5:1) a temperatura ambiente, seguido de nova centrifugação. A fase aquosa foi transferida a um novo tubo e se adicionou cloreto de lítio para atingir uma concentração final de 2,5 M. As misturas foram incubadas por 30 minutos a -20°C para permitir a precipitação do RNA, centrifugadas a 14.000 r.p.m por 20 minutos e o sedimento foi lavado com etanol 70 %. Após seco em estufa a 37°C, as amostras de RNA foram ressuspensas em 30 µl de água bidestilada tratada com dietil pirocarbonate (DEPC) e

	ORF/Descrição	código	Sequência
ATF1	YOR377W	ATF1L	CACTTCTTTCGGGTTTCATCT
	Alcohol acetyltransferase	ATF1R	TGATCTCGGTGACAACATCAT
ATF2	YGR177C	ATF2L	TACGACAACGGTGACCACTT
	Alcohol acetyltransferase	ATF2R	AGAGTTGGCAAGAAGGCTGT
FAS1	YKL182W	FAS1L	GAATCTGTCTGCAACCAACC
	subunit fatty acid synthetase	FAS1R	GAGGTGACTTCCATGACAGG
FAS2	YPL231W	FAS2L	AGGACCGTTTCAAGGATGAG
	subunit of fatty acid synthetase	FAS2R	AGCGGACATGGTGTGATAA
ACS2	YLR153C	ACS2L	CACTCCTGCCTACCCAGATT
	Acetyl-coA synthetase isoform	ACS2R	GCAGTTGGAGCCACATAGAA
EEB1	YPL095C	EEB1L	ATAATCAACGCAACGGATGA
	AcylcoenzymeA	EEB1R	CCCAAGTCAGTCTCGCATAA
IAH1	YOR126C	IAH1L	CGTACCAACGAGAAGTTTGC
	Isoamyl acetate-esterase	IAH1R	TCACCACCTTCCTGTTGAAA
APT1	YLR118C	APT1L	GCCGCTTTCAGCATACTA
	Acyl-protein thioesterase	APT1R	GTCAAACCAAGCAGGCATC
PDC1	YLR044C	PDC1L	TGACGAACAACACCCAAGATA
	pyruvate decarboxylase	PDC1R	CAACGGCTTCCTTAAGTTCTG
PDC5	YLR134W	PDC5L	GGTGTGTTGGTGAATTGTCTGC
	pyruvate decarboxylase	PDC5R	GATGGATGGAACACCAACAA
PDC6	YGR087C	PDC6L	GTATCTCGCAGGTGTTGTGG
	pyruvate decarboxylase	PDC6R	CTTGTTGGGGTCAATCTCCT
ARO10	YDR380W	ARO10L	TGGTGATGTTGTCTGTTTGTG
	Phenylpyruvate decarboxylase	ARO10R	TGCCAATGGAAAGGAAAAAT
THI3	YDL080C	THI3L	AACTTTGCGACCAATGACAA
	Probable decarboxylase	THI3R	TTCTACCACCCACCTGTCAA
ADH3	YMR083W	ADH3L	CGTTTCTGAAGCCGCTATT
	alcohol dehydrogenases	ADH3R	GCAAACCAACCAAAAACGAC
ADH4	YGL256W	ADH4L	GGGGAAATCGGAGACTATGA
	alcohol dehydrogenases	ADH4R	CGGAAGCAGTACCAGCAGTA
ADH5	YBR145W	ADH5L	TGCTATGGGTTACAGGGTCA
	alcohol dehydrogenases	ADH5R	TCTTCCGTGAAATCGATGAA
SFA1	YDL168W	SFA1L	TGCTGAGTGTGGCAAATGTA
	alcohol dehydrogenases	SFA1R	GGCATTACACCTTTCCTTG
ADH6	YMR318C	ADH6L	TGTGGTGTCTGCGGTAGTG
	NADPH alcohol	ADH6R	CGACTAGCGGCATCTTCAT
LEU4	YNL104C	LEU4L	AGACGCCATTAAGAAGGGTTT
	isopropylmalate synthase	LEU4R	CAATGGCAAGTATGGGATTCT
ADK1	YDR226W	ADK1L	TTACCATGCTCAAACCGAAC
	Adenylate kinase	ADK1R	CCCAAACAGTAGCAGGAGGT

Tabela 2: listagem das regiões codificantes selecionadas e dos iniciadores correspondentes.

armazenadas a -80°C até seu uso. A quantificação do RNA isolado foi realizada por análise em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm, usando a conversão de uma unidade de absorbância a 260 nm equivalente a 40 µg/mL de RNA. O grau de pureza das amostras foi determinado pela razão das absorbâncias a 260 nm/280 nm, sendo consideradas as amostras com valores 260/280 entre 1,9-2,1. A possível degradação da amostra foi determinada por análise em géis de agarose 1 %, usando como parâmetro a forma e intensidade nas bandas correspondentes ao RNAr 26S e 18S.

qPCR.

Os iniciadores foram desenhados para a amplificação de 20 regiões codificantes obtidas das seqüências dos genes depositadas no *Yeast Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org/>) (Tabela 2). Dentre esses, 19 correspondem aos genes de interesse e um (*ADKI*) foi usado para normalizar os níveis de transcrição basal. Para o desenho dos iniciadores foi utilizada a ferramenta *on-line Genscript primer design* no modo avançado (www.genscript.com/cgi-bin/tools) empregando os seguintes parâmetros: os tamanhos dos iniciadores entre 17 e 25 bases, valor de T_m em 59°C e tamanho dos *amplicons* entre 70 a 110 pb.

Os pares de iniciadores obtidos foram analisados com a ferramenta *Netprimer* para a determinação da formação de auto-híbridos, duplex, *hairpins* e *loops* (www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html). Os pares de iniciadores que apresentaram um *ranking* maior do que 90% foram selecionados para os ensaios de *qPCR*. Em seguida, os pares de iniciadores obtidos foram submetidos a uma análise de *match* com regiões codificantes dos genes alvo (www.blast.org) e com regiões não-específicas do genoma de *S. cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org/>). Por ultimo, os iniciadores foram submetidos a uma *PCR in silico* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) empregando como molde o genoma de *S. cerevisiae*. Todos os iniciadores geraram fragmentos específicos de tamanho esperado. Uma vez confirmadas as especificidades, as seqüências dos iniciadores foram enviadas para síntese pela *IDT Technologies* (USA).

Para a síntese do DNA complementar (DNAc) se empregou o kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega) usando Oligo(dT)₁₅ como iniciadores e seguindo as instruções do fabricante. A quantificação dos RNAm foram realizados com o kit *SYBR Green PCR Master*

Mix seguindo as instruções do fabricante (*Applied Biosystems*) no sistema de detecção 7500 *Real Time PCR system* (*Applied Biosystems*). Usaram-se as seguintes condições de amplificação: etapa inicial a 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, e seguidamente 40 ciclos de 95 °C por 15 seg, e 60 °C por 1 min. Os valores de C_T para cada amplificação nas distintas condições foram guardados e posteriormente analisados.

Para a determinação do grau de contaminação com DNA genômico (DNAg), as reações de *PCR* foram realizadas com amostras de reações de síntese de cDNA sem transcriptase reversa. Os resultados mostraram a presença de DNAg < 1,5% do total de cDNA.

A análise dos dados de quantificação foi feita segundo o método de quantificação relativo de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak e Schmittgem 2001), nos quais os níveis de transcrição gênica foram normalizados contra o controle endógeno representado pelo gene *ADKI*, e comparados em função da condição calibrador, neste caso as células cultivadas em caldo de cana com sacarose 12 % (p/v) sem suplementos de fonte de nitrogênio. Os valores foram normalizados com o controle endógeno *ADKI*; e se restaram a 1 para expressarem em vezes reprimidos o induzidos. Os dados foram expressos em vezes de indução/repressão em relação no controle endógeno (*ADKI*) na condição calibrador.

Para a determinação do erro padrão (δ) do controle endógeno como do gene de interesse se empregou a fórmula: $\delta = \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$

onde σ é a variância dos diferentes valores de C_T obtidos, e N é o número de valores de C_T usados no cálculo. Para determinação do erro padrão do $\Delta\Delta C_T$ se empregou a fórmula para a propagação do erro padrão: $\delta\Delta\Delta C_T = \sqrt{(\delta_1)^2 + (\delta_2)^2}$

onde δ_1 é o erro padrão do gene de interesse e δ_2 é o erro padrão do controle endógeno.

Determinação de etanol e álcool isoamílico.

O etanol foi quantificado no meio de cultura usando um cromatógrafo a gás modelo CG-Master com detector de ionização por chama e coluna de polietilenoglicol de 30 m x 0,53 mm x 0,5 mm. A análise foi conduzida segundo às seguintes condições: temperatura do vaporizador de 130 °C, a temperatura do detector foi de 130 °C, a programação do forno: 40 °C (6 min); 5 °C/min; 110 °C (2 min), dando um tempo de corrida de 20 min. O gás transportador foi hidrogênio a 7 mL/min, a razão de divisão da amostra foi 1:10, e o volume injetado foi 1 µL. Para

quantificar os resultados se empregou o método de padronização externa.

Análise das seqüências regulatórias.

Para analisar as seqüências não codificadoras *upstreams*, foram utilizadas as ferramentas computacionais fornecidas no banco de dados do *Regulatory Sequences Analysis Tools* (<http://rast.ulb.ac.be/rsat/>). Os motivos regulatórios foram analisados na região de 800 pb anteriores ao sítio de início da transcrição dos genes apresentados na Tabela 2.

Análise dos resultados.

Todos os ensaios de micro-fermentação, assim como a determinação dos níveis de RNAm foram realizados ao menos duas vezes de forma independente.

Os dados foram avaliados estatisticamente por análise da diferença entre as médias usando ANOVA para determinar as diferenças significativas nos tratamentos com um nível de significância de $\alpha = 5\%$, seguido por determinação da diferenças entre as médias dentro de cada tratamento analisando as diferenças mínimas significativas empregando o teste estatístico de Tuckey com um nível de significância de $\alpha = 5\%$.

Os valores que resultaram ser significantes, mas que apresentarem um nível de indução-repressão de RNAm menor ou igual a 0,15 vezes de indução-repressão (15%) em relação ao controle endógeno, não foram levados em consideração na análise final dos resultados.

RESULTADOS

Perfil fermentativo da linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* JP-1.

O perfil fermentativo da linhagem industrial JP-1 foi analisada em condições que simulam o processo de produção de cachaça de alambique, adicionando-se ou não sulfato de amônia o aminoácidos ramificados como fonte suplementar de nitrogênio. Na Figura 1A observou-se que após nove horas de incubação a concentração celular permaneceu constante em todas as condições ensaiadas, corroborando o estado fermentativo na cultura. Em relação à concentração de açúcar, a taxa de consumo de sacarose foi similar em todas as condições empregadas (nível

de significância $\alpha=5\%$) (Figura 1B).

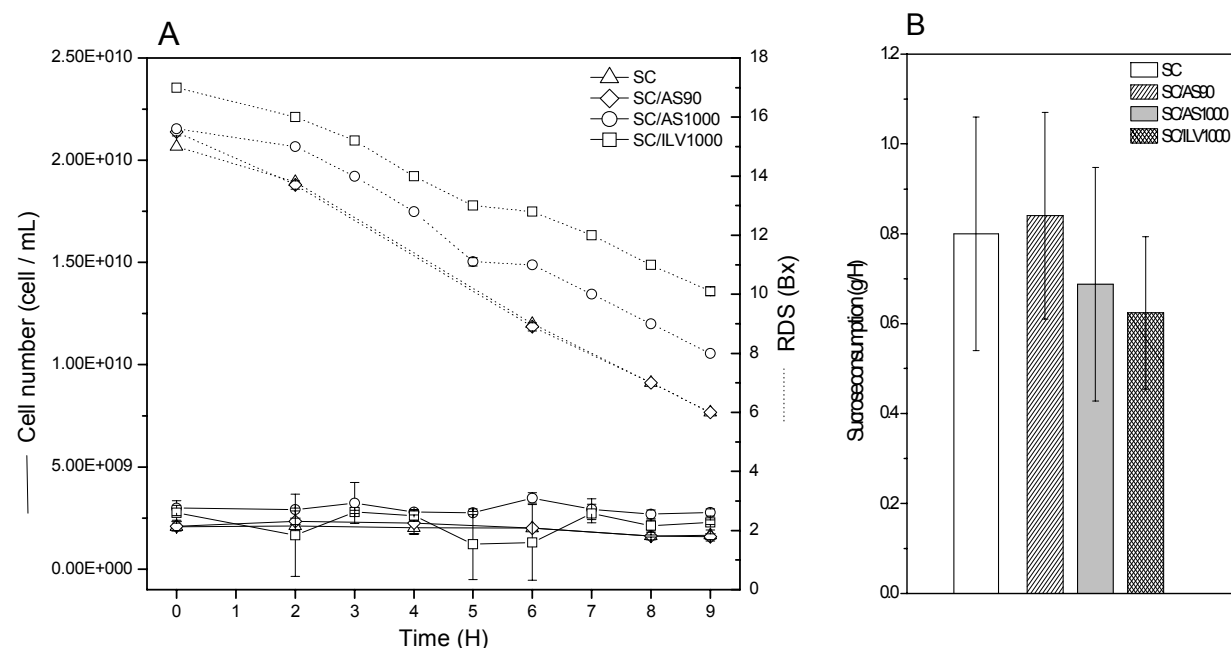


Figura 1. Curva de fermentação e consumo de sacarose.

