

**Expressão heteróloga, em *Saccharomyces cerevisiae*, de genes de *Zygosaccharomyces bailii* envolvidos na resistência a conservantes alimentares**

**Maria Madalena Carneiro de Almeida**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar**

Orientador: Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista  
Coorientador: Doutora Maria José Leandro

**Júri:**

Presidente: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro Brito, Professora Auxiliar com agregação ao Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa  
Vogais: - Doutor José Manuel de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com agregação ao Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa  
- Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Lisboa, 2014

## **Agradecimentos**

Terminada esta última etapa do meu percurso académico, gostaria de expressar o meu agradecimento a todos os que contribuíram para este trabalho.

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à Professora Doutora Maria Conceição Loureiro Dias, por me ter recebido novamente no seu laboratório, e por mais uma vez me dar a conhecer novas áreas dentro da microbiologia, motivando-me e entusiasmando-me a querer sempre saber mais.

Gostaria de expressar o meu agradecimento à Doutora Catarina Prista, por toda a sua disponibilidade, ajuda e orientação no decorrer trabalho acompanhando cada uma das suas etapas e estando sempre disponível para ajudar. Não queria deixar de agradecer toda a paciência e confiança que depositou em mim no decorrer deste trabalho, e que me motivou a querer fazer mais e melhor.

Quero também agradecer à Doutora Maria José Leandro, pela sua orientação e ajuda no decorrer deste percurso, e por me ter ajudado a aprofundar conhecimentos na área Biologia Molecular, sobre a qual tanto aprendi.

Um agradecimento especial a todos os meus colegas de laboratório (Sara Cabral, Tiago Viana, Catia Pinto, Farzana Sabir) por toda a ajuda e por tanto me terem ensinado. Em particular à minha colega Sara Cabral por toda a disponibilidade e por tudo o que me ensinou num tão curto espaço de tempo.

Finalmente agradeço à minha família e ao Bruno, por tudo o que fizeram por mim, e por todo o apoio que me deram, motivando-me e apoiando-me ao longo deste percurso.

## Resumo

### **Expressão heteróloga, em *Saccharomyces cerevisiae*, de genes de *Zygosaccharomyces bailii* envolvidos na resistência a conservantes alimentares**

*Zygosaccharomyces bailii* é uma das principais leveduras de alteração alimentar e um dos maiores problemas para a indústria devido à sua elevada resistência a conservantes alimentares, nomeadamente a ácidos fracos.

O trabalho realizado avaliou um dos mecanismos propostos para a resistência ao ácido benzóico e ácido sórbico, a diminuição da permeabilidade a cátions. Mais concretamente avaliou-se, o papel de oito genes de *Z. bailii* (*OPI3*, *FEN1*, *SUR4*, *ISC1*, *ERG2*, *ERG4*, *ERG6*, *GAS1*) na resistência aos ácidos fracos. Estes genes foram clonados e caracterizados por expressão heteróloga numa estirpe de *S.cerevisiae* sem o respectivo gene. Para caracterização fisiológica das estirpes transformadas, avaliou-se a sua resistência aos ácidos fracos (1-6mM), determinou-se o efluxo e influxo de prótons através da membrana e respectivo valor de  $pH_{in}$ , bem como parâmetros de crescimento (Biomassa e rendimento) em meio mineral e sumo de maçã em células adaptadas e não-adaptadas aos ácidos.

Os resultados mais relevantes foram observados para o gene *ZbGAS1*, cuja expressão em *S.cerevisiae* demonstrou melhorar o seu fenótipo de crescimento na presença de ácidos fracos ao nível de biomassa final produzida, rendimento e actividade da  $H^+$ -ATPase (efluxo), apontando para possíveis alterações da estrutura da parede como um dos mecanismos de resistência aos ácidos testados.

**Palavras-chave:** *Z. bailii*, resistência a ácidos fracos, conservantes alimentares, permeabilidade da membrana, *ZbGAS1*

## Abstract

### Heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of genes from *Zygosaccharomyces bailii* involved on food preservatives resistance

*Zygosaccharomyces bailii* is one of the main spoilage yeasts and one of the biggest problems for Food Industry due to its high resistance to food preservatives, namely weak acids.

In this work, we performed an evaluation of one mechanisms proposed for the increased resistance to benzoic and sorbic acid of *Z. bailii*: the decreased permeability to cations. More specifically, we evaluated the role of eight *Z. bailii* genes (*OPI3*, *FEN1*, *SUR4*, *ISC1*, *ERG2*, *ERG4*, *ERG6*, *GAS1*) on weak acid resistance.

We cloned and characterized each *Z.bailii* genes by heterologous expression in *S. cerevisiae* strains without the respective gene. In order to characterize each transformant strain, we evaluated weak acid resistance (1-6 mM), intracellular pH, proton influx and extrusion through the plasma membrane and growth parameters (final biomass and yield) in YNB and in a commercial apple juice in non-adapted and in adapted cells to the acids.

The most relevant results were obtained for *ZbGAS1* gene, whose expression in *S. cerevisiae* improved growth (final biomass and cell yield) and increased proton pump activity in the presence of weak acid. These results point to possible cell wall composition changes as one of the mechanism possible involved in weak acid resistance.

**Key-words:** *Z. bailii*, resistance to weak acids, food preservatives, membrane permeability, *ZbGas1*

## Extended Abstract

### Heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of genes from *Zygosaccharomyces bailii* involved on food preservatives resistance

The deterioration of food products by yeasts, often generates negative impacts on food and beverages industries, causing significant economic losses. Within the characterized spoilage yeasts, the most problematic belongs to the genus *Zygosaccharomyces spp.*, in particularly *Z. bailii*, due to its specific physiological properties, namely its ability to proliferate in the presence of weak acids ranging from acetic to benzoic and sorbic acids at concentrations usually used in food industry.

The knowledge concerning weak acids resistance mechanisms is a crucial factor to perceive the underlying reasons to the survival of these organisms in the presence of these compounds, so that these preservatives can be applied in a more effectively and controllably way.

In this work, we focused our attention toward one of the mechanisms proposed as the cause for the resistance to benzoic acid and to sorbic acid in yeasts, the decreased permeability to cations was also evaluated.

More specifically we evaluated the role of eight genes of *Z. bailii* (*OPI3*, *FEN1*, *SUR4*, *ISC1*, *ERG2*, *ERG4*, *ERG6*, *GAS1*), which code for proteins involved on the biosynthetic pathway of cellular envelope compounds and may be involved in the resistance to benzoic and sorbic acid.

We cloned each of the eight genes of *Z. bailii* into *S. cerevisiae* without the respective gene by homologous recombination into an expression vector, and we characterized each transformant strain. We evaluated the resistance to benzoic and sorbic acid (1-6 mM). Based on these results we select the *Z. bailii* gene, which expression in *S. cerevisiae* improved its resistance to weak acids, being the remaining work pursued with this gene.

In order to determine the effect of the expression of this gene on the plasmatic membrane permeability, the intracellular pH ( $pH_{in}$ ), the proton influx and proton extrusion through the plasma membrane were estimated. We also evaluated growth parameters of this strain, and through that the final biomass and cell yield were determined.

We obtained transformants for six of the eight genes tested (*OPI3*, *ERG4*, *FEN1*, *SUR4*, *ISC1* and *GAS1*), but not all of them had a positive effect on *S. cerevisiae* weak acid resistance.

The expression of *ZbOPI3*, *ZbERG4* and *ZbISC1* in *S. cerevisiae* led to an equal or worst behavior of this strain in the presence of these compounds. On the other hand, the expression

of *ZbFEN1* and *ZbSUR4* improved the resistance of *S. cerevisiae*, however their single deletion strain presented an even better behavior than the parental strain.

Finally the expression of *ZbGAS1* revealed an positive effect on the resistance of *S. cerevisiae* to weak acids, since the transformant strain grew better in the presence of this compounds than the parental and the deletion strain, being the remaining work persued with this gene.

The results obtained for the growth phenotype of the transformant strain, revealed this strain was less affected by the presence of weak acid, on both levels final biomass and cell yield, when compared with the parental strain. This result indicate a positive role of this gene, on weak acid resistance of *Z. bailii*, since its expression in *S. cerevisiae* led to a better behavior of this specie on weak acid presence.

Moreover, the results obtained for the pH<sub>in</sub> and the flux of protons through the plasma membrane, allowed us to see that the H<sup>+</sup>-ATPase activity was higher in this strain, which indicated a superior investment on cell protection, by the transformant strain.

Summarizing the most important results:

- Expressing *ZbERG4* and *ZbISC1* didn't improved *S. cerevisiae* weak acid resistance
- Expressing *ZbOPI3* Improved *S. cerevisiae* resistance only to sorbic acid
- Expressing *ZbFEN1* and *ZbSUR4* improved *S. cerevisiae* resistance, however their deletion led to an even better behavior of this species
- Expressing of *ZbGAS1* led to a better growth in the presence of weak acids, being the transformant more resistant that the parental and that the deletion strain
- The expression of *ZbGAS1* improved the phenotype growth and led to a higher value of protons extrusion

These results open new gates, for the research on the mechanisms underlying the higher resistance of *Z. bailii* to weak acids.

**Key-words:** *Z. bailii*, resistance to weak acids, food preservatives, membrane permeability, *ZbGas1*

# Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	ii
Abstract .....	iii
Extended Abstract .....	iv
Lista de Abreviaturas.....	viii
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	xii
I. Introdução .....	1
1. Enquadramento.....	1
2. <i>Zygosaccharomyces</i> como um dos principais géneros de alteração de alimentos.....	2
3. Estratégias de conservação dos alimentos.....	3
4. Envelope celular em leveduras .....	8
5. Objetivos do trabalho.....	17
II. Material e Métodos.....	18
1. Microrganismos, plasmídeos e condições de manutenção das estirpes .....	18
2. Sequências dos genes de <i>Z. bailii</i> .....	19
3. Desenho dos <i>primers</i> .....	19
4. Extração e quantificação de DNA .....	21
5. PCR.....	21
6. Transformação.....	22
7. Microscopia .....	23
8. Ensaio de crescimento .....	23
9. Determinação do pH intracelular ( $pH_{in}$ ) .....	26
10. Permeabilidade da membrana – fluxo de prótons.....	28
11. Determinação do pH extracelular .....	29
12. Quantificação da biomassa final .....	29
III. Resultados e Discussão.....	30
1. Seleção e validação dos genes a clonar.....	30
2. Amplificação e clonagem dos genes em estudo: .....	32
3. Avaliação dos níveis de expressão e da localização das proteínas heterólogas .....	35
4. Macro e Micromorfologia das estirpes .....	44
5. Efeito dos ácidos fracos nos parâmetros de crescimento e pH extracelular em meio líquido .....	45

6. Efeito de ZbGas1 na permeabilidade da membrana e pH intracelular em células adaptadas e não adaptadas a ácido sórbico.....	59
IV. Considerações finais e perspectivas futuras .....	65
Bibliografia.....	69
Anexos .....	74
Anexo I.....	74
Anexo II.....	78
Anexo III.....	79
Anexo IV .....	80
Anexo V .....	82
Anexo VI .....	83

## Lista de Abreviaturas

ATCC	<i>America type culture collection</i>
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
$a_w$	Actividade da água
BLAST	<i>Basical local alignment search tool</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid
DO <sub>640nm</sub>	Densidade optica 640 nm
°C	Graus celsius
pb	Pares de bases
p/v	<i>peso por volume</i>
pH <sub>ext</sub>	pH extracelular
pH <sub>in</sub>	pH intracelular
S.	<i>Saccharomyces</i>
Sc .	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
UFC	Unidade formadora de colónia
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
Z.	<i>Zygosaccharomyces</i>

## Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura química do ácido benzóico (pKa 4,19), sórbico (pKa 4,76), propiônico (pKa 4,86) e acético (pKa 4,75).....	5
Figura 2: Interação dos ácidos fracos com a célula microbiana.....	6
Figura 3: Resposta geral de <i>S. cerevisiae</i> ao ácido benzóico.....	7
Figura 4 : Esquema da estrutura da célula de uma levedura.....	9
Figura 5: Esquema da via biossintética dos fosfolípidos.....	11
Figura 6: Esquema do metabolismo dos esfingolípidos em <i>S. cerevisiae</i> .....	12
Figura 7: Esquema dos últimos 5 passos da via biossintética do ergosterol.....	15
Figura 8: <i>Primers</i> utilizados no PCR de colônia e respectivos locais de ligação ao vetor.....	22
Figura 9: Esquema da microplaca.....	24
Figura 10: Esquema do plasmídeo P416TEF-FFZ1-GFP, com todas os locais de corte possíveis, e com cada uma das suas regiões representadas.....	33
Figura 11: Alinhamento entre as regiões seleccionadas para desenhar os primers de <i>Z. bailii</i> CLIB213 com as respectivas regiões de <i>Z. bailii</i> ISA 1307.....	34
Figura 12: Imagens de microscopia de epifluorescência e de microscopia em campo claro de <i>S. cerevisiae</i> de estirpes transformadas com genes de <i>Z. bailii</i> .....	36
Figura 13: <i>Drop-tests</i> para <i>S. cerevisiae</i> BY4741, BY4741 $\Delta erg4$ e BY4741 $\Delta erg4$ a expressar o gene <i>ERG4</i> de <i>Z. bailii</i> ISA 1307.....	38
Figura 14: <i>Drop-tests</i> para <i>S. cerevisiae</i> BY4741, BY4741 $\Delta opi3$ e BY4741 $\Delta opi3$ a expressar o gene <i>OPI3</i> de <i>Z. bailii</i> ISA 1307.....	40
Figura 15: <i>Drop-tests</i> para <i>S. cerevisiae</i> BY4741, BY4741 $\Delta sur4$ e BY4741 $\Delta sur4$ a expressar o gene <i>SUR4</i> de <i>Z. bailii</i> ISA 1307.....	41
Figura 16: <i>Drop-tests</i> para <i>S. cerevisiae</i> BY4741, BY4741 $\Delta fen1$ e BY4741 $\Delta fen1$ a expressar o gene <i>FEN1</i> de <i>Z. bailii</i> ISA 1307.....	41
Figura 17: <i>Drop-tests</i> para <i>S. cerevisiae</i> BY4741, BY4741 $\Delta isc1$ e BY4741 $\Delta isc1$ a expressar o gene <i>ISC1</i> de <i>Z. bailii</i> ISA 1307.....	42
Figura 18: <i>Drop-tests</i> para <i>S. cerevisiae</i> BY4741, BY4741 $\Delta gas1$ e BY4741 $\Delta gas1$ a expressar o gene <i>GAS1</i> de <i>Z. bailii</i> ISA 1307.....	43
Figura 19: Macro e Micromorfologia da estirpe parental, estirpe mutante BY4741 $\Delta gas1$ e transformante BY4741 $\Delta gas1$ + <i>ZbGAS1</i> .....	44
Figura 20: Biomassa final (g/l) produzida pela estirpe <i>S. cerevisiae</i> BY4741 em cada uma das seis condições testadas, e para cada um dos inóculos usado.....	47
Figura 21: Biomassa final (g/l) produzida pela estirpe <i>S. cerevisiae</i> BY4741 $\Delta gas1$ em cada uma das seis condições testadas, e para cada um dos inóculos usado.....	48

Figura 22: Biomassa final (g/l) produzida pela estirpe <i>S. cerevisiae</i> BY4741 P416+ZbGAS1 em cada uma das seis condições testadas, e para cada um dos inóculos usado.....	49
Figura 23: Rendimento em biomassa em função da fonte de carbono e energia (g/g) obtido para a estirpe <i>S. cerevisiae</i> BY4741.....	50
Figura 24: Rendimento em biomassa em função da fonte de carbono e energia (g/g) obtido para a estirpe <i>S. cerevisiae</i> BY4741 $\Delta gas1$ .....	51
Figura 25: Rendimento em biomassa em função da fonte de carbono e energia (g/g) obtido para a estirpe <i>S. cerevisiae</i> BY4741 $\Delta gas1$ P416+ZbGAS1.....	51
Figura 26: Valores de pH extracelular de <i>S. cerevisiae</i> BY4741, para cada inóculo em cada uma das seis condições testadas.....	52
Figura 27: Valores de pH extracelular de <i>S. cerevisiae</i> BY4741 $\Delta gas1$ , para cada inóculo em cada uma das seis condições testadas.....	53
Figura 28: Valores de pH extracelular da BY4741 $\Delta gas1$ P416+ZbGAS1, para cada inóculo em cada uma das seis condições testadas.....	53
Figura 29: Biomassa final da estirpe parental ( BY4741), estirpe mutante ( $\Delta gas1$ ) e respetivo transformante ( $\Delta gas1$ P416+ZbGAS1).....	55
Figura 30: Valores de rendimento (g/g) da estirpe parental ( BY4741), estirpe mutante ( $\Delta gas1$ ) e respetivo transformante ( $\Delta gas1$ P416+ZbGAS1).....	56
Figura 31: Valores de pH extracelular da estirpe parental (BY4741) da estirpe mutante ( $\Delta gas1$ ) e do transformante ( $\Delta gas1$ P416+ZbGAS1).....	59
Figura 32: Valores de pH intra e extracelular para a estirpe parental (BY4741), estirpe mutante ( $\Delta gas1$ ) e respetivo transformante ( $\Delta gas1$ P416+ZbGAS1) quando em sumo normal, e com adição de 1 mM de ácido benzóico e sórbico.....	61
Figura 33: Velocidade de entrada (Influxo-inf) e de saída (efluxo-ef) de prótons na célula, para a estirpe parental (BY4741), estirpe mutante ( $\Delta gas1$ ) e respetivo transformante ( $\Delta gas1$ P416+ZbGAS1) cultivadas em sumo normal, e adaptadas a 1 mM de ácido benzóico e sórbico.....	62
Figura 34: Alinhamento entre o produto de PCR de amplificação do gene <i>ZbGAS1</i> com a respectiva sequência do gene de <i>Z. bailii</i> ISA 1307.....	79
Figura 35: Alinhamento entre o produto PCR de colónia da estirpe transformante BY4741 P416+ <i>ZbGAS1</i> com 800 pb do gene <i>GAS1</i> de <i>Z. bailii</i> ISA 1307 a partir do codão de iniciação ATG. Região de recombinação entre o vector e o primer forward assinalado a vermelho.....	82
Figura 36: Alinhamento entre o produto PCR de colónia da estirpe transformante BY4741 P416+ <i>ZbGAS1</i> com 800 pb do gene <i>GAS1</i> de <i>Z. bailii</i> ISA 1307 a partir do codão stop TGA. Região de recombinação entre o vector e o primer reverse assinalado a vermelho.....	82
Figura 37: Drop-tests para <i>S. cerevisiae</i> BY4741, BY4741 $\Delta opi3$ e BY4741 $\Delta opi3$ a expressar o gene <i>OPI3</i> de <i>Z. bailii</i> ISA 1307.....	83
Figura 38: Drop-tests para <i>S. cerevisiae</i> BY4741, BY4741 $\Delta fen1$ e BY4741 $\Delta fen1$ a expressar o gene <i>FEN1</i> de <i>Z. bailii</i> ISA 1307.....	83

Figura 39: *Drop-tests* para *S. cerevisiae* BY4741, BY4741  $\Delta$ *gas1* e BY4741  $\Delta$ *gas1* a expressar o gene *GAS1* de *Z. bailii* ISA 1307.....83

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Classes de lípidos presentes na membrana plasmática .....	10
Tabela 2 - Estirpes mutantes de deleção de BY4741 utilizadas neste estudo. ....	18
Tabela 3 - <i>Primers</i> construídos para cada um dos genes em estudo .....	20
Tabela 4- Condições de PCR para amplificação dos genes de interesse.....	21
Tabela 5 - Programa de PCR utilizado na amplificação dos genes de interesse .....	21
Tabela 6: Programa de PCR utilizado na amplificação de DNA plasmídico.....	22
Tabela 7: Meios de Cultura utilizados para crescimentos em meio líquido .....	24
Tabela 8: Percentagem de identidade e similaridade entre sequências proteicas de <i>S. cerevisiae</i> S288c e <i>Z. bailii</i> CLIB213 .....	31
Tabela 9: Percentagem de identidade e similaridade entre sequências proteicas de <i>S. cerevisiae</i> S288c e <i>Z. bailii</i> ISA 1307 .....	31
Tabela 10- Percentagem de identidade entre sequências proteicas e nucleotídicas correspondentes (entre parêntesis) de <i>Z. bailii</i> CLIB213 e <i>Z. bailii</i> ISA1307.....	32
Tabela 11: Percentagem de redução de biomassa final de cada estirpe do Sumo normal (100%) para os meios de sumo com adição de ácido. ....	55
Tabela 12: Percentagem de redução de rendimento de cada estirpe do Sumo normal (100%) para os meios de sumo com adição de ácido. ....	57
Tabela 13: Percentagem de redução de biomassa final (g/l) para cada estirpe do meio YNB pH 3,5 (100%) para o meio de YNB com adição de ácido sórbico.....	57
Tabela 14: Percentagem de redução de rendimento de cada estirpe do YNB pH 3,5 (100%) para o meio YNB com adição de ácido sórbico. ....	58

# I. Introdução

## 1. Enquadramento

O principal desafio para a indústria é não só garantir a segurança do produto, assegurando a ausência de microrganismos patogénicos, como também garantir a manutenção da sua qualidade durante o período de armazenamento, podendo esta ser posta em causa pelas diversas vias de degradação associadas à matriz alimentar: via química (ação enzimática), via física (presença de corpos estranhos) ou via microbiana (contaminação por microrganismos de alteração) (Brul e Coote, 1999).

A deterioração de origem microbiana reveste-se de uma especial importância, uma vez que se trata do tipo de deterioração mais frequente durante o período de armazenamento, levando a perdas económicas significativas, bem como ao desperdício de um bem tão valioso (Roller, 1999).

As exigências do consumidor moderno, relativamente à qualidade apresentada pelo produto, levam a um uso crescente por parte da indústria de métodos que impeçam o desenvolvimento de microrganismos que possam levar a deterioração do produto durante o seu período de armazenamento. Sendo a redução do pH através da adição de conservantes alimentares como é o caso dos ácidos fracos (exemplo: ácido benzóico, sórbico e acético), uma das principais estratégias utilizadas (Piper *et al.*, 2001).

Paralelamente às exigências de qualidade numa perspectiva de conservação, os consumidores têm vindo igualmente a desenvolver exigências no sentido da redução dos aditivos alimentares, nomeadamente dos conservantes, presentes nos alimentos. Este facto gera problemas à indústria alimentar, que tem de procurar satisfazer duas solicitações do consumidor nem sempre compatíveis entre si.

De forma a satisfazer ambas as exigências acima referidas é pois necessário um conhecimento prévio não só dos fatores intrínsecos e extrínsecos do alimento, como também das principais vias de alteração dos alimentos e mecanismos de resistência, por forma a manipular de forma adequada os fatores necessários a manter a qualidade do alimento com o mínimo de manipulação e concentração de conservantes possíveis.

Uma das espécies mais problemáticas em termos de alteração de alimentos é *Zygosaccharomyces bailii*, uma espécie de levedura caracterizada pela elevada capacidade de resistir a ácidos fracos, resistência a elevada concentração de açúcares e elevada capacidade de fermentar frutose com produção de grandes quantidades de dióxido de carbono e frequentemente causa de deterioração de sumos e concentrados de fruta, doces e

compotas. A capacidade deste tipo de microrganismos crescer na presença de elevadas concentrações de ácidos fracos, dá origem a grandes perdas a nível económico para a indústria alimentar. Desta forma, a compreensão dos mecanismos de resistência relativamente a estes compostos lipofílicos, permitiria melhorar as estratégias utilizadas por parte das indústrias para a conservação dos seus produtos, tornando-as conseqüentemente mais efetivas (Macpherson *et al.*, 2005).

## **2. *Zygosaccharomyces* como um dos principais géneros de alteração de alimentos**

De entre as leveduras caracterizadas até hoje como “leveduras de alteração” de alimentos, *Zygosaccharomyces* é o género com uma história mais longa na deterioração de alimentos e bebidas, sendo um dos maiores desafios para a indústria. Fazem parte deste género várias espécies que são consideradas das mais perigosas entre os microrganismos de alteração, sendo *Z. bailii*, *Z. rouxii*, *Z. bisporus* e *Z. lentus* as espécies que representam maior ameaça para produtos alimentares processados (Sá-Correia *et al.*, 2014).

A capacidade destes microrganismos para deteriorar alimentos considerados estáveis, deve-se ao facto de estes conseguirem não só sobreviver como proliferar em condições que rapidamente eliminariam um grande número de microrganismos associados à contaminação de alimentos.

*Z. bailii* é considerada como sendo uma maior ameaça para alimentos mais ácidos ou com concentrações de açúcar mais elevadas tais como, maionese, *Ketchup*, mostarda, molhos para saladas, pickles, bebidas carbonadas e alguns vinhos. Por outro lado *Z. rouxii*, está mais associada à alteração de alimentos com elevadas concentrações de açúcar ou de sal tais como concentrados de fruta, adoçantes entre outros. Já *Z. lentus* apresenta uma maior ameaça para alimentos refrigerados dada a sua capacidade de se multiplicar a baixa temperatura (Steels *et al.*, 1999), ao passo que *Z. bisporus* apesar de ter um perfil de deterioração entre *Z. bailii* e *Z. rouxii* aparece com muito menos frequência (Sá-Correia *et al.*, 2014).

De entre as propriedades fisiológicas que caracterizam as espécies pertencentes ao género *Zygosaccharomyces*, é de enfatizar três que tornam estas leveduras de alteração mais relevantes para a indústria alimentar: a sua considerável resistência aos ácidos fracos usados frequentemente como conservantes (ex: ácido acético, ácido benzóico, ácido sórbico) em particular *Z. bailii* e *Z. lentus*; elevada resistência à pressão osmótica causada pela presença de elevadas concentrações de açúcares e sal (osmotolerância); e a sua capacidade de fermentar hexoses tendo preferência por frutose, sendo classificadas como frutofílicas (Piper *et al.*, 2001; Sá-Correia *et al.*, 2014).

De todas as espécies do género *Zygosaccharomyces*, *Z. bailii* é considerada inquestionavelmente a mais problemática, o que se deve à conjugação das três características fisiológicas referidas anteriormente: é capaz de proliferar na presença de elevadas concentrações de ácidos fracos usados pela indústria como conservantes alimentares, mesmo na presença de concentrações superiores às permitidas pela legislação alimentar; é resistente a elevadas concentrações de etanol, é capaz de se multiplicar numa ampla escala de valores de pH e  $a_w$  (2 a 7 e 0,8 a 0,99 respetivamente), tem a capacidade de fermentar açúcares como a frutose, sendo ainda de realçar o fato de, mesmo a partir de um inóculo pequeno, conseguirem provocar a deterioração num produto alimentar (Piper *et al.*, 2001; Sá-Correia *et al.*, 2014).

### **3. Estratégias de conservação dos alimentos**

Para evitar que os alimentos se deterioreem por ação microbiana, é fundamental a previsão do tipo de microrganismo que poderá vir a contaminar o produto alimentar, sendo necessário ter em consideração uma grande variedade de fatores, que são classificados como fatores intrínsecos (pH, disponibilidade de água, potencial de oxidação-redução e nutrientes disponíveis) que correspondem às características físico-químicas do alimento, e factores extrínsecos (temperatura, humidade relativa, composição do ar ambiente) que se referem às condições ambientais em que são mantidos os alimentos (Beales, 2004). Estes fatores exercem uma seleção inicial sobre os microrganismos contaminantes, favorecendo determinadas espécies em relação a outras.

É com base na manipulação de cada um dos fatores intrínsecos e extrínsecos que são estruturadas as estratégias de conservação alimentar, em que cada estratégia de conservação visa controlar os fatores que potencializam a deterioração microbiana do alimento específico. Assim, ao desenhar uma estratégia de conservação, procura-se por um lado controlar os factores inerentes ao próprio produto alimentar, como por exemplo através de processos como a desidratação ou adição de humectantes ao produto de forma a controlar a disponibilidade de água presente no mesmo, ou controlando o seu pH através da adição de agentes químicos, mais precisamente antimicrobianos naturais ou sintéticos que reduzem o pH do produto (como é o caso dos ácidos fracos), nunca descurando o controlo rigoroso da composição nutricional do alimento. Por outro lado o controlo do ambiente externo ao produto, também é importante e para tal são utilizadas fundamentalmente duas estratégias: a manipulação da temperatura, tanto a nível de armazenamento (baixas temperaturas) como ao nível de processamento (elevadas temperaturas) e estratégias de embalagem diversificadas (ex: atmosfera controlada, vácuo). (Beales, 2004). Todos estes métodos visam

garantir a qualidade e segurança do produto, preservando simultaneamente as características nutricionais e organolépticas do produto.

As exigências do consumidor moderno, relativamente à qualidade apresentada pelo produto, levam a um uso crescente por parte da indústria de métodos que impeçam o desenvolvimento de microrganismos que possam levar a deterioração do produto durante o seu período de armazenamento. Sendo a adição de conservantes alimentares, como é o caso dos ácidos fracos (exemplo: ácido benzóico, sórbico e acético) uma das principais estratégias utilizadas (Piper *et al.*, 2001).

### 3.1 Ácidos fracos

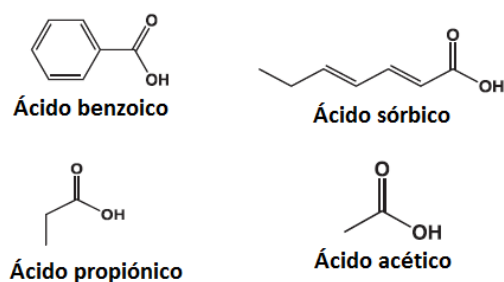
Os ácidos carboxílicos, são compostos que ocorrem de forma espontânea na natureza, estando presentes nas vias metabólicas dos microrganismos. Ao longo do tempo têm vindo a ser exploradas inúmeras aplicações possíveis para estas moléculas, estando entre estas, a sua utilização na conservação de produtos alimentares, mais precisamente como conservantes alimentares (Piper *et al.*, 2001; Mira *et al.*, 2013).

A utilização de ácidos fracos como conservantes alimentares é uma prática comum a nível mundial, a fim de prevenir a contaminação microbiana de alimentos e bebidas com valores de pH mais baixos sendo estes um dos poucos agentes antimicrobianos aprovados para este objetivo. (Lambert e Stratford, 1999). A sua eficácia como conservante alimentar depende do modo como estes compostos são utilizados pela indústria, em particular das quantidades empregues, encontrando-se definidas pela legislação alimentar. No entanto, a pressão por parte dos consumidores tem levado à redução dos limites legais para estes compostos, o que se tem vindo a tornar cada vez mais um desafio para a indústria, ao nível do controlo do desenvolvimento de determinadas leveduras, como *Zygosaccharomyces bailii*, que resistem a elevadas concentrações de ácido (Brul e Coote, 1999, Mollapour *et al.*, 2008).

A aplicação mais comum dos ácidos fracos é em alimentos que se caracterizem por elevadas concentrações de açúcar e por valores de pH mais baixos (ácidos), como é o caso dos sumos de fruta, vinhos e molhos para saladas, cuja integridade é posta com mais frequência em causa devido à presença de leveduras, fungos e bactérias lácticas uma vez que as características inerentes a estes produtos inibem da maioria das bactérias (Beales, 2004; Martorell *et al.*, 2007).

Nos dias de hoje, entre os ácidos fracos mais utilizados encontram-se o ácido acético (E260), benzóico (E210), sórbico (E200) e propiónico (E280), que ocorrem de forma natural em determinados vegetais e frutos, e que se utilizam hoje na indústria a fim de inibir o seu

crescimento e consequentemente prolongar a sua fase de latência (Lambert e Stratford, 1999; Piper *et al.*, 2001).



**Figura 1:** Estrutura química do ácido benzóico (pKa 4,19), sórbico (pKa 4,76), propiónico (pKa 4,86) e acético (pKa 4,75) (adaptado de Mira *et al.*, 2010)

### 3.1.1 Modo de ação dos ácidos fracos

Os ácidos fracos, enquanto conservantes alimentares, apresentam alguns modos de ação semelhantes independentemente da sua estrutura química e modos de ação específicos dependentes da sua estrutura e microrganismo em causa.

