

Comportamento celular e resposta antioxidante diferenciados de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Saccharomyces chevalieri* ao metavanadato de amónio

Different cellular behaviour and antioxidant response of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces chevalieri* growing in presence of ammonium metavanadate

R. Ferreira¹, I. Alves-Pereira^{1,2}, S. Magriço², C. Ferraz-Franco²

RESUMO

A fermentação do vinho é um processo microbiológico complexo que requiere a presença de leveduras adaptadas a condições de stresse. No ambiente celular de organismos aeróbios ocorrem naturalmente espécies reactivas de oxigénio (ROS) como subprodutos da respiração mitocondrial. A elevada reactividade destas espécies químicas pode gerar danos moleculares que, em alguns casos, levam à morte celular. Em condições fisiológicas normais ou como resposta ao stresse oxidativo, a célula pode desencadear respostas adaptativas que envolvem mecanismos antioxidantes como os enzimas glutationo redutase (GR; EC 1.6.4.2) e catalases T (CAT T; EC 1.11.1.6) e A (CAT A; EC 1.11.1.6).

O vanádio, um metal pesado presente em alguns fitofármacos, pode também comportar-se como um gerador de ROS, alterando o estado redox intracelular e exercendo efeitos nocivos em leveduras expostas a quantidade excessiva deste elemento. O principal objectivo deste trabalho foi

comparar o efeito do metavanadato de amónio (NH_4VO_3), um sal pentavalente de vanádio, na viabilidade celular e nas actividades enzimáticas GR, CAT T e CAT A das leveduras vínicas *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME3 e *Saccharomyces chevalieri* UE-ME1.

Os resultados obtidos mostram que *S. chevalieri* UE-ME1 revelou menor tolerância ao NH_4VO_3 do que *S. cerevisiae* UE-ME3, uma vez que culturas de *S. chevalieri* não sobreviveram para valores de concentração do sal de vanádio superiores a 7,5 mM enquanto que células de *S. cerevisiae* mantiveram-se viáveis em presença de metavanadato de amónio 75 mM. As actividades enzimáticas estudadas apresentaram em *S. chevalieri* valores muito inferiores aos que foram determinados em *S. cerevisiae* embora em ambas as espécies de levedura o NH_4VO_3 pareça comportar-se como um indutor de stresse oxidativo ao provocar um decréscimo significativo da actividade GR ($P < 0,01$) e um aumento significativo da actividade CAT A ($P < 0,01$). Observou-se, ainda, nas duas espécies de

¹ Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas (ICAM), Universidade de Évora, Apartado 94, 7002-554 Évora; e-mail: raf@uevora.pt; ² Departamento de Química, Universidade de Évora,

levedura, um aumento da actividade enzimática CAT T, tida como resposta adaptativa protectora ao stresse oxidativo. O comportamento diferenciado de adaptação à presença de metavanadato de amónio pelas duas espécies de *Saccharomyces* pode ser parcialmente justificado pela presença de sistemas antioxidantes mais eficientes em *S. cerevisiae* UE-ME3.

ABSTRACT

The fermentation of wine is a complex microbiological process which requires yeast adaptation to stress conditions. In the cellular environment of aerobic organisms naturally reactive oxygen species (ROS) occurs as by-products of mitochondrial respiration. The higher reactivity of these chemical species could cause molecular damages that in several cases induce cellular death. In common physiological conditions or as response to oxidative stress, the cell can generate adapted responses which involve antioxidants mechanisms as glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) and catalase T (CAT T; EC 1.11.1.6) and A (CAT A; EC 1.11.1.6)zymes.

Vanadium, a heavy metal present in several pesticides could generate ROS changing the intracellular redox state and cause deleterious effects in yeasts exposed to higher levels of this element. The main objective of this work was to compare the effects of ammonium metavanadate (NH_4VO_3), a pentavalent salt of vanadium on cellular viability and GR, CAT T and CAT A activities of wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME3 and *Saccharomyces chevalieri* UE-ME1.