A. Perfil fermentativo e substâncias secas refractométricas (RDS) da cepa JP-1, as células foram cultivadas por nove horas a 32 °C com agitação de 50 r.p.m. em meio de caldo de cana sacarose 12 % (p/v) (SC), e no mesmo caldo de cana mais o agregado de 0,44 g/L (SC/AS90) e 5,83 g/L (SC/AS1000) de sulfato de amônio, e com de uma mistura equimolar de L-leucina (3,84g/L), L-isoleucina (3,84 g/L) e L-valina (3,43 g/L) (SC/ILV1000).

B. Consumo de sacarose na cepa JP-1 nas mesmas condições anteriormente descritas. Os valores representam as médias $\pm$ o desvio padrão.

Níveis de transcrição genes associados no metabolismo de alcoóis superiores e ésteres.

Para determinar o tipo de regulação que exerce o nitrogênio na transcrição dos genes associados com o metabolismo de alcoóis superiores e ésteres, foram realizados ensaios micro-fermentativos com a linhagem JP-1 de *S. cerevisiae* em caldo de cana contendo 12 % (p/v) de sacarose (SC), e suplementando este meio com nitrogênio na forma de sulfato de amônia em baixa concentração (SC/AS90) ou alta concentração (SC/AS1000), ou ainda na forma de aminoácidos ramificados (AS/ILV1000). As células foram coletadas no tempo inicial e após nove horas de fermentação.

Empregando as condições de fermentação descritas acima, foram analisados os padrões de transcrição de 19 genes de *S. cerevisiae* selecionados por participarem no metabolismo de compostos organolépticos em outros processos biotecnológicos similares (elaboração de

cerveja, vinho, saquê, *whisky*).

Em relação aos alcoóis superiores, e tendo como base a via catabólica de Erlich, foram estudados os níveis de RNAm dos genes que codificam para as atividades descarboxilase tiamina pirofosfato dependente (*PDC1*, *PDC5*, *PDC6*), fenil piruvato descarboxilase (*ARO10*) e alfa-ceto-isocaproato descarboxilase (*THI3*), dos genes que codificam para as atividades álcool dehidrogenase (*ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *SFA1*, *ADH6*) e o gene que codifica para a alfa-isopropil malato sintetase (*LEU4*), a qual participa na via de biosíntese de leucina. Em relação as vias envolvidas na síntese de ésteres, foram estudados os níveis de transcrição dos genes com atividade álcool acetil transferase (*ATF1* e *ATF2*), acil-CoA etanol transferase (*EEB1*), ácido graxo sintetase (*FAS1* e *FAS2*), acetil CoA sintetase (*ACS2*), e dois genes que codificam para esterases, uma isoamil acetato esterase (*IAH1*) e uma proteína-acil tioesterase (*APT1*).

Inicialmente foi determinada a relação nos níveis de RNAm entre as diferentes condições fermentativas analisadas. Para isto, se compararam os níveis de RNAm dos genes em estudo na linhagem JP-1 nas diferentes condições (SC/AS90, SC/AS1000 e SC/ILV1000), os quais foram normalizados contra o controle endógeno *ADK1* e expressos em função da condição de fermentação em caldo cana sem suplemento de nitrogênio (Figura 2A). Os níveis de transcrição foram similares entre as condições de altas concentrações de nitrogênio (SC/AS1000 vs SC/ILV1000, com um coeficiente de correlação de $r=0,89$ (Figura 2B), independente do tipo de fonte de nitrogênio empregada. Em contraste, não houve relação no padrão de transcrição quando comparando as condições de escassez (SC/AS90) com as condições de excesso (AS/SC1000 e AS/ILV1000) de nitrogênio ($r<0,16$ nas duas comparações). Entretanto, quando os genes foram agrupados segundo o tipo de composto produzido se observou um aumento substancial no coeficiente de correlação quando se comparam os níveis de transcrição em uma condição específica. Principalmente nos genes envolvidos na formação de alcoóis superiores quando se comparam os níveis de RNAm em condições com alto conteúdo de nitrogênio (SC/AS1000-SC/ILV1000, $r=0,99$). Os genes envolvidos na formação de ésteres apresentaram um aumento no coeficiente de correlação na comparação entre a condição deficiente em amônia e a suplementado com aminoácidos ramificados ($r=0,73$).

Via metabólica alcoóis superiores.

Os resultados obtidos mostraram uma indução significativa nos níveis de transcrição nos

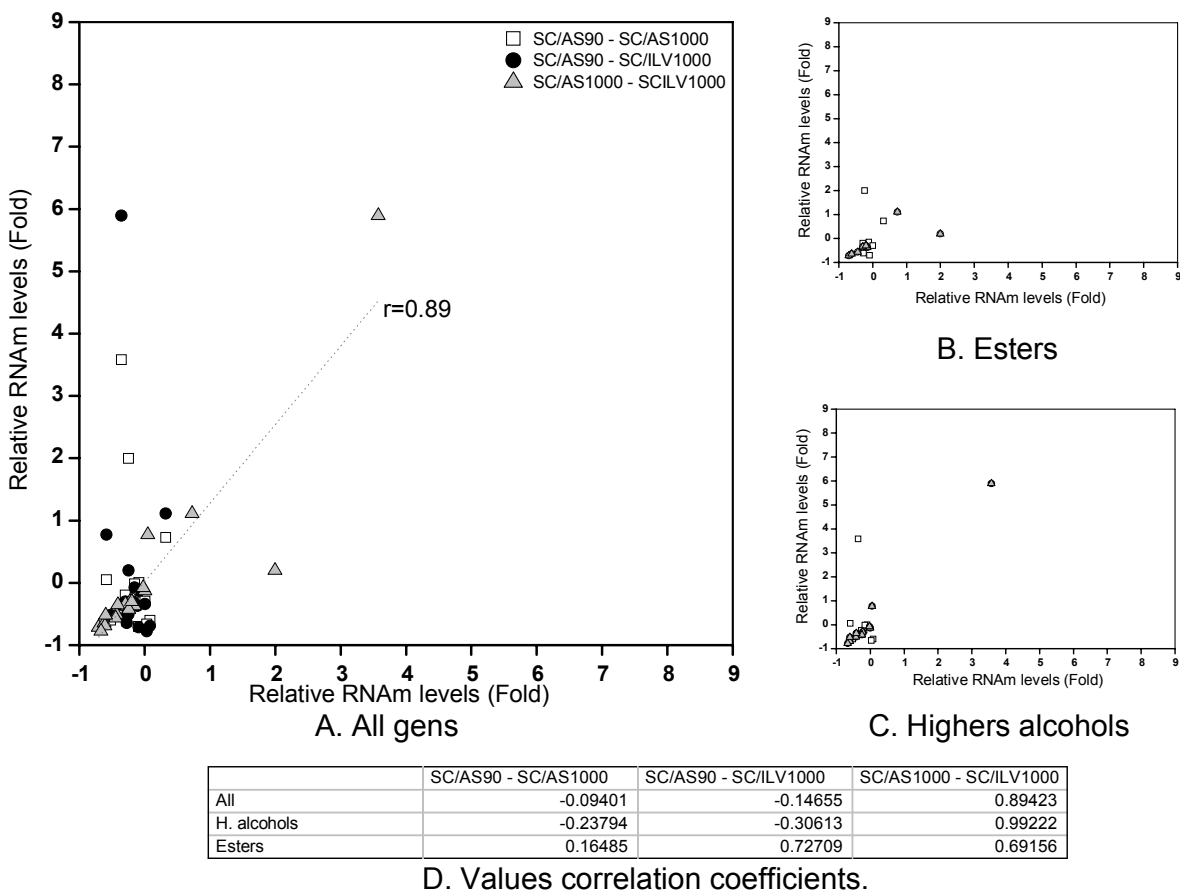


Figura 2. Análise global dos níveis de transcrição dos genes relacionados com a síntese de ésteres e alcoóis superiores na cepa JP-1 nas diferentes condições fermentativas.

Comparação dos níveis de ARNm relativos nas diferentes condições ensaiadas, SC/AS90= 93 mg N/L em forma de sulfato de amônio, SC/AS1000 = 1230 mg N/L em forma de sulfato de amônio, e SC/ILV1000= 1230 mg N/L em forma de aminoácidos ramificados leucina, valina e isoleucina.

- A. Comparação de todos os genes em estudo. Na gráfica se apresenta a reta de ajuste linear e o coeficiente de correlação para a comparação SC/AS1000 - SC/ILV1000.
- B. Comparação dos genes envolvidos no metabolismo de ésteres.
- C. Comparação dos genes envolvidos no metabolismo de alcoóis superiores.
- D. Valores dos coeficientes de correlação provenientes do análise de correlação entre as comparações respectivas.

genes *THI3* (+1,35 vezes), *PDC6* (+5,11 vezes), *ARO10* (+9,14 vezes), *ADH4* (+6,65 vezes), *ADH6* (+1,97 vezes), e *SAF1* (+1.71 vezes) na condição de caldo de cana com sacarose 12 % (p/v) (SC) quando se comparam com o tempo inicial (Figura 3B), entretanto os níveis de transcrição dos genes restantes apresentarem baixas ou nenhuma diferença.

Quando se comparam os níveis de RNAm nas diferentes condições com suplemento de nitrogênio em relação na condição SC se observou que os níveis de RNAm dos genes *PDC5*, *ADH6* e *SAF1* no meio SC/AS90 (93 mg N/L suplementado como sulfato de amônio) foram

A

	SC/AS90	SC/AS1000	SC/ILV1000
<i>ADK1</i>	0.00 (0.00 ; 0.00)	0.00 (-0.03 ; 0.03)	0.00 (-0.04 ; 0.04)
<i>PDC1</i>	-0.26* (-0.26 ; -0.26)	-0.24* (-0.2 ; -0.22)	-0.42* (-0.44 ; -0.41)
<i>PDC5</i>	0.03 (-0.03 ; -0.03)	-0.66* (-0.6 ; -0.66)	-0.77* (-0.78 ; -0.77)
<i>PDC6</i>	-0.52* (-0.52 ; -0.52)	-0.60* (0.61 ; -0.58)	-0.52* (-0.54 ; -0.50)
<i>ARO10</i>	-0.35 (-0.84 ; -0.20)	3.58* (3.42 ; 3.75)	5.89* (6.64 ; 6.15)
<i>THI3</i>	-0.36* (-0.37 ; -0.36)	-0.41* (-0.42 ; -0.40)	-0.35* (-0.37 ; -0.33)
<i>ADH3</i>	-0.24* (-0.24 ; -0.24)	-0.42* (-0.45 ; -0.40)	-0.50* (-0.52 ; -0.49)
<i>ADH4</i>	-0.59 (-0.66 ; -0.50)	0.05 (0.03 ; 0.08)	0.78* (0.42 ; 1.21)
<i>ADH5</i>	-0.18 (-0.18 ; -0.17)	-0.22 (-0.24 ; -0.20)	-0.30 (-0.32 ; -0.28)
<i>ADH6</i>	-0.09 (-0.10 ; -0.15)	0.00 (-0.02 ; 0.03)	-0.13 (-0.15 ; -0.10)
<i>SFA1</i>	-0.15* (-0.16 ; -0.15)	-0.02 (-0.04 ; 0.00)	-0.07 (-0.10 ; -0.04)
<i>LEU4</i>	0.08* (0.07 ; 0.10)	-0.60* (-0.62 ; -0.60)	-0.69* (-0.70 ; -0.68)