De uma forma genérica, estes compostos, atuam inibindo o crescimento dos microrganismos e aumentando a extensão da sua fase de latência (Stratford e Anslow, 1998).

Quando numa solução os ácidos fracos encontram-se num equilíbrio entre a sua forma não dissociada (HA) e a sua forma dissociada ( $A^-$ ) (pKa – valor de pH no qual existe o equilíbrio entre as duas formas do ácido), equilíbrio esse dependente dos valores de pH presentes na solução. Estes conservantes apresentam a sua atividade inibitória ótima para valores de pH reduzidos, uma vez que estes favorecem a presença da sua forma não dissociada do ácido (forma neutra), mais lipofílica, a qual se difunde facilmente através da membrana celular entrando para o interior da célula. Ao encontrarem no interior da célula valores de pH mais elevados ( $\approx 7$ ), a molécula de ácido dissocia-se, resultando na libertação de aniões ( $A^-$ ) e de protões ( $H^+$ ). A permeabilidade da membrana a estas substâncias (iónicas) é muito inferior, tendo como resultado a sua acumulação no interior da célula (Stratford e Anslow, 1998; Piper *et al.*, 1998; Piper *et al.*, 2001; Beales, 2004).

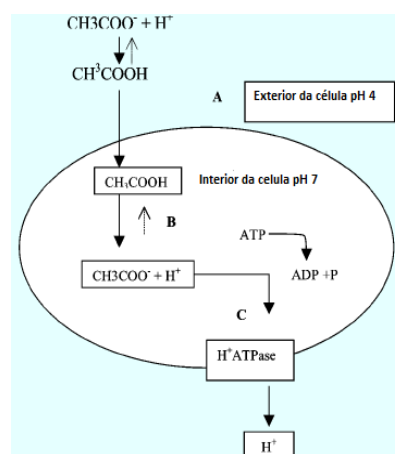
A acumulação de aniões no interior da célula pode levar a uma pressão de turgescência elevada, influenciar a produção de radicais livres (stress oxidativo) e ser ela própria tóxica para a célula. No caso da acumulação de protões, pode dar origem a uma acidificação do citosol, consequentemente a uma redução do pH intracelular (Pampulha e Loureiro-Dias, 1989), facto que pode levar à inibição de diversos processos metabólicos (Pampulha e

Loureiro-Dias, 1990) e à redução do rendimento em ATP (Pampulha e Loureiro-Dias, 2000), sendo estas das principais vias através da qual estes compostos inibem o crescimento microbiano e provocam a morte celular (Brul e Coote, 1999; Piper *et al.*, 2001; Beales *et al.*, 2004).

### 3.1.2. Mecanismos de resistência aos ácidos fracos

De entre todos os géneros de leveduras até hoje caracterizadas, apenas algumas são classificadas como “leveduras de alteração”, entre as quais leveduras com elevada resistência a ácidos fracos como sejam alguns isolados de *Saccharomyces cerevisiae*, que demonstraram a capacidade de crescer a concentrações de ácido superiores a 3 mM apresentando no entanto uma fase de latência bastante mais prolongada, e algumas espécies do género *Zygosaccharomyces*, entre as mais perigosas *Z. bailii* e *Z. lentus* as quais sobrevivem e se multiplicam com concentrações de ácidos fracos superiores às permitidas na legislação alimentar, e a valores de pH inferiores ao seu pKa (Mollapour e Piper, 2001; Piper *et al.*, 2001).

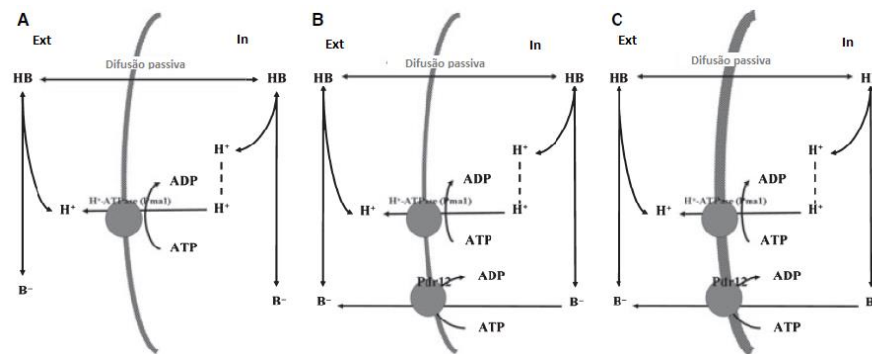
A ação inibitória dos ácidos fracos traduz-se entre outros efeitos na acidificação do citosol, a qual afeta a homeostase protónica da célula, levando a ativação de um transportador de membrana envolvido na manutenção do mesmo, H<sup>+</sup>-ATPase (Pma1), que vai transportar ativamente prótons para o exterior da célula. Apesar de ser um dos principais mecanismos de adaptação das células, a ação deste transportador trata-se de um processo energeticamente muito dispendioso, uma vez que resulta no consumo de aproximadamente 60% do ATP celular, levando a uma redução do rendimento das células (Verduyn *et al.*, 1992).



**Figura 2:** Interação dos ácidos fracos com a célula microbiana. (A) o exterior da célula favorece a forma não dissociada do ácido devido ao valor de pH reduzido; (B) Ao entrar na célula, o interior da célula favorece a forma não dissociada do ácido devido ao valor de pH mais elevado; (C) A bomba protónica remove os prótons em excesso utilizando energia (Adaptado de Beales *et al.*, 2004)

No entanto, verifica-se que o mecanismo de adaptação a estes compostos não é idêntico para todas as leveduras de alteração, como é o caso de *S. cerevisiae* e *Z. bailii*, que mantêm níveis intracelulares de ácidos fracos mais baixos do que o esperado, utilizando para tal estratégias diferentes (Piper *et al.*, 2001).

*S. cerevisiae*, tem como principal mecanismo de resistência a extrusão do ácido para o exterior da célula, processo no qual depende a maior parte da sua energia, através da indução de duas proteínas de membrana, Pdr12 e Hsp30 (“Heat shock protein”) (Ullah *et al.*, 2012; Piper *et al.*, 1997). Pdr12 é um dos 31 transportadores ABC de *S. cerevisiae*, a sua indução é tão forte na presença de ácidos fracos, que nas células adaptadas se torna uma das proteínas de membrana mais abundantes (Piper *et al.*, 1999). No caso de Hsp30, participa na adaptação aos ácidos fracos, atuando na regulação da H<sup>+</sup>-ATPase (Pma1) (Piper *et al.*, 1997).



**Figura 3:** Resposta geral de *S. cerevisiae* ao ácido benzóico. (A) o ácido benzóico na sua forma não dissociada (HB) entra na célula por difusão passiva, o protão resultante da sua dissociação no interior da célula é expulso pela H<sup>+</sup>-ATPase (Pma1) enquanto o seu anião (B<sup>-</sup>) ainda pode provocar alguma toxicidade. (B) Indução do transportador Pdr12, para transportar ativamente para o exterior da célula o anião B<sup>-</sup> (C) Alterações nas características da membrana, de forma a limitar a entrada de ácido por difusão passiva (Adaptado de Kresnowatiet *al.*, 2008)

A extrusão de protões (Pma1) e aniões (Pdr12) para o exterior da célula, seriam em vão se simultaneamente não ocorresse qualquer processo que limitasse a entrada da forma não dissociada do ácido na célula por difusão passiva. Desta forma as células adaptadas devem de alguma forma restringir a entrada de ácido por difusão através da membrana, no entanto ainda não são conhecidos os mecanismos por detrás deste processo (Piper *et al.*, 2001).

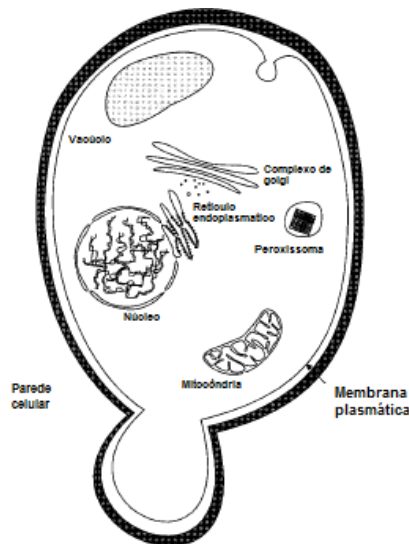
*Z. bailii*, considerada uma das leveduras de alteração mais perigosas devido à sua elevada resistência a ácidos fracos, superior à de *S. cerevisiae*, apresenta mecanismos de resistência diferentes desta. Quando na presença destes compostos, como por exemplo de Sorbato, não se verifica uma indução tão forte do transportador de membrana Pdr12, levando este facto a questionar o porquê então de apresentar uma resistência superior a *S. cerevisiae*.

Uma das possíveis explicações é a sua capacidade de degradar ácidos fracos quando na presença de elevadas concentrações de açúcares. Deste modo *Z. bailii* consegue degradar ácido acético (Sousa *et al.*, 1996, 1998), o ácido sórbico e o ácido benzóico (Mollapour e Piper, 2001) quando na presença de açúcares fermentescíveis, ao passo que a degradação do ácido acético por *S. cerevisiae* é inibida na presença de glucose. Para além disso, *Z. bailii*, consegue degradar por ação de uma enzima (*ZbYME2*) o ácido sórbico e benzóico, o que lhe confere também uma maior resistência a estes compostos. Existindo também a hipótese de que *Z. bailii* tenha desenvolvido um mecanismo muito mais eficaz de alterar a estrutura do envelope da célula, limitando assim a entrada do ácido da célula e justificando desta forma uma resistência muito superior a estes compostos por parte deste microrganismo quando comparado com *S. cerevisiae* (Piper *et al.*, 2001).

Em suma, para justificar a maior resistência de *Z. bailii* a estes compostos, uma vez não sendo conhecido o mecanismo em concreto que encontra por detrás desta maior resistência por parte deste microrganismo, e de acordo com os dados obtidos por diversos autores, foram colocadas algumas hipóteses explicativas, entre elas a possibilidade da membrana plasmática de *Z. bailii* ser menos permeável à forma não dissociada do ácido do que a membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Piper *et al.*, 1999; Arneborg *et al.*, 2000; Piper *et al.*, 2001). Este facto é suportado por resultados obtidos por M.C. Loureiro-Dias que mostram que o coeficiente de difusão dos ácidos fracos através da membrana plasmática é inferior em *Z. bailii* do que em *S. cerevisiae* (Informação pessoal).

#### **4. Envelope celular em leveduras**

As leveduras apresentam dois envelopes celulares, o primeiro a parede celular, responsável pela manutenção da rigidez e estrutura da célula e o segundo a membrana plasmática que assegura não só a separação entre o citosol (meio intracelular) e o exterior da célula bem como manutenção do potencial de membrana essencial para o transporte ativo secundário (Konings *et al.*, 1995; Dickson e Lester, 1999). A estrutura celular de uma levedura encontra-se representada esquematicamente na figura 4.



**Figura 4** : Esquema da estrutura da célula de uma levedura (Adaptado de van der Rest *et al.*, 1995)

Uma outra função da membrana, é permitir a passagem de nutrientes para o meio intracelular e a liberação de produtos resultantes do seu metabolismo para o meio extracelular, o que traduz a sua permeabilidade seletiva. A membrana plasmática funciona como a principal barreira à passagem dos compostos presentes no ambiente que rodeia a célula, de acordo com as propriedades de cada soluto este pode atravessar a membrana por difusão passiva, ou através de proteínas especializadas que medeiam o consumo e a secreção de solutos por parte da célula (van der Rest *et al.*, 1995; Konings, 2006).

A capacidade de um organismo se adaptar às diferentes condições ambientais a que é sujeito, por vezes pouco favoráveis à sua sobrevivência, depende em grande parte das propriedades funcionais da membrana plasmática, bem como da sua composição, uma vez que de acordo com os estímulos exteriores que a célula recebe vão ocorrendo alterações na sua composição lipídica. Como tal para uma melhor compreensão da forma como as células se adaptam aos diferentes stresses a que são sujeitas é necessário um melhor conhecimento do seu lipidoma bem como da flexibilidade da membrana (Lindberg *et al.*, 2013; Konings, 2006; van der Rest *et al.*, 1995).

#### **4.1. Estrutura e composição da membrana plasmática**

A estrutura da membrana plasmática caracteriza-se por uma bicamada lipídica, com uma espessura de aproximadamente 7,5 nm, que é composta por uma mistura de lípidos polares e proteínas, sendo a interação entre estes que coordena a sua estrutura. A organização dos componentes da membrana caracteriza-se por uma disposição assimétrica dos lípidos e proteínas ao longo da bicamada (van der Rest *et al.*, 1995)

Na membrana plasmática de leveduras, um fator importante para compreender a sua complexidade é conhecer a diversidade dos lípidos que a constituem, tanto a nível de dimensão como composição. As principais classes de lípidos presentes na membrana são: Glicerofosfolípidos, esfingolípidos e esteróis, representadas com maior detalhe na tabela 1 (van der Rest *et al.*, 1995; Lindberg *et al.*, 2013).

**Tabela 1:** Classes de lípidos presentes na membrana plasmática (adaptado de Lindberg *et al.*, 2013)

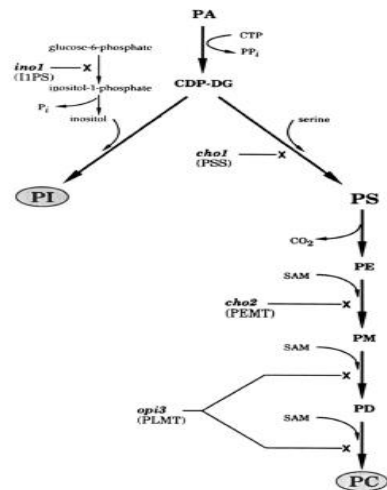
Classe de lípidos	Abreviaturas
<u>Glicerofosfolípidos:</u>	
Fosfatidicolina	PC
Fosfatidiletanolamina	PE
Fosfatidilinositol	PI
Fosfatidilserina	PS
Ácido Fosfatídico	PA
Fosfatidilglicerol	PG
<u>Esfingolípidos:</u>	
Ceramida	CER
Ceramida inositol fosfato	IPC
Ceramida Manosil-inositol fosfato	MIPC
Ceramida Manosil-dinositol fosfato	M(IP) <sub>2</sub> C
<u>Esteróis</u>	
Ergosterol	Erg

A composição lipídica da membrana apresenta uma enorme diversidade de acordo com a existência de diferentes cabeças polares, o comprimento da cadeia de ácidos gordos e o seu grau de saturação. A possível variação de todos esses fatores dá origem à existência de mais de 200 espécies de lípidos diferentes (van der Rest *et al.*, 1995).

#### **4.1.1. Glicerofosfolípidos**

A composição lipídica da membrana dos organismos eucariotas caracteriza-se por uma grande variedade de fosfolípidos, sendo estes constituídos por duas cadeias de ácidos gordos ligadas por ligações éster a uma molécula de Glicerol-3-fosfato e a vários grupos substituintes tais como colina, serina, etanolamina, glicerol que podem estar associados ao grupo fosfato (Wagner e Paltauf, 1994; van der Rest, 1995). Os ácidos gordos que se ligam através de uma ligação éster ao glicerol em levedura são o ácido palmítico (C<sub>16:0</sub>), ácido palmitoleico (C<sub>16:1</sub>), ácido esteárico (C<sub>18:0</sub>) e o ácido oleico (C<sub>18:1</sub>) (Henderson e Block, 2014). Em *Zygosaccharomyces bailii* existe ainda o ácido linoleico (C<sub>18:2</sub>) que não é detetado em *Saccharomyces cerevisiae* (Malfeito-Ferreira, 1996).

As principais classes de glicerofosfolípidos presentes na membrana plasmática de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* são: fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilinositol (PI). Cada uma destas moléculas é sintetizada através de uma série de reações químicas catalisadas por enzimas diferentes, sendo o seu processo de síntese (Figura 5) idêntico em organismos tão diferentes como o homem e a levedura (MacGraw e Henry, 1989; Wagner e Paltauf, 1994).



**Figura 5:** Esquema da via biossintética dos fosfolípidos (Adaptado McGraw e Henry 1989)

De entre os fosfolípidos que constituem a membrana plasmática das leveduras o mais abundante é a fosfatidilcolina (PC), representando entre 40 a 50 % do total de fosfolípidos que constituem a membrana. Como tal, vários mutantes apresentam alterações que afetam direta ou indiretamente a síntese destes compostos, tendo sido usados para demonstrar o papel fulcral deste composto no processo de crescimento da levedura (Kodaki e Yamashita, 1989).

De acordo com a figura 5, uma das proteínas envolvidas diretamente na síntese de PC é a Opi3, uma metiltransferase de fosfolípidos, codificada pelo gene *OPI3*. A deleção de *OPI3* em leveduras como *S. cerevisiae* afeta a regulação da síntese do precursor do PI, o inositol, bem como a uma redução dos níveis dos fosfolípidos PD e PC, e a um aumento excessivo dos níveis de PM o que por sua vez leva à inibição da proteína Ino1, alterando desta forma toda a via de biossíntese destes compostos, provocando alterações no crescimento normal das estirpes e perda de viabilidade das células na fase estacionária (McGraw e Henry, 1989).

A composição da membrana dos mutantes  $\Delta opi3$  de *S. cerevisiae*, pode dar origem a alterações na fluidez na membrana bem como alterações de outras propriedades físicas da mesma. Este facto demonstra o papel essencial dos fosfolípidos na membrana, e como a



Em *S. cerevisiae*, a maioria dos ácidos gordos presentes na célula varia entre os 12 e os 18 carbonos e são parte constituinte dos glicerofosfolípidos. Contudo, os ácidos gordos de cadeia mais longa, isto é compostos por mais de 20 carbonos, que constituem os esfingolípidos são formados por sistemas de alongamento associados à membrana que não se encontram bem caracterizados. No entanto encontram-se até hoje caracterizadas duas das elongases, Fen1 e Sur4, envolvidas no processo de alongamento destes compostos, a ação destas duas proteínas permite o alongamento de ácidos gordos com C<sub>16</sub> ou C<sub>18</sub> a ácidos gordos de cadeia longa entre C<sub>20</sub> a C<sub>26</sub> diminuindo a fluidez da membrana (Oh *et al.*, 1997).

A presença de pelo menos uma destas enzimas em *S. cerevisiae* parece ser fulcral para a célula, uma vez que com a deleção de ambos os genes as células não sobrevivem, o que indica a existência de funções relacionadas e sobrepostas por parte destas enzimas. Por outro lado, a deleção individual de cada um destes genes leva a uma redução do número de ácidos gordos com 26 carbonos, e simultaneamente a um decréscimo da quantidade de ceramida, produzida pela célula, o que dá origem a alterações significativas na composição de esfingolípidos (Oh *et al.*, 1997). A perda de função de cada uma destas proteínas afeta a atividade da β-glucano sintase, a composição da membrana plasmática bem como a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase e a resistência a inibidores da enzima esterol isomerase, o que indica a existência de uma possível relação entre a ação destas enzimas o metabolismo de outra classe lipídica os esteróis (Oh *et al.*, 1997).

De entre os esfingolípidos que constituem a membrana plasmática de *S. cerevisiae*, o grupo de esfingolípidos mais complexos classificados como fosfoesfingolípidos de inositol (IPC, MIPC, M(IP)<sub>2</sub>C), são o maior grupo e desempenham um papel muito importante na célula (Nagiec *et al.*, 1997). A degradação destes compostos é considerada como uma segunda via para a formação de ceramida na célula, como se encontra representado na figura 6.

O papel da ceramida na célula tem vindo a ser considerado cada vez mais relevante, atuando como mensageiro secundário em diversos processos tais como a regulação do crescimento da célula, a morte celular, a senescência e várias respostas ao stress (Choque térmico, irradiação, drogas anti-cancro) (Sawai *et al.*, 2000).

Em levedura, a hidrólise dos esfingolípidos complexos (IPS) é realizada pela enzima do tipo fosfolipase C, designada nestes organismos como Isc1 (IPS-fosfolipase C). A eliminação do gene que codifica esta enzima, deu origem a uma perda total da atividade da IPS – fosfolipase C, em todos os esfingolípidos complexos, o que nos indica que este gene possa ser o único que codifica uma enzima com este tipo de atividade em levedura (Sawai *et al.*, 2000). Para além disso, a deleção deste gene teve na célula diversas respostas diferentes tais como: uma redução da tolerância a elevadas concentrações de sal (NaCl e LiCl), um crescimento mais

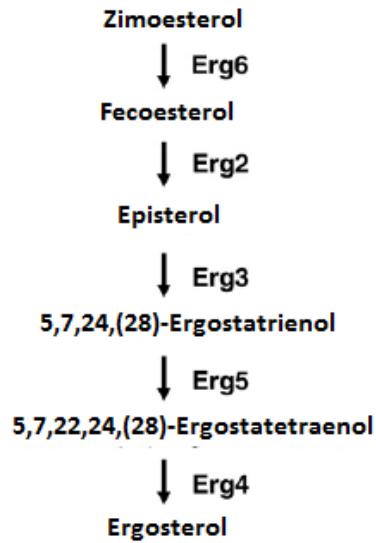
lento das células em condições normais (comparativamente à estirpe parental) e alterações significativas do crescimento das células quando na presença de compostos não fermentáveis, como é caso do glicerol (Sawai *et al.*, 2000; Matmati e Hanunn, 2008; Dickson, 2008). A localização desta proteína varia ao longo da curva de crescimento das células, encontrando-se no retículo endoplasmático durante a fase pré-diauxica e na mitocôndria na fase pós-diauxica, o que pode indicar uma possível influência da mesma na composição lipídica da mitocôndria.

De acordo com a análise de todos os fenótipos resultantes da deleção deste gene, bem como com a análise da sua expressão ao longo das diversas fases de crescimento da célula, deduz-se que sua expressão é fundamental para diversos processos na célula tais como o crescimento, a divisão celular, a proteção iónica da célula, a resposta a diversos stresses, e o envelhecimento das células (Matmati e Hanunn, 2008).

#### **4.1.3 Esteróis**

De entre as diferentes classes lipídicas que constituem a membrana plasmática de cada levedura, os esteróis diferenciam-se entre outros fatores pela sua estrutura química, uma vez que o único grupo polar que o constitui é um grupo hidroxilo e apresenta uma estrutura plana composta por quatro anéis aromáticos, ao contrário das restantes classes lipídicas que apresentam vários grupos polares e longas cadeias carbonadas (Abe e Hiraki, 2009).

O seu processo de síntese caracteriza-se por uma série de reações enzimáticas, tendo como produto final uma molécula constituída por 28 carbonos, designada por ergosterol, estando na Figura 7 representadas as últimas 5 etapas desse mesmo processo.



**Figura 7:** Esquema dos últimos 5 passos da via biossintética do ergosterol (Adaptado de Abe e Hiraki, 2009).

De entre os genes que codificam cada uma das enzimas envolvidas na síntese de ergosterol, apenas alguns destes foram clonados, e determinado o seu carácter essencial para o crescimento aeróbio através da análise de mutantes com os respetivos genes individualmente deletados. Dos genes da via biossintética de ergosterol apenas quatro (*ERG2*, *ERG3*, *ERG4* e *ERG6*) não são essenciais para o crescimento aeróbio das estirpes (Lees *et al.*, 1995).

No entanto, apesar da deleção individual destes genes dar origem a mutantes viáveis, as alterações na constituição e permeabilidade da membrana vão diferir de acordo com o gene deletado. Contudo, em qualquer dos mutantes ( $\Delta erg2$ ,  $\Delta erg3$ ,  $\Delta erg4$ ,  $\Delta erg6$ ) ocorre a alteração da permeabilidade da membrana, aumentando o grau de sensibilidade da célula a determinadas drogas, bem como à exposição a determinadas alterações do ambiente, como é o caso do  $\Delta erg3$  (Shah e Klausner, 1993; Lees *et al.*, 1995).

Enquanto componentes fundamentais das biomembranas, os ergosteróis influenciam muitas das suas funções tais como a manutenção da fluidez da membrana apropriada (Lees *et al.*, 1979), a regulação da sua permeabilidade (Bard *et al.*, 1978), a atividade de enzimas ligadas à membrana e alteram a taxa de crescimento das células (Lees *et al.*, 1978, cit in Lees *et al.*, 1995). Para além da sua influência sobre as diferentes funções das biomembranas da célula, estes compostos influenciam também noutros processos, como é o caso do ciclo celular (Lees *et al.*, 1995).

## 4.2. Estrutura e composição da parede celular

A parede celular das leveduras trata-se de uma estrutura resistente formada por diversas camadas, que confere à célula proteção física e algum apoio no que se refere à resistência das células às diferentes pressões osmóticas a que são sujeitas (Klis *et al.*, 2002).

De uma forma geral, a parede celular das leveduras é essencialmente composta por Glucanos ( $\beta$ -1,3-glucano e  $\beta$ -1,6-glucano), Manoproteínas e Quitina (Papolo e Vai, 1999).

A rigidez da parede e consequente proteção física que confere à célula, está principalmente associada à constituição da sua camada mais interna, sendo esta constituída essencialmente por dois compostos:  $\beta$ -1,3-glucano e quitina (Klis *et al.*, 2002).

Entre os diversos constituintes da parede celular, o  $\beta$ -1,3-glucano trata-se de um dos maiores polissacarídeos presentes na mesma, sendo responsável por conferir força mecânica a esta estrutura. Por outro lado, a sua estrutura química, organizando-se sob a forma de uma hélice oca, confere parte da elasticidade que caracteriza a parede celular nestes organismos, sendo assim responsável pela forma assumida pela célula. Na polimerização destes compostos, estão envolvidas entre outras enzimas a Gas1, uma  $\beta$ -1,3-glucanotransferase que atua na manutenção e formação destes polissacarídeos atuando em particular na extensão e formação das suas ramificações (Klis *et al.*, 2002).

Uma vez formadas estas ramificações, ocorre a sua ligação aos restantes componentes da parede ( $\beta$ -1,6-glucano, Quitina), levando à formação da estrutura em malha que a caracteriza. De acordo com as características que a presença deste polissacarídeo ( $\beta$ -1,3-glucano) confere à parede celular, isto é uma maior rigidez e consequente força mecânica, a deleção do gene que codifica a proteína Gas1 (envolvida na síntese deste composto), leva a uma alteração da estrutura da parede (Klis *et al.*, 2002; Ragni *et al.*, 2007).

Em células com este gene deletado, observa-se uma estrutura anormalmente redonda, ocorre uma perda da viabilidade das células, dá-se uma alteração no processo de divisão celular, bem como um aumento da sensibilidade das células a determinadas drogas (Papolo *et al.*, 1993).

## 5. Objetivos do trabalho

Tendo em conta a elevada importância de *Z. bailii* como levedura de alteração alimentar, a compreensão dos mecanismos de resistência a ácidos fracos é um aspeto essencial para perceber as razões subjacentes à sua sobrevivência de forma que se possam aplicar estes conservantes de uma forma eficaz e simultaneamente o mais controladamente possível.

O presente trabalho centrou-se num dos mecanismos propostos como estando na base da resistência a ácido benzóico e ácido sórbico, a diminuição da permeabilidade a catiões.

Mais concretamente, pretendeu-se avaliar o papel de oito genes de *Z. bailii* (*OPI3*, *FEN1*, *SUR4*, *ISC1*, *ERG2*, *ERG4*, *ERG6*, *GAS1*) cujas enzimas que codificam se encontram envolvidas na síntese de componentes do envelope celular e que poderão hipoteticamente estar envolvidos na resistência a stress provocados por ácido benzóico e ácido sórbico.

Com esse objectivo, pretendeu-se (1) clonar e caracterizar individualmente a nível molecular os oito genes de *Z. bailii* em estirpes de *S. cerevisiae* sem o respetivo gene, (2) caracterizar fisiologicamente as estirpes transformadas avaliando a sua resistência aos ácidos fracos (ácido benzóico e ácido sórbico) e os efeitos da expressão destes genes na permeabilidade da membrana e no fenótipo de crescimento da levedura .

## II. Material e Métodos

### 1. Microrganismos, plasmídeos e condições de manutenção das estirpes

No presente estudo foi utilizada a estirpe *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307, e estirpes mutantes de deleção única de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 adquiridas a partir da coleção Euroscarf, e representadas na tabela 2.

**Tabela 2** - Estirpes mutantes de deleção de BY4741 utilizadas neste estudo.

Estirpe	Genótipo	Referência Euroscarf	Localização da proteína	Função
$\Delta erg2$	BY4741; <i>Mata</i> ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YMR202w::kanMX4	Y00788	Retículo endoplasmático	C-8-esterol-isomerase (via biossintética do ergosterol)
$\Delta erg4$	BY4741; <i>Mata</i> ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YGL012w::kanMX4	Y04380	Retículo endoplasmático; Membrana plasmática	C-(24)28-esterol-redutase (via biossintética do ergosterol)
$\Delta erg6$	BY4741; <i>Mata</i> ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YML008c::kanMX4	Y00568	Retículo endoplasmático; Membrana externa da mitocôndria	$\Delta$ (24)-esterol-C-metiltransferase (via biossintética do ergosterol)
$\Delta opi3$	BY4741; <i>Mata</i> ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YJR073c::kanMX4	Y02551	Componente integral das biomembranas, Mitocôndria	Metileno-fosfolípido-acil-sintetase e fosfolípido metiltransferase
$\Delta isc1$	BY4741; <i>Mata</i> ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YER019w::kanMX4	Y00150	Componente integral das biomembranas; Mitocôndria;	Inositol fosfoesfingolípido fosfolipase C
$\Delta gas1$	BY4741; <i>Mata</i> ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YMR307w::kanMX4	Y00897	Componente integral das biomembrana; Mitocôndria;	$\beta$ -1,3-glucanosiltransferase
$\Delta sur4$	BY4741; <i>Mata</i> ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YLR372w::kanMX4	Y05281	Componente integral das biomembranas; Mitocôndria	Elongase envolvida na biossintese de esfingolípídeos e ácidos gordos
$\Delta fen1$	BY4741; <i>Mata</i> ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YCR034w::kanMX4	Y05763	Componente integral das biomembrana; retículo enplasmático	Elongase de ácidos gordos

As estirpes foram mantidas em meio YPD (1% (p/v) extrato de levedura, 2% (p/v) peptona, 2% (p/v) glucose) tendo sido repicadas periodicamente para meio fresco, incubadas a 28°C, até se observar crescimento significativo e mantidas posteriormente a 4°C.

Os transformantes obtidos ao longo deste trabalho foram mantidos em meio YNB sem aminoácidos suplementado com Leucina (20 g/l), Histidina (5 g/l) e Metionina (4 g/l) de acordo com as suas marcas auxotróficas.

O plasmídeo P416TEF-FFZ1-GFP (derivado do plasmídeo de baixo número de cópias p416 TEF (ATCC nº 87368), contendo o gene *ZrFFZ1* sob o controlo do promotor forte e constitutivo TEF1, com fusão C-terminal à proteína fluorescente GFP; (Maria J. Leandro, resultados não

publicados) foi utilizado para clonagem dos genes de interesse e para sua introdução nas estirpes mutantes de deleção de *S. cerevisiae* referidas na tabela 1.

## **2. Sequências dos genes de *Z. bailii***

Para a obtenção da sequência de cada um dos genes de interesse, foram utilizadas as sequências de cada gene de interesse de *S. cerevisiae* S288C, que foram comparadas com as sequências das bases de dados disponíveis, utilizando a ferramenta bioinformática BLAST (*Basic local alignment search tool*), fornecida pelo servidor NCBI (*National Center of Biotechnology information*).

Uma vez publicado o genoma de *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307 (Mira *et al.*, 2014), comparou-se, utilizando a ferramenta bioinformática BLAST, as sequências previamente selecionadas a partir do genoma da estirpe *Z. bailii* CLIB213 (Galeote *et al.*, 2013.), para confirmação da sequência de cada um dos genes em estudo em ambas as estirpes.

## **3. Desenho dos *primers***

Os *primers* utilizados neste estudo (Tabela 3), foram desenhados de forma a possuírem uma região específica para o gene de interesse, flanqueada por regiões de 40-50pb específicas para o plasmídeo P416TEF-FFZ1-GFP, concretamente, a montante para a parte final do promotor TEF1 e a jusante pelo início da região contendo o gene que codifica para a proteína GFP, de forma a possibilitar a clonagem dos genes de interesse por recombinação homóloga em *frame* com o promotor TEF1 e com fusão C-terminal com GFP.

