

# REMOÇÃO ZIMOLÓGICA DA ACIDEZ VOLÁTIL E FIXA DE MOSTOS E VINHOS: DA FISIOLOGIA À MANIPULAÇÃO GENÉTICA DE LEVEDURAS

C. Leão\* e co-autores\*\*

Departamento de Biologia/Centro de Ciências do Ambiente

Universidade do Minho, Braga

\*tel.: 253 601104; fax: 253 601132

e-mail: [cleao@bio.uminho.pt](mailto:cleao@bio.uminho.pt)

\*\* Nomes referenciados no final do texto

## 1. A perspectiva zimológica em processos de desacidificação de mostos e vinhos

A Biologia de Leveduras é uma das áreas de investigação que o Departamento de Biologia da Universidade do Minho tem privilegiado desde o seu início. Uma das principais vertentes deste domínio tem incidido sobre a temática "Leveduras /Fermentação Vinária". Os projectos assentam em abordagens pluridisciplinares de fisiologia, bioquímica e genética molecular, articulando estudos de índole fundamental com potenciais aplicações no sector enológico. Para tema da presente comunicação, seleccionámos os trabalhos relacionados com a utilização de leveduras em processos de desacidificação de mostos e vinhos.

A acidez, volátil e fixa, é um dos parâmetros que dita, por excelência, a qualidade dos vinhos. O ácido acético, principal responsável pela acidez volátil, é um sub-produto frequente da fermentação alcoólica de mosto de uva conduzida pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Quantidades adicionais deste ácido podem provir do metabolismo de bactérias acéticas contaminantes. O teor de ácido acético é considerado uma medida da qualidade do vinho, sendo a concentração legal máxima 1,2 g/l de acidez volátil (expressa em ácido acético) para vinhos a granel (1). Recentemente, tem-se verificado

um aumento crescente de vinhos com acidez volátil elevada imediatamente após a fermentação do mosto. As práticas actualmente disponíveis para a recuperação de vinhos azedos nem sempre são satisfatórias, não existindo medidas eficazes para a sua recuperação. Por sua vez, no caso do ácido málico que contribui para o parâmetro acidez fixa, tanto a perspectiva bacteriológica (2) – bactérias lácticas seleccionadas – como a perspectiva *Schizosaccharomyces pombe* (3), apresentam dificuldades à escala industrial, não só em termos de oportunidade da sua realização, como também em termos de efeitos na qualidade organoléptica dos vinhos.

Em teoria, uma forma de reduzir os teores de ácidos seria através da indução do seu consumo por leveduras durante a fermentação. Para tal, é necessário dispor de estirpes capazes de consumir o(s) ácido(s) nas condições presentes em fermentações vinárias o que, por sua vez, passa pela elucidação dos mecanismos de utilização por leveduras dos ácidos naquelas condições. *S. cerevisiae* seria, à partida, a melhor candidata para tais processos. No entanto, não são conhecidas estirpes desta levedura capazes de utilizar o ácido acético, bem como de consumir eficientemente o ácido málico na presença de açúcares. No nosso laboratório, uma parte significativa dos estudos desenvolvidos sobre

Biologia de Leveduras, tem incidido na elucidação dos mecanismos subjacentes à resposta fisiológica de leveduras à presença de ácidos orgânicos, tanto na vertente da sua utilização como fonte de carbono e/ou de energia, como na vertente dos possíveis efeitos negativos dos ácidos na actividade metabólica da levedura. Destes, iremos destacar os aspectos relacionados com o transporte e o metabolismo de ácidos carboxílicos fracos e sua regulação em leveduras, incluindo espécies de interesse enológico. Estes estudos, conforme será também abordado, constituíram o suporte científico essencial para a delineação de estratégias moleculares subjacentes à obtenção de estirpes de *S. cerevisiae* com capacidade de remoção dos ácidos acético ou málico em ambientes típicos de uma fermentação vinária.

## 2. Remoção zimológica do ácido acético

### 2.1 *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii*: dois padrões distintos de resposta fisiológica a meios ácidos com açúcares

As leveduras diferem na sua resposta à presença de ácidos fracos, vulgarmente utilizados como agentes antimicrobianos em alimentos e bebidas, o que condiciona de forma decisiva a probabilidade da sua ocorrência como agentes de contaminação/alteração. Em particular, *Zygosaccharomyces bailii* é considerada como uma das leveduras mais perigosas em termos de alteração de vinhos, dada a sua tolerância elevada a meios com ácido acético e açúcares e a valores baixos