B

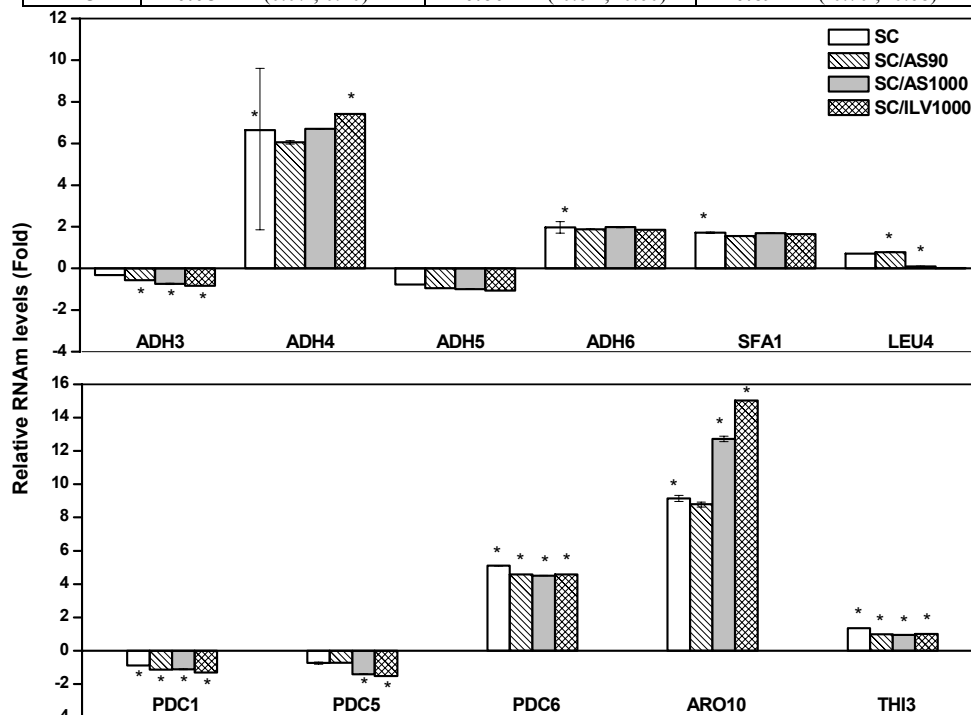


Figura 3. Níveis de expressão e indução relativos dos genes envolvidos na sínteses de alcoóis superiores em caldo de cana 12% (p/v) sacarose baixo diferentes concentrações e fontes de nitrogênio.

- (A) Níveis de indução/repressão do ARNm em condições com baixo conteúdo de nitrogênio na forma de sulfato de amônio SC/AS90 (93 mg N/L), e em condições com alta concentração de nitrogênio na forma de sulfato de amônio SC/AS1000 (1230 mg/L) e na forma de aminoácidos ramificados leucina, isoleucina e valina (1230 mg/L) relativos à condição de referência caldo de cana 12% sacarose (p/v). Os valores se normalizaram com o controle endógeno *ADK1*; e se restaram a 1 para expressarem em vezes reprimidos o induzidos.
- (B) Níveis de indução/repressão do ARNm relativos a tempo inicial de fermentação. Os valores se normalizaram em função do nível de ARNm do controle endógeno *ADK1*. A condição caldo de cana 12% (p/v) (SC) se relativizou em relação aos valores obtidos no tempo inicial da fermentação. Os valores obtidos para cada uma das condições suplementado com nitrogênio se expressaram em relação na condição de referência SC, somando-se aos valores obtidos para a condição SC.

-As barras de erro representam o menor e o maior valor que alcançarem as medições. A média e o intervalo de medição estão baseados no resultado obtido de pelo menos duas medições em duplicado a partir de duas culturas independentes.

* Valores significativamente diferentes com um nível de confiança de $\alpha=5\%$.

semelhantes à condição de referência de caldo de cana (Figura 3A e B). Os genes que apresentaram um comportamento significativamente diferente nos níveis de RNAm nesta comparação foram os genes *PDC1* (-0,26 vezes), *PDC6* (-0,52 vezes), *ARO10* (-0,35 vezes) e *THI3* (-0,36 vezes) entre as descarboxilases; e *ADH3* (-0,24 vezes) e *ADH4* (-0,59 vezes) entre as álcool desidrogenases (Figura 3A e B).

Em condições de altas concentrações de nitrogênio em relação à condição de referência foi observado aumento nos níveis de transcrição do gene *ARO10*, tanto em meio com sulfato de amônia (+3,58 vezes) quanto com aminoácidos ramificados (+5,89 vezes). Já o gene *ADH4* apresentou indução na ordem de +0,78 vezes quando a fermentação ocorreu na presença dos aminoácidos ramificados. Nestas condições também foram observadas diminuições significativas da transcrição nos genes *PDC1* (-0,24 e -0,42 vezes respectivamente), *PDC5* (-0,66 e -0,77 vezes), *PDC6* (-0,60 e -0,52 vezes), *THI3* (-0,41 e 0,35 vezes) e *ADH3* (-0,42 e -0,50 vezes).

Em relação à via anabólica do aminoácido leucina, outra via importante na formação de álcool isoamílico, os níveis do transcrito *LEU4* foram reduzidos na condição de alta concentração de nitrogênio, tanto na forma de amônia (-0,60 vezes), e como era de esperar-se na forma de aminoácidos ramificados (-0,69 vezes).

Vias metabólicas ésteres.

Os resultados obtidos mostraram uma indução significativa nos níveis de transcrição nos genes *ATF2* (+1,33 vezes), *ACS2* (+2,67 vezes), *FAS1* (+3,53 vezes), *FAS2* (+2,44 vezes), e *IAH1* (+3,48 vezes), na condição de caldo de cana com sacarose a 12% (p/v) (SC) quando se comparam com o tempo inicial (Figura 3B).

Quando se comparam os níveis de RNAm nas diferentes condições com suplemento de nitrogênio em relação na condição SC se observa que os níveis de RNAm do gene *ATF1* diminuiu de forma significativa, na presença de concentrações baixas de nitrogênio (-0,29 vezes) assim como em alta concentrações de nitrogênio, tanto em presença de amônia (-0,44 vezes) como em presença de aminoácidos ramificados (-0,56 vezes) (Figura 3A). Já o nível de transcrição do gene *ATF2* não variou na condição com baixo conteúdo de amônia, mas apresentou níveis significativos de repressão na presença de alto conteúdo de nitrogênio (-0,30 vezes quando forem cultivadas com amônia e -0,34 vezes quando se cultivarem usando

A

	SC/AS90	SC/AS1000	SC/ILV1000
<i>ADK1</i>	0.00 (0.00 ; 0.00)	0.00 (-0.03 ; 0.03)	0.00 (-0.96 ; 1.04)
<i>ATF1</i>	-0.29* (-0.32 ; -0.27)	-0.44* (-0.45 ; -0.43)	-0.56* (-0.73 ; -0.30)
<i>ATF2</i>	0.01 (-0.01 ; 0.02)	-0.30* (-0.32 ; -0.27)	-0.34* (-0.39 ; -0.28)
<i>EEB1</i>	-0.24* (-0.25 ; -0.24)	2.00* (1.92 ; 2.08)	0.20* (0.16 ; 0.23)
<i>ACS2</i>	-0.11* (-0.12 ; -0.10)	-0.15* (-0.17 ; -0.13)	-0.37* (-0.39 ; -0.35)
<i>FAS1</i>	-0.09 (-0.10 ; -0.09)	-0.70* (-0.71 ; -0.13)	-0.72* (-0.72 ; -0.71)
<i>FAS2</i>	-0.27* (-0.28 ; -0.27)	-0.62* (-0.63 ; -0.61)	-0.64* (-0.65 ; -0.63)
<i>IAH1</i>	0.32* (0.31 ; 0.32)	0.73* (0.69 ; 0.77)	1.11* (1.05 ; 1.17)
<i>APT1</i>	-0.29* (-0.32 ; -0.26)	-0.20* (-0.22 ; -0.18)	-0.30* (-0.32 ; -0.28)

B

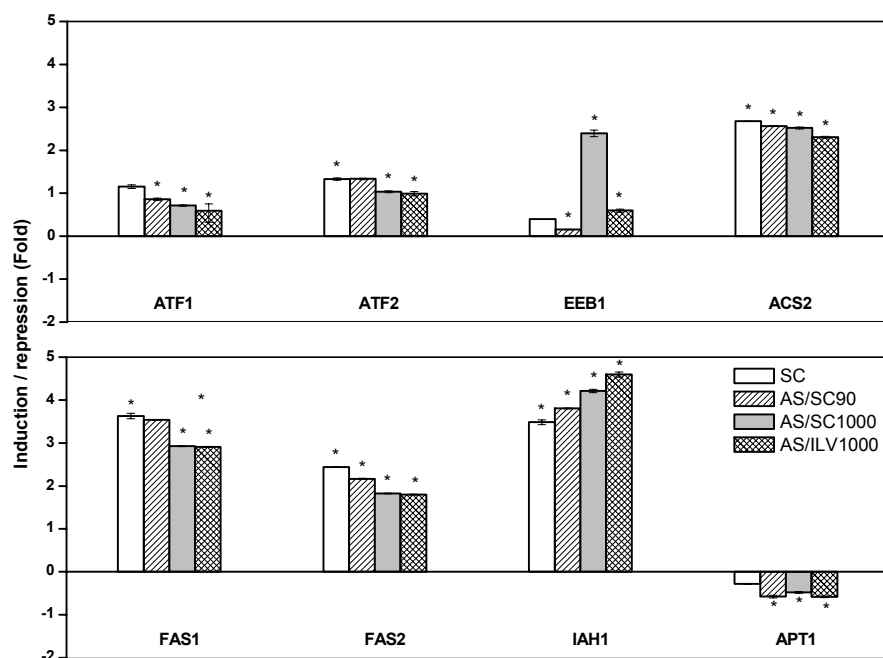


Figura 3. Nível de ARNm relativos a *ADK1* dos genes envolvidos na síntese de ésteres em caldo de cana 12% (p/v) sacarose baixo diferentes concentrações e fontes de nitrogênio.

- (A) Níveis de indução/repressão do ARNm em condições com baixo conteúdo de nitrogênio na forma de sulfato de amônio SC/AS90 (93 mg N/L), e em condições com alta concentração de nitrogênio na forma de sulfato de amônio SC/AS1000 (1230 mg/L) e na forma de aminoácidos ramificados leucina, isoleucina e valina (1230 mg/L) relativos à condição de referência caldo de cana 12% sacarose (p/v). Os valores se normalizaram com o controle endógeno *ADK1*; e se restaram a 1 para expressarem em vezes reprimidos o induzidos.
- (B) Níveis de indução/repressão do ARNm relativos a tempo inicial de fermentação. Os valores se normalizaram em função do nível de ARNm do controle endógeno *ADK1*. A condição caldo de cana 12% (p/v) (SC) se relativizou em relação aos valores obtidos no tempo inicial da fermentação. Os valores obtidos para cada uma das condições suplementado com nitrogênio se expressaram em relação na condição de referência SC, somando-se aos valores obtidos para a condição SC.

-As barras de erro representam o menor e o maior valor que alcançarem as medições. A média e o intervalo de medição estão baseados no resultado obtido de pelo menos duas medições em duplicado a partir de duas culturas independentes.

* Valores significativamente diferentes com um nível de confiança de $\alpha=5\%$.

aminoácidos ramificados como suplemento) (Figura 3A).

Em relação à via de formação de ésteres de ácidos graxos, o gene *EEB1*, que codifica a enzima acil-CoA:etanol aciltransferase, apresentou um nível de indução de 0,24 vezes na condição de baixo conteúdo de nitrogênio foi induzido de forma estatisticamente significativa na condição com alto teor amônia (+2 vezes), apresentando na presença de aminoácidos ramificados uma diminuição de 0,20 vezes (Figura 3A). Também foi observado que os genes *FAS1* e *FAS2* que codificam respectivamente as subunidades beta e alfa do complexo ácido graxos sintetase foram reprimidos principalmente em condições de altas concentrações de nitrogênio na forma de amônia (-0.70 e -0.62 vezes respectivamente) e na condição com suplemento de aminoácidos ramificados (-0.72 e -0.64 vezes, respectivamente).

Com respeito ao gene *ACS2*, os níveis de RNAm mostraram uma repressão significativa nas diferentes situações ensaiadas em relação à condição de referência (entre -0,11 a -0,37 vezes). Em relação aos genes com atividade esterase, *IAH1* apresentou indução significativa nos níveis de RNAm nas três condições testadas, +0.32 vezes na presença de baixa concentração de amônia, +0.73 vezes na presença de alto conteúdo de amônia e +1.11 vezes na presença de aminoácidos ramificados (Figura 3A). O outro gene estudado, *APT1* (acil-tioesterase) apresentou níveis significativos de repressão nas condições examinadas, entre -0,20 a -0,30 vezes (Figura 3A).

