

CLAUDIO ROBERTO ZASTROW

TRANSPORTE E FERMENTAÇÃO DE MALTOTRIOSE POR

SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da Universidade
Federal de Santa Catarina, visando a obtenção do
grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Boris U. Stambuk

FLORIANÓPOLIS

SETEMBRO/2000

Roberto Zastrow, Claudio

Transporte e fermentação de maltotriose por *Saccharomyces cerevisiae* / Claudio Roberto Zastrow. – Florianópolis, 2000.

79p.; 27 cm.

Tese (Mestrado – Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina

1. Maltotriose – transporte. 2. *Saccharomyces cerevisiae* – fermentação. 3. Açúcares. 4. Leveduras.


**“TRANSPORTE E FERMENTAÇÃO DE MALTOTRIOSE POR
SACCHAROMYCES CEREVISIAE”**

POR

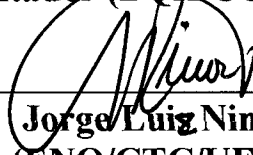
CLAUDIO ROBERTO ZASTROW

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Comissão Examinadora.


Comissão Examinadora:



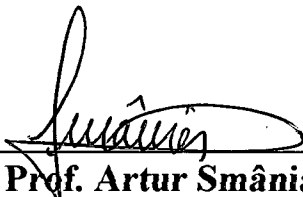
Boris Ugarte Stambuk
Orientador (BOA/CCB/UFSC)



Jorge Luiz Ninow
(ENQ/CTC/UFSC)



Agenor Fúrigo Júnior
(ENQ/CTC/UFSC)



Prof. Artur Smânia Júnior
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da UFSC.

FLORIANÓPOLIS, SETEMBRO DE 2000

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Boris U. Stambuk, pela orientação, confiança, apoio e todo empenho para que o trabalho fosse realizado.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFSC, pelo apoio prestado. Aos bolsistas de iniciação científica, Marcelo A. Matos e Cláudia Hollatz, que me auxiliaram diretamente na execução da parte experimental deste trabalho, além dos colegas Anderson, Patrícia e Eliana.

Ao Dr. Pedro Soares de Araújo do Departamento de Bioquímica da USP, por permitir a realização de uma série de experimentos no seu laboratório, aos colegas Fábio e Flávio e Márcia A. da Silva, pelo apoio e estadia durante a permanência em São Paulo.

Ao Professor Jorge Ninow e aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da UFSC, pelo uso do indispensável cromatógrafo a gás.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC e aos colegas de curso que de alguma forma contribuíram para a execução do mesmo.

Aos funcionários da IBA-Polar, Filial Montenegro, que da melhor forma possível me auxiliaram na parte final desta dissertação.

Aos meus pais, Curt e Hildegard Zastrow e ao meu irmão Ricardo Alexandre Zastrow, já que sem a participação destes pouco seria possível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao FUNPESQUISA-UFSC, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Resumo	v
Summary	vi
Introdução Geral	01
Capítulo I	
<i>Transporte e fermentação de açúcares por leveduras da indústria cervejeira</i>	07
Capítulo II	
A Metabolização da Maltotriose por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
Capítulo III	
A Otimização da Fermentação de Maltotriose por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
Discussão Geral e Conclusões	73
Anexo	

RESUMO

A maltotriose é o segundo açúcar mais abundante do mosto cervejeiro. Foi realizada portanto uma análise detalhada do metabolismo de maltotriose pelas células de *Saccharomyces cerevisiae*. Células de levedura crescem neste açúcar com velocidades específicas menores, e atingem massas celulares maiores, comparado ao obtido com glicose ou maltose. A antimicina A inibiu o crescimento em maltotriose, mas não em glicose ou maltose, indicando que a maltotriose não é fermentada mas degradada aerobicamente pela maioria das cepas industriais de levedura. Isto foi confirmado pela ausência da produção de etanol e glicerol. Como o transporte ativo dos açúcares através da membrana plasmática é o passo limitante para a metabolização, realizamos uma análise das velocidades de transporte ativo de maltose ou maltotriose por várias cepas de levedura. Nossos resultados mostram que enquanto o transporte de maltose é mediado por várias permeases com alta ($K_m = 1-5$ mM) e baixa ($K_m = 20$ mM) afinidade pelo substrato, no caso da maltotriose foi caracterizado um único sistema de transporte com baixa afinidade ($K_m = 18$ mM), provavelmente mediado pela permease *AGT1*. O isolamento de uma cepa capaz de fermentar a maltotriose permitiu confirmar que o transporte, e não a hidrólise intracelular, é o passo limitante da fermentação deste açúcar. Finalmente foi verificado que a adição de magnésio, um íon capaz de melhorar a fermentação do mosto cervejeiro, aumenta significativamente (300 %) a produção de etanol a partir de maltotriose por células de *S. cerevisiae*.

SUMMARY

Maltotriose is the second most abundant sugar of brewer's wort. We have thus performed a detailed analysis of maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae* cells. Yeast cells grew slower, but reached higher cellular densities when grown on maltotriose, than on the same concentration of glucose or maltose. Antimycin A prevented growth on maltotriose, but not on glucose or maltose, indicating that maltotriose is not fermented but degraded aerobically by several industrial yeast cells. This was confirmed by the absence of ethanol and glycerol production. Since active sugar uptake across the plasma membrane is the rate limiting step for metabolism, we have analyzed the rates of active maltose or maltotriose transport by several yeast strains. Our results indicate that while maltose is transported by several permeases with high ($K_m = 1-5$ mM) and low ($K_m = 20$ mM) affinity for the substrate, in the case of maltotriose a single transport activity with low affinity ($K_m = 18$ mM), mediated by the *AGT1* permease, could be characterized. The isolation of a yeast strain capable of fermenting maltotriose allowed us to confirm that transport across the plasma membrane, and not intracellular hydrolysis, is the rate limiting step for the fermentation of maltotriose. Finally, we have also found that magnesium, a nutrient ion known to improve the fermentation of brewer's wort, enhanced significantly (300%) the production of ethanol from maltotriose by *S. cerevisiae* cells.

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

A cerveja é uma bebida não destilada obtida da fermentação alcoólica do mosto de cereal maltado pela ação de leveduras específicas. A história da elaboração e consumo da cerveja tem pelo menos 8.000 anos de existência. Os sumérios e babilônios, antes do ano 6.000 a.C., já consumiam esta bebida. Esta prática foi seguida pelos egípcios, gregos, romanos e chineses, sendo atualmente conhecida e apreciada por praticamente todos os povos. A mais antiga cervejaria, descoberta recentemente por arqueólogos no Egito, data de 5.400 anos a.C. e fabricava vários tipos de cerveja. A grande maioria das cervejas produzidas naquela época eram escuras e fortes, e muitas vezes substituíam a água por ser esta última sujeita a diversos tipos de contaminações que provocavam inúmeras doenças à população.

Na Idade Média a cerveja passou a ser produzida nos mosteiros, e foram os monges católicos que deram a ela o aroma e o sabor que conhecemos hoje. Outra grande contribuição dada por eles foram as receitas escritas. A partir delas, pode-se preservar a qualidade da cerveja e aperfeiçoar cada vez mais as técnicas de fabricação. Os mosteiros que iniciaram a produção de cerveja foram os de Weihenstephan e St. Emmeran (Alemanha) e o de St. Gallen (Suíça), sendo que Weihenstephan é a cervejaria mais antiga do mundo atualmente em funcionamento, como parte do centro de tecnologia e ensino de cervejaria da Universidade Técnica de Munique.

A primeira regulamentação do processo de fabricação de cerveja, a “Lei da Pureza”, foi promulgada pelo Duque Guilherme IV em 1516 na Baviera. Esta lei determina que os ingredientes que podem ser usados na fabricação de cerveja são o lúpulo, a cevada e a água. A levedura de cerveja ainda não era conhecida na época e, somente mais tarde, foi incluída na lei.

Louis Pasteur e Emil Christian Hansen, na segunda metade do século XIX, foram responsáveis por uma revolução na indústria cervejeira, ressaltando a importância da utilização de culturas puras de levedura na sua fabricação, e o processo de pasteurização para a conservação prolongada da mesma. Estes novos conceitos e tecnologias revolucionaram a qualidade e o caráter da cerveja.

No nosso século a evolução do processo de elaboração continuou de forma acentuada, com o aprimoramento de técnicas e equipamentos e a diversificação dos tipos de cerveja disponíveis no mercado. Por outro lado, os conhecimentos adquiridos nas áreas de bioquímica, microbiologia, engenharia de processo, e mais recentemente a biotecnologia, permitiram a elaboração de um produto com mínimas variações, mantendo uma uniformidade produtiva elevada e menores custos de produção.

O processo denominado “high gravity”, contendo um mosto inicial de concentração mais elevada, é o processo de produção de cervejas mais utilizado atualmente no Brasil e em vários outros países. Este processo apresenta uma série de vantagens, tanto econômicas quanto processuais, sendo a mais importante a possibilidade de produção de cervejas com diferentes extratos finais, oriundas de um único mosto inicial. Embora o processo “high gravity”

utilize principalmente o xarope de maltose como adjunto, este não altera a composição final de açúcares do mosto cervejeiro já que a concentração e tipos de açúcares presentes neste adjunto é muito semelhante a do mosto normal.

A produção mundial de cerveja alcançou em 1979 aproximadamente 90 bilhões de litros, sendo os Estados Unidos o maior produtor mundial. O Brasil ocupava então o sexto lugar, com uma produção de 2,8 bilhões de litros. Dados recentes divulgados pelo SINDICERV (Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja, www.sindicerv.com.br) indicam que a produção mundial de cerveja no ano de 1998 chegou perto de 125 bilhões de litros, sendo que no caso específico do Brasil, a produção quase triplicou neste período, atingindo mais de 8 bilhões de litros (Figura 1). Com esta produção o Brasil passou a ocupar a quarta posição na produção mundial de cerveja, perdendo apenas para os Estados Unidos (26,6 bilhões de litros), China (15,4 bilhões de litros) e Alemanha (11,7 bilhões de litros).