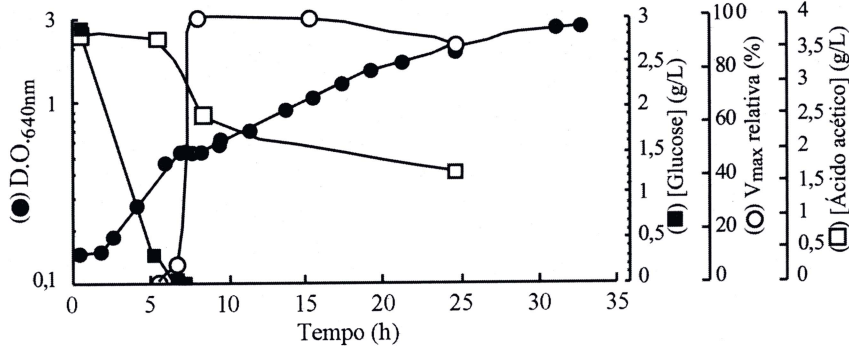


Figura 1. Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* IGC 4072 em meio mineral, com vitaminas e oligoelementos, com glucose (0,3%, p/v) e ácido acético (0,3%, v/v), pH 5,0. O valor relativo da velocidade máxima de transporte ( $V_{max}$ ) foi estimado utilizando uma concentração saturante de ácido acético radioactivo, 2 mM, pH 6,0.

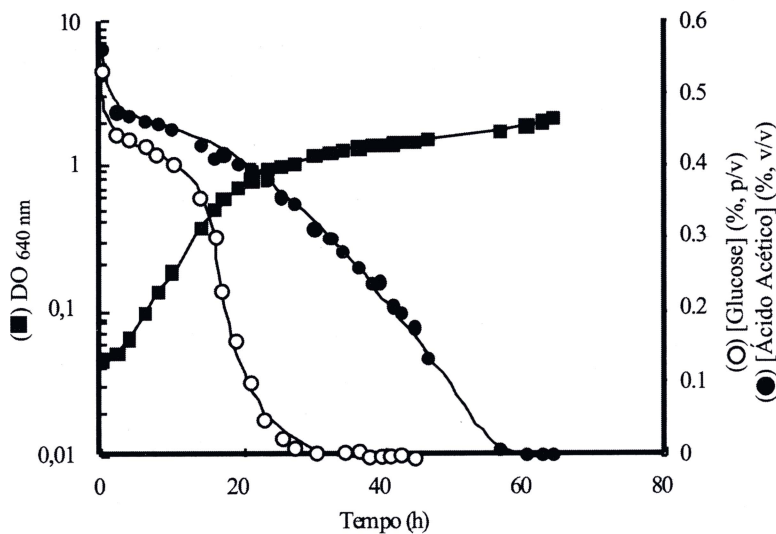


Figura 2. Crescimento de *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307, pH 3,0, em meio mineral, com vitaminas e oligoelementos, com glucose (0,5 %, p/v) e ácido acético (0,5 %, v/v) e respectivos perfis de utilização.

de pH (4-6). Por outro lado, *Saccharomyces cerevisiae* não é capaz de sobreviver a tais ambientes. São vários os mecanismos que poderão estar associados aos padrões distintos de resistência a ácidos fracos destas duas leveduras (7-16), dos quais iremos dar ênfase ao transporte transmembranar, ao metabolismo intracelular do ácido na presença de glucose e às suas consequências na capacidade de utilização do ácido acético em ambientes fermentativos.

♦ O transporte transmembranar do ácido acético

Na levedura *S. cerevisiae*, o transporte de monocarboxilatos através da membrana plasmática

pode ocorrer por dois sistemas distintos de simporte com protões: um partilhado pelo acetato, propionato e formato e um outro, de afinidade mais elevada e de menor especificidade, para acetato, lactato, piruvato e propionato; estes sistemas de transporte estão presentes em células provenientes, respectivamente, de culturas em meio com ácido acético e ácido láctico como única fonte de carbono e energia (17, 18). Ambos os sistemas estão sujeitos a repressão pela glucose, mas apenas o de alta afinidade depende da presença de um indutor exógeno. Em células provenientes de culturas em meio com glucose, não se detecta actividade para estes sistemas de

simporte monocarboxilato- $H^+$ . Nestas condições, a entrada do ácido ocorre na forma não dissociada por difusão simples. Em meios mistos com glucose e ácido acético, pH 5,0, o crescimento é diáuxico; o consumo do ácido bem como actividade para o(s) sistema(s) de simporte monocarboxilato- $H^+$  apenas são detectados após o esgotamento do açúcar do meio de cultura (Figura 1). Nas mesmas condições de cultura, mas a valores baixos de pH (3,0-3,5), *S. cerevisiae* não evidencia crescimento, pelo menos durante um período experimental de oito dias.