The results obtained show that *S. chevalieri* UE-ME1 has lower tolerance to NH_4VO_3 than *S. cerevisiae* UE-ME3, since *S. chevalieri* cultures do not survive to con-

centration values of ammonium metavanadate higher than 7,5 mM, whereas *S. cerevisiae* cells are still viable in the presence of 75 mM. *S. chevalieri* has an enzymatic activity lower than *S. cerevisiae*, although for both yeast species NH_4VO_3 could behave as oxidative stress inductor, causing a significant decrease of GR activity ($P < 0,01$) and a significant increase of CAT A activity ($P < 0,01$). The results show also an increase of CAT T activity in both yeast species, which can be interpreted as a protective response to oxidative stress. Differences on response to ammonium metavanadate by both species of *Saccharomyces* could be partially justified by more efficient antioxidant systems in *S. cerevisiae* UE-ME3.

INTRODUÇÃO

As leveduras têm sido utilizadas pelo homem no fabrico de variados produtos alimentares, como o vinho, a cerveja, o pão e os iogurtes, devido à sua particular capacidade para a fermentação de glúcidos (Frazier, 1972). O primeiro registo que referencia a sua utilização no fabrico de alimentos data de 6000 A.C., onde é descrito o procedimento para o fabrico de cerveja na antiga Babilónia (Barnett, 1998).

Apesar de as leveduras serem indispensáveis na indústria alimentar, a sua importância actual expande-se para além dessas aplicações. As leveduras, organismos eucariotas muito simples, podem também ser utilizados como modelos celulares no estudo de diversas funções da célula, como por exemplo, vias metabólicas e seus aspectos reguladores ao nível da expressão genética ou após a tradução (Lima & Mota, 2003; Grant, 2001; Costa & Moradas-Ferreira, 2001; Cooper, 2000 e Buschini *et al.*, 2003).

As semelhanças funcionais e estruturais entre as células de levedura e de mamífe-

ros, aliadas à facilidade de manipulação genética destes microrganismos, tem levado a que as leveduras sejam amplamente utilizadas como modelos celulares em estudos toxicológicos, no estabelecimento de diagnósticos de toxicidade de variados produtos de natureza antropogénica, como os fitofármacos, os resíduos da indústria química ou compostos de origem natural (Lima & Mota, 2003).

Entre as diversas espécies de levedura utilizadas na produção do vinho, inicialmente isoladas a partir de processos naturais e espontâneos de fermentação, elegemos para este estudo *Saccharomyces chevalieri* UE-ME1, totalmente adaptada ao ambiente enológico da fase inicial do processo fermentativo (Rossignol *et al.*, 2003, Bataillon *et al.*, 1996) e *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME3 com propriedades fisiológicas específicas e únicas que lhe facilitam a sobrevivência em ambientes extremos onde ocorrem níveis elevados de glúcidos (140-160 g/L), teor alcoólico elevado (superior a 15% (v/v)), pH ácido (3,0-3,5) e baixo teor em azoto, lípidos e vitaminas, condições estas observadas nos mostos (Carrasco *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 2000). Contudo, as características moleculares responsáveis pela resposta fisiológica diferenciada destas duas espécies de levedura e que lhes permite manter a fermentação contínua do mosto das uvas até ao produto final vínico, não estão totalmente esclarecidas.

Em qualquer organismo aeróbio eucariota, as espécies reactivas de oxigénio (ROS) ocorrem naturalmente no ambiente celular como subprodutos da respiração mitocondrial (Carmel-Harel *et al.*, 2001 e Grant *et al.*, 1997). Devido à elevada reactividade que estas espécies químicas exibem podem provocar elevados danos celulares como a oxidação de proteínas, a inactivação enzimática, a peroxidação lipídica e mutações