**Tabela 3 - Primers** construídos para cada um dos genes em estudo

Gene a amplificar	Nome do primer	Sequência (5'-3')	Clonado nas estirpes mutantes de <i>S. cerevisiae</i> BY4741
<i>ZbERG2</i>	Zberg2FW	<u>GAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTTAATTACAAAT</u> <u>CTAGAACTAGATGAGATGTTCTTTGTGTTTGCGATTGTGG</u>	$\Delta erg2$
	Zberg2REV	<u>CACCTTTAGACATTTTAATAAAGCTCCGGAGCTTGCATGCAA</u> <u>ACTTGTGATTCTTTATCAAGTTCTTGAGC</u>	
<i>ZbOPI3</i>	Zbopi3FW	<u>GAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTTAATTACAAAT</u> <u>CTAGAACTAGATGGATTTCAAAGAATCGTTCAGAGGCATTC</u> <u>G</u>	$\Delta opi3$
	Zbopi3REV	<u>CACCTTTAGACATTTTAATAAAGCTCCGGAGCTTGCATGC</u> <u>II</u> <u>CATTTTTTCTACTTCTAGCGTCATCTCTTTCTGC</u>	
<i>ZbGAS1</i>	Zbgas1FW	<u>GAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTTAATTACAAAT</u> <u>CTAGAACTAG ATGTTATTCCAGGCGTTTTTCGACCCTCG</u>	$\Delta gas1$
	Zbgas1REV	<u>CACCTTTAGACATTTTAATAAAGCTCCGGAGCTTGCATGCA</u> <u>GCCAAAGCAAATCCAGCACC</u>	
<i>ZbISC1</i>	Zbisc1FW	<u>GAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTTAATTACAAAT</u> <u>CTAGAACTAG ATGCCCCAAAGTAGTGGTATTGACTATAGG</u>	$\Delta isc1$
	Zbisc2REV	<u>CACCTTTAGACATTTTAATAAAGCTCCGGAGCTTGCATGC</u> <u>GGACTTGTTCTTAAAATATAGAAATCTCTGC</u>	
<i>ZbSUR4</i>	Zbsur4FW	<u>GAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTTAATTACAAAT</u> <u>CTAGAACTAG ATGGAACAAGCTGTTGAGACCGCCGTGGAG</u>	$\Delta sur4$
	Zbsur4REV	<u>CACCTTTAGACATTTTAATAAAGCTCCGGAGCTTGCATGCG</u> <u>GCCTTTCTTGAACCAGCAGGTTTAAATGTCCG</u>	
<i>ZbERG4</i>	Zberg4FW	<u>GAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTTAATTACAAAT</u> <u>CTAGAACTAG ATGGTTGCCGAAGTGAAAGTTCCTGAGC</u>	$\Delta erg4$
	Zberg4REV	<u>CACCTTTAGACATTTTAATAAAGCTCCGGAGCTTGCATGCAA</u> <u>AAATGTATGGTATAAACATGTAGGGGCAATG</u>	
<i>ZbERG6</i>	Zberg4FW	<u>GAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTTAATTACAAAT</u> <u>CTAGAACTAG ATGTCGTCCACCCTTGAAGACACC</u>	$\Delta erg6$
	Zberg4REV	<u>CACCTTTAGACATTTTAATAAAGCTCCGGAGCTTGCATGC</u> <u>II</u> <u>TCTTCTTTTGCGGTTTGTGCG</u>	
<i>ZbFEN1</i>	Zbfen1FW	<u>GAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTTAATTACAAAT</u> <u>CTAGAACTAG ATGGAAGAACTTTTGGAAACAGC</u>	$\Delta fen1$
	Zbfen1REV	<u>CACCTTTAGACATTTTAATAAAGCTCCGGAGCTTGCATGCAT</u> <u>GTCTTCTTTTTCTAAAAGATCTGTCCG</u>	

\* Sequências homólogas aos genes a clonar de *Z. bailii* estão sublinhadas

#### 4. Extração e quantificação de DNA

O DNA genómico de *Z. bailii* ISA 1307 foi extraído segundo um protocolo adaptado de Hoffman e Winston (1997) (Anexo II). Após a extração, o DNA foi quantificado por espectrofotometria e diluído para uma concentração final de 50 ng/μl.

No caso da extração de DNA plasmídico de colónias de leveduras, com auxílio de um palito colocou-se uma porção de células numa solução com a enzima liticase (1U/μl), vortexou-se durante 15 segundos, incubou-se a 37°C durante 30 min, aqueceu-se as células a 100°C durante 5 minutos, centrifugou-se, obtendo-se no sobrenadante o DNA plasmídico pretendido que foi utilizado como molde de reação de PCR após diluição de 1/50.

Extração de DNA plasmídico de *E. coli* foi realizada através de um kit de extração, *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich®) de acordo com as instruções do fabricante.

#### 5. PCR

##### 5.1. Amplificação de DNA genómico de *Z. bailii* ISA 1307:

Para a amplificação de cada um dos genes de interesse, procedeu-se à realização de um PCR (*Polymerase chain reaction*) (Tabela 4), utilizando-se os *primers* previamente descritos (Tabela 3) e o programa base de PCR apresentado na tabela 5.

**Tabela 4-** Condições de PCR para amplificação dos genes de interesse.

	Volume (μl)
Água mili Q estéril	5,4
Tampão de reacção 5 X	2
4 dNTPs mix 10 mM/ cada Bioron	0,2
Primer FW 10 μM	0,4
Primer REV 10 μM	0,4
DNA molde (50 ng/μl)	1,5
Taq Phusion F-530 <i>Finnzymes</i> (2U/μl)	0,1
Volume final de reacção	10

**Tabela 5 -** Programa de PCR utilizado na aplicação dos genes de interesse

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	4	1
Desnaturação	94	0,5	6
Emparelhamento	50	1	
Extensão	72	3	
Desnaturação	94	0,5	30
Emparelhamento	65	1	
Extensão *	72	1	
Extensão final	72	7	1

\*Variável com a dimensão do gene a amplificar podendo ir até aos 3 minutos quando na amplificação de genes de maior dimensão, utilizando a relação de 1Kb/min

Após a amplificação dos genes de interesse a partir do DNA genómico de *Z. bailii* ISA 1307, purificou-se os produtos de PCR com recurso a colunas de purificação (“*PCR Wizard cleaning kit*”-Promega) de acordo com as instruções do fabricante, e enviou-se para sequenciação automática, efetuada pela empresa STAB Vida (Caparica).

## 5.2. Amplificação de DNA plasmídico dos transformantes obtidos

Para confirmar a clonagem correta dos genes de interesse realizaram-se reações de PCR a partir de DNA plasmídico extraído de cada de colónia de acordo com o descrito no ponto 4.

Para a reação de amplificação, utilizaram-se os *primers* específicos presentes na figura 8 e as condições de PCR referidas anteriormente na Tabela 6, alterando-se apenas o programa utilizado para o representado na Tabela 6.

**Tabela 6:** Programa de PCR utilizado na amplificação de DNA plasmídico

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95	7	1
Desnaturação	94	1	6
Emparelhamento	55	1	
Extensão	72	3	
Extensão final	72	7	1

Primer Foward: 5'-CGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAG-3' – 126 pb a montante do codão ATG inicial, dentro da região do promotor

Primer Reverse: 5'-CTGGGTATCTAGCAAAC-3' - 293 pb a montante do final do gene de interesse clonado, dentro da região codificante do gene GFP

**Figura 8:** *Primers* utilizados no PCR de colónia e respetivos locais de ligação ao vetor.

Após amplificação do fragmento de DNA plasmídico desejado, purificou-se com recurso a colunas de purificação (“*PCR Wizard cleaning kit*”-Promega) de acordo com as instruções do fabricante, e enviou-se para sequenciação automática, efetuada pela empresa STAB Vida (Caparica).

## 6. Transformação

Para clonar cada um dos genes de *Z. bailii* foi utilizada como estirpe hospedeira *S. cerevisiae* BY4741 deletada no gene de interesse. A clonagem foi realizada por recombinação homóloga, entre as regiões homólogas das extremidades dos fragmentos amplificados por PCR contendo os genes de *Z. bailii* e o plasmídeo P416TEF-FFZ1-GFP previamente digerido com *Bgl*II e *Xba*I. A transformação foi realizada pela adição simultânea do fragmento de PCR amplificado do gene de interesse e do plasmídeo digerido, de acordo com o protocolo de

transformação apresentado no Anexo IV, de modo a construir, por recombinação homóloga dentro da levedura um plasmídeo com o gene de interesse em *frame* com o promotor TEF1 e com o gene GFP (fusão C-terminal).

## 7. Microscopia

Para cada um dos genes em estudo, escolheram-se 12 colónias isoladas dos transformantes de *S. cerevisiae* obtidos e inocularam-se em placas de meio mineral mínimo YNB (*Yeast nitrogen base without amino acids*, Difco), com 2% glucose (p/v) com os respetivos suplementos para as auxotrofias das estirpes em estudo (Leucina 20 g/l; Histidina 5 g/l; Metionina 4g/l). No caso específico das colónias obtidas para o gene *ERG4*, estas foram repicadas para o meio SC (“Synthetic media”), com 2% glucose (p/v), e com uma maior adição de aminoácidos para além dos suplementos acima referidos, não sendo na mesma adicionado ao meio o uracilo (marca de seleção).

Para confirmar a presença e localização do plasmídeo no interior da célula, a partir de culturas frescas, inoculou-se cada colónia individualmente em meio YNB líquido, incubou-se a 28°C até fase exponencial e observou-se através de um microscópio de fluorescência invertido (Axiovert 200; Carl Zeiss, Germany) equipado com uma câmara digital (Photometrics, USA). Para a visualização e localização da GFP utilizou-se um filtro de excitação de 495/10nm e um filtro de corte de 535/25nm acoplados com um feixe divisor dicróico de 515nm.

## 8. Ensaio de crescimento

### 8.1. Pré-inóculo

Para a avaliação preliminar da resistência a ácidos fracos (ácido benzóico e ácido sórbico), cada uma das estirpes em estudo (BY4741, mutantes de deleção e transformantes obtidos), foi cultivada em YNB, com 2% glucose (p/v), com os respetivos suplementos de acordo com as respetivas auxotrofias de cada estirpe. As culturas foram incubadas a 28°C aproximadamente 14 horas com agitação orbital (180rpm) de forma a obter culturas em plena fase exponencial ( $DO_{640nm}$  1-2, medições efectuadas com um espectrofotómetro Ultrospec 2100pro (Amersham Biosciences).

### 8.2. Adaptação aos ácidos fracos

Para adaptar as células aos ácidos centrifugaram-se as células (1811xg 3 min, *Eppendorf centrifuge 5810R*), desprezou-se o sobrenadante, e ressuspenderam-se em meio mineral YNB com 2% glucose (p/v) e os respetivos suplementos necessários (Leucina 20g/l; Histidina 5g/l; Metionina 4g/l e quando necessário Uracilo 16g/l) com ácido benzóico ou sórbico a uma

concentração de 1mM (Quintas *et al.*, 2000), ambos os meios a um pH 4,5 de forma a obter uma  $DO_{640nm}$  de 0,5. As culturas foram incubadas a 28°C entre 14 e 24h com agitação orbital (180rpm).

### 8.3. Avaliação preliminar da resistência aos ácidos fracos

As culturas adaptadas e não-adaptadas a ácido benzóico e ácido sórbico foram cultivadas até meio da fase exponencial. Após atingirem esta fase, centrifugaram-se (1811xg 3 min), e ressuspenderam-se em água desmineralizada estéril, de forma a obter uma  $DO_{640nm}$  10. A partir de cada uma das culturas a  $DO_{640nm}$  10, foram feitas diluições decimais seriadas ( $10^0 - 10^{-5}$ ). Colocou-se 200µl de cada uma das diluições numa microplaca (Figura 9) e transferiu-se para meios sólidos (YNB) com concentrações de ácido benzóico e sórbico de 1 – 6mM (1, 2, 4, 6), com valores de pH de 4,5 e 3,5, com o auxílio de um dispositivo próprio (*replica plater for 96-well plates*, SIGMA). As placas com as gotas foram incubados a 28°C, tendo o crescimento sido observado e registado após uma e duas semanas de incubação.

	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
Células não adaptadas						
Células adaptadas a ácido benzóico						
Células adaptadas a ácido sórbico						

**Figura 9:** Esquema da microplaca.

### 8.4. Crescimentos em meio líquido

A análise do crescimento das estirpes em meio líquido foi realizada em dois meios de cultura base diferentes avaliando-se o seu crescimento em meio mineral mínimo YNB (2% glucose (p/v)) (pH 3,5) e em Sumo de maçã (pH 3,42) (Leucina 20g/l; Histidina 5 g/l; Metionina 4g/l), com ou sem adição de ácido benzóico e ácido sórbico de acordo com o descrito na tabela 7.

**Tabela 7:** Meios de Cultura utilizados para crescimentos em meio líquido

Meio base YNB pH 3,5	Meio base Sumo de maçã pH 3,42
YNB sem adição de ácido	Sumo Sem adição de ácido
Sórbico 1 mM	Sórbico 1;2;3;6 mM
Benzóico 1 mM	Benzóico 1;2;3;6 mM

A partir de culturas frescas em meio sólido, efetuou-se o pré-inóculo para cada uma das estirpes, inoculando-se 50ml de meio YNB (2% glucose (p/v) Leucina 20g/l; Histidina 5g/l; Metionina 4 g/l e quando necessário Uracilo 16 g/l) em balões de Erlenmeyer de 200ml. Incubou-se a 28°C com agitação orbital (180 rpm) até plena fase exponencial ( $DO_{640nm}$  1-2). As culturas foram centrifugadas (temperatura ambiente, 1811xg 3min), e lavadas 2x com água desmineralizada fria estéril para concentrar as células e remover o meio de cultura utilizado, e ressuspensas em água estéril para uma  $DO_{640nm}$  de 10. A partir desta suspensão, prepararam-se duas suspensões mais diluídas ( $DO_{640nm}$  1 e  $DO_{640nm}$  0,1).

Cada um dos crescimentos foi efetuado em frascos de vidro com tampa de rosca plástica, com 10ml de meio cada inoculados com 100 $\mu$ l de suspensão. Para cada condição foram testados três inóculos diferentes ( $DO_{640nm}$  iniciais: 0,1; 0,01; 0,001). Incubaram-se os frascos a 28°C com agitação orbital (180rpm). Para cada condição de crescimento avaliou-se periodicamente a  $DO_{640nm}$  e a concentração de glucose presente no meio, durante o período de tempo necessário para estabilizar o valor da  $DO_{640nm}$  em cada uma das condições testadas ou até esgotamento dos açúcares.

### **8.3. Determinação da concentração dos açúcares no meio de crescimento**

A determinação da glucose foi efetuada recorrendo às tiras teste DIABUR-TEST® 5000. No caso dos crescimentos feitos em sumo para além da concentração de glucose determinou-se também a concentração de frutose por testes enzimáticos.

### **8.4. Determinação do número de células**

Para a avaliação da viabilidade das células foram determinados, o número de células totais e o número de UFC's viáveis cultiváveis.

#### **8.4.1. Determinação no número de células totais e do número de células metabolicamente ativas**

O método utilizado para a contagem do número de células totais (viáveis e não viáveis), foi o método de exclusão por corante, que tem como base a utilização de corantes cuja captação por parte das células é dependente da integridade da membrana das mesmas ou cujo metabolismo indica a existência de atividade enzimática. Este método tem como princípio base que as células vivas possuem a sua membrana celular intacta excluindo determinados corantes como é o caso do azul metileno, ao passo que no caso das células mortas não apresentam a sua membrana com a mesma integridade absorvendo este tipo de corante (Patterson, 1979).

Misturou-se o corante com a suspensão de células (diluídas quando necessário) numa proporção de 1:1, incubou-se à temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. Após o período de incubação aplicou-se no hemocitómetro cerca de 10µl da mistura corante/células e através da sua observação ao microscópio contou-se o número de células totais (viáveis/brancas e não viáveis/azuis).

#### 8.4.2. Determinação do número de células com capacidade de multiplicação

Para a determinação do número de células com capacidade de multiplicação determinou-se o número de UFC'S por espalhamento em placa de YPD de 100µl da suspensão diluídas de células. Incubaram-se as placas à temperatura ambiente até ao aparecimento de colónias. Após este período contou-se o número de colónias por placa. Cada amostra foi plaqueada em duplicado.

### 9. Determinação do pH intracelular (pH<sub>in</sub>)

A determinação do pH intracelular é uma importante via de medição da ação inibitória dos ácidos fracos, que tem como base a elevada permeabilidade da membrana à forma não dissociada (HA) de cada ácido e a respetiva redução da permeabilidade da membrana relativamente à sua forma iónica.

Quando numa situação de equilíbrio, em que a quantidade de ácido na sua forma não dissociada [HA] é igual tanto no interior como no exterior da célula, em que o ácido se dissocia de ambos os lados e se assume a manutenção da sua constante de dissociação (K<sub>d</sub>) então podemos dizer:

$$K_d = \frac{[H_{in}^+][A_{in}^-]}{[AH_{in}]} = \frac{[H_{out}^+][A_{out}^-]}{AH_{out}} \quad (1) \quad \text{quando no equilíbrio } pH_{in} - pH_{ext} = \Delta pH = \log \frac{[A_{in}^-]}{A_{out}^-} \quad (2)$$

se o valor do pH no meio extracelular for superior ao valor da constante de dissociação mais um (pk+1), leva a que o ácido se encontre maioritariamente na sua forma não dissociada (forma iónica) em ambos os lados da membrana (uma vez que o pH intracelular já é só por si mais alcalino), e neste caso o ΔpH pode ser calculado através da equação anterior. Quando por outro lado o pH<sub>ext</sub> < pk+1, nesse caso uma grande parte do ácido encontra-se na sua forma não dissociada, e partindo do facto que a concentração total do ácido (A<sub>T</sub>) é dada por : A<sub>T</sub> = A<sup>-</sup> +AH no equilíbrio:

$$\frac{A_{in}^T}{A_{ext}^T} = \frac{\frac{1}{K_d} + \frac{1}{H_{in}^+}}{\frac{1}{K_d} + \frac{1}{H_{ext}^+}} \quad (3)$$

Na qual  $A_{in}^T$  representa a quantidade de ácido total no interior da célula e  $A_{ext}^T$  é a quantidade total de ácido no exterior da célula. Resolvendo a equação em ordem ao pH intracelular, ficamos com :

$$pH_{in} = \log \left[ \frac{A_{in}^T}{A_{ext}^T} \left( \frac{1}{K_d} + \frac{1}{H_{ext}^+} \right) - \frac{1}{K_d} \right] \quad (4)$$

Equação que permite o cálculo do valor do pH intracelular e conseqüentemente a verificação do grau de acidificação intracelular causado pela presença do ácido no meio (com base no método de Rottenberg, 1979).

Recolheram-se 50ml de células em fase exponencial de crescimento, e dividiu-se o volume recolhido em dois balões de Erlenmeyer de 50ml. Num dos balões (balão A ou balão “quente”) foi adicionado o ácido benzóico radioativo, e no segundo balão (balão B ou balão “frio”) não foi adicionado qualquer composto.

Para cada meio a testar, no meio presente no balão A adicionou-se 2 $\mu$ l de (7-<sup>14</sup>C) ácido benzóico. Após a adição deste composto incubou-se a 25°C por 90 minutos, de modo a que a forma não dissociada do ácido atinja o equilíbrio entre o citosol e o meio extracelular.

A partir do balão A, determinou-se a concentração da forma não dissociada do ácido radioativamente marcado intra e extracelularmente. A partir do balão B, determinou-se o pH extracelular e o a biomassa seca, por filtração de 5ml de suspensão.

## 9.2. Concentração total do ácido radioativo no meio extracelular

Após os 90 minutos de incubação, foram retirados 500 $\mu$ l da suspensão de células do balão A para *ependorfs* (1,5ml), centrifugou-se durante 1 min a 18514xg e recolheu-se 100 $\mu$ l do sobrenadante, para dois frascos com 5ml de líquido de cintilação Optiphase “HiSafe” 2 (Perkin Elmer).

A atividade foi medida por um contador de cintilação líquida *Tri-Carb* 1600 CA (*Packard Instruments*).

## 9.3. Concentração total do ácido radioativo no meio intracelular

Para a quantificação da concentração total do ácido radioativo no meio intracelular, filtrou-se um volume conhecido (de acordo com o valor da DO<sub>640nm</sub> da cultura) da suspensão de células, numa membrana GF/C (*Whatman*) de forma a obter-se no mínimo 5mg de células e lavou-se com 10ml de água desmineralizada gelada. Transferiu-se a membrana contendo as células filtradas para um tubo com 5 ml de líquido de cintilação Optiphase “HiSafe” 2 (Perkin

Elmer). Antes do início e entre cada ensaio, lavou-se o sistema de filtração com 10 ml de água desmineralizada gelada, utilizando uma membrana GF/B (*Whatman*).

A atividade foi medida por um contador de cintilação líquida *Tri-Carb 1600 CA* (*Packard Instruments*).

## **10. Permeabilidade da membrana – fluxo de protões**

Para a realização dos ensaios de permeabilidade da membrana plasmática, centrifugaram-se 100ml (1811xg 5min a 4°C) e lavaram-se duas vezes com água desmineralizada fria e resuspendiam-se em água desmineralizada para se obter uma  $DO_{640nm}$  de 100.

Uma vez ressuspendidas incubou-se em gelo durante o período de 1 hora.

Os fluxos de protões foram avaliados, através da medição da acidificação e alcanização do meio extracelular recorrendo a um elétrodo de pH (PHM220, Lab pH METER, Radiometer), ligado a um potenciómetro e a um registador (BBC Goernz Metrawatt Se460).

### **10.1. Influxo**

Adicionou-se 200µl da suspensão de células a 800µl de água desmineralizada, 5µl de antimicina 0,4mg/ml e 5µl de 2-deoxi-D-glucose 0,2M para inibir o funcionamento da cadeia respiratória, inibir o normal funcionamento da ATPase, e levar ao esgotamento de ATP respetivamente. Uma vez adicionadas estas soluções, ajustou-se o pH a um valor de 4 com HCl ou NaOH conforme o necessário, dando-se início ao ensaio. Registou-se as alterações do pH extracelular, durante um período de tempo variável, de acordo com a curva pretendida. De seguida, calibrou-se o sinal através da adição de 5µl de HCL 10mM.

### **10.2. Efluxo**

Adicionou-se 200µl de células a 700µl de água ajustou-se o pH a 5 e deu-se início ao ensaio. Uma vez obtida uma linha de base estável, procedeu-se a adição de um pulso de glucose (100µl Glucose 20%), de forma a avaliar a capacidade de extrusão de protões por parte da ATPase membranar. Nestes ensaios as calibrações foram feitas através da adição de 5 ou 10µl KOH 10mM.

## **11. Determinação do pH extracelular**

O pH extracelular, foi determinado recorrendo a um eléctrodo previamente calibrado (PHM220, Lab pH METER).

## **12. Quantificação da biomassa final**

No caso dos ensaios de crescimento em frasco e determinação do pHin, quantificou-se a biomassa seca por filtração de um volume de células conhecido definido de acordo com a  $DO_{640nm}$  da cultura (de forma a obter na membrana pelo menos 5mg de células) em membranas *Milipore* TYPE GSPW de 0,22 $\mu$ m de poro previamente taradas, seguido de lavagem das células com 20mL de água desmineralizadas. As membranas foram colocadas numa estufa a 80°C durante um período de 24h após o qual foram pesadas.

No caso dos ensaios para determinação da velocidade de entrada e saída de H<sup>+</sup>, a biomassa seca da suspensão foi determinada recorrendo a recipientes de papel de alumínio previamente tarados, nos quais se colocou 100ul de suspensão que foram colocadas numa estufa a 80°C durante um período de 24h após o qual foram pesadas.

### III. Resultados e Discussão

*Zygosaccharomyces bailii* é uma das leveduras que mais problemas de alteração de alimentos provoca e maiores perdas económicas causa, sobretudo às indústrias de sumos e concentrados de sumos, polpas e derivados. Esta levedura é altamente resistente a ácidos fracos utilizados como conservantes.

O trabalho apresentado surge no seguimento de diversas observações efetuadas anteriormente no que diz respeito às possíveis hipóteses explicativas da elevada resistência de *Z. bailii* aos ácidos fracos, comparativamente a outros microrganismos, em particular *S. cerevisiae*. Nomeadamente, deu-se particular atenção à hipótese de *Z. bailii* ter um mecanismo mais eficaz de alterar o envelope celular, limitando em consequência disso, a entrada na célula da forma não-dissociada do ácido por difusão simples através dos lípidos da membrana plasmática (Piper *et al.*, 2001).

No momento em que o trabalho foi iniciado, apenas se encontravam disponíveis nas bases de dados as sequências correspondentes à estirpe *Z. bailii* CLIB213, tendo sido estas as sequências que se utilizaram para desenhar os *primers* com vista à clonagem dos genes escolhidos. Posteriormente, foi disponibilizada nas bases de dados o genoma da estirpe usada neste trabalho, tendo os resultados sido validados e continuados usando as sequências que entretanto foram disponibilizadas.

#### 1. Seleção e validação dos genes a clonar

De forma a testar o papel da alteração das propriedades do envelope celular na presença de ácidos fracos como forma de resistência escolheram-se oito proteínas envolvidas na biossíntese de componentes da membrana plasmática e parede celular (Erg2, Erg4, Erg6, Sur4, Gas1, Fen1, Opi3, Isc1) que foram clonadas por recombinação homóloga em plasmídeos de expressão de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando como estirpe recetora a estirpe de *S. cerevisiae* deletada no gene correspondente e caracterizaram-se os transformantes obtidos para parâmetros relacionados com a permeabilidade da membrana e capacidade de sobreviver em presença de ácido benzóico e ácido sórbico.

Numa primeira abordagem, verificou-se a similaridade entre as proteínas escolhidas de *Z. bailii* e de *S. cerevisiae*, de forma a verificar se estas apresentavam diferenças relevantes que pudessem estar relacionadas com os comportamentos diferentes das duas espécies em relação à sua resistência a ácido benzóico e ácido sórbico. Através da análise, por Blastp, da similaridade e identidade entre as sequências proteicas referentes a cada uma das proteínas da estirpe de *Z. bailii* CLIB213 (única estirpe com o genoma publicado no início deste trabalho)

escolhidas e as respectivas sequências dessas proteínas de *S. cerevisiae*, observou-se uma diferença significativa entre as duas espécies (Tabela 8, Tabela 9).

**Tabela 8:** Percentagem de identidade e similaridade entre sequências proteicas de *S. cerevisiae* S288c e *Z. bailii* CLIB213

Identidade % (Similaridade %)								
Proteínas	ScErg2	ScErg4	ScErg6	ScOpi3	ScLsc1	ScFen1	ScSur4	ScGas1
<b>ZbErg2 CLIB 213</b>	75(85)	-	-	-	-	-	-	-
<b>ZbErg4 CLIB 213</b>	-	79 (88)	-	-	-	-	-	-
<b>ZbErg6 CLIB 213</b>	-	-	78(88)	-	-	-	-	-
<b>ZbOpi3 CLIB 213</b>	-	-	-	58 (71)	-	-	-	-
<b>Zblsc1 CLIB 213</b>	-	-	-	-	63 (78)	-	-	-
<b>ZbFen1 CLIB 213</b>	-	-	-	-	-	74(86)	-	-
<b>ZbSur4 CLIB 213</b>	-	-	-	-	-	-	62(79)	-
<b>ZbGas1 CLIB 213</b>	-	-	-	-	-	-	-	67(80)

Atendendo a estes resultados, dadas as diferenças entre as proteínas de *Z. bailii* e *S. cerevisiae*, manteve a escolha dos genes/proteínas que havia sido efetuada. Para além disso, verificou-se ainda que nenhuma dos genes apresentava intrões, possibilitando a obtenção das sequências codificantes diretamente a partir de DNA genómico.

Posteriormente, após a disponibilização do genoma de *Z. bailii* ISA1307, efetuou-se a mesma análise contra as proteínas desta estirpe, tendo-se obtido resultados similares (Tabela 9), o que se justifica pela baixa variabilidade intraespecífica quer ao nível da proteína quer ao nível da própria sequência de nucleótidos dos genes observada entre as duas estirpes (Tabela 10).

**Tabela 9:** Percentagem de identidade e similaridade entre sequências proteicas de *S. cerevisiae* S288c e *Z. bailii* ISA 1307

Identidade % (Similaridade %)								
Proteínas	ScErg2	ScErg4	ScErg6	ScOpi3	ScLsc1	ScFen1	ScSur4	ScGas1
<b>ZbErg2 ISA 1307</b>	75 (85)	-	-	-	-	-	-	-
<b>ZbErg4 ISA 1307</b>	-	79 (88)	-	-	-	-	-	-
<b>ZbErg6 ISA 1307</b>	-	-	79 (91)	-	-	-	-	-
<b>ZbOpi3 ISA 1307</b>	-	-	-	58 (70)	-	-	-	-
<b>Zblsc1 ISA 1307</b>	-	-	-	-	62 (78)	-	-	-
<b>ZbFen1 ISA 1307</b>	-	-	-	-	-	73(86)	-	-
<b>ZbSur4 ISA 1307</b>	-	-	-	-	-	-	62 (79)	-
<b>ZbGas1 ISA 1307</b>	-	-	-	-	-	-	-	67(80)

**Tabela 10-** Percentagem de identidade entre sequências proteicas e nucleotídicas correspondentes (entre parêntesis) de *Z. bailii* CLIB213 e *Z. bailii* ISA1307.

Identidade % (Similaridade %)								
Proteínas	ZbErg2 CLIB213	ZbErg4 CLIB213	ZbErg6 CLIB213	ZbOpi3 CLIB213	Zblsc1 CLIB213	ZbFen1 CLIB213	ZbSur4 CLIB213	ZbGas1 CLIB213
ZbErg2 ISA 1307	99 (98)	-	-	-	-	-	-	-
ZbErg4 ISA 1307	-	98 (98)	-	-	-	-	-	-
ZbErg6 ISA 1307	-	-	98 (99)	-	-	-	-	-
ZbOpi3 ISA 1307	-	-	-	97(98)	-	-	-	-
Zblsc1 ISA 1307	-	-	-	-	96 (97)	-	-	-
ZbFen1 ISA 1307	-	-	-	-	-	98(98)	-	-
ZbSur4 ISA 1307	-	-	-	-	-	-	99 (99)	-
ZbGas1 ISA 1307	-	-	-	-	-	-	-	96(97)

As diferenças de similaridade e identidade entre as sequências de *Z. bailii* e *S. cerevisiae* acima comparadas bem como as semelhanças quase totais entre as proteínas das duas estirpes de *Z. bailii* vieram reforçar a possibilidade de que quando expressas em *S. cerevisiae*, as proteínas de *Z. bailii*, possam alterar de alguma forma o seu comportamento.

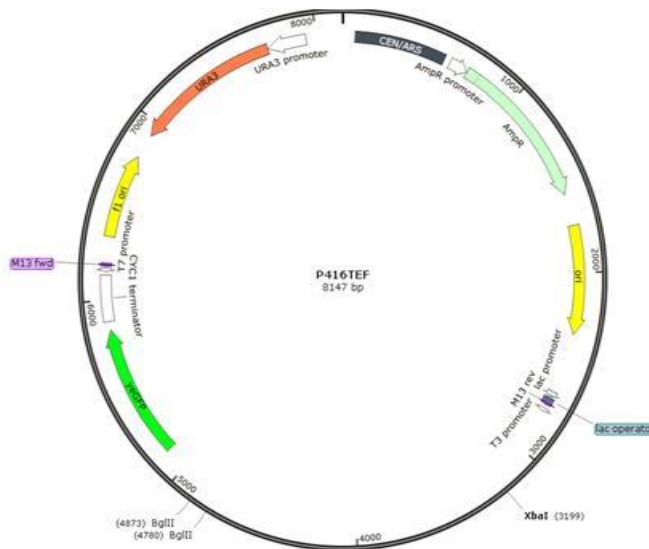
## 2. Amplificação e clonagem dos genes em estudo:

Para a obtenção da sequência de cada um dos genes, que codificam as proteínas em estudo, foram utilizadas as sequências referentes a cada gene de *S. cerevisiae* S288C. Estas foram comparadas com as sequências disponíveis nas bases de dados, através da utilização de ferramenta bioinformática Blastn, o que nos permitiu obter a sequência de cada um destes genes de *Z. bailii* CLIB213 e posteriormente validadas para a estirpe *Z. bailii* ISA1307.