Em *Z. bailii*, observa-se um comportamento bem distinto. Nesta levedura estão também presentes dois sistemas de transporte activo secundário para o acetato, do tipo simporte com protões, mas sujeitos a mecanismos de regulação distintos: um compartilhado pelo acetato, propionato e formato em células provenientes de culturas em meio com ácido acético, etanol ou glicerol como única fonte de carbono e de energia, indutivo e sujeito a repressão pela glucose; um segundo, em células cultivadas em meio com glucose ou frutose e específico para o acetato (11). Adicionalmente, *Z. bailii*, num meio com glucose e ácido acético, pH 3,0 (Figura 2) ou 5,0, apresenta crescimento bifásico. A primeira fase está associada ao consumo simultâneo do açúcar e do ácido e a segunda ao consumo do ácido remanescente. Curiosamente, em células recolhidas durante a primeira fase de crescimento não foi detectada actividade para qualquer um dos sistemas de transporte mediado para o ácido. No entanto, foi possível demonstrar que nestas células está presente um transportador para o acetato, idêntico ao presente em células provenientes de culturas em meio com glucose, cuja actividade está sujeita a regulação por um mecanismo de retro-inibição pelo substrato (14). Este comportamento contrasta com o acima descrito para *S. cerevisiae* e muitas outras leveduras como *Candida utilis*, *Torulaspora*

*delbrueckii* e *Dekkera anomala*. Nestas, tipicamente, o transporte e o metabolismo do acetato estão sujeitos a repressão pela glucose (19-21).

♦ **O metabolismo intracelular do ácido acético na presença de glucose: a estratégia peculiar de *Zygosaccharomyces bailii***

Na sequência dos resultados acima referidos, procedeu-se à caracterização da energética do crescimento e das enzimas chave do metabolismo do ácido acético, bem como à elucidação do destino metabólico do ácido em células de *Z. bailii* provenientes de culturas em meios mistos com glucose e ácido acético (22). Os resultados, no seu conjunto, mostraram que esta espécie apresenta um padrão de regulação do metabolismo do ácido acético invulgar em leveduras e diferente do descrito para *S. cerevisiae*. O esquema para este modelo metabólico de *Z. bailii* é apresentado na Figura 3. Assim, nesta levedura quando cultivada em meios mistos, com glucose e ácido acético, e durante a primeira fase de crescimento, correspondente ao consumo simultâneo de glucose e

ácido acético, são de realçar os seguintes aspectos :

- a glucose e o ácido acético são utilizados como fonte de carbono e de energia e a gluconeogénese não está operacional;
- as enzimas acetil-CoA sintetase (Acs), malato desidrogenase (Mdh) e álcool desidrogenase (Adh), em contraste com a isocitrato sintetase e a fosfoenolpiruvato carboxicinase, estão activas; os resultados, quando comparados com os descritos para *S. cerevisiae*, mostram que, em *Z. bailii*, o factor de repressão pela glucose das enzimas Acs e Mdh é menos acentuado (cerca de metade) do que em *S. cerevisiae*;
- o acetato na presença de glucose é assimilado a nível do ciclo de Krebs com a concomitante produção de glutamato (estudos realizados por ressonância magnética nuclear); nestas condições, o acetato utilizado como fonte de carbono, é maioritariamente desviado para a biossíntese de proteínas e lípidos (ensaios de incorporação de C<sup>14</sup>);
- o acetato é convertido em acetil-CoA que é utilizada como uma fonte adicional do ciclo de Krebs e para a síntese de lípidos;
- o reabastecimento do ciclo de

Krebs, catalisado pela piruvato carboxilase, é incrementado na presença de ácido acético.

♦ **O papel do transporte transmembranar e do metabolismo intracelular do ácido na resposta da levedura a meios ácidos com açúcares**

Os resultados sugerem, assim, que em *Z. bailii*, o transporte e actividade da acetil-CoA sintetase assumem um papel fisiológico relevante na resposta desta espécie a ambientes contendo misturas de açúcares e ácido acético e a valores baixos de pH tais como os presentes numa fermentação vinária. Nestas condições, em *Z. bailii* e em contraste com *S. cerevisiae*, tanto o transporte como a enzima acetil-CoA sintetase estão activos. Além disso, os fluxos do transporte e do metabolismo do ácido parecem estar regulados de tal forma que a concentração intracelular de ácido pode ser mantida a valores aos quais não ocorrem efeitos tóxicos do ácido (14).