ao nível do DNA que, em situações extremas, podem levar à morte celular (Grant, 2001; Costa & Moradas-Ferreira, 2001; Cabisco *et al.*, 2000 e Jamieson, 1998). Em condições fisiológicas normais, a célula consegue evitar os danos provocados pelas ROS recorrendo à acção de vários sistemas e mecanismos de defesa antioxidantes como os enzimas GR, CAT T e CAT A (Jamieson, 1998; Davidson *et al.*, 1996; Lapinskas *et al.*, 1993). No entanto, esse tipo de resposta, característico de cada espécie, pode ser perturbado quando as células são expostas a condições de stresse como a presença de metais pesados, agentes antioxidantes e xenobióticos. A imposição deste tipo de condições extremas leva à produção excessiva de ROS que, ao serem detectadas pela célula, induzem respostas descritas na literatura como repostas secundárias ao stresse oxidativo, e que em muitos casos permitem a sobrevivência da população (Franca *et al.*, 2005; Lushchak & Gospodaryov, 2005; Scandalios, 2005; Dumond *et al.*, 2000; Costa e Moradas-Ferreira, 2001; Lee *et al.*, 1999).

O vanádio, um metal pesado com distribuição ubíqua na natureza, ocorre naturalmente em quantidades traço na crosta terrestre. No entanto, a sua concentração ambiental tem vindo a aumentar devido à sua utilização em fitofármacos e na indústria do aço. Alguns autores admitem que o vanádio, em particular no estado pentavalente como aquele que ocorre no metavanadato de amónio, pode comportar-se como gerador de ROS com alteração do estado redox intracelular (Barceloux, 1999; Huang *et al.*, 2000).

Neste trabalho houve a preocupação de comparar a resposta de duas espécies de *Saccharomyces* que participam em estágios diferentes da vinificação ao vanádio. Deste modo pretendemos avaliar a capacidade adaptativa de cada uma das espécies ao

stresse oxidativo induzido por um metal pesado, em termos de sobrevivência da população e das actividades enzimáticas anti-oxidantes GR (EC 1.6.4.2), CAT T (EC 1.11.1.6) e CAT A (EC 1.11.1.6).

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e meios de cultura

O trabalho aqui descrito utilizou como modelos celulares as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME3 e *Saccharomyces chevalieri* UE-ME1, estirpes vinícolas da colecção de leveduras do Laboratório de Enologia da Universidade de Évora. Estas foram mantidas em meio YEPD sólido (glucose 2% (p/v); extracto de levedura 1% (p/v); peptona 2% (p/v); agar 2% (p/v)) à temperatura de 4 °C. Nos ensaios realizados as células de levedura cresceram em meio mineral líquido (solução base; solução de vitaminas 0,05% (v/v); solução A de oligoelementos 0,05% (v/v); solução B de oligoelementos 0,05% (v/v); solução de glucose 2% (v/v)) ou sólido com a adição de agar 2% (p/v), tal como descrito previamente (van Uden, 1967).

Tratamento com metavanadato de amónio

Células de levedura na fase exponencial de crescimento ($ABS_{640}=0,7$) foram recolhidas e colocadas a crescer em meio mineral líquido (van Uden, 1967) contendo 0; 0,25; 0,75; 2,5; 7,5; 15; 25; 75; 150 ou 200 mM de metavanadato de amónio, à temperatura controlada de 28 °C durante 200 min. Na determinação da viabilidade celular foram recolhidas amostras no tempo 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150 e ao final de 200 min de crescimento em presença de metavanadato de amónio. A viabilidade celular foi determinada pela

contagem de unidades formadoras de colónias (ufc) após inoculação e crescimento durante 48 horas a 28 °C em placas de meio YEPD sólido. As curvas dose resposta foram construídas pela representação da % de ufc em meio YEPD sólido, correspondendo 100% ao número de ufc presentes no tempo zero. Células de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME3 e de *Saccharomyces chevalieri* UE-ME1 na fase exponencial de crescimento foram recolhidas e colocadas a crescer em meio mineral sólido (van Uden, 1967) contendo 0; 25; 75 mM e 0; 0,25; 0,75; 2,5; 7,5 mM de metavanadato de amónio, respectivamente, à temperatura controlada de 28 °C durante 72 h e posteriormente utilizadas na determinação das actividades enzimáticas.