Determinação de etanol.

A determinação analítica demonstrou a formação de pequenas quantidades de álcool etílico nos primeiros minutos da fermentação, no tempo transcorrido entre inocular a cultura e realizar a extração da amostra (Figura 4B). Este resultado permite assegurar que as células se encontram fermentativamente ativas no tempo inicial, sendo adequada esta condição para normalizar a condição SC.

Interessantemente, a quantidade de etanol produzido na condição SC/AS1000 resulto 0,45 vezes maior que na condição de SC (nível de significância de $\alpha=5\%$) (Figura 4A).

Além disso, na condição SC/ILV1000 foi a única onde foi possível detectar a produção de álcool isoamílico ($1,43 \pm 0,50$ g/L) (Figura 4B).

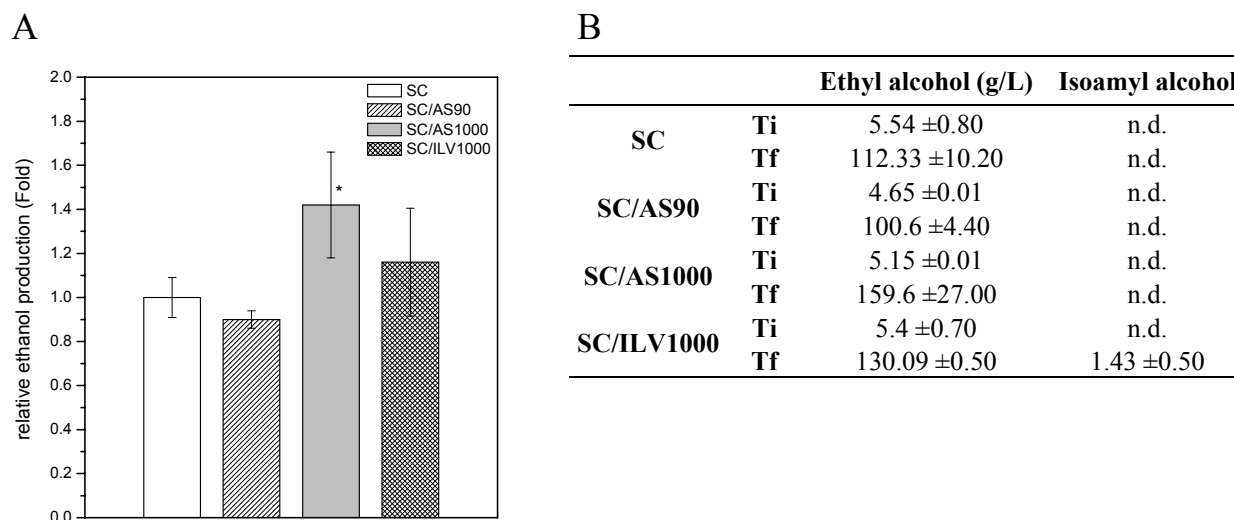


Figura 4. Determinação da concentração de álcool etílico e álcool isoamílico.

(A). Produção de etanol relativo à condição SC. Quantidade de álcool etílico produzida em relação no obtido na condição de referencia, expressada em vezes.

* valores significativamente diferentes com nível de significância de $\alpha=5\%$.

(B). Determinação da concentração de álcool etílico e álcool isoamílico. Os valores representam as medias e os desvios padrão de como mínimo 4 determinações.

Ti= Tempo inicial. Tf= Tempo final.

n.d.=não detectado.

DISCUSSÃO

As linhagens industriais de *S. cerevisiae* envolvidas na elaboração de bebidas alcoólicas conseguem adaptar-se e crescer em diversas condições ambientais, sempre mantendo a habilidade de converter a vasta quantidade de fontes de carbono do meio em etanol e diversos metabólitos alguns com importante propriedades organolépticas. A compreensão do padrão de transcrição gênica dessas linhagens pode contribuir para o aprimoramento da produção de bebidas alcoólicas e para os processos biotecnológicos em geral (como o bio-etanol). Isto tem se verificado na crescente lista de publicações que utilizam a técnica de microarranjo de DNA para estudos de transcrição orientados à elaboração de vinho (Cavaliere *et al.* 2000, Backhus *et al.* 2001) e de cerveja (Higgins *et al.* 2001, Dawes *et al.* 2002, James *et al.* 2002).

Com o objetivo de incrementar o conhecimento neste campo em relação ao processo de elaboração de cachaça, este trabalho analisou os níveis de transcrição de 19 genes de *S. cerevisiae* relacionados com o metabolismo dos ésteres e alcoóis superiores na elaboração de

outras bebidas obtidas por fermentação. Para isso se realizaram ensaios em pequena escala simulando as condições empregadas na produção de cachaça artesanal: suco da cana de açúcar natural com conteúdos de sacarose de 12% (p/v), inóculos celulares altos (na ordem da 1×10^9 cel/ml), temperatura de 32°C, e mínima agitação (apenas para evitar a decantação das células), usando essa condição como referência e comparando-a com condições com diferentes fontes e concentrações de nitrogênio. Motivo desta escolha foi o baixo conteúdo de nitrogênio livre assimilável presente no caldo de cana. Ao mesmo tempo, se empregou como inóculo o fermento comercial JP-1, uma linhagem industrial de *S. cerevisiae*.

Semelhança de genoma entre linhagens industriais e de laboratório.

Em geral, as linhagens industriais apresentam várias diferenças genéticas em relação às linhagens de laboratório: poliploidias, aneuploidias, translocações, redundância no número de cópias de alguns genes e quadros abertos de leitura únicos (Hammond 1996, Johnstom e Oberman 1979, Goffeau *et al.* 1996, De Winde 2003). Portanto, não é incomum que seqüências genômicas das linhagens industriais difiram em certos aspectos de seus ortólogos em linhagens laboratoriais.

A linhagem JP-1 utilizada no presente estudo foi isolada como dominante em processos de fermentação alcoólica em destilarias de álcool combustível, sendo selecionada por suas características de alta capacidade fermentativa (Silva-Filho *et al.* 2005). Entretanto, esta linhagem apresenta uma alta instabilidade cromossômica (Lucena *et al.* 2007), o que parece ser uma característica dos isolados industriais (Infante *et al.* 2003). Uma outra característica desta linhagem é a instabilidade meiótica que inviabiliza 25% dos esporos gerados (dados não publicados). Apesar desses fenótipos, a linhagem JP-1 está sendo comercializada (Fermol Distiller®, AEB Bioquímica Latino Americana S.A.) para destilarias de álcool combustível e destilarias de cachaça em diferentes regiões do Brasil. Além das suas características industriais, detectamos e quantificamos os níveis de RNAm correspondentes a 21 genes em células de JP-1 cultivadas em condições semelhantes àquela da fermentação de cachaça. Outros ensaios preliminares indicam o mesmo resultado como outros 18 genes (dados não mostrados). Todos estes fatores em conjunto sugerem uma grande homologia de seqüência entre o genoma da linhagem industrial e da linhagem S288C depositado no *Yeast Genome Database*. Não obstante, empregar linhagens industriais poliplóides ou com número redundante de genes pode resultar em

sobre-estimações dos níveis de RNAm quando os dados não são normalizados contra uma condição de referência, como acontece em ensaios de microarranjos ou de quantificação absoluta por *qPCR*. De fato, foi mostrado que um dos genes mais expressos em diferentes experimentos, *YCR005C*, se devia à ploidia do genoma (Galitski *et al.* 1999). De forma análoga, os níveis de transcrição muito baixos em diferentes condições podem indicar a deleção parcial ou total do gene (James *et al.* 2002).

Consumo de sacarose em diferentes tipos de fonte de nitrogênio empregado.

O íon amônio, principal fonte de nitrogênio para as leveduras, estimula o metabolismo fermentativo, devido ao aumento na disponibilidade de grupos amino na síntese de proteína ocasionando um aumento na concentração das enzimas e por consequência nas atividades enzimáticas, e pela diminuição da relação ATP:ADP, causado pelo gasto de ATP pelo sistema de transporte ativo do íon amônio acoplado a uma H^+ -ATPase (Pena *et al.* 1987). Por isso, baixos níveis do íon estão associados à baixa atividade celular (Bely *et al.* 1990) e baixo rendimento em biomassa (Bissom 1991). Mas ainda não estão claros os níveis mínimos de concentração de amônio no meio. Por exemplo, Mendes-Ferreira e colaboradores (2004) demonstraram que a linhagem industrial *PYCC4072* empregada na indústria do vinho não apresentou diferença na taxa específica de crescimento com valores de nitrogênio entre 16,5 e 805 mg N/L, e na produção de biomassa celular entre 267 e 805 mg N/L.

Os resultados do presente trabalho concordam com estes reportes prévios, já que a taxa de consumo de sacarose foi similar em todas as condições testadas (nível de significância $\alpha=5\%$) (Figura 1B). Este fato pode explicar a ausência de crescimento celular devido às condições de cultura semi-aeróbicas (alta concentração de açúcar, mínima agitação) e principalmente ao alto conteúdo celular (12 % p/v).

Padrão de transcrição global.

Os estudos demonstraram que os níveis de transcrição tomando em conjunto todos os genes estudados são similares nas condições com altas concentrações de nitrogênio (SC/AS1000 e SC/AS/ILV100) independente do tipo de fonte empregada. Em contraste, não existe relação no padrão de transcrição quando se compara a condição limitante em nitrogênio com as condições não limitantes (Figura 2B). Interessantemente, quando os genes foram agrupados segundo a via

metabólica que participam se observou um aumento nas diferentes comparações realizadas. Esta observação pode ser devida ao fato de que os genes envolvidos em uma mesma via metabólica compartilham os mesmos mecanismos regulatórios. Neste sentido, é lógico pensar que estes genes apresentem seqüências motivo similares de ligação a fatores de transcrição nas regiões *upstream* do sítio de iniciação da transcrição. Por exemplo, tomando a proteína Gcn4p, o fator de transcrição mais estudado em relação ao metabolismo de nitrogênio e supondo que maiores quantidades de seqüências motivos produzam maiores efeitos nos níveis de transcrição, se observa uma maior incidência nas seqüências motivos de ligação a este fator nos genes envolvidos na formação de alcoóis superiores (ocorrência da seqüência motivo/números de genes= 2.09) que nos envolvidos na formação de ésteres (ocorrência da seqüência motivo/números de genes= 0.63) (Figura 5), explicando a maior correlação nos níveis de RNAm dos genes envolvidos na via de Erlich.

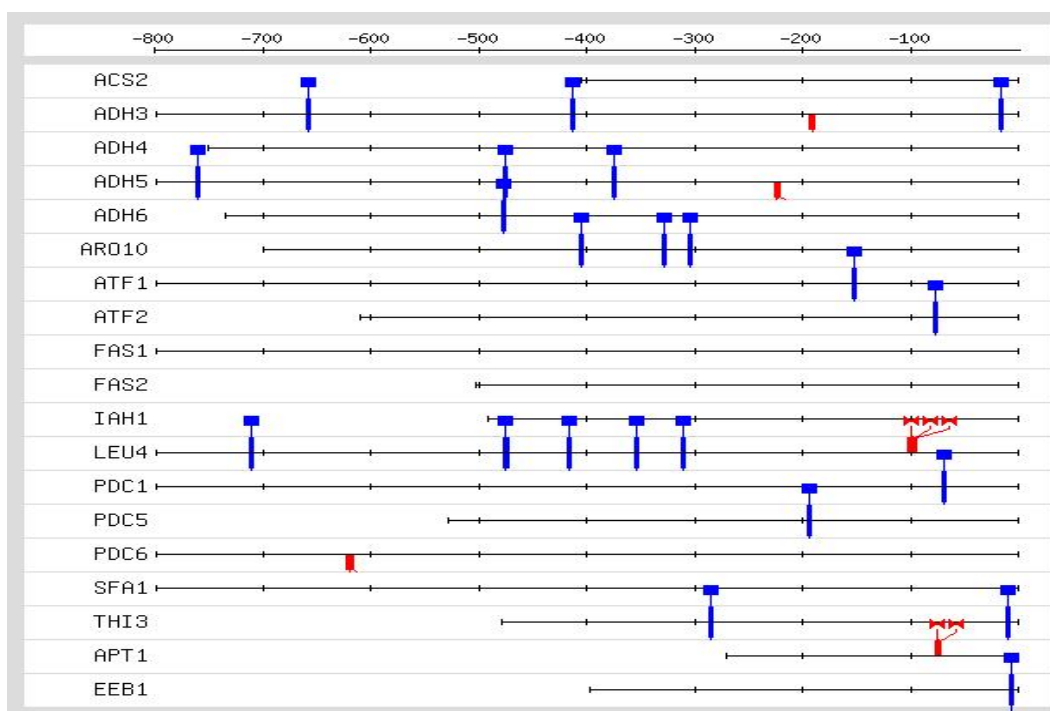


Figura 5. Análise para motivo do fator de transcrição Gcn4p nas seqüências *upstreams* do sítio de iniciação da transcrição.