Para proceder à amplificação por PCR e clonagem dos oito genes de *Z. bailii* selecionados, foram desenhados *primers* de forma a possuírem uma região específica para o gene de interesse, flanqueada a montante por uma região de cerca de 40-50pb específica para o plasmídeo P416TEF-FFZ1-GFP, de forma a possibilitar a clonagem por recombinação homóloga entre esta e os locais que flanqueiam o local de clonagem múltiplo do vector (Figura 10). Para que as sequências de cada *primer* fossem únicas e o seu grau de especificidade superior, foram tidas em conta as seguintes características:

- (1) tamanho entre 32 a 42 pb
- (2) conteúdo em G-C pelo menos 90% similar entre cada *primer*
- (3) temperatura de *melting* entre os 58 e os 64°C.

Como tal para cada gene, de acordo com as características acima referidas escolheu-se uma região da sua sequência na direção 5'-3' (*Primer forward*) e outra região da sua sequência no sentido 3'-5' (*Primer reverse*) (Anexo I).



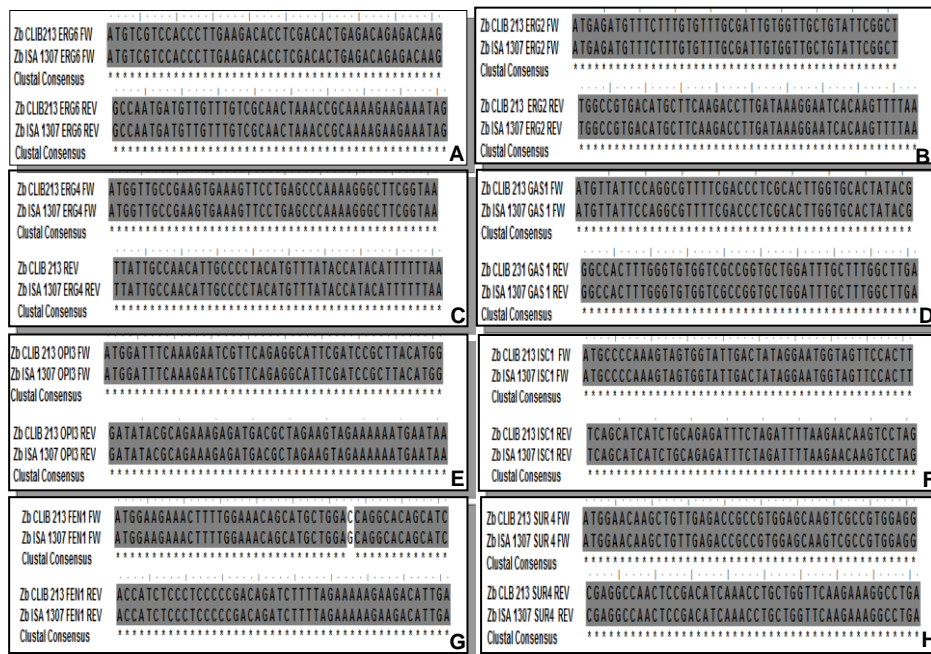
**Figura 10:** Esquema do plasmídeo P416TEF-FFZ1-GFP, com todas os locais de corte possíveis, e com cada uma das suas regiões representadas.

Apesar da sequência utilizada para desenhar os *primers* ter sido a de *Z. bailii* CLIB213, o DNA genómico utilizado para amplificação de cada gene foi o de *Z. bailii* ISA 1307, devido à indisponibilidade do genoma sequenciado de *Z. bailii* ISA1307 no início do trabalho.

*Z. bailii* ISA 1307 é entre as estirpes de *Z. bailii* a mais utilizada no estudo desta espécie enquanto microrganismo de alteração, tendo sido isolada a partir de uma unidade de produção de espumante (Ferreira *et al.*, 1997),

Muito embora a variabilidade intraespecífica ao nível das proteínas fosse muito baixa (Tabela 10), como forma de verificar a igualdade entre as sequências de cada gene referente a cada uma das duas estirpes e validar as sequências escolhidas para os *primers*, alinharam-se as regiões selecionadas em *Z. bailii* CLIB13 para desenhar os *primers* (*Forward e Reverse*) com as respetivas regiões das sequências de *Z. bailii* ISA 1307 (Figura 11).

A análise dos alinhamentos representados na Figura 11 permitiu-nos observar que entre estas duas estirpes, as regiões selecionadas apresentam quase 100 % de identidade, o que nos confirmou a correta construção dos *primers* utilizados.



**Figura 11:** Alinhamento entre as regiões selecionadas para desenhar os *primers* de *Z. bailii* CLIB213 com as respectivas regiões de *Z. bailii* ISA 1307. (A) Para o gene *ERG6* (B) Para o gene *ERG2*, (C) Para o gene *ERG4*, (D) Para o gene *GAS1*, (E) Para o gene *OPI3*, (F) Para o gene *ISC1*, (G) Para o gene *FEN1*, (H) Para o gene *SUR4*

Utilizando os *primers* desenhados efetuou-se a amplificação dos genes a partir de DNA genômico extraído de *Z. bailii* ISA1307, tendo-se obtido produtos de PCR com o tamanho esperado (*ZbERG2*- 755pb, *ZbERG4*-1493pb, *ZbERG6*-1226pb, *ZbOPI3*-734pb, *ZbISC1*-1475pb, *ZbFEN1*-1148pb, *ZbSUR4*-1130pb e *ZbGAS1*-1802pb). Os produtos de PCR purificados foram enviados para sequenciar, e uma vez publicado o genoma anotado de *Z. bailii* ISA 1307 (Mira *et al.*, 2014), procedeu-se ao alinhamento entre o produto de PCR com as respectivas sequências de cada gene *Z. bailii* ISA 1307 de forma a obter-se a confirmação do resultado do processo de amplificação (Anexo III).

A análise destes alinhamentos permitiu-nos observar uma identidade entre sequências bastante elevada, confirmando desta forma a correta amplificação de cada um dos genes.

## 2.1. Transformação

Para a clonagem de cada um dos genes foi utilizada como estirpe hospedeira *S. cerevisiae* BY4741 com o respetivo gene deletado. A clonagem foi feita por recombinação homóloga entre as regiões homólogas das extremidades dos fragmentos amplificados por PCR contendo os genes de *Z. bailii* e o plasmídeo P416TEF-FFZ1-GFP previamente digerido com *Bgl*II e *Xba*I (de forma a linearizar o plasmídeo e eliminar parte do gene *ZrFFZ1* clonado previamente no local) de acordo com o protocolo presente no anexo IV.

De entre os oito genes de *Z. bailii* a clonar, conseguiu-se obter transformantes para seis deles (*ERG4*, *SUR4*, *ISC1*, *OPI3*, *FEN1*, *GAS1*), não tendo sido possível obter transformantes para dois dos genes selecionados (*ERG2* e *ERG6*).

A clonagem dos genes envolvidos no processo de síntese de ergosterol (*ERG2*, *ERG4* e *ERG6*) apresentou bastantes dificuldades a nível técnico, uma vez que a estirpe utilizada como hospedeira -tal como para os restantes genes- tinha cada um dos genes deletado individualmente, fato que resulta na alteração da composição da membrana devido às alterações no processo de síntese do ergosterol, tornando as estirpes deletadas extremamente sensíveis à temperatura (Lees *et al.*, 1995).

Deste modo foi necessário proceder a diversas alterações no protocolo de transformação, nomeadamente na composição do meio utilizado (aumentando-se a quantidade de aminoácidos presentes no meio) (Abe e Hiraki, 2009), redução da duração do choque térmico a 42°C e o aumento da concentração de DNA genómico adicionada, de 300ng para 400ng.

O período de choque térmico a 42°C inicialmente previsto no protocolo de transformação e que foi utilizado para a clonagem dos genes cujas proteínas codificadas não estavam envolvidas na biossíntese de ergosterol foi de 40 minutos. No entanto, devido às dificuldades que tivemos na clonagem dos genes envolvidos na síntese de ergosterol, reduziu-se esse período de incubação para dez minutos. Apesar disto, apenas se conseguiu clonar o gene *ERG4*, o que se pode justificar por uma maior sensibilidade a temperaturas elevadas das estirpes de *S. cerevisiae* com os genes *ERG2* e *ERG6* deletados. Este fato é suportado por alguns autores que referem que para a clonagem destes genes apenas executaram um choque térmico de 2 minutos (Gaber *et al.*, 1989).

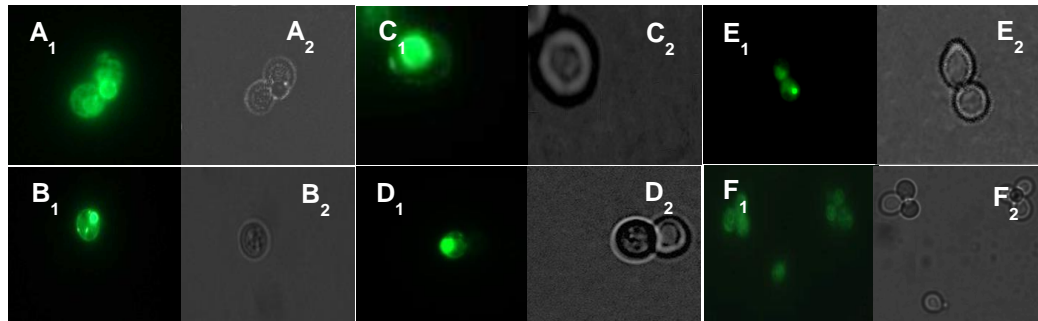
### **3. Avaliação dos níveis de expressão e da localização das proteínas heterólogas**

#### **3.1. Localização da proteína heteróloga por observação da GFP**

De forma a confirmar simultaneamente a expressão e respetiva localização das proteínas clonadas e marcadas com GFP, foi utilizada microscopia de epifluorescência (Figura 12). Deste modo, para cada um dos genes em estudo, selecionaram-se 12 colónias isoladas, inocularam-se em meio líquido até plena fase exponencial de crescimento e observaram-se ao microscópio.

A observação de cada uma das 12 colónias de cada gene ao microscópio de epifluorescência, permitiu a seleção dos clones onde se obteve uma localização da proteína de fusão com GFP

no local esperado de acordo com a literatura bem como de entre estas aquelas que apresentaram níveis de fluorescência superiores que corresponderão a um maior nível de expressão da proteína clonada (Tabela 2 – Material e Métodos) .



**Figura 12:** Imagens de microscopia de epifluorescência (1) e de microscopia em campo claro (2) de *S. cerevisiae*  $\Delta sur4$  a expressar o gene *SUR4* de *Z. bailii* (A), de *S. cerevisiae*  $\Delta isc1$  a expressar o gene *ISC1* de *Z. bailii* (B), de *S. cerevisiae*  $\Delta opi3$  a expressar o gene *OPI3* de *Z. bailii* (C), de *S. cerevisiae*  $\Delta erg4$  a expressar o gene *ERG4* de *Z. bailii* (D) de *S. cerevisiae*  $\Delta fen1$  a expressar o gene *FEN1* de *Z. bailii* (E), de *S. cerevisiae*  $\Delta gas1$  a expressar o gene *GAS1* de *Z. bailii* (F)

Tal como é possível observar através das fotografias de microscopia de fluorescência e microscopia de campo claro, cada uma das proteínas clonada foi expressa na estirpe hospedeira. Em relação à sua localização celular, embora se observe uma localização parcial ao nível da membrana plasmática, a maior parte das proteínas apresentam-se maioritariamente noutras biomembranas da célula em acordo com o descrito na base de dados SGD (*Saccharomyces Genome Database*), tendo alguns destes outras localizações mais específicas como é o caso de *SUR4*, *ERG4*, *FEN1* e *GAS1* (Figuras 12A, 12D, 12E e 12F, respetivamente) que se encontram simultaneamente presentes no retículo endoplasmático e de *ISC1* e *OPI3* (Figuras 12B e 12C respetivamente) que se encontram também localizados possivelmente na mitocôndria.

Após observação microscópica da localização esperada das várias proteínas, verificou-se também se durante o processo de transformação ocorreu uma correta recombinação entre o gene e o respetivo vetor. Para tal, realizaram-se reações de PCR a partir de DNA plasmídico extraído a partir de cada colónia transformante selecionada, utilizando *primers* específicos para regiões do plasmídeo que flanqueavam o gene clonado do lado 5' (*primer forward* e 3' *primer reverse*).

As regiões de ligação dos *primers* foram escolhidas de forma a que, após a sequenciação do produto de PCR, fosse possível observar o seu alinhamento com a região do plasmídeo na qual ocorreu a ligação do *primer* bem como com o respetivo gene, permitindo dessa forma confirmar a correta recombinação entre o vetor e cada um dos genes em causa bem como a

inexistência de mutações pontuais que pudessem ocorrer apesar de se ter utilizado uma DNA polimerase *proof reading* (Anexo V).

### **3.2. Avaliação preliminar da resistência aos ácido benzóico e sórbico nas estirpes transformadas**

Uma vez confirmada a correta sequência dos genes correspondentes e a expressão das respectivas proteínas de *Z. bailii* ISA 1307 na estirpe previamente escolhida como estirpe hospedeira (*S. cerevisiae* BY4741 com o respetivo gene deletado) efetuou-se uma avaliação preliminar da resistência de cada uma das estirpes, comparando o fenótipo de crescimento em meio sólido das várias estirpes (BY4741, mutantes de deleção e transformantes) em presença e na ausência de ácidos fracos (ácido benzóico e ácido sórbico).

Para avaliação comparada da resistência de cada uma destas estirpes aos ácidos fracos, foram realizados *Drop-tests*, nos quais com o auxílio de um dispositivo apropriado, se transferiram para meio sólido suspensões preparadas por diluições seriadas ( $10^0$ - $10^{-5}$ ) de cada uma das estirpes para que na última diluição o número de células estivesse entre 1-10 células/ $3\mu\text{l}$ . Observou-se o crescimento em cada uma das placas após uma e duas semanas de incubação a 28 °C.

Os ensaios foram realizados com células em fase exponencial de crescimento cultivadas em YNB com os respetivos suplementos aos diversos valores de pH com e sem adição de cada um dos ácidos fracos. Os meios sólidos testados procuraram abranger as várias situações possíveis e permitir descartar possíveis efeitos que não resultassem diretamente da presença específica de cada ácido:

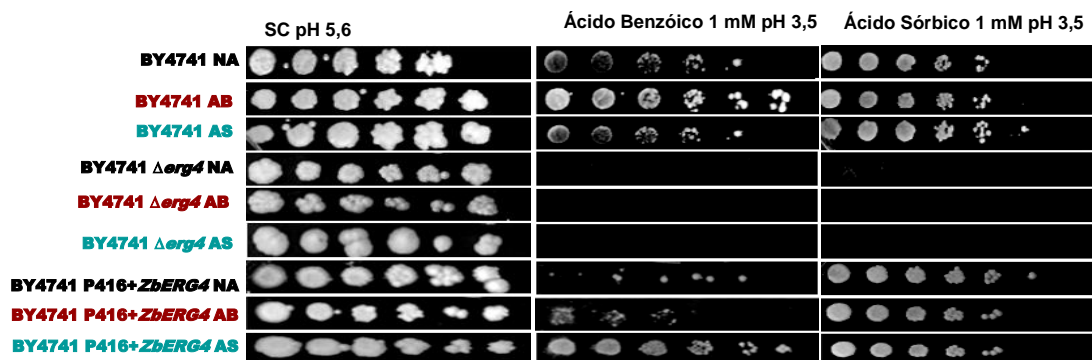
- a. YNB (pH 5,6) – controlo positivo de crescimento/viabilidade das células
- b. YNB (pH 3,5 e pH 4,5) – efeito do pH sobre o crescimento
- c. YNB (pH 3,5 e pH 4,5) com concentrações de 1, 2, 4 e 6mM de ácido benzóico – efeito do ácido benzóico sobre o crescimento
- d. YNB (pH 3,5 e 4,5) com concentrações de 1, 2, 4 e 6mM de ácido sórbico – efeito do ácido sórbico sobre o crescimento

Para além disso, com vista a comparar as várias estirpes numa situação em que estas tivessem sofrido previamente um processo de pré-adaptação aos ácidos fracos, juntamente com as células cultivadas na ausência de ácidos fracos testaram-se em simultâneo culturas das mesmas estirpes que sofreram um passo de pré-adaptação durante a noite a uma concentração não-lethal de ácido benzóico e ácido sórbico (1mM de ácido, pH 4,5) tal como descrito no Material e Métodos.

No caso específico das estirpe de *S. cerevisiae* a expressar o gene *ERG4*, por razões explicadas anteriormente, o meio base utilizado foi o meio mineral SC (“*Synthetic media*”), que, pese embora seja também um meio mineral, tem um conjunto de suplementos mais alargado e permitindo à partida o crescimento mais rápido e significativo da estirpe deletada e da estirpe transformada.

Os resultados obtidos para cada conjunto de estirpes para as quais foi possível obter transformantes expressando a proteína de interesse encontram-se exemplificados nas figuras abaixo (Figura 13, 14, 15, 16, 17 e 18) para as condições em que as diferenças fenotípicas entre as estirpes foram mais evidentes (1mM de ácido benzóico e ácido sórbico, pH 3,5 após uma ou duas semanas de incubação a 28°C). Em anexo apresentam-se os resultados obtidos para outras das condições testadas (Anexo VI).

De entre os vários transformantes/proteínas testadas comparativamente com a estirpe parental (BY4741) e o respetivo mutante de deleção, os resultados obtidos indicaram (i) não haver diferenças de crescimento das três estirpes em meio a pH 3,5 ou 4,5 (ver anexo VI), (ii) nem sempre houve evidências de um fenótipo claro de melhoria do crescimento da estirpe transformante face ao mutante de deleção ou à estirpe parental, e (iii) em alguns casos não foi evidente uma melhoria do crescimento da estirpe parental face ao mutante de deleção respetivo.



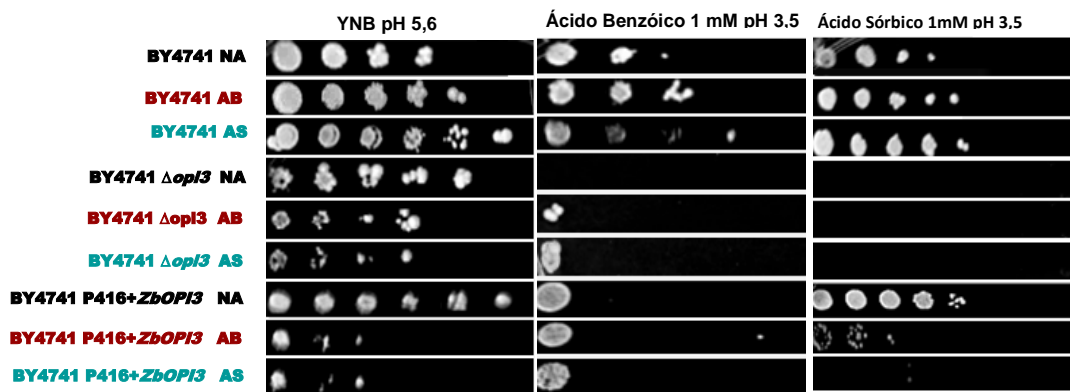
**Figura 13:** Drop-tests para *S. cerevisiae* BY4741, BY4741  $\Delta erg4$  e BY4741  $\Delta erg4$  a expressar o gene *ERG4* de *Z. bailii* ISA 1307 (na presença e ausência de ácido benzóico e ácido sórbico) para células não adaptadas aos ácidos (**NA – não adaptadas**), e células pré-adaptadas a **ácido benzóico (AB – adaptadas ao ácido benzóico)** e a **ácido sórbico (AS – adaptadas ao ácido sórbico)**. Crescimento registado após 1 semana de incubação a 28 °C.

Ao analisarmos os resultados obtidos no caso do *ERG4* (Figura 13), foi possível verificar uma clara diferença entre o comportamento da estirpe parental (BY4741) e a estirpe mutante com o gene deletado ( $\Delta erg4$ ), não se observando crescimento da estirpe BY4741  $\Delta erg4$  quando na presença de ácidos para nenhuma das diluições testadas quer em células não-adaptadas quer para células pré-adaptadas aos ácidos benzóico e sórbico, ao contrário do que se verificou para a BY4741. Pelo contrário, no caso do transformante verificou-se que o fenótipo de crescimento em cada um dos meios, apresentou um comportamento muito semelhante ao da BY4741, recuperando o fenótipo de crescimento da estirpe parental, e no caso de células pré-adaptadas a ácido sórbico verificou-se um ligeiro aumento do crescimento quando as células foram cultivadas em ácido benzóico. Estes resultados apontam no sentido de a expressão do gene *ERG4* ser essencial à resistência a ácidos fracos em *S. cerevisiae* mas por outro lado indicam também que as alterações induzidas pela expressão do gene *ERG4* de *Z. bailii* em *S. cerevisiae* não estão na origem a uma alteração da sua resistência a estes compostos, mantendo-se o seu comportamento na presença dos mesmos pese embora os indícios de alguma resistência cruzada observada.

A ausência de crescimento por parte da estirpe BY4741  $\Delta erg4$  na presença de ácidos fracos pode estar relacionada com as alterações provocadas pela deleção deste gene no processo de síntese de ergosterol, uma vez que a enzima codificada por este cataliza o último passo do processo de síntese deste composto (Abe e Hiraki, 2009).

Estando este composto envolvido na regulação de diversas funções da célula, tais como : a regulação da permeabilidade da membrana; a atividade de enzimas ligadas à membrana e taxa específica de crescimento das células (Brad *et al.*, 1978; Lees *et al.*, 1978; Lees *et al.*, 1995). A ausência de ergosterol na célula pode dar origem a uma maior sensibilidade à presença de ácidos fracos, resultando numa redução do crescimento das células.

No caso do gene *OPI3*, que codifica para uma enzima nos dois últimos passos da biossíntese dos fosfolípidos biossíntese fosfatidil metiltransferase, a diferença entre o comportamento das três estirpes (Figura 14) não foi idêntico ao que se observou no caso do gene *ERG4* (Figura 13).



**Figura 14:** Drop-tests para *S. cerevisiae* BY4741, BY4741  $\Delta$ *opi3* e BY4741  $\Delta$ *opi3* a expressar o gene *OPI3* de *Z. bailii* ISA 1307 (na presença e ausência de ácido benzóico e ácido sórbico) para células não adaptadas aos ácidos (NA – não adaptadas), e células pré-adaptadas a **ácido benzóico (AB – adaptadas ao ácido benzóico)** e a **ácido sórbico (AS – adaptadas ao ácido sórbico)**. Crescimento registado após 2 semana de incubação a 28 °C.

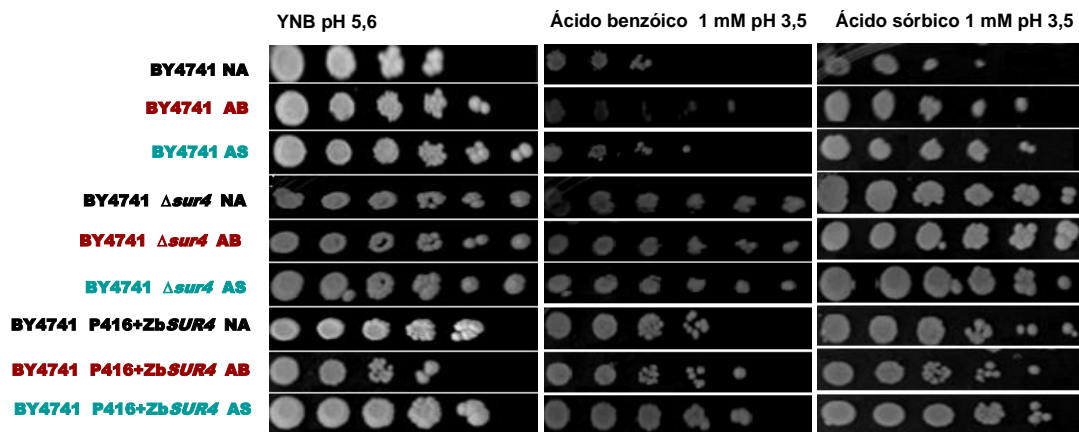
Relativamente ao gene *OPI3*, tal como se observou para o gene *ERG4*, ocorreu uma forte redução do crescimento por parte da estirpe mutante ( $\Delta$ *opi3*) relativamente à estirpe parental BY4741 na presença de ácidos, indicando que este gene é fundamental para a resistência aos ácido fracos. No entanto, também se verificou a redução do crescimento, embora de uma forma muito menos significativa, aquando na ausência de ácidos no meio.

A enzima codificada por este gene encontra-se diretamente envolvida no processo de síntese da fosfatidilcolina (PC) que é um dos principais fosfolípidos que constituem a membrana plasmática, e a sua deleção em leveduras provoca alterações nos níveis de diferentes fosfolípidos que constituem a membrana. As alterações provocadas nesta via devido à deleção deste gene dão origem a alterações do crescimento normal da estirpe e simultaneamente a uma perda de viabilidade das células (McGraw e Henry, 1989), o que pode justificar os resultados obtidos para esta estirpe.

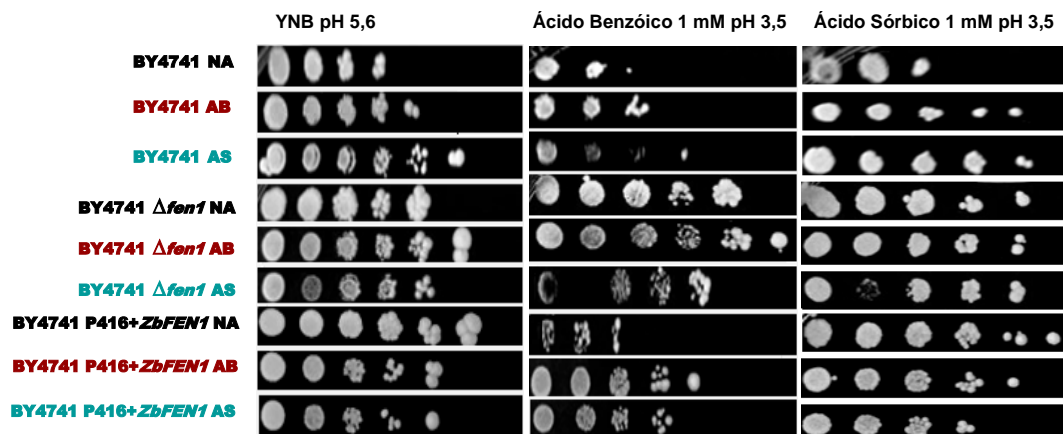
Relativamente ao transformante (BY4741  $\Delta$ *opi3* P416+*ZbOPI3*), observou-se um comportamento relativamente semelhante ao das células da estirpe  $\Delta$ *opi3*, com redução do crescimento face ao crescimento da estirpe parental tanto na presença de ácidos como na ausência dos mesmos, tanto em células adaptadas como em células não-adaptadas aos ácidos. O que nos indicou que não só a expressão do gene *ZbOPI3* em *S. cerevisiae* não alterou a sua resistência a estes compostos, como também não ocorreu uma total recuperação da viabilidade perdida devido à deleção do gene *ScOPI3*, uma vez que mesmo no meio sem adição de ácidos, tal como acontece com o  $\Delta$ *opi3*, houve uma redução do crescimento comparativamente com a BY4741. No entanto, comparando o crescimento observado no caso de células não-adaptadas em presença de ácido sórbico, verificou-se uma melhoria do fenótipo de crescimento face da estirpe expressando o gene *ZbOPI3* face ao

crescimento da estirpe parental na presença de ácido sórbico, indiciando um possível papel dos fosfolípidos de membrana de *Z. bailii* na maior resistência desta estirpe ao ácido sórbico muito embora não estejam implicados no processo de adaptação resultante da pré-incubação em ácido.

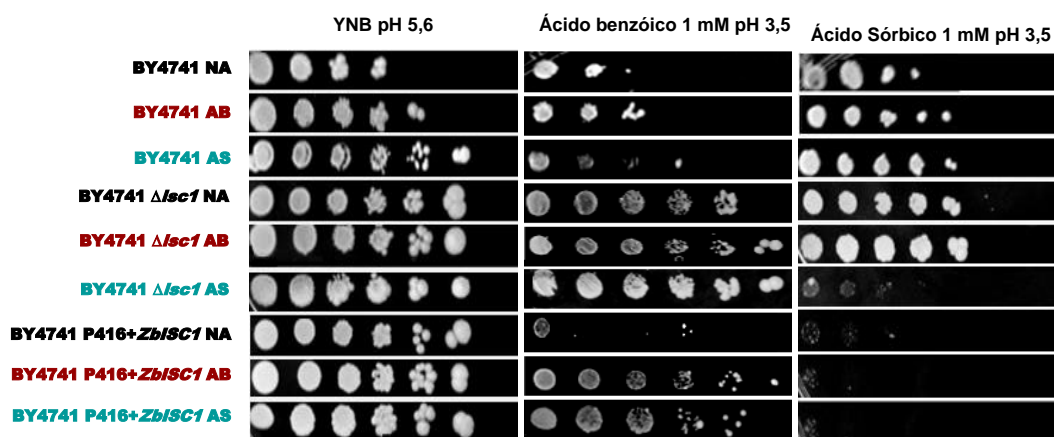
Os resultados obtidos com os genes *ZbFEN1*, *ZbSUR4* e *ZbISC1* foram muito semelhantes, tal como se pode observar pelas seguintes figuras (Figura 15, 16 e 17.).



**Figura 15:** Drop-tests para *S. cerevisiae* BY4741, BY4741  $\Delta sur4$  e BY4741  $\Delta sur4$  a expressar o gene *SUR4* de *Z. bailii* ISA 1307 (na presença e ausência de ácido benzóico e ácido sórbico) para células não adaptadas aos ácidos (NA – não adaptadas), e células pré-adaptadas a **ácido benzóico** (AB – adaptadas ao ácido benzóico) e a **ácido sórbico** (AS – adaptadas ao ácido sórbico). Crescimento registado após 2 semana de incubação a 28 °C.



**Figura 16:** Drop-tests para *S. cerevisiae* BY4741, BY4741  $\Delta fen1$  e BY4741  $\Delta fen1$  a expressar o gene *FEN1* de *Z. bailii* ISA 1307 (na presença e ausência de ácido benzóico e ácido sórbico) para células não adaptadas aos ácidos (NA – não adaptadas), e células pré-adaptadas a **ácido benzóico** (AB – adaptadas ao ácido benzóico) e a **ácido sórbico** (AS – adaptadas ao ácido sórbico). Crescimento registado após 2 semana de incubação a 28 °C.