Ensaio enzimáticos

Após o tratamento com metavanadato de amónio, as células de levedura foram recolhidas e lavadas três vezes com água ultrapura e por centrifugação a 800 g, durante 10 min. A lise celular foi realizada através de agitação vigorosa com esferas de vidro. Os homogeneizados celulares foram posteriormente submetidos a centrifugação diferencial a 3000 e a 12000 g. Tanto o sobrenadante como o sedimento dos 12000 g foram utilizados como fracções celulares. No sedimento determinou-se a actividade CAT A ou peroxissomal, enquanto que no sobrenadante foram determinadas as actividades CAT T ou pós-peroxissomal e GR. A concentração de proteína foi determinada de acordo com Lowry (1951) utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão na construção da curva de calibração. Todas as actividades enzimáticas foram determinadas em 1 mL de mistura reaccional, por espectrometria de absorção molecular com temperatura controlada a 25 °C por banho com circulação de água. A

actividade GR foi determinada de acordo com o método de Golberg & Spooner (1987) numa mistura contendo tampão fosfato 0,12 M, pH 7,2; EDTA 15 mM; disulfureto de glutationo 63,5 mM e extracto celular em quantidade adequada, por forma a assegurar a linearidade da reacção durante 10 min. A reacção foi iniciada com NADPH 9.6 mM cuja oxidação foi registada a 340 nm durante 120 s. As actividades CAT foram determinadas de acordo com Tran *et al.*, (1995) numa mistura contendo tampão fosfato 100 mM, pH 7.0 e H₂O₂ 220 mM cuja decomposição foi registada a 240 nm durante 120 s após a reacção iniciada com as fracções celulares na diluição adequada.

Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos com as culturas de levedura foram submetidos à análise de variância simples (ANOVA I) e ao teste de

significância de Duncan (Sokal & Rohlf, 1997), recorrendo ao programa SPSS 13.1 licenciado para a Universidade de Évora.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostram que após 200 min de crescimento em presença de metavanadato de amónio na concentrações de 25 mM e de 75 mM do sal a cultura de *S. cerevisiae* UE-ME3 apresentava 19% e 12% de células vivas respectivamente, enquanto que para uma concentração de NH₄VO₃ 10 vezes inferior, 7,5 mM, a cultura de *S. chevalieri* UE-ME1 apresentava apenas 5% de células vivas, não sendo detectadas células viáveis para valores de concentração superior (Figura 1).

Os estudos enzimáticos realizados permitiram detectar em *S. cerevisiae* UE-ME3 crescidas na ausência de metavanadato de amónio as actividades CAT A da fracção

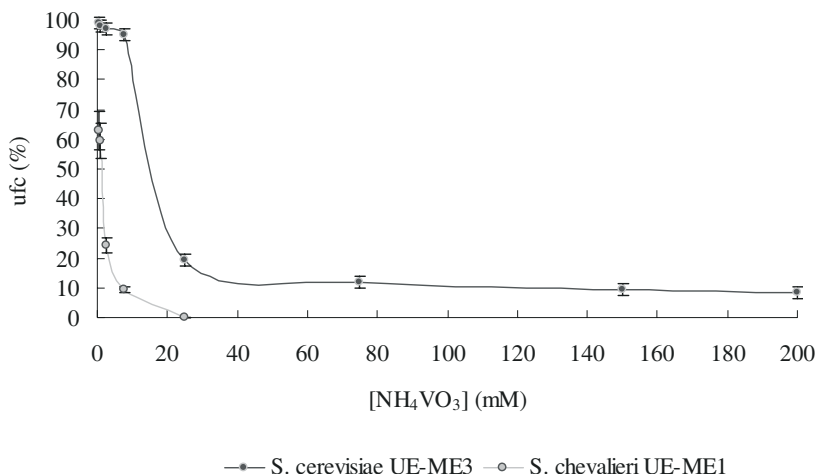


Figura 1 - Avaliação da resposta ao NH₄VO₃ pelas leveduras vnicas *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME3 e *Saccharomyces chevalieri* UE-ME1 crescidas durante 200 min em meio líquido mineral enriquecido contendo NH₄VO₃ num intervalo de 0 a 200 mM. Cada ponto representa a média de três réplicas ± desvio-padrão