**2.2. Estratégias moleculares e a construção de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para a remoção do ácido acético**

♦ **Clonagem do gene que codifica a acetil-CoA sintetase**

Com base nos resultados dos estudos de fisiologia e bioquímica acima referidos, uma das estratégias delineada para a obtenção de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, capazes de utilizar ácido acético na presença de glucose, assentou na clonagem do gene que codifica a acetil-CoA sintetase, enzima que catalisa a 1ª etapa do metabolismo do ácido. Estes estudos incluíram essencialmente as seguintes etapas:

- construção de uma biblioteca genómica de *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307 num vector shuttle para *S. cerevisiae* e *E. coli* (pRS 316, com marca selectiva *URA3*);

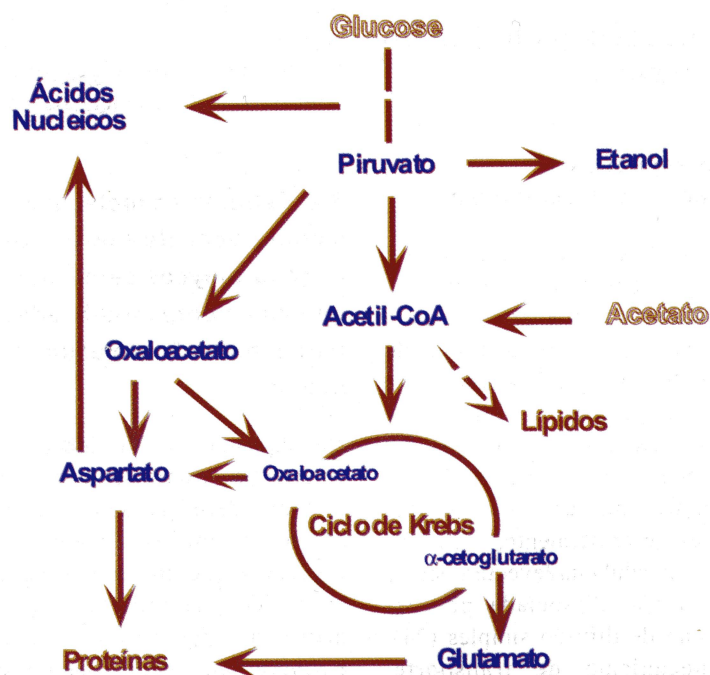


Figura 3. Modelo proposto para as principais vias metabólicas envolvidas na utilização simultânea da glucose e ácido acético em *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307.

- identificação do gene *ACS* de *Z. bailii* que passou pela construção de uma sonda homóloga e pela sua utilização no *screening* da biblioteca genómica de *Z. bailii*.

Obtiveram-se quatro clones contendo um *insert* com homologia elevada com a sonda testada. Um destes clones foi sequenciado e mostrou conter uma ORF (*Open Reading Frame*) que codifica uma proteína de 675 aminoácidos. Esta sequência revelou uma homologia de 80 e 69 %, respectivamente, com os genes *ACS2* e *ACS1* de *S. cerevisiae*. Por outro lado, a identidade a nível da sequência de aminoácidos da proteína foi de 78 e 66 % e a similaridade de 84 e 78 %, respectivamente, para as proteínas *ACS2* e *ACS1* de *S. cerevisiae*.

O mutante de *S. cerevisiae acs2Δ*, como consequência da ausência de acetil-CoA sintetase citoplasmática, essencial para a biossíntese de lípidos, não apresenta capacidade de se multiplicar num meio contendo glucose como única fonte de carbono e energia. O fenótipo apresentado por este mutante foi revertido pela introdução de um plasmídeo contendo a ORF clonada. Este resultado mostra que o clone isolado complementa a mutação, sendo mais uma evidência que o gene isolado codifica a enzima acetil-CoA sintetase, tendo sido designado por *ZbACS*.

Entretanto procedeu-se à obtenção de transformantes de *S. cerevisiae* com o gene *ZbACS* clonado. Estes transformantes estão a ser testados, comparativamente com *Z. bailii*, no que respeita à sua capacidade de utilização do ácido na presença de glucose e à sua sensibilidade a meios ácidos com glucose e ácido acético. Prevê-se que estas estirpes se venham a revelar de potencial aplicação enológica em processos de remoção de acidez volátil.

### ◆ *Clonagem do transportador do acetato*

Outra das estratégias delineada para a obtenção de estirpes de *S.*

*cerevisiae*, capazes de utilizar ácido acético na presença de glucose, passou pela utilização de abordagens de genética molecular dirigidas para a clonagem de genes envolvidos no transporte de monocarboxilatos em *S. cerevisiae* e sua expressão nesta espécie, em condições de repressão pela glucose. Foram obtidos e caracterizados clones mutantes afectados na capacidade de transporte de ácido acético e outros ácidos monocarboxílicos, seguindo-se os trabalhos de clonagem. Foi identificado e caracterizado o gene *JEN1* responsável pela expressão da proteína transportador de monocarboxilatos em *S. cerevisiae* (23). Posteriormente e usando vectores adequados, construíram-se estirpes de *S. cerevisiae* capazes de expressar constitutivamente o gene *JEN1*. Estas estirpes, quando cultivadas em meio com glucose e ácido acético, e em contraste com a estirpe selvagem, revelam actividade para o transportador de monocarboxilatos, incluindo acetato. Estão em curso os ensaios respeitantes à possível utilização destas estirpes para a remoção do ácido acético à escala de microvinificações.