- Caixa Gcn4
- Caixa Gcn4 para o sítio AP-1
- ▶ Número de seqüências motivos na região

Formação de alcoóis superiores por *S. cerevisiae*.

No processo de elaboração de aguardente de cana, *S. cerevisiae* é responsável pela produção de uma variedade de metabólitos que contribuem no aroma e no sabor, estando os alcoóis superiores entre os mais importantes. Estes compostos organolépticos derivam do esqueleto carbônico dos aminoácidos, os quais em teoria podem ser sintetizados de novo, mas durante o processo fermentativo são tomados geralmente do meio, sobretudo em condições deficientes em fontes de nitrogênio de mais fácil assimilação, como por exemplo, amônia. É comumente aceito que nestas condições os alcoóis superiores se originem na via catabólica de Erlich.

As enzimas chaves nesta via metabólica são as piruvato descarboxilase tiamina difosfato dependente, (*PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10* e *THI3*) as quais também estão envolvidas no metabolismo principal fermentativo na formação de etanol. Em *S. cerevisiae* cada uma pode independentemente descarboxilar o piruvato a acetaldeído (James *et al.* 2002). Em células tipo selvagem, 85% de toda a atividade piruvato descaboxilase provêm de *PDC1*, o restante de *PDC5* (Köning 1998). *PDC6* parece só contribuir na atividade piruvato descarboxilase durante crescimento em fonte de carbono não fermentáveis, análises de *Northem blot* demonstraram que *PDC6* apresenta indução nos níveis de RNAm quando as células são crescidas em etanol (Hohman 1991).

Em nossos estudos, observamos entre as alfa cetoácido descarboxilases um aumento nos níveis de RNAm dos genes *PDC6* (+5,11 vezes), *ARO10* (+9,14 vezes) e *THI3* (+1,35 vezes) quando se comparam a condição de caldo de cana com sacarose 12 % (p/v) com nove horas de fermentação com o tempo inicial. Esta observação colocariam a *ARO10* e *PDC6* como as descarboxilases principais nas condições ensaiadas.

Quando se comparou a condição baixa em nitrogênio (SC/AS90) com a condição de referência (SC) se denota a repressão nos níveis de transcrição dos genes com atividade piruvato descarboxilase (PDCases) (entre -0,50 a -0,26 vezes), de forma similar quando se comparam às condições com alto conteúdo de nitrogênio com SC (entre -0,60 a -0,24 vezes), unicamente *PDC5* não apresenta diferenças entre as condições SC/AS90 e SC (+0,03 vezes). Interessantemente *PDC5* demonstrou níveis de repressão maiores que as outras PDCases nas condições com alto conteúdo de nitrogênio.

Em relação às outras descarboxilases dependentes de tiamina pirofosfato, trabalhos

prévios assinalam que o nível de RNAm de *ARO10* é induzido por triptofano, fenilalanina e leucina. Neste sentido, estudos baseados em perfis metabólicos e em atividade enzimática, sugerem que a expressão de *ARO10* poderia estar super-regulada por valina, leucina e isoleucina (Vuralhan et al 2005). Outro estudo evidencia que Aro9p (transferase de aminoácidos aromáticos II) é co-expressa com Aro10p em culturas com diferentes fontes de nitrogênio, ambas reguladas pelo fator de transcrição Aro80p (YDR421W) ((Thurston et al. 1981). Este sugere que tanto Aro9p como Aro10p não estão restritas aos aminoácidos aromáticos. Todas estas observações apresentam consistência com o rol proposto para *ARO10* como uma descarboxilase com um amplo espectro de substratos.

Nossos resultados confirmam que os aminoácidos ramificados provocariam em conjunto a indução nos níveis de RNAm de *ARO10*. Surpreendentemente, isto também ocorre se bem em menor medida, na presença de quantidades similares de amônio. Esta observação somada ao aumento nos níveis de RNAm na condição de referência em relação no tempo inicial (+9,15 vezes), as altas taxas de produção de etanol na condição com alto conteúdo de amônia, e a repressão nos níveis de RNAm de *PDC1* e *PDC5*, colocaria o gene *ARO10* como o principal responsável pela atividade descarboxilase nas condições ensaiadas, re-colocando a este gene com a capacidade de descarboxilar o piruvato a acetaldeído (James et al. 2002).

Em relação ao nível de transcrição de *THI3* observamos similaridade nas três condições testadas, parece que este gene não é regulado pela fonte ou concentração de nitrogênio no meio. Isto pode dever-se ao fato de que *THI3* por si só não exerce atividade descarboxilásica, sendo requerida as outras PDCases para apresentar esta atividade (Vurahlam et al. 2003).

Com respeito às álcool desidrogenases os resultados obtidos demonstram um aumento nos níveis de RNAm nos genes *ADH4* (+6,65 vezes), *ADH6* (+1,97 vezes) e *SFA1* (+1,71 vezes) quando se comparou a condição com caldo de cana com sacarose 12 % (p/v) depois de nove horas de fermentação com o tempo inicial.

Em relação à fonte de nitrogênio empregada, estudos prévios onde se cresceram células em meio mínimo com aminoácidos ramificados como única fonte de carbono, as alfa-ceto ácidos descarboxilase não demonstraram estar envolvidas na formação de alcoóis superiores em presença destes aminoácidos (Dickinson et al. 2000).

Os resultados obtidos neste trabalho em relação a *ADH4*, *ADH6* e *SFA1* ratificam esta observação, mostrando que não existe diferenças significativas entre as condições com

suplemento de aminoácidos ramificados e a condição de referência, também não apresentarem diferenças as outras condições ensaiadas. Entretanto, *ADH3* e *ADH4* demonstraram estar regulados pelo suplemento de nitrogênio, apresentando repressão nos níveis de RNAm em relação na condição de referência (entre -0,24 a -0,59 vezes). *ADH4* apresentou um aumento nos níveis de RNAm de +0,78 vezes na condição com suplemento de aminoácidos ramificados, esta observação somado à produção de álcool isoamílico detectada (1,43 g/L) (Figura 4B), situa a *ADH4* como a principal gene envolvido na produção de álcool isoamílico, com um taxa de conversão de leucina em álcool isoamílico de 37,24 %.

Estes resultados estariam de acordo com outra análise onde se demonstra que células selvagens cultivadas em anaerobiose na presença de fenilalanina como única fonte de nitrogênio, convertem quase estequiometricamente a fenilalanina em feniletanol. Isto sugere o estado redox das células em favor da ramificação redutiva da via de Erlich sobre a oxidativa produzindo fenilacetato (Vuralhan *et al.* 2003).

Em relação do gene *LEU4* nossos resultados sugerem que os níveis de RNAm estariam reprimidos pela presença de aminoácidos ramificados no meio, especificamente leucina, mas não descartamos a possível repressão por isoleucina e valina, já que o anabolismo destes aminoácidos compartilham as mesmas enzimas. Surpreendentemente, observamos o mesmo comportamento nos níveis de RNAm do gene *LEU4* em células crescidas em quantidades similares de sulfato de amônio. Mais análises precisam ser realizados para esclarecer este fato. Desde outro aspecto, a maior concentração de álcool isoamílico produzido na presença de aminoácidos ramificados sugere que a produção deste composto nas condições estudadas está mais sujeita à via catabólica de Erlich que à via anabólica de formação de aminoácidos onde participa o gene *LEU4*.

Formação de ésteres por *S. cerevisiae*.

Os ésteres de etila e de ácidos graxos são produzidos como resultado da reação de condensação entre um acetil/acil-CoA e alcoóis superiores ou etanol. Assimismo, a síntese de ácidos graxos em leveduras é um processo citosólico e depende do suplemento de acetil-CoA como precursor. O acetil-CoA é o intermediário principal na bio-síntese de lipídios e de ésteres, e de fato, a produção dos mesmos depende de vias metabólicas em comum (Lynes *et al.* 1997).

Tem sido sugerido que o fluxo de piruvato a etanol e acetil-CoA é regulado apenas pelas afinidades relativas da piruvato desidrogenase (PDAs) e da piruvato descarboxilase (PDCs), esta última também envolvida na formação de alcoóis superiores. Neste sentido, o acetil-CoA pode derivar do acetaldeído, produzido pela PDCs via o intermediário acetato, contornando a piruvato desidrogenase. As evidências demonstram que esta bifurcação representa a principal via para a formação de acetil-CoA em condições fermentativas (Boulton e Quain 2001).

Bem com isso, a lipoamida desidrogenase, componente essencial no complexo multi-enzimático desidrogenase está sujeita à repressão por glicose (Roy e Dawes 1987). A ausência da enzima PDAs leva à perda completa do ciclo do ácido cítrico em *S. cerevisiae* quando é crescida anaerobicamente.

Desde outro ângulo, se demonstrou que linhagens mutantes deficientes em PDCs de *S. cerevisiae* não podem crescer na presença de glicose em condições fermentativas ou não fermentativas, sugerindo que a formação de citosólica de acetil-CoA via o intermediário acetaldeído é fundamental para biosíntese de lipídios (van den Berg *et al.* 1995, Flikweert *et al.* 1996). Com isso, se pode assumir que a piruvato desidrogenase não apresenta um papel importante no catabolismo de açúcares em condições fermentativas. Por isso, em condições de alto conteúdo de açúcar o metabolismo passa a ser respiro-fermentativo, o piruvato é canalizado predominantemente por a via onde participam as piruvato descarboxilases (Petrik *et al.* 1983, Van Urk *et al.* 1988), e por ação das álcool desidrogenases e das aldeídos desidrogenases é transformado em etanol ou acetato, respectivamente. Presumivelmente, a impossibilidade das enzimas de processar o grande fluxo de carbono faz com que estes produtos parcialmente oxidados sejam excretados das células. Nestas condições, estudos *in vivo* indicam que as quantidades de acetato excretadas se devem ao fato de que a atividade das acetaldeído desidrogenasa excedem a atividade das acetil-CoA sintetase.

A produção de acetato explicaria a redução nos rendimentos em biomassa devido a que este ácido orgânico débil produz a dissipação do gradiente de pH através da membrana plasmática. Este seria um dos fatores que determinam o modesto crescimento das células em condições fermentativas (van den Berg *et al.* 1996). Neste sentido, outros estudos demonstram que *ACS2* seria a única das acetil-CoA sintetase expressa em condições anaeróbicas (van den Berg *et al.* 1996). Nossos resultados mostraram um aumento nos níveis de RNAm de *ACS2* ao comparar a condição SC com o tempo inicial de fermentação, corroborando os dados prévios.

Com respeito à biossíntese de ácidos graxos, outro dos precursores na formação e ésteres de acila, os genes envolvidos são as ácido graxos sintetase (*FAS1* e *FAS2*). Estudos prévios mostram que células crescidas em condições limitantes de nitrogênio ou com cocientes altos de C:N, conduziram à acumulação e síntese excessiva de esteróis. Em geral, em meios contendo mínimas concentrações de nitrogênio e excesso de carbono se promove o acúmulo de lipídeos, parece que nestas condições o carbono é canalizado para a síntese de lipídios (Novotny *et al.* 1987).

Nossas análises mostram que em condições de falta de nitrogênio, com uma relação C:N alta (SC C:N=280, Tabela 1) os níveis de RNAm de *FAS1* e *FAS2* são significativamente maiores que nas condições quando foi suplementado nitrogênio (SC/AS90 C:N=238, SC/AS1000 C:N=75, e SC/ILV1000 C:N=80), observando-se uma relação nos níveis de repressão e a quantidade de nitrogênio final no meio. A medida que diminui a relação C:N, se produz um incremento nos níveis de repressão destes genes (Figura 3B).