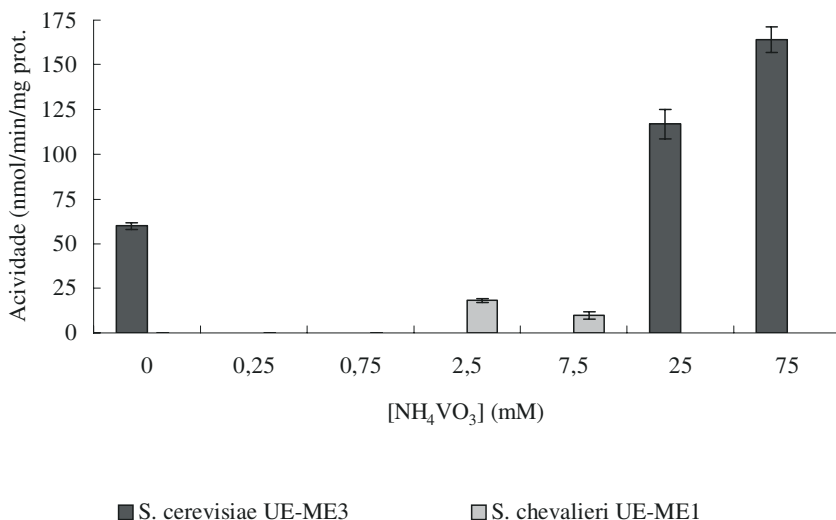


Figura 2 - Influência do NH_4VO_3 sobre a actividade CAT A (A) das fracções celulares de leveduras vínicas. Cada ponto representa a média aritmética \pm desvio-padrão de 5 réplicas (letras diferentes indicam que os resultados são significativamente diferentes para $P < 0,01$)

peroxissomal (59,98 nmol/min/mg proteína) (Figura 2), CAT T da fracção pós-peroxissomal (109,98 nmol/min/mg proteína) (Figura 3) e GR da fracção pós-peroxissomal (114,84 nmol/min/mg proteína) (Figura 4). No entanto, em *S. chevalieri* UE-ME1, apenas a actividade GR (1,48 nmol/min/mg proteína) foi detectada na ausência de NH_4VO_3 e numa quantidade 100 vezes inferior à detectada para *S. cerevisiae* (Figuras 2, 3 e 4).

A partir da Figura 2 podemos observar um aumento significativo ($P < 0,01$) da actividade CAT A de *S. cerevisiae* UE-ME3 crescidas em meios de cultura com concentração elevada de metavanadato de amónio, nomeadamente 25 e 75 mM. Contudo não conseguimos detectar a referida actividade enzimática em células da levedura *S. chevalieri* UE-ME1 crescidas em meio mineral sólido quando o sal de vanádio estava presente na concentração de 0,25 e 0,75 mM, sendo no entanto detectada a indução desta

actividade nas fracções peroxissomais de células de levedura crescidas na presença de 2,5 e 7,5 mM de metavanadato de amónio, onde o valor significativamente mais elevado ($P < 0,01$), 17,9 nmol/min/mg proteína, foi determinado para a concentração de 2,5 mM.

A Figura 3 mostra-nos que em *S. cerevisiae* UE-ME3 o metavanadato de amónio apenas provocou um aumento significativo ($P < 0,01$) da actividade enzimática CAT T em células crescidas em presença de 25 mM desse sal. Em *S. chevalieri* UE-ME1 não foi possível detectar esta actividade catalítica na fracção pós-peroxissomal obtida a partir de células da levedura crescidas na presença de 0,25 mM de metavanadato de amónio, observando-se, no entanto, uma indução da actividade CAT T quando a concentração de NH_4VO_3 no meio de cultura era superior a 0,75 mM, apresentando um máximo de 21,2 nmol/min/mg proteína para a concentração de 2,5 mM.

