

Seleção genética e molecular de leveduras para vinificação

Cláudio Luiz Messias

A seleção de linhagens de leveduras para os processos fermentativos na vinificação é objetivo de vários laboratórios do mundo inteiro envolvidos na produção de vinhos ou em estudos da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A seleção pode ser feita diretamente, no vinhedo, no mosto ou no ambiente da cantina, pois a grande variabilidade genética é apresentada por este microrganismo, a *Saccharomyces cerevisiae*, permitindo este tipo de procedimento. Ainda pode ser dito que o melhor vinho é feito no vinhedo, onde tem-se a combinação da qualidade da uva e dos microrganismos contaminantes. Uma boa levedura pode vir da população selvagem, mas muitas são as características que se espera de uma levedura na vinificação e provavelmente nem todas acompanham a linhagem indígena. Entre estas características podemos relacionar aquelas relacionadas com as propriedades fermentativas, ao aroma, ao processo de produção e ao metabolismo específico para certas substâncias como baixa formação de sulfetos, amina e etil carbamato. Quanto às propriedades fermentativas podemos listar: alta eficiência fermentativa, rápida partida da fermentação, alta tolerância ao etanol, alta tolerância osmótica, desenvolvimento à baixa temperatura e aceitável produção de biomassa. Características relacionadas ao aroma, baixa produção de acidez volátil, elevada produção de álcool, liberação de precursores de aromas como o glicosilatos, alta produção de glicerol, ação hidrolítica, autólises, atividade esterásica e baixa produção de sulfetos/DMS/tiol. Quanto às propriedades tecnológicas a estabilidade genética e fundamental, tolerância a sulfetos, baixa formação de espumas, propriedade floculante, sedimentação, resistência à dessecação, propriedade Killer, baixa demanda de nitrogênio, atividade proteolítica. No entanto a manutenção destas linhagens em laboratório gerações após gerações é o grande problema, pois sabe-se que na descendência de um excelente isolado, não estará garantida a reprodutibilidade do mesmo resultado, além do que muitas destas características são quantitativas e dependem da expressão de vários genes, além de fatores epigenéticos. A distribuição de *S. cerevisiae* na uva é bastante irregular. Assim, pode ser encontrada nas bagas, nas folhas, menos freqüentemente nas flores. Nas bagas esta população indígena aumenta quando da maturação das uvas pela presença de exudado, que pode conter de 10^3 a 10^5 células de leveduras e este número dependerá das condições de clima, dos tratamentos fitossanitários, e de maneira ampla com o manejo do vinhedo. Por outro lado *S. cerevisiae*, não está sozinha e uma série de outros gêneros e espécies acompanham-na do vinhedo até a fermentação na cantina. Entre estas podemos citar gêneros como *Kloeckera*, *Haneniaspora*, *Candida*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Kluveromyces*, *Pichia*, *Hansenula* e *Rhodotorulla*. Se por um lado estas podem ser consideradas nefastas, podem representar uma fonte de genes importantes para serem utilizados em programas específicos usando-se a transferência de genes por metodologias da biologia e genética molecular. Ainda quando falamos em genética de leveduras para a vinificação, também devemos considerar: a vinificação se em tinto ou em branco ou ainda especialmente na produção de espumantes, pois estes constituem ambientes diferentes cuja expressão fenotípica esperada depende da relação biótica/abiótica, diferenciada para estes três casos. Vale ainda ressaltar as condições sanitárias da cantina que vão demandar procedimentos especiais para tratamento do mosto, dependendo das condições de recebimento da matéria-prima. Assim, o que se busca no melhoramento e seleção é a expressão fenotípica mais apropriada para cada caso e necessidades.

A manipulação genética de *S. cerevisiae* é facilitada pela ocorrência de linhagens haplóides, velocidade de crescimento, e ainda por apresentar reprodução vegetativa por brotamento com a ocorrência de mitoses, e reprodução sexual (meiose), com a formação de asco com 4 ascósporos haplóides, e ainda ao pequeno genoma. O núcleo haplóide tem 14.000 kb, distribuídos em 16 grupos de ligação ou cromossomos, com 200 a 2000 kb, com aproximadamente 6000 genes codificantes para proteínas já seqüenciados.