Vale destacar que as condições empregadas neste ensaio são semi-anaeróbicas (ausência de influxo de nitrogênio gasoso para gerar um ambiente anaeróbico estrito), por isso se conjectura que a síntese de esteróis e de ácidos graxos insaturados pode conduzir-se com as mínimas quantidades de oxigênio presentes, principalmente no princípio da fermentação. Além disso, a biossíntese de ácidos graxos saturados (que forma parte o complexo ácido graxo sintetase integrada por *FAS1* e *FAS2*) e a formação de esqualeno a partir de acetil-CoA (o precursor do ergosterol) são oxigênio independente. Outro aspecto importante a ressaltar e a coordenação nos níveis de transcrição de *FAS1* e *FAS2*, na Figura 3B se pode observa que os níveis de RNAm se comportam similarmente em cada condição. Esta observação corrobora indícios que assinalam que as células sintetizam quantidades equivalentes dos RNAm respectivos para formar o complexo ácido graxo sintetase (Kuziora *et al.* 1983, Chirala *et al.* 1987).

Outro aspecto de suma importância são os níveis de transcrição dos produtos gênicos com atividade éster sintetase. A biossíntese depende da atividade das enzimas acil-CoA etanol transferase (*EEB1*), as álcool acetil transferase (*ATF1* e *ATF2*), e as esterases (*IAH1* e *APT1*), exercendo seu modo de ação no sentido inverso. Estudos demonstraram que em concentrações de glicose entre 5 e 10% (p/v) a síntese de etil acetato resulta da ação das atividades álcool acetil transferase (AATase) e da reação reversa das esterases; entretanto, em altas concentrações

de glicose (24% p/v) a síntese deste éster resulta somente da atividade AATase (Schermer *et al.* 1976, Yoshioka e Hashimoto 1981). Neste sentido, numerosas provas certificam que os níveis de ésteres são claramente reduzidos em condições aeróbicas assim como na presença de ácidos graxos insaturados no meio de cultura (Anderson *et al.* 1973, Schiler *et al.* 1982). Por isso sugere-se que altas taxas de crescimento incrementariam as necessidades celulares de acetil-CoA, deixando menos acetil-CoA disponível para a síntese de ésteres (Calderbank *et al.* 1994). Além disso, na presença de oxigênio reprime a transcrição de *ATF1* através da via repressora mediada por Rox1p (Fuwara *et al.* 1999), devido a presença do elemento de resposta a baixo oxigênio (LORE) na sequência promotora de *ATF1* (Vasconcelles *et al.* 2001).

Outras observações indicam que os níveis de transcrição de *ATF1* podem ser também influenciados pela disponibilidade de nitrogênio no meio de cultura. Se há demonstrado que a deleção da proteína quinase Sch9p, envolvida na sinalização por nitrogênio, produz a redução nos níveis de expressão de *ATF1* (Fujiwara e col.1999). Vestrepen *et al.* (2003) demonstraram que a expressão de *ATF1* era máxima quando glicose e fontes de nitrogênio assimilável estão presentes no meio em forma não limitante. Nossos resultados demonstram que na condição SC os níveis de transcrição de *ATF2* e de *ATF1* são induzidos significativamente em relação do tempo inicial de fermentação (+1,15 e +1,33 vezes respectivamente), indicando que o suplemento com nitrogênio produz uma queda nos níveis de RNAm. Este último efeito poderia ser resultado da influência pela proteína Sch9p, cuja atividade é regulada pela concentração de nitrogênio. Maiores estudos precisam ser realizados para determinar o papel de Sch9p na regulação de *ATF1* e possivelmente de *ATF2*. similarmente, a regulação destes genes segue um padrão similar ao gene *ACS2*, que sintetiza o acetil-coA, um dos precursores dos ésteres empregados as enzimas atf1p e Atf2p. Este poderia sugerir que nas condições fermentativas usadas os níveis dos transcritos de *ATF1* e *ATF2* dependeriam das quantidades do precursor acetil-CoA assim como do tipo e concentração de nitrogênio no meio. Isto explicaria também os níveis de RNAm dos genes *FAS1* e *FAS2*, que empregam acetil-CoA na síntese de ácidos graxos.

Em relação a *EEB1*, a outra enzima com atividade éster sintetase, foram verificados altos níveis de RNA na condição com alto conteúdo de amônia (SC/AS1000) (Figura 3B). Não existem estudos na literatura que descrevem o mecanismo de regulação para *EEB1*. Nossos resultados mostram que os níveis de RNAm seriam induzidos pela presença de suplementos de

nitrogênio no meio, e baseados nos níveis de RNAm apresentados por *ATF1* e *ATF2*, *EEB1* seria junto com estes responsáveis pela produção de ésteres nas condições testadas, colocando este ultimo como mais importantes em condições com alto conteúdo de nitrogênio. Além disso,

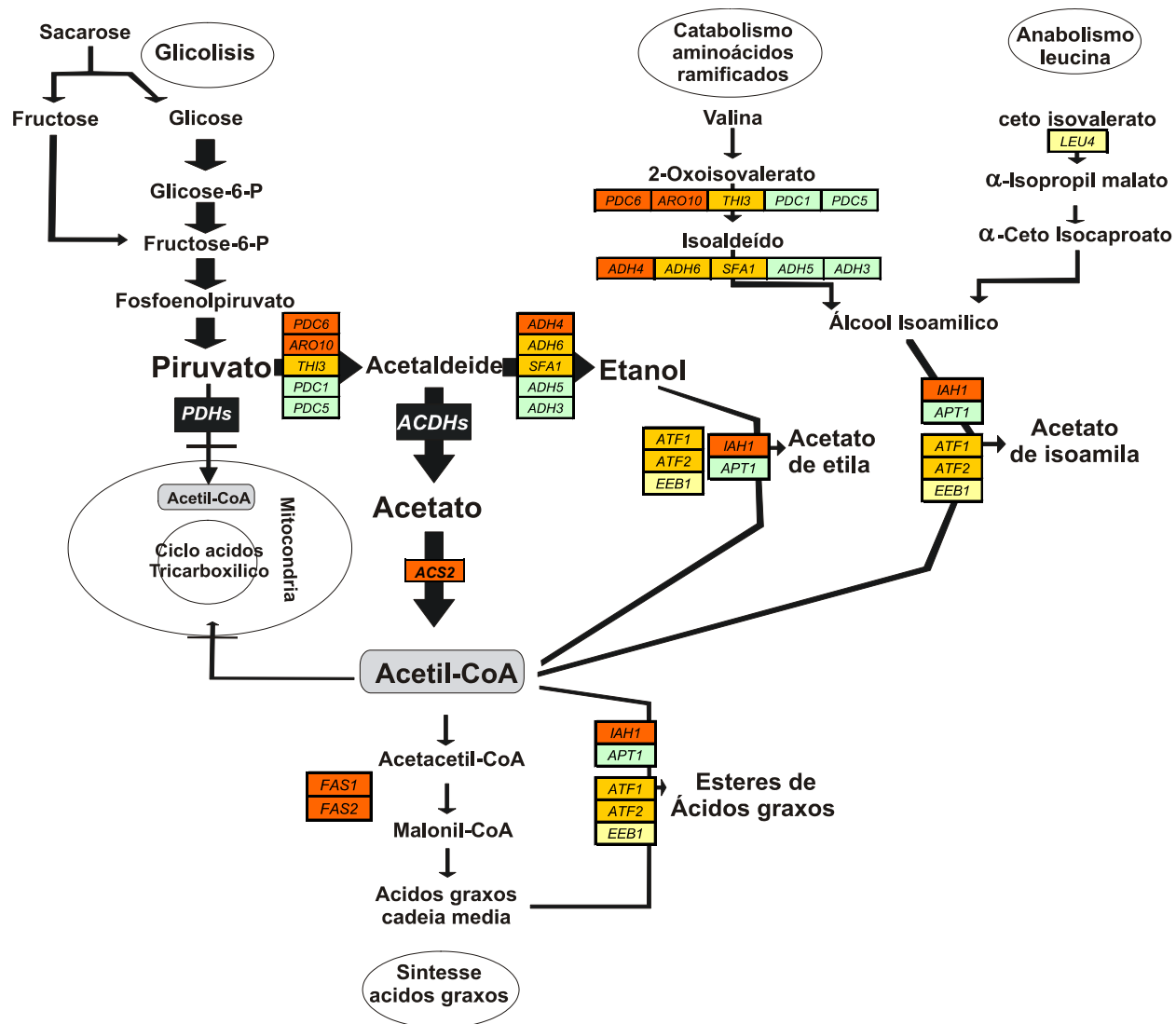


Figura 6. Níveis relativos de RNAm entre o tempo inicial e depois de nove horas de fermentação de células JP-1 crescidas em caldo de cana 12 % (p/v). Resumo das vias metabólicas, genes analisados e níveis de RNAm. Os genes induzidos (tonalidades amarelo, laranja e vermelho) o reprimidos (tonalidades de verde). O tamanho das flechas indicam maior fluxo metabólico. Flecha atravessada por linha, via enzimática não ativa na condição ensaiadas. Para o catabolismo de aminoácidos ramificados se exemplifico com valina, já que o resto dos aminoácidos ramificados utilizam a mesma rota.

PDHs, piruvato desidrogenase.

ACDHs, acetaldeído desidrogenase.

não podemos descartar a atividade de *IAH1*. Sugerimos, então, que os altos níveis de *IAH1* presentes seriam necessários para manter os níveis de acetil-CoA consumidos na reação de esterificação em todas as condições ensaiadas.

As diferenças observadas entre os níveis de transcrição gênica neste estudo e em outros estudos na literatura podem ser explicados por vários fatores. O grande tamanho de inóculo empregado, a natureza industrial da linhagem, a ausência de agitação, as concentrações de nitrogênio testadas, junto com o elevado conteúdo de fontes de carbono fazem que as condições sejam distantes das utilizadas em estudos empregando-se condições de laboratório.

CONCLUSÃO.

Usando como base os resultados obtido neste trabalho que simulam as condições industriais com caldo de cana contendo sacarose 12% (p/v) podemos sugerir que devido a grande quantidade de sacarose no meio existiria um grande fluxo metabólico para a produção de piruvato seria convertido a acetaldeído por atividade principal das enzimas *ARO10*, *PDC6*, e secundariamente *THI3*, para em seguida transformar-se em etanol por atividade da enzima *ADH4*, e em segundo plano por atividade das enzimas *ADH6* e *SFA1*. Este mesmo padrão estaria presente na formação de alcoóis superiores, devido a similaridade na via metabólica.

Neste sentido, o acetaldeído também pode ser transformado em acetato por atividade das acetaldeído desidrogenases, e este por atividade da Acs2p transformar-se em acetil-CoA. O acetil-CoA formado seria empregado como precursor na formação de ácidos graxos por atividade das enzimas codificadas pelos genes *FAS1* e *FAS2*, assim como na formação de acil ésteres e acetil ésteres por atividades das enzimas codificadas pelos genes *ATF1*, *ATF2* e *EEB1*, sem descartar a atividade da enzima *IAH1* na degradação o síntese de ésteres. Ao mesmo tempo, existiria também a produção de alcoóis superiores, neste caso álcool isoamílico, pela atividade da enzima Leu4p (Figura 6). Esta situação mudaria com o suplemento de altas concentrações de nitrogênio (1000 mg N/L) independentemente da fonte de nitrogênio empregada, produzindo uma queda geral significativa nos níveis de RNAm para a maioria dos genes estudados, com exceção de *ARO10* e *ADH4* na via anabólica de etanol e alcoóis superiores e *EEB1* na via de síntese de ésteres.

Neste sentido, a maior expressão de *ARO10* e *ADH4* poderia explicar o aumento na produção de etanol nestas condições, em especial na condição com suplemento de amônia 1000

mg N/L, assim como a produção de álcool isoamílico na condição com suplemento de aminoácidos ramificados. Pode presumir-se que o nível de síntese de proteínas nestas condições com alta concentração de nitrogênio esta no máximo nível possível, e por consequência a taxa de produção de etanol. Estas observações confirmam a grande influência que apresenta o nitrogênio no metabolismo de alcoóis superiores e ésteres nas linhagens indústrias, e ratificam a relevância de estudar mais a fundo as necessidades de nitrogênio para um melhor controle do processo fermentativo.