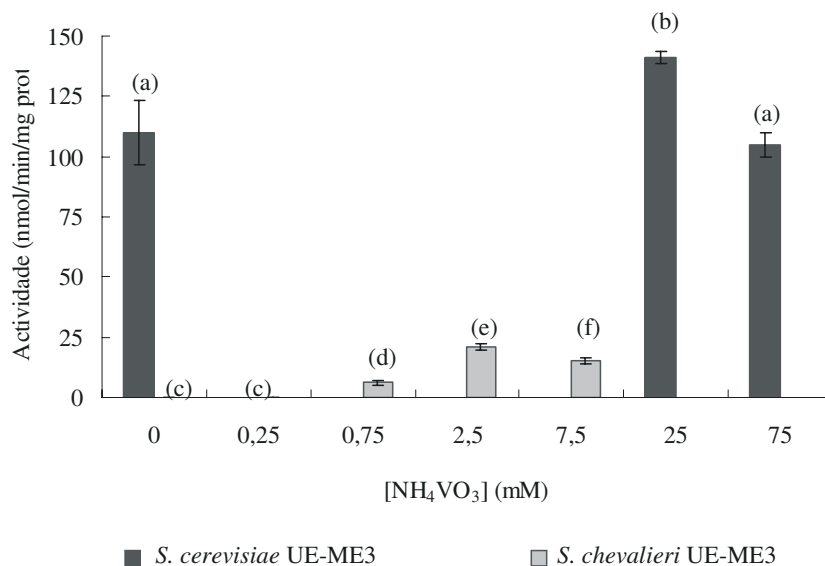


Figura 3 - Influência do NH₄VO₃ sobre a actividade CAT T (B) das fracções celulares de leveduras vínicas. Cada ponto representa a média aritmética ± desvio-padrão de 5 réplicas (letras diferentes indicam que os resultados são significativamente diferentes para P < 0,01)

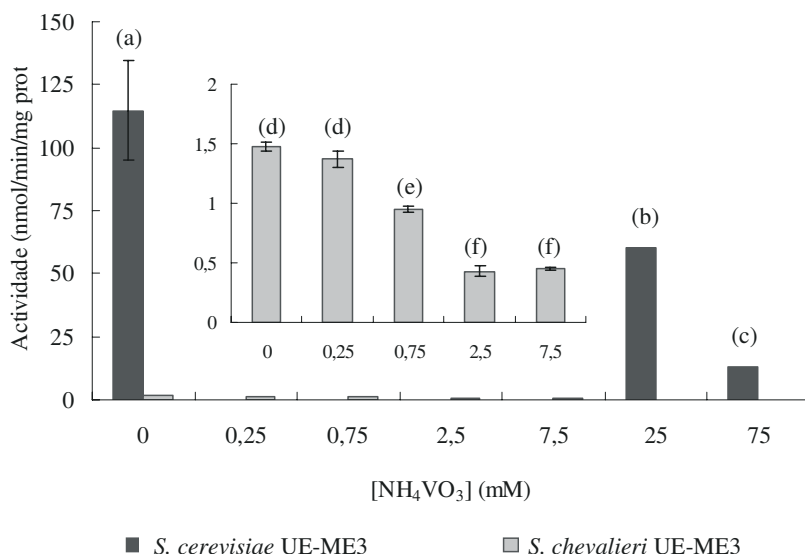


Figura 4 - Influência do NH₄VO₃ sobre a actividade GR das fracções celulares de leveduras vínicas. Cada ponto representa a média aritmética ± desvio-padrão de 5 réplicas (letras diferentes indicam que os resultados são significativamente diferentes para P < 0,01)