**Figura 17:** Drop-tests para *S. cerevisiae* BY4741, BY4741  $\Delta isc1$  e BY4741  $\Delta isc1$  a expressar o gene *ISC1* de *Z. bailii* ISA 1307 (na presença e ausência de ácido benzóico e ácido sórbico) para células não adaptadas aos ácidos (NA – não adaptadas), e células pré-adaptadas a **ácido benzóico (AB – adaptadas ao ácido benzóico)** e a **ácido sórbico (AS – adaptadas ao ácido sórbico)**. Crescimento registado após 2 semana de incubação a 28 °C

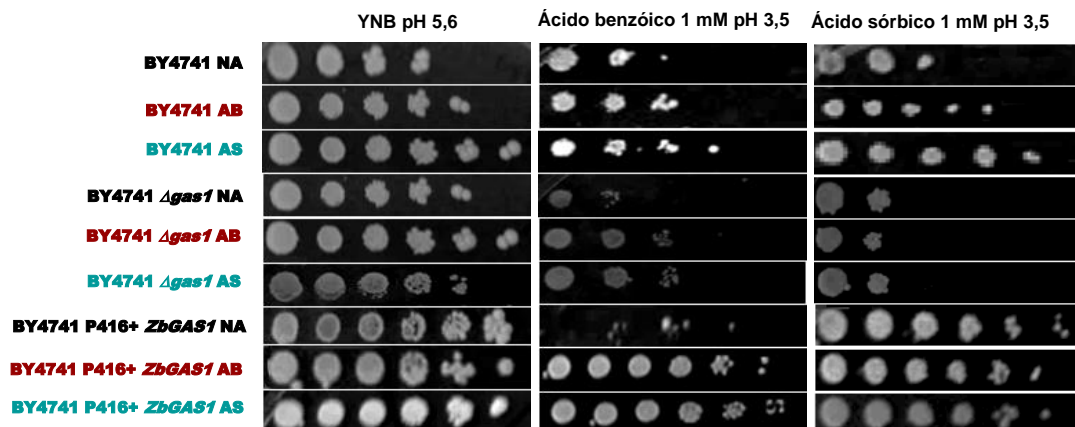
Ao analisarmos os resultados referentes a estes três genes (*ZbSUR4*, *ZbFEN1*, *ZbISC1*), verificou-se que em qualquer dos casos, a estirpe mutante ( $\Delta sur4$ ,  $\Delta fen1$ ,  $\Delta isc1$ ) quer na presença de ácido benzóico quer de ácido sórbico demonstrou ser mais resistente a estes compostos que a estirpe parental (BY4741), uma vez que no caso destas estirpes apresentou crescimento até à última ou penúltima diluição e no caso da BY4741 esta só cresce e com uma quantidade de biomassa muito inferior até à terceira diluição.

Relativamente ao comportamento dos transformantes, nos três casos *ZbSUR4*, *ZbFEN1* e *ZbISC1* as células adaptadas a ácido benzóico, estes apresentaram um fenótipo intermédio entre a BY4741 e as respetivas estirpes mutantes, isto é, cresceram mais significativamente que a estirpe parental, não crescendo no entanto tão bem quanto a estirpe BY4741  $\Delta sur4$ , BY4741  $\Delta fen1$  e BY4741  $\Delta isc1$  respetivamente. O que nos permitiu detetar a existência de alguma ação por parte das vias nas quais estão implicadas as três proteínas e dos seus produtos na resistência de *S. cerevisiae* aos ácidos.

O fenótipo apresentado pelos mutantes de deleção face ao fenótipo da estirpe parental parece, à partida, algo inesperado. No entanto, recentemente Rego e colaboradores (2012) descreveram um fenótipo similar para o mutante  $\Delta isc1$  em presença de ácido acético, referindo o papel da ceramida na indução de apoptose em consequência do aumento dos níveis de mitocôndrias não-funcionais e o papel do ácido acético na indução do aumento dos níveis de biossíntese ceramida e consequentemente na indução de maiores níveis de apoptose em células com o gene *ISC1* intacto (Rego *et al.*, 2012). No caso específico do ácido benzóico, é possível que o mesmo aconteça levando à perda de viabilidade da estirpe parental

em consequência do aumento dos níveis de ceramida e à perda parcial da viabilidade das células em presença do ácido, o mesmo se podendo postular para os genes *FEN1* e *SUR4*, em presença de ácido sórbico e ácido benzóico, ambos igualmente envolvidos na via de biossíntese de esfingolípido que funcionam como precursores da ceramida.

No que se refere ao gene *ZbGAS1*, os resultados obtidos foram diferentes de todos os restantes, estando estes representados na Figura 18.



**Figura 18:** Drop-tests para *S. cerevisiae* BY4741, BY4741  $\Delta gas1$  e BY4741  $\Delta gas1$  a expressar o gene *GAS1* de *Z. bailii* ISA 1307 (na presença e ausência de ácido benzóico e ácido sórbico) para células não adaptadas aos ácidos (**NA – não adaptadas**), e células pré-adaptadas a **ácido benzóico (AB – adaptadas ao ácido benzóico)** e a **ácido sórbico (AS – adaptadas ao ácido sórbico)**. Crescimento registado após 2 semana de incubação a 28 °C.

Nos resultados obtidos referentes ao gene *GAS1*, observou-se diferenças ao nível do crescimento nos meios com ácidos entre as três estirpes em estudo. Ocorrendo um crescimento menos acentuado por parte da estirpe mutante comparativamente quer à estirpe parental quer comparando com o transformante, o que nos permitiu verificar que a ausência de *Gas1* aumenta a sensibilidade de *S. cerevisiae* aos ácidos fracos. Para além disso, ao contrário do que acontece com a estirpe mutante, a estirpe transformante não só cresce mais acentuadamente que o próprio mutante como cresce também melhor que a estirpe parental nos meios com ácido, sendo esse resultado mais notório em células adaptadas ao ácido sórbico e no meio com ácido sórbico.

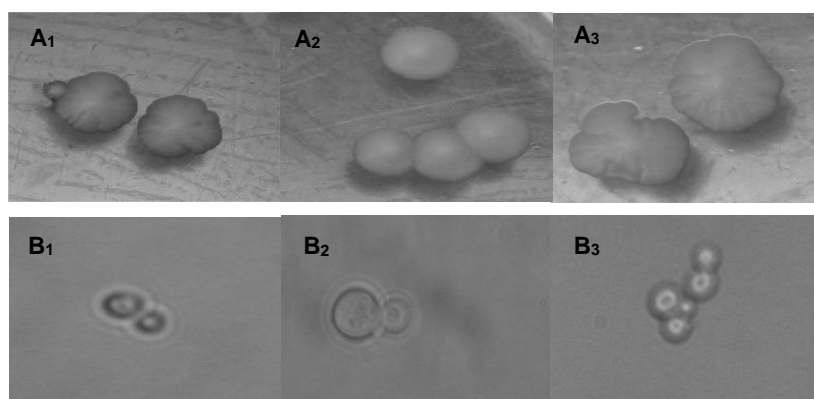
A proteína codificada por este gene, encontra-se envolvida no processo de síntese de um dos principais componentes da camada interna da parede celular,  $\beta$ -1,3-glucano, atuando mais precisamente na formação das ramificações que constituem este polissacarídeo, estando por isso envolvido na manutenção da rigidez e força mecânica que caracterizam a parede celular (Kliis *et al.*, 2012). A deleção deste gene, provoca entre outras alterações uma alteração da estrutura da célula, dando origem a células anormalmente redondas, bem como provoca

alterações na sensibilidade das células a determinadas drogas que indica uma possível ação deste gene na proteção da célula (Popolo *et al.*, 1993).

Após o rastreio inicial do efeito da expressão dos genes de *Z. bailii* em *S. cerevisiae* na sua resistência aos ácidos fracos, foi selecionado aquele que apresentou um efeito mais significativo no aumento da sua resistência aos mesmos. De acordo com os resultados obtidos, o gene de *Z. bailii* selecionado como gene cuja expressão em *S. cerevisiae* demonstrou de forma mais clara um efeito positivo, no aumento da sua resistência aos ácidos fracos foi o gene *GAS1*, sendo o restante trabalho prosseguido com este gene. Para além disso, e uma vez que os resultados mais evidentes foram obtidos em presença de ácido sórbico pH 3,5, escolheu-se esta condição para prosseguir.

#### 4. Macro e Micromorfologia das estirpes

Uma vez que Gas1 é uma proteína descrita como estando envolvida na biossíntese de componentes da parede e dado o papel da parede no estabelecimento e manutenção da forma da célula que se pode igualmente traduzir em modificações da morfologia das colónias em meio sólido, procurou-se observar possíveis alterações na macro e micromorfologia, comparando o comportamento das três estirpes (estirpe parental, BY4741  $\Delta gas1$  e estirpe transformada) (Figura 19).



**Figura 19:** Macro (A) e Micromorfologia (B) da estirpe parental (1), estirpe mutante BY4741  $\Delta gas1$  (2) e transformante BY4741  $\Delta gas1 + ZbGAS1$  (3)

A nível de macromorfologia, observou-se que no caso da estirpe deletada as colónias desta estirpe apresentam uma forma arredondada, com uma margem inteira (Figura 19, A2) ao passo que a estirpe parental apresenta colónias com uma forma de geometria menos definida e uma margem recortada (Figura 19 A1). Por outro lado, microscopicamente as células sem Gas1 têm maiores dimensões, uma forma redonda e uma parede pouco espessa (Figura 19 B2) ao passo que as células da estirpe parental apresentam uma forma mais oval, com uma

parede espessa. Ambas as observações vêm ao encontro do que está descrito na literatura que refere que um dos efeitos provocados pela deleção do gene *GAS1* em *S. cerevisiae* é a apresentação de uma estrutura anormalmente redonda por parte da célula em resultado da alteração da sua parede celular (Warth, 1989; Paolo *et al.*, 1993).

Na presença de ZbGas1 verifica-se a recuperação do fenótipo parental, quer ao nível da macromorfologia das colónias, em que se observa que as colónias voltam a apresentar uma forma e margem semelhante à apresentada pela estirpe parental (BY4741) (Figura 19, A<sub>3</sub>), quer ao nível micromorfológico, com as células da estirpe transformante (BY4741  $\Delta$ gas1 P416+ZbGAS1), apresentando uma estrutura relativamente mais ovaladas e células de menores dimensões que as da estirpe mutante.

A observação da micro e macromorfologia das três estirpes em estudo, permitiu assim constatar a existência de diferenças a nível de morfologia, em particular micromorfologia, entre as três estirpes, o que serviu como um primeira indicação da existência de um efeito da expressão deste gene de *Z. bailii* na morfologia e consequentemente estrutura do envelope de *S. cerevisiae*.

## **5. Efeito dos ácidos fracos nos parâmetros de crescimento e pH extracelular em meio líquido**

Partindo desta seleção, de forma a obter dados quantitativos sobre o efeito da expressão deste gene no crescimento de *S. cerevisiae* quando na presença de ácidos fracos, foi analisado o crescimento da estirpe parental (BY4741), da estirpe com o gene deletado (BY4741  $\Delta$ gas1), e do respetivo transformante (BY4741 P416 + ZbGAS1) em dois meios base de cultura diferentes: meio mineral mínimo YNB (pH 3,5) e sumo de maçã (pH 3,42). Tendo sido estudado o crescimento de cada uma das estirpes referidas, em cada um dos meios bases em diferentes condições: sem adição de ácidos e com 1 mM de ácido benzóico e com 1 mM de ácido sórbico.

Tal como previamente descrito, *Z. bailii* é considerada como uma das maiores ameaças para produtos alimentares mais ácidos e ou com concentrações de açúcares mais elevadas, como é o caso dos sumos de fruta (Steels *et al.*, 1999).

Por esse motivo, decidiu-se testar o efeito da expressão deste gene não apenas em meio mineral YNB mas também em sumo, neste caso no Sumo de maçã (Compal), devido à sua limpidez que nos permitiu o acompanhamento do crescimento das três estirpes neste meio através da avaliação da Densidade Ótica.

Para a realização destes ensaios uma vez que se pretendia avaliar a capacidade de crescimento numa situação próxima da real simulando uma situação de contaminação de uma

bebida no momento do embalamento, não se procedeu a uma prévia adaptação das células aos ácidos fracos. Desta forma, partiu-se de um pré inóculo inicial em meio mineral YNB em plena fase exponencial de crescimento, a partir do qual quando se inóculou-se cada um dos meios em estudo.

Para além de se testarem dois meios de cultura (um laboratorial e uma bebida presente no mercado), testou-se ainda o efeito da carga microbiana inicial na capacidade de crescimento das estirpe. Assim, para cada um dos meios foram testados três inóculos diferentes ( $DO_{640nm}$  iniciais 0,1; 0,01 e 0,001).

Para cada condição procedeu-se a uma avaliação periódica da  $DO_{640nm}$  e da concentração de glucose em cada meio, durante o período de tempo necessário até à estabilização dos valores da  $DO_{640nm}$  (entrada em fase estacionária) e ou até ao esgotamento de açúcares.

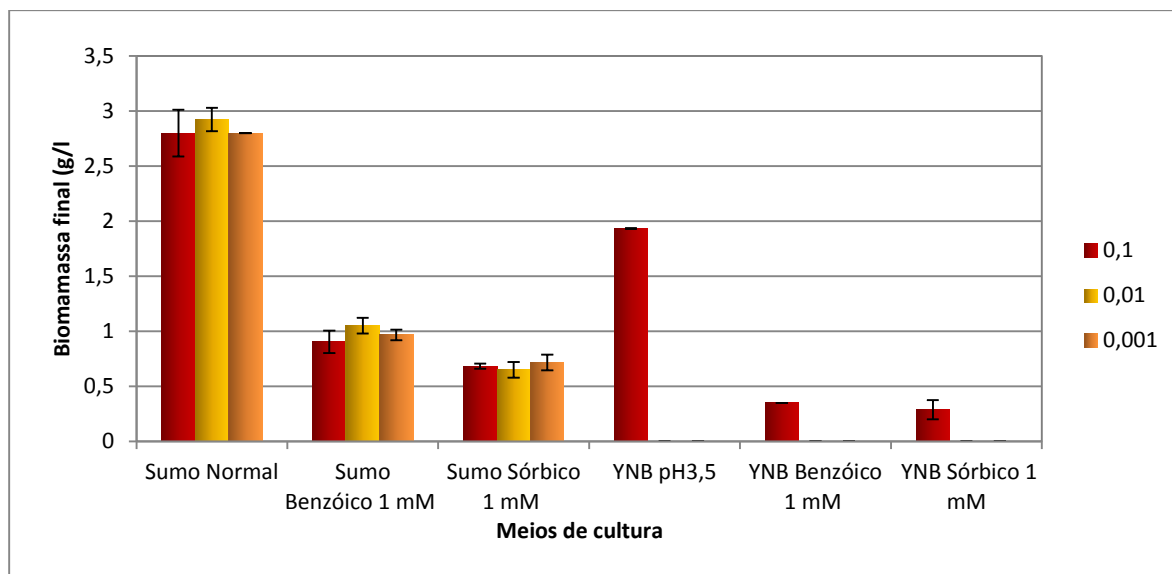
Uma vez estabilizado o valor da  $DO_{640nm}$  e ou tendo ocorrido um esgotamento dos açúcares, procedeu-se à avaliação de uma série de parâmetros para cada uma das condições testadas tais como: Biomassa final produzida, Açúcar residual e pH extracelular, tendo-se posteriormente calculado também o Rendimento em biomassa em relação à fonte de carbono e energia (biomassa final/açúcares consumidos).

### **5.1. Efeito do inóculo e meio de cultura**

A biomassa final (g/l) produzida para cada meio, para cada estirpe e cada condição de biomassa inicial foi determinada em termos de peso seco das culturas após atingida a fase estacionária (Figura 20, 21, 22). Com base neste valor e no valor obtido simultaneamente para a concentração de açúcares residuais/açúcares consumidos, foi possível calcular o valor de rendimento em biomassa em relação à fonte de carbono e energia, em termos de gramas de biomassa produzida por grama de açúcar consumido (Figura 23, 24 e 25).

Como forma de se observar em simultâneo o efeito do meio de cultura e o efeito do inóculo sobre cada um destes parâmetros, efetuou-se a comparação destes valores para cada estirpe em cada uma das seis condições testadas com cada um dos inóculos efetuados.

Em ambos os meios de cultura, tal como esperado (Pampulha e Loureiro Dias, 2000) a biomassa produzida foi sempre superior nos meios sem adição de ácidos, muito embora significativamente mais elevada em sumo em virtude provavelmente de ser um meio mais rico. Apesar disso, a redução a biomassa para as duas situações é similar para cada uma das estirpes.



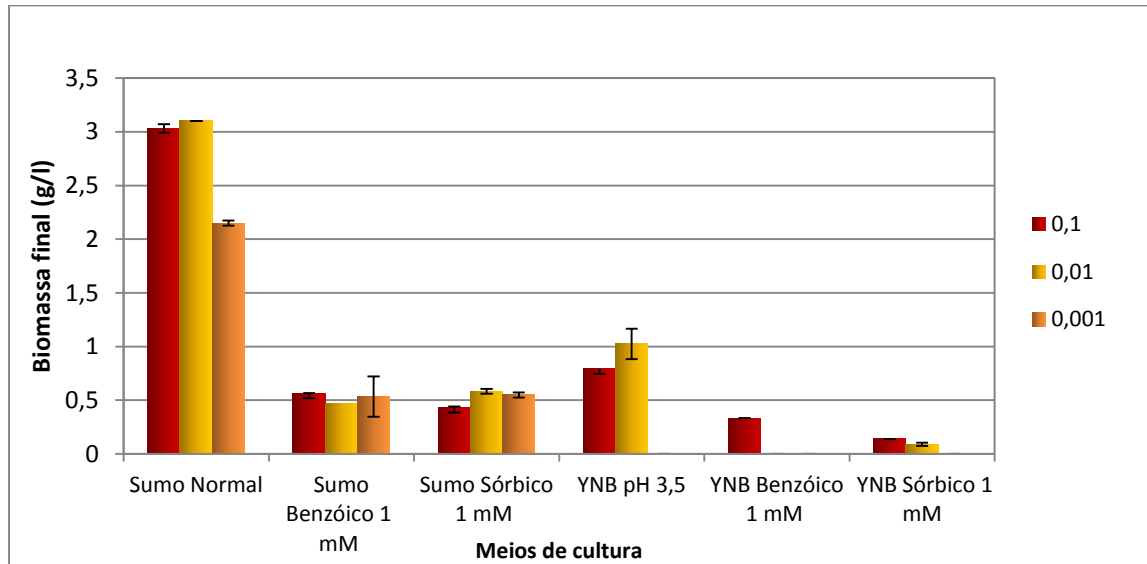
**Figura 20:** Biomassa final produzida pela estirpe *S. cerevisiae* BY4741 em cada uma das seis condições testadas, e para cada um dos inóculos usado.

De acordo com a análise da Figura 20, os resultados obtidos para o efeito do inóculo em sumo e em meio mineral é substancialmente diferente, na medida em que em sumo os valores obtidos para a biomassa final são muito semelhantes entre si não se verificando uma diferença significativa em função da densidade inicial da cultura ao passo que no caso do meio mineral YNB apenas se verificou crescimento com o inóculo mais elevado, indicando um claro efeito do mesmo no crescimento desta estirpe neste meio. Este resultado vem ao encontro dos resultados obtidos para a viabilidade celular que indicam uma perda quase total da capacidade de formação de colónias desta população após incubação em meio mineral com ácido benzóico ou ácido sórbico.

No caso da estirpe BY4741  $\Delta gas1$  (Figura 21), o comportamento da estirpe em sumo e em YNB sem ácidos é consistente com as diferenças entre as concentrações de açúcares presentes nos dois meios, sendo a biomassa mais elevada no meio em que os açúcares estão presentes em maior concentração. Por outro lado, em sumo ao contrário do que aconteceu com a estirpe BY4741, verificaram-se diferenças do valor de biomassa final produzida em função do inóculo inicial com a biomassa produzida pelo inóculo mais fraco (0,001) a registar um valor inferior aos restantes inóculos testados.

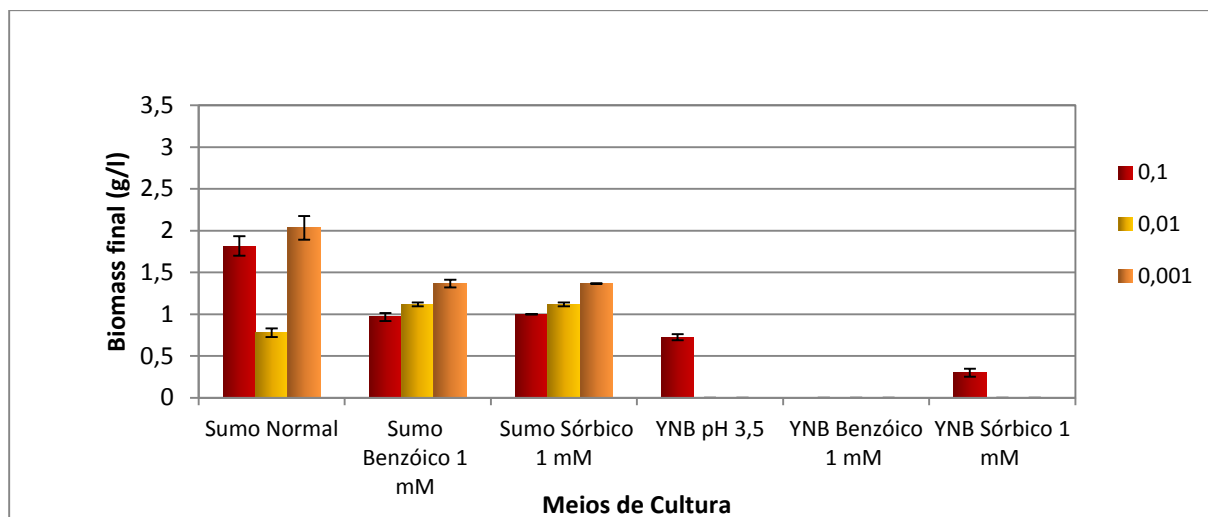
Em presença de ácidos fracos, à semelhança do que havia sido observado para a estirpe parental, quer no caso do sumo de maçã quer no caso do meio mineral houve uma redução drástica da biomassa final obtida. No entanto, no caso do crescimento em YNB essa redução foi relativamente menos acentuada face à situação de crescimento em meio sem ácidos. Apesar da redução observada, os resultados obtidos nesta estirpe em meio sumo de maçã

com ácidos não revelaram um efeito do inóculo, tendo-se obtido valores de biomassa final semelhantes para os três inóculos utilizados. No caso do crescimento em meio YNB, o efeito do inóculo foi claramente visível, não se observando crescimento para os inóculos iniciais mais baixos ao contrário do que se verificou no sumo.



**Figura 21:** Biomassa final produzida pela estirpe *S. cerevisiae* BY4741  $\Delta$ gas1 em cada uma das seis condições testadas, e para cada um dos inóculos usado.

No caso da estirpe transformante (Figura 22), os valores obtidos para a biomassa final quer em sumo quer em YNB sem ácidos, foram relativamente baixos sobretudo se atendermos a que no sumo a quantidade de açúcares disponíveis é 5x maior (10% de açúcares no sumo de maçã face a 2% em YNB). Ao contrário do que seria de esperar, em sumo de maçã em presença de ácido benzóico e de ácido sórbico, observou-se um aumento dos valores de biomassa final, com o decréscimo da quantidade de inóculo introduzida, não se encontrando à partida qualquer explicação plausível para este fato. Esta variação apenas se observou em sumo, uma vez que tal como aconteceu anteriormente para a BY4741 em meio mineral YNB apenas se obteve crescimento nos meios inoculados com mais biomassa inicial (0,1), e mesmo neste caso, no meio com adição de ácido benzóico, não se observou o crescimento.



**Figura 22:** Biomassa final produzida pela estirpe *S. cerevisiae* BY4741 P416+ZbGAS1 em cada uma das seis condições testadas, e para cada um dos inóculos usado.

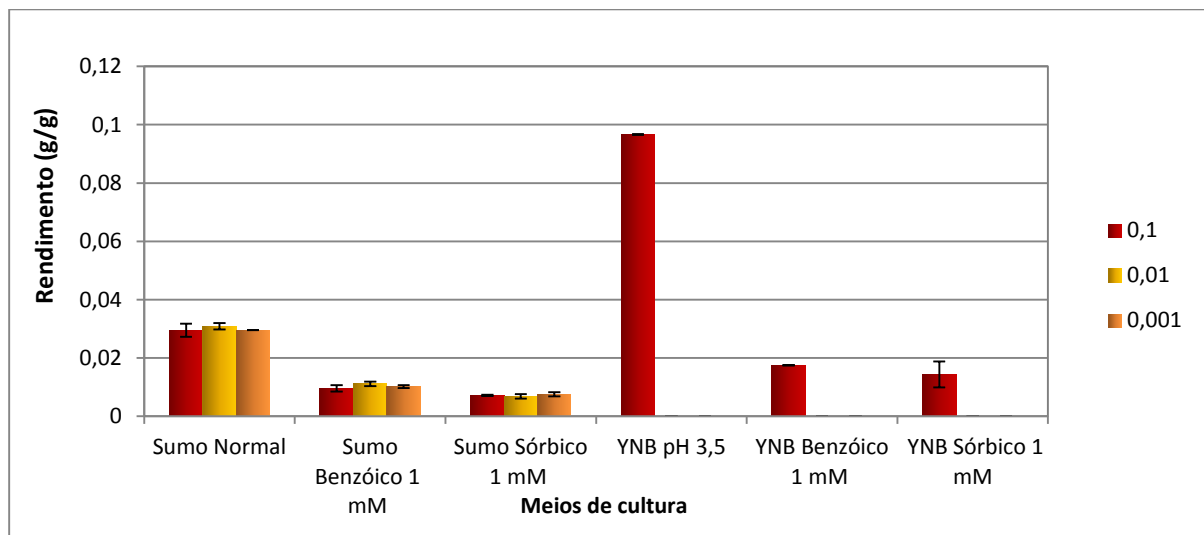
Uma vez que está descrito na literatura que um dos efeitos do stress provocado por ácidos fracos é a redução do rendimento em biomassa em função da fonte de carbono consumida (Lambert e Stratford, 1999; Quintas *et al.*, 2005) em virtude do desvio do ATP produzido da produção de biomassa para a manutenção das células, procurou-se comparar o efeito da presença de ácido benzóico e ácido sórbico no rendimento em biomassa em relação à fonte de carbono.

Para tal, recolheram-se amostras de sobrenadante no final do crescimento (esgotamento da glucose no caso do YNB ou duas  $DO_{640nm}$  iguais correspondendo à entrada em fase estacionária para YNB e sumo de maçã) para determinação da quantidade de açúcar residual nos dois meios para as três condições de biomassa inicial testadas com o objetivo de calcular o rendimento nas várias condições testadas (Figuras 23, 24 e 25).

Os resultados para os rendimentos da estirpe BY4741 foram em termos qualitativos muito semelhantes aos da biomassa final, verificando-se que em sumo não se observaram grandes diferenças acentuadas neste parâmetro em função do inóculo inicial quer em sumo de maçã, quer em sumo de maçã com ácidos benzóico e sórbico. Apesar de não se observar efeito do inoculo inicial, em presença de ácidos observou-se uma redução significativa do rendimento face ao rendimento obtido na ausência de ácidos fracos, sendo o efeito mais acentuado na presença de ácido sórbico (na ordem dos 60% em presença de ácido benzóico e na ordem dos 75% em presença de ácido sórbico) reforçando a ideia de uma redução da energia disponível para o crescimento, o que está de acordo com o descrito na literatura.

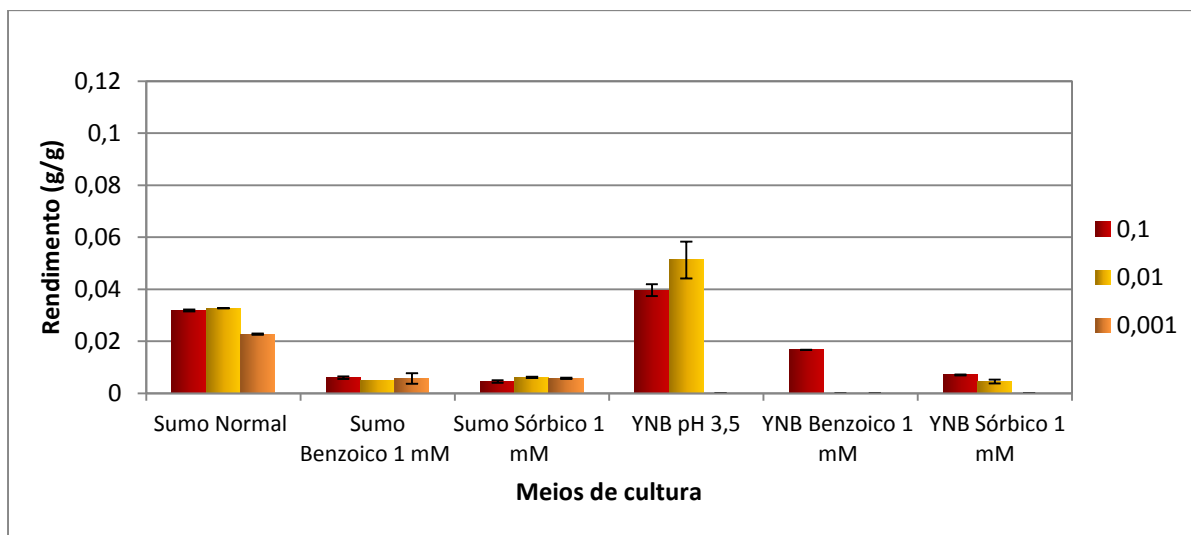
Em meio YNB dado que as culturas apenas foram capazes de crescer nos casos em que o inóculo inicial foi maior ( $DO_{640nm}$  0,1) apenas foi possível calcular o rendimento para esta

situação. A partir dos resultados obtidos, é no entanto possível observar que houve uma redução acentuada do rendimento em biomassa em presença de ácido, ainda mais acentuada do que a que se havia observado em sumo de maçã apesar de no caso do meio YNB não se observar uma diferença notória entre o rendimento obtido em presença dos dois ácidos (cerca de 82% no caso do ácido benzóico e 86% no caso do ácido sórbico).



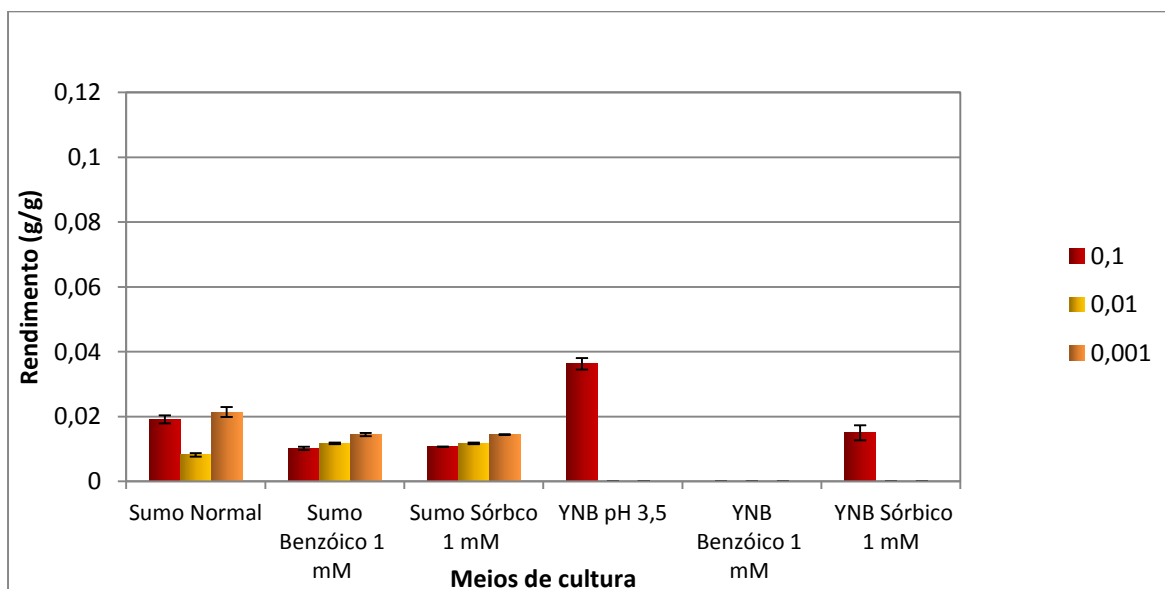
**Figura 23:** Rendimento em biomassa em função da fonte de carbono e energia (g/g) obtido para a estirpe *S. cerevisiae* BY4741 em cada uma das seis condições testadas, por cada um dos inóculos em estudo

No caso da estirpe BY4741  $\Delta gas1$ , os resultados obtidos relativamente ao rendimento, e à semelhança do observado para a estirpe parental, apresentaram uma correlação direta com os seus valores de biomassa final. No caso do meio de sumo de maçã, o efeito do inóculo apenas foi observável na ausência de ácidos, tendo sido os valores de rendimento significativamente menores em presença de ácidos neste meio, mas não se tendo observado qualquer efeito do inóculo inicial. Em meio YNB, tal como para a estirpe parental, não se observou crescimento para os casos em que os inóculos iniciais foram menores, não sendo possível calcular o rendimento nestes casos. Para o inóculo inicial mais forte, o rendimento obtido em meio YNB sem ou com ácidos fracos foi superior ao obtido em meio com sumo, registando-se uma diminuição do rendimento em presença de ácidos fracos tal como seria de esperar.