O genoma de *S. cerevisiae* contém transposons, especificamente o chamado Ty (transposon yeast). Este elemento transponível codifica para um retrovirus não infeccioso, que apresenta uma transcriptase reversa capaz de copiar RNA para DNA; desta forma podendo ser utilizado para inserir na seqüência de DNA novas seqüências modificando genes e contribuindo com a evolução da espécie. Também há a ocorrência de um plasmídeo chamado de 2 μ m, identificado no núcleo. Este plasmídeo é uma molécula de DNA circular, contendo 6 kb podendo ocorrer de 50 a 100 cópias por célula, sua função não é conhecida, mas tem sido utilizado como ferramenta molecular na construção de plasmídios artificiais para transformar geneticamente linhagens de leveduras. Ainda como herança extracromossômica tem-se as mitocôndrias, que possuindo seu genoma próprio codificando para muitas proteínas envolvidas na fosforilização oxidativa, uma ribossomal, e para rRNAs e tRNAs, necessários para a transcrição. No entanto uma vasta quantidade de proteínas são sintetizadas a partir de informações de genes nucleares e importadas para elas pelo citoplasma. Verifica-se assim uma dependência nuclear para sua expressão.

Vários são os métodos que podem ser utilizados, mas o grau de ploidia deve ser considerado, uma vez que podem contribuir na escolha para métodos clássicos, Mendelianos, como análise de ascos não ordenados, ou técnicas da biologia molecular. Linhagens de laboratório são na maioria das vezes haplóides ou diplóides, enquanto que linhagens industriais são predominantemente diplóides, aneuplóides ou poliplóides. Assim podem ser trabalhadas em muitas e variadas maneiras, como seleção massal de variantes, indução de mutação e seleção, hibridização, fusão de protoplastos, clonagem de genes e transformação. Neste particular, por muitos anos vem se buscando a construção de leveduras por métodos da biologia molecular, chamado de engenharia genética, e tem sido obtido com sucesso linhagens OGMs, melhoradas quanto a aromas primários e secundários, sobrevivência sobre condições especiais requerida pela tecnologia da fermentação. Tendo-se as considerações anteriores vamos apresentar algumas formas para condução de seleção e melhoramento de leveduras *S. cerevisiae*, para vinificação.

Em muitas oportunidades não é o caso do melhoramento da levedura mas a possibilidade da não ocorrência de contaminantes microbianos que podem danificar a qualidade sensorial. Entre estes temos os gêneros: *Brettanomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Zigosaccharomyces* e *Kluyveromyces*. Outros ainda competem no consumo de substrato, assim tem-se os gêneros por exemplo: *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia* e *Pichia*. Assim o ambiente onde vai existir uma linhagem de *S. cerevisiae*, selecionada, terá a influência destas variáveis bióticas, onde não somente tem-se leveduras mas também bactérias.

Com algumas técnicas básicas, como a mutação e seleção, identificação dos produtos, cruzamentos quer por meios de reprodução sexuada ou por fusão de esferoplasto, obtém-se recombinantes que são novamente submetidos a um processo de seleção. Este é um meio rápido que também apresenta resultados. A mutação pode ser espontânea, ocorrendo numa freqüência de 10^{-6} ou induzida por agentes mutagênicos físicos, como a luz ultravioleta (UV-C), um agente não ionizante, que causa mutações pontuais, pela substituição de bases nitrogênadas não introduzindo quebras cromossômicas como as ionizantes, os raios X e as radiações gama. Podem ser utilizados também agentes químicos nesta indução de mutação, entre estes tem-se: ácido nitroso, etil-metano-sulfonato (EMS), dietil sulfeto, 1-metil-nitrosoguanidina. De forma geral ambos os físicos e químicos aumentam a freqüência de mutantes, chegando a 5.10^{-4} a