A Figura 4 mostra-nos um decréscimo significativo da actividade glutatióno redutase da fracção pós-peroxissomal ($P < 0,01$) em ambas as espécies de levedura para a concentração no meio de cultura igual ou superior a 25 mM em *S. cerevisiae* UE-ME3 e superior a 0,25 mM em *S. chevalieri* UE-ME1.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram que a tolerância ao metavanadato de amónio no meio de cultura pelas espécies vnicas de levedura *S. cerevisiae* UE-ME3 e *S. chevalieri* UE-ME1 é distinto e dependente da concentração do sal de vanádio no meio de crescimento. Enquanto que *S. cerevisiae* UE-ME3 após 200 min de crescimento em presença do metavanadato de amónio, na concentração de 25 mM e 75 mM, apresentava 19% e 12% de células vivas, respectivamente, a levedura *S. chevalieri* UE-ME1 apresentava apenas 5% de células vivas para uma concentração de NH_4VO_3 10 vezes inferior, 7,5 mM, não sobrevivendo para valores de concentração superior. Este tipo de resposta levou-nos a seleccionar para os ensaios enzimáticos os valores de concentração de metavanadato de amónio mais elevados e entre eles os que apresentavam maior percentagem de sobrevivência, nomeadamente, 25 e 75 mM para *S. cerevisiae* UE-ME3 e 0,25; 0,75; 2,5 e 7,5 mM para *S. chevalieri* UE-ME1. Considerando que o vanádio numa concentração intracelular da ordem de grandeza acima do micromolar torna-se tóxico para a maior parte dos organismos (Grant, 2001; Costa & Moradas Ferreira, 2001; Cabiscol *et al.*, 2000), admitimos que a espécie *S. cerevisiae* UE-ME3 poderá ser um importante modelo biológico que contribua para a compreensão adequada dos efeitos tóxicos

do vanádio nos organismos vivos. Por outro lado a baixa tolerância ao vanádio pela espécie *S. chevalieri* UE-ME1 assume elevada importância como termo de comparação com *S. cerevisiae* UE-ME3 na resposta ao stresse induzido por metais pesados.

O decréscimo significativo da actividade GR ($P < 0,01$) em ambas as espécies de levedura, o aumento significativo da actividade CAT A ($P < 0,01$) em *S. cerevisiae* UE-ME3, assim como a indução desta actividade em *S. chevalieri* UE-ME1 pode ser enquadrada num perfil característico de indução de stresse oxidativo (Cabiscol *et al.*, 2000 e Jamieson, 1998). No que diz respeito à actividade CAT T, o perfil de resposta idêntico nas duas espécies de levedura com máximo para a concentração de vanádio de 25 mM em *S. cerevisiae* UE-ME3 e 2,5mM em *S. chevalieri* UE-ME1, pode ser considerado uma resposta adaptativa protectora ao stresse oxidativo (Franca *et al.*, 2005; Lushchak & Gospodaryov, 2005 e Scandalios, 2005).

A tolerância diferencial ao metavanadato amónio observada nas duas espécies de *Saccharomyces* poderá ser parcialmente justificada pela presença de sistemas antioxidantes mais eficientes em *S. cerevisiae* UE-ME3. Este facto parece ser ainda evidenciado pelos baixos valores de actividade glutatióno redutase detectados na fracção pós-peroxissomal de *S. chevalieri* UE-ME1, assim como pela não detecção de CAT A e CAT T na ausência de metavanadato de amónio ou quando este está presente em baixa concentração.

O efeito diferencial que o metavanadato de amónio exerce na sobrevivência de espécies de *Saccharomyces* envolvidas na vinificação pode alterar drasticamente a população de leveduras, quer do ponto de vista quantitativo quer qualitativo, desse processo fermentativo, quando o vanádio se encontra presente nos mostos na ordem

dos mM devido a contaminação por fitofármacos ou pelo ambiente da adegas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Eng^o Paulo Laureano do Laboratório de Enologia da Universidade de Évora pela cedência das estirpes de levedura.