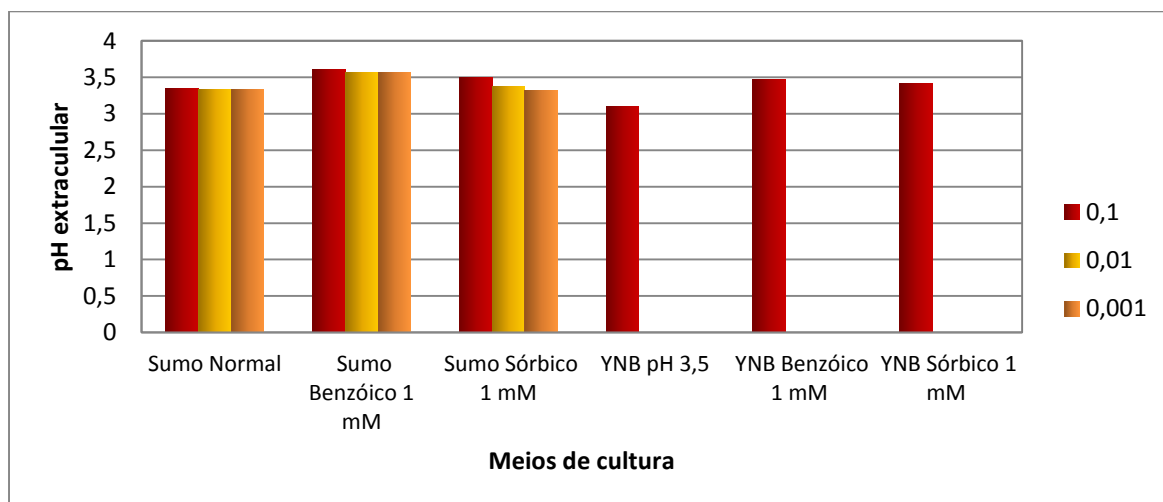
**Figura 24:** Rendimento em biomassa em função da fonte de carbono e energia (g/g) obtido para a estirpe *S. cerevisiae* BY4741  $\Delta gas1$  em cada uma das seis condições testadas, por cada um dos inóculos em estudo

Em relação à estirpe transformada contendo o gene *ZbGAS1*, verificou-se igualmente uma correlação entre a biomassa produzida (Figura 22) e o rendimento calculado (Figura 25). Da mesma forma, tal como para a biomassa final, em sumo de maçã com ácido benzoico e ácido sórbico voltou a registar-se a situação anómala de um aumento do rendimento em função da biomassa com a redução do inóculo, que muito embora seja ligeiro parece ser consistente em ambos os casos.



**Figura 25:** Rendimento em biomassa em função da fonte de carbono e energia (g/g) obtido para a estirpe *S. cerevisiae* BY4741  $\Delta gas1$  P416+*ZbGAS1* em cada uma das seis condições testadas, por cada um dos inóculos em estudo

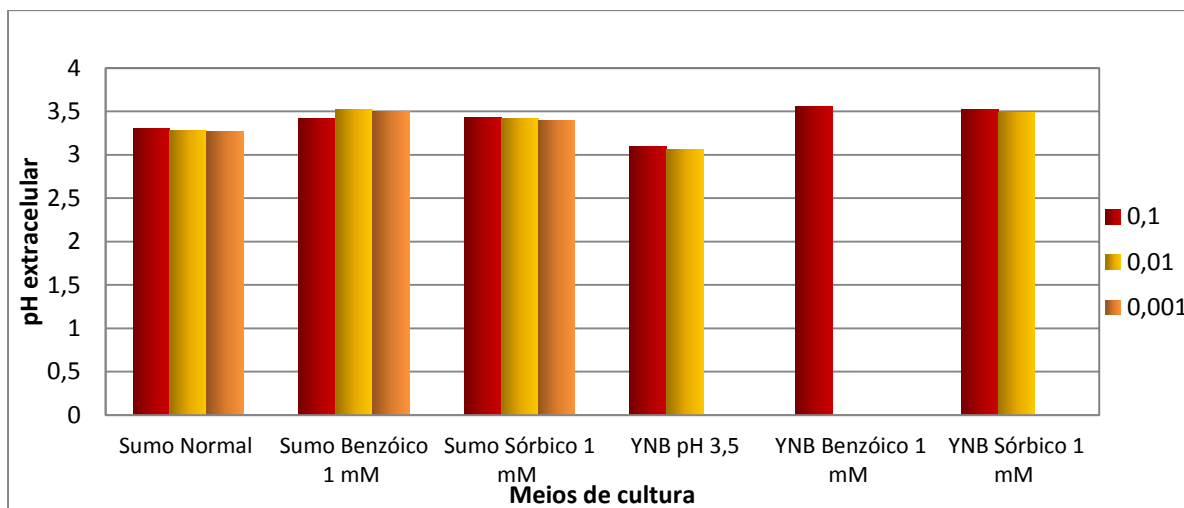
Para além da avaliação dos parâmetros anteriormente referidos (biomassa e rendimento), determinou-se também para cada uma das condições testadas o valor do seu pH extracelular após atingir a fase estacionária (Figuras 26, 27, 28), de forma a ser possível comparar as possíveis alterações deste parâmetro entre os diferentes inóculos para cada estirpe dado que os ensaios não foram realizados a pH controlado.



**Figura 26:** Valores de pH extracelular da BY4741, para cada inóculo em cada uma das seis condições testadas.

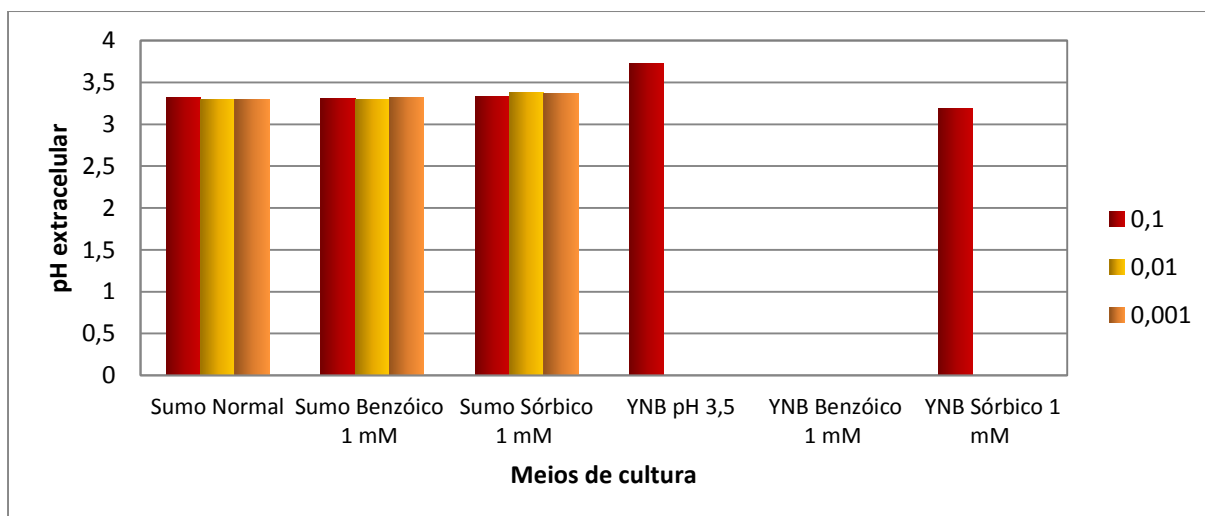
Os valores de pH extracelulares obtidos para cada um dos inóculos, em sumo, não apresentaram alterações acentuadas muito embora se tenha observado um ligeiro aumento nos meios com ácido (3,35 em sumo de maçã sem ácido versus 3,6 em sumo de maçã com ácido benzóico, inóculo  $DO_{640nm}$  0,1). No caso dos valores obtidos em meio YNB, apesar de apenas ter havido crescimento para o primeiro inóculo, obtiveram-se também valores muito semelhantes entre os meios com e sem adição de ácido, e um pequeno aumento do valor de pH extracelular para meio YNB com ácidos.

Os resultados obtidos para a estirpe mutante ( $\Delta gas1$ ) (Figura 27) foram quase idênticos aos obtidos pela estirpe parental, não tendo sido observadas grandes diferenças acentuadas nos valores de pH extracelular entre inóculos diferentes, e sendo os valores obtidos nos meios sem adição de ácidos inferiores aos valores presentes nos meios com ambos os ácidos fracos em estudo.



**Figura 27:** Valores de pH extracelular da BY4741  $\Delta_{gas1}$ , para cada inóculo em cada uma das seis condições testadas.

No caso do transformante, à semelhança do que aconteceu com as restantes estirpes, os resultados obtidos não demonstraram existir diferenças neste parâmetro relativamente aos diferentes inóculos, mantendo-se os valores de pH extracelular entre 3,3 e 3,5 para todos os meios e independentemente do inóculo inicial.



**Figura 28:** Valores de pH extracelular da BY4741  $\Delta_{gas1}$  P416+ZbGAS1, para cada inóculo em cada uma das seis condições testadas.

## 5.2. Comparação entre estirpes

Um ponto comum nos resultados obtidos para cada uma das estirpes em estudo foi a ausência de crescimento em meio YNB dos inóculos mais fracos testados, crescendo apenas quando o inóculo foi 0,1 na maioria das situações. Este fato pode estar relacionado com a percentagem de perda de viabilidade inicial da cultura em presença dos ácidos, que ocorreu em cada um dos casos nestes meios que foi da ordem de 90%. Uma redução da viabilidade desta ordem de grandeza poderá ter como resultado uma redução do número de células presente no meio tão acentuada que praticamente não restem células metabolicamente ativas suficientes para o arranque do crescimento.

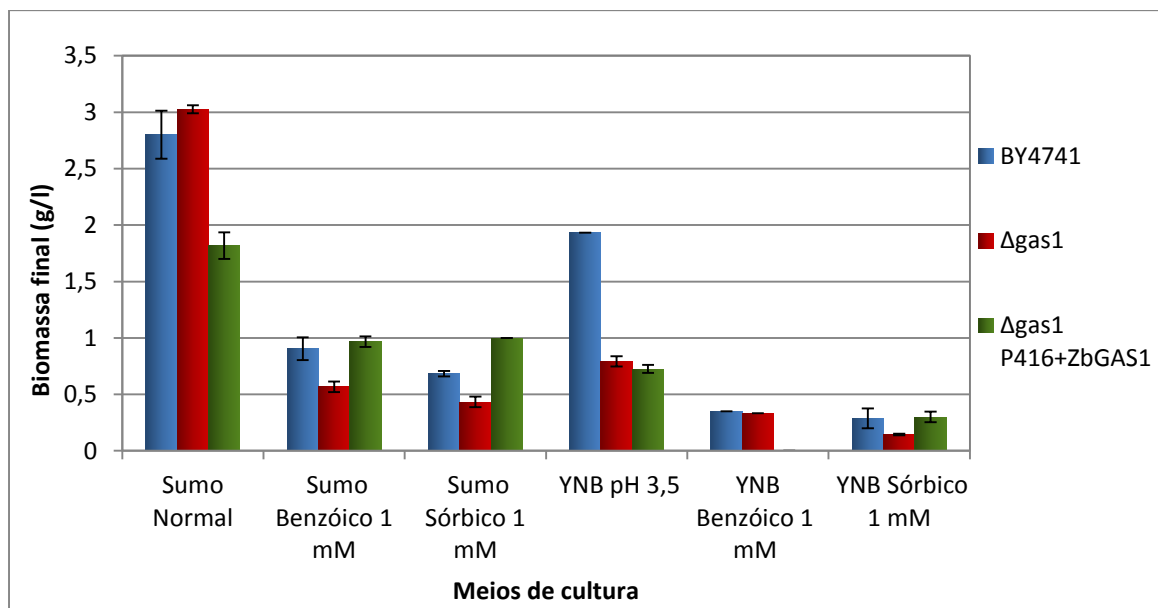
Em termos globais verificou-se que o rendimento era mais baixo em sumo que em YNB. Uma vez que o sumo (meio rico) é composto por cinco vezes mais açúcares que o YNB (meio mínimo) seria de esperar que a biomassa final e respetivo rendimento fossem cinco vezes superiores em sumo do que em YNB, fato que não aconteceu, levando a conclusão de que em sumo o fator que limita o crescimento das estirpes não será o açúcar mas sim outro dos seus componentes. O que justifica que por vezes a entrada em fase estacionária em sumo tenha ocorrido antes do esgotamento de todos os açúcares presentes no meio (Glucose e Frutose).

A análise destes resultados permitiu para além disso estabelecer uma correlação direta entre os valores de biomassa final obtidos e o rendimento para cada uma das estirpes, as diferenças entre inóculos, bem como as diferenças entre meios com e sem adição de ácidos, foram muito semelhantes para a biomassa final e rendimento de cada estirpe.

Para além da avaliação do efeito do inóculo no crescimento de cada estirpe, pretendeu-se acima de tudo com estes ensaios determinar o efeito da expressão do gene *GAS1* de *Z. bailii* no crescimento de *S. cerevisiae* na presença de ácidos fracos avaliando-se dessa forma o efeito da expressão deste gene na resistência de *S. cerevisiae* a estes compostos.

Para tal, escolheu-se então o inóculo com o qual se observou crescimento em todas as condições para as três estirpes, e comparou-se os valores de biomassa final e rendimento obtidos (Figura 29 e Figura 30).

A comparação dos valores de biomassa final obtidos para cada uma das estirpes (Figura 28) permitiu primeiramente observar uma redução da biomassa final produzida em todas as estirpes no meio com adição de ácidos comparativamente ao meio sem ácidos, sendo no entanto essa redução mais drástica para umas estirpes do que para outras.



**Figura 29:** Representação da biomassa final da estirpe parental (BY4741), estirpe mutante ( $\Delta gas1$ ) e respetivo transformante ( $\Delta gas1$  P416+ZbGAS1)

Esse fato é mais notório quando comparamos diretamente o comportamento da estirpe parental (BY4741) com o do transformante ( $\Delta gas1$  P416+ZbGAS1), uma vez que tanto em sumo sem ácidos como em YNB pH 3,5 a estirpe parental apresentou valores muito superiores aos obtidos pelo transformante. No entanto, em presença de ácidos em ambos os meios a redução de biomassa produzida foi muito superior para a BY4741 do que para  $\Delta gas1$  P416+ZbGAS1.

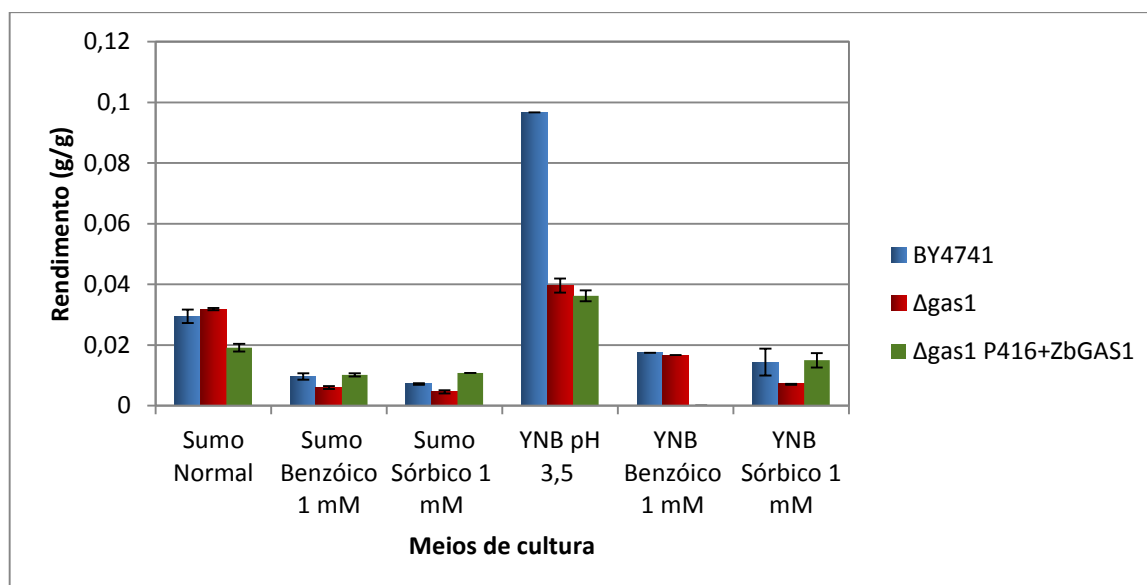
De forma a permitir uma análise mais clara da redução de biomassa final produzida quando em presença de ácidos, e ser possível uma melhor comparação dos valores obtidos para cada estirpe, calculou-se para cada uma a percentagem de redução de biomassa entre o sumo normal (100%) e os meios com adição de ácido (sumo benzóico 1 mM e sumo sórbico 1 mM), estando esses valores representados na tabela 11

**Tabela 11:** Percentagem de redução de biomassa final de cada estirpe do Sumo normal (100%) para os meios de sumo com adição de ácido.

% Redução de Biomassa final			
Ácido fraco adicionado	Estirpes		
	BY4741	$\Delta gas1$	$\Delta gas1$ P416+ZbGAS1
Ácido benzóico	68	81	47
Ácido sórbico	75	86	44

A análise dos valores apresentados na tabela 11, permitiu-nos confirmar os resultados obtidos a partir da figura 29. Comparativamente com a estirpe parental e com a estirpe mutante em meio de sumo de maçã sem ácidos e com ácidos, o transformante sofreu uma redução de biomassa final muito inferior, o que nos indicou que a nível de biomassa final produzida esta estirpe foi menos afetada que as restantes.

Para a confirmação dos resultados acima descritos, e dado o feito no rendimento descrito por vários autores (Lambert e Stratford, 1999; Quintas *et al.*, 2005) realizou-se a mesma análise em relação aos valores de rendimento obtidos para cada estirpe, verificando-se se existe ou não uma correlação direta entre os valores de biomassa final e de rendimento (Figura 30).



**Figura 30:** Representação dos valores de rendimento (g/g) da estirpe parental (BY4741), estirpe mutante ( $\Delta gas1$ ) e respetivo transformante ( $\Delta gas1$  P416+ZbGAS1).

Apesar de, olhando para os dados apresentados na Figura 30, no meio de sumo de maçã as diferenças observadas no caso da biomassa final não serem tão evidentes, pode-se igualmente verificar uma maior redução do rendimento da estirpe parental e respetiva estirpe mutante em sumo de maçã com adição de ácido comparativamente com o sumo de maçã sem ácido benzóico e ácido sórbico, do que a redução do rendimento sofrida pela estirpe transformante.

Tal como foi calculado para a biomassa final, calculou-se também para cada estirpe a percentagem de redução de rendimento entre o sumo normal (100%) e o sumo com adição de ácido (Tabela 12).

**Tabela 12:** Percentagem de redução de rendimento de cada estirpe do Sumo normal (100%) para os meios de sumo com adição de ácido.

<b>% Redução de Rendimento</b>			
<b>Ácido fraco adicionado</b>	<b>Estirpes</b>		
	BY4741	$\Delta gas1$	$\Delta gas1$ P416+ZbGAS1
Ácido benzóico	68	81	46
Ácido sórbico	76	86	43

A avaliação dos resultados obtidos, permitiu-nos a confirmação dos resultados obtidos através da análise da redução de biomassa final, verificando-se novamente que em comparação com as restantes estirpes, em termos qualitativos a estirpe transformante expressando o gene *ZbGAS1* foi a que sofreu menor redução de rendimento em presença de ácidos. Para além disso, analisando os valores obtidos, foi possível ainda observar uma redução similar dos rendimentos em biomassa obtidos em comparação com os valores obtidos para a redução da biomassa, confirmando a correlação que havia sido observada entre a biomassa final da cultura e o rendimento obtido em sumo de maçã.

Estes mesmos valores de redução relativa de biomassa e rendimento em biomassa foram calculados para o meio YNB pH 3,5 (100%), mas apenas fazendo a comparação entre o meio sem e com adição de ácido sórbico (Tabela 13 e Tabela 14), uma vez que a estirpe transformante, por razões desconhecidas, não cresceu em nenhum dos inóculos no meio YNB com a adição de ácido benzóico.

**Tabela 13:** Percentagem de redução de biomassa final (g/l) para cada estirpe do meio YNB pH 3,5 (100%) para o meio de YNB com adição de ácido sórbico

<b>% Redução de Biomassa final</b>			
<b>Ácido fraco adicionado</b>	<b>Estirpes</b>		
	BY4741	$\Delta gas1$	$\Delta gas1$ P416+ZbGAS1
Ácido Sórbico	85	81	58

No caso do meio YNB, para o rendimento e pelas mesmas razões descritas para a biomassa final, o cálculo destes valores foi apenas possível para o YNB com adição de ácido sórbico comparativamente com o meio YNB pH 3,5 (100%) (Tabela 13).

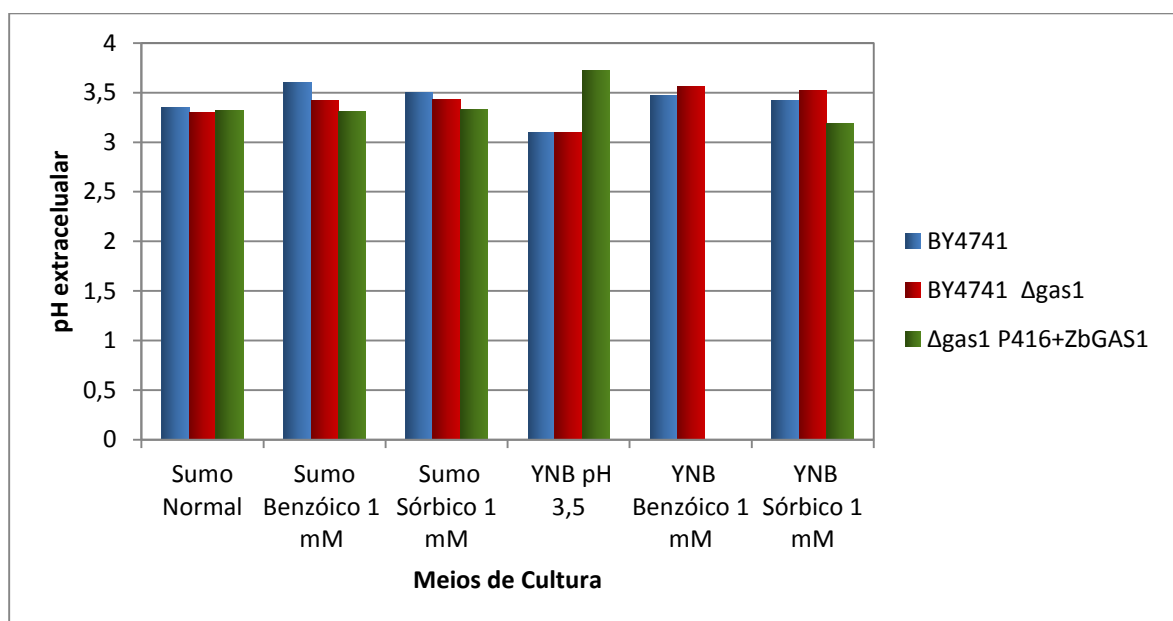
**Tabela 14:** Percentagem de redução de rendimento de cada estirpe do YNB pH 3,5 (100%) para o meio YNB com adição de ácido sórbico.

% Redução de Rendimento			
Ácido fraco adicionado	Estirpes		
	BY4741	$\Delta gas1$	$\Delta gas1$ P416+ZbGAS1
Ácido Sórbico	85	81	58

Os resultados obtidos por estes cálculos demonstraram que, tal como em meio de sumo de maçã, também em YNB a estirpe transformante é a que sofre uma menor redução relativa biomassa final. No entanto, apesar de a estirpe transformada sofrer menor redução dos parâmetros biomassa e rendimento que a estirpe parental em YNB, a redução foi muito mais acentuada em meio mineral que em meio sumo de maçã (58% em YNB versus 44% em sumo de maçã, ambos com ácido sórbico para a biomassa e rendimento da estirpe transformada). A maior redução relativa da biomassa e do rendimento foi também observada no caso da estirpe parental (85% em YNB versus 75% em sumo de maçã, ambos com 1mM de ácido sórbico) mas curiosamente, no caso da estirpe deletada não se observou qualquer diferença entre a redução relativa da biomassa e do rendimento nos dois meios com ácido sórbico.

A maior redução observada nas estirpes que contém Gas1 leva-nos a ponderar a existência de um efeito adicional resultante da escassez de um outro nutriente ou uma alteração estrutural na parede, que eventualmente não se fará sentir na estirpe deletada. Uma segunda hipótese para justificar este resultado poderia residir de uma menor capacidade tampão do meio YNB face ao sumo de maçã levando a uma redução do pH extracelular e consequentemente num aumento da fração não dissociada do ácido e um aumento do influxo desta forma, aumentando os efeitos nocivos do ácido, uma vez que os ensaios em meio líquido não foram efetuados a pH controlado.

Em termos de valores de pH externo, comparando os valores obtidos para a situação  $DO_{640nm}$  inicial 0,1 para as três estirpes e seis meios diferentes (Figura 31), verifica-se que o transformante ( $\Delta gas1$  P416+ZbGAS1) é a estirpe que mantém mais constantes os seus valores de  $pH_{ext}$  em cada um dos meios quando em sumo de maçã. No entanto, verificou-se que no caso da estirpe transformada a redução do pH extracelular observada em meio YNB e em meio YNB com ácido sórbico foi a mais acentuada (3,72 em YNB sem ácido versus 3,19 em YNB com ácido sórbico) o que indica que a hipótese apresentada atrás poderá justificar esta redução mais acentuada na biomassa e do rendimento nesta estirpe. Apesar disso, tal não deverá ser o caso para a estirpe parental dado que o valor de pH observado em meio YNB com ácido sórbico foi mais elevado que o observado para o mesmo meio sem ácidos.



**Figura 31:** Valores de pH extracelular da estirpe parental (BY4741) da estirpe mutante ( $\Delta$ gas1) e do transformante ( $\Delta$ gas1 P416+ZbGAS1)

Da análise conjunta de todos estes dados, podemos concluir que a expressão do gene *GAS1* de *Z. bailii* em *S. cerevisiae* a tornou mais resistente aos ácidos fracos (ácido benzóico e ácido sórbico), uma vez que a BY4741  $\Delta$ gas1 P416+ZbGAS1 foi a menos afetada a nível de biomassa final, rendimento e pHext quando na presença de ácidos fracos comparativamente com a estirpe parental e respetiva estirpe mutante.

## 6. Efeito de ZbGas1 na permeabilidade da membrana e pH intracelular em células adaptadas e não adaptadas a ácido sórbico

Os resultados obtidos para os parâmetros de crescimento apontaram para que em resultado da expressão deste gene de *Z. bailii* em *S. cerevisiae* tivessem ocorrido alterações na estrutura da célula (parede celular e membrana plasmática), que se traduziram numa maior resistência aos ácidos fracos.

De acordo com o modo de ação destes compostos, uma das principais vias através da qual estes inibem o crescimento celular é a acidificação do citosol, e conseqüente aumento da quantidade de catiões ( $H^+$ ) presentes no interior da célula. Desta forma, procurou-se avaliar se o efeito de ZbGas1 observado resultava de alterações na permeabilidade da membrana. De forma a avaliar isto, realizaram-se ensaios em que se determinou a permeabilidade a prótons e o pH intracelular.

Para a realização destes estudos, utilizou-se como meio de cultura apenas o sumo de maçã com e sem adição de ácidos, tendo sido feita a adaptação prévia das células aos ácidos fracos. Contudo, neste caso e uma vez que as diferenças no fenótipo de crescimento observadas foram mais acentuadas em células adaptadas a ácido sórbico, o processo de adaptação foi efetuado apenas com o ácido sórbico, a uma concentração de 1 mM, com o pH natural do sumo (pH 3,42).

Uma vez adaptadas as células, as três estirpes em estudo (BY4741, estirpe mutante e estirpe transformante), foram inoculadas quer em sumo sem adição de ácido, quer em sumo de maçã com uma concentração de 1 mM de ácido benzóico e sórbico e incubadas a 28°C com agitação orbital até atingirem uma  $DO_{640nm}$  entre 0,8 e 1,6 (início da fase exponencial).

### 6.1. pH intracelular

A determinação deste parâmetro teve como base o método descrito por Rottenberg (1979), o qual consiste na medição da distribuição da forma dissociada (HA) de um ácido fraco marcado radioativamente ( $^{14}C$ ) entre o meio intra e extracelular.

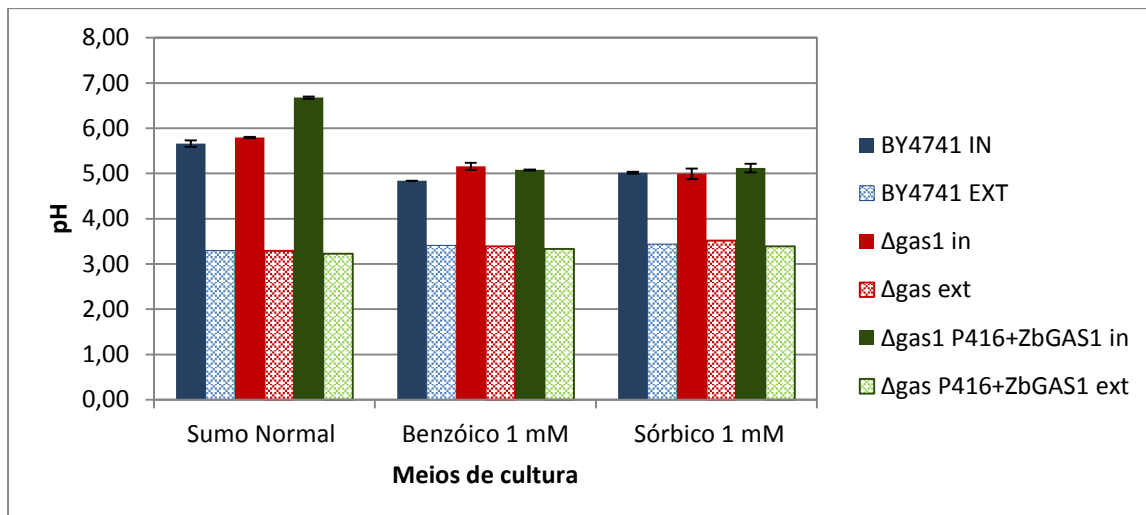
Para tal, recolheu-se 50 ml das células em plena fase exponencial de crescimento ( $DO_{640nm}$  0,8-1,6) e dividiu-se esse mesmo volume em dois balões de Erlenmeyer diferentes.

Num desses balões adicionou-se ácido benzóico radioativo (Balão A – “balão quente”) e no outro não foi adicionado qualquer composto (Balão B – “balão frio”).

No caso do balão A, após à adição do ácido benzóico marcado radioativamente, incubou-se a 25°C durante 90 minutos de maneira à forma não dissociada do ácido fraco atingir um equilíbrio entre o meio intra e extracelular.

A partir do balão A foi medida concentração da forma não dissociada do ácido benzóico marcado radioativamente intra  $[HA_{in}]$  e extracelularmente  $[HA_{ext}]$ . Por outro lado, a partir do balão B, no qual não se adicionou qualquer outro composto, determinou-se o pH extracelular  $[H^+_{ext}]$  e biomassa seca.

A determinação de cada um destes parâmetros, permitiu através da utilização da equação definida pelo método de Rottenberg (1979), o cálculo dos valores de pH intracelular para cada uma das estirpes nas respetivas condições em estudo.



**Figura 32:** Valores do pH intra e extracelular para a estirpe parental (BY4741), estirpe mutante ( $\Delta gas1$ ) e respectivo transformante ( $\Delta gas1$  P416+ZbGAS1) quando em sumo normal, e com adição de 1 mM de ácido benzóico e sórbico.

Ao analisarmos os valores obtidos para este parâmetro, e comparando os valores obtidos para cada uma das estirpes em estudo, verificou-se a ausência de variações acentuadas do pH intracelular entre a estirpe parental e a estirpe deletada quando em meios com ou sem adição de ácidos.