## 3. Remoção zimológica do ácido málico

### 3.1 A perspectiva *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* não é capaz de utilizar ácido málico e outros ácidos intermediários do ciclo de Krebs, como única fonte de carbono e de energia. No entanto, na presença de glucose, *S. cerevisiae* é capaz de consumir o ácido, mas com uma eficiência reduzida, variável e dependente da estirpe. Nestas condições de crescimento, a entrada do ácido na célula da levedura ocorre na forma não dissociada por um mecanismo de difusão simples (24). Este mecanismo de transporte, associado à baixa afinidade da enzima málica, enzima chave do

metabolismo do ácido, parece constituir a etapa limitante para a fraca eficiência da utilização do ácido málico pela levedura (25). Esta limitação poderia, por hipótese, ser ultrapassada pela presença de uma proteína transportadora para o ácido málico na membrana plasmática de *S. cerevisiae*, através da aplicação de técnicas de engenharia genética. Para tal, a primeira dificuldade a contornar prendia-se com a selecção da(s) espécie(s) de levedura(s) a utilizar para o isolamento e clonagem do gene que codifica para a proteína transportadora do ácido málico. Tirando partido do “know how” adquirido, nos últimos anos, no nosso laboratório sobre transporte de ácidos dicarboxílicos e sua regulação em leveduras (26-30), optou-se pelas espécies *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis*. Ambas estão incluídas no grupo genericamente designado por “Leveduras Krebs (+)” e, em contraste com *S. cerevisiae*, são capazes de utilizar ácido málico como única fonte de carbono e de energia. Além disso, e nestas condições de crescimento, o transporte do ácido ocorre por um sistema de transporte mediado activo, do tipo simporte com protões, compartilhado pelo malato e outros dicarboxilatos. No que diz respeito à regulação, trata-se de um sistema de transporte indutivo e sujeito a repressão catabólica pela glucose.

### 3.2. Estratégias moleculares e a construção de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para a remoção do ácido málico

Na sequência do referido na secção anterior, o desafio seguinte prendia-se com a definição de uma estratégia que nos permitisse a identificação e caracterização molecular de genes envolvidos na utilização de ácido málico em *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis* para posterior expressão em *Saccharomyces cerevisiae*. Neste sentido, foram

delineadas duas abordagens distintas e complementares: i) obtenção de transformantes de *S. cerevisiae* com um banco genómico da levedura *K. lactis* e ii) obtenção de mutantes de *K. marxianus* afectados no transporte de malato.

♦ **Obtenção e caracterização de transformantes de *Saccharomyces cerevisiae* com um banco genómico da levedura *Kluyveromyces lactis***

Numa primeira fase os trabalhos incidiram na pesquisa de transformantes de *S. cerevisiae* W303.1A capazes de utilizar, com eficácia, ácido málico, usando um banco genómico de *K. lactis* construído no vector pSK1. Esta abordagem conduziu à identificação de uma estirpe transformante com o fenótipo pretendido. O crescimento desta estirpe, em meio de cultura sólido contendo ácido málico e um indicador de pH, origina alcalinização do meio e colónias com dimensão superior à observada para a estirpe selvagem. Estes resultados, por hipótese, estariam associados a um consumo mais eficaz de ácido málico pela estirpe transformante em relação à selvagem. Os ensaios, em meio líquido com extracto de levedura, peptona e ácido málico, confirmaram esta hipótese. Nestas condições de crescimento, as células

da estirpe transformada apresentam actividade para o transportador de malato ausente nas células não transformadas; além disso revelam uma capacidade de consumo de ácido málico superior à estirpe selvagem (Figura 4).

Os estudos prosseguiram com a análise da sequência completa de 2744 pb (Genbank nº de acesso AJ271895) do fragmento de DNA de *K. lactis*, contido no plasmídeo recuperado designado por pO1. Observou-se a presença de duas ORFs: ORF1 de 396 pb e ORF2 de 1062 pb. Utilizando sondas específicas para cada uma das ORFs, verificou-se por *Northern-blot* que o nível de transcrição da ORF1 não é afectado pelas condições de crescimento usadas. No entanto, o nível de expressão da ORF2 é mais elevado em células cultivadas em meio com ácido málico do que em células provenientes de culturas em meio com glucose. A este gene foi atribuída a designação de *MUP1*. Resultados idênticos foram obtidos na estirpe de *S. cerevisiae* transformada com o plasmídeo pO1 onde foram encontrados dois transcritos com cerca 1,5 and 2,5 kb, idênticos aos encontrados em *K. lactis*. Em *S. cerevisiae* não transformada não são detectáveis quaisquer transcritos da ORF1 ou da

ORF2.

O gene *MUP1* foi interrompido em *K. lactis* com concomitante integração do gene de resistência à geneticina, *KanMX4*. Análises feitas por *Southern-blot* e por PCR indicaram a presença de uma segunda cópia no genoma que designámos por *MUP2*. Um segundo passo de mutagenese foi então efectuado para anular o gene *MUP2*, utilizando a marca de selecção *URA3*.

As três estirpes de *K. lactis*, *MUP1MUP2*, *mup1ΔMUP2* e *mup1Δmup2Δ*, em meio com ácido málico, como única fonte de carbono e de energia, apresentam um padrão de crescimento muito idêntico, sem diferenças significativas na taxa específica de crescimento e na biomassa final avaliada por D.O. As principais diferenças detectadas foram ao nível da actividade do sistema de transporte de dicarboxilatos avaliada pela incorporação de ácido succínico radioactivo. A afinidade do sistema foi muito semelhante nas três estirpes mas, no mutante duplo a velocidade máxima do sistema foi reduzida para cerca de metade. Na sua globalidade, estes resultados parecem indicar que os genes *MUP1* e *MUP2* estão envolvidos no processo de regulação da actividade da permease de dicarboxilatos de *K. lactis*.

Utilizando vectores adequados, construíram-se estirpes de *S. cerevisiae* com expressão do gene *MUP1* na presença de glucose. Os resultados obtidos, à escala laboratorial, são promissores; seguir-se-ão os testes com vista à possível aplicação destas estirpes em enologia para efeitos da remoção do ácido málico.

♦ **Obtenção de mutantes de *Kluyveromyces marxianus* afectados no transporte de malato**

Em paralelo aos estudos acima descritos, procedeu-se também a abordagens de genética molecular tendo como objectivo a clonagem do gene transportador do ácido málico da levedura *K. marxianus* e sua

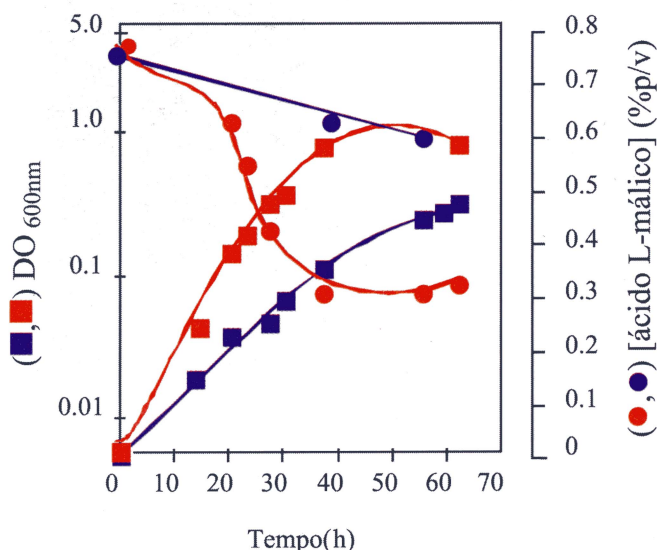


Figura 4. Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* W303.1A em meio mineral, com vitaminas e oligoelementos, e com ácido málico, 0,5%, (p/v), pH 5,0 e respectivo perfil de utilização. Símbolos: de cor azul, estirpe selvagem; de cor vermelha, estirpe transformada com o gene *MUP1* de *Kluyveromyces lactis*.

expressão em *S. cerevisiae* na presença de glucose.

Utilizando a estirpe KMS3 de *K. marxianus*, auxotrófica para a leucina, obtiveram-se mutantes deficientes na utilização de ácido málico (Figura 5). Dois dos mutantes obtidos (Mal6 e Mal7) não evidenciaram actividade do sistema de transporte malato-protão presente na estirpe selvagem, sugerindo que estas estirpes se encontram afectadas no gene que codifica para a proteína transportadora do malato. O padrão electroforético das proteínas de membrana de células induzidas (provenientes de culturas com ácido málico) da estirpe Mal7 mostrou que estava ausente uma proteína com Mr de 28 kD (Figura 6). Esta proteína, p28, foi posteriormente isolada, purificada e microsequeenciada.

Tendo por base a sequência parcial de aminoácidos da p28, procedeu-se à pesquisa, por "colony screening" e por PCR, do gene putativo do transportador de malato, usando uma sonda de DNA degenerada, num

banco genómico de *K. marxianus*. Estão em curso os trabalhos com vista à clonagem deste gene e sua expressão em *S. cerevisiae* na presença de glucose. Espera-se que as estirpes a obter venham, também, a revelar-se de potencial utilização em enologia para processos de remoção de ácido málico.

## Considerações Finais

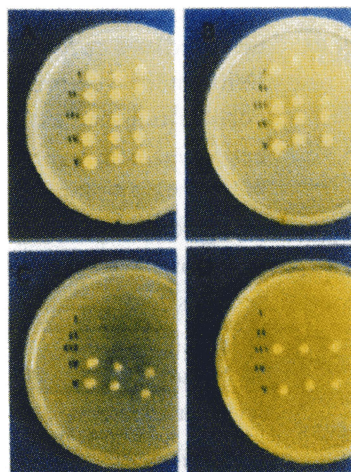
Conforme referido no início, a desacidificação de mostos ou vinhos continua a ser um problema em aberto. Com o intuito de disponibilizar ao enólogo diversas alternativas biológicas/tecnológicas para processos de desacidificação, desenvolveram-se estudos dirigidos para a obtenção de estirpes de leveduras com capacidade de utilização de ácidos orgânicos nas condições presentes em processos de fermentação alcoólica. Nos trabalhos apresentados, a ênfase foi para as leveduras pertencentes às espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*,

*Kluyveromyces marxianus* e *K. lactis* e para os ácidos acético e málico associados, respectivamente, à acidez volátil e fixa dos vinhos.

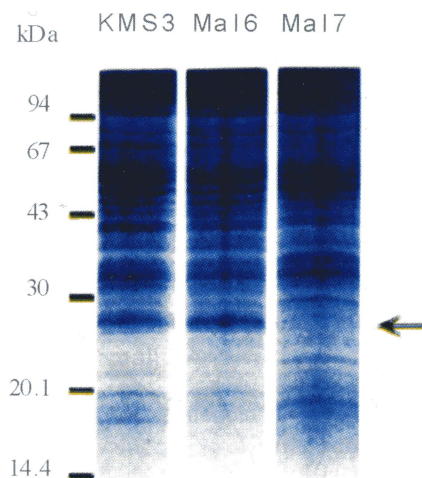
Como reflexão final, considera-se que os trabalhos apresentados permitiram (i) avanços significativos no conhecimento sobre fisiologia, bioquímica e genética de leveduras, muito em particular sobre os processos associados ao transporte e metabolismo intracelular de ácidos mono- e dicarboxílicos nas condições presentes em ambientes típicos de fermentações vinárias e (ii) a obtenção de estirpes de *S. cerevisiae* manipuladas geneticamente a serem, num futuro próximo, testadas a nível de adega para a sua potencial utilização em processos de remoção controlada da acidez volátil e fixa de mostos/vinhos.

## Co-autores:

F. Rodrigues, S. Paiva, O. Queirós, D. Schuller, F. Cássio, H. Cardoso, M. João Sousa, M. Casal e M. Côrte-Real (Departamento de Biologia/Centro de Ciências do Ambiente, Universidade do Minho, Braga).



**Figura 5.** Crescimento de *Kluyveromyces marxianus* KMS3 e de clones mutantes (I a IV) em meio de cultura rico (yeast nitrogen base) contendo as seguintes fontes de carbono: A) glucose, 2% (p/v); B) glicerol, 1% (p/v); C) etanol, 2% (p/v); D) ácido málico, 1% (p/v), pH5,0.



**Figura 6.** Gel de SDS-poliacrilamida, corado com azul de Coomassie, das proteínas totais de membrana de células de *Kluyveromyces marxianus* KMS3 e dos clones mutantes Mal6 e Mal7, provenientes de culturas em meio com ácido málico (desreprimidas). A seta assinala um polipéptido com 28 kDa ausente nas células do mutante Mal7.

## Agradecimentos:

Os trabalhos apresentados foram realizados em colaboração com P. Moradas Ferreira (IBMC/ICBAS Universidade do Porto), H. Santos (Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras), V. Loureiro e M. Malfeito (Laboratório de Microbiologia, Departamento de Botânica e Engenharia Biológica, Instituto Superior de Agronomia) e no âmbito de projectos financiados pelo INIA-PAMAF, FCT e pela União Europeia (contratos INIA-PAMAF 96.09.5554.0, PRAXIS XXI nº 2/2.1/BIO/1068/95, PRAXIS XXI P/AGR/11135/1998 e AIR-CT93-0830). F. Rodrigues e S. Paiva são bolsiros de doutoramento (JNICT/PRAXIS XXI).