Figura 1: Os maiores países produtores de cerveja. Fonte: SINDICERV (1998).

Este destaque também é refletido a nível das empresas envolvidas, uma vez que entre as maiores cervejarias do mundo, no Brasil encontram-se a Companhia Cervejaria Brahma e a Companhia Antártica Paulista, que em 1994 ocupavam a 8^a e 15^a posição na classificação mundial. Estas empresas recentemente anunciaram sua fusão, para a criação da AmBev (American Beverage Company), que passa a ser a terceira maior cervejaria do mundo.

Em função dos altos investimentos injetados no setor desde 1996 (média de US\$ 1 bilhão anuais), a perspectiva é de que até o final deste ano a produção e o consumo atinjam a casa dos 10 bilhões de litros. Atualmente a indústria de cerveja gera 120.000 empregos diretos e indiretos e o setor fechou o ano de 1998 com um faturamento bruto superior a R\$ 9 bilhões.

O brasileiro, embora seja um bom apreciador, está longe de ser o povo que mais bebe cerveja. O consumo de cerveja neste país (50 litros/habitante/ano) é consideravelmente inferior ao verificado em outros países, inclusive da América Latina, como por exemplo na Venezuela (Figura 2). Já no caso dos países europeus e da Austrália, o consumo atinge valores acima de 100 litros/habitante/ano, e na Bavária (sul da Alemanha) o consumo per capita de cerveja supera os 250 litros.

Este volume de consumo per capita no Brasil só não é maior porque a cerveja brasileira é um produto caro, quando comparado ao poder aquisitivo de parte significativa dos consumidores brasileiros. Apesar da cerveja brasileira ser uma das mais baratas do mundo na porta da fábrica (R\$ 0,50 por litro), o produto encarece muito até chegar ao consumidor, principalmente em função da

rede de distribuição e da grande carga tributária que pesa sobre o setor. De qualquer forma, pelo exposto acima fica evidente que a produção e o consumo de cerveja é um ramo da economia brasileira que se encontra em franca expansão.

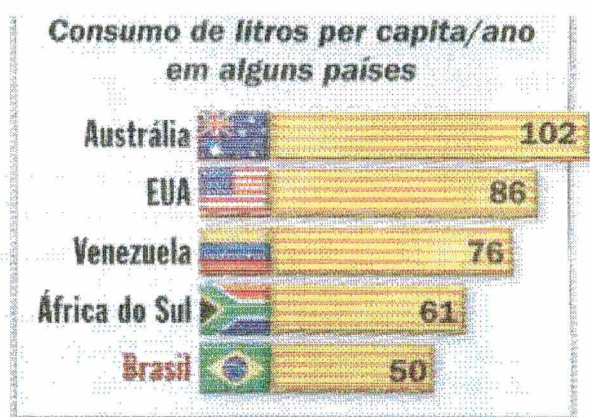


Figura 2: Consumo de cerveja (litros/habitante/ano). Fonte: SINDICERV (1998).

A pesquisa básica e aplicada, impulsionada pela indústria cervejeira, tem contribuído significativamente para o desenvolvimento do setor e da ciência em geral ao longo da história. Certamente novos avanços e/ou melhorias na produção poderão contribuir para aumentar ainda mais o desempenho das empresas envolvidas, principalmente no contexto de economia globalizada atualmente em vigor.

No intuito de otimizar o processo fermentativo de produção de cerveja, a presente dissertação apresenta uma análise do metabolismo da maltotriose, o segundo açúcar mais abundante do mosto cervejeiro. Com este objetivo, a dissertação será apresentada na forma de capítulos, sejam de revisão bibliográfica ou de resultados obtidos, escritos no formato de artigos de revistas especializadas.

**“Transporte e Fermentação de Açúcares por Leveduras da
Indústria Cervejeira”**

Revisão bibliográfica aceita para publicação na *REVISTA UNIVILLE*

CAPÍTULO I

**TRANSPORTE E FERMENTAÇÃO DE AÇÚCARES POR
LEVEDURAS DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA**

Claudio Roberto Zastrow ⁽¹⁾

Boris Ugarte Stambuk ⁽²⁾

⁽¹⁾ Mestrando em Biotecnologia / Departamento de Bioquímica - UFSC

⁽²⁾ Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica - UFSC

RESUMO

A maltose, maltotriose e glicose constituem os principais açúcares utilizados por *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação do mosto cervejeiro. A glicose é o primeiro açúcar a ser fermentado, seguido da maltose e finalmente a maltotriose. A utilização da maltose requer o seu transporte através da membrana plasmática, para a seguir ser hidrolisada por α -glicosidases intracelulares. A detalhada análise dos genes e proteínas envolvidas na utilização da maltose têm permitido otimizar, através de engenharia genética, a fermentação deste açúcar por cepas de *S. cerevisiae*. Por outro lado, um problema comumente encontrado na indústria cervejeira é a utilização incompleta da maltotriose. No intuito de melhorar a eficiência do processo fermentativo, atualmente estão sendo analisados os transportadores e as enzimas envolvidas na fermentação deste açúcar por *Saccharomyces cerevisiae*.

Palavras-Chave: Fermentação, Transporte de açúcares, *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUÇÃO

O mosto cervejeiro é obtido pelo processo denominado mosturação, onde o malte moído é misturado com água e outros complementos, como cereais (milho, arroz, trigo e cevada não maltada) ou carboidratos (sacarose, glicose e maltose), além do lúpulo e outros adjuntos específicos (BOHATCH, 1994). O amido do malte e dos outros cereais utilizados no processo é transformado em açúcares menores pela ação das α - e β -amilases, enzimas que atacam as ligações α -1,4 das cadeias do amido pela extremidade não-redutora (Figura 1). A α -amilase dá origem a oligossacarídeos de cadeias curtas com no mínimo cinco a seis unidades de glicose, sendo que estes, pela ação da β -amilase são transformados em moléculas de maltose e maltotriose (no caso de cadeias com número ímpar de moléculas de glicose).

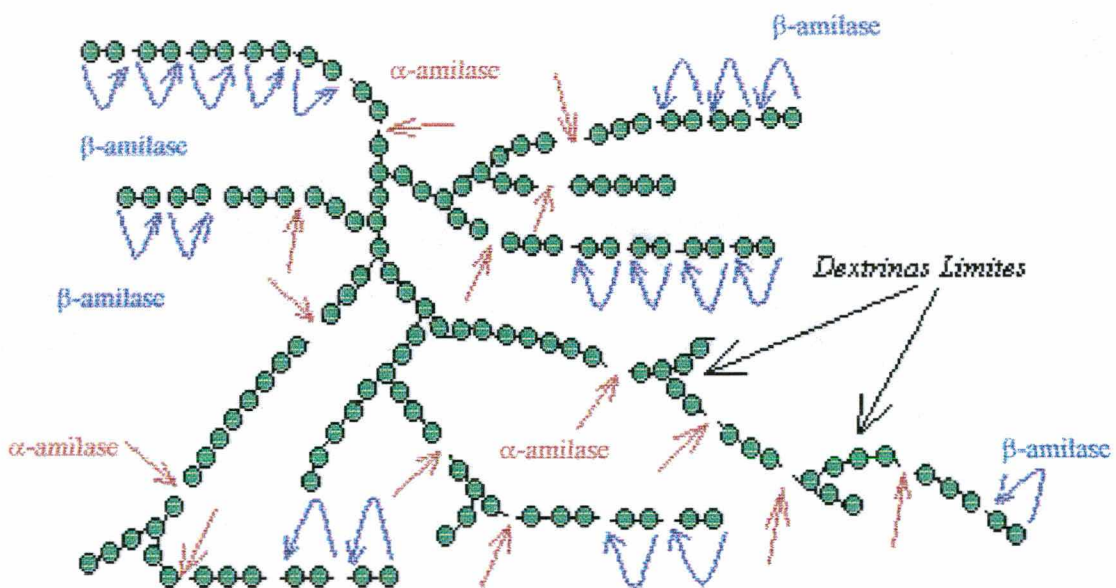


Figura 1: Forma de ação das α - e β -amilases na degradação do amido.

Desta forma, a maltose constitui o principal açúcar encontrado no mosto cervejeiro, seguido da maltotriose (Tabela 1). Outros açúcares importantes também estão presentes no mosto, mas em quantidades menores, como a glicose, a frutose e a sacarose. Além destes carboidratos, as chamadas dextrinas limites, contendo os pontos de ramificação, representam os açúcares não-fermentáveis (MUNROE, 1978; UCHIDA *et al.*, 1991).

Tabela 1: Concentração de açúcares presentes no mosto cervejeiro.

Açúcar	Quantidade (% do total)
Maltose	50 - 60
Maltotriose	15 - 20
Glicose	10 - 15
Frutose	1 - 2
Sacarose	1 - 2
Dextrinas Limites	20 - 30

UTILIZAÇÃO DE AÇÚCARES DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO

As linhagens de levedura mais utilizadas em cervejaria pertencem a duas espécies do gênero *Saccharomyces*, *S. cerevisiae* e *S. uvarum* (também chamada de *S. carlsbergensis*). As cervejas do tipo “Lager” são produzidas pela fermentação profunda (baixa), por cepas de *S. uvarum*, consideradas como de alta atividade fermentativa e de menor capacidade respiratória que *S. cerevisiae*. As cervejas do tipo “Ale” são em geral produzidas por fermentação superficial

(alta), realizadas por cepas de *S. cerevisiae* (AQUARONE *et al.*, 1983).