No caso da estirpe transformada, em sumo de maçã sem ácidos o valor de pH intracelular foi significativamente maior que o da estirpe parental (6,68 versus 5,66, para  $\Delta gas1$  P416+ZbGAS1 e BY4741, respetivamente) .

Tal como foi descrito anteriormente, o meio de cultura utilizado apresentava um pH de 3,42, e de acordo com o modo de ação dos ácidos fracos, sabe-se que na presença de valores de pH's mais ácidos, como é o caso, estes permanecem na sua forma não dissociada, entrando livremente na célula e que, ao encontrarem no seu interior um pH mais elevado (aproximadamente 7), a molécula dissocia-se e liberta prótons no interior da célula levando a uma acidificação do citosol (Stratford, 1998; Piper *et al.*, 2001; Beales, 2004). De acordo com o modo de ação destes compostos, é normal ocorrer a acidificação do meio intracelular quando na presença dos mesmos tal como se verificou na figura 31. No entanto, tal como é possível observar na figura, a variação do pH extracelular é praticamente nula para ambas as estirpes o que permite descartar esta hipótese como válida.

## 6.2. Permeabilidade da membrana – influxo e efluxo de prótons

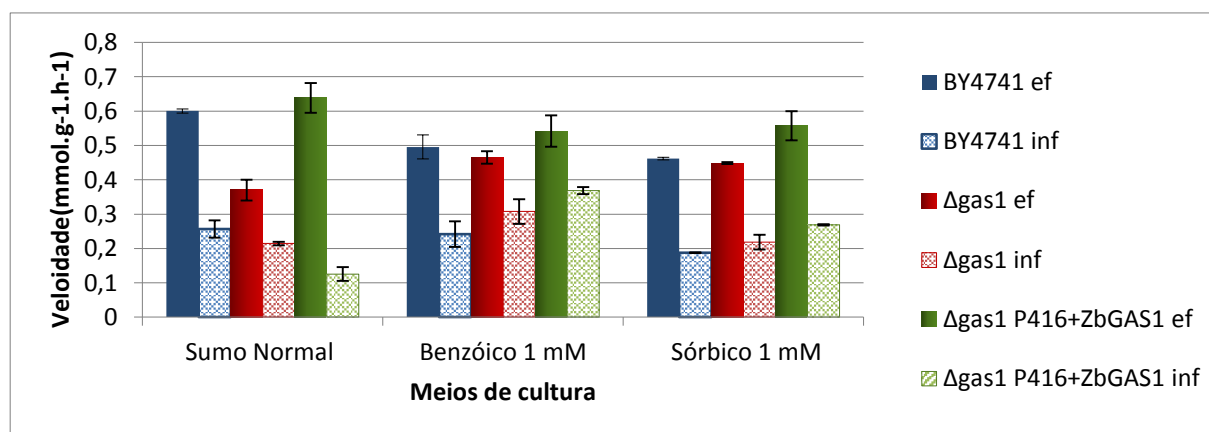
Para a determinação de possíveis efeitos da expressão do gene em estudo na permeabilidade da membrana plasmática, uma vez que o seu valor está diretamente relacionado com a entrada (influxo) e saída (efluxo) de prótons da célula e a respetiva permeabilidade da membrana aos mesmos, procedeu-se à avaliação da permeabilidade da membrana a estes compostos em células cultivadas em sumo e adaptadas e não adaptadas a ácido sórbico.

Para isso, os fluxos de prótons foram avaliados através da medição da alcalinização do meio (influxo) e acidificação do mesmo (efluxo) através de um eletrodo de pH ligado a um potenciómetro e a um registor.

Com base nos registos obtidos foram estimados dois parâmetros: a velocidade de entrada de prótons para o interior da célula (influxo), e a de saída dos mesmos para o meio extracelular através da atividade da H<sup>+</sup>-ATPase (efluxo).

A análise dos valores referentes a cada um destes parâmetros, permitiu não só avaliar a permeabilidade da membrana de cada das estirpes como também compreender melhor os valores obtidos para o pH intracelular.

De forma a tornar a compreensão dos dados obtidos para cada um dos parâmetros em estudo (pH intracelular e extracelular, influxo e efluxo de prótons), foi realizada uma análise conjunta dos mesmos que se encontram representados na Figura 33.



**Figura 33:** Velocidade de entrada (Influxo-inf) e de saída (efluxo-ef) de prótons na célula, para a estirpe parental (BY4741), estirpe mutante ( $\Delta gas1$ ) e respetivo transformante ( $\Delta gas1$  P416+ZbGAS1) cultivadas em sumo normal, e adaptadas a 1 mM de ácido benzóico e sórbico.

Atendendo aos resultados apresentados na Figura 33, quer em células cultivadas em sumo de maçã quer no caso de células adaptadas aos ácidos, a estirpe transformada foi aquela para a qual se observaram maiores valores de efluxo de protões seguida da estirpe parental, sendo a estirpe deletada aquela que aparenta uma menor atividade da H<sup>+</sup>-ATPase traduzida em menores valores para a velocidade de saída de protões (0,64, 0,60 e 0,37 mmolg<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, para a estirpe transformada, estirpe parental e estirpe deletada, respetivamente). O efeito da presença de Gas1, embora comum às três estirpes e nas três condições de crescimento, é mais notório em células cultivadas apenas em sumo, não adaptadas por isso à presença de ácidos.

Em simultâneo, quando se analisam os resultados obtidos para a permeabilidade da membrana aos protões, verifica-se que em células cultivadas em sumo de maçã, a permeabilidade passiva é menor para a estirpe transformada e maior para a estirpe parental.

Conjugando ambos os resultados com os valores obtidos para o pH intracelular apresentados acima (Figura 32) (e tendo em conta que o pH extracelular se manteve) verifica-se que neste caso os resultados são consistentes uma vez que a estirpe transformada apresenta um maior valor de pH intracelular (6,68) coerente com o maior efluxo de protões e menor influxo. Já no caso da estirpe parental e da estirpe deletada, observou-se que estas apresentam valores de pH intracelulares próximos (5,66 para BY4741 e 5,79 para a estirpe deletada). Nesta condição de crescimento, a estirpe parental apresentou maior capacidade de expulsão de protões mas em simultâneo maior permeabilidade que a estirpe deletada, sendo por isso justificável que o resultado global destes dois efeitos se traduza numa proximidade dos valores de pH intracelular das duas estirpes.

Em células cultivadas na presença de ácidos (células adaptadas) as velocidades de efluxo de protões nestas estirpes e nestas condições, não variaram acentuadamente, mantendo-se contudo o padrão de comportamento que havia sido observado para células cultivadas na ausência de ácidos (células não adaptadas).

Uma maior atividade de ATPase implica um maior dispêndio de ATP, dando origem a um desvio do mesmo dos mecanismos de manutenção da célula o que se pode traduzir não necessariamente numa menor produção de biomassa final mas sim num menor rendimento das células (Figura 33), uma vez que o ATP -que deveria estar a ser utilizado nos mecanismos de manutenção da célula passa-a ser utilizado na proteção da mesma.

Contrariamente à manutenção do padrão observada para o efluxo de protões, a permeabilidade passiva a protões foi mais elevada na estirpe transformada e menor na estirpe

parental para as células adaptadas a ambos os ácidos, invertendo-se o padrão que havia sido observado na ausência de ácidos. Relativamente aos meios com adição de ácidos, tal como já foi referido não se verificaram variações significativas dos valores de pH intracelular entre cada uma das estirpes, que variou entre 4,84 e 5,08 (para a estirpe parental e estirpe transformada adaptadas a ácido benzóico, respetivamente) sendo no entanto menores que os observados em células cultivadas na ausência de ácidos o que é coerente com as variações observadas no efluxo e no influxo das células adaptadas a ácidos.

Para além disso, contrariamente ao que seria esperado, o processo de adaptação quer a ácido benzóico quer a ácido sórbico não conferiu uma maior capacidade de expulsão de prótons em ambas as estirpes que expressam Gas1 dado que os valores obtidos são menores do que os obtidos para células cultivadas em sumo sem ácidos. Estes resultados contrariam os resultados apresentados na literatura que referem um aumento da actividade da H<sup>+</sup>-ATPase em células adaptadas a ácidos fracos como um dos mecanismos de defesa das células a este stress (Holyoak *et al.*, 1996).

Observou-se ainda que para todas as estirpes, a permeabilidade da membrana aos prótons é maior em células adaptadas aos ácidos do que em células não adaptadas. Esta observação leva-nos a concluir que não houve nestas células uma alteração da composição da membrana que justifique o aumento da resistência em células adaptadas.

## IV. Considerações finais e perspectivas futuras

A manutenção da estabilidade dos produtos alimentares durante o seu período de vida útil tem vindo a ser um dos principais desafios para a indústria alimentar, sendo esta posta em causa na maioria das vezes pelo desenvolvimento de microrganismos de alteração no produto, que mesmo não tornando o alimento inseguro podem provocar alterações a nível de sabor, odor e textura, alterando as características organolépticas do alimento. Em particular, o desenvolvimento de leveduras de alteração, em alimentos como é o caso dos sumos e concentrados de fruta têm como consequência o aparecimento de embalagens opacas devido à produção de gases resultantes da fermentação.

Desta forma, apesar de não porém em risco a saúde do consumidor, provocam alterações significativas na aparência do produto o que leva a uma alteração da percepção de qualidade aos olhos do consumidor.

Uma das principais estratégias utilizadas pela indústria para inibir o crescimento destes microrganismos é a adição de conservantes alimentares, nomeadamente ácidos fracos, que atuam como agentes antimicrobianos. No entanto as quantidades utilizadas pela indústria, definidas pela legislação alimentar, não são na maioria das vezes suficientes para impedir o desenvolvimento de determinadas leveduras de alteração mais resistentes a estes conservantes, como é o caso de *Zygosaccharomyces bailii*, que não só sobrevive como também prolifera na presença de elevadas concentrações destes compostos, dando origem a perdas económicas significativas para a indústria alimentar.

Desta forma a compreensão dos mecanismos de resistência a estes compostos lipofílicos, permitirá melhorar as estratégias utilizadas por parte das indústrias para a conservação dos seus produtos, tornando-as consequentemente mais efetivas.

Os mecanismos através dos quais *Z. bailii* consegue resistir aos ácidos fracos, são ainda muito controversos, no entanto actualmente estão propostos três mecanismos que poderão existir isoladamente ou combinados para conferir a esta espécie maior capacidade de resistência e proliferação a ácidos fracos: metabolismo dos ácidos fracos como fonte de carbono na presença de elevadas concentrações de açúcares, presença de bombas de extrusão de ácidos e por fim a ocorrência de alterações na estrutura do envelope celular que resultam na limitação da entrada destes compostos difusão no interior da célula.

Dado que a entrada da forma não dissociada do ácido por difusão passiva através da membrana plasmática e a sua acumulação no interior da célula é apontada como uma das causas para os seus efeitos inibitórios, este trabalho pretendeu avaliar um dos mecanismos

propostos como estando na origem da maior resistência de *Z. bailii* a estes compostos, a possível alteração da estrutura do envelope em presença destes compostos no meio, tendo-se avaliado em particular as possíveis alterações da permeabilidade da membrana a protões.

Nesse sentido, pretendeu-se avaliar o papel de oitos genes de *Z. bailii* cujas enzimas se encontram envolvidas na síntese de componentes do envelope celular (parede e membrana plasmática) e que poderão de alguma forma estar envolvidas no mecanismo de resistência deste microrganismo a ácidos fracos. Para tal, testou-se o efeito desses genes por expressão heteróloga em estirpes mutantes de deleção de *Saccharomyces cerevisiae*, avaliando o seu fenótipo em presença de dois ácidos fracos (ácido benzóico e ácido sórbico) habitualmente usados como conservantes pela indústria alimentar, a fim de se observar se provocavam alguma alteração na sua resistência a estes compostos e assim inferir do possível papel destes mecanismos em *Z. bailii*.

De entre os genes de *Z. bailii* expressos em *S. cerevisiae* apenas com dois deles, *ZbOPI3* e *ZbGAS1*, se observou um fenótipo de maior resistência aos ácidos fracos relativamente à estirpe parental. No entanto, relativamente ao gene *ZbOPI3* essa melhoria apenas se observou e de forma menos significativa na presença de ácido sórbico.

No caso do gene *ZbGAS1*, cuja enzima se encontra envolvida na via biossintética de um componente da parede celular ( $\beta$ -1,3-glucano), quando expresso em *S. cerevisiae* obteve-se um fenótipo mais claro em meio sólido, tornando a estirpe de *S. cerevisiae* hospedeira mais resistente quer ao ácido sórbico quer ao ácido benzóico do que a estirpe parental BY4741, o que nos permitiu concluir, que a resistência mais elevada de *Z. bailii* a estes compostos se deve em parte à ação deste gene.

O fenótipo de resistência foi avaliado em dois meios diferentes, um meio laboratorial (meio mineral YNB) e sumo de maçã comercial de forma a testar as estirpes numa situação mais próxima da situação real de contaminação de uma bebida. Apesar de os resultados não demonstrarem uma clara melhoria na biomassa final e no rendimento na estirpe transformada, verificou-se que para esta estirpe os efeitos inibitórios em presença de ácidos fracos eram menos acentuados.

Por outro lado, no sentido de determinar se o fenótipo de maior resistência da estirpe transformada estava ou não relacionado com alterações na permeabilidade da membrana avaliaram-se três aspetos relacionados com esta: a capacidade de efluxo de protões, o influxo de protões e o pH intracelular das estirpes. Apesar de os resultados não demonstrarem uma clara diminuição na permeabilidade nem um aumento do efluxo de protões na estirpe transformada, verificou-se que para esta estirpe houve uma menor redução da atividade da

H<sup>+</sup>-ATPase em presença de ácidos fracos. Para além disso, e apesar de em meio sólido se ter observado um incremento da resistência após adaptação das células aos dois ácidos, verificou-se ainda que a presença de Gas1 não levou a alterações significativas positivas em qualquer dos fatores estudados (efluxo e influxo de prótons) após o processo de adaptação o que nos leva a concluir pela ausência de alterações induzidas pelos ácidos após a sua adaptação. O incremento da resistência observado em *S. cerevisiae* deve-se a outros fatores como por exemplo a indução de Pdr12 tal como descrito por vários autores (Piper *et al.*, 1998; Mollapour *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos apontam assim para um papel de Gas1 na resistência aos ácidos, sendo este aparentemente mais relevante para a resistência a ácido sórbico do que a ácido benzóico.

Atendendo a estes resultados, seria interessante no futuro avaliar diretamente a permeabilidade da membrana aos ácidos por exemplo através de ácido marcado radioativamente, bem como observar mais atentamente o papel desta proteína na aquisição de resistência a ácido sórbico e ácido benzóico, uma vez que existem autores que referem diferenças entre os mecanismos de ação destes dois ácidos (Ferreira *et al.*, 1997; Han e Floros, 1998).

Apesar de serem medidas indiretas do efeito dos ácidos fracos a avaliação da biomassa final e o rendimento em biomassa em função da fonte de carbono permitiu observar uma maior resistência a ácido por parte da estirpe transformada. Estas diferenças apontam para um efeito da presença de *ZbGas1* sobre o crescimento/metabolismo das células. Nesta linha de ideias, um outro aspeto importante que poderá ser avaliado no futuro é a capacidade metabólica das células para fermentarem açúcares e produzirem gás, já que existem também referências ao menor efeito inibidor no metabolismo dos açúcares por parte dos ácidos fracos (Ferreira *et al.*, 1997; Warth, 1991).

O conhecimento de uma via específica envolvida na maior resistência de *Z. bailii* aos ácidos fracos, abre portas para novas áreas de investigação no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos que atuem em particular, na inibição da ação da  $\beta$ -1,3-glucotransferase (*ZbGas1*).

O efeito de um agente antimicrobiano com uma ação específica no processo de síntese deste composto em sinergia com efeito dos ácidos fracos levaria a uma inibição mais eficaz do desenvolvimento deste microrganismo, como também a uma redução da quantidade de ácido fraco adicionada ao produto.

O que se traduziria não só numa utilização mais eficaz destes conservantes, como numa aplicação mais controlada dos mesmos. Trazendo benefícios não apenas para a indústria como também para o consumidor que cada vez mais exige produtos alimentares com uma redução de aditivos alimentares.

## Bibliografia

- Abe, F. & Hiraki, T. (2009). Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(3), 743-752.
- Arneborg, N., Jespersen, L., Jakobsen, M. (2000). Individual cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* exhibit different short-term intracellular pH responses to acetic acid. *Archives of Microbiology*, 174(1-2), 125-128.
- Bard, M., Lees, N. D., Burrows, L. S., Kleinhans, F. W. (1978). Differences in crystal violet uptake and cation-induced death among yeast sterol mutants. *Journal of Bacteriology*, 135(3), 1146-1148.
- Beales, N. (2004). Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 1-20.
- Brul, S. & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 1-17.
- Dickson, R. C. (2008). Thematic Review Series: Sphingolipids. New Insights into Sphingolipid Metabolism and Function in Budding Yeast. *Journal of Lipid Research*, 49(5), 909-21.
- Dickson, R. C. & Lester, R. L. (1999). Metabolism and selected functions of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1438(3), 305-321.
- Ferreira, M. M., Loureiro-Dias, M. C., Loureiro, V. (1997). Weak acid inhibition of fermentation by *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 36(2-3), 145-153.
- Gaber, R. F., Couple, D. M., Kennedy, B. K., Vidal, M., Bard, M. (1989). The Yeast *ERG6* is required for normal membrana function but is not essential for cell-cycle-sparking sterol, *Mollecular and Celular Biology*, 8(9), 3437-3446.
- Galeote, V., Bigey, F., Devillers, H., Neuvéglise, C., Dequin, S. (2013). Genome Sequence of the Food Spoilage Yeast *Zygosaccharomyces bailii* CLIB 213T. *Genome Announcements*, 1(4), 2010-2011.
- Han, J. H. & Floros, J. D. (1998). Modeling the Growth Inhibition Kinetics of Baker's Yeast by Potassium Sorbate Using Statistical Approaches. *Journal of Food Science*, 63(1), 12-14.
- Henderson, C. M. & Block, D. E. (2014). Examining the Role of Membrane Lipid Composition in Determining Ethanol Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 5345-5356.

- Holyoak, C. D., Bracey, D., Piper, P. W., Kuchler, K., Coote, P. J. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* weak-acid-inducible ABC transporter Pdr12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an energy-dependent mechanism. *Journal of Bacteriology*, 181(15), 4644-4652.
- Klis, F. M., Mol, P., Helingwerf, K., Brul, C. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 3(26), 239-256.
- Kodaki, T. & Yamashita, S. (1989). Characterization of the methyltransferases in the yeast phosphatidylethanolamine methylation pathway by selective gene disruption. *European Journal of Biochemistry*, 185(2), 243-251.
- Konings, W. N. (2006). Microbial transport: Adaptations to natural environments. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 90(4), 325-342.
- Konings, W. N., Lolkema, J. S., Poolman, B. (1995). The generation of metabolic energy by solute transport. *Archives of Microbiology*, 164(4), 235-242.
- Kresnowati, M. T. A. P., van Winden, W. A., van Gulik, W. M., Heijnen, J. J. (2008). Energetic and metabolic transient response of *Saccharomyces cerevisiae* to benzoic acid. *FEBS Journal*, 275(22), 5527-5541.
- Lambert, R. J. & Stratford, M. (1999). Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, 86(1), 157-164.
- Lees, N. D., Bard, M., Kemple, M. D., Haak, R. A., Kleinhans, F. W. (1979). ESR determination of membrane order parameter in yeast sterol mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 553(3), 469-475.
- Lees, N. D., Skaggs, B., Kirsch, D. R., Bard, M. (1995). Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* - A review. *Lipids*, 30(3), 221-226.
- Lindberg, L., Santos, A. X., Riezman, H., Olsson, L., Bettiga, M. (2013). Lipidomic profiling of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* reveals critical changes in lipid composition in response to acetic acid stress. *PloS One*, 8(9), e73936.
- Macpherson, N., Shabala, L., Rooney, H., Jarman, M. G., Davies, J. M. (2005). Plasma membrane H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transporters are involved in the weak-acid preservative response of disparate food spoilage yeasts. *Microbiology*, 151(6), 1995-2003.
- Malfeito-Ferreira, M. (1996). Perfis de ácidos gordos e toxicidade de ácidos fracos em leveduras de contaminação de alimentos. Dissertação de Doutoramento, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

- Martorell P., Stratford M., Steels H., Fernández-Espinar, M. T., Querol A. (2007). Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 234-232.
- Matmati, N. & Hannun, Y. (2008). Thematic review series: sphingolipids. ISC1 (inositol phosphosphingolipid-phospholipase C), the yeast homologue of neutral sphingomyelinases. *Journal of Lipid Research*, 49(5), 922-928.
- Mira, N. P., Münsterkötter, M., Dias-Valada, F., Santos, J., Palma, M., Roque, F. C., Guerreiro J. F., Rodrigues F., Sousa M. J., Leão C., Guldner U., Sá-Correia, I. (2014). The genome sequence of the highly acetic acid-tolerant *Zygosaccharomyces bailii*-derived interspecies hybrid strain ISA1307, isolated from a sparkling wine plant. *DNA Research*, 21(3), 299-313.
- Mira, N. P., Teixeira, M. C., Sá-Correia, I. (2010). Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view. *Omics : A Journal of Integrative Biology*, 14(5), 525-540.
- Mira, N. P., Teixeira, M. C. (2013). Microbial Mechanisms of tolerance to weak acid stress. *Frontiers in Microbiology*, 4(4),1.
- Mollapour, M., & Piper, P. W. (2001). The ZbYME2 gene from the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* confers not only YME2 functions in *Saccharomyces cerevisiae*, but also the capacity for catabolism of sorbate and benzoate, two major weak organic acid preservatives, *Molecular Biology*, 4(42), 919-930.
- Mollapour, M., Shepherd, A., Piper, P. W. (2008). Novel stress responses facilitate *Saccharomyces cerevisiae* growth in the presence of the monocarboxylate preservatives. *Yeast*, 3(25), 169-177.
- Nagiec, M. M., Nagiec, E. E., Baltisberger, J., Wells, G. B., Lester, R. L., Dickson, R. C. (1997). Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the AUR1 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 272(15), 9809-9817.
- Oh, C.-S., Toke, D. A., Mandala, S., Martin, C. E. (1997). *ELO2* and *ELO3*, Homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* *ELO1* Gene, Function in Fatty Acid Elongation and Are Required for Sphingolipid Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17376-17384.
- Pampulha, M. E., Loureiro-Dias, M. C. (1989). Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting *Yeast*, 5-6(31), 547-550.
- Pampulha, M. E. & Loureiro-Dias, M. C. (1990). Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(3), 375-380.

- Pampulha, M. E., Loureiro-dias, M. C. (2000). Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Letters*, 1(184), 69-72.
- Patterson, M. K. Jr. (1979). Measurement of growth and viability of cells in culture, In: William B. Jakoby, Ira H. Pastan, Editor(s), *Methods in Enzymology*, Academic Press, Volume 58, Pages 141-152.
- Piper, P. W., Mahe, Y., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Muhlbauer, M., Coote, P., Kuchler, K. (1998). The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast, *EMBO J.*, 15(17), 4257-4265
- Piper, P. W., Ortiz-Calderon, C., Holyoak, C. D., Coote, P. J., Cole, M. B. (1997). Hsp30, the integral membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress inducible regulator of plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase. *Cell Stress Chaperones*, 2(1), 12-24.
- Piper P., Ortiz-Calderon C., Hatzixanthis K., Mollapour M. (2001). Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives, *Microbiology*, 147(10), 2635-4642.
- Popolo, L., & Vai, M. (1999). The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1426(2), 385–400.
- Popolo, L., Vai, M., Gatti, E., Porello, S., Bonfante, P., Balestrini, R., Celoria, V. (1993). Physiological Analysis of Mutants Indicates Involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-Anchored Protein gpII5 in Morphogenesis and Cell Separation. *Journal of Bacteriology* 175(7), 1879-1885.
- Quintas, C., Lima-Costa, E., Loureiro-Dias, M. C. (2000). The Effect of Ethanol on the Plasma Membrane Permeability of Spoilage Yeasts. *Food Technology and Biotechnology*, 38(1), 47-51.
- Ragni, E., Fontaine, T., Gissi, C., Latg, J. P. (2007). The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis, *Yeast*, 24(4), 297-308.
- Rego, A., Costa, M., Chaves, S. R., Matmati, N., Pereira, H., Sousa, M. J., Côrte-Real, M. (2012). Modulation of mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by ceramide metabolism. *PloS One*, 7(11), e48571.
- Roller, S. (1999). Physiology of food spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 151-153.
- Sá-Correia, I., Guerreiro, J. F., Loureiro-Dias, M. C., Leão, C., Côrte-Real, M. (2014) *Zygosaccharomyces*. In: Batt, C. A., Tortorello, M. L. (Editor's), *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 3, Elsevier Ltd, Academic Press, pages 849-855.

- Sawai, H., Okamoto, Y., Luberto, C., Mao, C., Bielawska, A., Domae, N., Hannun, Y. a. (2000). Identification of *ISC1* (YERO19w) as inositol phosphosphingolipid phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(50), 39793-39798.
- Shah, N. & Klausner, R. D. (1993). Brefeldin A reversibly inhibits secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(8), 5345-5348.
- Sousa, M. J., Miranda, L., Corte-Real, M., Leão, C. (1996). Transport of acetic-acid in *Zygosaccharomyces bailii* ± effects of ethanol and their implications on the resistance of the yeast to acidic environments. *Applied Environment Microbiology*, 9(62), 3152-3157.
- Sousa, M. J., Rodrigues, F., Corte-Real, M., Leao, C. (1998). Mechanisms underlying the transport and intracellular metabolism of acetic acid in the presence of glucose in the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology*, 3(144), 665-670.
- Steels H., James S. A., Roberts I. N., Stratford M. (1999). *Zygosaccharomyces lentus*: a significant new osmophilic, preservative-resistance spoilage yeast, capable of growth at low temperature. *Journal of applied Microbiology*, 4(87), 520-527.
- Stratford, M. & Anslow, P. (1998). Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic "weak acid preservative". *Letters in Applied Microbiology*, 27(4), 203-206.
- Ullah, A., Orij, R., Brul, S., Smiths, G. (2012). Quantative Analysis of the Modes of Growth Inhibition by weak organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 23(78), 8377-8377.
- van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Konings, W. N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiology and Molecular biology Reviews*, 59(2), 304-322.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A., Van-Dijken, J. P. (1992). Effect of Benzoic Acid on Metabolic Fluxes in Yeasts: A continuous-Culture Study on Regulation of Respiration and Alcoholic Fermentation. *Yeast*, 7(8), 501-517.
- Wagner, S. & Paltauf, F. (1994). Generation of Glycerophospholipid Molecular Species in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Fatty acid pattern of Phospolipid Classes and Selective Acyl Turnover at *sn-1* and *sn-2* positions. *Yeast*, 11(2), 1429-1437.
- Warth, A D. (1989). Relationships Among Cell Size, Membrane Permeability, and Preservative Resistance in Yeast Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11), 2995-2999.
- Warth, A D. (1991). Mechanism of Action of Benzoic Acid on *Zygosaccharomyces bailii*: Effects on Glycolytic Metabolite Levels, Energy Production, and Intracellular pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(12), 3410-3414.

## Anexos

### Anexo I

Desenho dos primers – Região específica escolhida para o gene de interesse:

**“Primer Foward”**

**“Primer Reverse”**

*ERG6:*

ATGTCGTCCACCCTTGAAGACACC TCGACACTGAGACAGAGACAAGCGCAATTCACCAAGGAACTCCACGGTGAA  
GACATCGGCGCAAAGAGCGGTTTTGCTGCTTTTCATCTCCAAGAACAAGTCTGCCCAGAAAAGAAGCTGTAGCCAAG  
TACCTGAAACATTGGGACGGTAAGACGGACCAAGAGGCCGAAAAAAGACGTCTAGAAGACTACAATGAAGGCACA  
CACTCATACTACAACGTGGTAACCGACTTTTACGAGTACGGCTGGGGCAGCTCTTTCCACTTCTGTGCTTTCTAC  
AAGGGAGAGAACTTTTACGCCGCCGTGGCTCGCCACGAGCTGTACTTGGCATAACAAGTCCAACATTCAGGAGGGA  
GACCTCGTGTGACGTCGGCTGCGGTGTTGGAGGTCCAGCAAGAGAGATCGCACGTTTCACAGGAGCCACGTT  
ATCGGTTTTGAACAACAACGACTACCAGGTTGCCAAGGCCAACTGGAATGCGAAAAAATACCGCCTCGAGGACCAA  
TTGGAGTTTGTCAAGGGCGATTTTCATGCAGATGGAGTTCCAAGATGCAACTTTTGACAAAAGTCTACGCCATTGAG  
GCCACATGCCATGCCCCAAAGTTGGAAGGGGTCTATTCTGAGATCTACAGGGTTTTGAAGCCAGGAGGAACCTTT  
GCCGTGTATGAGTGGGTTCATGACCGACAAGTATGATGAGTCCAATCCCAGCACC GCCGGATCGCGTATGAAATC  
GAGGTTGGCGACGGTATCCCAAGATGTTCACTGCTGATGTGCTCGCAATGCGCTGAAAAGTGTGGTTTCGAA  
GTGCAACTTGCTGACGATCTCGCCGATAACAATGACGAAATTCCTTGGTACTACCCATTGACAGGCGACTGGAAA  
TACATACAGACGTTGTCCGATTTGGCTACTTTCTTCCGTACCTCCTACTTTGGCCGTAAAATTCACCACGTTTCATG  
GTGTGGCTGATGGAGCTCGTGGGCATTGCCCCAAGGGATCCACTCAAGTGACCAATGCCCTAGAGGAGGCTGCT  
GTTGGCCTCGTGGCTGGGGGCCGTGCCAAGCTATTCACGCCAATGATGTTGTTGT **CGCAACTAAACCGCAAAAAG  
AAGAAATAG**

*ERG2*

ATGAGATGTTTTCTTTGTGTTTGGCATTGTGG TTGCTGTATTTCGGCTGGATAATGAACAGCACGTTTCACGACATGG  
TTACCTCAGAACTATATCTTTGACGGCCAGACGTTAGGTGAGATTTGCAACAGTGTTTATTGTTGCGCACAAGGCC  
AACGACACTGAAATTTTGGCTCAGAGAGGTGCGTGATGCGCTCGCTGCCCATTTATGGCCACAGTTTCATCAACGAG  
TACAAGCAATCGGAGTGGGTTTTTAATAATGCTGGGGGGGCTATGGGACAGATGATAATCTTGCATGCATCCATC  
AGCGAGTATGTCATCTTCTTTGGCAGTGCAGTGGGGACCGAAGGTCATACAGGTGTCCATTTTGCAGACGACTAC  
TTCATATCTTGAAGGGCCAACAGACGGCCGCTCTACCTTTTGAACGGAGCCGGAAGTCTATACTCCCGGCATG  
GTACATCATTTACAGAAGGGGCACGCTAAACAGTACAGCATGCCCTCGGGCTCATTGCTCTGGAGCTTGACAG  
GGATGGATTCCATGCATGTTGCCATTTGGCTTCTTGGATACCTTTACGAGTACGCTAGACCTCTACACATTGTGG  
CGTACCGTTTTACTTGACTGGCCGTGACAT **GCTCAAGAACTTGATAAAAGAATCACAAGTTTTTAA**