1.10^{-2} por gene, empregando-se estas técnicas podem ser obtidos com sucesso os mais diferentes tipos de mutantes, incluindo-se os auxotróficos, que apresentam deficiências biossintéticas, e assim influenciam vias biossintéticas, e têm sido utilizados para identificação de várias vias metabólicas. Em todos os casos têm-se a necessidade de um meio para seleção. Assim, se partimos de linhagens selvagens, estas normalmente prototróficas, homotáticas e heterozigotas. Empregando-se mutação e seleção, pode-se obter por exemplo mutantes eficientes na fermentação de maltose, em presença de glicose. A técnica de hibridização está um pouco ultrapassada, e assim a fusão de esferoplastos supera, pois permite a fusão de mesma espécie assim como de espécies diferentes e entre gêneros. É uma técnica assexual, não necessitando do requerimento de mating type, produzirá híbridos. Pela fusão de esferoplastos, podemos ter a introdução de elementos genéticos citoplasmáticos sem a transferência de genes nucleares. Este método é chamado de citoindução, e utiliza linhagens haplóides portadoras da mutação *kar1*. Esta mutação impede a cariogamia ou fusão nuclear. Por esta técnica pode-se estudar a herança presente em um simples cromossomo, pois algumas vezes uma das linhagens pode carregar um cromossomo adicional de um dos pais durante o cruzamento.

Outras técnicas oriundas da biologia molecular, são extremamente importantes para a seleção e melhoramento de leveduras para vinificação, entre estas têm-se a clonagem e a transformação. Estas técnicas permitem a manipulação de genes específicos, sem afetar o restante do genoma. Assim, genes de leveduras ou de outros organismos podem ser inseridos no genoma em estudo. Esta técnica da inclusão de genes requer uma série de elementos, para carrear o DNA que se deseja introduzir no núcleo da célula hospedeira. Assim, há a necessidade de vetores de DNA. Estes podem ser constituídos por plasmídios do tipo integrativo como o Yip (Yeast integrative plasmid), Plasmídios com replicação autônoma: YRp (Yeast Replicating Plasmid), YEP (Yeast Episomal Plasmid) YCp (Yeast Centromeric Plasmid), ou ainda plasmídios especializados como: YLp (Yeast linear Plasmid) YAC (Yeast Artificial chromosome) YXp (Yeast Expression Plasmid) e YDp (Yeast Disintegration Plasmid). Estes plasmídios conterão o fragmento de DNA de origem do genoma, de cDNA, de produto de PCR ou ainda de síntese. Para que possam ser reconhecidos no interior do novo hospedeiro, há necessidade de marcas, e entre estas as marcas recessivas mais utilizadas são: *HIS3*, *LEU2*, *LYS2*, *TRP1*, *URA3* e *ADE2*. Estes, após serem ligados ao vetor, são utilizados para transformar a célula hospedeira. Várias técnicas são utilizadas para a introdução destes plasmídios, na célula hospedeira feita esferoplasto, assim podem ser utilizados: acetato de lítio, que produz poros na célula facilitando a aquisição do DNA exógeno, a eletroporação que leva a formação de poros pela transformação de cargas da superfície da membrana ficando permeáveis a macromoléculas e moléculas, fazendo com que o DNA exógeno entre para a célula, e ainda a Biolística (Biologia e Balística) onde o DNA a ser inserido recobre micro-projéteis de tungstênio e são atirados em máquinas de pressão a alta velocidade sobre as células. Este DNA exógeno agora poderá se recombinar com o DNA hospedeiro dando origem a segregantes onde as características desejáveis são então obtidas. Assim, genes importantes podem ser transferidos por esta técnica para diferentes hospedeiros, gerando novas linhagens com diferente expressão. Por estas técnicas podemos obter melhoramento para aroma e outras qualidades sensoriais como a liberação de terpenóides. Quando o gene da β -1,4-glicosidase (*BGL1*) *Trichoderma longibrachiatum* foi expresso na levedura a intensidade de aroma foi aumentado, provavelmente devido à hidrólise de um precursor. O glicerol por suas características químicas não tem impacto no aroma, no entanto tem um valor na qualidade sensorial, pois apresenta um sabor levemente doce, viscosidade, contribuindo assim com a maciez e dando corpo ao vinho. Pela manipulação de 2 genes *ALD6* e *ALD7*, a super expressão de *ALD6* produziu três vezes mais glicerol em relação à linhagem não transformada.

Assim, existem inúmeras possibilidades para a seleção e melhoramento de leveduras para vinificação. Se por um lado podemos construir novas combinações por metodologias da genética clássica, por outro mais rápido aqueles utilizando-se a biologia molecular, (Organismos geneticamente modificados) OGMs ainda dependem de regulamentações para que possamos levar estas leveduras geneticamente modificadas por mecanismos do DNA recombinante, para as fermentações.