A partir do momento em que as células de *Saccharomyces* entram em contato com o mosto cervejeiro, a glicose, a frutose e a sacarose constituem os primeiros substratos a serem utilizados pelas células, seguidos da maltose e, finalmente, da maltotriose, restando as dextrinas que não são fermentadas (PATEL & INGLEDEW, 1973; D'AMORE *et al.* 1989; SUIHKO *et al.*, 1993). Como os açúcares não atravessam a membrana celular livremente, a sua passagem requer a ação de proteínas transportadoras denominadas permeases (LAGUNAS, 1993; HORÁK, 1997). Inclusive, logo nos primeiros estudos que visavam analisar a utilização e metabolização dos açúcares pelas leveduras, ficou evidente que o passo limitante do processo fermentativo é o transporte dos açúcares presentes no mosto para o interior das células (GRIFFIN, 1975; HAUTERA & LÖVGREN, 1975).

Os monossacarídeos glicose e frutose são captados para o interior das células pelo mesmo sistema de transporte, utilizando o processo de difusão facilitada. Atualmente, já foram caracterizados inúmeros transportadores de hexoses (*HXT1* - *HXT7*), sendo que alguns possuem alta e outros baixa afinidade pela glicose. Todas estas permeases transportam também frutose e manose, porém com afinidades menores do que pela glicose. Por este motivo a glicose do meio é captada mais rapidamente do que a frutose (BOLES & HOLLENBERG, 1997). A sacarose, dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma de frutose unidas através de uma ligação α -1 β -2, é hidrolizada extracelularmente

por invertases específicas, sendo que os monossacarídeos formados são captados pelos transportadores de hexoses descritos acima (CARLSON, 1987). Uma vez transportadas para o interior das células, a glicose e a frutose são degradadas pela via glicolítica até piruvato que pode ser totalmente convertido a CO_2 e H_2O pelo ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa, ou então, ser degradado até etanol e CO_2 pelo processo denominado de fermentação alcoólica (GANCEDO & SERRANO, 1989).

A utilização da maltose pelas leveduras requer também o transporte deste dissacarídeo para o interior das células, onde será hidrolizado por glicosidases intracelulares. Para que a maltose possa ser utilizada pelas cepas de *Saccharomyces*, estas devem possuir pelo menos um dos cinco *loci MAL*: *MAL1*, *MAL2*, *MAL3*, *MAL4* e *MAL6*. Cada um destes *locus* contém geralmente os três genes necessários à metabolização da maltose (Figura 2), o gene *MALS* que codifica para a maltase, o gene *MALT* que codifica para o transportador de maltose e o gene *MALR* que regula a expressão dos outros dois genes (NEEDLEMAN, 1991).

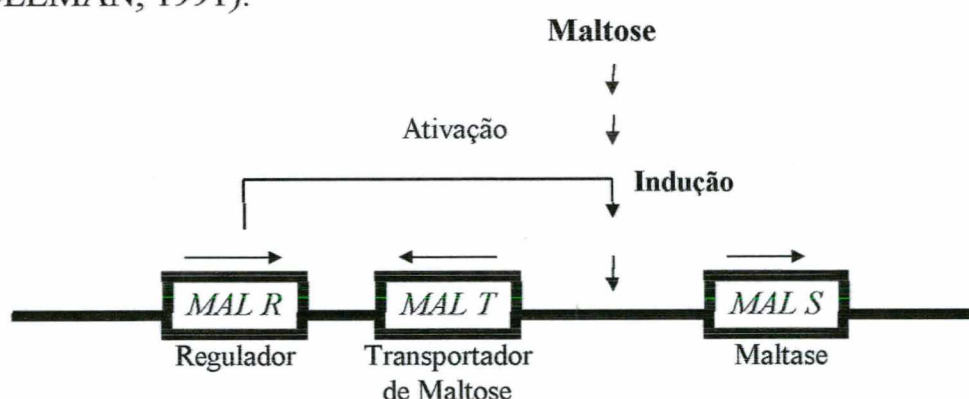


Figura 2: Estrutura e regulação do *locus MAL*. As setas representam a direção da transcrição.

Estudos iniciais com cepas de laboratório demonstraram a existência de dois sistemas de transporte de maltose, um de alta afinidade ($K_m = 4$ mM) e outro de baixa afinidade ($K_m = 70$ mM) pelo substrato (BUSTURIA & LAGUNAS, 1985). Análises posteriores indicaram que a atividade de transporte de baixa afinidade era provavelmente devido à ligação da maltose radioativa com a parede celular e/ou a membrana plasmática, ou seja, um simples “artefato experimental” (BENITO & LAGUNAS, 1992). Entretanto, trabalhos efetuados por NOVAK *et al.* (1990) e CRUMPLEM *et al.* (1996) com cepas de cervejaria demonstraram que nestas células existem também os dois sistemas de transporte, de alta afinidade ($K_m = 1-2$ mM) e de baixa afinidade ($K_m = 20$ mM) pelo substrato. O transportador de maltose de alta afinidade, codificado pelos genes *MALT*, é uma permease específica para maltose e turanose (CHANG *et al.*, 1989). Esta permease é capaz de transportar ativamente o açúcar através do co-transporte com H^+ , mesmo a favor do gradiente de concentração (SERRANO, 1977). Uma vez captada, a maltose é hidrolisada pela maltase (α -glicosidase, E.C. 3.2.1.20) em duas moléculas de glicose que são metabolizadas até etanol (Figura 3). A α -glicosidase, enzima que tem pH ótimo em torno de 6,8, é capaz de hidrolisar maltose, isomaltose, sacarose, maltotriose e substratos sintéticos como o *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (MATSUSAKA, *et al.*, 1977; NEEDLEMAN *et al.*, 1978).

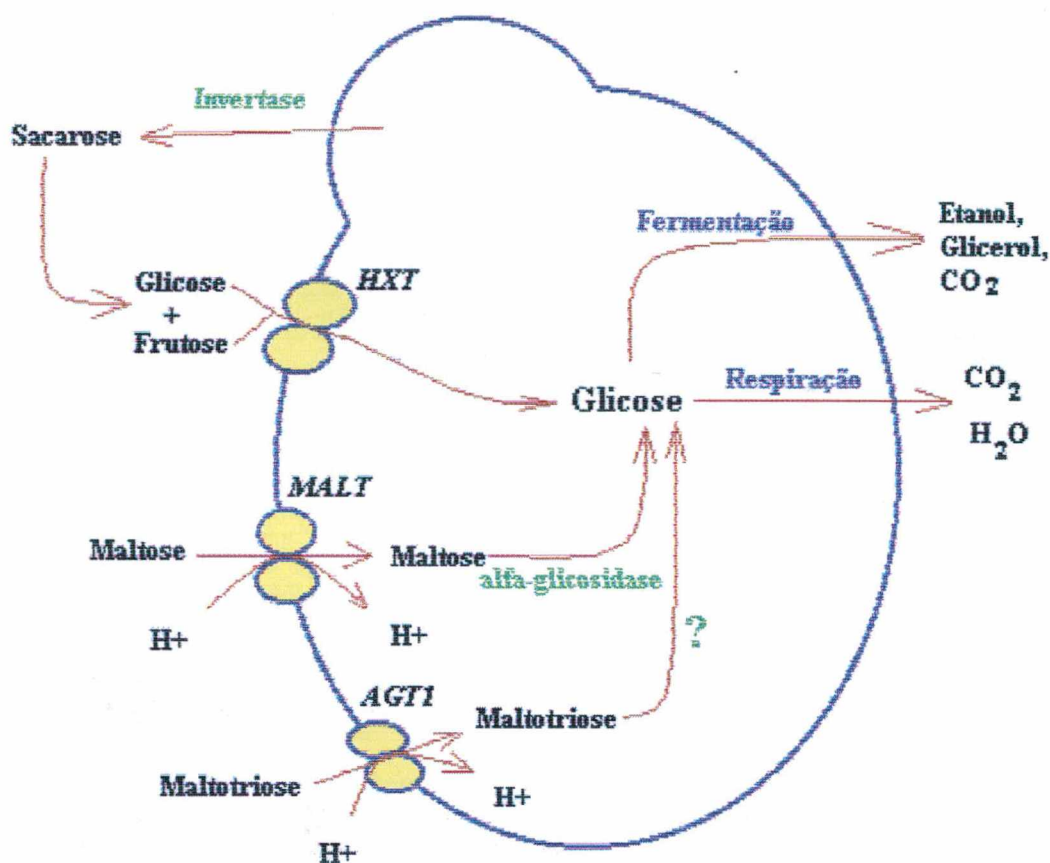


Figura 3: Esquema representando a utilização de açúcares por leveduras.

Análises iniciais do transporte de maltotriose revelavam que este açúcar possui um transportador distinto do transportador de maltose (HARRIS & THOMPSON, 1960). Embora já tenham sido descritos vários trabalhos sobre o transporte de maltotriose em leveduras (MICHALJANICOVA *et al.*, 1982; ZHENG *et al.*, 1994a), até pouco tempo não se sabia qual era o gene responsável pela síntese deste transportador. Recentemente, analisando um alelo do transportador de maltose, foi caracterizado um gene (*AGT1*) responsável pelo transporte de uma série de α -glicosídeos, como trealose, maltose, melezitose, α -metilglicosídeo e maltotriose (HAN *et al.*, 1995). Tanto o transportador de maltose quanto a permease codificada pelo gene *AGT1* apresentam uma grande homologia estrutural e ambos permitem a captação ativa dos açúcares pelo

co-transporte com H^+ (STAMBUK *et al.*, 1998; 1999). Condizente com a importância deste transportador para a metabolização da maltotriose, foi verificado recentemente que a maioria das cepas de cervejaria possui o gene *AGT1*, além dos transportadores de maltose codificados pelos genes *MALT* (JESPERSEN *et al.*, 1999).