REFERÊNCIAS

- Alves TA. (2004). Perspectivas do Setor Sucro-alcóoleiro na Região da Alta Noroeste Paulista :Caracterização da cana. Universidade Estadual Paulista-Programa Especial de Treinamento da Engenharia Mecânica (PET/EM).
- Anderson RG, and Kirsop BH. (1975). Oxygen as a regulator of ester accumulation during the fermentation of worts of high specific gravity. J. Inst. Brew. 81:111-115.
- Backhus LE, DeRisi JPO and Bisson LF.(2001) Functional genomic analysis of a commercial wines train of *Saccharomyces cerevisiae* under differing nitrogen conditions. FEMS Yeast Research 1:111–125.
- Bely M, JM Sablayrolles JM, and Barre P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. J. Ferment. Bioeng. 70:246–252.
- Bisson LF. (1991). Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes, In J. Rantz (ed.). Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines. American Society for Enology and Viticulture, Seattle, Wash. 172–184.
- Boulton C and Quain D. (2001). Brewing yeast and fermentation. Blackwell Science Ltd. Malden, USA.
- Calderbank J and Hammond JRM. (1994). Influence of higher alcohol availability on ester formation by yeast. J. Am. Soc. Brew. Chem. 52:84-90.
- Cavaliere D, Townsend JP and Hartl DL. (2000). Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:12369-12374.
- Chirala SS, Kuziora MA, Spector DM, Wakil SJ. (1987). Complementation of mutations and nucleotide sequence of FAS1 gene encoding beta subunit of yeast fatty acid synthase. *J Biol Chem.* 262(9):4231–4240
- Dawes I, Day R, Duan D, Roddick F, Stanley G, Chambers P, Chandler, Higgins V, Lentini A and Rogers P. (2002). Brewing yeast ,gene expression and beer quality. In American Society of Brewing Chemists Abstracts, 2002 meeting 14p.<http://www.asbcnetorg/meetings/2002/abstracts/p-14.htm>.
- Derrick S and Large PJ. (1993). Activities of the enzymes of the Ehrlich pathways and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* And *Candida utilis* grown continues culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. *J Gen Microbiol* 139: 2783-2792.
- Dickinson, JR and Dawes IW. (1992). The catabolism of branched-chain amino acids occurs via 2-oxoacid dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 138:2029-2033.
- Flikweert MT, Van Der Zanden L, Janssen WM, Steensma HY, Van Dijken JP, Pronk JT (1996). Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast* 12(3):247-57
- Fujiwara D, Kobayashi O, Yoshimoto H, Harashima S and Tamai Y. (1999). Molecular mechanism of the multiple regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ATF1 gene encoding alcohol acetyltransferase *Yeast.* 15(12):1183-1197.
- Fukuda K, Yamamoto N, Kiyokawa Y, Yanagiuchi T, Wakai Y, Kitamoto K, Inoue Y and Kimura A (1998). Balance of Activities of Alcohol Acetyltransferase and Esterase in *Saccharomyces cerevisiae* Is Important for Production of Isoamyl Acetate. *Appl Environ Microbiol.* 64(10): 4076–4078.
- Galitski T, Saldanha A J, Styles C A, Lander E S and Fink G R. (1999). Ploidy regulation of gene expression; *Science* 285;:251–254.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H and Oliver SG. (199D). Life with D000 Genes. *Science.* 25:1996-546

- Hammond, JRM. (1993). Brewer's yeast . In H. A. Rose and J. S. Harrison (ed.), The yeasts, vol. 5. Academic Press, London, United Kingdom. 7-67.
- Higgins JV, Oliver AD, Day RE, Dawes IW and Rogers PJ. (2001). Application of genome-wide transcriptional analysis to identify genetic markers useful in industrial fermentations. In European Brewery Convention Congress ,Budapest ,Hungary, 2001. Nurnberg, Germany: EBC Publications, Fachverlag Hans Carl.
- Hohman S and Cederg H. (1991). Autoregulation may control the expresion of yeast pyruvate decarboxylase structural genes *PDC1* and *PDC5*. *Eur J Biochem*. 188:615-621.
- Infante JJ, Dombek KM, Rebordinos L, Cantoral JM, and Young ET. (2003). Genome-Wide Amplifications Caused by Chromosomal Rearrangements Play a Major Role in the Adaptive Evolution of Natural Yeast. *Genetics*. 165:1745-1759.
- James TC, Campbell S, Donnelly D and Bond U. (2002). Transcription profile of brewery yeast under fermentation conditions. *Journal of Applied Microbiology*. 94:432-448.
- Johnston J.R. and Oberman H. (1979). Yeast genetics in industry. *Progress in Industrial Microbiology*. 15:151-191.
- Köning S (1998). Subunit structure, function and organization of pyruvate descaboxilase from various organisms. *Biochimia et Biophysica Acta*. 1385: 271-286.
- Kuziora MA, Chalmers JH Jr, Douglas MG, Hitzeman RA, Mattick JS, Wakil SJ. (1983) Molecular cloning of fatty acid synthetase genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 258(19):11648–11653.
- Lambrechts MG and Pretorius IS. (2000). Yeast and its importance to wine aroma: a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic*. 21:97-129.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-Ct method. *Methods*. 25:402–408.
- Lucena BTL, Silva-Filho EA, Coimbra MRM, Morais JOF, Simões DA and Morais MA Jr. (2007). Chromosome instability in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* batch cultivated under laboratory conditions. *Genetics and Molecular Research*. 6(4): 1072-1084.
- Meilgaard MC. (2001). Effects on flavors of innovations in brewery equipment and processing: a review. *J. Inst. Brew*. 107:271-286.
- Mendes Ferreira A, Mendes-Faia and Leão C. (2004). Growth and fermentation patterns of

- Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *Journal of Applied Microbiology*. 97:540-545.
- Novotny C, Beran K, Běhalová B, Dolezalová L, Zajíček J. (1987). Effect of ammonium ions on delta 5,7-sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol (Praha)*. 32(3):206-10.
- Pena A, Pardo JP, and Ramirez J. (1987). Early metabolic effects and mechanism of ammonium transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 253:431-438.
- Petrik M, Käppeli O, Fiechter A. (1983). An expanded concept for glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum*: involvement of short and long-term regulation. *J Gen Microbiol*. 129:43–49.
- Roy DJ, Dawes IW. (1987). Cloning and characterization of the gene encoding lipoamide dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*. 133 (4):925–933.
- Schermers, F.H., Duffus, J.H., McLeod, A.M. (1976). "Studies on yeast esterase" *Journal of the Institute of Brewing* 82: 170-184.
- Schmitt, ME, Brown T and Trumpower B. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl Acids Res* 18:3091-3092.
- Silva-Filho EA, Santos SKB, Resende AM, Morais JOF, Morais MA and Simões DA. (2005). Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*. 88:13–23.
- Swiegers JH and Pretorius IS. (2006). Volatile sulfur compounds produced by fermented food and beverage related microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74:954-960
- Thurston PA, Taylor R and Avhenainen J. (1981) Effects of linoleic acid supplements on the synthesis by yeast of lipids and acetate esters. *J. Inst. Brew.* 87, :92-95.
- van den Berg MA, Steensma HY. (1995). ACS2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding acetyl-coenzyme A synthetase, essential for growth on glucose. *Eur J Biochem*. 231:704–713.
- van Urk H, Mak P R, Scheffers W A, van Dijken J P. (1988). Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621 upon transition from glucose limitation to glucose excess. *Yeast*. 4:283–291.
- Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Dufour J-P, Winderickx J, Thevelein JM, Pretorius IS, and

5. ANEXOS

5.1. Resumo resultados Teste ANOVA para consumo de sacarose.

Análise de comparação de medias da taxa de consumo de sacarose nas diferentes condições ensaiadas para o nível de significância de 5%.

SQ = Soma dos quadrados; gl = graus de liberdade; MQ= média dos quadrados. F= valor de Fisher.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F crítico</i>
Tratamentos	0.15	3.00	0.05	0.46	3.24
Resíduos	0.86	16.00	0.11		
Total	1.01	19			

O f crítico e maior que o F calculado, então se aceita a H0 que não existe diferenças entre as meias.

5.2. Resumo resultados Teste ANOVA para comparação de medias dos valores de RNAm relativos obtidos entre a condição caldo de cana 14 % (p/v) e o tempo inicial de fermentação para o nível de significância de 5%.

A diferenças mínimas significante, ao nível de $\alpha = 5\%$, com 4 tratamentos, três repetições e 8 graus de liberdade do resíduo.

SQ = Soma dos quadrados; gl = graus de liberdade; MQ= média dos quadrados. F= valor de Fisher.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	413.70	1.00	137.90	258.74	4.00	1.18
Resíduos	30.91	58.00	0.53			
Total	444.61	59.00				

O f crítico e menor que o F calculado, então se aceita a H_0 , que não existe diferenças entre as meias.

5.3. Teste de Tuckey para determinação da diferenças de medias dos valores de RNAm relativos obtidos entre a condição caldo de cana 14 % (p/v) e o tempo inicial de fermentação para o nível de significância de 5%.

Comparação dos valores com a d.m.s., diferenças entre as meia tomadas de a pares.

A diferenças mínimas significante, ao nível de $\alpha = 5\%$, com 4 tratamentos, três repetições e 8 graus de liberdade do resíduo.

Valores em vermelhos apresentam diferenças significativas.

		ADK1
	MEIAS	0.00
ADK1	0.00	0.00
ACS2	2.67	2.67
ADH3	-0.32	-0.32
ADH4	7.27	7.27
ADH5	-0.77	-0.77
ADH6	1.98	1.98
ARO10	9.14	9.14
ATF1	1.15	1.15
ATF2	1.33	1.33
EEB1	0.40	0.40
FAS1	3.63	3.63
FAS2	2.44	2.44
IAH1	3.48	3.48
LEU4	0.70	0.70
PDC1	-0.87	-0.87
PDC5	-0.74	-0.74
PDC6	5.11	5.11
SFA1	1.71	1.71
THI3	1.35	1.35
APT1	-0.28	-0.28

5.4. Resumo resultados Teste ANOVA.

Análise de comparação das medias dos níveis de RNAm nas diferentes condições em relação na condição SC, para o nível de significância de 5%.

SQ = Soma dos quadrados; gl = graus de liberdade; MQ= média dos quadrados. D.m.s: diferenças medias significativas, Calculada pelo teste de Tukey.

ADK1						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	0.00	3.00	0.00	0.00	4.07	0.07
Resíduos	0.01	8.00	0.00			
Total	0.01	11.00				

ACS2						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	0.22	3.00	0.07	351.02	4.07	0.04
Resíduos	0.00	8.00	0.00			
Total	0.22	11.00				

ADH3						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	0.45	3.00	0.15	666.50	4.07	0.04
Resíduos	0.00	8.00	0.00			
Total	0.45	11.00				

ADH4						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	2.89	3.00	0.96	9.07	4.07	0.85
Resíduos	0.85	8.00	0.11			
Total	3.74	11.00				

ADH5						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	0.14	3.00	0.05	193.83	4.07	0.04
Resíduos	0.00	8.00	0.00			
Total	0.15	11.00				

ADH6						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	0.04	3.00	0.01	5.25	4.07	0.13
Resíduos	0.02	8.00	0.00			
Total	0.06	11.00				

ATF1						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	0.49	3.00	0.16	13.43	4.07	0.29
Resíduos	0.10	8.00	0.01			
Total	0.58	11.00				

ATF2						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	0.31	3.00	0.10	119.21	4.07	0.08
Resíduos	0.01	8.00	0.00			
Total	0.31	11.00				

EEB1						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	9.42	3.00	3.14	1703.60	4.07	0.11
Resíduos	0.01	8.00	0.00			
Total	9.43	11.00				

FAS1						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	1.33	3.00	0.44	4859.30	4.07	0.02
Resíduos	0.00	8.00	0.00			
Total	1.33	11.00				

FAS2						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	0.84	3.00	0.28	4591.43	4.07	0.02
Resíduos	0.00	8.00	0.00			
Total	0.84	11.00				

IAH1						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	2.10	3.00	0.70	494.07	4.07	0.10
Resíduos	0.01	8.00	0.00			
Total	2.11	11.00				

Continuação Tabela.

ARO10

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	80.55	3.00	26.85	945.62	4.07	0.44
Resíduos	0.23	8.00	0.03			
Total	80.78	11.00				

LEU4

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	1.44	3.00	0.48	3906.08	4.07	0.03
Resíduos	0.00	8.00	0.00			
Total	1.45	11.00				

PDC1

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	0.27	3.00	0.09	655.12	4.07	0.03
Resíduos	0.00	8.00	0.00			
Total	0.28	11.00				

SFA1

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	0.04	3.00	0.01	36.19	4.07	0.05
Resíduos	0.00	8.00	0.00			
Total	0.05	11.00				

PDC5

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	1.68	3.00	0.56	36.34	4.07	0.32
Resíduos	0.12	8.00	0.02			
Total	1.80	11.00				

THI3

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	0.32	3.00	0.11	820.18	4.07	0.03
Resíduos	0.00	8.00	0.00			
Total	0.32	11.00				

PDC6

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	0.68	3.00	0.23	1537.66	4.07	0.03
Resíduos	0.00	8.00	0.00			
Total	0.68	11.00				

APT1

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico	d.m.s
Tratamentos	0.17	3.00	0.06	125.70	4.07	0.06
Resíduos	0.00	8.00	0.00			
Total	0.18	11.00				

5.5. Teste de Tuckey para determinação da diferenças de medias dos valores de RNAm relativos obtidos nas distintas condições ensaiadas.