O autor S. Magriço agradece ao programa INTERREG III A SP4.E44 pela bolsa que financiou o seu trabalho no laboratório LABTRANS na Universidade de Évora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barceloux, D. G. 1999. Vanadium, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, **37**:265-278.
- Barnett, J. A. 1998. A history of research on yeast 1: Work by Chemists and Biologists. *Yeast*, **14**: 1439-1451.
- Bataillon, M., Rico, A., Sablayrolles J.-M., Salmon J.-M. & Barre, P. 1996. Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **82**: 145-150.
- Bauer, F.F. & Pretorius, J. S. 2000. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine – a review. *J. Afr. J. Enol.*, **21**: 27-51.
- Buschini, A., Poli, P. & Rossi, C. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* as an eukaryotic cell model to assess cytotoxicity and genotoxicity of three anticancer anthraquinones. *Mutagenesis*, **18**: 25-36.
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave P., Herrero E. & Ros J. 2000. Oxidative Stress Promotes Specific Protein Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 27393-27398.
- Carmel-Harel O., Stearman R., Gasch A. P., Botstein D., Brown P. O. & Storz G. 2001. Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **39**: 595-605.
- Carrasco, P., Querol A. & del Olmo M. 2001. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch Microbiol*. **175**: 450-457.
- Cooper, J. M. 2000. *The cell: A molecular approach*. Sunderland, London, GB.
- Costa, V. & Moradas-Ferreira, P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicin*, **22**: 217-246.
- Davidson, J. F., Whyt, B., Bissinger, P. H. & Schiestl, R. H. 1996. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Microbiology*, **93**: 5116-5121.
- Dumond, H., Danielou N., Pinto M. & Bolotin-Fukuhara M. 2000. A large-scale study of Yap1p-dependent genes in normal aerobic and H₂O₂-stress conditions: the role of Yap1p in cell proliferation control in yeast. *Mol. Microbiol*, **36**: 830-845.
- Franca, M. B., Panek, A. D. & Eleutherio, E. C. 2005. The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress Chaperones*, **10**: 167-70
- Frazier, W. C. 1972. *Microbiologia de los alimentos*. W. C. Brown Publishers, London
- Golberg, D. M. & Spooner, R. J. 1987. Glutathione reductase. In Bergmeyer (eds) *Methods of Enzymatic Analyses*, pp.259-271. VCH, New York.

- Grant, C. M. 2001. Role of glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology*, **39**: 533-541.
- Grant, C. M., Maclver, F. H. & Dawes I. W. 1997. Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, **410**: 219-222.
- Huang, C., Zhang, Z. & Shi, X. 2000. Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **259**: 13273-13281.
- Jamieson, D. J. 1998. Oxidative stress responses of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 1511-1527
- Lapinskas, P., Ruis, H. & Culotta, V. 1993. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* catalase gene expression by copper. *Current Genetics*, **24**: 388-393
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garini, J., Labarre, J. & Toledano, M. B. 1999. Yap1 and Skn7 Control Two Specialized Oxidative Stress Response Regulons in Yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**: 16040-16046.
- Lima, N. & Mota, M. 2003. *Biotecnologia: Fundamentos e aplicações*. LIDEL-Edições Técnicas Lda, Lisboa
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, L. & Randall, R. J. 1951. Protein Measure with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lushchak, V. I. & Gospodaryov, D. V. 2005. Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol Int.*, **29**: 187-92.
- Rossignol, T., Dulau L., Julien A. & Blondin B. 2003. Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast*, **20**: 1369-85.
- Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.*, **38**: 995-1014.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. 1997. *Biometry*. W. H. Freeman, New York.
- Tran, L.-T., Miki, T., Kamakura, M., Izawa, S., Tsujimoto, Y., Maybe, S., Inoue, Y. & Kimura, A. 1995. Oxidative Stress Response in Yeast, Induction of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase by Lipid Hydroperoxide in *Hansenula mrakii*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **80**: 606-609.
- Van Uden, N. 1967. Transport-limited fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* and competitive inhibition. *Arch. Microbiol.*, **58**: 155-168.