## ERG4

ATGGTTGCCGAAGTGAAAGTTCCTGAGCCAAAAGGGCTTCGGTAAATTTTCTACCACAAGGAAAGTATCTCAAG  
CCTGAAGAAATTGAGTACGAGTTTGGCGGGACTCTGGGAGTCTCGGTATGATGGTAGGGTTCCTTTGCTGATG  
TATTACATGTGGATCAGTGTGAGTTTTACAAGGGAATTCCTGCTTGGCCAAATACTGGCGAATCATGGTGCCAA  
TTTATTAGACACCTTTATCAGCTATTTTGGGATTATGGTGTGCCAACTAGGTATGCGTGGACCATCTTTTTAACG  
TTTTGGGCTATCCAAATATTCTTCTATTATACTTTGCCTGGTGTATGGACCAAGGGACAGCCATTGACCCATTTA  
AAGAACAAGCAACTTCCTTACTATTGCAATGCCATGTGGTCTCTTTACACCACGACTGCCTTGATTATCTGCCTA  
CATGTCTTTGGTATCTTCAAGTTGTACACTATAATTGAAATTTTTGGACAGATCATGACCTGTGCCATTATCTCT  
GGGTTTTCTTTGCGATTGGGCTTTACTTATGGACTATGTTTATCACTAAGGACTATCATCGTATGACCGGCAAT  
CCAATTTATGATATGTTTCATGGGGGCGCCTTTAAATCCACGCTGGGGCATCTTAGATCTGAAGATGTTTTTCGAA  
GTGCGTCTTCTTGGTTTACGCTATTCTATATCTCGCTGGGTGCCACTTTAAAACAATACGAAAGGTACGGATAC  
GTGACGCCTCAGATGGGCGTGATACTATTGGCTCACTGGCTCTACGCTAACGCGTGTGCCAAGGGCGAAGAACTT  
ATCGTGCCTACTTGGGACATGGCTTACGAGAAGTTTGGCTTCATGCTAATCTTCTGGAACATCGCTGGCGTCCCT  
TACACTTACTGCCACTGTACGCTATACTTGTACTACCATGACCCATCTGAATATCAATGGTCTTGGGTTACAAC  
ATTGCATTGTATGTGACTTTGCTAACCGGCTACTATTTCTTTGACACCATAATGGTCAGAAGAATTCGTTTCAGG  
AAACAGATGGCTGGTGATAAGCGTGTGAGGAAAACCTTCCCATTTCTTCTTATCAAGTGCTAGAAAACCTAAG  
TACATGGTAACTTCCAATGGTTTCGTACTTACTAATCGATGGTTGGTACAGATATGCCAGGAAAAATACATTATACA  
GCTGACTGGGTTCAATCTTTAGTTTGGGCTCTTTCTGTGGCTTCAACTCTGTCTTTCCCTGGTTTTTTCCCCACA  
TTCTTCTCGTAGTTTTGATTTCATCGTGCTTTTCCAGGACCAGATAAAGTGCAAGAAGAAGTATGGCAAGGATTGG  
GACATTTATTGCCAACATTGCCCTACATGTTTATACCATAACATTTTTTAA

## GAS1

ATGTTATTCCAGGCGTTTTTCGACCCTGCCTTGGTGCCTATACGCTGCCTCCGGTGCAGTTGCAGCCAGTAGC  
AGCAGTGCTACCAAACCTTCCAGCAATTGAAGTTGCTGGTAACAAGTTCTTCTACTCGAACAACGGTTCTCAATTT  
TACATCAAAGGTGTTGCATACCAGGCCGACACGGCTAACTCATCTTCTGATGACAGCATCGACGATCCATTGGCC  
GACTACTCCAAATGTTTCGAGAGATATTCCATATTTGCAGAAGTTACAGACCAATGTTGTTTCGTGCTACGCAGTT  
AACACAACCTTTGGACCACAGCAAGTGTATGGAAGCTCTAGCTGACGCTGGTATTTACGTCATTGCAGACTTGTCC  
ACCCAGCTGACTCTGTAAACAGAAATGACCCTACTTGGGATATCGCACTATAACCAGCGTTACTGCGTGGTG  
GACGCTTTTGCTAACTACACAAACGTGTTGGGTTTCTTTGCCGGTAACGAAGTGACCAACAATGCTAGTAACACT  
GATGCATCTGCCTTTGTGAAGGCTGCCGTTAGAGACGTTAAGCAGTACATCAAGGACAAGAAATACAGAACAATT  
CCTGTTGGTTACTCCTCCAATGATGACGAGGACACCAGAGTTGCTATGGCTGACTACTTTGCTTGGCGTGACGAA  
GACCAAAGGCTGATTTCTACGGTATTAACATGTACGAATGGTGTGGTGACTCAACCTACCAGAAATCTGGTTAC  
CAGGACAGAACCAATGACTTCAAGAATTTGTCGATCCCTATCTTCTTCTCTGAGTACGGTTGCAACGCTGTCACT  
CCAAGAAAGTTTACCGAGGTTTACAGCTCTTTACGGTGTATGATGACTGATGTGTGGTCCGGTGGTATTGTTTAC  
ATGTATTTTCGAAGAGACCAACAAGTACGGTTTGGTCAAGTATTGATGATGATCAGGTCAAGACTTTGACTGACTTC  
GACAACCTTGTGAGCCAGATGGCCAAGATCTTCCAAGTGCTGCCAAGAAGTCTTCTTACTGCAAGAGCACT  
TCTCTATCTTGGCCAGCCACCGCAAGTACTGGAAAGCTAACACCAAATTTGCCACCTACCCCAAGCAAGGACCTC  
TGTACCTGTATGGAAGACTCCTTGTCTGTGTTGTGGACGATAAGGTTGACGAAGATGACTACAGTGATTTGTTT  
AGTTACATCTGCTCGAAGGTGGACTGTTCTGGTATTACCGCAACGGTACTAGTGGTAAATATGGTTCTTACTCT  
TTCTGCTCTGCCAAGGAGCAGCTATCCTTTGTGATGAACCTTGTATTACGAGAAGAACGGTGGTAGCAAGTCTGAC  
TGTAGCTTCAAGTGGTTCTGCCAGCTTGAAGTCTGCCACCACCAAGTCTGCCTGTTCTCTGCTTTGAAGCAGATT  
GGTAGCTCCGGTCTAGGCTCTGCCAGCAAAAGTGTCACTGGTTCCGCTCTGGCTCCTCCTCTGGCTCATCTTCT  
GCTTCTGGTTCTTCTGAATCTTCTCTGGCAAGGGTTCTAGCTCCAGTAAGGGTGGTGACTCTTCTCTAGTTCC  
AAGAAGAGCTCAAGTACAGCTAGCACCAAGGAAAAGAAGTCTTGTGCCGCTTCCAAGGCTAGTCTGTCTCAGGTA  
ATCCTATCCTTCTGGCCACTTTGGGTGTGGTCCGGTGGTGGATTGCTTTGGCTTGA

OPI3

ATGGATTTCAAAGAATCGTTCAGAGGCATTCCGATCCGCTTACATGGAACGTGTTCCATGACGTGGATTTGGAAGAA  
CCCTCTTTTAGCACCGCAATGTATTTTATAATCTTCAATCCAACCTTCTGGAACATTGCGGCTCGCTTAGAATAT  
CATAACACTTTTTGACGAAAATAACGGGGAGTGCTAAAAAGGGTTGCTACTTGCTTGCCGCTACCATTTTCACG  
CTGGGTGTAGGTCGTGATTTATGTTTTCCACAAGGCCTTGGATGCTCAGCCGTTATCACCAGTATTGGATAATCCT  
AAAGTTAAATTTGTGGGGCAAGCGCTGGTCATTGCAGGCCAGGTACTTGTGGCACTTCCATGTGGCAGTTGGGC  
ATAACTGGTACCTACTTAGGAGATTACTTCGGTATTTTAATGGATCACATAGTCACCTCTTCCCATTTAACGTT  
TGTAACAATCCCATGTACCAGGGCAGTACTTTGTCATTTTTAGGGTATTCTTTGGTACTGGAAAAGCAGCAGGC  
CTGATACTGGCCTTCATGGTATATGCAATGTATTTCGTTTGCATTGAGGTTTGAAGAGCCATTTACTGCCAAGATA  
TACGCAGAAAGAGATGACCGCTAGAAGTAGAAAAAATGAATAA

SUR4

ATGGAACAAGCTGTTGAGACCGCCGTGGAGCAAGTCGCCGTGGAGGCCGCTACCCTCCATTGGCAAGCTTCATC  
CAAGACACCAACTGGATCCGTTACCACGTTCCCTCCGTGCAGCACCCATTGCGGTTAGAGCTGTGGCCCATCTTC  
TCAAAGGTCTTCGAAAAATATGCCGGCTACCCTGCGGAGGACTTTGAGTTCGTGGACCGTAAGACTTTTTATGGCC  
AATGGGTACCATGCCATGGGCGTGATCGCGATCTACTGTCTTGTGATTAGTTCGGCCAGTTTTTGTCTCGCAGT  
GTCAATGCCAAACCTCTCAAGTTGAGGCTTCTGACCCAGGTGCACAACCTGGTGTGACAGCCGTTTCGCTCGTG  
CTGTTGATGCTACTCATCGAACAGCTGTTGCCCATGATCGTTGAGCACGGTTTGTCTTTGCCATCTGCTCGAAG  
CAGGCTTTACACCCAAGCTCGTCACCCTTTACTACCTCAACTACTTGTCCAAGTTCCTTGAAGTCTCGACACC  
GTCTTCCTCGTCCTTATGAGGAAGAAGTTGCTGTTTTTGCACGTGTACCACCACAGTGTACTGCGCTGCTGTGC  
TACTCGCAGTTGACCGGTAGGACTTCCATCGAGTGGGTGCCCATCACGTTGAACCTTGCTGTGCACGTGCAGATG  
TACTGGTACTTCTACTTTGAGCTCCCGCGGCATCAAGGTGTGGTGGAAAGCAGTGGGTCAACCGTTTCCAGATCCTG  
CAGTTTGTGATTGACGTGATCTTTGTGTACTTTGCCACCTACACCTTCTACGCTGACAAAATACTTTTCCACCATC  
TTGCCCAACAAGGGTAGCTGTTACGGCACTCAGGATGCCGCTGCCTACGGCTATTTGATCTTGACCTCCTACCTG  
GTCTTGTTCATTTCTTTTTACATCAACTCCTACAATAAGAAGCAGCAGAAGGCCGAGAAGGTTGAGGCCAAGGCC  
CAAGCCGATGCTGTTGCCGAGGCCAACTCCGACATCAAACCTGCTGGTTCAAGAAAAGGCCCTGA

ISC1

ATGCCCCAAAGTAGTGGTATTGACTATAGGAATGGTAGTTCACACTTCCAAAGGGCCTTTTAGCTCACAAAGTGTG  
AAGTTTTTAACATTTAATACCTGGGGGCTCAAATGGGTTTTCAAACATCGTAAGCAAAGACTTAGGGCAATCGCT  
GATGAGCTCTCTGGCCGGGCTAGCACTATTTTATTGCCAGGGAGTGAAATCTTAACTACGGGCAACCGTGCAGCGG  
GCTGATCAGTATGATGTCGTTGCCCTTACAAGAAATTTGGTGTCAAGAAGATTGGGAATATATCGTCATGAGATGC  
TCAGAGATATATCCCTATCATCGTATTTTTTATTCTGGAATCATAACGGGGCCTGGCTTGGAATCCTATCTAAA  
ATTCCCATCGAGTCAACTTTTCTTTACCGTTTTTCCAATTAATGGAAGGCCAAGTGCCGTCCACAGAGGTGATTGG  
TATGTGGTAAATCAATCGCTATTACTTTGCTCGAATCCCCAGATCGCAACACTTATCCTCTCGCTATCATGAAC  
AGCCACATGCATGCACCATACGCGTTGGATGGTGTGATGCCGCTATGCGTGTATAGGGCTTGTCAGCCTGGGAT  
TTTGCTAAGCTGGCTAATTTATACAAAAGGCCGGGTAAGTACTCAGTAGTGATTGTGGGAGATTTGAACTCAAGACCC  
GGATCATTACCGCATAGGTTTTCTTACAGAGGAGACGGGACTCGTGGATTCTTGGGAACAGCTAAACGGGGTTCAA  
GATTTACAAGCCATTGCGAAATTGAGGCCTATGGAACAATTGCAATACGGCTGCACGACATGTGATTCGACGCTC  
AACACTTGGCGGTCCCATAAGAAGCCTAATGAGGCTTGCAGATTAGACTACGCGCTCATAGATCCCGAGCGACTG  
GAAACGACCGCTGCAGGGGTACGTTTTACGGAGTTGATTCCAGGCGTAGGATCTTTTTCTGATCATTTTGCTTAC  
ACATGTACTTTGAACTTTTGGCCCCGACTCCCCACAGATTTGCCTCCAAATAGCGCGAATCAGTCACGGGAGTTT  
TTACTACATCGCTATGCCAACTATCAGGAGATGTTGCAGTGTATTGCGACCTATATGGGCACATCAAGAAAAGCAG  
AGCGTGTTTAGAGGAATCCATTTTCTTTTATCTGTGGTCTCCTGATCTCCTCCTTGGTACTTTCGGTATTTAACT  
GTTTGGCCGGGATTTTTTGGGTTCTTTTGTGGCAGTTGTTTGTGTTACAGGTACCCTCGATGGATTGATCGCA  
TTCTTATTCGGCGCCAAAGAAATACGTGCCCTTCTTGGAGTAGAGCAAGAAGTTGCGGGAGCTCAGCATCATCTC  
CAGAGATTTCTAGATTTTAAGAACAAGTCTTAG

*FEN1*

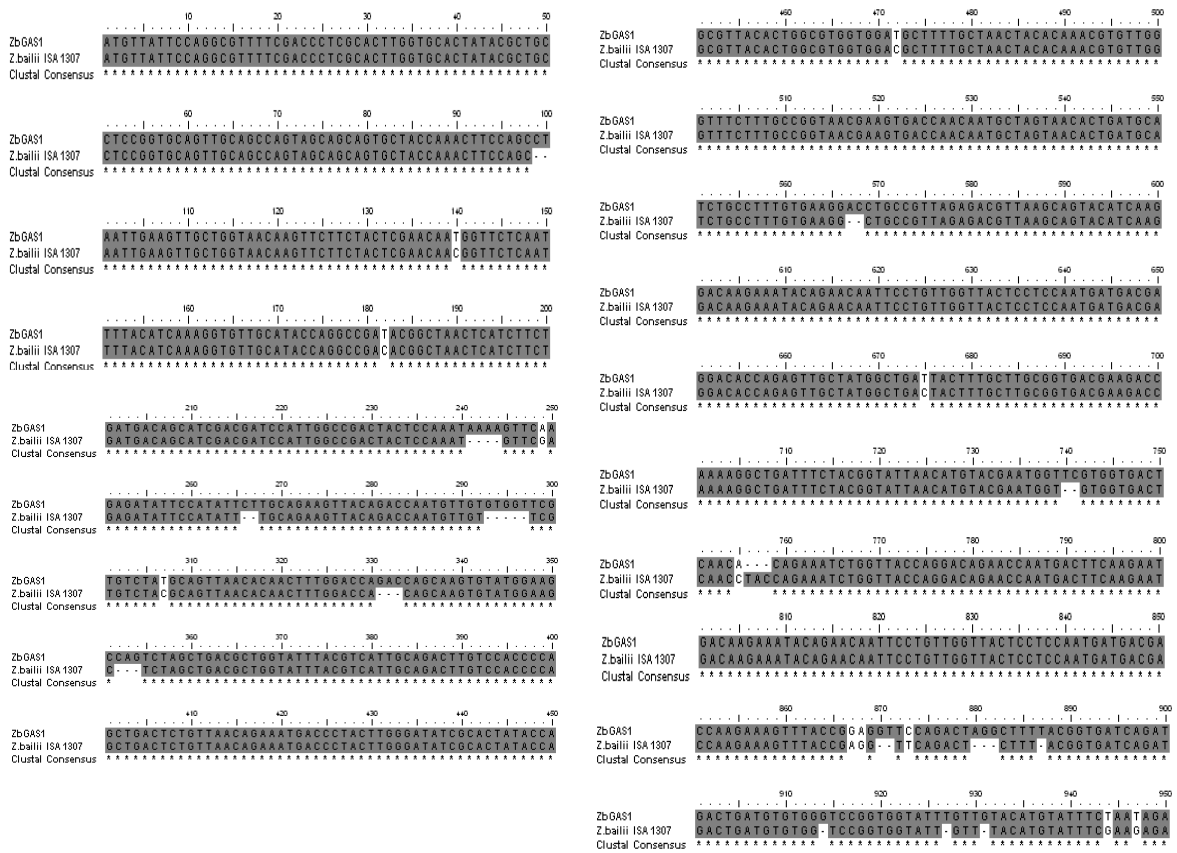
ATGGAAGAACTTTTGGAAACAGCATGC TGGAGCAGGCACAGCATCTCGACAAGTCCTGCAAACCTCAGCAACTTT  
CTACCGACTGTGGACAGACCTTTCTTCAATATTTCCCTTATGGGAACATTTTGATTATATTGTCAGTCAAGTCACG  
GGGGGAAGATTTATTCCCAGTCAATTTAGCTTCGTCCCCGACAAGCTACCTTTGAGTGACTTGAGATCTGTCATT  
GCAGCTATTACTACTTATTATGTTGTTATTTTTGGTGGTAGAGCACTTTTGCCTAAAGCCCAACCTTTGAAACTC  
AATGTATTATTTCAATTTTATAATATATTTCCCTTACGCTTGGATCTCTAACTCTTTTGACTTTAATGATAGAACAA  
CTGGTACCTATACTCTACAAAAACGGTCTCTACTATGCAATTTGTGACATCGGTGCCTGGACCAACCAATGGTG  
ACACTTTACTACCTGAATTACATTTTCAAATTCATCGAATTTATTGATACTGTGTTTCTAGTCTCAAGCATAAA  
AAGCTAACTTTCCCTACACACCTACCACCACGGTGCTACTGCTCTGCTTTGCTACACCCAGTTGGTCGGGACGACT  
GCGATCTCATGGGTCCCCATTACACTCAATTTGGGCGTGCATGTGCTAATGTACTTCTACTACTTCCCTCGCAGCC  
AGAGGAATTAGAGTTTGGTGGAAAGAGTGGGTTACTAGGTTCCAAATATTGCAATTTATGCTAGATATCGGATTC  
ATCTATTTTCGCAGTGTACCAAAAATTTGTCCACATTTTTATCCCAAGTTTCCCCACTGTGGTGACTGCGTTGGA  
TCCACTACAGCTACTTTTTCTGGTTGTGCCATCATCTCATCTTATTTATTCCCTATTTGTGGCATTTTACATCGAA  
GTATACAGGCAGAAGGGCACCAAAAAGAGTAGGGTCATCAAGCGTGCTCGCGGTGGTGTGGCTGCTAAAAGTCAAT  
GAGTATGTCAATGTCGACTTGAAAAAGGTATCGACACCATCTCCCTCCCC CGACAGATCTTTTAGAAAAAGA  
CATTGA

## Anexo II

### Protocolo de extração de DNA genómico (adaptado de Hoffman e Winston, 1987):

1. Crescer 20 ml de cultura em YPD a 28°C
2. Recolher as células por centrifugação durante 5 minutos a 4000 rpm. Remover o sobrenadante e ressuspender as células em 2 ml de água destilada. Transferir as células para 4 tubos *ependorf* de 2 ml e centrifugar 2 minutos a 18514 xg.
3. Decantar o sobrenadante e “vortexar” os tubos para ressuspender as células no líquido residual.
4. Adicionar 2 ml de mix de lise (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM pH 8, EDTA 1mM) e cerca de 0,3g de esferas de vidro. Na hote adicionar 0,2 ml de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1).
5. “Vortexar” durante 30 segundos e alternar com gele 30 segundos, 6 vezes.
6. Adicionar 0,2 ml de TE 10:1 (pH 7,4).
7. Centrifugar 5 minutos à velocidade máxima. Transferir a camada aquosa para um novo tubo. Adicionar de etanol 96%. Misturar por inversão e colocar a – 20°C durante 1 hora.
8. Centrifugar 5 minutos à velocidade máxima. Remover o sobrenadante. Deixar o pellet secar ao ar e ressuspender em 50 µl de TE 10:1 (pH 7,4).

## Anexo III



**Figura 34:** Alinhamento entre o produto de PCR de amplificação do gene *ZbGAS1* com a respectiva sequência do gene de *Z. bailii* ISA 1307

## Anexo IV

### Protocolo transformação:

#### Dia 1 – Condições de crescimento

1. Inocular a estirpe *S. cerevisiae* BY4741 com o gene deletado em 50 ml de meio YPD (1% extracto de levedura, 2% Glucose e 2% peptona) e incubar a 28°C, 180 rpm.

#### Dia 2 – Transformação de levedura

1. Medir a  $DO_{640nm}$  (diluição 1:5).

2. Transferir 50 mL de meio 2x YPM pré-aquecido aos frascos de cultura pré-aquecidos e adicionar  $2,5 \times 10^8$  células para se obter uma concentração de  $5 \times 10^6$  células/ml ( $DO_{640nm} = 0,25$ ).

3. Quando a concentração for  $2 \times 10^7$  células/ml (aproximadamente 4 horas após incubação) recolher as células por centrifugação a 3200 g durante 5 minutos. Lavar as células em 25 ml de água estéril e ressuspender em 1 ml de água estéril ( $DO_{640nm} = 1,3$ ).

4. Ferver uma amostra de 250  $\mu$ l de ssDNA em água numa placa de aquecimento durante 5 minutos e arrefecer em gelo.

5. Transferir a suspensão de células para um eppendorf de 1,5 ml, centrifugar durante 1 minuto a à velocidade máxima e desprezar o sobrenadante.

6. Adicionar água estéril para um volume final de 1,0 ml e “vortexar” para ressuspender as células.

7. Pipetar 100  $\mu$ l para um eppendorf de 1,5 ml, um por cada transformação. Centrifugar a velocidade máxima durante 1 minuto e remover o sobrenadante.

8. A cada eppendorf adicionar os seguintes componentes ao pellet, na ordem apresentada:

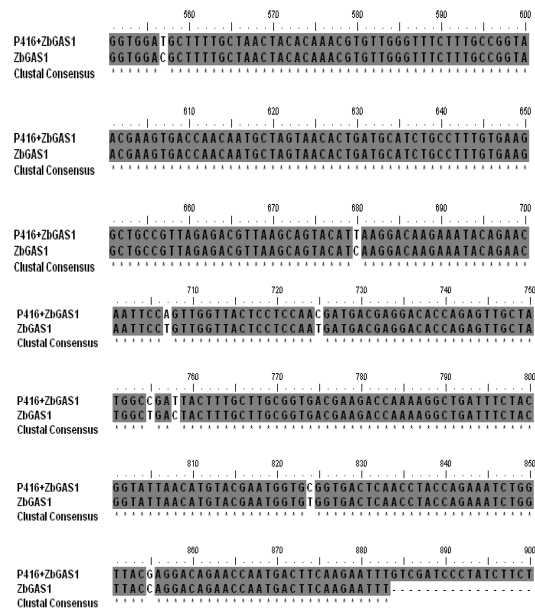
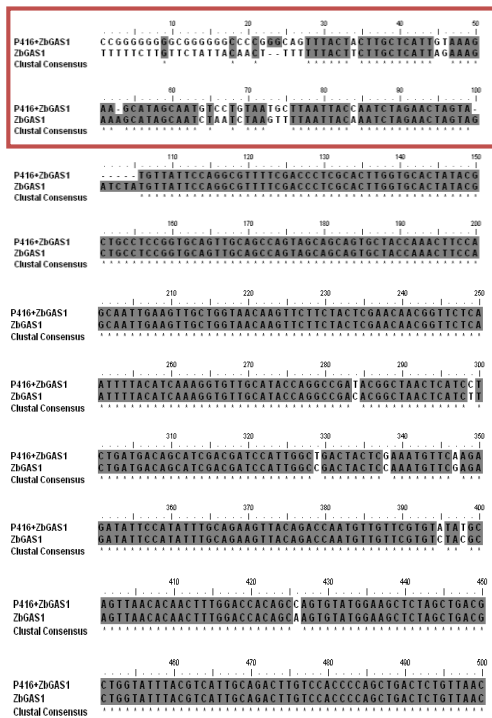
Componente	Volume ( $\mu$ L)
PEG 3500 50% (p/v)	240
LiAc 1.0 M	36
ssDNA fervido (2 mg/ mL)	50
p416_TEF (100 ng/ $\mu$ L)	2
dH <sub>2</sub> O	32
Volume total	360

9. Ressuspender as células, “vortexando” pelo menos 1 minuto.

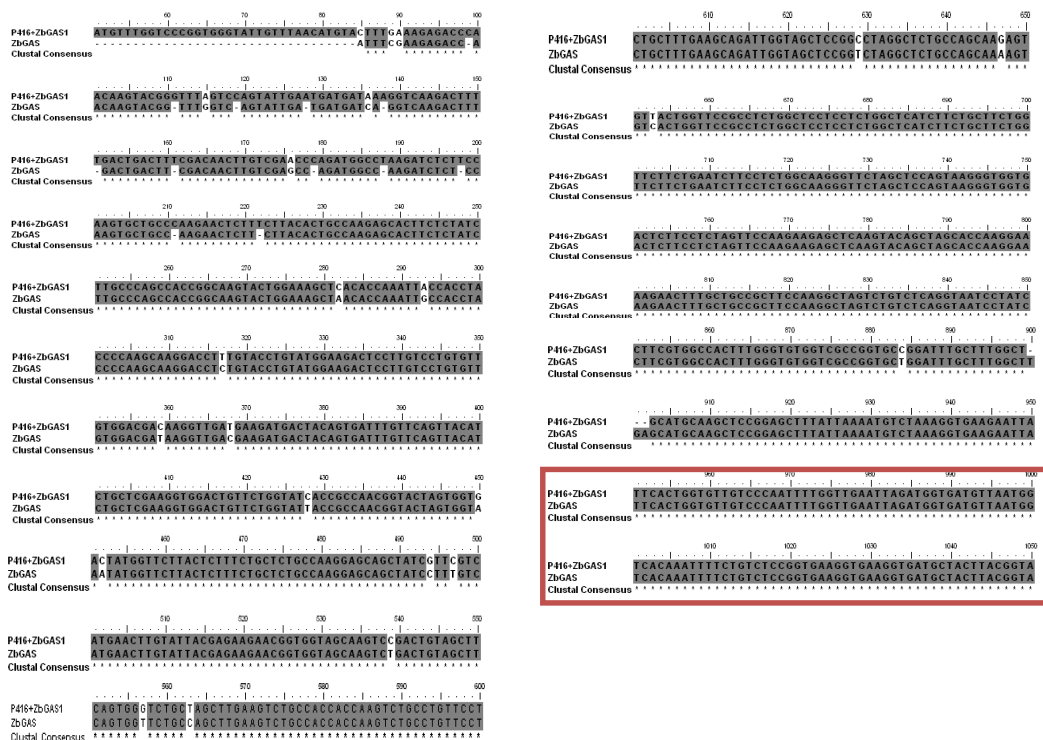
10. Incubar os eppendorfs a 42°C durante 40 minutos.

11. Centrifugar a velocidade máxima durante 1 minuto e remover os componentes adicionados.
12. Pipetar 500 µl de água estéril para cada tubo. Soltar o pellet com o auxílio de uma ponta e “vortexar” suavemente.
13. Plaquear 200 µl e 100 µl de cada eppendorf em meio sólido seletivo.
14. Incubar as placas a 28°C durante 3-4 dias e contar o número de transformantes.

# Anexo V

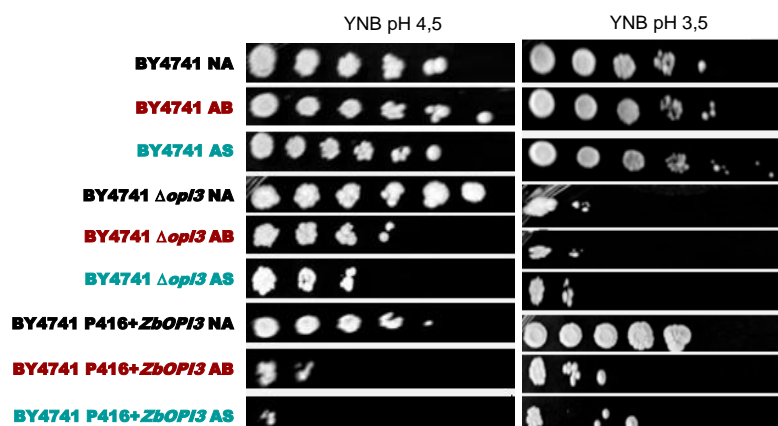


**Figura 35:** Alinhamento entre o produto PCR de colônia da estirpe transformante BY4741 P416+ *ZbGAS1* com 800 pb do gene *GAS1* de *Z. bailii* ISA 1307 a partir do codão de iniciação ATG. Região de recombinação entre o vector e o *primer forward* assinalado a vermelho.

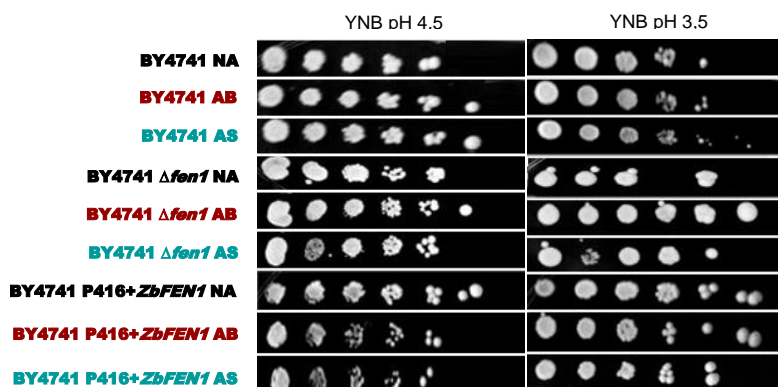


**Figura 36:** Alinhamento entre o produto PCR de colônia da estirpe transformante BY4741 P416+ *ZbGAS1* com 800 pb do gene *GAS1* de *Z. bailii* ISA 1307 a partir do codão stop TGA. Região de recombinação entre o vector e o *primer reverse* assinalado a vermelho.

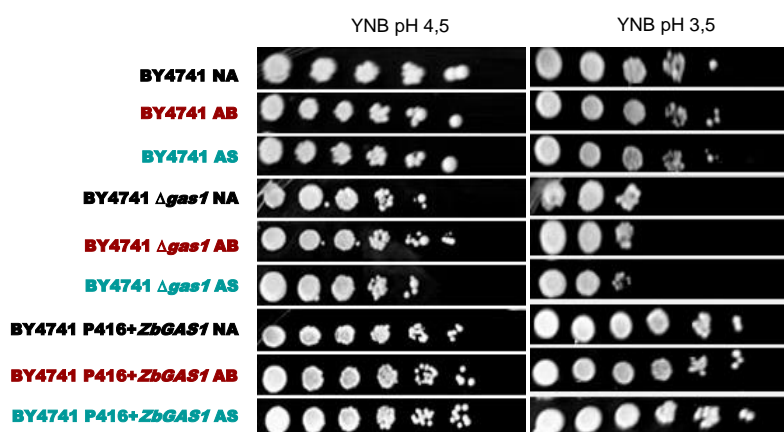
## Anexo VI



**Figura 37:** Drop-tests para *S. cerevisiae* BY4741, BY4741  $\Delta$ *opi3* e BY4741  $\Delta$ *opi3* a expressar o gene *OPI3* de *Z. baillii* ISA 1307 (pH 4,5 e pH 3,5) para células não adaptadas aos ácidos (NA – não adaptadas), e células pré-adaptadas a ácido benzóico (AB – adaptadas ao ácido benzóico) e a ácido sórbico (AS – adaptadas ao ácido sórbico). Crescimento registado após 2 semana de incubação a 28 °C.



**Figura 38:** Drop-tests para *S. cerevisiae* BY4741, BY4741  $\Delta$ *fen1* e BY4741  $\Delta$ *fen1* a expressar o gene *FEN1* de *Z. baillii* ISA 1307 (pH 4,5 e pH 3,5) para células não adaptadas aos ácidos (NA – não adaptadas), e células pré-adaptadas a ácido benzóico (AB – adaptadas ao ácido benzóico) e a ácido sórbico (AS – adaptadas ao ácido sórbico). Crescimento registado após 2 semana de incubação a 28 °C.



**Figura 39:** Drop-tests para *S. cerevisiae* BY4741, BY4741  $\Delta$ *gas1* e BY4741  $\Delta$ *gas1* a expressar o gene *GAS1* de *Z. baillii* ISA 1307 (pH 4,5 e pH 3,5) para células não adaptadas aos ácidos (NA – não adaptadas), e células pré-adaptadas a ácido benzóico (AB – adaptadas ao ácido benzóico) e a ácido sórbico (AS – adaptadas ao ácido sórbico). Crescimento registado após 2 semana de incubação a 28 °C.