Em relação à enzima responsável pela hidrólise da maltotriose, não existe relato na literatura que indique a existência de alguma α -glicosidase específica para este açúcar, embora nunca tenha sido testada a presença e especificidade desta enzima nas células crescidas ou induzidas em maltotriose (STEWART *et al.*, 1979; STEWART & RUSSELL, 1986). Estudos realizados com células crescidas em maltose têm revelado a existência de pelo menos 9 a 10 isoformas da enzima α -glicosidase, algumas das quais específicas para maltose e outras para α -metilglicosídeo (SPIELMAN & MOWSHOWITZ, 1982; TABATA *et al.*, 1984; KOPETZKI *et al.*, 1989). Algumas isoformas da α -glicosidase induzidas pela maltose são capazes de hidrolisar maltotriose, porém com uma atividade correspondente a cerca de 10% da observada para a hidrólise da maltose (TABATA *et al.*, 1984).

MELHORAMENTO DO PROCESSO FERMENTATIVO

Durante a fermentação do mosto cervejeiro, verifica-se que enquanto glicose, frutose e sacarose estão presentes no meio de cultivo, a maltose e a maltotriose não são utilizadas pelas células. A maltose somente começa a ser

captada quando os níveis de glicose no mosto atingem a metade dos níveis iniciais. Este problema torna-se mais pronunciado quando a concentração de glicose no mosto é maior (D'AMORE *et al.*, 1989; D'AMORE, 1992; ERNANDES *et al.*, 1993; SUIHKO *et al.*, 1993). A não utilização completa da maltose e da maltotriose enquanto as concentrações de glicose são altas é devido ao efeito que este último açúcar exerce sobre a célula: a glicose reprime a síntese dos transportadores e das α -glicosidases (NEEDLEMAN, 1991), e a glicose também provoca a rápida endocitose e degradação proteolítica das proteínas transportadoras no vacúolo celular (RIBALLO *et al.*, 1995; MEDINTZ *et al.*, 1996). Este problema tem sido em parte resolvido, através da modificação das cepas por técnicas de engenharia genética, promovendo a síntese constitutiva do transportador de maltose em *S. cerevisiae* (OSINGA *et al.*, 1989; KODAMA *et al.*, 1995)

Outro problema comumente encontrado em mostos cervejeiros, como consequência da não utilização completa de maltotriose pelas leveduras, é a presença deste açúcar no final da fermentação, o que dificulta a filtração do mosto e a cerveja obtida apresenta sabor atípico e qualidade inferior (PANCHAL & STEWART, 1979). Inúmeros trabalhos têm tentado otimizar a utilização da maltotriose durante a fermentação do mosto (ERNANDES *et al.*, 1993; D'AMORE *et al.*, 1989; D'AMORE, 1992; ZHENG *et al.*, 1994b). Entretanto, os resultados relatados são muitas vezes contraditórios, provavelmente refletindo as características das diferentes cepas utilizadas. Por exemplo, inúmeras cepas de

S. cerevisiae respiram a maltotriose até CO₂ e água, portanto são incapazes de fermentar este açúcar (ZASTROW *et al.*, 1999). Aparentemente, o transporte do açúcar para o interior da célula, e não a posterior hidrólise pelas α -glicosidases, é o fator limitante na fermentação da maltotriose (ZASTROW *et al.*, 1999). Somente após uma completa análise dos transportadores e α -glicosidases envolvidas na metabolização da maltotriose e dos mecanismos regulatórios que afetam a síntese destas proteínas, é que será possível otimizar a utilização da maltotriose pelas leveduras.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A utilização de açúcares durante a fermentação do mosto cervejeiro é um fenômeno complexo que envolve inúmeras enzimas, vários sistemas de transporte e complexos mecanismos regulatórios. Os estudos sobre a metabolização da maltose por *S. cerevisiae* permitiram incrementar significativamente a eficiência da fabricação de cerveja. Entretanto, a não utilização completa da maltotriose presente no mosto constitui ainda um problema para a indústria cervejeira. Somente após serem desvendados os mecanismos moleculares que permitem às células de *S. cerevisiae* fermentarem este açúcar é que poderão ser desenvolvidas estratégias visando a otimização do processo fermentativo.

ABSTRACT

Maltose, maltotriose and glucose are the major sugars used by *Saccharomyces cerevisiae* during brewer's wort fermentation. Glucose is the first sugar to be fermented, followed by maltose and finally maltotriose. Maltose utilization requires its transport across the plasma membrane, and further hydrolysis by intracellular α -glucosidase. The detailed analysis of the genes and proteins involved in maltose utilization has allowed the optimization, by genetic engineering, of the fermentation of this sugar by strains of *S. cerevisiae*. On the other hand, a common problem encountered in the breweries is the incomplete utilization of maltotriose. In order to optimize the efficiency of the brewing process, the transporters and enzymes involved on the fermentation of this sugar are currently being analyzed.

Key words: Fermentation, Sugar Transporters, *Saccharomyces cerevisiae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUARONE, E. ; LIMA, U. A. ; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação.** 243 p. São Paulo-SP, Edgard Blücher, 1983.
- BENITO, B. ; LAGUNAS, R. **The low-affinity component of *Saccharomyces cerevisiae* maltose transport is an artifact.** J. Bacteriol. 174: pp. 3065-3069, 1992.
- BOHATCH, A. **Cerveja; fabricação em pequena escala.** 66 p. Curitiba-PR, EMATER, 1994.
- BOLES, E. ; HOLLENBERG, C. **The molecular genetics of hexose transport in yeast.** FEMS. Microbiol. Rev. 21: pp. 85-111, 1997.
- BUSTURIA, A. ; LAGUNAS, R. **Identification of two forms of the maltose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* and their regulation by catabolite inactivation.** Biochim. Biophys. Acta 820: pp. 324-326, 1985.
- CARLSON, M. **Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces* species.** J. Bacteriol. 169: pp. 4873-4877, 1987.
- CHANG, Y. S. ; DUBIN, R. A. ; PERKINS, E. ; MICHELS, C. A. ; NEEDLEMAN, R. B. **Identification and characterization of maltose permease in a genetically defined *Saccharomyces* strain.** J. Bacteriol. 171: pp. 6148-6154, 1989.
- CRUMPLEN, R. M. ; SLAUGHTER, J. C. ; STEWART, G. G. **Characteristics of maltose transporter activity in an ale and lager strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** Lett. Appl. Microbiol. 23: pp. 448-452, 1996.
- D'AMORE, T. **Improving yeast fermentation performance.** J. Inst. Brew. 98: pp. 375-382, 1992.
- D'AMORE, T. ; RUSSELL, I. ; STEWART, G. G. **The effect of carbohydrate adjuncts on Brewer's wort fermentation by *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*).** J. Inst.

Brew. 95: pp. 333-336, 1989.

ERNANDES, J. R. ; WILLIAMS, J. W. ; RUSSELL, I. ; STEWART, G. G. **Effect of yeast adaptation to maltose utilization on sugar uptake during the fermentation of Brewer's wort.** J. Inst. Brew. 99: pp. 67-71, 1993.

GANCEDO, C. ; SERRANO, R. **Energy-yielding metabolism.** The Yeast, v.3, pp. 205-259, New York, 1989.

GRIFFIN, S. R. **Fast and slow fermentations of brewer's wort by strains of *Saccharomyces cerevisiae*.** J. Inst. Brew. 76: pp. 41-45, 1975.

HAN, E-K. ; COTTY, F. ; SOTTAS, C. ; JIANG, H. ; MICHELS, C. A. **Characterization of *AGT1* encoding a general α -glucoside transporter from *Saccharomyces*.** Mol. Microbiol. 17: pp. 1093-1107, 1995.

HARRIS, G. ; THOMPSON, C. C. **Uptake of nutrients by yeast. II Maltotriose permease and the utilization of maltotriose by yeast.** J. Inst. Brew. 66: pp. 293-297, 1960.

HAUTERA, P. ; LÖVGREN, T. **α -Glucosidase, α -glucoside permease, maltose fermentation and leavening ability of baker's yeast.** J. Inst. Brew. 81: pp. 309-313, 1975.

HORÁK, J. **Yeast nutrient transporters.** Biochim. Biophys. Acta 1331: pp. 41-79, 1997.

JESPERSEN, L. ; CESAR, L. B. ; MEADEN, P. G. ; JAKOBSEN, M. **Multiple α -glucoside transporter genes in brewer's yeast.** Appl. Environ. Microbiol. 65: pp. 450-456, 1999.

KODAMA, Y. ; FUKUI, N. ; ASHIKARI, T. ; SHIBANO, Y. ; MORIOKA-FUJIMOTO, K. ; NAKATANI, K. **Improvement of maltose fermentation efficiency: Constitutive expression of *MAL* genes in brewing yeast.** J. Am. Soc. Brew. Chem. 53: pp. 24-29, 1995.

KOPETZKI, E. ; BUCKEL, P. ; SCHUMACHER, G. **Cloning and characterization of Baker's yeast α -glucosidase: over-expression in a yeast strain devoided of vacuolar**

- proteinases.** *Yeast* 5: pp. 11-24, 1989.
- LAGUNAS, R. **Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Microbiol. Rev.* 104: pp. 229-242, 1993.
- MATSUSAKA, K. ; CHIBA, S. ; SHIMOMURA, T. **Purification and substrate specificity of brewer's yeast α -glucosidase.** *Agric. Biol. Chem.* 41: pp. 1917-1923, 1977.
- MEDINTZ, I. ; JIANG, H. ; HAN, E. ; CUI, W. ; MICHELS, C. A. **Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J. Bacteriol.* 178: pp. 2245-2254, 1996.
- MICHALJANICOVA, D. ; HODAN, J. ; KOTYK, A. **Maltotriose transport and utilization in Baker's and Brewer's yeast.** *Folia Microbiol.* 27: pp. 217-221, 1982.
- MUNROE, J. H. **Fermentable carbohydrates in wort and beer.** *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 36: pp. 107-111, 1978.
- NEEDLEMAN, R. B. ; FEDEROF, H. J. ; ECCLESHALL, T. R. ; BUCHFERER, B. ; MARMUR, J. **Purification and characterization of an α -glucosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*.** *Biochemistry* 17: pp. 4657-4661, 1978.
- NEEDLEMAN, R. **Control of maltase synthesis in yeast.** *Mol. Microbiol.* 5: pp. 2079-2084, 1991.
- NOVAK, S. ; D'AMORE, T. ; RUSSELL, I. ; STEWART, G. **Characterization of sugar transport in 2-deoxy-D-glucose resistant mutants of yeast.** *J. Ind. Microbiol.* 6: pp. 149-156, 1990.
- OSINGA, K. A. ; RENNIERS, A. C. H. M. ; WELBERGEN, J. W. ; ROOBOL, R. H. **Maltose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 5: pp. S207-S212, 1989.
- PANCHAL, C. J. ; STEWART, G. G. **Utilization of wort carbohydrates.** *Brew. Dig.* 54: pp. 26-48, 1979.
- PATEL, G. B. ; INGLEDEW, W. M. **Trends in Wort carbohydrate utilization.** *Appl. Microbiol.* 26: pp. 349-353, 1973.

- RIBALLO, E. ; HERWEIJER, M. ; WOLF, D. H. ; LAGUNAS, R. **Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis.** J. Bacteriol. 177: pp. 5622-5627, 1995.
- SERRANO, R. **Energy requirements for maltose transport in yeast.** Eur. J. Biochem. 80: pp. 97-102, 1977.
- SPIELMAN, L. L. & MOWSHOWITZ, D. B. **A specific stain for α -glucosidases in isoelectric focusing gels.** Anal. Biochem. 120: pp. 66-70, 1982.
- STAMBUK, B. U. ; PANEK, A. D. ; CROWE, J. H. ; CROWE, L. M. ; DE ARAUJO, P. S. **Expression of high-affinity trehalose- H^+ symport in *Saccharomyces cerevisiae*.** Biochim. Biophys. Acta 1379: pp. 118-128, 1998.
- STAMBUK, B. U. ; DA SILVA, M. A. ; PANEK, A. D. ; DE ARAUJO, P. S. **Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*.** FEMS Microbiol. Lett. 170: pp. 105-110, 1999.
- STEWART, G. G. ; RUSSELL, I. **One hundred years of yeast research and development in the brewing industry.** J. Inst. Brew. 92: pp. 537-558, 1986.
- STEWART, G. G. ; ERRATT, J. ; GARRISON, I. ; GORING, T. ; HANCOCK, I. **Studies on the utilization of wort carbohydrates by brewer's yeast strains.** MBAA Tech. Quart. 16: pp. 1-7, 1979.
- SUIHKO, M.-L. ; HOME, S. ; LINKO, M. **Wort sugar, yeast sugar uptake and beer quality.** Monatsschr. Brauwiss. 5: pp. 185-192, 1993.
- TABATA, S. ; IDE, T. ; UMEMURA, Y. ; TORII, K. **Purification and characterization of α -glucosidases produced by *Saccharomyces* in response to three distinct maltose genes.** Biochim. Biophys. Acta 797: pp. 231-238, 1984.
- UCHIDA, M. ; NAKATANI, K. ; ONO, M. ; NAGAMI, K. **Carbohydrates in brewing. I. determination of fermentable sugars and oligosaccharides in wort and beer by**

partition high-performance liquid chromatography. J. Am. Soc. Brew. Chem. 49: pp. 65-73, 1991.

ZASTROW, C. R. ; MATOS, M. A. ; HOLLATZ, C. ; STAMBUK, B. U. **Maltotriose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*.** In: XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambú-MG, 22 a 25 de maio de 1999, Programa p. 58, G-09, 1999.

ZHENG, X. ; D'AMORE, T. ; RUSSELL, I. ; STEWART, G. G. **Transport kinetics of maltotriose in strains of *Saccharomyces*.** J. Ind. Microbiol. 13: pp. 159-166, 1994a.

ZHENG, X. ; D'AMORE, T. ; RUSSELL, I. ; STEWART, G. G. **Factors influencing maltotriose utilization during brewery wort fermentations.** J. Am. Soc. Brew. Chem. 52: pp. 41-47, 1994b.

**“Metabolização da Maltotriose por
Saccharomyces cerevisiae”**

Trabalho publicado na revista indexada *Biotechnology Letters* 22: 455-459

CAPÍTULO II

Metabolização de Maltotriose por *Saccharomyces cerevisiae*

Claudio R. Zastrow, Marcelo A. Mattos, Claudia Hollatz & Boris U. Stambuk*

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brasil.

Palavras-chave: cervejaria, maltose, maltotriose, *Saccharomyces*, transporte.

Resumo:

Células de *Saccharomyces cerevisiae* crescem mais lentamente mais atingem maiores densidades celulares quando crescidas em 20 g maltotriose/L do que com as mesmas concentrações de glicose ou maltose. Antimicina A (3 mg L^{-1}) impediu o crescimento em maltotriose mas não em glicose ou maltose, indicando que este açúcar não é fermentado, mas sim degradado aeróbicamente. Isto foi confirmado pela ausência da produção de etanol e glicerol. O passo limitante no metabolismo da maltotriose é o transporte ativo deste açúcar através da membrana plasmática, e a baixa velocidade de transporte observada em células crescidas em maltotriose é provavelmente a principal razão da ausência de fermentação deste açúcar pelas células de *S. cerevisiae*.

Introdução

Os açúcares fermentáveis mais abundantes do mosto cervejeiro são a maltose (50-60%), maltotriose (15-20%) e glicose (10-15%). Entretanto, a maltotriose é o último açúcar a ser utilizado pelas leveduras. Geralmente a captação da maltose e maltotriose começa após metade da glicose presente no mosto ter sido consumida, sendo que a velocidade de utilização da maltotriose é mais lenta do que a da maltose (STEWART *et al.*, 1979). Esta lenta, e muitas vezes incompleta, metabolização da maltotriose pelas leveduras provoca um problema comum entre as cervejarias: um produto final com elevado conteúdo de açúcares fermentáveis e uma cerveja com um perfil de sabor atípico. A velocidade de captação e metabolização da maltotriose durante a fermentação do mosto é, portanto, um dos principais fatores determinantes de uma fermentação eficiente e de um produto de qualidade. Entretanto, o metabolismo da maltotriose tem recebido pouca atenção comparado com os mecanismos de utilização de maltose e glicose pelas células de levedura.

Maltose e maltotriose possuem sistemas de transporte independentes, mas aparentemente compartilham a mesma enzima hidrolítica, α -glicosidase (STEWART *et al.*, 1979). O sistema de transporte de maltotriose foi estudado em inúmeras cepas industriais (ZHENG *et al.*, 1994a), e temos mostrado recentemente que a permease *AGT1* é um sistema ativo de co-transporte maltotriose- H^+ (STAMBUK *et al.*, 1999). Tendo em vista a importância do transporte de maltotriose para as aplicações industriais das leveduras,

praticamente todas as cepas cervejeiras apresentam a permease *AGT1* (JESPERSEN *et al.*, 1999).

A grande maioria de estudos na utilização de maltotriose pelas leveduras tem analisado apenas fatores ambientais, ou características das cepas, que poderiam influenciar a captação desta fonte de carbono durante a fermentação do mosto (STEWART *et al.*, 1979; ZHENG *et al.*, 1994b). Pouco se sabe sobre o tipo de metabolismo (fermentativo ou respiratório) que as células de *S. cerevisiae* utilizam quando estão crescendo em maltotriose. Os resultados apresentados no presente trabalho indicam que, embora *S. cerevisiae* tenha uma forte tendência de realizar a fermentação alcoólica (LAGUNAS, 1979), a maltotriose não é fermentada por várias cepas industriais.

Materiais e métodos

Materiais

Os componentes do meio foram adquiridos da Difco. Glicose, maltose, maltotriose e antimicina A foram obtidos da Sigma. Kits enzimáticos comerciais para determinação de glicose e glicerol foram da Biobrás (Brasil). Todos os outros reagentes químicos utilizados foram de grau analítico.

Cepas utilizadas

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 1. Todas as cepas foram gentilmente cedidas pela Dr. Anita D. Panek

(Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil).

Tabela 1: Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas.

Cepa	Características	Fonte*
S-14	w.t. diplóide	1
254	Cepa comercial utilizada para produção de etanol	2
70	Cepa de panificação	2
CC3	Cepa cervejeira Ale	2

*Fonte: (1) A. Rapoport, August Kirchenstein Institute of Microbiology, Latvia;
(2) Labatt Culture Collection, Labatt Breweries of Canada, Ontario.

Meios de cultura e condições de cultivo

As células foram crescidas aeróbicamente em batelada (28°C e 160 rpm) em meio YEP (pH 5,0) contendo 20 g peptona L⁻¹, 10 g extrato de levedura L⁻¹ e 20 g da fonte de carbono (glicose, maltose ou maltotriose) L⁻¹. A fermentação dos açúcares foi determinada pela produção de gás e ácido em tubos de Durhan contendo o meio acima e 15 mg de purpura de bromo-ressol L⁻¹. Alternativamente, foi adicionado aos meios 3 mg de antimicina A L⁻¹ para inibir a cadeia respiratória e favorecer o crescimento fermentativo. O crescimento foi determinado através da densidade ótica medida a 570 nm e correlacionada ao peso seco das células.

Determinação de etanol e glicerol

Amostras das culturas foram centrifugadas (10.000 g, 3 min) e os sobrenadantes utilizados para a determinação da produção de etanol e glicerol. Etanol foi quantificado através de cromatografia gasosa com uma coluna Poropack Q-80-100, detetor de ionização de chama e sistema de integração computadorizado. O glicerol foi determinado com um kit enzimático comercial, baseado na glicerol kinase, glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase.

Ensaio de transporte

As cinéticas de transporte ativo de maltose ou maltotriose foram determinadas através do co-transporte de H^+ como descrito anteriormente (STAMBUK *et al.*, 1998, 1999) utilizando-se 0,2-150 mM de cada açúcar. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e a variação máxima foi menor que 10%.

Ensaio da α -glicosidase

A atividade α -glicosidase com maltose ou maltotriose (0,5-100 mM) foi determinada *in situ* utilizando células permeabilizadas como descrito anteriormente (STAMBUK, 1999). A glicose produzida foi medida pelo método da glicose oxidase e peroxidase utilizando-se kits comerciais. Todos os ensaios foram realizados em duplicata, e foram utilizados controles com células permeabilizadas e previamente fervidas.

Resultados

Antimicina A inibe o crescimento celular em maltotriose

Uma prática comum utilizada para a seleção de células com defeitos no transporte de açúcares (ou seus equivalentes transformados e complementados) é incluir no meio seletivo um inibidor respiratório, como a antimicina A, para garantir que outros substratos (p. ex. amino-ácidos) não sejam utilizados como fonte de carbono. Entretanto, este procedimento não pode ser usado com maltotriose uma vez que a antimicina A inibiu completamente o crescimento de várias cepas selvagens e industriais nesta fonte de carbono, enquanto que o crescimento em glicose ou maltose não foi afetado (dados não mostrados). Este resultado indica que a cadeia respiratória é necessária para o crescimento em maltotriose, e nos levou a uma análise mais detalhada do tipo de metabolismo utilizado pelas células de *S. cerevisiae* durante o crescimento nesta fonte de carbono.

Cinética de crescimento em glicose, maltose e maltotriose

A Figura 1 mostra as curvas de crescimento obtidas com diferentes cepas de levedura crescidas em meios contendo glicose, maltose ou maltotriose como fonte de carbono e energia. Enquanto que as leveduras crescem em glicose e maltose com um metabolismo respiro-fermentativo, no caso da maltotriose foi observada uma única fase exponencial de crescimento com uma velocidade específica significativamente menor, e um maior rendimento em biomassa,

quando comparado àqueles obtidos com glicose ou maltose (Tabela 2). Não houve praticamente produção de etanol e glicerol durante o crescimento em maltotriose (Tabela 2 e Figura 2), indicando que a utilização da maltotriose por estas células é provavelmente oxidativa.

É importante salientar que todas as cepas utilizadas neste estudo apresentaram resultado positivo quando a fermentação da maltotriose foi determinada pela produção de gás e ácido em tubos de Durham. Este resultado indica que o teste clássico de Durham pode apresentar resultados falso-positivos. Um trabalho anterior também mostrou que o teste de Durham apresenta vários resultados falso-negativos (VAN DIJKEN *et al.*, 1996). Portanto, o uso deste teste pode ter levado a uma avaliação errada de quais carboidratos são realmente fermentados pelas células de *S. cerevisiae*. Quando foi adicionado antimicina A aos tubos de Durham, foram ainda obtidos resultados positivos para glicose e maltose, mas não para maltotriose, indicando que a adição deste inibidor respiratório pode resolver o problema dos resultados falso-positivos.

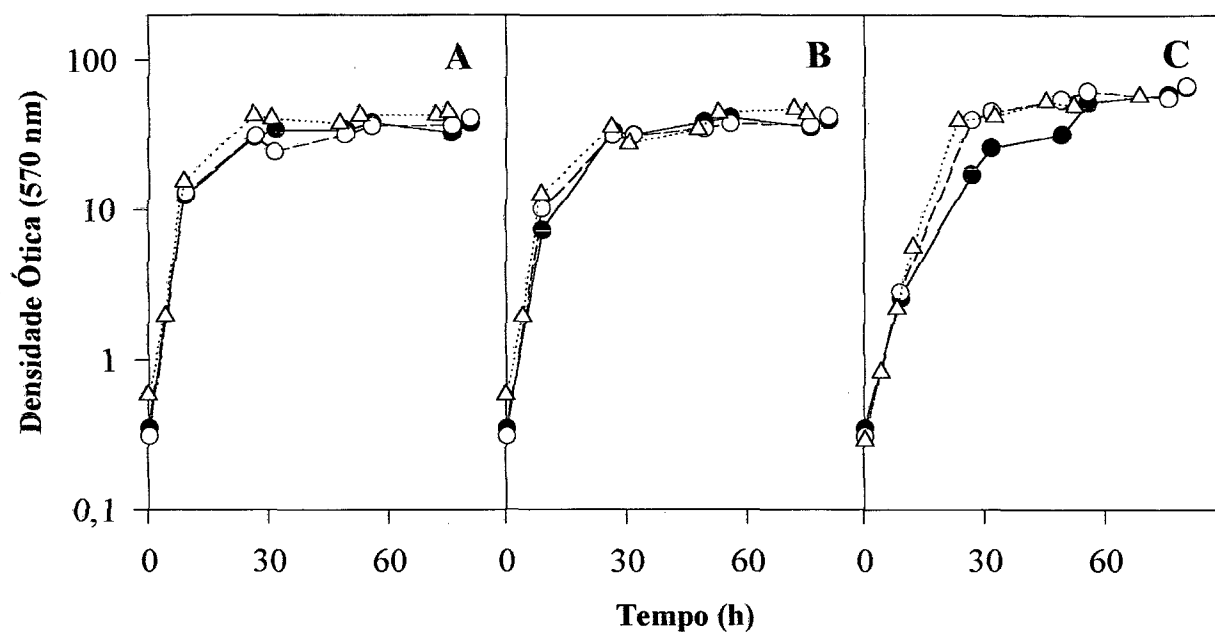


Figura 1: Crescimento aeróbio em batelada das cepas 70 (Δ), CC3 (\bullet), e 254 (\circ) em meio YEP contendo 2% (p/v) de glicose (A), maltose (B) ou maltotriose (C). As incubações foram realizadas a 28°C com agitação (160 rpm) em frascos erlenmeyers preenchidos até 1/5 de seu volume.

Tabela 2: Velocidades específicas de crescimento, e rendimento de etanol e glicerol durante o crescimento das cepas 70 e 254 em meio YEP contendo 2% (p/v) da fonte de carbono indicada. As incubações foram realizadas em frascos erlenmeyer preenchidos até 1/5 de seu volume, com agitação constante a 160 rpm e 28°C.

Cepa e		Rendimento Máximo (g [g açúcar] ⁻¹)		
Fonte de carbono	μ^* (h ⁻¹)	Biomassa	Etanol	Glicerol
<i>Cepa 70</i>				
Glicose	0,43	0,37	0,40	0,20
Maltose	0,35	0,45	0,31	0,05
Maltotriose	0,21	0,70	0,05	0,00
<i>Cepa 254</i>				
Glicose	0,41	0,64	0,33	0,04
Maltose	0,39	0,67	0,18	0,02
Maltotriose	0,18	0,90	0,01	0,00

*Velocidade específica de crescimento calculada das primeiras 8-12 h da fase exponencial.

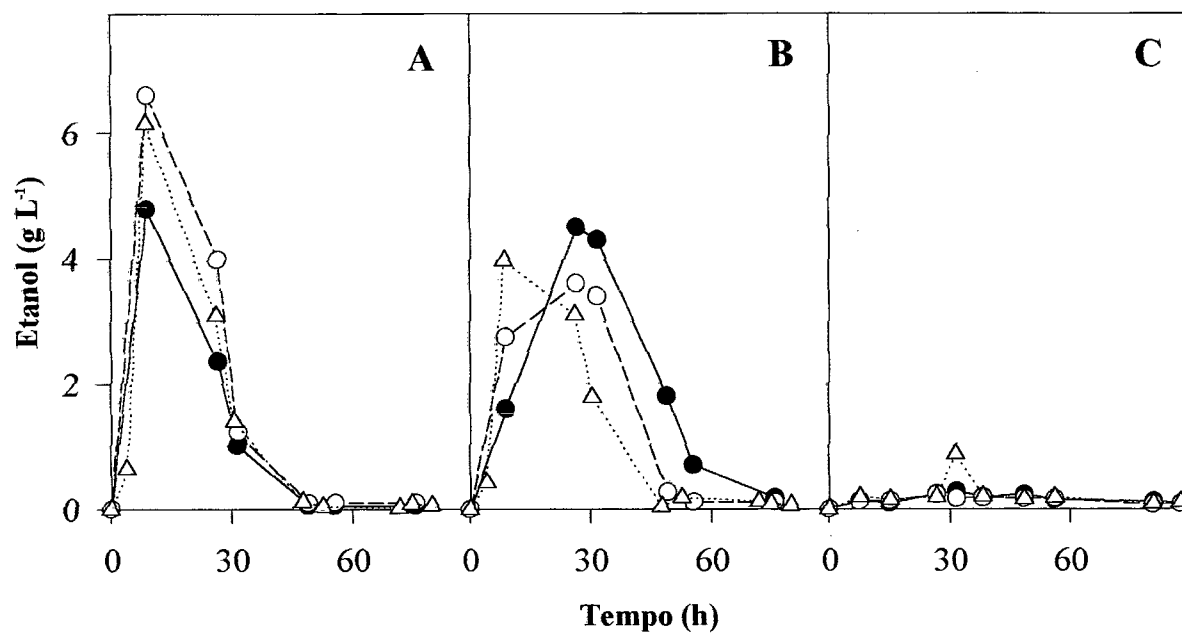


Figura 2: Produção de etanol durante o crescimento das cepas 70 (Δ), CC3 (\bullet), e 254 (\circ) em meio YEP contendo 2% (p/v) de glicose (A), maltose (B) ou maltotriose (C). As incubações foram realizadas como descrito na Figura 1.

Análise do transporte e hidrólise de maltose e maltotriose

A metabolização da maltose e maltotriose é altamente interligada. Ambos açúcares são α -glicosídeos transportados ativamente pelo co-transportador α -glicosídeo- H^+ codificado pelo gene *AGT1*. Esta permease, que é induzida pela maltose, tem a mesma afinidade pela maltose e maltotriose (dados não mostrados). Ambos açúcares são também hidrolizados por α -glicosidases induzidas por maltose que possuem praticamente a mesma afinidade para ambos os α -glicosídeos (dados não mostrados). No intuito de desvendar as bases moleculares da ausência da fermentação de maltotriose pelas leveduras, analisamos as diferenças entre as velocidades de transporte e hidrólise destes dois α -glicosídeos pela cepa 70. Esta cepa foi escolhida devido ao fato de ser a única capaz de produzir etanol ($0,9 \text{ g L}^{-1}$) quando crescida em maltotriose (Figura 2 e Tabela 2).

A Tabela 3 mostra as velocidades de transporte ativo e de hidrólise de maltotriose obtidas em células crescidas em maltotriose, comparadas com os mesmos resultados obtidos para maltose em células crescidas em maltose. Duas conclusões podem ser obtidas: (i) o transporte e não a hidrólise intracelular é o passo limitante para a utilização destes α -glicosídeos, (ii) o fluxo de moléculas de glicose na via glicolítica em células crescidas em maltose pode exceder 3 vezes àquele obtido com maltotriose.

Tabela 3: Velocidades de transporte e hidrólise de maltose e maltotriose pela cepa 70 crescida em meio YEP contendo 2% (p/v) de maltose ou maltotriose respectivamente.

Açúcar	V_{\max} (nmol min ⁻¹ [mg peso seco de células] ⁻¹)*	
	Transporte	Hidrólise
Maltose	580	1390
Maltotriose	180	405

*Para efeito comparativo, o transporte é expresso em nmol de equivalentes de glicose transportados por min⁻¹ (mg peso seco de células)⁻¹, e a hidrólise como nmol glicose liberada por min⁻¹ (mg peso seco de células)⁻¹.

Discussão

Embora a maltotriose seja considerado um açúcar “fermentável” do mosto cervejeiro, os resultados acima descritos indicam que este carboidrato não é fermentado por várias cepas industriais. Esta suposição errônea de que a maltotriose é fermentada pode ser uma consequência do tipo de análise geralmente realizada durante o processo fermentativo, onde a captação deste açúcar é determinada, e não necessariamente sua fermentação até etanol. Nossos resultados também fornecem uma chave ao problema encontrado por muitas cervejarias, isto é, a incompleta utilização deste açúcar no final do processo fermentativo (STEWART *et al.*, 1979). É bem sabido que o oxigênio realiza papéis críticos na fisiologia da levedura cervejeira, incluindo a performance fermentativa (O’CONNOR-COX *et al.*, 1996). De fato, ZHENG *et al.* (1994b) mostraram que o único fator que aumenta a assimilação de maltotriose do mosto é o aumento da oxigenação e/ou a agitação do mosto. Nossos resultados indicam que o oxigênio é necessário para a respiração da maltotriose, e é provável que os níveis de oxigênio no mosto sejam limitantes no final da fermentação, quando inicia-se a utilização da maltotriose pelas células (STEWART *et al.*, 1979).

Independentemente da energética do transporte (difusão facilitada ou transporte ativo), muitos trabalhos tem demonstrado que o passo limitante na fermentação pelas células de *S. cerevisiae* é o transporte do açúcar através da membrana plasmática (POSTMA *et al.*, 1989; SALMON & MAURICIO, 1994; KODAMA *et al.*, 1995). Embora seja comumente aceito que as células de *S.*

cerevisiae tenham uma forte tendência a realizar a fermentação alcoólica, experimentos em cultura contínua tem mostrado que isto ocorre apenas na presença de altas velocidades de captação do açúcar. Quando o açúcar é alimentado ao meio a baixa velocidade, e conseqüentemente baixas velocidades de captação são obtidas, o metabolismo do açúcar é essencialmente respiratório (POSTMA *et al.*, 1989). Devido ao influxo aumentado de açúcares supõe-se que muitos compostos se acumulem nas células, atuando como sinais na indução/repressão de vários passos metabólicos que permitem o crescimento fermentativo (revisto por GONÇALVES & PLANTA, 1998). Nossos resultados confirmam estes aspectos do metabolismo de açúcares nas células de leveduras. A maltotriose provavelmente não é fermentada por *S. cerevisiae* devido ao baixo influxo do açúcar dentro das células. Como conseqüência, baixos níveis dos compostos sinalizadores são formados, e conseqüentemente este açúcar é respirado pelas células de levedura.

Tentativas de melhorar a eficiência da fermentação de maltose nas leveduras cervejeiras vem sendo realizadas, e estas tem revelado que o principal fator limitante na velocidade da fermentação é a expressão da permease de maltose (KODAMA *et al.*, 1995). É óbvio que o co-transportador α -glicosídeo- H^+ codificado pelo gene *AGT1* poderá ser de grande importância para a fermentação de mostos contendo maltose e maltotriose, e portanto seria de maior interesse a manipulação genética de cepas contendo esta permease.

Agradecimentos

Este trabalho teve apoio financeiro da FAPESP (Nº 96/1405-7), FUNPESQUISA-UFSC e CNPq (Nº 523429/95-9). M.A.M. e C.H. receberam bolsas de iniciação científica do CNPq. Agradecemos as valiosas discussões e colaboração do Dr. P. S. de Araujo (IQ-USP) e do Dr. J. Ninow (CTC-UFSC).

Referências

- GONÇALVES PM, PLANTA RJ **Starting up yeast glycolysis.** *Trends Microbiol.* **6:** 314-319 (1998).
- JESPERSEN L, CESAR LB, MEADEN PG, JAKOBSEN M **Multiple α -glucoside transporter genes in brewer's yeast.** *Appl. Environ. Microbiol.* **65:** 450-456 (1999).
- KODAMA Y, FUKUI N, ASHIKARI T, SHIBANO Y, MORIOKA-FUJIMOTO K, HIRAKI Y, NAKATANI K **Improvement of maltose fermentation efficiency: constitutive expression of MAL genes in brewing yeasts.** *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **53:** 24-29 (1995).
- LAGUNAS R **Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars.** *Mol. Cell. Biochem.* **27:** 139-146 (1979).
- O'CONNOR-COX ESC, LODOLO EJ, AXCELL BC **Mitochondrial relevance to yeast fermentative performance: A review.** *J. Inst. Brew.* **102:** 19-25 (1996).

- POSTMA E, SCHEFFERS WA, VAN DIJKEN JP **Kinetics of growth and glucose transport in glucose-limited chemostat cultures of *S. cerevisiae* CBS 8066.** *Yeast* **5**: 159-165 (1989).
- SALMON JM, MAURICIO JC **Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcoholic fermentation.** *Biotechnol. Lett.* **16**: 89-94 (1994).
- STAMBUK BU **A simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast α -glucosidase.** *Biochem. Educ.* **27**: 177-180 (1999).
- STAMBUK BU, PANEK AD, CROWE JH, CROWE LM, DE ARAUJO PS **Expression of high-affinity trehalose- H^+ symport in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochim. Biophys. Acta* **1379**: 118-128 (1998).
- STAMBUK BU, DA SILVA MA, PANEK AD, DE ARAUJO PS **Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 105-110 (1999).
- STEWART GG, ERRATT J, GARRISON I, GORING T, HANCOCK I **Studies on the utilization of wort carbohydrates by Brewer's yeast strains.** *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **16**: 1-7 (1979).
- VAN DIJKEN JP, VAN DEN BOSCH JJ, HERMANS L, DE MIRANDA R, SCHEFFERS WA **Alcoholic fermentation by 'non-fermenting' yeasts.** *Yeast* **2**: 123-127 (1986).

ZHENG X, D'AMORE T, RUSSELL I, STEWART GG **Transport kinetics of maltotriose in strains of *Saccharomyces*. *J. Ind. Microbiol.* 13: 159-166 (1994a).**

ZHENG X, D'AMORE T, RUSSELL I, STEWART GG **Factors influencing maltotriose utilization during brewery wort fermentations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52: 41-47 (1994b).**

**“Otimização da Fermentação de Maltotriose por
Saccharomyces cerevisiae”**

Trabalho a ser submetido para publicação na revista indexada *Journal of
Industrial Microbiology & Biotechnology*

CAPÍTULO III

Otimização da Fermentação de Maltotriose por *Saccharomyces cerevisiae**

CR Zastrow, C Hollatz & BU Stambuk

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brasil.

Palavras-chave: cervejaria, fermentação, maltose, maltotriose, *Saccharomyces*, transporte

Notas:

Correspondência: Dr BU Stambuk, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brasil. Fone: +55 48 331-9589, Fax: +55 48 331-9672, e-mail: bstambuk@mbox1.ufsc.br

*Parte destes resultados foram apresentados no *Third Conference on Recent Advances in Fermentation Technology (RAFT III)*, realizado em Sarasota, FL, Novembro, 1999.