Comparação dos valores com a d.m.s., diferenças entre as media tomadas de a pares.

A diferenças mínimas significante, ao nível de $\alpha= 5\%$, com 4 tratamentos, três repetições e 8 graus de liberdade do resíduo.

	ADK1	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	1.00	1.00	1.00
SC	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SC/AS90	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SC/AS1000	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SC/ILV1000	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00

	ARO10	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	0.66	4.58	6.90
SC	1.00	0.00	0.34	-3.58	-5.90
SC/AS90	0.66	-0.34	0.00	-3.93	-6.24
SC/AS1000	4.58	3.58	3.93	0.00	-2.31
SC/ILV1000	6.90	5.90	6.24	2.31	0.00

	ACS2	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	0.89	0.85	0.63
SC	1.00	0.00	0.11	0.15	0.37
SC/AS90	0.89	-0.11	0.00	0.04	0.26
SC/AS1000	0.85	-0.15	-0.04	0.00	0.22
SC/ILV1000	0.63	-0.37	-0.26	-0.22	0.00

	ATF1	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	0.71	0.56	0.47
SC	1.00	0.00	0.29	0.44	0.53
SC/AS90	0.71	-0.29	0.00	0.15	0.24
SC/AS1000	0.56	-0.44	-0.15	0.00	0.09
SC/ILV1000	0.47	-0.53	-0.24	-0.09	0.00

	ADH3	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	0.76	0.58	0.50
SC	1.00	0.00	0.24	0.42	0.50
SC/AS90	0.76	-0.24	0.00	0.18	0.26
SC/AS1000	0.58	-0.42	-0.18	0.00	0.08
SC/ILV1000	0.50	-0.50	-0.26	-0.08	0.00

	ATF2	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	1.01	0.70	0.66
SC	1.00	0.00	-0.01	0.30	0.34
SC/AS90	1.01	0.01	0.00	0.30	0.34
SC/AS1000	0.70	-0.30	-0.30	0.00	0.04
SC/ILV1000	0.66	-0.34	-0.34	-0.04	0.00

	ADH4	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.08	0.42	1.05	1.81
SC	1.08	0.00	0.66	0.03	-0.72
SC/AS90	0.42	-0.66	0.00	-0.63	-1.39
SC/AS1000	1.05	-0.03	0.63	0.00	-0.75
SC/ILV1000	1.81	0.72	1.39	0.75	0.00

	EEB1	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	0.76	3.00	1.20
SC	1.00	0.00	0.24	-2.00	-0.20
SC/AS90	0.76	-0.24	0.00	-2.24	-0.44
SC/AS1000	3.00	2.00	2.24	0.00	1.80
SC/ILV1000	1.20	0.20	0.44	-1.80	0.00

Continuação Tabela.

	ADH5	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	0.82	0.78	0.70
SC	1.00	0.00	0.18	0.22	0.30
SC/AS90	0.82	-0.18	0.00	0.05	0.12
SC/AS1000	0.78	-0.22	-0.05	0.00	0.08
SC/ILV1000	0.70	-0.30	-0.12	-0.08	0.00

	FAS1	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	0.91	0.30	0.28
SC	1.00	0.00	0.09	0.70	0.72
SC/AS90	0.91	-0.09	0.00	0.61	0.62
SC/AS1000	0.30	-0.70	-0.61	0.00	0.01
SC/ILV1000	0.28	-0.72	-0.62	-0.01	0.00

	ADH6	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	0.91	1.00	0.87
SC	1.00	0.00	0.09	0.00	0.13
SC/AS90	0.91	-0.09	0.00	-0.09	0.04
SC/AS1000	1.00	0.00	0.09	0.00	0.13
SC/ILV1000	0.87	-0.13	-0.04	-0.13	0.00

	FAS2	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	0.73	0.38	0.36
SC	1.00	0.00	0.27	0.62	0.64
SC/AS90	0.73	-0.27	0.00	0.34	0.37
SC/AS1000	0.38	-0.62	-0.34	0.00	0.03
SC/ILV1000	0.36	-0.64	-0.37	-0.03	0.00

	IAH1	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	1.32	1.73	2.11
SC	1.00	0.00	-0.32	-0.73	-1.11
SC/AS90	1.32	0.32	0.00	-0.41	-0.79
SC/AS1000	1.73	0.73	0.41	0.00	-0.38
SC/ILV1000	2.11	1.11	0.79	0.38	0.00

	PDC6	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	0.48	0.40	0.48
SC	1.00	0.00	0.52	0.60	0.52
SC/AS90	0.48	-0.52	0.00	0.08	0.00
SC/AS1000	0.40	-0.60	-0.08	0.00	-0.08
SC/ILV1000	0.48	-0.52	0.00	0.08	0.00

	LEU4	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	1.08	0.40	0.31
SC	1.00	0.00	-0.08	0.60	0.69
SC/AS90	1.08	0.08	0.00	0.69	0.77
SC/AS1000	0.40	-0.60	-0.69	0.00	0.08
SC/ILV1000	0.31	-0.69	-0.77	-0.08	0.00

	SFA1	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	0.85	0.98	0.93
SC	1.00	0.00	0.15	0.02	0.07
SC/AS90	0.85	-0.15	0.00	-0.13	-0.08
SC/AS1000	0.98	-0.02	0.13	0.00	0.05
SC/ILV1000	0.93	-0.07	0.08	-0.05	0.00

	PDC1	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	0.74	0.76	0.58
SC	1.00	0.00	0.26	0.24	0.42
SC/AS90	0.74	-0.26	0.00	-0.02	0.16
SC/AS1000	0.76	-0.24	0.02	0.00	0.19
SC/ILV1000	0.58	-0.42	-0.16	-0.19	0.00

	THI3	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	0.64	0.59	0.65
SC	1.00	0.00	0.36	0.41	0.35
SC/AS90	0.64	-0.36	0.00	0.04	-0.01
SC/AS1000	0.59	-0.41	-0.04	0.00	-0.05
SC/ILV1000	0.65	-0.35	0.01	0.05	0.00

	PDC5	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.02	1.03	0.34	0.23
SC	1.02	0.00	-0.01	0.68	0.79
SC/AS90	1.03	0.01	0.00	0.70	0.81
SC/AS1000	0.34	-0.68	-0.70	0.00	0.11
SC/ILV1000	0.23	-0.79	-0.81	-0.11	0.00

	APT1	SC	SC/ AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
		1.00	0.71	0.80	0.70
SC	1.00	0.00	0.29	0.20	0.30
SC/AS90	0.71	-0.29	0.00	-0.09	0.01
SC/AS1000	0.80	-0.20	0.09	0.00	0.10
SC/ILV1000	0.70	-0.30	-0.01	-0.10	0.00

5.6. Resumo do Teste de Tukey.

+ diferenças significativas com a condição SC.

	SC/AS90	SC/ AS1000	SC/ ILV1000
ADK1	-	-	-
ACS2	+	+	+
ADH3	+	+	+
ADH4	-	-	+
ADH5	-	-	-
ADH6	-	-	-
ARO10	-	+	+
ATF1	+	+	+
ATF2	-	+	+
EEB1	+	+	+
FAS1	-	+	+
FAS2	+	+	+
IAH1	+	+	+
LEU4	+	+	+
PDC1	+	+	+
PDC5	-	+	+
PDC6	+	+	+
SFA1	+	-	-
THI3	+	+	+
APT1	+	+	+

5.7. Instruções para autores.

Applied Microbiology and Biotechnology.

Editor-in-Chief: Alexander Steinbüchel

International Editors: U. Kues; A.L. Demain; A. Kimura

General Editor: C. Schmidt-Dannert ISSN: 0175-7598 (print version)

ISSN: 1432-0614 (electronic version)

Springer

Preferred length of Original Papers is 6-8 printed pages. The indicated length includes figures, tables and references: one printed page corresponds to approximately 6,500 characters (9,000 characters in the sections "Materials and methods" and "References").

Manuscripts must be written in English and should be typed (12 pt throughout) in double-line spacing and wide margins.

Genus and species names should be in italics.

Use a normal, plain font (e.g., Times New Roman) for text.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

For indents use tab stops or other commands, not the space bar.

Use the equation editor of your word processing program or MathType for equations.

Please arrange your manuscript as follows:

Title page

Including name(s) of author(s), a concise and informative title, affiliation(s) of the author(s), e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author.

Abstract

Each paper must be preceded by an abstract presenting the most important results and conclusions in no more than 200 words.

Footnotes

Essential footnotes to the text should be numbered consecutively and placed at the bottom of the page to which they refer.

Footnotes on the title page are not given reference symbols. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Introduction

The Introduction should state the purpose of the investigation and give a short review of the pertinent literature (max. one printed page).

Materials and methods

The Materials and methods section should follow the Introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work. The microorganisms used in the study and in particular new isolates must be deposited in a publicly accessible culture collection (e.g. DSM, ATCC, NCIMB etc.), and the authors should refer to the collection and the strain number

in the text to ensure that the strains are available to other scientists. If nucleic acid or amino acid sequences are presented, a GenBank/EMBL accession number for primary nucleotide and/or amino acid sequence data should be included in a separate paragraph at the end of the Materials and methods section.

Results

The Results section should describe the outcome of the study. Data should be presented as concisely as possible, if appropriate in the form of tables or figures, although very large tables should be avoided.

Discussion

The Discussion should be an interpretation of the results and their significance with reference to work by other authors.

Acknowledgements

These should be as brief as possible. Any grant that requires acknowledgement should be mentioned. The names of funding organizations should be written in full.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be numbered consecutively. Equations in appendices should be designated differently from those in the main body of the paper, e.g. (A1), (A2) etc. In each appendix equations should be numbered separately.

References

The list of References should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications should only be mentioned in the text. In the text, references should be cited by author and year (e.g. Hammer 1994; Hammer and Sjöqvist 1995; Hammer et al. 1993) and listed in alphabetical order in the reference list. Papers which have been accepted for publication should be included in the list of references with the name of the journal and "in press". If available the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature should be added at the end of the reference in question. The author is responsible for the accuracy of the references. Here are a few examples for the style of references:

*Journal papers: name(s) and initial(s) of all authors; year; full title; journal title abbreviated in accordance with international practice; volume number; first and last page numbers

Example:

Yabe K, Nakajima H (2004) Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 745-755

If available, the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature should be added at the end of the reference in question.

Example:

He Q, Sanford RA (2004) The generation of high biomass from chlororespiring bacteria using a continuous fed-batch bioreactor. DOI 10.1007/s00253-004-1591-9

*Single contributions in a book:

name(s) and initial(s) of all authors; year; title of article; editor(s); title of book; edition; volume

number; publisher; place of publication; page number

Example:

Widdel F, Hansen TA (1992) Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds) *The prokaryotes*, 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 583-624

Tables and figures

Tables must be numbered consecutively with arabic numerals and submitted separately from the text. They should have a title explaining any abbreviation used in that table. Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters. Double documentation of the same points in figures and tables is not acceptable.

Illustrations must be restricted to the minimum needed to clarify the text. All figures (photographs, graphs or diagrams) should be cited in the text, and numbered consecutively throughout. Figure parts should be identified by lower-case roman letters (a, b, etc.). If illustrations are supplied with uppercase labeling, lower-case letters will still be used in the figure legends and citations.

Figure legends must be brief, self-sufficient explanations of the illustrations. The legends should be placed at the end of the text.

Submit all figures as separate files and do not integrate them within the text. The preferred figure formats are EPS for vector graphics exported from a drawing program and TIFF for halftone illustrations. EPS files must always contain a preview in TIFF of the figure. The file name should include the figure number.

Color illustrations

Color figures will always be published in color in the online version. In print, however, they will only appear in color if the author agrees to make a contribution of Euro 950/US \$ 1,150 (plus 19% VAT) per article. Otherwise the figures will be printed in black and white. Save color illustrations as RGB (8 bits per channel) in TIFF format.

Plates

Several figures or figure parts should be grouped in a plate on one page.

Size of figures

The figures, including legends, should either match the column width (86 mm) or the print area of 176 x 236 mm. The publisher reserves the right to reduce or enlarge illustrations.

Electronic Supplementary Material Electronic Supplementary Material (ESM) for a paper will be published in the electronic edition of this journal provided the material is: