

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

RENAN VASCONCELOS SANTOS

**Influência dos carboidratos e da  
expressão de genes relacionados à  
parede celular na floculação  
de *Saccharomyces cerevisiae***

VITÓRIA

2013

RENAN VASCONCELOS SANTOS

**Influência dos carboidratos e da  
expressão de genes relacionados à  
parede celular na floculação  
de *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade  
Federal do Espírito Santo, como  
requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Biotecnologia, na  
área de concentração Agronegócio.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patricia  
Machado Bueno Fernandes.

VITÓRIA

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

"Influência dos Carboidratos e da Expressão de Genes Relacionados à Parede Celular  
na Floculação de *Saccharomyces Cerevisiae*"

Renan Vasconcelos dos Santos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada por:

Prof.ª. Dr.ª. Patricia Machado Bueno Fernandes (UFES)  
Orientadora

Prof. Dr. Marco César Cunegundes Guimarães (UFES)  
Membro Interno

Prof.ª. Dr.ª. Fernanda Bravim (UFES)  
Membro Interno

Prof.ª. Dr.ª. Janice Lisboa De Marco (UnB)  
Membro Externo

Vitória-ES, 02 de abril de 2013.

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patricia M. B. Fernandes, por me conceder a oportunidade de fazer parte de um núcleo de pesquisa referência no estado, conduzindo-o com grande dedicação e competência;

À Dr<sup>a</sup>. Fernanda Bravim, minha mentora desde o começo no laboratório, pela participação ativa em todas as minhas atividades, pelo aprendizado contínuo e pela grande paciência;

Ao Prof. Dr. A. Alberto Ribeiro Fernandes, pelos ensinamentos tão pertinentes em cada conversa;

Ao Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster, da UFRJ e IFES, e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Amaral e equipe do Laboratório de Produtos Naturais da FIOCRUZ, pela grande prestatividade e ajuda gratuita quando tanto precisei de uma “luz” em meus experimentos de cromatografia;

Aos antigos e atuais colegas do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio, pelo apoio, aprendizado e pelas boas risadas, dentro e fora do laboratório. Em especial, à Érica, pelo companheirismo e muitos ensinamentos sobre os carboidratos. Ao Helber, pela disponibilidade nas análises de HPLC e à Paolla, pela paciência e longas discussões sobre os mistérios da biologia molecular;

À minha querida família, que mesmo distante, sempre esteve presente em todos meus passos dessa jornada: meu pai Carlos, minha mãe Neide, meus irmãos Rodrigo e Isabella, minha madrastra Ione, meus tios Ginaldo (Dado) e Giovanni (Nena), meus primos Aurélio e Guilherme;

A todos os meus tão queridos amigos e amigas, de longe e de perto, cada um especial a sua maneira e com uma importância sem precedentes na minha vida, por toda a alegria e apoio que sempre me proporcionam;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos. À FAPES, CAPES e a FINEP pelo financiamento da pesquisa;

À UFES, através do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de fazer o mestrado.

Muito obrigado a todos!

“Eis o momento! Começando nesta porta, um longo e eterno caminho mergulha no passado: atrás de nós está uma eternidade! Não será verdade que todos os que podem andar têm de já ter percorrido este caminho?”

- *Friedrich Nietzsche*

## RESUMO

Desde os primórdios da civilização, o homem utiliza as fermentações microbianas para a produção de diversos bens de consumo. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é, sem dúvida, o maior expoente dos processos fermentativos conhecidos, responsável pela fabricação do pão, da cerveja, do vinho cachaça e do bioetanol. *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarionte a ter seu genoma sequenciado e vem sendo utilizada há várias décadas como um modelo eucarionte para estudos celulares e moleculares. A parede celular de levedura é uma robusta estrutura composta por uma camada estrutural interna de glucanos e quitina, e uma camada externa de manoproteínas covalentemente ligadas à camada estrutural, que determinam a maior parte das propriedades de superfície da célula. A floculação de levedura pode ser definida como um processo não sexual, reversível e cálcio-dependente de agregação de células em massas multicelulares, chamadas flocos, com a subsequente sedimentação a partir do meio em que elas estão suspensas. É um processo muito complexo e depende de numerosos fatores, tais como as características do meio (pH e a presença de cátions), as condições de fermentação (oxigenação, os açúcares, a temperatura de crescimento, a concentração de etanol) e a expressão dos genes da família FLO. O processo envolve a interação de proteínas especializadas da parede celular denominadas lectinas, presentes apenas em células floculantes, e carboidratos (receptores) na parede celular das células vizinhas. Propriedades de floculação especificamente ajustadas poderia levar a uma melhoria no processamento de produtos biotecnológicos de fermentação, tais como alimentos, bebidas e biocombustíveis. Dados anteriores do grupo sobre a identificação do perfil de floculação entre cepas selvagens de levedura isoladas de diferentes alambiques mostraram duas cepas com um perfil característico de sedimentação (BT0510 e BT0605), enquanto outras duas (BT0505 e BT0601) sem capacidade de floculação. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre o conteúdo de carboidratos (glicose e manose) da parede celular e de genes relacionados à parede com o processo da floculação, a fim de melhor entender os fatores que causam a diferença no comportamento floculante. As células de levedura foram cultivadas em meio YEPD, incubadas a 28 °C e 150 rpm de agitação. A parede celular foi extraída por combinação de sonicação, agitação vigorosa com pérolas de vidro e de ebulição em solução detergente. Após lavagem extensiva com água ultra pura, o *pellet* contendo a parede celular foi incubado a 80 °C para secagem completa e determinação do peso seco. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma hidrólise com ácido sulfúrico, precipitação de íons sulfato por adição de Ba(OH)<sub>2</sub>, e concentração a vácuo. Os monossacarídeos liberados foram analisados por HPLC na coluna REZEX-RHM, eluição isocrática com água ultra pura, detector de refração diferencial a 60 °C. Por PCR em Tempo Real foram comparados os níveis de expressão dos genes FLO e de genes relacionados à parede celular entre uma cepa floculante e outra não-floculante. Não foi encontrada diferença significativa entre o teor de glicose e manose nas cepas floculantes e não floculantes, o que sugere que o perfil de floculação não está diretamente relacionado com a concentração de carboidratos de parede celular. A análise da expressão gênica relativa mostrou um aumento significativo dos genes da família FLO (*FLO1*, *FLO8* e *FLO10*) na cepa floculante, confirmando as expectativas. Um grande aumento, de 27 vezes, foi observado no gene *CWP1*, corroborando com estudos que sugerem uma grande importância deste gene para a integridade da parede celular e para o processo de floculação. Também houve aumento de outros genes relacionados à parede celular. Estudos de proteômica da parede celular, além de análise em espectrometria de massas poderiam ajudar a elucidar os resultados encontrados, e contribuir para o melhor entendimento da floculação nos processos fermentativos.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, parede celular, floculação, cachaça, carboidratos, HPLC, genes FLO.

## ABSTRACT

Since the dawn of civilization, man has used microbial fermentation to produce various consumer goods. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is undoubtedly the main factor in known fermentation processes, responsible for the production of bread, beer, wine, cachaça and bioethanol. *S. cerevisiae* was the first eukaryotic organism to have its genome sequenced and has been used for several decades as a model for eukaryotic cellular and molecular studies. The yeast cell wall is a robust structure composed of a structural internal layer of glucan and chitin, and an outer layer of mannoproteins covalently linked to the structural layer, which determine the bulk properties of the cell surface. The flocculation of yeast can be defined as a non-sexual, reversible and calcium-dependent aggregation of cells in multicellular masses, called flocs, with subsequent sedimentation from the medium in which they are suspended. It is a very complex process and depends on numerous factors such as the characteristics of the medium (pH and the presence of cations), conditions of fermentation (oxygenation, sugars, growth temperature, and the ethanol concentration) and the expression of genes of the FLO family. The process involves the interaction of specialized cell wall proteins called lectins, present only in cell flocculants, and carbohydrates (receptors) in the cell wall of neighboring cells. Flocculation properties specifically set may lead to an improvement in the processing of fermentation biotechnology products, such as food, beverages and biofuels. The group's previous data on the identity of flocculation profile between wild yeast strains isolated from different stills showed two strains with a characteristic profile of sedimentation (BT0510 BT0605), while two others (BT0505 and BT0601) showed no flocculation capacity. The objective of this study was to evaluate the relationship between the content of carbohydrates (glucose and mannose) and cell wall-related genes to the flocculation process in order to better understand the factors that cause the difference in behavior flocculant. Yeast cells were grown in YEPD medium and incubated at 28 ° C and 150 rpm agitation. The cell wall was extracted by a combination of sonication, vigorous agitation with glass beads and boiling in detergent solution. After extensive washing with ultrapure water, the *pellet* containing the cell wall was incubated at 80 ° C to complete drying and determination of dry weight. Then the samples were subjected to hydrolysis with sulfuric acid, precipitation of sulphate ions by adding Ba (OH) 2, and concentration in vacuum. The liberated monosaccharides were analyzed by HPLC on a column of REZEX-RHM, isocratic elution with ultrapure water, differential refraction detector at 60 ° C. The expression levels of FLO genes and genes related to cell wall between a flocculent strain and a non-flocculent were compared using Real Time PCR. No significant difference was found between the levels of glucose and mannose in flocculent and non-flocculent strains, which suggests that the profile of flocculation is not directly related to the concentration of cell wall carbohydrates. Analysis of relative gene expression showed a significant increase in the FLO gene family (*FLO1*, *FLO8* and *FLO10*) in flocculant strain, confirming expectations. A large increase of 27 times was noted in *CWP1* gene, confirming studies suggesting a major importance of this gene for the cell wall and in the flocculation process. There was also an increase in other genes related to the cell wall. Studies of cell wall proteomics, and mass spectrometry analysis may help elucidate the results, and contribute to a better understanding of flocculation in fermentation processes.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, cell wall, flocculation, cachaça, carbohydrates, HPLC, FLO genes.

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 -	Macromoléculas da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> .....	22
Tabela 2 -	Oligonucleotídeos usados como primers na reação de RT-PCR em tempo real.....	51
Tabela 3 -	Dosagem de glicose pelo método de glicose oxidase-peroxidase das amostras de levedura utilizadas no estabelecimento dos protocolos de extração e hidrólise da parede celular.....	56
Tabela 4 -	Razão Manose/Glicose das cepas floculantes e não-floculantes.....	63



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Microscopia eletrônica de varredura da levedura <i>S. cerevisiae</i> , mostrando algumas características morfológicas comuns: broto (gêmula) e cicatrizes.....	17
Figura 2 -	Composição e estrutura da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> .....	22
Figura 3 -	Organização molecular da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> .....	26
Figura 4 -	Floculação em <i>S. cerevisiae</i> .....	27
Figura 5 -	Mecanismo da floculação em <i>S. cerevisiae</i> .....	29
Figura 6 -	Diagrama representativo da multiplicidade de fatores que afetam a floculação de <i>S. cerevisiae</i> .....	31
Figura 7 -	Regulação da floculação em <i>S. cerevisiae</i> .....	37
Figura 8 -	Perfil de sedimentação das cepas selvagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BT0505 (losango), BT0510 (círculo), BT0601 (triângulo) e BT0605 (quadrado).....	41
Figura 9 -	Organograma da metodologia desenvolvida no presente estudo.....	44
Figura 10 -	Perfil cromatográfico dos monossacarídeos analisados, Glicosamina, Glicose e Manose. Mistura de soluções dos padrões comerciais nas concentrações de 10.0 mg/mL, com seus respectivos tempos de retenção, em minutos.....	53
Figura 11 -	Perfil cromatográfico dos monossacarídeos da parede celular de uma mesma amostra e comparação entre as colunas REZEX-ROA (A) e REZEX-RCM (B).....	54
Figura 12 -	Perfil cromatográfico da mistura dos padrões comerciais dos carboidratos, nas concentrações de 1.0 mg/mL (A) e 10.0 mg/mL (B).....	55
Figura 13 -	Perfil dos monossacarídeos da parede celular da cepa Y440, liberados após hidrólise com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	56
Figura 14 -	Cromatograma da fração ácido-insolúvel após tratamento com liticase.....	58
Figura 15 -	Cromatogramas das frações ácido-solúvel (A) e alcali-solúvel (B) após hidrólise básica, seguida de hidrólise ácida.....	59
Figura 16 -	Cromatogramas das frações ácido-solúvel (A e B) e alcali-solúvel (C e D) após hidrólise ácida inicial, seguida de hidrólise básica (A e C), e o inverso, hidrólise básica inicial, seguida de hidrólise ácida (B e D).....	60
Figura 17 -	Perfil cromatográfico das cepas BT0510 (preto), BT0601 (azul), BT0505 (verde) e BT0605 (vermelho), mostrando a presença dos monossacarídeos.....	61
Figura 18 -	Avaliação do teor de Glicose e comparação entre as cepas floculantes (BT0510 e BT0605) e não-floculantes	

	(BT0601e BT0505).....	62
Figura 19 -	Avaliação do teor de Manose e comparação entre as cepas flocculantes (BT0510 e BT0605) e não-flocculantes (BT0601 e BT0505).....	63
Figura 20 -	Avaliação do teor teórico de Glicosamina e comparação entre as cepas flocculantes (BT0510 e BT0605) e não-flocculantes (BT0601 e BT0505).....	64
Figura 21 -	Expressão relativa dos genes flocculantes e relacionados à parede celular na cepa flocculante BT0605.....	65

## LISTA DE SIGLAS

AcNa	Acetato de Sódio
AE	Tampão Acetato de Sódio-EDTA
ANOVA	Análise de variância
ASL	<i>Alkali-sensitive linkage</i> , ou ligação/ álcali-sensível
ATP	Adenosina trifosfato
cAMP	Adenosina-monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementar
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COMPASS	<i>Complex proteins associated with Set1p</i> / complexo de proteínas associadas a Set1p
Ct	<i>Cycle threshold</i> / limiar do ciclo
CWPs	<i>Cell wall proteins</i> / proteínas da parede celular
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EC	<i>Enzyme code</i> , código da enzima
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Glc	Glicose
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
HDACs	Histona-desacetilases
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Hsps	<i>Heat shock proteins</i> / proteínas do choque térmico
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotássico
kDa	Kilo Daltons
LBAA	Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio
Man	Manose
MI	Manose-insensível
PC	Parede Celular
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> / reação em cadeia da polimerase
PKA	Proteína-quinase A
Pir-CWPs	<i>Proteins with internal repeats</i> / proteínas com repetições internas
RT	<i>Reverse transcriptase</i> / transcriptase reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TFA	Ácido trifluoracético
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
YEPD	<i>Yeast extract, peptone, dextrose</i> / extrato de levedura, peptona e dextrose

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 O HOMEM E AS FERMENTAÇÕES MICROBIANAS: UM BREVE COMEÇO.....	15
1.2 A LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> : UMA FÁBRICA MICROBIANA.....	17
1.3 A PAREDE CELULAR DE LEVEDURA.....	19
<b>1.3.1 Estrutura e composição da parede celular.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.2 Organização molecular da parede celular.....</b>	<b>24</b>
1.4 O FENÔMENO DA FLOCULAÇÃO EM <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	27
<b>1.4.1 Mecanismo da floculação.....</b>	<b>28</b>
1.4.1.1 Fenótipos da floculação.....	30
<b>1.4.2 Efetores da floculação.....</b>	<b>31</b>
<b>1.4.3 Genética básica da floculação.....</b>	<b>35</b>
<b>1.4.4 Regulação da floculação.....</b>	<b>37</b>
1.5 O PROCESSO FERMENTATIVO DE PRODUÇÃO DA CACHAÇA.....	39
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
3.1 MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	44

3.2 EXTRAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE LEVEDURA.....	45
3.3 HIDRÓLISE DA PAREDE CELULAR.....	46
<b>3.3.1 Hidrólise ácida com ácido sulfúrico.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3.2 Hidrólise básica com hidróxido de sódio.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3.3 Hidrólise enzimática com liticase.....</b>	<b>47</b>
3.4 DOSAGEM DA GLICOSE PELO MÉTODO DE GLICOSE OXIDASE- PEROXIDASE.....	47
3.5 ANÁLISE DOS CARBOIDRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE OU HPLC).....	48
3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES RELACIONADOS À FLOCULAÇÃO E PAREDE CELULAR DE LEVEDURA.....	48
<b>3.6.1 Extração de RNA total.....</b>	<b>48</b>
<b>3.6.2 Tratamento com DNase e síntese da fita de cDNA.....</b>	<b>49</b>
<b>3.6.3 Reação de RT-PCR em tempo real.....</b>	<b>50</b>
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	51
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
4.1 ANÁLISE DOS CARBOIDRATOS DA PAREDE CELULAR DE LEVEDURA	52
<b>4.1.1 Estabelecimento de protocolo de análise de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC).....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.2 Estabelecimento do protocolo de extração e hidrólise da parede celular.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1.3 Comparação do teor de carboidratos da parede celular de cepas floculantes e não-floculantes de <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>61</b>

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES RELACIONADOS À FLOCULAÇÃO E À PAREDE CELULAR POR PCR EM TEMPO REAL.....	65
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>6 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>72</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O homem e as fermentações microbianas: um breve começo

Desde os primórdios da civilização, o homem vem utilizando, mesmo que sem conhecimento, as fermentações para a produção de bens de consumo. Exemplos clássicos dessa prática estão incluídos entre os alimentos, como o pão e o queijo, e as bebidas, como a cerveja e o vinho. Há indícios de que, por volta de 6000 a.C., os antigos mesopotâmicos já produziam um tipo de cerveja, aproveitando a cevada que, naquela região, crescia em estado selvagem. Nas pirâmides egípcias, foram encontradas evidências da fabricação de pão usando leveduras, a cerca de 5000 a.C. (BARROS, 2002; FERNANDES et al., 2009).

Em estudos entre 1857 e 1876, o cientista francês Louis Pasteur cunhou o termo fermentação, do italiano *fervere* (efervescência), ao observar a ação da levedura em extrato de malte ou de frutas, e a formação de bolhas, devido à produção de CO<sub>2</sub>. Assim, foi evidenciada e comprovada pela primeira vez a relação de microrganismos com a alteração de alimentos e bebidas (STANBURY et al., 1999). Na época, referiu-se exclusivamente aos processos em que as transformações provocadas por leveduras e outros microrganismos ocorriam na ausência de ar. Em 1897, Eduard Buchner, ao isolar enzimas de levedura, mostrou que eram elas, e não as leveduras em si, as verdadeiras responsáveis pela fermentação alcoólica (WARD, 1991), processo bioquímico de transformação de açúcares em etanol, seguindo a seguinte fórmula:  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2 + 2 ATP + \text{calor}$  (LEHNINGER et al., 2002).

Atualmente, o termo fermentação é empregado de várias formas e necessita de esclarecimento. Quando mudanças químicas são discutidas a nível molecular, no contexto fisiológico/bioquímico, o termo fermentação é habitualmente empregado para descrever a quebra de carboidratos sob condições anaeróbicas. Em um sentido mais amplo, representa a quebra anaeróbica ou aeróbica de substâncias orgânicas. Em termos industriais, entretanto, se aceita a denominação fermentação ou processo fermentativo para caracterizar qualquer transformação intermediada por um microrganismo

através de uma sequência de reações bioquímicas. Assim, são considerados, também, processos fermentativos, as transformações envolvendo respiração microbiana, biossíntese, fotossíntese e respiração com substratos inorgânicos. (BARROS, 2002).

Sem dúvida, o maior ator dos processos fermentativos conhecidos é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, responsável pela fabricação do pão, e de bebidas como o vinho, a cerveja e a cachaça. Mais do que isso, a levedura tornou-se uma das mais importantes ferramentas biotecnológicas da atualidade, amplamente utilizada nas indústrias de cosméticos e de alimentos, na produção de enzimas, proteínas terapêuticas, biocombustíveis, etc (FELDMAN, 2005).

## **1.2 A levedura *Saccharomyces cerevisiae*: uma fábrica microbiana**

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular, organismo eucarionte, heterotrófico, imóvel e com parede celular definida, esta consistindo basicamente de polissacarídeos de glicose, manose e N-acetilglicosamina e proteínas. Pertence ao filo Ascomycota (Ascomycetes), à classe Saccharomycetes, à ordem Saccharomycetales, à família Saccharomycetaceae e à subfamília Saccharomycetoidea, que engloba 26 gêneros. O gênero *Saccharomyces* é característico por possuir todas as espécies com uma alta capacidade fermentativa, se dividem assexuadamente por gemulação ou brotamento – processo no qual a nova célula se forma como uma pequena gêmula, ou broto, (Fig.1) na célula mãe, crescendo até separar-se dela – e possuem ascósporos ovais que não são liberados do asco durante a reprodução. Após a divisão celular, a célula filha deixa na célula mãe uma cicatriz de nascimento. O número de cicatrizes de gemas presentes na parede celular representa a idade genealógica da célula (Fig. 1). As células de *S. cerevisiae* tem a forma elipsoidal, com o tamanho que varia entre 5-10  $\mu\text{m}$  no diâmetro maior e 1-7  $\mu\text{m}$  no diâmetro menor. A média de volume celular é de 29 ou 55  $\mu\text{m}^3$  para uma célula haplóide ou diplóide, respectivamente, podendo o tamanho da célula aumentar com a idade (KREGGER-VAN RIJ, 1987; FERNANDES et al., 2009).



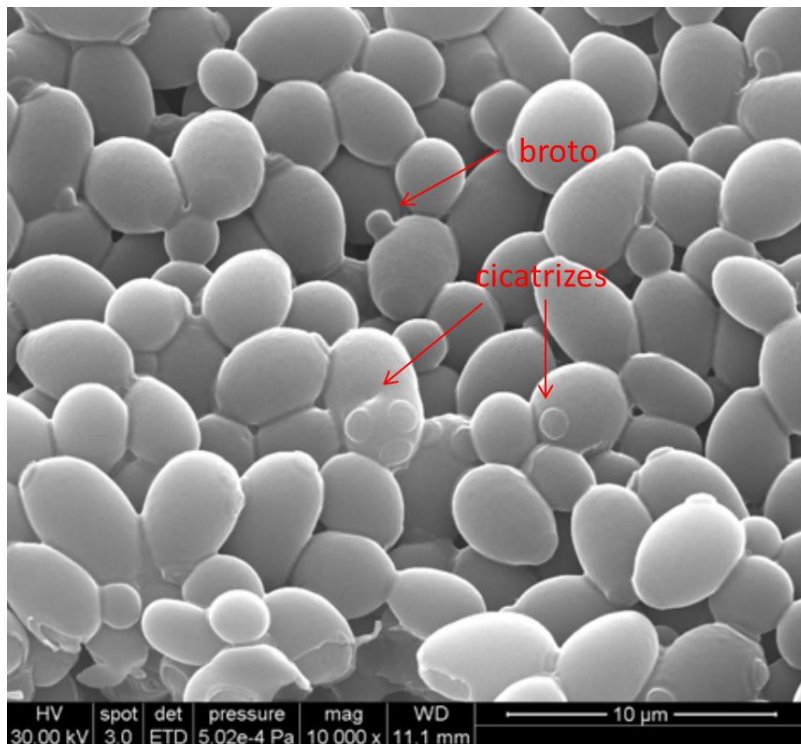


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura da levedura *S. cerevisiae*, mostrando algumas características morfológicas comuns: broto (gêmula) e cicatrizes (aumento de 10000x). Modificado de MARX et al., 2011.

*S. cerevisiae* é um microrganismo anaeróbico facultativo, tendo, no entanto, o metabolismo fermentativo predominante sobre o respiratório quando as concentrações de açúcares estão elevadas, mesmo sob condições aeróbicas. Possui cinco diferentes fases de crescimento. A primeira fase 'lag', corresponde a uma fase de adaptação fisiológica das células ao novo ambiente (meio de cultura) no qual elas foram introduzidas. O metabolismo das células está ativo (expressando genes e proteínas), criando as condições ideais para a divisão celular.

A segunda fase de crescimento é conhecida como exponencial, fermentativa ou primeira fase 'log'. Nessa, a fermentação da glicose é a única via energética usada pela célula e a taxa de crescimento celular é alta. Em levedura, sabe-se que a glicose reprime a expressão dos genes que codificam para enzimas da via respiratória, como também reprime as vias do catabolismo de outras fontes de carbono.

Ao ser consumida toda a glicose, interrompe-se o ciclo celular e as células passam para uma segunda fase 'lag', a chamada 'diauxia', na qual os

genes da via respiratória reprimidos pela glicose tornam-se ativos, adaptando o metabolismo celular à fase subsequente.

Na fase 'pós-diauxia', a célula passa a utilizar o etanol e outros subprodutos da fermentação para continuar seu crescimento (HOHMANN & MAGER, 1997). Essa fase do crescimento é conhecida como segunda fase exponencial, respiratória ou segunda "log". Nela, a célula agora depende de oxigênio e a produção de radicais livres é aumentada (CARLSON, 1999).

Quando todas as fontes de carbono se exaurem, as células entram na fase estacionária, uma fase de latência na qual o número de células viáveis se mantém constante. Nessa fase as células acumulam açúcares de reserva como glicogênio e trealose, além de proteínas de defesa conhecidas como proteínas de choque térmico (Hsps) (WERNER-WASHBURNE et al., 1993 apud BRAVIM, 2007). A parede celular torna-se significativamente mais espessa e menos porosa do que a de células na fase exponencial (WERNER-WASHBURNE et al., 1993; MUKHERJEE et al., 2003), o que confere a propriedade de resistência fenotípica à drogas (GALE et al., 1980; SUCI & TYLER, 2003).

*S. cerevisiae* foi o primeiro eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado, publicado em abril de 1996 (GOFFEAU et al., 1996) e acessível pelo endereço eletrônico "<http://yeastgenome.org>". Nenhum outro organismo eucarioto possui tamanha riqueza de detalhes moleculares sobre sua bioquímica e fisiologia (FERNANDES, 2005). Apesar de simples, é um organismo conservado evolutivamente. Além de ser não patogênico, possui curto ciclo de vida, é de fácil manutenção laboratorial e manipulação genética, o que viabiliza estudos de deleção e inserção de genes importantes para o metabolismo celular. Do mesmo modo, a comprovada similaridade dos mecanismos de replicação, recombinação, divisão celular e produção de metabólitos entre a levedura e os organismos superiores a torna um organismo modelo para células eucarióticas (HANEY et al, 2001). Assim, a levedura é usada em estudos de processos biológicos fundamentais, como o ciclo celular; estudos na área da saúde, envolvendo envelhecimento celular, resposta imunológica e câncer; pesquisa de fármacos; pesquisas sobre a resposta a

estresse, dentre outros (FERNANDES, 2005; NEVOIGT, 2008; BRAVIM, 2010). É também uma importante fonte de proteína e de fatores de crescimento, passível de ser utilizada na alimentação animal e mesmo humana. Outros exemplos de metabólitos de interesse comercial produzidos pelo microrganismo são ácido cítrico, ácido glucônico, aminoácidos, vitaminas, polissacarídeos e micronutrientes como o selênio (ARAÚJO et al., 2009).

Uma grande diversidade de cepas de *S. cerevisiae* ocorre na natureza, podendo diferir umas das outras quanto ao seu genótipo e fenótipo. As cepas têm uma ampla dispersão no meio ambiente, habitando o solo, folhas, flores, frutos em decomposição, locais como padarias, cervejarias, destilarias, indústrias produtoras de etanol combustível, e possuem características adaptadas à fonte energética e ao papel ecológico em cada habitat que ocupam (KLIS et al., 2004).

Como mencionado, tem crescido cada vez mais o interesse e a utilização de *S. cerevisiae* na indústria biotecnológica. Isso se deve, primariamente, à sua alta adaptabilidade às alterações ambientais, ajustando rapidamente seu metabolismo para lidar com tais variações; também a sua extraordinária capacidade em produzir etanol, a sua tolerância a baixos valores de pH, a alta concentração de açúcar e de etanol, a sua resistência a inibidores presentes nos hidrolisados de biomassa e ao seu crescimento anaeróbico (NEVOIGT, 2008). Assim, a capacidade de adaptação da levedura a diversas condições ambientais é foco de estudo com a finalidade de entender os mecanismos fisiológicos de resistência ao estresse, bem como promover o melhoramento das cepas utilizadas industrialmente a fim de aumentar sobremaneira a produtividade dos processos fermentativos.

### **1.3 A parede celular de levedura**

A camada mais externa do envelope celular das leveduras é a parede celular, uma robusta estrutura responsável por 10 a 25% do peso celular seco, dependendo das condições de crescimento, o que representa um investimento considerável da célula em termos de energia metabólica (AGUILAR-USCANGA

& FRANÇOIS, 2003). Esta organela essencial possui quatro funções principais:

- 1) Estabilização das condições osmóticas internas. A osmolalidade do citoplasma de *S. cerevisiae* e de outros fungos é geralmente mais elevada que do meio extracelular. Para limitar o influxo de água resultante, que poderia perturbar as condições internas de reação e causar um inchamento excessivo da célula, levando à ruptura da membrana, leveduras e fungos desenvolveram uma parede resistente e elástica. A distensão da parede cria uma pressão de neutralização que bloqueia o influxo de água;
- 2) Proteção contra o estresse físico. Além de estar envolvida com a manutenção da homeostase osmótica, a parede celular também funciona como um casaco protetor. A combinação de resistência mecânica e elasticidade elevada permitem que a parede transmita e redistribua tensões físicas, oferecendo assim uma proteção eficiente contra danos mecânicos (MORRIS et al., 1986; KOCH, 2003 apud KLIS et al., 2006);
- 3) Manutenção da forma da célula, que é uma pré-condição para a morfogênese, o processo de desenvolvimento e modelagem dos organismos. As células de levedura podem crescer como células ovais (condições normais), ou em formatos mais alongados, como acontece sob privação de nitrogênio ou quando há formação de pseudohifas – adaptações de alguns fungos unicelulares, os quais se dividem, mas permanecem unidos, formando estruturas semelhantes a hifas, com função de adaptação ao meio submetido. A formação de projeções reprodutivas especializadas em resposta a feromônios de células de tipo sexual oposto também demonstra esta função da parede celular;
- 4) Um arcabouço para proteínas da superfície celular. A tensão de suporte dos polissacarídeos da camada estrutural funciona como um esqueleto para a camada externa de glicoproteínas. Em conjunto, essas glicoproteínas, e em particular os carboidratos de suas cadeias laterais, limitam a permeabilidade da parede celular a macromoléculas, protegendo assim os polissacarídeos da camada estrutural e todo o restante da célula do ataque de proteínas exógenas e substâncias danosas (ZLOTNIK et al., 1984; DE NOBEL et al., 1990). A limitada permeabilidade da camada externa pode também permitir a criação de um microambiente na região interna da parede adjacente à membrana plasmática. O elevado grau de glicosilação das proteínas da parede celular e a presença de grupamentos fosfatos carregados negativamente nos carboidratos de suas cadeias laterais, provavelmente

contribuem também para a retenção de água, protegendo a célula contra a desidratação (ZLOTNIK et al., 1984; TOKUNAGA et al., 1986; OSUMI, 1998).

Além das funções principais, funções específicas das proteínas também merecem destaque. A camada externa pode, em qualquer momento do ciclo de vida da célula, ser constituída de pelo menos 20 glicoproteínas diferentes, e sua composição pode variar dependendo das condições de crescimento (De GROOT et al., 2004; 2005; YIN et al., 2005). Isso possibilita à célula dispor de uma grande variedade de funções. As proteínas permitem que as células floculem (tópico 1.4), reconheçam parceiros reprodutivos, formem biofilme, formem pseudohifas e cresçam invasivamente; também ajudam as células a reter íons ferro, facilitam a absorção de esteróis e são necessárias para o crescimento em condições anaeróbias (ABRAMOVA et al., 2001; PROTCHENKO et al., 2001; REYNOLDS & FINK, 2001; WILCOX et al., 2002; ALIMARDANI et al., 2004). Podem também afetar fortemente a hidrofobicidade da célula, o que é importante para a adesão ao poliestireno e outras superfícies abióticas, bem como para preparação de bebidas alcoólicas (STRAVER & KIJNE, 1996; REYNOLDS & FINK, 2001; SHIMOI et al., 2002). Por fim, algumas proteínas da parede celular parecem estar envolvidas na reparação da própria parede, como CWP1p, Hsp150p e Chs1p (HARTLAND et al., 1994; KAPTEYN et al., 1999).

### **1.3.1 Estrutura e composição da parede celular**

Análises por microscopia eletrônica da parede celular de diferentes espécies de leveduras revelam uma estrutura em camadas, com uma camada elétron-transparente interna de cerca de 70-100 nm de espessura, aparentemente homogênea, e uma camada elétron-densa externa fibrilar que se estende para o meio extracelular, implantada na camada interior. A camada interna representa a camada estrutural, e a camada exterior é composta de glicoproteínas covalentemente ligadas à camada estrutural, e determinam a maior parte das propriedades de superfície da célula (BABA e OSUMI, 1987; OSUMI, 1998 apud KLIS et al., 2004).

A Figura 2 mostra um esquema de como se dá a organização da parede celular:

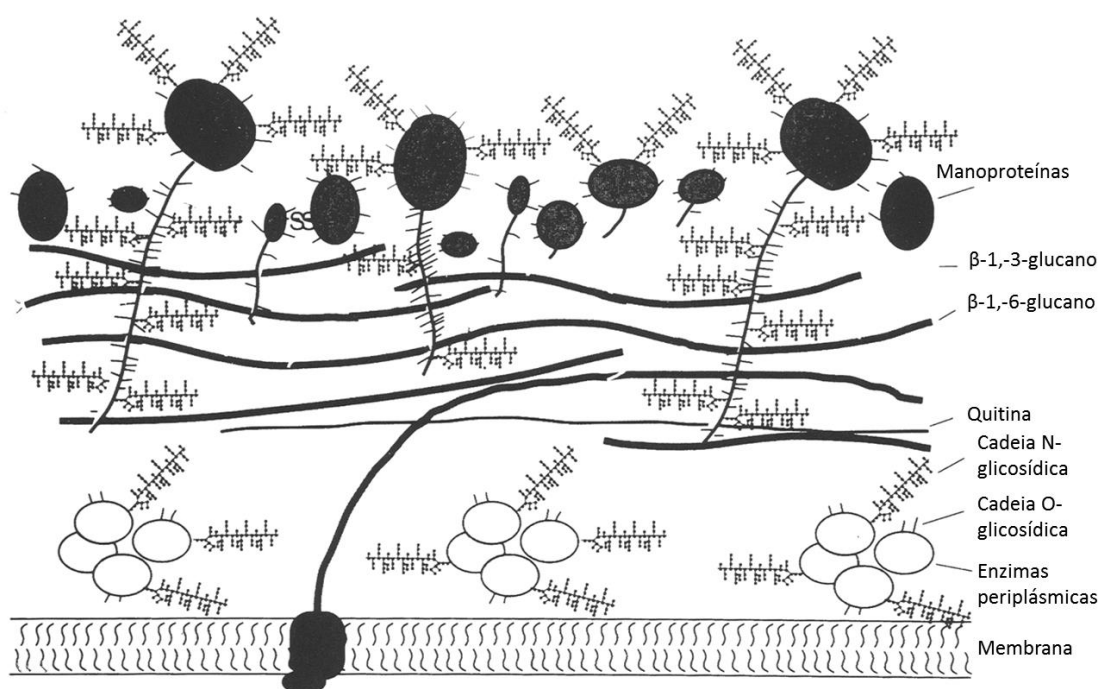


Figura 2. Composição e estrutura da parede celular de *S. cerevisiae*. A parede celular é constituída por duas camadas: a camada interna proporciona a resistência da parede celular, e é composta por  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6-glucanos, complexados com moléculas de quitina. A camada externa é composta de manoproteínas. A maioria das manoproteínas são covalentemente ligadas aos glucanos da camada interior. Enzimas periplásmicas encontram-se ancoradas entre a membrana celular e a camada interna. Adaptado de OSUMI, 1998.

Existem apenas quatro classes de macromoléculas presentes na parede celular de *S. cerevisiae*, as quais são apresentadas na Tabela 1 na ordem em que elas ocorrem na célula, indo do exterior para o interior. O grau de polimerização corresponde ao número de unidades monoméricas presentes na molécula:

Tabela 1. Macromoléculas da parede celular de *S. cerevisiae*. Adaptado de KLIS et al., 2006.

Macromolécula	% da parede (peso seco)	Grau de polimerização (KDa)
Manoproteínas	30-50*	variável
$\beta$ -1,6-glucanos	5-10	24 (150)
$\beta$ -1,3-glucanos	30-45	240 (1500)
Quitina	1.5-6	25 (120)

\* Valor devido principalmente aos carboidratos ligados às cadeias laterais.

De trinta a cinquenta por cento da parede (em peso seco) é representado por glicoproteínas altamente glicosiladas, também referidas como manoproteínas, uma vez que suas cadeias laterais de carboidratos são ricas em manose. Este intricado de cadeias laterais glicídicas por vezes é considerado como um polissacarídeo a parte, conhecido como manana (JONES & BALLOU, 1969; RAYNER & MUNRO, 1998; YOSHIDA et al., 2009). De fato, o teor real de proteínas é de cerca de 4-5%; a massa restante é referente ao conteúdo de suas cadeias laterais manosídicas.

Abaixo da camada de manoproteínas, duas classes de glucanos (polímeros de glicose) compõem a camada interna estrutural: os  $\beta$ -1,6-glucanos, altamente ramificados e solúveis em água, interligam a maioria das manoproteínas à rede de  $\beta$ -1,3-glucanos, moderadamente ramificados e insolúveis em água (MANNERS et al., 1973). Este último, juntamente com a quitina, é em grande parte responsável pela resistência mecânica da parede. Juntos, estes polissacarídeos constituem cerca de 60% da parede celular. Quando comparados em termos de peso seco, os  $\beta$ -1,6-glucanos podem parecer um componente menos significativo da parede celular de *S. cerevisiae* (cerca de um décimo da massa de  $\beta$ -1,3-glucanos), o que não é o caso em termos de número de moléculas. Estima-se que  $\beta$ -1,3-glucanos e  $\beta$ -1,6-glucanos consistam, em média, de 1500 e 150 resíduos de glicose, respectivamente (MANNERS et al., 1973; FLEET & MANNERS, 1976), mas o número de moléculas de  $\beta$ -1,6-glucanos é comparável à de  $\beta$ -1,3-glucanos. Assumindo que o peso seco total da parede por célula é de aproximadamente  $5 \times 10^{-12}$  g (KATHODA et al., 1976), isso corresponderia a cerca de 7 milhões de cópias / célula de ambos os componentes.

É mais difícil estimar o número de manoproteínas por célula na parede celular, uma vez que sua massa molecular média não é conhecida. Utilizando a estimativa bastante arbitrária de 200 kDa, chega-se a um valor de cerca de 6 milhões de moléculas por célula (KLIS et al., 2004).

Em contraste com o micélio dos fungos filamentosos, leveduras têm apenas uma pequena quantidade de quitina (polímero de N-acetil-D-glicosamina em ligações  $\beta$ -1,4) em suas paredes (1.5-6%). Mas em situações

de estresse da parede celular esse conteúdo aumenta consideravelmente, chegando a até dez vezes do valor inicial (KAPTEYN et al., 1999; DALLIES et al., 1998; MAGNELLI et al., 2002; RAM et al., 1998a).

### 1.3.2 Organização molecular da parede celular

Conforme exposto anteriormente, a parede celular é constituída por uma camada interna de polissacarídeos, que atua como um suporte para uma camada externa protetora de manoproteínas que se estendem para o meio. O principal polissacarídeo de suporte é um  $\beta$ -1,3-glucano moderadamente ramificado. Devido à presença das cadeias laterais, as moléculas de  $\beta$ -1,3-glucanos podem apenas se associar localmente através de ligações de hidrogênio, o que resulta na formação de uma rede tridimensional contínua. Esta rede é altamente elástica e permanece consideravelmente estendida em condições osmóticas normais. Quando transferidas para um meio hipertônico, as células encolhem rapidamente e podem perder até 60% do seu volume original, o que corresponde a uma perda de superfície estimada de 40 a 50% (MORRIS et al., 1986). Essa contração é totalmente reversível, o que pode ser observado ao retornar as células para um meio osmoticamente ótimo. A elasticidade da parede celular reflete a estrutura das moléculas individuais de  $\beta$ -1,3-glucanos, que têm uma forma flexível e helicoidal, como uma mola de arame, podendo existir em vários estados de tensão (REES & SCOTT, 1971 apud KLIS et al., 2006).

As extremidades não redutoras das moléculas de  $\beta$ -1,3-glucanos podem funcionar como sítios de ligação para as ligações covalentes de outros polissacarídeos. Na face externa da rede de  $\beta$ -1,3-glucanos, encontram-se cadeias de  $\beta$ -1,6-glucanos altamente ramificadas (e, portanto, solúvel em água), que por sua vez pode estar ligado a uma manoproteína GPI<sup>1</sup>-ancorada (Fig. 3) (KAPTEYN et al., 1996; KOLLAR et al., 1997; FUJII et al., 1999).

---

<sup>1</sup>As âncoras do glicolípídeo conhecido como glicosilfosfatidilinositol (GPI) são estruturas altamente conservadas responsáveis pela ligação de variados tipos de proteínas a membranas e parede celular. Foram descritas em eucariotos desde leveduras, fungos e protozoários a plantas e mamíferos (LEHNINGER, 2002).



Podem aparecer cadeias de quitina ligadas no interior da rede de  $\beta$ -1,3-glucanos das paredes laterais, mas somente após a ocorrência da citocinese (SHAW et al., 1991; KOLLAR et al., 1995). Isso significa que as paredes laterais de uma gêmula em crescimento geralmente não contêm quitina, demonstrando que este polissacarídeo não é essencial para a resistência mecânica das paredes laterais. A quitina pode se ligar glicosidicamente não só a extremidades não redutoras de  $\beta$ -1,3-glucanos, mas também a cadeias de  $\beta$ -1,6-glucanos, particularmente em resposta a estresses da parede celular. No entanto, normalmente, a maior parte da quitina não é encontrada nas paredes laterais, mas sim no anel quitinoso do istmo da célula mãe, no septo primário e nas cicatrizes de gemas.

A maioria das proteínas da parede celular (*cell wall proteins* - CWPs) são proteínas de superfície ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) (GPI-CWPs), portanto, indiretamente ligadas à rede de  $\beta$ -1,3-glucanos (RAM et al., 1998b; RODRIGUEZ-PENA et al., 2000; 2002). Além das GPI-CWPs, um grupo menor de proteínas está diretamente ligado à rede de  $\beta$ -1,3-glucanos através de uma ligação não identificada que é sensível a tratamentos com álcalis (bases) moderados. Estas proteínas são chamadas ASL-CWPs (*alkali-sensitive linkage*, ou ligação alcali-sensível) e incluem a família de Pir-CWPs (*protein with internal repeats*, proteína com repetições internas), composta pelas proteínas Cis1p, Pir1p, Hsp150p/Pir2p e Pir3p (DE GROOT et al., 2005). Enquanto as GPI-CWPs são encontradas na camada exterior da parede, as Pir-CWPs parecem estar uniformemente distribuídas por toda a camada estrutural interna, o que é consistente com o fato delas serem diretamente ligadas a moléculas de  $\beta$ -1,3-glucanos (KAPTEYN et al., 1999). Pir1p e Pir3p possuem cada uma oito repetições contendo a sequência de assinatura DGQJQ (J sendo qualquer aminoácido hidrofóbico); Hsp150p tem 10 repetições e Cis1p apenas uma. Além disso, foi demonstrado que a tal sequência repetitiva é necessária para a ligação a  $\beta$ -1,3-glucanos (CASTILLO et al., 2003), logo, é plausível que as Pir-CWPs possam interligar duas ou mais moléculas de  $\beta$ -1,3-glucanos. Por conta disso, essas proteínas estão relacionadas com aumento da resistência mecânica da parede, sendo

fortemente expressas em resposta a estresse da parede celular (KAPTEYN et al., 1999; BOORSMA et al., 2004).

Como mencionado, três das quatro Pir-CWPs contêm múltiplas sequências repetitivas de aminoácidos internas. Além delas, algumas GPI-CWPs, tais como as floculinas (lectinas), Aga1p, Tir1p, Tir4p e Dan4p, também as contêm (VERSTREPEN et al., 2005). De fato, as múltiplas sequências repetitivas são predominantemente encontradas em proteínas da superfície celular. Além disso, o número de repetições muitas vezes varia entre cepas de células e isto acontece devido a uma frequência relativamente elevada de eventos de recombinação no domínio de repetição. Essa variabilidade afeta as propriedades da superfície das células, tais como hidrofobicidade e a capacidade de floculação, e, possivelmente, podem contribuir para a virulência em fungos patogênicos (WEIG et al., 2004; KAUR et al., 2005).

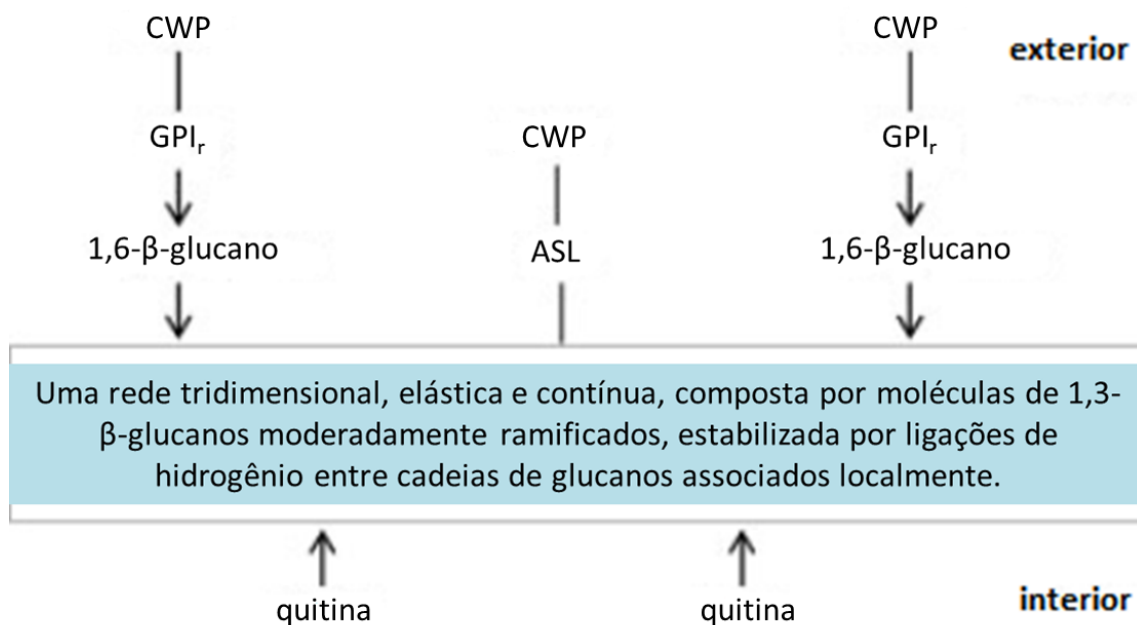


Figura 3. Organização molecular da parede celular de *S. cerevisiae*. As GPI-CWPs formam a maioria das proteínas de parede celular ligadas covalentemente. As ASL-CWPs incluem as Pir-CWPs (Pir1p, Hsp150p, Pir3p e Cis3p). GPI<sub>r</sub>, remanescente hipolipídico de uma âncora GPI. ASL, ligação alcali-sensível. Adaptado de KLIS et al., 2002.

Por fim, vale ressaltar que a biologia da parede celular de *S. cerevisiae* é um campo da ciência em franca expansão. Estudos de engenharia genética

relacionados às propriedades de superfície da parede celular através da introdução de novas proteínas estão atraindo cada vez mais interesse (KONDO & UEDA, 2004; KLIS et al., 2006). Observa-se assim um grande potencial para a compreensão de processos celulares relacionados com a morfogênese, para a elucidação das redes regulatórias que ajudam a coordenar os processos celulares com a progressão do ciclo celular, e para aplicações práticas, tais como o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas e a exploração de processos de interesse industrial, como a floculação.

#### 1.4 O fenômeno da floculação em *Saccharomyces cerevisiae*

A floculação de levedura pode ser definida como um processo não sexual e reversível, de agregação de células em massas multicelulares, chamados flocos, com a subsequente sedimentação a partir do meio em que eles estão suspensos (STRATFORD, 1992; STEWART, 2009) (Fig. 4). É um importante processo em indústrias como a de produção de etanol, de bebidas alcoólicas como cerveja e vinho, e de substâncias como a insulina, por ser considerado um processo fácil e barato de separação celular durante a etapa de clarificação, que não requer o aporte de energia (DENGIS et al., 1995; VERSTREPEN et al., 2003; CLARO et al., 2007; WANG et al., 2008).

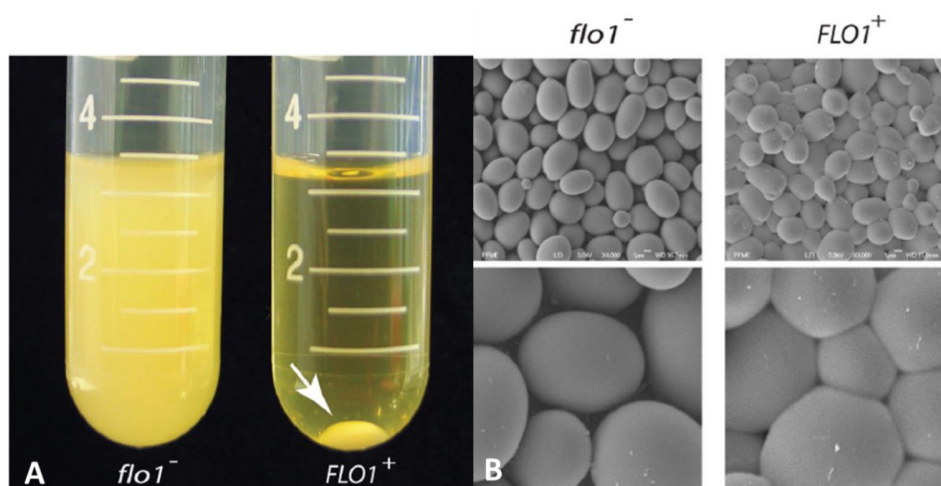


Figura 4. Floculação em *S. cerevisiae*. A) Células não-floculantes (*flo1*<sup>-</sup>) permanecem suspensas no meio, enquanto células floculantes (*FLO1*<sup>+</sup>) sedimentam, formando corpo de fundo (seta). B) Microscopia eletrônica de varredura de células floculantes e não-floculantes após centrifugação, mostrando que as células floculantes se juntam de modo a formar uma estrutura densamente tridimensional, com pouco espaço intercelular. Em contraste, as células não-floculantes se comportam como esferas empilhadas independentes com claras lacunas entre as células. Modificado de SMUKALLA et al., 2008.

Entretanto, existem ainda contradições relacionadas ao tema. Alguns autores afirmam que o maior problema encontrado nessas indústrias é a floculação prematura das células, ou seja, antes da depleção completa de nutrientes no meio. A diminuição do tempo de contato entre as células e o mosto, causada pela floculação celular, reduz o rendimento da fermentação, provocando sérios prejuízos ao processo, entre eles, um produto final com alta quantidade de açúcar residual e características aromáticas insatisfatórias (VERSTREPEN et al., 2001; AMORIM, 2005; KOIZUMI & OGAWA, 2005; BAUER et al., 2010). Como uma alternativa, leveduras não-floculantes são selecionadas em tais indústrias, que, conseqüentemente, investem altos recursos financeiros nos processos de separação, como centrifugação e filtragem, para a completa remoção celular do mosto fermentativo. No entanto, a passagem pelas centrífugas, expõe as células de levedura a um estresse mecânico e a um possível rompimento. Já foi demonstrado que o processo de centrifugação conduz a uma depleção no conteúdo intracelular de glicogênio e trealose, induzindo a liberação de mananas da parede celular e aumentando a atividade da proteinase A, a qual resulta em um decréscimo na estabilidade da espuma da cerveja. Além disso, células centrifugadas exibem baixa viabilidade e vitalidade (SOARES, 2010).

#### **1.4.1 Mecanismo da floculação**

A floculação é uma propriedade de superfície celular. Células floculantes mortas por tratamento térmico retêm a sua capacidade de floculação (MACHADO et al., 2008), bem como as paredes celulares isoladas a partir de células floculantes (SOUSA et al., 1992). O processo envolve a interação de proteínas especializadas da parede celular chamadas lectinas, adesinas ou floculinas, presentes apenas nas células floculantes, com carboidratos (receptores) da parede celular das células vizinhas (MIKI et al., 1982; STRATFORD, 1992). Embora as lectinas estejam diretamente envolvidas no processo de floculação ainda não está totalmente claro como esta interação acontece (VERSTREPEN et al., 2003; VERSTREPEN & KLIS, 2006). A Figura 5 ilustra o mecanismo básico aceito atualmente:

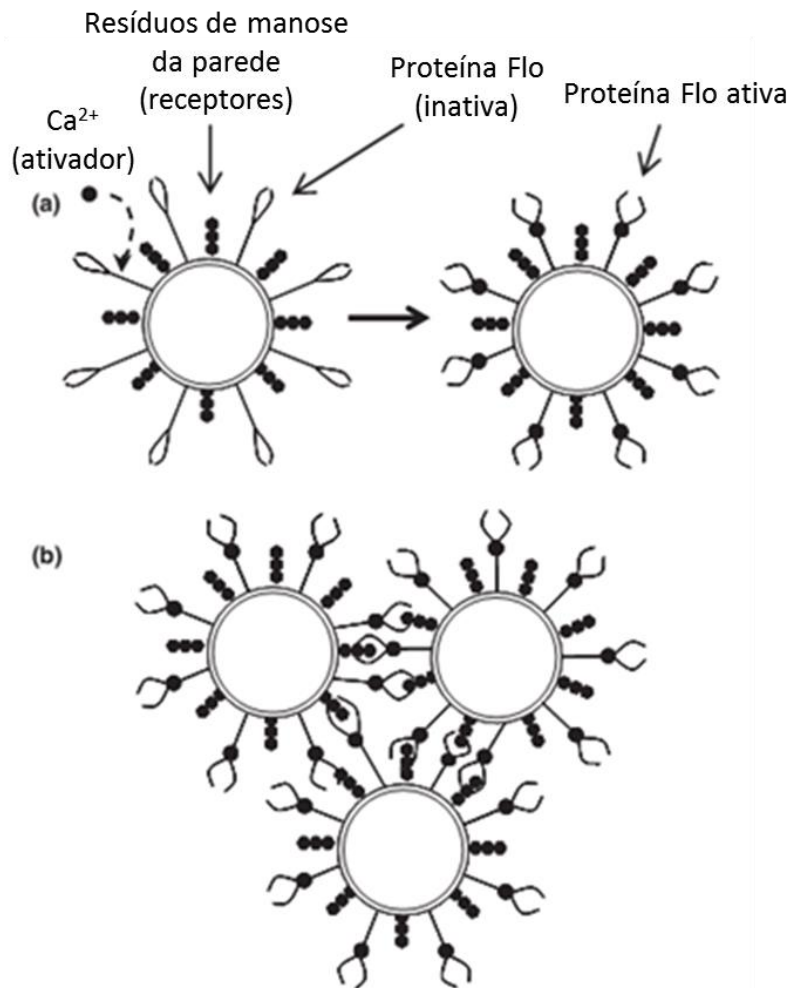


Figura 5. Mecanismo da flocculação em *S. cerevisiae*. (a) Íons cálcio permitem que as lectinas atinjam sua conformação ativa e (b) as lectinas ativas, somente presentes em células flocculantes, despontam para fora da parede celular e interagem com resíduos de manose (receptores) nas paredes das células vizinhas. Adaptado de SOARES, 2010.

As lectinas são amplamente distribuídas na natureza e já foram isoladas de plantas, animais, microrganismos e vírus. São moléculas definidas como proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um sítio de ligação a carboidratos e que, através deste(s) sítio(s) são capazes de, eventualmente, se ligarem reversivelmente ao glicocálix e outras estruturas da superfície das células e desencadearem uma grande variedade de efeitos biológicos (PEUMANS et al., 2000). Devido a essa especificidade na ligação, as lectinas têm a capacidade de servir como moléculas de reconhecimento dentro de uma célula, entre células ou entre organismos (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991).

#### 1.4.1.1 Fenótipos da floculação

Levando em conta a inibição reversível da floculação por açúcares, sal e baixo valor de pH, além da sensibilidade a proteases, dois fenótipos de floculação principais foram distinguidos: Flo1 e NewFlo (STRATTFORD & ASSINDER, 1991). O fenótipo Flo1 é constitutivamente floculante e inclui cepas em que a floculação é especificamente inibida por manose e seus derivados, geralmente associado a cepas laboratoriais de *S. cerevisiae*. Por outro lado, o fenótipo NewFlo contém a maior parte das cepas de cervejaria ale (alta temperatura de fermentação), no qual a floculação é inibida reversivelmente pela manose, maltose, glicose e sacarose, mas não por galactose. Pelo fato de vários açúcares inibirem a floculação, este fenótipo previne as leveduras de uma floculação precoce, sendo por isso, tipicamente associado a cepas industriais (CUNHA, et al., 2006). Cepas de fenótipo NewFlo são ainda mais sensíveis à inibição por cátions, baixo valor de pH, e à digestão por tripsina ou proteinase K (STRATTFORD & ASSINDER, 1991). Estes fenótipos também exibem sensibilidade diferente às condições de crescimento, tais como temperatura (SOARES et al., 1994.), pH (SOARES et al., 1994; STRATTFORD, 1996; SOARES e SEYNAEVE, 2000b) e disponibilidade de nutrientes (SOARES & MOTA, 1996).

Dois outros fenótipos foram também descritos: um fenótipo manose-insensível (MI), composto pelas cepas em que a floculação não é inibida por açúcares, incluindo manose e é independente de íons cálcio (MASY et al., 1992; BAUER et al., 2010); e um quarto fenótipo, no qual a floculação só ocorre na presença de concentração suficientemente elevada de etanol (DENGIS et al., 1995). O mecanismo exato de agregação das cepas pertencentes a estes dois fenótipos ainda não está compreendido. No entanto, um mecanismo lectina-dependente, tal como foi relatado para o fenótipo Flo1 e NewFlo, parece estar excluído (DENGIS et al., 1995).

## 1.4.2 Efeitores da floculação

As propriedades de adesão dos microrganismos são dependentes das características da superfície celular, geralmente da camada externa da parede das células. Os microrganismos podem ajustar as propriedades de adesão pelas mudanças na estrutura e/ou composição destas superfícies, como discutido no tópico anterior. Tais mudanças comumente ocorrem como parte da resposta adaptativa a parâmetros ambientais e transmite fenótipos de adesão específicos (BAUER et al., 2010).

Assim como outros mecanismos de adesão celular, a floculação é um fenômeno complexo influenciado por uma multiplicidade de fatores. Além de características genéticas das cepas (genes FLO, supressores e ativadores), diferentes parâmetros afetam a floculação das leveduras. O intrincado quebra-cabeça torna-se ainda mais complexo uma vez que alguns destes efetores podem atuar em mais de um nível, seja na expressão de genes FLO, na secreção das lectinas ou na interação entre as lectinas e os receptores na parede celular (Fig. 6).

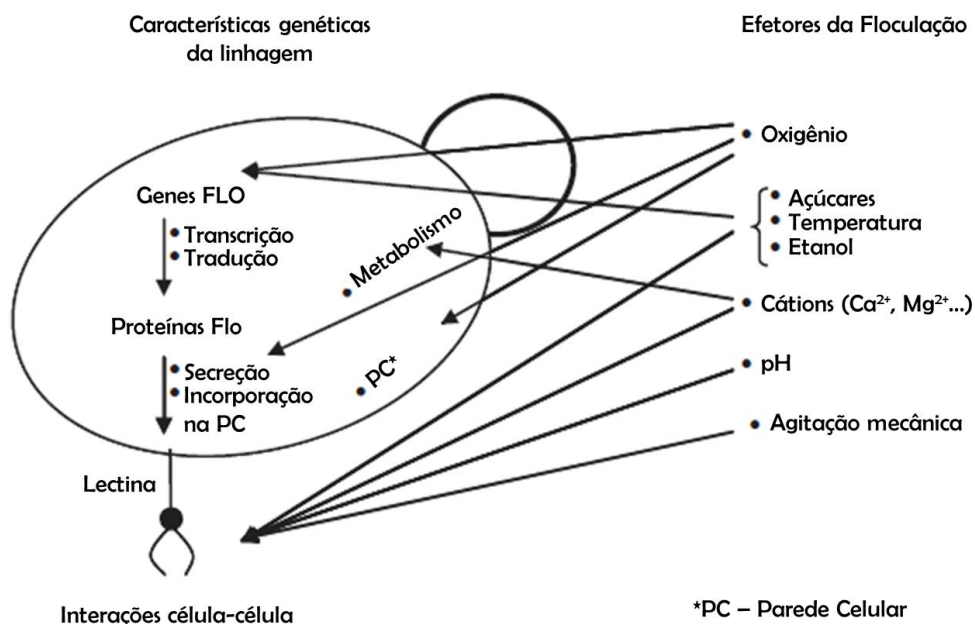


Figura 6. Diagrama representativo da multiplicidade de fatores que afetam a floculação de *S. cerevisiae*. Modificado de SOARES, 2010.

Os principais fatores que influenciam a floculação em *S. cerevisiae* são:

1) *A presença de cátions.* Os cátions possuem um papel fundamental na floculação de *S. cerevisiae*. Dentre eles,  $\text{Ca}^{2+}$  é reconhecidamente o mais eficaz na promoção da floculação (MIKI et al., 1982a; STRATFORD, 1989).  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  e, principalmente,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  também já foram descritos como indutores da floculação (MIKI et al., 1982a, NISHIHARA et al., 1982; SOUSA et al., 1992; SOARES et al., 2002). Ao contrário, cátions como  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  inibem competitivamente a floculação das leveduras, devido à semelhança em suas razões iônicas com o  $\text{Ca}^{2+}$ . Eles podem competir pelo mesmo sítio de ligação do cálcio nas lectinas, embora não sejam capazes de induzir a conformação correta das mesmas (NISHIHARA et al, 1982; GOUVEIA & SOARES, 2004).

2) *Condições de aeração e oxigenação.* Uma aeração moderada mostra-se benéfica para a floculação de levedura, enquanto que uma aeração forte (KIDA et al., 1989; SOARES et al., 1991) ou condições anaeróbicas (MIKI et al 1982b; SOARES et al., 1991; STRAVER et al., 1993) provocam a perda de floculação. Tais observações estão em concordância com o fato de manoproteínas da parede celular serem expressas diferencialmente em condições aeróbias ou anaeróbias (ABRAMOVA et al., 2001). Foi proposto que a transição de anaerobiose a aerobiose, que ocorre em condições fermentativas, pode estar associada com alterações na expressão dos genes que regulam ou que codificam para lectinas de floculação (GIBSON et al., 2007).

3) *Açúcares.* Os açúcares podem afetar a floculação de levedura agindo nas interações célula-célula, ao nível da superfície celular e sobre a regulação dos genes FLO (Fig. 6). No primeiro caso, os açúcares promovem a dispersão reversível dos flocos ao competir com os receptores (os resíduos de manose da parede celular) das lectinas floculantes. A sensibilidade cepa-dependente a diferentes açúcares é a base da distinção dos fenótipos Flo1 e NewFlo. Além disso, os açúcares fermentáveis, incluindo aqueles encontrados no mosto, induzem a perda da floculação na fase inicial de crescimento (SOARES et al., 2004) ou em células sob limitação nutricional (SOARES & DUARTE, 2002;



SOARES & VROMAN, 2003), muito provavelmente por afetar a expressão dos genes FLO.

4) *Temperatura*. A temperatura pode atuar em níveis diferentes no processo de floculação de levedura (Fig. 6). O abaixamento da temperatura de crescimento e fermentação leva a uma diminuição no metabolismo e na produção de CO<sub>2</sub>. Como consequência, há uma redução da turbulência no meio, o que favorece a sedimentação. Foi proposto que, durante a fermentação da cerveja, a agitação (tensão de cisalhamento), causada pela produção de CO<sub>2</sub>, exerce uma grande influência sobre o número de células em suspensão (SPEERS et al., 2006). A temperatura também pode afetar a floculação das leveduras agindo sobre interações célula-célula. Um aumento na temperatura de 50 para 60 °C, durante alguns minutos, promove a dispersão reversível dos flocos (TAYLOR & ORTON, 1975) muito provavelmente devido à desnaturação das lectinas. A incubação de cepas de leveduras em temperaturas supra ótimas de crescimento (35-37 °C) conduz a uma redução na floculação de levedura. Um breve choque térmico (52 °C, 5 min) numa cepa NewFlo, em fase exponencial de crescimento, retardou o aparecimento da floculação, provavelmente ao afetar direta ou indiretamente a expressão de genes FLO (CLARO et al., 2007).

5) *O pH do meio*. O pH do meio de cultura parece ter um efeito profundo sobre a floculação das leveduras. Em diversas cepas laboratoriais e industriais, a floculação ocorre ao longo de uma ampla faixa de pH (2.5-9.0), enquanto diversas cepas de cervejaria (um subgrupo de fenótipo NewFlo) só floculam dentro de um estreito intervalo de pH (2.5-5.5) (MIKI et al., 1982a; DENGIS et al., 1995; STRATTFORD, 1996; SOARES & SEYNAEVE, 2000b). Em ambos os casos (cepas com intervalos maior ou menor de pH), o valor de pH ótimo geralmente ocorre entre 3.0 e 5.0, de acordo com a cepa. Valores extremos de pH promovem uma dispersão reversível dos flocos. Provavelmente, a modificação do valor do pH altera a ionização dos aminoácidos das lectinas de floculação com a consequente alteração da sua conformação (JIN & SPEERS, 2000; JIN et al., 2001).

6) *Etanol*. O etanol parece ter um efeito positivo sobre a floculação das leveduras. No entanto, o mecanismo através do qual ele atua permanece

obscuro. Uma das possibilidades é que a adsorção de etanol à superfície provoca uma redução da constante dielétrica local e gera uma diminuição da repulsão eletrostática célula-célula (DENGIS et al., 1995). Propõe-se também que a presença de etanol pode permitir a protrusão de cadeias poliméricas na fase líquida, deslocando sítios de ligação para interações específicas ou não específicas (ligações de hidrogênio) (DENGIS et al., 1995). Além da ação superficial, o etanol parece agir sobre a expressão dos genes FLO. Foi demonstrado que células floculantes, quando incubadas em presença de etanol (4%, v/v) como única fonte de carbono, em condições de crescimento ou de privação nutricional, jamais perdem a capacidade floculante (SOARES & VROMAN, 2003; SOARES et al., 2004). No entanto, outro estudo mostrou que a concentração de etanol elevada (10%, v/v) prejudicou a expressão da floculação numa cepa de cervejaria ale, muito provavelmente devido à sua toxicidade celular (CLARO et al., 2007).

7) *Idade genealógica e idade da cultura.* No processo de produção da cerveja, as células de levedura são mantidas e reutilizadas em vários ciclos de fermentação (7 a 20 vezes). Foi demonstrado que tanto células virgens (células filhas com idade genealógica zero), quanto as não virgens possuem capacidade floculante; independentemente da classificação do tipo de cerveja (ale/lager), células velhas são mais floculantes do que as mais novas (POWELL et al., 2003; 2004). No que diz respeito ao efeito da fase de crescimento (idade da cultura) na floculação, dois tipos principais de células de leveduras podem ser encontradas: (i) as células que nunca perdem a sua capacidade de floculação (cepas floculantes constitutivas) e, portanto, não são afetadas pela idade da cultura; (ii) cepas em que a floculação muda de acordo com a fase de crescimento (cepas floculantes indutivas - fenótipo NewFlo) (SOARES & MOTA, 1996). No último grupo, embora as células antigas possam ser mais floculantes do que as células virgens, o início da floculação observada no final da fase exponencial de crescimento dificilmente pode ser explicado pela diferença da capacidade de floculação entre as células ou pelo aumento da proporção de células envelhecidas. Assim, foi sugerido que as células mães ou filhas devem ser floculantes ou não dependendo da fase de crescimento, em vez de sua idade genealógica (SOARES & MOTA, 1996). Em cepas

NewFlo, a fase de crescimento é o fator determinante na definição da capacidade de floculação das células e, por conseguinte, no estado de floculação da cultura (SOARES, 2010).

8) *Densidade celular e agitação mecânica*. Por fim, foi demonstrado que pouca ou nenhuma floculação ocorre em concentrações celulares inferiores a um limiar mínimo (MIKI et al., 1982b). A presença de um baixo número de células/mL limita a possibilidade física de se estabelecer uma ligação floculante, e a taxa de agregação é praticamente zero. Em concentrações celulares altas ( $> 4 \cdot 10^7$  células/mL), o número de células remanescentes em suspensão é constante e independente da concentração inicial de células (SOARES & MOTA, 1997). Além disso, um limite mínimo de agitação é necessário para que a floculação ocorra (STRATFORD, 1992b). A agitação mecânica promove o aumento da energia cinética necessária para superar a repulsão mútua entre as células; como consequência, ocorre o contato e a formação da ligação floculante.

#### **1.4.3 Genética básica da floculação**

Vários estudos têm caracterizado genes envolvidos no processo de floculação da levedura *S. cerevisiae*, com destaque para os pertencentes à família FLO, que é constituída por diferentes genes com localização telomérica (~10-40 kb do telômero), incluindo *FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10*, além de *FLO11* e *FLO8* (VERSTREPEN et al., 2003; KLIS et al., 2006). Os mecanismos de ativação dos genes FLO e, conseqüentemente, das lectinas é bastante complexo, e dependente de vários parâmetros ambientais e físicos, como a concentração de íons cálcio e nutrientes presentes no meio de crescimento, as mudanças no pH e na temperatura, o nível de etanol, a oxigenação e a agitação mecânica (COSTA & MORADAS-FERREIRA, 2001; JAVADEKAR et al., 2000; VERSPETREN et al., 2003).

O gene *FLO1* está situado no braço direito do cromossomo I e é o gene floculante mais estudado. Sua fase de leitura é constituída por ~ 4.6 kb, a qual inclui um grande número de sequências repetitivas em sua parte central,

variável de acordo com a cepa. Este gene codifica para uma glicoproteína (Flo1p) estrutural localizada na superfície celular, que possui a estrutura de uma típica lectina, e tem sido reportado como um dos principais responsáveis pela adesão célula-célula (VERSTREPEN et al., 2003; 2005; CUNHA et al., 2006). A adesão, que acontece a partir da interação de Flo1p com resíduos de manose, pode ser geralmente inibida pela presença deste açúcar no meio, pois esta poderá ocorrer entre a lectina e os resíduos de manose encontrados no meio, ao invés da ligação ocorrer com os açúcares ligados à parede celular e/ou as lectinas de outras células (SATO et al., 2001; VERSTREPEN et al., 2005; LIU, et al., 2007).

A mudança do número de repetições internas no gene *FLO1* resulta na modificação do grau de floculação e de sensibilidade a condições de estresse (SMUKALLA et al., 2008). Além disso, sugere-se que a variação do número de repetições pode ser a força motriz da criação de novas proteínas Flo; isto resulta em uma matriz de novos fenótipos de floculação, o que permite que as células de levedura adaptem as propriedades de floculação rapidamente a um ambiente particular (VERSTREPEN et al., 2005; VERSTREPEN & KLIS, 2006; DRANGINIS et al., 2007). Ainda, foi proposto que a deleção de repetições internas do gene *FLO1* é responsável pela conversão do fenótipo de floculação Flo1 para NewFlo (LIU et al., 2007).

Em leveduras de cervejaria lager (baixa temperatura de fermentação), foi descrito um novo homólogo de *FLO1*, chamado Lg-*FLO1*, que codifica para uma adesina responsável pelo fenótipo NewFlo (KOBAYASHI et al., 1998; SATO et al., 2002.). Lg-*FLO1* está localizado no cromossomo VIII, na mesma posição do gene *FLO5* da cepa laboratorial de *S. cerevisiae* S288c (OGATA et al., 2008).

O gene *FLO8* codifica um ativador transcricional dos genes *FLO1*, *FLO11* e *STA1* (KOBAYASHI et al. 1996; 1999). O gene *FLO11* (também conhecido como MUC1) codifica para uma proteína responsável pela formação de pseudohifas e biofilmes, e pelo crescimento celular invasivo. Foi demonstrado que a superexpressão de *FLO1* e *FLO10* resulta em uma forte e fraca floculação, respectivamente. Enquanto a superexpressão do gene *FLO11*

resulta em uma forte aderência das células a superfícies abióticas (ágar e poliestireno), não conferindo um aumento na floculação em cepas de *S. cerevisiae* (GUO et al., 2000; BAYLY et al., 2005).

#### 1.4.4 Regulação da floculação

Em *S. cerevisiae*, os mecanismos de adesão são regulados através de diversas vias de sinalização de genes, que transmitem as propriedades de adesão específicas, e são regulados através de uma combinação de fatores transcricionais, bem como alelos específicos e regulação epigenética (VERSTREPEN et al., 2005). A Figura 7 ilustra as principais vias de regulação da floculação em *S. cerevisiae*.

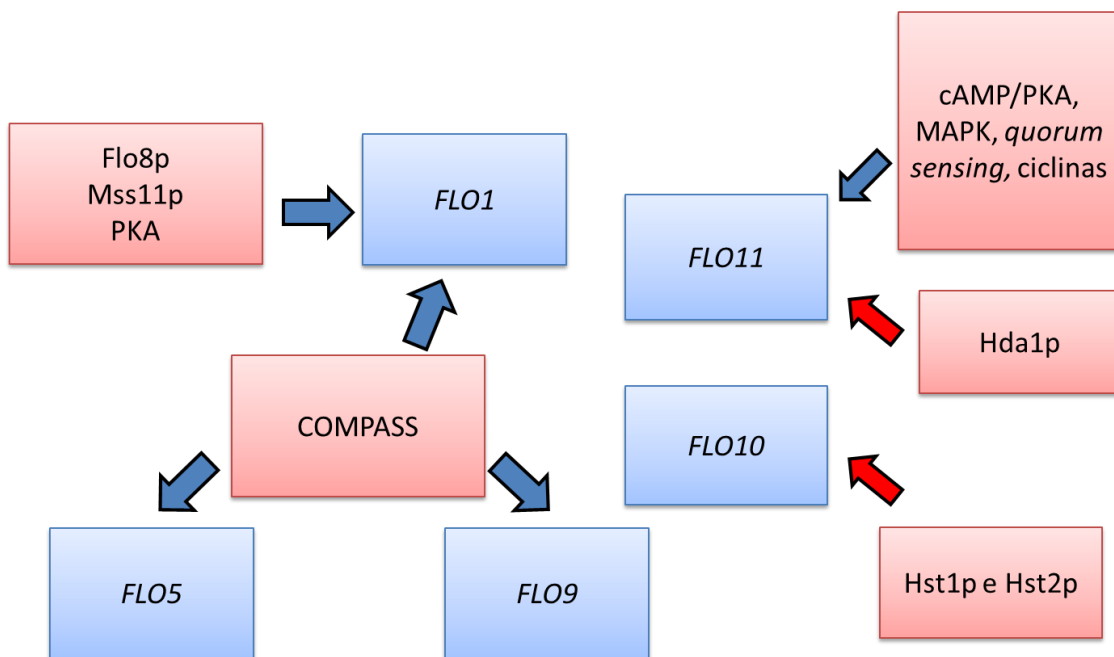


Figura 7. Regulação da floculação em *S. cerevisiae*. Setas vermelhas indicam vias de silenciamento.

Os genes FLO parecem ser regulados por elementos genéticos em *upstream*. Um estudo com a cepa laboratorial S288c mostrou que a substituição do gene *FLO8* defeituoso (ativador de *FLO1* e *FLO11*, como dito acima) por uma versão intacta, ou a superexpressão do mesmo, permite a expressão dos genes *FLO1* e *FLO11* em células diplóides, com o consequente

restabelecimento da floculação e do crescimento pseudohifal, respectivamente. Além de Flo8p, outro fator de transcrição, Mss11p, e a via da proteína-quinase A (PKA) são os principais reguladores da expressão do gene *FLO1* (BESTER et al., 2006; FICHTNER et al., 2007).

Outra possibilidade de regulação da floculação envolve o complexo de metilação COMPASS (do inglês *complex proteins associated with Set1p*<sup>2</sup>). Mutantes com COMPASS defeituoso mostraram um comportamento floculante, devido às quantidades crescentes de transcritos *FLO1*, *FLO5* e *FLO9*. Foi proposto que o COMPASS está envolvido no silenciamento da expressão desses genes (DIETVORST & BRANDT, 2008).

A expressão de *FLO11* é controlada por diversas vias diferentes, incluindo a de adenosina-monofosfato cíclico/proteína-quinase A (cAMP/PKA), a via de proteína-quinase ativada por mitógeno, *quorum sensing* e vias de ciclinas (VERSTREPEN & KLIS, 2006; DRANGINIS et al., 2007). Além da regulação transcricional, a expressão de *FLO11* também parece estar sob controle ao nível pós-transcricional (STRITTMATTER et al., 2006; FISCHER et al., 2008). Também tem sido demonstrado que *FLO10* e *FLO11* genes são regulados epigeneticamente. *FLO11* é silenciado por Hda1p, enquanto *FLO10* é regulado pelos fatores de transcrição Sfl1p e Flo8p (assim como *FLO11*) e silenciado por um conjunto de diferentes histona-desacetilases (HDACs): Hst1p e Hst2p (HALME et al., 2004).

Nas últimas décadas, o avanço da biologia molecular e suas novas ferramentas, como a transcriptômica, proteômica e metabolômica, têm proporcionado um melhor conhecimento acerca dos sensores *upstream* e das vias de sinalização envolvidas na regulação da floculação. Dessa forma, cepas de leveduras foram modificadas geneticamente, com atributos que ajudam a melhorar o comportamento floculante das cepas durante a fermentação, e, conseqüentemente, otimizar os processos industriais. (GOVENDER et al., 2008; WANG et al., 2008). Entretanto, como a regulação dos genes da

---

<sup>2</sup> O complexo COMPASS (complexo de proteínas associadas a Set1p) é conservado em leveduras e em outros eucariotos, incluindo o homem. O complexo COMPASS age na metilação da quarta lisina da Histona 3, necessário para o silenciamento de genes teloméricos (KROGAN et al., 2002).

floculação, em especial os genes FLO, ainda não é completamente conhecida, a manipulação genética pode comprometer outras características da cepa utilizada. Foi observado que cepas não-floculantes alteradas com os genes *FLO1* e *FLO5* demonstraram reduzida performance fermentativa ou aumento no tempo da fermentação (WATARI et al., 1991; WATARI et al., 1994). Ainda assim, a elucidação da regulação da floculação gera a oportunidade de manipular essa característica celular e abre a possibilidade de ampliar sua aplicação biotecnológica para além da produção de bioetanol e de bebidas alcoólicas, como por exemplo, para produção de proteínas heterólogas (KONDO et al., 2002; MATSUMOTO et al., 2002; SEONG et al., 2006), e para a biorremediação de metais pesados (SOARES et al., 2002; WANG & CHEN, 2006).

### **1.5 O processo fermentativo de produção da cachaça**

“Cachaça” é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48 % em volume, a 20 °C (BRASIL, 2005). A partir da degradação do açúcar do caldo da cana-de-açúcar é produzido o mosto fermentado, que, após destilado, dá origem a uma bebida de características sensoriais marcantes e peculiares, com altos níveis de álcoois, ésteres etílicos, aldeídos e ácidos orgânicos, os quais são responsáveis pelos distintos aromas da bebida final (CARDOSO et al., 2004).

No mercado de bebidas do Brasil, a cachaça merece um destaque especial, já que a aguardente é a bebida destilada mais consumida no país e ocupa o segundo lugar entre as bebidas alcoólicas, ficando atrás da cerveja. A produção chega a 1,5 bilhão de litros/ano, sendo exportados cerca de 14,8 milhões de litros, e existem atualmente mais de 5 mil marcas registradas e cerca de 30 mil produtores em todo o país, gerando uma receita de aproximadamente US\$ 500 milhões e empregando 450 mil pessoas (JUSTINO et al., 2005; SILVA et al., 2009; CAMPOS et al., 2009). No estado do Espírito Santo, o mercado da cachaça gera em torno de 5 mil empregos diretos, sendo a produção estimada em 20 milhões de litros/ano, dividida em, aproximadamente, 350 alambiques (DE MINGO, 2005 apud BRAVIM, 2011).

A produção da cachaça no Brasil está regulada por decreto específico (4.851/2003), regras que visam o incremento da produção de bebida de alta qualidade (BRASIL, 2003).

Nos últimos anos a cachaça começou a conquistar um novo consumidor, no país e no exterior, de renda mais elevada, gosto sofisticado e bastante criterioso na escolha dos produtos que compra. Portanto, observa-se que o mercado está cada vez mais exigente e o consumo mais elevado. A cachaça produzida seguindo elevados padrões de fabricação atinge preços expressivamente maiores que os produtos tradicionais. A partir deste momento, o produtor começou a agregar mais valor à bebida, investindo em equipamentos mais modernos e eficazes, padronizando o processo com a utilização de leveduras selecionadas, fazendo controle de qualidade, criando embalagens mais finas, e também realizando o *marketing* do produto com o objetivo de inseri-lo nos melhores pontos de venda do país ao lado de outras bebidas destiladas já conhecidas (FERNANDES et al., 2009).

O processo de fabricação da cachaça inicia-se com a moagem da cana, que produz um caldo ao qual se adiciona água, resultando no mosto. O processo de fermentação pode acontecer de forma espontânea ou após o mosto ser inoculado por leveduras. Ao término da fermentação ocorre a decantação, na qual se separam as borras, depois se processa a destilação num alambique (LIMA et al., 1983).

Nos alambiques onde a fermentação acontece de forma espontânea, o processo é mediado por uma complexa comunidade microbiana (microbiota endógena), presente no próprio caldo de cana-de-açúcar ou na superfície dos equipamentos utilizados no processo fermentativo. A falta de controle sobre a microbiota responsável pela fermentação é um dos aspectos que pode conduzir a variações organolépticas na bebida. Além disso, a preparação do fermento não segue um método padrão, podendo consistir somente do caldo de cana ou misturas do caldo com fubá e arroz (MORAIS et al., 1997; PATARO, et al., 1998; 2000; GUERRA et al., 2001; SCHWAN et al., 2001; GOMES et al., 2007). Sabe-se que a qualidade da cachaça está diretamente relacionada ao processo fermentativo, logo, cepas com características



apropriadas podem ser selecionadas para a otimização do processo e ser uma alternativa para controlar o processo mais eficientemente. Assim, muitos aspectos podem ser priorizados durante a seleção das cepas de *S. cerevisiae* para a produção de um produto de alta qualidade, entre eles, tolerância a estresse, uma curta fase de latência antes do início do processo, capacidade floculante, alta absorção e consumo de açúcar, completa fermentação do substrato, baixa produção de ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S) e ácido acético, desejáveis componentes de sabor, produção de álcoois superiores e alta produção de etanol (SILVA, 2009; VIANNA et al., 2008 apud BRAVIM, 2011).

Como parte da linha de pesquisa relacionada à fisiologia molecular e aplicações biotecnológicas da levedura *S. cerevisiae*, no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LBAA-UFES), o presente trabalho utilizou cepas selvagens de *S. cerevisiae* isoladas de diferentes alambiques do estado do Espírito Santo (BRAVIM et al., 2010). Desse modo, resultados preliminares sobre perfil de floculação das cepas (Figura 8), foram utilizados para nortear as demais investigações que seguem.

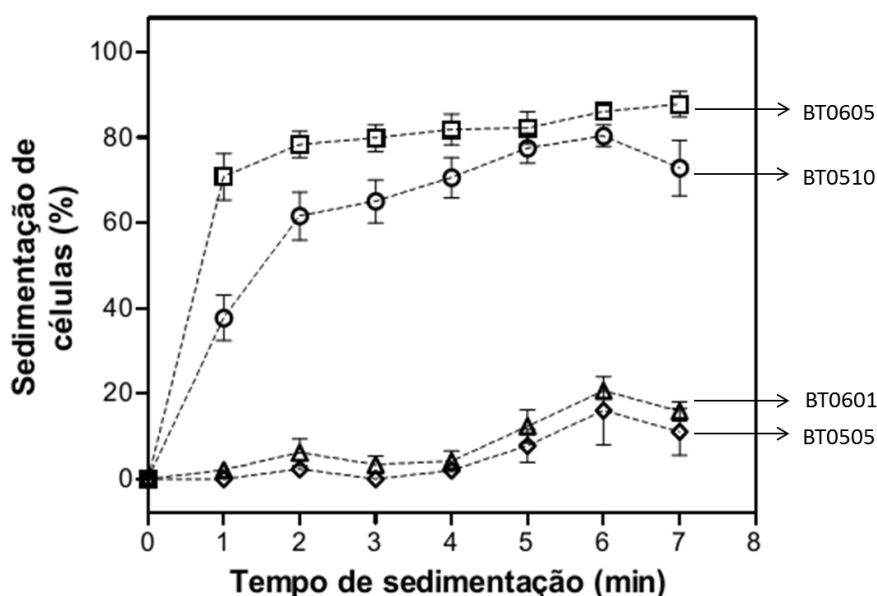


Figura 8. Perfil de sedimentação das cepas selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* BT0505 (losango), BT0510 (círculo), BT0601 (triângulo) e BT0605 (quadrado). O resultado é apresentado em porcentagem de sedimentação células por tempo, tomado em intervalos regulares de 1 minuto. Cada ponto representa a média de determinação, a qual foi feita a partir de três culturas independentes para cada cepa. Fonte: BRAVIM, 2011.

Como observado, duas cepas apresentaram um perfil de sedimentação característico de células floculantes (BT0510 e BT0605), enquanto as outras duas cepas (BT0505 e BT0601) não apresentaram capacidade floculante (BRAVIM, 2011).

Cepas floculantes de levedura são de grande interesse em diferentes indústrias biotecnológicas por apresentarem um processo fácil e barato de separação celular ao final do processo fermentativo (DENGIS et al., 1995; VERSTREPEN et al., 2003; CLARO et al., 2007; WANG et al., 2008). Em especial, o processo de produção tradicional da cachaça – feito em dornas de fermentação, com o caldo de cana fermentado sendo destilado em alambiques de cobre, e o “pé-de-cuba”<sup>3</sup> da primeira batelada podendo ser reaproveitado em vários ciclos fermentativos –, não utiliza a centrifugação para a reciclagem das células. Desse modo, a utilização de cepas de leveduras floculantes pode otimizar o processo, favorecendo a rápida sedimentação das células para o fundo da dorna de fermentação (SILVA et al., 2009 apud BRAVIM, 2011).

---

<sup>3</sup> Inóculo inicial, também chamado de pé-de-cuba, ou pé-de-fermentador, é em biotecnologia, a denominação dada à suspensão de microrganismos de concentração adequada, a ser usada na fermentação do mosto (FEIJÓ & MACIEL, 2002).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Analisar a influência dos carboidratos e da expressão de genes relacionados à parede celular na floculação em cepas selvagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Estabelecer uma metodologia para extração e hidrólise da parede celular de levedura, comparando diferentes abordagens em ambas as etapas;
- Comparar a eficiência de três colunas de cromatografia líquida de alta eficiência na resolução dos picos de glicose, manose e glicosamina;
- Comparar o teor de carboidratos da parede celular de cepas floculantes e não-floculantes de *S. cerevisiae*;
- Verificar a expressão dos genes relacionados à floculação e à parede celular em cepa floculante e não-floculante, contribuindo para o melhor entendimento dos fatores que promovem a floculação nos processos fermentativos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento metodológico deste trabalho se deu conforme as etapas que seguem no organograma da Figura 9.

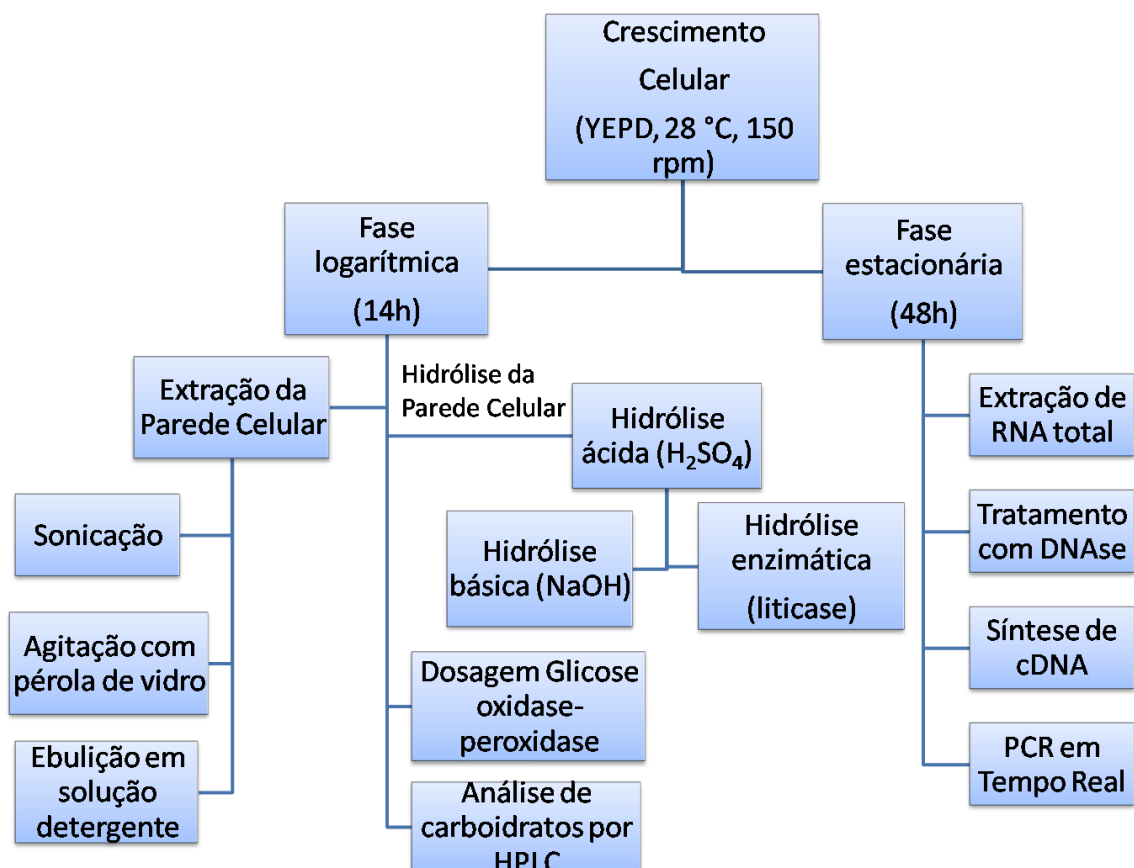


Figura 9. Organograma da metodologia desenvolvida no presente estudo.

#### 3.1 Microrganismos e condições de crescimento

As cepas da levedura de *S. cerevisiae* utilizadas no presente estudo (BT0505, BT0510, BT0601 e BT0605) foram isoladas de diferentes alambiques do estado do Espírito Santo (BRAVIM, 2011). Além delas, a cepa laboratorial Y440 (*MAT a, leu2*) foi utilizada no estabelecimento da metodologia de extração, hidrólise e dosagem dos carboidratos da parede celular. Todas as cepas são mantidas a -20 °C, na biblioteca de leveduras do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio, Núcleo de Biotecnologia, UFES.

As células de levedura foram cultivadas em meio YEPD (2% (p/v) de glicose, 2% (p/v) de peptona, e 1% (p/v) de extrato de levedura), incubadas a 28 °C e 150 rpm de agitação até a fase logarítmica de crescimento (cerca de 14 horas), para os experimentos da análise dos carboidratos da parede celular (item 3.5). Para a análise da expressão gênica (item 3.6), as células foram cultivadas até a fase estacionária de crescimento (cerca de 48 horas). Para crescimento realizado em meio sólido, foi adicionado 2% de ágar à composição do meio de cultura.

### **3.2 Extração da parede celular de levedura**

A parede celular de levedura foi extraída pela adaptação dos protocolos de Dallies et al. (1998) e De Groot et al. (2004). Para isso, 50 mL de cultura de células em fase logarítmica de crescimento foram colhidas por centrifugação, lavadas duas vezes com água ultrapura gelada e mais uma vez com 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5. As células foram ressuspensas em 1 mL de 10 mM Tris-HCl e transferidas para tubos de ensaio de vidro, em seguida, submetidos a 10 minutos de sonicação e arrefecidas em gelo. As células foram desintegradas por agitação vigorosa com esferas de vidro (0,106 mm de diâmetro) em vórtex de bancada ajustado na velocidade máxima durante 5 minutos e arrefecidas em gelo. A suspensão de células foi recolhida e as esferas de vidro lavadas extensivamente com 10 mM Tris-HCl gelado. A suspensão e as lavagens foram reunidas e centrifugadas a 10.000 rpm durante 3 minutos. O *pellet* foi lavado uma vez mais com NaCl 1 M, e seguiu-se quatro extrações numa solução detergente (50 mM Tris-HCl, pH 7,8, SDS a 2%, 100 mM de Na-EDTA, 150 mM NaCl ), em fervura por 10 minutos. Após ao menos sete lavagens com água ultrapura, o *pellet* final contendo a parede celular foi incubado a 80 °C por aproximadamente duas horas, para secagem completa da amostra e determinação do peso seco.

### 3.3 Hidrólise da parede celular

Após a extração, foi necessário escolher o melhor método de hidrólise da parede celular, para a liberação dos monossacarídeos e posterior análise em HPLC e dosagem pelo método de glicose oxidase-peroxidase (item 3.4).

#### 3.3.1 Hidrólise ácida com ácido sulfúrico

Para cada 1 mg de amostra, foram adicionados 75  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72% (v/v) e deixado por 3 horas à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura para obter uma solução 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . As amostras foram fervidas por 4 horas e resfriadas no gelo.

Ao final da etapa de fervura, o *pellet* remanescente, quando existiu, foi encaminhado para uma segunda etapa de hidrólise, básica ou enzimática.

Para neutralização e recuperação dos açúcares, foi realizada a precipitação dos íons sulfato com  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ . As amostras foram diluídas para 5 mL e foi adicionada solução saturada de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  até atingir a neutralidade, medindo com papel indicador universal. O  $\text{BaSO}_4$  formado foi recolhido por centrifugação a 10.000 rpm, 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado com muito cuidado e deixado a 4 °C por 18 horas, para permitir a precipitação do sulfato remanescente, removendo-o com uma segunda centrifugação. As amostras foram concentradas a vácuo a 80 °C por aproximadamente 2 horas, até secagem completa do volume. Ao final, o *pellet* seco contendo os açúcares foi ressuscitado em 1 mL de água ultrapura.

#### 3.3.2 Hidrólise básica com hidróxido de sódio

A hidrólise básica realizada foi baseada nas metodologias de Boone et al. (1990), Popolo et al.(1997) e HA et al. (2002). As células foram centrifugadas, lavadas uma vez com água destilada, e em seguida extraiu-se três vezes com 0,5 mL de NaOH a 3%, a 75 °C (1 h por extração). Após a

extração alcalina, as células foram lavadas uma vez com 1 mL de 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, e uma vez com 1 mL de 10 mM Tris-HCL, pH 7,5.

A partir desse momento, duas tentativas de neutralização e precipitação foram feitas. A primeira utilizou precipitação dos açúcares com dois volumes de etanol absoluto a -20 °C, por 18 horas, seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, 4 °C. Por fim, o sobrenadante foi neutralizado com HCl 3% e o *pellet* remanescente, quando existiu, foi encaminhado para a hidrólise ácida. A segunda utilizou neutralização com ácido acético 2 M e precipitação posterior com dois volumes de etanol absoluto contendo 0,3 M de tampão acetato de sódio, pH 7,0. O precipitado, recolhido após estocagem a -20 °C, 18 horas, foi lavado uma vez com etanol:água ultra pura (3:1), uma vez com etanol: água (1:1) e mais uma vez com água. Após a evaporação do etanol restante, a amostra foi ressuspensa em 1 mL de água ultra pura e dosada.

### **3.3.3 Hidrólise enzimática com liticase**

A hidrólise com a enzima liticase (EC. 3.2.1.58) (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) foi testada em combinação com a hidrólise ácida, para o esgotamento completo de um pequeno remanescente insolúvel formado ao final da etapa de fervura. O *pellet* foi lavado 3 vezes com água ultra pura, ressuspensa em 1 mL de tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  67 mM, pH 7,5 e adicionados 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque da enzima a 500 U/mL. A reação se deu a 25 °C por 15 minutos, em seguida, foi verificada a liberação de glicose pelo método de glicose oxidase-peroxidase, assim como análise por HPLC.

### **3.4 Dosagem da glicose pelo método de glicose oxidase-peroxidase**

A dosagem enzimática da glicose foi realizada em diversos momentos diferentes do trabalho. Foi utilizado o kit Glicose Enzimática Líquida (Doles, Goiás, Brasil), cujo método utiliza 10  $\mu\text{L}$  de amostra, 1 mL do reagente de cor contendo o sistema enzimático glicose oxidase-peroxidase. A reação acontece

a 37 °C por 10 minutos e em seguida é feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 510 nm. Uma solução padrão (100 mg/dL) é utilizada para cálculo do fator (F) de calibração, dado pela fórmula:  $F = 100 / \text{absorbância padrão}$ . A concentração de glicose em cada amostra é calculada tirando a média aritmética de três alíquotas, lendo as absorbâncias das mesmas e multiplicando pelo fator F.

### **3.5 Análise dos carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC)**

O conteúdo de glicose, manose e glicosamina da parede celular foi analisado por HPLC (LC20AT Prominence, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Três colunas da série REZEX (Phenomenex, Califórnia, EUA) foram testadas e comparadas em relação ao melhor desempenho: 1) ROA-*OrganicAcids* H<sup>+</sup>, 0,005 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fase móvel, fluxo isocrático de 0,6 mL/min; 2) RCM-*Monosaccharides* Ca<sup>2+</sup>; 3) RHM-*Monosaccharides* H<sup>+</sup>, ambas utilizando água ultra pura como eluente com fluxo isocrático de 0,6 mL/min. Todas as análises foram feitas a 60 °C. Em cada corrida, o volume de amostra injetada foi de 20 µL. O detector de índice de refração diferencial (RID10A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) a 60 °C foi utilizado para todas as colunas. O software utilizado para as análises foi o LC *Solution* (versão 1.25 SP2, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Uma curva padrão foi construída com soluções de diferentes concentrações dos padrões comerciais dos carboidratos analisados, a partir das medidas das áreas dos picos, relacionando-as com as concentrações dos compostos nas amostras.

### **3.6 Análise da expressão dos genes relacionados à floculação e parede celular de levedura**

#### **3.6.1 Extração de RNA total**

Para a extração de RNA total, foi adaptado protocolo descrito por UPPULURI et al. (2007), que trabalhou com células na fase estacionária.



Culturas de células de levedura foram crescidas em meio YEPD líquido (28 °C, 150 rpm) durante aproximadamente 48h, até a completa depleção de açúcar no meio, o que induz naturalmente a flocculação nas cepas flocculantes. Foram coletados 1,0 mL da cultura em tubos de microcentrífuga, centrifugados (10.000 rpm, 2 min), lavados uma vez com água ultra pura e centrifugados novamente. As células foram congeladas em nitrogênio líquido, adicionadas de um volume correspondente de pérolas de vidro e maceradas por 5 min com pistilo de vidro. As células foram ressuspensas em uma mistura de 600 µL de fenol (pH 4,3), 450 µL de tampão de AE (50 mM acetato de sódio, 10 mM EDTA,), 150 µL de clorofórmio e 90 µL de SDS 10%. Os tubos foram agitados à máxima velocidade por 30 s e, em seguida, a mistura foi incubada a 65 °C durante 20 min, com agitação em vórtex a cada 5 min. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 12.000 rpm, 4 °C. A camada aquosa superior, com aproximadamente 500 µL, foi re-extraída com um volume igual de fenol, agitadas por 30 s e centrifugadas. Seguiu-se então uma extração com 500 µL da mistura 24:1 de clorofórmio/álcool isoamílico, vortexadas por 30 s e centrifugadas. O sobrenadante aquoso foi precipitado com 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M, pH 5,2, e 2,5 volumes de etanol a 100%, e incubadas a -80 °C durante 15 min. Seguiu-se uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 15 min, 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com etanol 70%. O *pellet* contendo RNA foi recolhido por uma última centrifugação (15 min a 12 000 rpm, 4 °C), seco à temperatura ambiente em fluxo laminar e ressuspensos em 50 µL de água ultrapura. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nano Drop, ND-1000 Spectrophotometer, Delaware, EUA) e armazenadas em freezer a -20 °C até serem processadas.

### **3.6.2 Tratamento com DNase e síntese da fita de cDNA**

Para a remoção de qualquer resíduo de DNA genômico, 1µg de RNA total foi tratado com o kit *DNase 1 Amplification grade* (Invitrogen, Washington, EUA) durante 15 min a 25 °C. Para inativação da enzima, 1 µL de stop solution (20mM de EDTA) foi adicionado à amostra e seguiu-se incubação por 10 min à 65 °C. Após tratamento com a DNase, procedeu-se a confecção da fita de

cDNA utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). Para isso, utilizou-se 2 µL de tampão da RT (10x), 0,8 µL de mix de dNTP (25x, 100mM), 2 µL de primer randômico (10x) e 1 µL da *MultiScribe Reverse Transcriptase*. À mistura foi adicionado água para um volume total de 10 µL. As amostras foram incubadas na seguinte ordem: 10 minutos a 25 °C, 50 °C por 50 minutos e, posteriormente, 85 °C por 5 minutos, e, por fim, armazenadas em gelo, ou estocadas em freezer a -20 °C até a etapa seguinte.

### 3.6.3 Reação de RT-PCR em tempo real

Para a reação do PCR em tempo real utilizou-se o equipamento *Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR* (ABI 6.200, Applied Biosystems, Califórnia, EUA). O volume total de reação foi de 25 µL contendo: 3,0 µL de cDNA (0,2 µg do RNA tratado com DNase), 12,5 µL do kit *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), 1,0 µL de cada primer a uma concentração de 10 µM. As amostras foram submetidas a um ciclo de 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, finalizando-se por um ciclo de 95 °C por 15 segundos. Um controle negativo (contendo todos os reagentes, com exceção de cDNA que foi substituído por água) foi adicionado em todas as corridas. O número de ciclos requeridos para o sinal de fluorescência ultrapassar o limiar (Cycle threshold - Ct), bem como a curva de dissociação (melting curve) para a verificação da especificidade da reação, ausência de contaminação e ausência de dímeros de primers foram analisados pelo programa *StepOne Software®* (Applied Biosystems, versão 2.1, Califórnia, EUA). A eficiência de cada par de primer (Tabela 1) foi avaliada pelo método de diluição seriada usando um mix de cDNA como padrão. O valor de eficiência foi calculado pela seguinte fórmula:  $E = [10^{(-1/a)}]$ , onde “a” é o *slope* entre cada concentração conhecida de cDNA utilizada na curva padrão (primer com eficiência de 100% apresentam *slope* de -3,32). Valores de eficiência entre 90 e 110% foram considerados, utilizando-se a seguinte fórmula para o cálculo da expressão relativa,  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , onde  $\Delta\Delta CT = [(CT_{Tratado} - CT_{Controle}) - (CT_{Tratado-Referência} - CT_{Controle-Referência})]$ .

Tabela 2. Oligonucleotídeos usados como primers na reação de RT-PCR em tempo real

mRNA alvo	Sequência do Primer 5'-3'	Tamanho do amplicon (pb)	Eficiência do primer (%)
<i>CWP1</i>	Foward, 5'TGCAGCAGATTTTTCTCCAA3'	147	103
	Reverse, 5'GGGGAGCTAGCAGAGGAAGT3'		
<i>FKS1</i>	Foward, 5'GAGGCTGAGCGTCGTATTTTC3'	60	97
	Reverse, 5'TGGTTCGGGAATTGGAGTAG3'		
<i>FLO1</i>	Foward, 5'CCACAGACTGCGAATGAAGA3'	60	103
	Reverse, 5'TTGTCTCACCGGTAGCACTG3'		
<i>FLO8</i>	Foward, 5'GTCGACGGACCCAAATCTAA3'	145	99
	Reverse, 5'ACTCTGAGCCACCTCTGGAA3'		
<i>FLO10</i>	Foward, 5'CCTCCACCTCCGTTCAAATA3'	69	92
	Reverse, 5'GAGGGGCAACTGTGGAATA3'		
<i>KNR4</i>	Foward, 5'CTACCCTCAACGCAGAATCC3'	150	95
	Reverse, 5'CTGCTTGTCCAAGGCTTTCT3'		
<i>MNN9</i>	Foward, 5'TGCCATGTTCCCTAATTTCC3'	65	101
	Reverse, 5'TCGCCATCTTAGCAAAACCT3'		
<i>PIR3</i>	Foward, 5'ACCGATAGGAAGGGTAGAATTGG3'	66	94
	Reverse, 5'GTGGAGGACCATCGAATTGG3'		
<i>ALG9*</i>	Foward, 5'ACATCGTCGCCCAATAAAT3'	145	96
	Reverse, 5'GATTGGCTCCGGTACGTAAA3'		

\*Gene de referência

### 3.7 Análises estatísticas

Todos os gráficos foram feitos no software *Graph Pad Prism* (versão 5.0, Graph Pad, Califórnia, EUA) com utilização de média e desvio padrão para as barras e o cálculo dos erros. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) e todos os experimentos foram feitos em triplicata, exceto a análise da expressão gênica. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados por testes de média com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A partir da identificação dos perfis de floculação nas cepas selvagens isoladas de alambiques (Fig. 7), prosseguiu-se a investigação de alguns fatores que pudessem ser responsáveis por essa diferença no perfil de floculação, dentre eles, a composição de carboidratos da parede celular de levedura e a expressão de genes floculantes e relacionados à parede celular.

### **4.1 Análise dos carboidratos da parede celular de levedura**

A composição de carboidratos da parede celular de levedura foi o primeiro fator de influência da floculação analisado, o que se deu em parte pela falta de trabalhos na literatura tratando dessa influência. Para tanto, foi necessário inicialmente estabelecer o protocolo para análise dos carboidratos por HPLC e, em seguida, os protocolos para a extração e hidrólise da parede celular. Todos os experimentos realizados durante o estabelecimento dos protocolos utilizaram a cepa laboratorial Y440.

#### **4.1.1 Estabelecimento de protocolo de análise de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC).**

A análise dos polissacarídeos da parede celular foi feita de modo indireto pela dosagem dos monossacarídeos que os compõem – glicose ( $\beta$ -glucanos), manose (manana) e glicosamina (quitina), respectivamente – por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). É importante ressaltar que o tratamento ácido da hidrólise causa a desacetilação da N-acetil-glicosamina, o monômero verdadeiro das moléculas de quitina (HARDY et al., 1988; RAM & KLIS, et al., 1994; DALLIES et al., 1998; CHEN et al., 2010). Dessa forma, a glicosamina é o composto utilizado para inferir o conteúdo de quitina da célula. O perfil cromatográfico dos monossacarídeos analisados, juntamente com seus respectivos tempos de retenção são mostrados na Figura 10. O primeiro composto a ser eluído foi a glicosamina, no tempo de retenção ~7,6 minutos,

seguido pela glicose em ~11,4 minutos e, por fim, a manose em ~13,0 minutos. Os tempos de retenção são referentes à coluna REZEX-RCM. Independente da coluna utilizada, e de outras variações nos parâmetros, a ordem de eluição dos compostos se mantém.

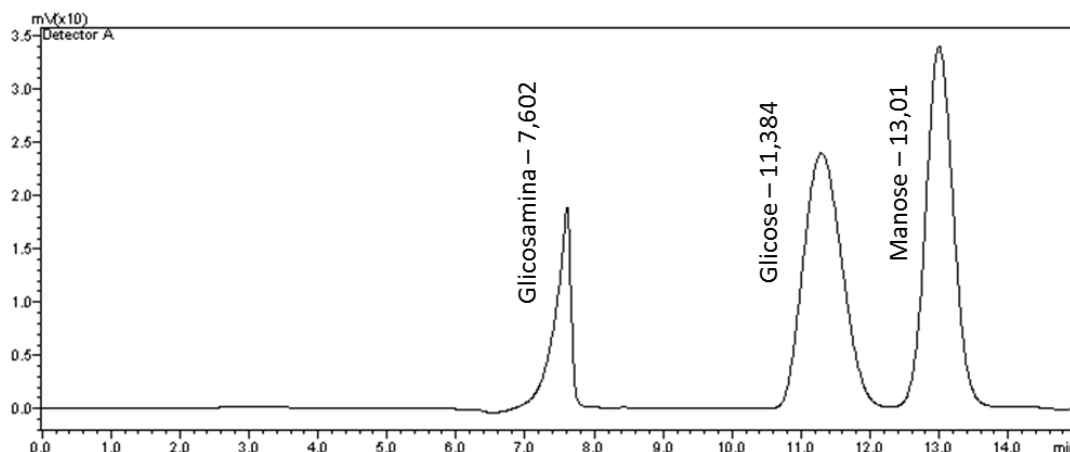


Figura 10. Perfil cromatográfico dos monossacarídeos analisados, Glicosamina, Glicose e Manose. Mistura de soluções dos padrões comerciais nas concentrações de 10.0 mg/mL, com seus respectivos tempos de retenção, em minutos. Coluna REZEX-RCM.

De fato, a cromatografia é uma técnica de separação de compostos. Assim, a dosagem dos monossacarídeos foi realizada por padronização externa, construindo inicialmente uma curva de calibração com soluções de concentrações conhecidas de seus padrões comerciais e, em seguida, utilizando os valores da área dos picos encontrados nos cromatogramas para inferir a concentração dos carboidratos nas amostras. A intensidade (altura) dos picos foi utilizada para confirmar e respaldar os resultados obtidos pela área, ambas variando na mesma proporção e apresentando a mesma tendência em todas as corridas analisadas (dados não mostrados).

Para o estabelecimento dessa metodologia foram testadas três colunas diferentes, com seus respectivos eluentes e condições de análise: 1) ROA-*Organic Acids*  $H^+$ , coluna para ácidos orgânicos, podendo também ser utilizada para açúcares, glicerol e etanol; 2) RCM-*Monosaccharides*  $Ca^{2+}$ , coluna trocadora de  $Ca^{2+}$ , específica para monossacarídeos; 3) RHM-

*Monosaccharides* H<sup>+</sup>, trocadora de H<sup>+</sup>, também específica para monossacarídeos. Os critérios utilizados para a escolha da coluna foram uma melhor resolução dos picos, menor oscilação da linha de base, picos com base mais estreitas e sem sobreposição. A resolução descreve o grau de separação de um componente em relação a outro e é definida como a diferença dos tempos de retenção de dois solutos divididos pela largura média de seus picos (COLLINS et al., 2006).

A coluna REZEX-ROA apresentou o pior desempenho dentre as três testadas. A resolução dos picos de glicose e manose não é completa (o final do pico do primeiro coincide com o início do segundo), mostrando que as substâncias estão eluindo em parte concomitantemente. Além disso, ocorreu em boa parte das corridas inversão de fase no pico da glicosamina (Figura 11 A). A mesma amostra lida na coluna RCM mostrou picos de glicose e manose com ótima separação, valores de intensidades próximos e sem inversão de fase.

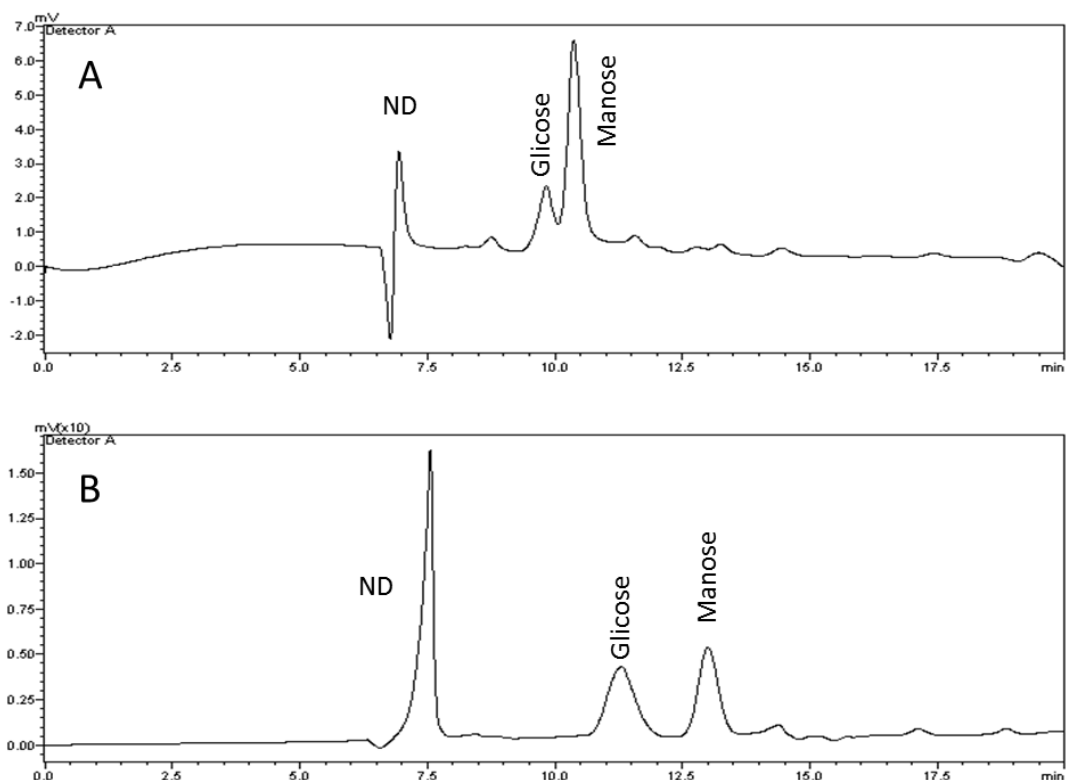


Figura 11. Perfil cromatográfico dos monossacarídeos da parede celular de uma mesma amostra e comparação entre as colunas REZEX-ROA (A) e REZEX-RCM (B). Não determinado.

A coluna REZEX-RCM, por sua vez, apresentou o melhor desempenho, com excelente resolução entre os picos de glicose e manose, sem qualquer sobreposição (Figura 11 B), resolução esta que se mantém mesmo em substâncias a concentração de 10 mg/mL (Figura 10). A coluna RHM, similar à RCM também foi testada para análise de monossacarídeos. A coluna apresentou picos de base estreita, melhor resolução dos picos de glicose e manose que a ROA, embora ainda com uma pequena sobreposição. A resolução piorou quando analisados uma mistura dos padrões comerciais dos carboidratos estudados a 10 mg/mL (Figura 12).

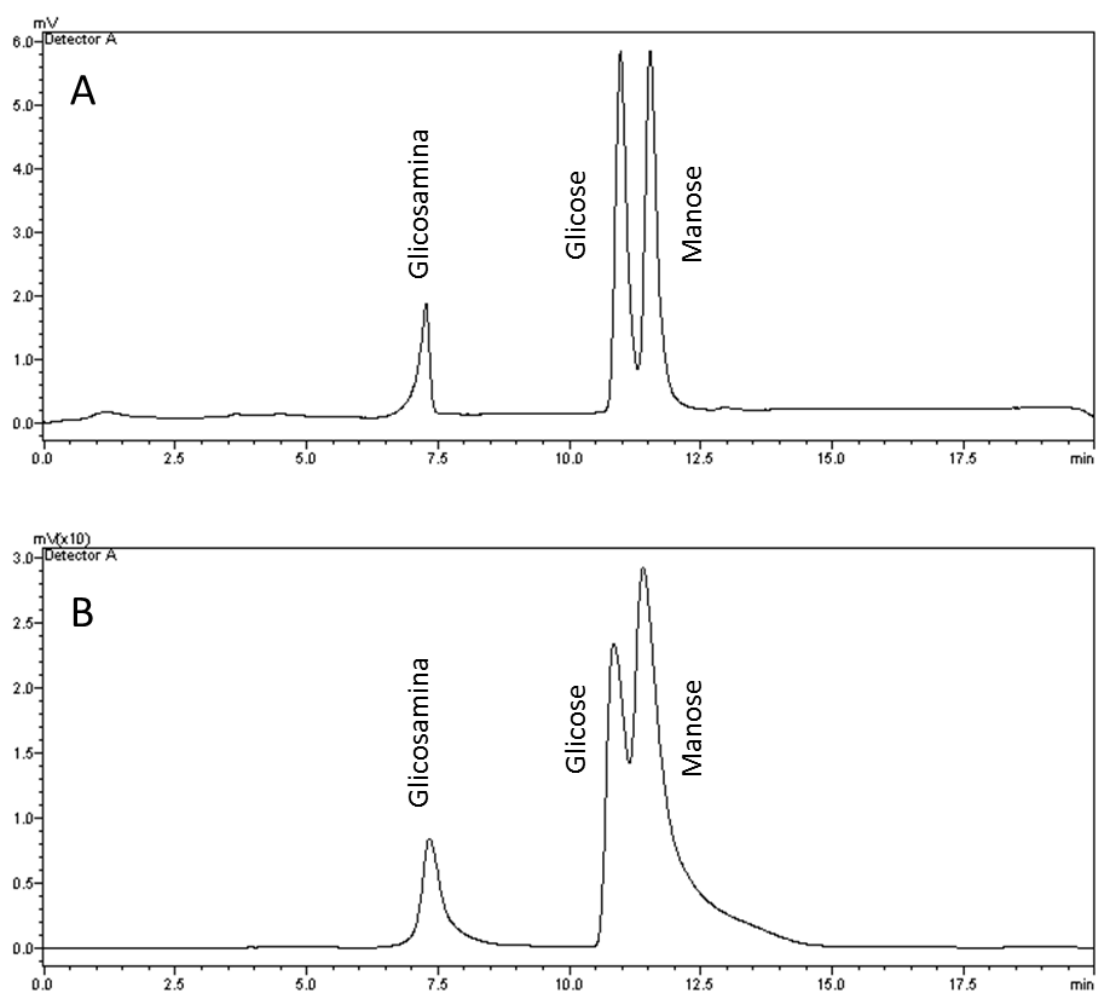


Figura 12. Perfil cromatográfico da mistura dos padrões comerciais dos carboidratos, nas concentrações de 1.0 mg/mL (A) e 10.0 mg/mL (B). Coluna REZEX-RHM.

Em suma, a coluna REZEX-RCM apresentou a melhor resolução entre as três. RHM atua como uma boa substituta, com boa resolução das substâncias em baixa concentração, enquanto a RCM continua com ótima

resolução mesmo com alta concentração de açúcares. Entretanto, por manter-se mais estável, a coluna RHM foi escolhida.

#### 4.1.2 Estabelecimento do protocolo de extração e hidrólise da parede celular.

Uma vez estabelecida a metodologia para análise dos carboidratos, partiu-se para o estabelecimento dos protocolos de extração e hidrólise da parede celular. Os protocolos utilizados foram eficientes na separação da parede celular, quebra dos polissacarídeos e liberação dos monossacarídeos para análise posterior.

A fim de comprovar a eficiência da separação da parede de todo o resto do conteúdo celular foi feita a dosagem de glicose pelo método de glicose oxidase-peroxidase antes (Amostra 1, Tabela 3) e após (Amostra 2, Tabela 3) as sucessivas lavagens com água ultra pura, a última etapa da extração (ver tópico 3.3). Uma vez que os açúcares que poderiam interferir e funcionar como falsos positivos, são hidrossolúveis, esperar-se-ia que estivessem presentes no sobrenadante do *pellet* final contendo a parede celular. O valor negativo de glicose na Amostra 2, lida após as lavagens, mostram não haver açúcar intracelular após a extração da parede. O resultado representa a média da medição de três experimentos distintos.

Tabela 3. Dosagem de glicose pelo método de glicose oxidase-peroxidase das amostras de levedura utilizadas no estabelecimento dos protocolos de extração e hidrólise da parede celular. Descrição das amostras no texto. \*Valor teórico.

Amostra	Glicose (mg/dL)
Amostra 1	16,3±2,6
Amostra 2	-3,6±1,3*
Amostra 3	0,25±0,06
Amostra 4	1,92
Amostra 5	3,94
Amostra 6	37,82
Amostra 7	39,21



Em um extenso estudo, Dallies et al. (1998) compararam a hidrólise da parede pelos ácidos trifluoroacético (TFA), sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) e clorídrico (HCl), mostrando que a estabilidade e a recuperação dos monossacarídeos glicose, manose e glicosamina foi maior com a utilização do ácido sulfúrico.

A Figura 13 demonstra o sucesso da hidrólise ácida padrão utilizada na liberação dos monossacarídeos esperados em um dos testes realizados com a cepa Y440.

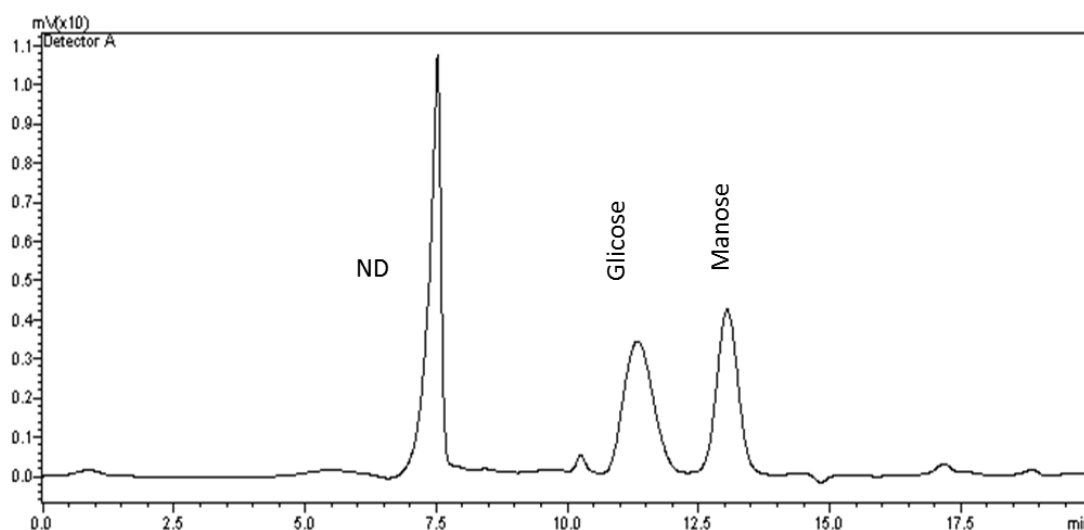


Figura 13. Perfil dos monossacarídeos da parede celular da cepa Y440, liberados após hidrólise com  $H_2SO_4$ . Tempos de retenção: ND ~7,5 min; Glicose ~11,4 min; Manose ~13,0 min. Coluna REZEX-RCM. ND: Não determinado.

Diversos trabalhos utilizam também a hidrólise básica da parede celular, em geral com NaOH (POPOLO et al., 1997; HA et al., 2002; CABIB & DURAN, 2005), enquanto outros utilizam hidrólise enzimática, lançando mão de enzimas como  $\beta$ -glucanases, quitinases, mananases e proteases, ou ainda a combinação das hidrólises química e enzimática (BOONE et al., 1990; DIJKGRAAF et al., 1996; KATH & KULICKE, 1999; DIJKGRAAF et al., 2002). Com intuito de melhorar a liberação dos carboidratos, no presente trabalho foram feitas várias tentativas, além da hidrólise ácida, com as hidrólises básica, enzimática utilizando a enzima liticase (uma  $\beta$ -glucanase), e diferentes combinações entre elas.

A Tabela 3 (Amostra 3) e a Figura 14 mostram o resultado da combinação das hidrólises ácida e enzimática. Ao final da etapa de fervura (ver

tópico 3.3), um *pellet* remanescente (cerca de 10-20% do *pellet* da parede celular inicial, em peso seco) ácido-insolúvel foi tratado com a enzima liticase, a fim de esgotá-lo completamente. Uma quantidade muito pequena de glicose foi liberada dos *pellets* após a aplicação da enzima.

O cromatograma da Figura 14 mostra não haver detecção de monossacarídeos, apenas um grande pico único em ~10,5 minutos, provavelmente relacionado ao tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , utilizado para ressuspender a amostra. Ao comparar com o perfil da Figura 13, o resultado indica que a combinação das hidrólises não foi eficiente.

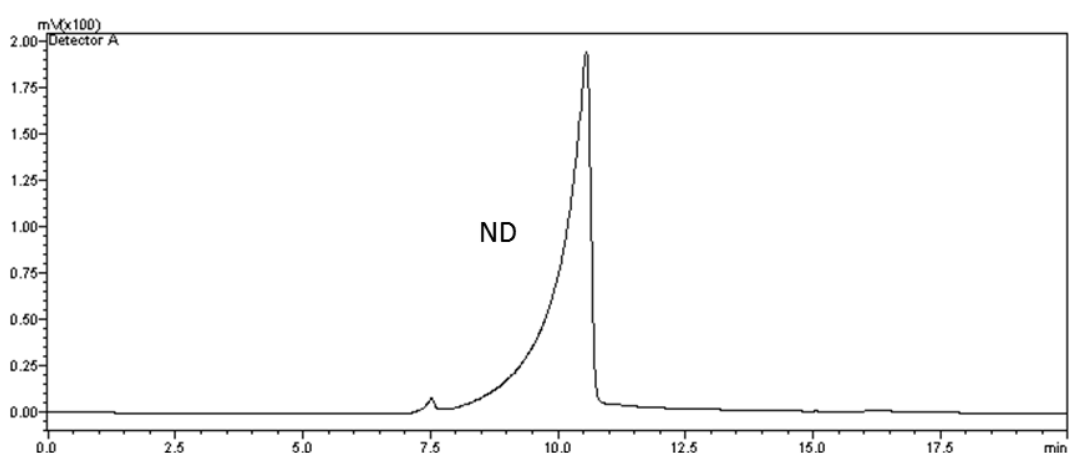


Figura 14. Cromatograma da fração ácido-insolúvel após tratamento com liticase. Ambas as amostras mostraram o mesmo perfil, com um único pico detectável em ~10,5 minutos. Coluna REZEX-RCM. ND: Não determinado.

Foram testadas diversas modalidades de hidrólise básica com NaOH, em geral, combinando com a hidrólise ácida para o esgotamento dos *pellets* insolúveis formados ao final de cada etapa em particular. Na primeira tentativa, hidrólise básica inicial, seguida de hidrólise ácida, a fração ácido-solúvel, (Figura 15, A) apresentou um pico em ~10,9, que poderia ser de glicose, um pouco antes que o esperado (~11,4 min), e sem manose. A fração alcali-solúvel (Figura 15, B) apresentou apenas um pico de glicose também eluindo antes do esperado e um pico desconhecido em ~15,4 min com inversão de fase. A dosagem de glicose pelo método de glicose oxidase-peroxidase (Amostras 4 e 5, Tabela 3) confirma a pequena presença de glicose nas amostras.

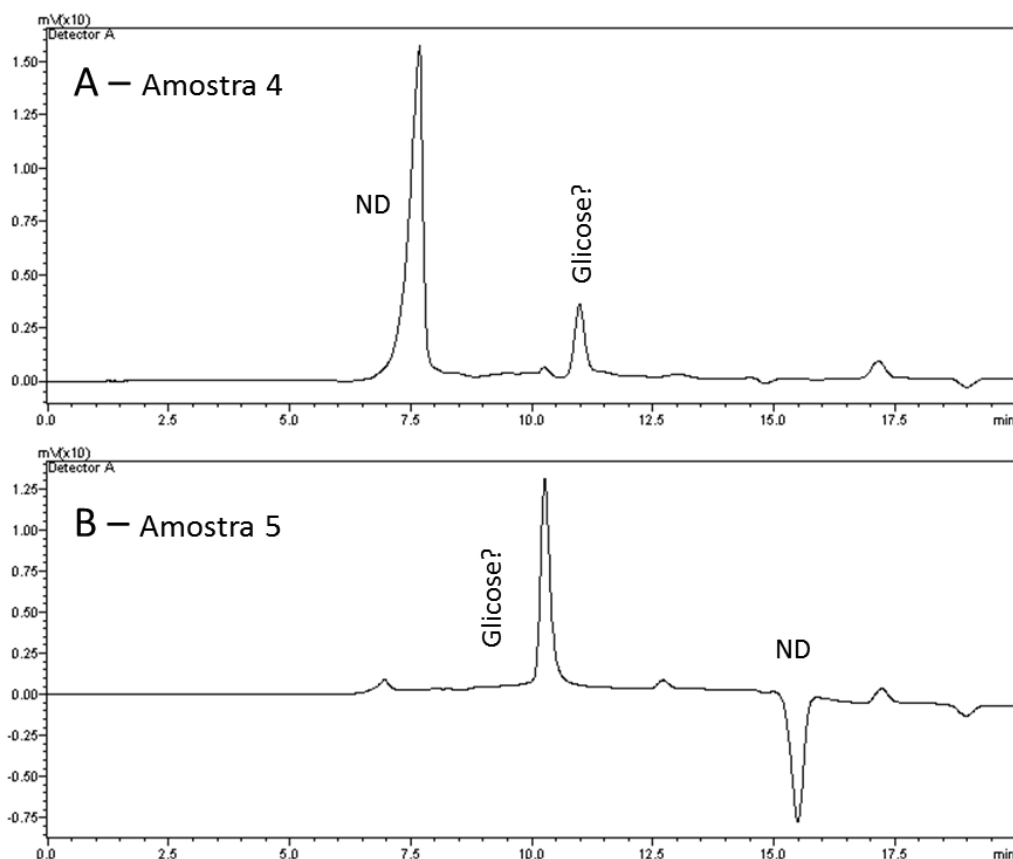


Figura 15. Cromatogramas das frações ácido-solúvel (A) e álcali-solúvel (B) após hidrólise básica, seguida de hidrólise ácida. Coluna REZEX-RCM. ND: Não determinado.

A segunda abordagem utilizou hidrólise ácida inicial, seguida de hidrólise básica (Amostra 6). Foi testado em conjunto a neutralização com ácido acético 2 M e precipitação por etanol absoluto com acetato de sódio 0,3 M numa amostra com hidrólise básica inicial (Amostra 7). Os resultados indicam uma liberação equivalente de glicose em ambas as amostras (Tabela 3). A análise dos cromatogramas, no entanto, mostra que a melhor liberação dos monossacarídeos ocorreu na fração ácido-solúvel da amostra 6, com a hidrólise ácida inicial (Figura 16, A). A fração ácido-solúvel da amostra 7 (Figura 16, B) apresentou pico de glicose reduzido em relação à amostra 6 e uma ínfima quantidade de manose. Houve formação excessiva de sal nos processos de neutralização e precipitação, o que pode ter levado ao aparecimento de picos desconhecidos em ~15-15,4 min e outro menor em ~17,3 min nas frações álcali-solúveis, prejudicando assim as análises cromatográficas.

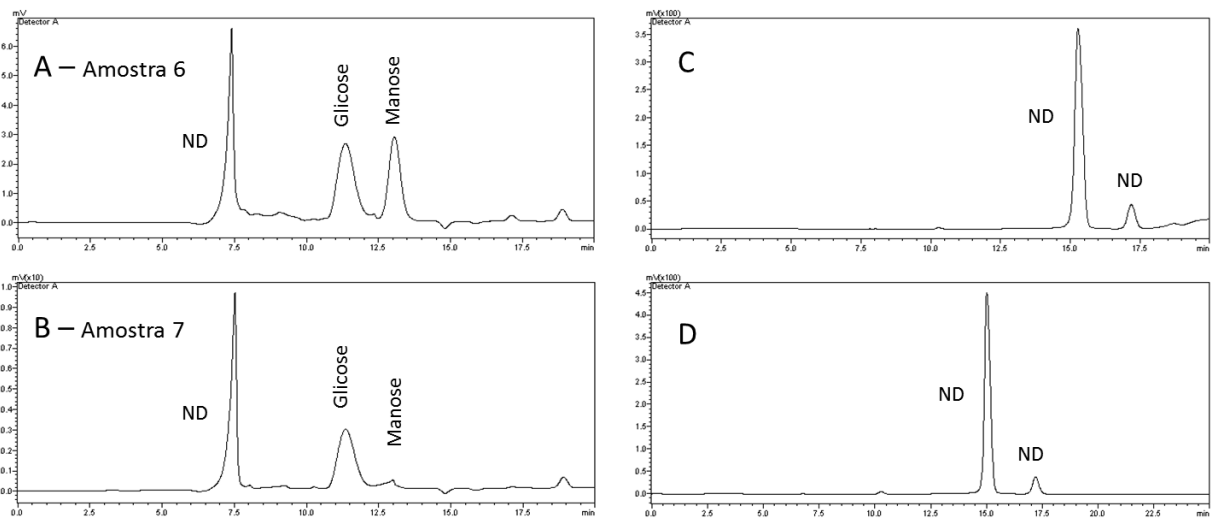


Figura 16. Cromatogramas das frações ácido-solúvel (A e B) e alcali-solúvel (C e D) após hidrólise ácida inicial, seguida de hidrólise básica (A e C), e o inverso, hidrólise básica inicial, seguida de hidrólise ácida (B e D). Coluna REZEX-RCM. ND: Não determinado.

De posse dos resultados obtidos, a hidrólise única com ácido sulfúrico da parede celular de levedura foi escolhida, capaz de separar eficientemente a parede de todo o resto celular e liberar os monossacarídeos para análises posteriores.

#### 4.1.3 Comparação do teor de carboidratos da parede celular de cepas floculantes e não-floculantes de *S. cerevisiae*.

O estudo comparativo do conteúdo dos carboidratos da parede celular entre cepas floculantes e não-floculantes de *S. cerevisiae* foi realizado utilizando-se o método de extração por hidrólise ácida e análise dos carboidratos por HPLC na coluna REZEX-RHM. Os perfis cromatográficos das cepas são mostrados na Figura 17 e representam a avaliação qualitativa da liberação dos monossacarídeos estudados.

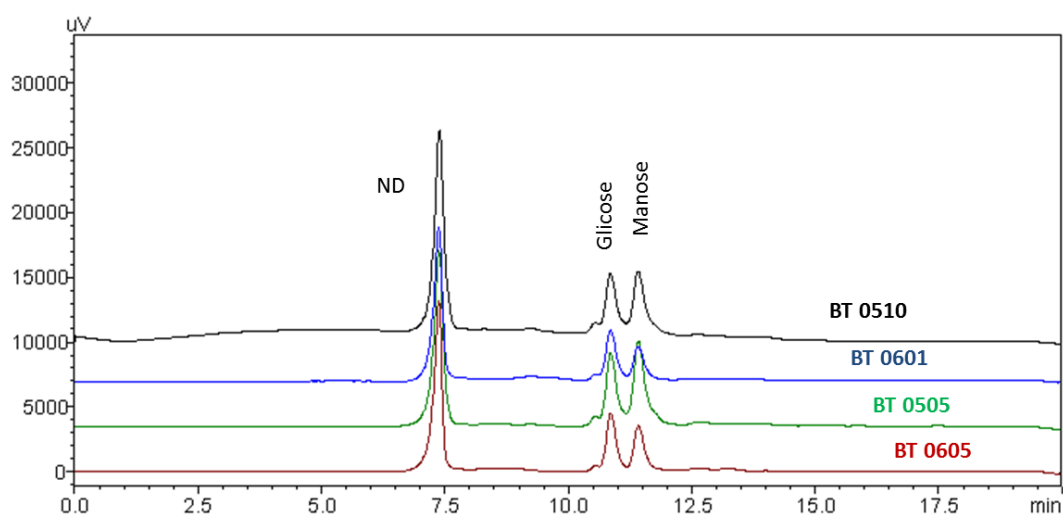


Figura 17. Perfil cromatográfico das cepas BT0510 (preto), BT0601 (azul), BT0505 (verde) e BT0605 (vermelho), mostrando a presença dos monossacarídeos. Coluna REZEX-RHM.

A análise quantitativa dos carboidratos se deu conforme exposto nos tópicos 3.5 e 4.1.1. O conteúdo de glicose da parede celular das cepas foi avaliado e o resultado consta na Figura 18:

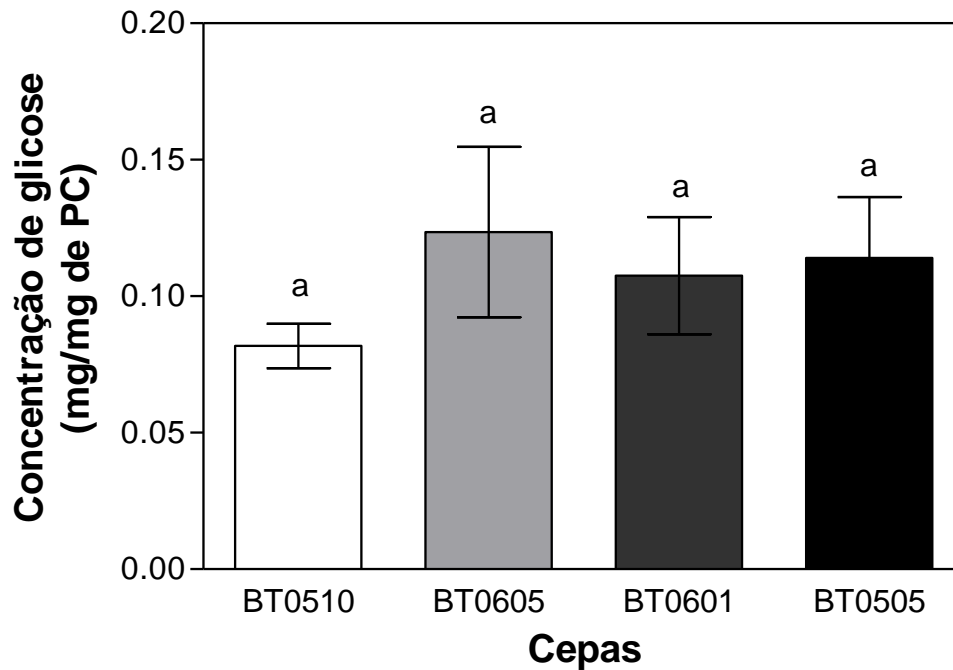


Figura 18. Avaliação do teor de Glicose e comparação entre as cepas floculantes (BT0510 e BT0605) e não-floculantes (BT0601 e BT0505). Médias marcadas com a mesma letra não diferem estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ). PC: Parede Celular.

Como pode ser observado, apesar da cepa floculante BT0510 apresentar um menor conteúdo médio de glicose, não houve diferença significativa entre as cepas. Resultado similar foi encontrado analisando o conteúdo de manose (Figura 19). Dessa forma, neste trabalho não foi encontrada relação positiva entre os níveis de carboidratos da parede celular e a capacidade floculante.

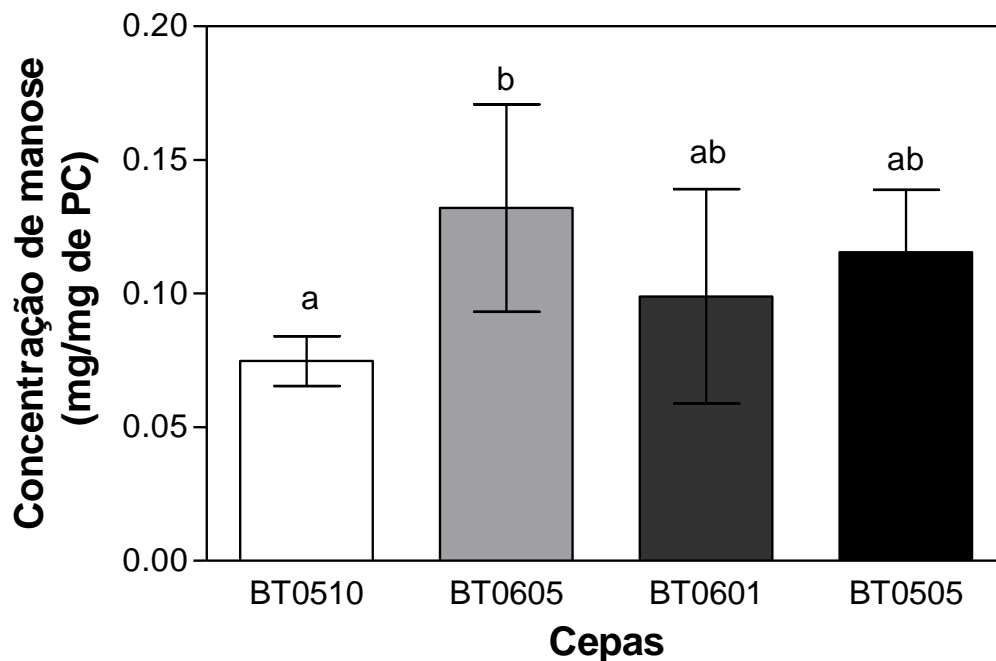


Figura 19. Avaliação do teor de Manose e comparação entre as cepas floculantes (BT0510 e BT0605) e não-floculantes (BT0601 e BT0505). Médias marcadas com a mesma letra não diferem estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ). PC: Parede Celular.

Foi calculada também a razão Manose/Glicose, mostrada na Tabela 4, abaixo. Uma razão próxima de 1.0, geralmente encontrada em cepas selvagens, é um indicativo que não há mutações ou modificações na regulação dos genes que respondem pela síntese e estruturação dos carboidratos que compõem a parede celular. São comuns pequenas variações entre diferentes cepas, mas valores abaixo de 0.6 e acima de 1.6 já passam a configurar perfis típicos de cepas mutantes (RAM et al., 1994; DALLIES et al., 1998; DIJKGRAAF et al., 2002; HA et al., 2002).

Tabela 4. Razão Manose/Glicose das cepas floculantes e não-floculantes.

Cepa	Razão Man/Glc
BT0510	0,91
BT0605	1,11
BT0601	0,87
BT0505	1,01

Até o presente momento foi considerado o pico de glicosamina visualizado nas amostras de parede celular, eluindo, em geral, próximo de 7-7,5 minutos. Mas o mesmo não reflete a quantidade real de quitina na célula, variando de 1.5 a 6 % do peso seco da parede celular (DALLIES et al., 1998; AGUILAR-USCANGA & FRANÇOIS, 2003), em condições normais, podendo chegar a até dez vezes seu valor normal em condições de estresse da parede celular (KAPTEYN et al., 1999; DALLIES et al., 1998; MAGNELLI et al., 2002; RAM et al., 1998). Dessa forma, um pico real de glicosamina não poderia ser maior que os de glicose e manose. Para demonstrar esse fato, foi calculado o teor teórico, de glicosamina das amostras e comparado com os teores de glicose e manose (Figura 20).

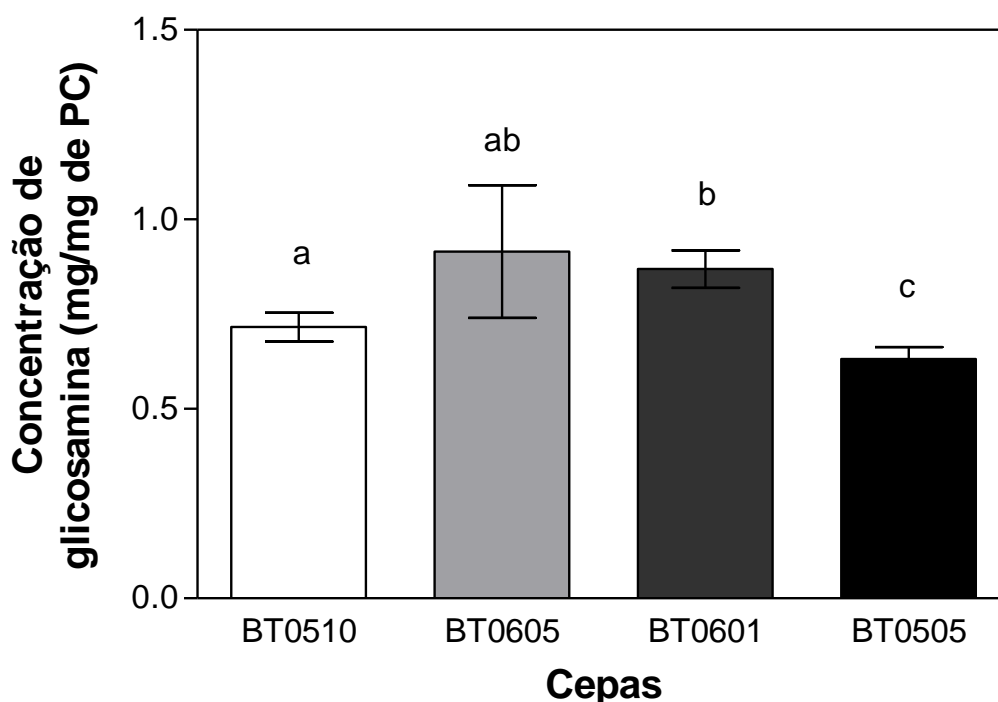


Figura 20. Avaliação do conteúdo teórico de Glicosamina e comparação entre as cepas flocculantes (BT0510 e BT0605) e não-flocculantes (BT0601 e BT0505). Médias marcadas com a mesma letra não diferem estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ). PC: Parede Celular.

Como observado, o valor teórico de glicosamina (entre ~0.7-1.2 mg/mg de parede) se mostra maior que os de glicose e manose, o que não condiz com a realidade celular. Provavelmente, no mesmo tempo de retenção que a glicosamina, está(ão) eluindo outra(s) substância(s), aumentando o sinal



detectado, e assim, gerando um falso resultado. Tal substância, ou substâncias, estaria sendo formada durante as etapas de preparação das amostras (extração, hidrólise e secagem). Uma análise por espectrometria de massas faz-se necessária para identificar os prováveis compostos.

#### 4.2 Análise da expressão dos genes relacionados à floculação e à parede celular por PCR em Tempo Real.

A fim de melhor compreender a diferença no perfil de floculação, foi analisada a expressão de genes ligados à floculação (*FLO1*, *FLO8*, *FLO10*) e genes relacionados à biogênese e estruturação da parede celular (*PIR3*, *CPW1*, *FKS1*, *MNN9*, *KNR4*). Inicialmente, foram comparadas uma cepa floculante (BT0605) e outra não-floculante (BT0505), após 48 horas de crescimento (fase estacionária), de modo a permitir que as células constitutivamente floculantes, floculassem naturalmente. A Figura 21 mostra os níveis de expressão gênica de BT0605 em relação à BT0505. O gene *ALG9* foi usado como gene de referência, baseado em dados da literatura (TESTE et al., 2009).

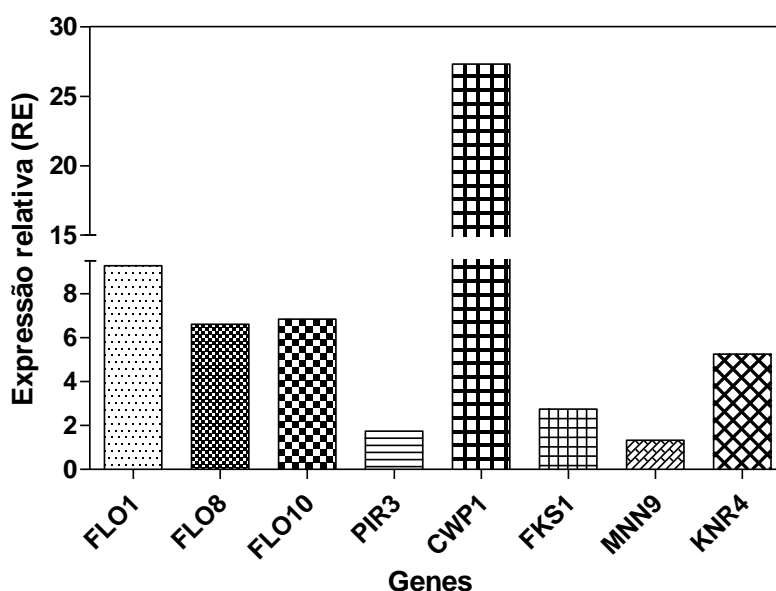


Figura 21. Expressão relativa dos genes floculantes e relacionados à parede celular na cepa floculante BT0605 em relação à cepa não floculante BT0505.

Como pode ser observado, há um aumento na ordem de 6 a 9 vezes na expressão dos genes FLO, mostrando claramente a atuação dos mesmos na cepa floculante BT0605. *FLO1* é o principal gene relacionado à floculação em *S. cerevisiae*. Codifica para uma lectina de parede celular e é responsável pelo fenótipo de floculação *FLO1* (WATARI et al. 1994; BONY et al., 1997), determinando, assim, o fenótipo da cepa estudada. *FLO10* também é componente da família de genes subteloméricos cuja expressão induz a floculação (GUO et al, 2000), possuindo alta homologia a *FLO1*. Eles podem atuar conjuntamente, sendo os níveis de participação na floculação de cada um dos genes variável entre as cepas (TEUNISSEN & STEENSMA, 1995; VAN HOLLE et al., 2012). Foi demonstrado que *FLO8*, juntamente com o gene *MSS11*, codificam para fatores de transcrição que induzem a floculação, sendo o principal alvo de ambos os fatores o gene *FLO1* (KOBAYASHI et al., 1996; 1999; BESTER et al., 2006).

Um pequeno aumento (1,7 vezes) foi observado na expressão de *PIR3*, que codifica para uma Pir-CWP, necessária para estabilização da parede celular e relacionada à tolerância ao choque térmico (TOH-E, et al., 1993) e resistência à osmotina, uma proteína antifúngica encontrada em plantas (YUN et al., 1997). Mazán et al., (2008) demonstraram a importância das proteínas Pir para o crescimento em baixo pH e na presença de vários inibidores. Por outro lado, um impressionante aumento (27 vezes) pode ser observado no gene *CWP1*, que codifica para uma GPI-CWP, o grupo que compõe a maioria das manoproteínas da parede celular e que parecem ter uma função geral na estabilidade e integridade da mesma, além de outras funções. *CWP1* e *CWP2* são expressos durante crescimento vegetativo. A deleção de ambos os genes separadamente confere hipersensibilidade aos agentes estressantes de parede *Calcofluor White* e Vermelho Congo (VAN DER VAART et al., 1995), além de aumentar a permeabilidade celular a agentes genotóxicos (ZHANG et al., 2008). Quando vista por microscopia eletrônica, uma cepa mutante  $\Delta cwp2$  apresentou uma parede celular mais fina do que a cepa selvagem (VAN DER VAART et al., 1995).

Estudos de PCR em tempo real avaliaram a expressão dos genes CWP durante fermentações em escala industrial de duas cepas de cerveja

lager. A superexpressão de *CWP1* coincidiu com a sedimentação das células, possivelmente indicando que o gene desempenhou um papel no início da floculação (LAWRENCE et al., 2009). Ainda, a deleção de *CWP1* inibiu a floculação na cepa laboratorial S288c, particularmente durante a fase estacionária (SMART et al., 2005). Assim, é possível que a estabilidade na parede celular possa favorecer de alguma forma a floculação, ou então que células floculantes possuam uma parede celular mais estável e, portanto, sejam mais tolerantes a estresses. O comportamento floculante é de grande importância para as células de levedura, uma vez que é uma forma de escaparem das condições adversas do meio a que são submetidas. Foi sugerido que as células localizadas no meio dos flocos podem sofrer lise e servir como uma fonte de novos nutrientes para as demais células durante o processo fermentativo (STEWART, & RUSSELL, 1981; ISERENTANT, 1996; GOOSSENS et al., 2011). Os resultados demonstrados neste trabalho corroboram com estudos anteriores e sugerem que o gene *CWP1* tenha um papel importante na floculação da cepa BT0605.

O gene *FKS1* é responsável por codificar uma subunidade catalítica da enzima glucano-sintase, responsável pela biossíntese de  $\beta$ -1,3-glucanos (DOUGLAS et al., 1994; INOUE et al., 1995). Um aumento de 2,7 vezes na expressão de *FKS1* pode ser observado na cepa floculante, de modo que seria esperada uma maior atividade glucano-sintase e um maior conteúdo de glucanos da parede (DIJKGRAAF et al, 2002). O resultado, no entanto, não é consistente com os dados de dosagem dos açúcares da parede por HPLC, que mostraram não haver diferença significativa no teor de glicose entre as cepas. Essa discrepância pode ser resultado da decomposição dos glucanos durante a etapa de hidrólise, formando homo/heteropolímeros de oligossacarídeos que poderiam estar eluindo no mesmo tempo de retenção que a glicosamina (Figura 16), diminuindo assim o conteúdo de glicose detectado.

O gene *MNN9*, que codifica para uma subunidade do complexo manosiltransferase, responsável por mediar a N-glicosilação das manoproteínas e a alongação do esqueleto de manana na parede celular, apresentou um aumento bem modesto (1,3 vezes) na cepa floculante. STRATFORD (1992c) mostrou que células mutantes em *MNN9* apresentaram

uma estrutura mais compacta e com menos resíduos de manose expostos na parte externa do esqueleto de mananas, diminuindo a agregação das células com a lectina concavalina A e a capacidade de floculação. O mesmo trabalho sugere que as células normais possuem receptores em excesso, acima do que seria necessário para a floculação. Desse modo, mesmo que o pequeno aumento na expressão do gene pudesse refletir numa maior disponibilidade de resíduos de manose, o que não é corroborado pelos dados do HPLC, provavelmente não afetaria a capacidade floculante da célula, estando a mesma atrelada à atividade de outros genes, como os genes *FLO* e *CWP1*.

Por último, o gene *KNR4* codifica para uma proteína envolvida na regulação da síntese da parede celular, provavelmente envolvida na coordenação da progressão do ciclo celular com a integridade da parede celular. Foi demonstrado que a perda de *KNR4* leva à alteração na estrutura e composição da parede celular, aumentando a quantidade de quitina em quatro vezes, e reduzindo os níveis de  $\beta$ -1,3-glucano em 50% (HONG et al., 1994; MARTIN et al., 1999). Outros trabalhos demonstraram que a remoção de *KNR4* em uma cepa de vinho resultou na liberação de maiores quantidades de manoproteínas durante a fermentação alcoólica (GONZALEZ-RAMOS & GONZALEZ, 2006), o que pode contribuir para a maior estabilidade do ácido tartárico, das proteínas solúveis, do aroma e favorecer propriedades específicas da espuma nos vinhos espumantes (FEUILLAT et al., 1998; NÚÑEZ et al., 2006; GONZALEZ-RAMOS et al., 2009; SCHMIDT et al., 2009). Estudos mais recentes com a mesma cepa deletada em *KNR4* mostraram a superexpressão de *FKS1*, provavelmente através de um mecanismo compensatório pela perda de *KNR4*, além da expressão de *FLO8* e aparecimento de comportamento floculante (PENACHO et al., 2012). Os autores afirmam que esse comportamento está diretamente relacionado com as alterações estruturais e composicionais na superfície da célula, resultado da eliminação de *KNR4* (PENACHO et al., 2012).

Este trabalho mostrou um aumento significativo de 5,2 vezes na expressão de *KNR4* na cepa floculante em relação à cepa não-floculante. O resultado corrobora com os dados da literatura e sugere que esse gene, ao desempenhar um papel importante na manutenção estrutural da parede celular,

provavelmente favoreça propriedades da superfície celular, como a floculação. O mecanismo pelo qual isto ocorre, no entanto, ainda não está totalmente claro.

## 5 CONCLUSÕES

- Foi estabelecida uma metodologia para extração e hidrólise com ácido sulfúrico da parede celular de levedura, capaz de separar eficientemente a parede de todo o resto celular e liberar os monossacarídeos para análises posteriores;
- A hidrólise básica parece ser mais eficiente em esgotar e solubilizar os *pellets*. Mas tal solubilização, em geral, não reflete na liberação dos carboidratos esperados. Além disso, há uma discrepância em relação à dosagem de glicose pelo método de glicose oxidase-peroxidase e o que é detectado por HPLC;
- Apesar de esgotar completamente o *pellet*, a hidrólise dupla provavelmente levou à destruição dos carboidratos. As hidrólises básica e enzimática com liticase não foram eficientes na liberação dos monossacarídeos requeridos, de modo que a metodologia para essas hidrólises não foi estabelecida com êxito. Ainda, houve formação excessiva de sal nos processos de neutralização e precipitação, o que prejudicou muito as análises cromatográficas. A presença de sal e tampões, tanto na fase móvel, quanto na amostra é um dos maiores problemas em potencial em cromatografia (COLLINS et al., 2006). Outras tentativas, com protocolos mais apurados podem trazer sucesso. Por ora, a hidrólise ácida padrão foi a única que possibilitou alcançar os resultados esperados;
- A utilização de uma técnica para identificação molecular e atômica das substâncias, como a espectrometria de massas, poderia confirmar a identidade dos carboidratos analisados e, ainda, identificar os picos desconhecidos, como os visualizados na hidrólise básica;
- Foi estabelecida uma metodologia para análise dos carboidratos glicose, manose e glicosamina por HPLC, utilizando prioritariamente a coluna REZEX-RCM, e a REZEX-RHM com substituta viável;

- Nenhuma relação positiva entre a capacidade floculante e níveis de glicose e manose da parede celular foi encontrada. Desta forma, pode-se afirmar que a concentração de carboidratos da parede celular não influencia no padrão de floculação. O método não foi eficiente para determinação do conteúdo de glicosamina das amostras de parede celular. Algumas substâncias podem estar sendo formadas durante a etapa de extração e hidrólise dos polissacarídeos da parede celular, e eluindo juntamente com a glicosamina;
- Na análise da expressão gênica da cepa floculante BT0605 em relação à cepa não-floculante BT0505, foi observado um aumento expressivo dos genes FLO (*FLO1*, *FLO8* e *FLO10*), confirmando as expectativas. Um aumento impressionante foi observado no gene *CPW1*, corroborando com estudos que sugerem uma grande importância deste gene para a integridade da parede celular e para o processo de floculação. Também houve aumento significativo da expressão de outros genes relacionados à parede celular, dentre eles *KNR4* e *FKS1*, além de *PIR3* e *MNN9* em menor nível.

## 6 PERSPECTIVAS

O presente trabalho apresenta uma contribuição importante ao explorar o processo de floculação em leveduras de cachaçaria, a segunda bebida alcoólica mais consumida no Brasil, que, apesar da importância crescente no cenário nacional e mundial, faltam estudos que respaldem essa importância.

Dentre as perspectivas lançadas com o trabalho, está possibilidade de análise proteômica da parede celular das cepas floculantes e não-floculantes, poderiam ajudar a explicar a diferença no perfil de floculação.

Análises por espectrometria de massas das frações obtidas por HPLC poderiam confirmar a identidade dos carboidratos analisados e, ainda, identificar as prováveis substâncias que estão sendo formadas e eluindo com a glicosamina, além de compostos desconhecidos, como os visualizados após a hidrólise básica.

Por fim, foram indicados genes potenciais, cuja superexpressão em cepas transformadas poderia levar a uma capacidade floculante aumentada, característica de grande interesse industrial.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVA, N., SERTIL, O., MEHTA, S. & LOWRY, C.V. Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 2881–2887, 2001.

AGUILAR-USCANGA, B. & FRANCOIS, J.M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 37, p. 268–274, 2003.

ALIMARDANI, P., REGNACQ, M., MOREAU-VAUZELLE, C., FERREIRA, T., ROSSIGNOL, T., BLONDIN, B. & BERGÈS, T. SUT1-promoted sterol uptake involves the ABC transporter Aus1 and the mannoprotein Dan1 whose synergistic action is sufficient for this process. **Biochem. J.**, v. 381, p. 195–202, 2004.

AMORIM, V. A. Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia. Piracicaba: FERMENTEC, 2005. 434p.

ARAÚJO, F. L., DIAS, M.V.C, BRITO, E.A. & OLIVEIRA JÚNIOR, S. Enriquecimento protéico de alimentos por levedura em fermentação semissólida: alternativa na alimentação animal. **Tecnol.&Ciên.Agropec.**, João Pessoa, v.3, n.3, p.47-53, 2009.

BABA, M. & OSUMI, M. Transmission and scanning electron microscopic examination of intracellular organelles in freeze-substituted *Kloeckera* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. **J. Electron Microsc. Tech.**, v. 5, p. 249–261, 1987.

BARROS, N. M., AZEVEDO, J. L. & SERAFINI, L. A. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul – RS: Editora EDUCS, 2002.

BAUER, F. F.; GOVENDER, P.; BESTER, M. C. Yeast flocculation and its biotechnological relevance. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 88, n. 1, p. 31-39, 2010.

BAYLY, J.C., DOUGLAS, L.M., PRETORIUS, I.S., BAUER, F.F. & DRANGINIS, A.M. Characteristics of *FLO11*-dependent flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 5, p. 1151–1156, 2005.

BESTER, M.C., PRETORIUS, I.S. & BAUER, F.F. The regulation of *Saccharomyces cerevisiae* FLO gene expression and Ca<sup>2+</sup>-dependent flocculation by *FLO8p* and *Mss11p*. **Curr. Genet.**, v. 49, p. 375–383, 2006.

BONY, M., THINES-SEMPOUX, D., BARRE, P. & BLONDIN, B. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein *FLO1p*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 4929–4936, 1997.

BOONE, C., SOMMER, S.S., HENSEL, A. & BUSSEY, H. Yeast kre genes provide evidence for a pathway of cell wall/ -glucan assembly. **J. Cell Biol.**, v. 110, p. 1833-1843, 1990.

BOORSMA, A., DE NOBEL, H., TER RIET, B., BARGMANN, B., BRUL, S., HELLINGWERF, K.J., & KLIS, F.M. Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 21, p. 413–427, 2004.

BRASIL. Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. Publicado no Diário Oficial da União de 30/06/2005, Seção 1, p. 3. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>.

BRASIL, Decreto nº 4851, de 2 de outubro de 2003. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: <http://www.receita.fazenda.gov.br/Legislacao/Decretos/2003/dec4851.htm>.

BRAVIM, F. Isolamento e indução de resistência em leveduras para a produção de cachaça. f. 86 Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

BRAVIM, F., PALHANO, F.L., FERNANDES, A.A.R. e FERNANDES, P.M.B. Biotechnological properties of distillery and laboratory yeasts in response to industrial stresses. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 37, p. 1071-1079, 2010.

BRAVIM, F. Resposta de *Saccharomyces cerevisiae* ao estresse de alta pressão hidrostática. f. 162. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – RENORBIO, Programa de Pós-graduação de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito, Vitória, 2011.

CABIB, E. & DURÁN, A. Synthase III-dependent chitin is bound to different acceptors depending on location on the cell wall of budding yeast. **J. Biol. Chem.**, v. 280(10), p. 9170-9179, 2005.

CAMPOS, C. R., SILVA, C.F., DIAS, D.R., BASSO, L.C., AMORIM, H.V. & SCHWAN, R.F. Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage, cachaça in Brazil. **J. Appl. Microbiol.**, v. 108, n. 6, p. 1871-1879, 2010.

CARDOSO, D. R., ANDRADE-SOBRINHO, L.G., LEITE-NETO, A.F., RECHE, R.V., ISIQUE, W.D., FERREIRA, M.M., LIMA-NETO, B.S. & FRANCO, D.W. Comparison between cachaça and rum using pattern recognition methods. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 11, p. 3429-3433, 2004.

CARLSON, M. Glucose repression in yeast. **Cur. Opin. Microbiol.**, v. 2, p. 202-207, 1999.

CASTILLO, L., MARTINEZ, A.I., GARCERA, A., ELORZA, M.V., VALENTÍN, E. & SENTANDREU, R. Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall  $\beta$ -1,3-glucan. **Yeast**, v. 20, p. 973–983, 2003.

- CHEN, J.-K., SHEN, C.-R. & LIU, C.-L. N-Acetylglucosamine: Production and applications. **Mar. Drugs**, v. 8, p. 2493-2516, 2010.
- CHRISPEELS, M. J. & RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **The Plant Cell**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 1991.
- CLARO, F. B., RIJSBRACK, K. & SOARES, E. V. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, n. 3, p. 693-700, 2007.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L. & BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia. ed. Unicamp, 452p., 2006.
- COSTA, V. & MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis e diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, p. 217-246, 2001.
- CUNHA, A.F., MISSAWA, S.K., GOMES, L.H., REIS, S.F. & PEREIRA, G.A.G. Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, p. 280–287, 2006.
- DALLIES N., FRANÇOIS, J. & PAQUET, V. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast.**, v. 14(14), p. 1297-306, 1998.
- DE GROOT, P.W.J., DE BOER, A.D., CUNNINGHAM, J., DEKKER, H.L., DE JONG, L., HELLINGWERF, K.J., DE KOSTER, C. & KLIS, F.M. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. **Eukaryot. Cell.**, v. 3, p. 955–965, 2004.
- DE GROOT, P.W.J., RAM, A.F. & KLIS, F.M. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. **Fungal Genet. Biol.**, v. 42, p. 657–675, 2005.
- DE MINGO, N. Cachaça “Made in” Espírito Santo. In: **ESSA - Espírito Santo Sociedade Aberta**. n. 3, 2005.
- DENGIS, P.B., NE´LISSEN, L.R. & ROUXHET, P.G. Mechanisms of yeast flocculation: comparison of top- and bottom fermenting strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 718–728, 1995.
- DE NOBEL, J.G., KLIS, F.M., PRIEM, J., MUNNIK, T. & VAN DEN ENDE, H. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 6, p. 491–499, 1990.
- DIJKGRAAF, G.J.P., BROWN, J.L. & BUSSEY, H. The KNH1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is a functional homolog of KRE9. **Yeast**, v. 12, p. 683-692, 1996.
- DIJKGRAAF, G.J.P., ABE, M., OHYA, Y. & BUSSEY, H. Mutations in *FKS1p* affect the cell wall content of B-1,3- and B-1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 19, p. 671–690, 2002.

DIETVORST, J. & BRANDT, A. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* is repressed by the COMPASS methylation complex during high-gravity fermentation. **Yeast**, v. 25, p. 891–901, 2008.

DRANGINIS, A.M., RAUCEO, J.M., CORONADO, J.E. and Lipke, P.N. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 71, p. 282–294, 2007.

DOUGLAS, C. M., FOOR, F., MARRINAN, J. A., MORIN, N., NIELSEN, J. B., DAHL, A. M., MAZUR, P., BAGINSKY, W., LI, W., EL-SHERBEINI, M., CLEMAS, J. A., MANDALA, S. M., FROMMER, B. R., & KURTZ, M. B. The *Saccharomyces cerevisiae* *FKS1* (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91: p. 12907–12911, 1994.

FEIJÓ, A. & MACIEL, Engels. Cachaça artesanal: do alambique à mesa. **SENAC Nacional**, 107p, 2002.

FELDMAN, H. Yeast Molecular Biology: A short compendium on basic features and novel aspects. Munich: Adolf-Butenandt-institute, 2005.

FERNANDES, P.M. How does yeast respond to pressure? **Braz. J. Med. Biol. Res.** Ribeirão Preto, v. 38, n. 8, p. 1239-1245, 2005.

FERNANDES, P.M.B (org). Levedura: do pão à biotecnologia. Vitória: Edufes, 119p, 2009.

FEUILLAT, M., CHARPENTIER, C. & NGUYEN VAN LONG, T. Yeast's mannoproteins: a new possible enological adjuvant. **Bulletin de l'OIV.**, v. 71, p. 944–967, 1998.

FICHTNER, L., SCHULZE, F. & BRAUS, G.H. Differential *FLO8p*-dependent regulation of *FLO1* and *FLO11* for cell–cell and cell–substrate adherence of *S. cerevisiae* S288c. **Mol. Microbiol.**, v. 66, p. 1276–1289, 2007.

FISCHER, C., VALERIUS, O., RUPPRECHT, H., DUMKOW, M., KRAPPMANN, S. & BRAUS, G.H. Posttranscriptional regulation of *FLO11* upon amino acid starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, p. 225–236, 2008.

FLEET, G.H. & MANNERS, D.J. Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 94(1), p. 180-92, 1976.

FUJII, T., SHIMOI, H. & IIMURA, Y. Structure of the glucan binding sugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1427, p. 133–144, 1999.

GALE, E.F., JOHNSON, A.M., KERRIDGE, D. & WAYMAN, F. Phenotypic resistance to miconazole and amphotericin B in *Candida albicans*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 117, p. 535–538, 1980.

GIBSON, B.R., LAWRENCE, S.J., LECLAIRE, J.P.R., POWELL, C.D. & SMART, K.A. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 3, p. 535–569, 2007.

GOFFEAU, A., BARRELL, B.G., BUSSEY, H., DAVIS, R.W., DUJON, B., FELDMANN, H., GALIBERT, F., HOHEISEL, J.D., JACQ.C., JOHNSTON, M., LOUIS, E. J., MEWES, H.W., MURAKAMI, Y., PHILIPPSSEN, P., TETTELIN, H. e OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 546–549, 1996.

GOMES, F.C., SILVA, C.L., MARINI, M.M., OLIVEIRA, E.S. & ROSA, C.A. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. **J. Appl. Microbiol.**, v. 103, n. 6, p. 2438-2447, 2007.

GONZALEZ-RAMOS, D. & GONZALEZ, R. Genetic determinants of the release of mannoproteins of enological interest by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 9411–9416, 2006.

GONZALEZ-RAMOS, D., QUIRÓS, M. & GONZALEZ, R. Three different targets for the genetic modification of wine yeast strains resulting in improved effectiveness of bentonite fining. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 8373–8378, 2009.

GOOSSENS, K.V.Y., STASSEN, C., STALS, I., DONOHUE, D.S., DEVREESE, B., DE GREVE, H. & WILLAERT, R.G. **Eukaryot. Cell**, v. 10, p. 110–117, 2011.

GOUVEIA, C. & SOARES, E.V. Pb<sup>2+</sup> inhibits competitively flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Inst. Brew.**, v. 110, p. 141–145, 2004.

GOVENDER, P., DOMINGO, J.L., BESTER, M.C., PRETORIUS, I.S. & BAUER, F.F. Controlled expression of the dominant flocculation genes *FLO1*, *FLO5*, and *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, p. 6041–6052, 2008.

GUERRA, J.B. ARAÚJO, R.A., PATARO, C., FRANCO, G.R., MOREIRA, E.S., MENDONÇA-HAGLER, L.C. & ROSA, C.A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 33, n. 2, p. 106-111, 2001.

GUO, B., STYLES, C.A., FENG, Q. & FINK, G. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell–cell adhesion, and mating. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 12158– 12163, 2000.

HA, C.H., LIM, K.H., KIM, Y.T., LIM, S.T., KIM, C.W. & CHANG, H.I. Analysis of alkali-soluble glucan produced by *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.58, p. 370–377, 2002.

HALME, A., BUMGARNER, S., STYLES, C. & FINK, G.R. Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell–surface variation in yeast. **Cell**, v. 116, p. 405– 415, 2004.

HANEY, S. et al. Genetic selection in *Saccharomyces* of Mutant Mammalian Adenylyl Cyclases with elevated basal activities. **Molec. Genetic. Genomics**, Heidelberg, v. 265, n. 6, p. 1120-1128, 2001.

HARDY, M. R., TOWNSEND, R. R. & LEE, Y. C. Monosaccharide analysis of glycoconjugates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Anal. Biochem.**, v. 170, p. 54–62, 1988.

HARTLAND, R.P., VERMEULEN, C.A., KLIS, F.M., SIETSMA, J.H. & WESSELS, J.G.H. The linkage of (1–3)- $\beta$ -glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 10, p. 1591–1599, 1994.

HOHMANN, S. & MAGER, W.H. (eds). Yeast Stress Responses. Molecular Biology Intelligence Unit, R.G. Landes Co., Austin, TX, 389p, 1997.

HONG, Z., MANN, P., BROWN, N.H., TRAN, L.E., SHAW, K.J., HARE, R.S., & DIDOMENICO, B. Cloning and characterization of *KNR4*, a yeast gene involved in (1,3)- $\beta$ -glucan synthesis. **Mol. Cell. Biol.**, v. 14, p. 1017–1025, 1994.

JAVADEKAR, V. S., SIVARAMAN, H., SAINKAR, S.R. & KHAN, M.I. A mannose binding protein from the cell surface of flocculent *Saccharomyces cerevisiae* (NCIM 3528): its role in flocculation. **Yeast**, v. 16, p. 99-110, 2000.

INOUE, S. B., N. TAKEWAKI, T. TAKASUKA, T. MIO, M. ADACHI, Y. FUJII, C. MIYAMOTO, M. ARISAWA, Y. FURUICHI, & T. WATANABE. Characterization and gene cloning of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 231, p. 845–854, 1995.

ISERENTANT, D. Practical aspects of yeast flocculation. *Cerevisiae*. **Bel. J. Brew. Biotechnol.**, v. 21, p. 30–33, 1996.

JIN, Y. & SPEERS, R.A. Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 58, p. 108–116, 2000.

JIN, Y., RITCEY, L.L. & SPEERS, R.A. Effect of cell surface hydrophobicity, charge, and zymolectin density on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, v. 59, p. 1–9, 2001.

JONES G.H., & BALLOU C.E. Studies on the structure of yeast mannan. I. Purification and some properties of an alpha-mannosidase from an *Arthrobacter* species. **J. Biol Chem.**, v. 244(3), p. 1043-51, 1969.

JUSTINO, M., MUTTON, R., MUTTON, M.A. Aguardente. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Ed.). Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação, mercado. São Paulo: Ed. Edgar Blucher, 2005.

KAPTEYN, J.C., MONTIJN, R.C., VINK, E., DE LA CRUZ, J., LLOBELL, A., DOUWES, J.E., SHIMOI, H., LIPKE, P.N. & KLIS, F.M. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked  $\beta$ -1,3-/ $\beta$ -1,6-glucan heteropolymer. **Glycobiology**, v. 6, p. 337–345, 1996.

KAPTEYN, J.C., VAN EGMOND, P., SIEVI, E., VAN DEN ENDE, H., MAKAROW, M. & KLIS, F.M. The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and  $\beta$ 1,6-glucan-deficient mutants. **Mol. Microbiol.**, v. 31, p. 1835–1844, 1999.

KATH, F. & KULICKE, W.-M. Mild enzymatic isolation of mannan and glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Die Angew. Makromol. Chem.**, v. 268, p. 59–68, 1999.

KATHODA, S., ABE, N., MATSUI, M. & HAYASHIBE, M. Polysaccharide composition of the cell wall of baker's yeast with special reference to cell walls obtained from large- and small-sized cells. **Plant Cell Physiol.**, v. 17, p. 909–919, 1976.

KAUR, R., DOMERGUE, R., ZUPANCIC, M.L. & CORMACK, B.P. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 378–384, 2005.

KIDA, K., YAMADAKI, M., ASNO, S., NAKATA, T. & SONODA, Y. The effect of aeration on stability of continuous ethanol fermentation by a flocculating yeast. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 68, p. 107–111, 1989.

KLIS, F.M., MOL, P., HELLINGWERF, K. & BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 26, p. 239–256, 2002.

KLIS, F. M., DE GROOT, P., BRUL, S. & HELLINGWERF, K. Molecular organization and biogenesis of the cell wall. In: DICKISON, J.R. & SCHWEIZER, M. (Ed.) *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. ed. 2, Philadelphia, PA (EUA): CRC Press, cap. 5, p. 117-139, 2004.

KLIS, F.M., BOORSMA, A & DE GROOT, P.W.J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, p. 185-202, 2006.

KOBAYASHI, O., SUDA, H., OHTANI, T. & SONE, H. Molecular cloning and analysis of the dominant flocculation gene *FLO8* from *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 251, p. 707–715, 1996.

KOBAYASHI, O., HAYASHI, N., KUROKI, R. & SONE, H. Region of *FLO1* proteins responsible for sugar recognition. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 6503–6510, 1998.

KOBAYASHI, O., YOSHIMOTO, H. & SONE, H. Analysis of the genes activated by the *FLO8* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 36, p. 256–261, 1999.

KOCH, A.L. Development of the sacculus marked emergence of the bacteria. **ASM News**, v. 69, p. 229–233, 2003.

KOLLAR, R., PETRAKOVA, E., ASHWELL, G., ROBBINS, P.W. & CABIB, E. Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and  $\beta$ (1–3)-glucan. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 1170–1178, 1995.

KOLLAR, R., REINHOLD, B.B., PETRAKOVA, E., YEH, H.J., ASHWELL, G., DRGONOVÁ, J., KAPTEYN, J.C., KLIS, F.M. & CABIB, E. Architecture of the yeast cell wall.  $\beta(1-6)$ -glucan interconnects mannoprotein,  $\beta(1-3)$ -glucan, and chitin. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 17762–17775, 1997.

KONDO, A., SHIGECHI, H., ABE, M., UYAMA, K., MATSUMOTO, T., TAKAHASHI, S., UEDA, M., TANAKA, A., KISHIMOTO, M. & FUKUDA, H. High-level ethanol production from starch by a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface glucoamylase. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 58, p. 291–296, 2002.

KONDO, A. & UEDA, M. Yeast cell-surface display — applications of molecular display. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 64, p. 28–40, 2004.

KOIZUMI, H. & OGAWA, T. Rapid and sensitive method to measure premature yeast flocculation activity in malt. **J. Am. Soc. of Brew. Chem.**, v. 63, n.4, p. 147-150, 2005.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. Classification of yeast. In: ROSE A. H. & HARRISON, J. S. (Ed.). The yeasts. 2. ed. London: Academic Press, p. 5-61, 1987.

KROGAN, N.J., DOVER, J., KHORRAMI, S., GREENBLATT, J.F., SCHNEIDER, J., JOHNSTON, M. & SHILATIFARD, A. COMPASS, a histone H3 (Lysine 4) methyltransferase required for telomeric silencing of gene expression. **J. Biol. Chem.**, v. 277 (13), p. 10753-5, 2002.

LAWRENCE, S.J., GIBSON, B.R. & SMART, K.A. Expression of the cell wall mannoprotein genes CWP and DAN during industrial-scale lager fermentations. **J. Am. Soc. of Brew. Chem.**, v. 67, p. 58-62, 2009.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L. & COX, M. M. Lehniger princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 975 p, 2002.

LIMA, U. A. Aguardentes. In: AQUARONE, E., LIMA, A.A., BOZANI, W. (Ed.). **Alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda., p. 79-103, 1983.

LIU, N., WANG, D.L., WANG, Z.Y., HE, X.P. & ZHANG, B.R. Genetic basis of flocculation phenotype conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v. 7, p. 1362–1370, 2007.

MACHADO, M.D., SANTOS, M.S.F., GOUVEIA, C., SOARES, H.M.V.M. & SOARES, E.V. Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: the flocculation as a separation process. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 2107–2115, 2008.

MAGNELLI, P., CIPOLLO, J. F. & ABEIJON, C. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and B-1,6-glucan fine structure. **Analytic. Biochem.**, v. 301, p. 136–150, 2002.

MANNERS, D.J., MASSON, A.J. & PATTERSON, J.C. The structure of a  $\beta(1-3)$ -D-glucan from yeast cell walls. **Biochem. J.**, v. 135, p. 19–30, 1973.



MARTIN, H., DAGKESSAMANSKAIA, A., SATCHANSKA, G., DALLIES, N. & FRANÇOIS, J. *KNR4*, a suppressor of *Saccharomyces cerevisiae* cwh mutants, is involved in the transcriptional control of chitin synthase genes. **Microbiology**, v. 145, p. 249–258, 1999.

MARX, G., MOODY, A. e BERMÚDEZ-AGUIRRE, D. A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication. **Int. J. Food Microbiol.** v.151, p. 327–337, 2011.

MASY, C.L., HENQUINET, A. & MESTDAGH, M.M. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*: inhibition by sugars. **Can. J. Microbiol.**, v. 38, p. 1298–1306, 1992.

MATSUMOTO, T., FUKUDA, H., UEDA, M., TANAKA, A. & KONDO, A. Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the *FLO1p* flocculation functional domain. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 4517–4522, 2002.

MAZÁN, M., MAZÁNOVÁ, K. & FARKÁS, V. Phenotype analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with deletions in Pir cell wall glycoproteins. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, p. 335–342, 2008.

MIKI, B.L.A., POON, N.H., JAMES, A.P. & SELIGY, V.L. Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 150, p. 878–889, 1982a.

MIKI, B.L.A., POON, N.H. & SELIGY, V.L. Repression and induction of flocculation interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 150, p. 890–899, 1982b.

MORAIS, P.B., ROSA, C.A., LINARDI, V.R., PATARO, C. & MAIA, A.B.R.A. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugarcane aguardente. **W. J. Microbiol. and Biotechnol.**, v. 13, n. 2, p. 241-243, 1997.

MORRIS, G.J., WINTERS, L., COULSON, G.E. & CLARKE, K.J. Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 132, p. 2023–2034, 1986.

MUKHERJEE, P.K., CHANDRA, J., KUHN, D.M. & GHANNOUM, M.A. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 4333–4340, 2003.

NEVOIGT, E. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*, **Microbiol. Molec. Biol. Rev.**, Washington, v. 72, n. 3, p. 379–412, 2008.

NISHIHARA, H., TORAYA, T. & FUKUI, S. Flocculation of cell walls of brewers yeast and effects of metal ions, protein denaturants and enzyme treatments. **Arch. Microbiol.**, v. 131, p. 112–115, 1982.

NÚÑEZ, Y.P., CARRASCOSA, A.V., GONZALEZ, R., POLO, M.C., MARTINEZ-RODRÍGUEZ, A. Isolation and characterization of a thermally extracted yeast cell wall fraction potentially useful for improving the foaming properties of sparkling wine. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 7898–7903, 2006.

OGATA, T., IZUMIKAWA, M., KOHNO, K. & SHIBATA, K. Chromosomal location of *Lg-FLO1* in bottom-fermenting yeast and the *FLO5* locus of industrial yeast. **J. Appl. Microbiol.**, v. 105, p. 1186–1198, 2008.

OSUMI, M. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. **Micron**, v. 29, p. 207–233, 1998.

PATARO, C., SANTOS, A., CORREA, S.R., MORAIS, P.B., LINARDI, V.R. & ROSA, C.A. Physiological characterization of yeasts isolated from traditional fermentation in a cachaça distillery. **Rev. Microbiol.**, v. 29, p. 69- 73, 1998.

PATARO, C., GUERRA, J.B., PETRILLO-PEIXOTO, M.L., MENDONÇA-HAGLER, L.C., LINARDI, V.R. & ROSA, C.A. Yeasts communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentations in Brazil. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p. 24-31, 2000.

PENACHO, V., BLONDIN, B., VALERO, E. & GONZALEZ, R. Flocculation and transcriptional adaptation to fermentation conditions in a recombinant wine yeast strain defective for *KNR4/SMI1*. **Biotechnol. Prog.**, v. 28, n. 2, p. 327-336, 2012.

PEUMANS, W. J., BARRE, A., QIANG, H., ROUGÉ, P. & VAN DAMME, E.J.M. Higher plants developed structurally different motifs to recognize foreign glycans. **T. Glycosci. Glycotecnol.**, v. 12, n. 64, p. 83-101, 2000.

POPOLO, L., GILARDELLI, D., BONFARTE, P. & VAI, M. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 463-470, 1997.

POWELL, C.D., QUAIN, D.E. & SMART, K.A. The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. **FEMS Yeast Res.**, v. 3, p. 149–157, 2003.

POWELL, C.D., QUAIN, D.E. & SMART, K.A. The impact of sedimentation on cone yeast heterogeneity. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 62, p. 8–17, 2004.

PROTCHENKO, O., FEREA, T., RASHFORD, J., TIEDEMAN, J., BROWN, P.O., BOTSTEIN, D. & PHILPOTT, C.C. Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol.Chem.**, v. 276, p. 49244–49250, 2001.

RAM, A.F.J., WOLTERS, R., TEN HOOPEN, R. & KLIS, F.M. A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to Calcofluor white. **Yeast**, v. 10, p. 1019–1030, 1994.

RAM, A. F., KAPTEYN, J. C., MONTIJN, R. C., CARO, L. H., DOUWES, J. E., BAGINSKY, W., MAZUR, P., VAN DEN ENDE, H. & KLIS, F. M. Loss of the

plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of  $\beta$ -1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 1418–1424, 1998a.

RAM, A.F.J., VAN DEN ENDE, H. & KLIS, F.M. Green fluorescent protein–cell wall fusion proteins are covalently incorporated into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 162, p. 249–255, 1998b.

RAYNER, J.C. & MUNRO, S. Identification of the *mnn2* and *mnn5* mannosyltransferases required for forming and extending the mannose branches of the outer chain mannans of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 26836–26843, 1998.

REES, D.A. & SCOTT, W.E. Polysaccharide conformation. Part VI. Computer model-building for linear and branched pyranoglycans. Correlations with biological function. Preliminary assessment of inter-residue forces in aqueous solution. Further interpretation of optical rotation in terms of chain conformation. **J. Chem. Soc. (B)**, p. 469–479, 1971.

REYNOLDS, T.B. & FINK, G.R. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. **Science**, v. 291, p. 878–881, 2001.

RODRIGUEZ-PENA, J.M., CID, V.J., ARROYO J. & NOMBELA, C. A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, p. 3245–3255, 2000.

RODRIGUEZ-PENA, J.M., RODRIGUEZ, C., ALVAREZ, A., NOMBELA, C. & ARROYO, J. Mechanisms for targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored cell wall protein Crh2p to polarised growth sites. **J. Cell. Sci.**, v. 115, p. 2549–2558, 2002.

SATO, M., WATARI, J. & SHINOTSUKA, K. Genetic instability in flocculation of bottom-fermenting yeast. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 59, p. 130–134, 2001.

SATO, M., MAEBA, H., WATARI, J. & TAKASHIO, M. Analysis of an inactivated *Lg-FLO1* gene present in bottom-fermenting yeast. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 93, p. 395–398, 2002.

SEONG, K.T., KATAKURA, Y., NINOMIYA, K., BITO, Y., KATAHIRA, S., KONDO, A., UEDA, M. & SHIOYA, S. Effect of flocculation on performance of arming yeast in direct ethanol fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 73, p. 60–66, 2006.

SCHMIDT, S.A., TAN, E.L., BROWN, S., NASUTION, U.L., PETTOLINO, F., MAC-INTYRE, O.J., DE BARROS LOPES, M., WATERS, E.J. & ANDERSON, P.A. Hpf2 glycan structure is critical for protection against protein haze formation in white wine. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 3308–3315, 2009.

SCHWAN, R.F., MENDONÇA, A.T., DA SILVA Jr, J.J., RODRIGUES, V. & WHEALS, A.E. Microbiology and physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, n. 1, p. 89-96, 2001.

SHAW, J.A., MOL, P.C., BOWERS, B., SILVERMAN S.J., VALDIVIESO, M.H., DURÁN, A., CABIB, E. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. **J. Cell. Biol.**, v. 114, p. 111–123, 1991.

SHIMOI, H., SAKAMOTO, K., OKUDA, M., ATTHI, R., IWASHITA, K., ITO, K. The AWA1 gene is required for the foam-forming phenotype and cell surface hydrophobicity of sake yeast. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 2018–2025, 2002.

SILVA, C.L.C. Selection, growth, and chemo-sensory evaluation of flocculent starter culture strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the large-scale production of traditional Brazilian cachaça. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 131, n. 2-3, p. 203-210, 2009.

SMART, K. A., LAWRENCE, S., LECLAIRE, J. & DAVY, S. Brewing Yeast Flocculation: A Model For Onset And Control. 2005. Disponível em: [www.ibdasiapac.com.au/asia-pacific-activities/conventionproceedings/2006/Papers%2520%26%2520Presentations/Smart%2520Katherine%2520Paper.pdf](http://www.ibdasiapac.com.au/asia-pacific-activities/conventionproceedings/2006/Papers%2520%26%2520Presentations/Smart%2520Katherine%2520Paper.pdf).

SMITS, G.J., KAPTEYN, J.C., VAN DEN ENDE, H. & KLIS, F.M. Cell wall dynamics in yeast. **Curr.Opin.Microbiol.**, v. 2, p. 348–352, 1999.

SMUKALLA, S., CALDARA, M., POCHE, N., BEAUVAIS, A., GUADAGNINI, S., YAN, C., VINCES, M. D., JANSEN, A., PREVOST, M. C., LATGÉ, J.-P., FINK, G. R., FOSTER, K. R. & VERSTREPEN, K. J. *FLO1* is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. **Cell**, v. 135 (4), p. 726-737, 2008.

SOARES, E.V., TEIXEIRA, J.A. & MOTA, M. Influence of aeration and glucose concentration in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett.**, v. 13, p. 207–212, 1991.

SOARES, E.V., TEIXEIRA, J.A. & MOTA, M. Effect of cultural and nutritional conditions on the control of flocculation expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Can. J. Microbiol.**, v. 40, p. 851–857, 1994.

SOARES, E.V. & MOTA, M. Flocculation onset, growth phase, and genealogical age in *Saccharomices cerevisiae*. **Can. J. Microbiol.**, v. 42, p. 539–547, 1996.

SOARES, E.V. & MOTA, M. Quantification of yeast flocculation. **J. Inst. Brew.**, v. 103, n. 2, p. 93-98, 1997.

SOARES, E.V. & SEYNAEVE, J. Induction of flocculation of brewer's yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* by changing the calcium concentration and pH of culture medium. **Biotechnol. Lett.**, v. 22, p. 1827–1832, 2000b.

SOARES, E.V., DE CONINCK, G., DUARTE, F. & SOARES, H.M.V.M. Use of *Saccharomyces cerevisiae* for Cu<sup>2+</sup> removal from solution: the advantages of using a flocculent strain. **Biotechnol. Lett.**, v. 24, p. 663–666, 2002.

SOARES, E.V. & DUARTE, A.A. Addition of nutrients induce a fast loss of flocculation in starved cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett.**, v. 24, p. 1957–1960, 2002.

SOARES, E.V. & VROMAN, A. Effect of different starvation conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 95, p. 325–330, 2003.

SOARES, E.V., VROMAN, A., MORTIER, J., RIJSBRACK, K. & MOTA, M. Carbohydrate carbon sources induce loss of flocculation of an ale-brewing yeast strain. **J. Appl. Microbiol.**, v. 96, p. 1117–1123, 2004.

SOARES, E. V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **J. Appl. Microbiol.**, v. 110, n. 1, p. 1-18, 2010.

SOUSA, M.J., TEIXEIRA, J.A. & MOTA, M. Differences in the flocculation mechanism of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett.**, v. 14, p. 213–218, 1992.

SPEERS, R.A., WAN, Y.-Q., JIN, Y. & STEWART, R.J. Effects of fermentation parameters and cell wall properties on yeast flocculation. **J. Inst. Brew.**, v. 112, p. 246–254, 2006.

STANBURY, P.F., WHITAKER, A & HALL, S.J. Principle of Fermentation Technology, 2<sup>a</sup> Ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, RU, 376p, 1999.

STEWART, G.G., & RUSSELL, I. Yeast flocculation, In: POLLOCK. J.R.A. (ed.), Brewing science, Academic Press, New York, NY, v. 2, p. 61–91, 1981.

STEWART, G.G. The Horace Brown Medal lecture: forty years of brewing research. **J. Inst. Brew.**, v. 115, p. 3–29, 2009.

STRATFORD, M. Yeast flocculation: calcium specificity. **Yeast**, v. 5, p. 487–496, 1989.

STRATFORD, M. & ASSINDER, S. Yeast flocculation: *FLO1* and NewFlo phenotypes and receptor structure. **Yeast**, v. 7, p. 559–574, 1991.

STRATFORD, M. Lectin-mediated aggregation of yeasts-yeast flocculation. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.**, v. 10, p. 283-341, 1992a.

STRATFORD, M. Yeast flocculation – a new perspective. **Adv. Microb. Physiol.**, v. 33, p. 1–71, 1992b.

STRATFORD, M. Yeast Flocculation: Receptor Definition by *mnn* Mutants and Concanavalin A. **Yeast**, v 8, p. 635-645, 1992c.

STRATFORD, M. Induction of flocculation in brewing yeasts by change in pH value. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 136, p. 13–18, 1996.

- STRAVER, M.H., AAR, P.C.V.D., SMIT, G. & KIJNE, J.W. Determinants of flocculence of brewer's yeast during fermentation in wort. **Yeast**, v. 9, p. 527–532, 1993.
- STRAVER, M.H. & KIJNE, J.W. A rapid and selective assay for measuring cell surface hydrophobicity of brewer's yeast cells. **Yeast**, v. 12, p. 207–213, 1996.
- STRITTMATTER, A.W., FISCHER, C., KLEINSCHMIDT, M. & BRAUS, G.H. *FLO11* mediated filamentous growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* depends on the expression of the ribosomal RPS26 genes. **Mol. Genet. Genomics**, v. 276, p. 113–125, 2006.
- SUCI, P.A. & TYLER, B.J. A method for discrimination of subpopulations of *Candida albicans* biofilm cells that exhibit relative levels of phenotypic resistance to chlorhexidine. **J. Microbiol. Methods**, v. 53 p. 313–325, 2003.
- TAYLOR, N.W. & ORTON, W.L. Calcium in flocculence of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Inst. Brew.**, v. 81, p. 53–57, 1975.
- TESTE, M.-A., DUQUENNE, M., FRANÇOIS, J.M. & PARROU, J.-L. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Molec. Biol.**, v. 10, n. 99, 2009.
- TEUNISSEN, A.W.R.H. & STEENSMA, H.Y. Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. **Yeast**, v. 11, p. 1001–1013, 1995.
- TOH-E, A., YASUNAGA, S., NISOGI, H., TANAKA, K., OGUCHI, T. & MATSUI, Y. Three yeast genes, PIR1, PIR2 and *PIR3*, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. **Yeast**, v. 9(5), p. 481-94, 1993.
- TOKUNAGA, M., KUSAMICHI, M. & KOIKE, H. Ultrastructure of outermost layer of cell wall in *Candida albicans* observed by rapid-freezing technique. **J. Electron. Microscop.** (Tokyo), v. 35, p. 237–246, 1986.
- UPPULURI, P., PERUMAL, P. & CHAFFIN, L. Analysis of RNA species of various sizes from stationary-phase planktonic yeast cells of *Candida albicans*. **FEMS Yeast Res.**, v. 7, p. 110–117, 2007.
- VAN DER VAART, J.M., CARO, L.H., CHAPMAN, J.W., KLIS, F.M., & VERRIPS, C.T. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 3104–3110, 1995.
- VAN HOLLE, A., MACHADO, M.D. & SOARES, E.V. Flocculation in ale brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*: re-evaluation of the role of the cell surface charge and hydrophobicity. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v., 93, p. 1221-1229, 2012.
- VERSTREPEN, K.J., DERDELINCKX, G., DELVAUX, F.R., WINDERICKX, J., THEVELEIN, J.M., BAUER, F.F. & Pretorius, I.S. Late fermentation expression of *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 59, p. 69–76, 2001.

- VERSTREPEN, K. J. Yeast flocculation: what brewers should know. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 61, n. 3, p. 197-205, 2003.
- VERSTREPEN, K.J., JANSEN A., LEWITTER, F. & FINK, G.R. Intragenic tandem repeats generate functional variability. **Nat. Genet.**, v. 37, p. 986–990, 2005.
- VERSTREPEN, K. J. & KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molec. Microbiol.**, v. 60, n. 1, p. 5-15, 2006.
- VIANNA, C.R., SILVA, C.L., NEVES, M.J. & ROSA, C.A. *Saccharomyces cerevisiae* strains from traditional fermentations of Brazilian cachaça: trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. **Ant. van Leeuw.**, v. 93, n. 1-2, p. 205-217, 2008.
- WANG, J. & CHEN, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Biotechnol. Adv.**, v. 24, p. 427– 451, 2006.
- WANG, F. Z., SHEN, W., RAO, Z.M., FANG, H.Y., ZHAN, X.B. & ZHUGE, J. Construction of a flocculating yeast for fuel ethanol production. **Biotechnol. Lett.**, v. 30, n. 1, p. 97-102, 2008.
- WARD, O, P. Biotecnologia de la fermentacion. Zaragoza – Espanha: Editorial ACRIBIA, S. A., 274p, 1991.
- WATARI, J., TAKATA, Y., OGAWA, M., MURAKAMI, J. & KOSHINO, S. Breeding of flocculent industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains by introducing the flocculation gene *FLO1*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 55, p. 1547-1552, 1991.
- WATARI, J., NOMURA, M., SAHARA, H., KOSHINO, S. & KERÄNEN, S. Construction of flocculent brewer's yeast by chromosomal integration of the yeast flocculation gene *FLO1*. **J. Ins. Brew.**, v. 100, p. 73-77, 1994.
- WEIG, M., JANSCH, L., GROSS, U., DE KOSTER, C.G., KLIS, F.M. & DE GROOT, P.W.J. Systematic identification in silico of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein–polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*. **Microbiology**, v. 150, p. 3129–3144, 2004.
- WERNER-WASHBURNE, M., BRAUN, E., JOHNSTON, G. C. & SINGER, R. A. A stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Rev.**, v. 57, p. 383-401, 1993.
- WILCOX, L.J., BALDERES, D.A., WHARTON, B, TINKELBERG, A.H., RAO, G. & STURLEY, S.L. Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. **J. Biol.Chem.**, v. 277, p. 32466–32472, 2002.
- YIN, Q.Y., DE GROOT, P.W.J., DEKKER, H.L., DE JONG, L., KLIS, F.M. & DE KOSTER, C.G. Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 20894–20901, 2005.

YOSHIDA, Y., NAITO, E., MIZUKOSHI, H., WATANABE, Y., KIMURA, K., YOKOI, W., SATO, T., OKUMURA, T., ITO, M. & SAWADA, H. Side-chain structure of cell surface polysaccharide, mannan, affects hypocholesterolemic activity of yeast. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 8003–8009, 2009.

YUN, D.J., ZHAO, Y., PARDO, J.M., NARASIMHAN, M.L., DAMSZ, B., LEE, H., ABAD, L.R., D'URZO, M.P., HASEGAWA, P.M. & BRESSAN, R.A. Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 94, p. 7082–7087, 1997.

ZHANG, M., LIANG, Y., ZHANG, X., XU, Y., DAI, H., & XIAO, W. Deletion of Yeast CWP Genes Enhances Cell Permeability to Genotoxic Agents. **Toxicol. Sci.**, v. 103, p. 68-76, 2008.

ZLOTNIK, H., FERNANDEZ, M.P., BOWERS, B. & CABIB, E. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. **J. Bacteriol.**, v. 159, p. 1018–1026, 1984.