## Referências

- Fuselsang, K. (1997) Wine Microbiology. Chapman, New York.
- Kunkee, F. (1991) Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making, FEMS Microbiol. Rev., **88**, 55-72.
- Sousa, M. J., M. Mota and C. Leão. (1995) Effects of ethanol and acetic acid on the transport of malic acid and glucose in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: implications in wine deacidification, FEMS Microbiol. Lett., **126**, 197-202.
- Malfeito-Ferreira, M., Lopes I. and Loureiro, V. (1990) Characterization of spoilage yeasts in Portuguese bottled dry white wines, Actualités Oenologiques, **89**. Dunod, Paris.
- Thomas, D. S. and Davenport, R. (1985) *Zygosaccharomyces bailii*: a profile of characteristics and spoilage activities, Food Microbiol., **2**, 157-169.
- Fleet, G. (1992) Spoilage yeasts, Critical Reviews in Biotechnol., **12**, 1-44
- Pinto, I., Cardoso, H. and Leão, C. (1989) High and low enthalpy death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by acetic acid, Biotechnol. Bioeng., **33**, 1350-1352.
- Cardoso, H. and Leão, C. (1992) Mechanisms underlying low and high enthalpy death induced by short-chain monocarboxylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Microbiol. and Biotech., **38**, 388-392.
- Pampulha, M. E. and Loureiro-Dias, M. C. (1989) Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast, Appl. Microbiol. Biotechnol., **31**, 547-550.
- Warth, A. D. (1991) Mechanism of action of benzoic acid on *Zygosaccharomyces bailii*: effects on glycolytic metabolite levels, energy production and intracellular pH, Appl. Environ. Microbiol., **57**, 3415-3417.
- Sousa, M. J., Miranda, L., Côrte-Real, M. and C., Leão (1996) Transport of acetic acid in *Zygosaccharomyces bailii*: effects of ethanol and their implications on the resistance of the yeast to acid environments, Appl. Environ. Microbiol., **62**, 3152-3157.
- Casal, M., Cardoso, H. and Leão, C. (1998) Effects of ethanol and other alkanols on the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol., **64**, 665-668.
- Fernandes, L., Côrte-Real, M., Loureiro, V., Loureiro-Dias, M. C. and Leão, C. (1997) Glucose respiration and fermentation in *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae* express different sensitivity patterns to ethanol and acetic acid, Lett. Appl. Microbiol., **25**, 249-253.
- Sousa, M. J., Rodrigues, F., Côrte-real, M. and Leão, C. (1998) Mechanisms underlying the transport and intracellular metabolism of acetic acid in the presence of glucose by the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, Microbiology, **144**, 665-670.
- Prudêncio, C., Sansonetty, F. and Côrte-Real, M. (1998) Flow cytometric assessment of cell structural and functional changes induced by acetic acid in the yeasts *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae*, Cytometry, **31**, 307-313.
- Fernandes, L., Côrte-Real, M. and Leão, C. (1999) A peculiar behaviour for cell death induced by weak carboxylic acids in the wine spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*, Letters in Appl. Microbiol., **28**, 345-349.
- Cássio, F., Leão, C. and van Uden, N. (1987) Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **53**, 509-513.
- Casal, M., Cardoso, H. e Leão, C. (1996) Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*, Microbiology, **142**, 1385-1390.
- Leão, C. and van Uden, N. (1986) Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Candida utilis*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **23**, 389-393.
- M. Casal and C. Leão (1995) Utilization of short-chain monocarboxylic acids by the yeast *Torulaspora delbrueckii*: specificity of the transport systems and their regulation, Biochim. Biophys. Acta, **1267**, 122-130.
- Gerós, H., Cássio, F. and Leão, C. (2000) Utilization and transport of acetic acid in *Dekkera anomala* and their implications on the survival of the yeast in acidic environments, J. Food Prot., **63**, 96-101.
- Rodrigues, F. (1998) "Estudos sobre a regulação do metabolismo intracelular de ácido acético na levedura *Zygosaccharomyces bailii*". Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Braga.
- Casal, M., Paiva, S., Andrade, R.P., Gancedo, C. e Leão, C. (1999) The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by *JEN1*. J. Bacteriol., **181**, 2620-2623.
- Salmon, J. M. (1987). L-malic acid permeation in resting cells of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*, Biochem. Biophys. Acta **901**, 30-34.
- Kuczynski, J. T. and F. Radler. (1982) The anaerobic metabolism of malate of *Saccharomyces bailii* and the partial purification and characterization of malic enzyme, Arch. Microbiol., **131**, 266-270.
- Côrte-Real, M., Leão, C. and van Uden, N. (1989) Transport of L(-) malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Candida spharica*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **31**, 551-553.
- Côrte-Real, M. and Leão, C. (1990) Transport of malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Hansenula anomala*, Appl. Environ. Microbiol., **56**, 1109-1113.
- M. J. Sousa, M. Mota and C. Leão (1992) Transport of malate in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: evidence for a proton/malate symport, YEAST, **8**, 1025-1031.
- Queirós, O., Casal, M., Althoff, S. Moradas-Ferreira, P. e Leão, C. (1998) Isolation and characterization of *Kluyveromyces marxianus* deficient mutants on malate transport, Yeast, **14**, 401-407.
- Cássio, F. and C. Leão (1993) A comparative study on the transport of L (-) malic acid and other short-chain carboxylic acids in the yeast *Candida utilis*: evidence for a general organic acid permease, Yeast, **9**, 743-752.