Resumo

Maltotriose, o segundo açúcar mais abundante do mosto cervejeiro, não é fermentado mas respirado por muitas das cepas de levedura industriais. Nós isolamos uma cepa capaz de crescer em placas contendo maltotriose e o inibidor da cadeia respiratória antimicina A. Como esperado, esta cepa produziu a mesma quantidade de etanol a partir de glicose, maltose ou maltotriose. A seguir realizamos uma detalhada análise das velocidades de transporte e hidrólise de maltose e maltotriose por esta cepa, e por uma cepa incapaz de fermentar este último açúcar. Nossos resultados indicam que as células de leveduras não possuem uma α -glicosidase específica para maltotriose, sendo que as cinéticas de hidrólise por ambas as cepas são também semelhantes. No caso do transporte ativo dos açúcares um padrão diferente foi observado: a cepa capaz de fermentar a maltotriose apresentou a mesma velocidade de transporte de maltose e maltotriose, enquanto que a cepa incapaz de fermentar a maltotriose apresentou uma menor velocidade de transporte de maltotriose, quando comparado com a velocidade do transporte ativo de maltose. Portanto, nossos resultados revelam que o transporte através da membrana plasmática, e não a hidrólise intracelular, é o passo limitante para a fermentação (ou não) deste açúcar. Finalmente, foi verificado também que o magnésio, um conhecido íon que melhora a fermentação do mosto cervejeiro, aumenta significativamente a produção de etanol a partir de maltotriose pelas células de leveduras.

Introdução

Os açúcares fermentáveis mais abundantes no mosto cervejeiro são a maltose (50-60%), maltotriose (15-20%) e glicose (10-15%). Embora a maltotriose seja o segundo açúcar mais abundante do mosto cervejeiro, este tem a última prioridade de captação pelas células de levedura. Em geral, somente quando a metade da glicose presente no mosto tenha sido captada pelas células é que se iniciará a captação de maltose e maltotriose, com uma menor velocidade de transporte de maltotriose do que a de maltose [25,26,41]. Esta menor, e muitas vezes incompleta captação de maltotriose pelas leveduras leva a um dos problemas encontrados por algumas cervejarias: um produto final com elevada quantidade de açúcares, e uma cerveja com sabor atípico e qualidade inferior. A velocidade de captação e metabolização da maltotriose durante as fermentações é, portanto, um dos fatores determinantes na eficiência do processo fermentativo e na qualidade do produto final. Entretanto, o metabolismo da maltotriose tem recebido pouca atenção comparado aos mecanismos de utilização de maltose e glicose pelas células de levedura industriais [2-5].

A utilização de maltose requer a presença de pelo menos um dos cinco homólogos e independentes loci *MAL*: *MAL1* até *MAL4* e *MAL6* [21]. Cada locus contém pelo menos uma cópia de três genes separados que codificam para a permease de maltose (*MALx1*, onde *x* representa um dos cinco loci *MAL*), maltase (*MALx2*) e a proteína reguladora (*MALx3*) que induz a transcrição dos

dois genes anteriores na presença de maltose. A permease para maltose transporta este açúcar através da membrana celular e, em seguida, a maltase citoplasmática (α -glicosidase) hidroliza a maltose em duas unidades de glicose, que são então canalizadas pela via glicolítica.

Entretanto, a glicose é a fonte de carbono preferida pelas células de *S. cerevisiae*, e um complexo circuito regulatório foi desenvolvido para garantir que a expressão de enzimas alternativas na utilização de outros açúcares (uncluindo a permease para maltose e a maltase) seja reprimida quando a glicose está presente no meio de crescimento [11,12,21]. Esta situação também é observada durante a fermentação dos mostos industriais, e é agravada pela utilização de adjuntos, como glicose, frutose ou inclusive a sacarose [2-4]. A análise detalhada dos mecanismos moleculares da repressão causada pela glicose sobre a transcrição dos genes *MAL* tem permitido o desenvolvimento de cepas com fermentação da maltose incrementada tanto pela utilização da seleção clássica de cepas e/ou técnicas genéticas [22,23,27,28], alterando as condições fisiológicas das células [5,9] ou mesmo pela utilização das técnicas do DNA recombinante [10,14,15,24].

A maior parte dos estudos relacionados com a utilização de maltotriose pelas leveduras tem analisado os fatores ambientais, ou características de cada cepa, que poderiam influenciar na captação desta fonte de carbono durante o processo fermentativo [2,5,6,28,30,31,40,44]. Estudos anteriores sobre a utilização de açúcares pelas leveduras demonstraram que a maltose e a

maltotriose são transportados através da membrana plasmática por sistemas de transporte diferentes [31,38]. Embora o transporte de maltotriose tenha sido estudado em um grande número de cepas industriais [6,8,20,43], a identidade molecular desta permease permaneceu desconhecida até pouco tempo atrás quando o gene de uma nova permease (*AGT1*) com especificidade por um amplo espectro de substratos foi caracterizada [7]. A permease do gene *AGT1* é um transportador ativo capaz de transportar uma série de α -glicosídeos, incluindo maltose, melezitose, trealose, sacarose, α -metilglicosídeo e maltotriose [34-37]. De acordo com a importância do transporte de maltotriose para as aplicações industriais das leveduras, praticamente todas as cepas cervejeiras têm a permease codificada pelo gene *AGT1* [13].

Recentemente demonstramos que a maltotriose não é fermentada, mas sim respirada por várias cepas industriais [42]. Resultados semelhantes também foram observados com outro α -glicosídeo, o dissacarídeo trehalose, que também é respirado pelas células de levedura [18]. Em ambos os casos, o influxo do açúcar na glicólise parece ser o passo limitante na fermentação do α -glicosídeo [18,42]. No intuito de desvendar as bases moleculares da utilização de maltotriose pelas leveduras isolamos uma cepa capaz de fermentar este açúcar, e realizamos uma análise detalhada de vários parâmetros bioquímicos que poderiam estar envolvidos na fermentação de maltotriose. Nossos resultados indicam que o transporte ativo de maltotriose através da membrana plasmática, e não a hidrólise intracelular, é o passo limitante para a fermentação deste açúcar.

Adicionalmente, mostramos que a adição de Mg^{2+} no meio aumenta significativamente a produção de etanol a partir de maltotriose pelas células de *S. cerevisiae*.

Materiais e métodos

Materiais

Os componentes do meio foram adquiridos da Difco (EUA). Glicose, maltose, maltotriose, *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo, fenilmetilsulfonil fluoreto e antimicina A foram obtidos da Sigma (EUA). Os kits enzimáticos comerciais para a determinação de glicose e glicerol foram da Biobrás (Brasil). Anfólitos® (pH 5.0-7.0 e pH 3.5-10.0), e marcadores protéicos de ponto isoelétrico (pI 3.5-9.3) foram obtidos da Amersham Pharmacia Biotech (Suíça). 5-bromo-4-cloro-3-indoilo- α -D-glicopiranosídeo (X- α -glicosídeo) foi obtido da Calbiochem (EUA). Todos os outros reagentes químicos utilizados eram de grau analítico.

Cepas utilizadas e condições de cultivo

Duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizadas neste trabalho. A cepa 70 (gentilmente cedida pela Dr. Anita D. Panek, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil) é uma cepa de panificação da Labatt Brewing Company (Ontário, Canadá) e foi descrita anteriormente [42]. A cepa B01 foi isolada de

uma massa de fermento de uma companhia cervejeira local através do método de semeadura por esgotamento. As células foram crescidas em batelada (28°C e 160 rpm) em meio YEP (pH 5.0) contendo por litro: Bacto peptona 20 g, extrato de levedura 10 g e 20 g da fonte de carbono indicada (glicose, maltose ou maltotriose). O meio sólido continha por litro 20 g de Bacto agar e, quando indicado, 3 mg de antimicina A. A curva de crescimento foi determinada por medidas de turbidez a 570 nm e a quantidade de células expressa em peso seco (determinada com células filtradas, lavadas com água destilada e secas a 80°C por 48 h). As células foram centrifugadas (2500 g, 3 min) na fase exponencial de crescimento e lavadas duas vezes com água destilada gelada antes de serem utilizadas. Alternativamente, amostras da cultura foram centrifugadas (5000 g, 3 min) e o sobrenadante utilizado para a determinação de etanol e glicerol.

Determinação de glicose, etanol e glicerol

A glicose foi determinada pelo método da glicose oxidase e peroxidase utilizando-se um kit comercial. O etanol foi determinado no sobrenadante das culturas por cromatografia a gás (CG Instrumentos Científicos Ltda., Brasil) com uma coluna Poropak Q-80-100 e um detector de ionização a chama com um sistema integrador computadorizado. O glicerol foi determinado com kits enzimáticos comerciais baseados na glicerol quinase, glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase.

Extratos Celulares

As células lavadas foram ressuspensas em tampão A refrigerado (100 mM MOPS-NaOH pH 6.8) contendo 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoreto, 20% (v/v) glicerol e 1 mM de EDTA. As células foram rompidas por agitação vigorosa num misturador vortex na presença de pérolas de vidro (0.5 mm de diâmetro) por cinco períodos de 1-min com intervalos de 1-min. Durante os intervalos os tubos foram mantidos no gelo. Os extratos foram centrifugados (10000 g, 5 min) e o sobrenadante utilizado para a determinação da α -glucosidase total e as análises de isoeletrofocalização.

Determinação da Atividade α -Glicosidase

A atividade α -glicosidase total presente nos extratos celulares foi determinada pela hidrólise de 1 mM *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo em tampão A a 30°C. O *p*-nitrofenol liberado foi determinado a 400 nm ($\Delta\epsilon = 7.28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A atividade α -glicosidase com maltose ou maltotriose (0.5 a 100 mM) foi determinada *in situ* com células permeabilizadas como descrito previamente [33]. Todos os ensaios foram realizados pelo menos em duplicata e foram utilizados controles com células ou extratos previamente fervidos.

Isoeletrofocalização

Os géis de isoeletrofocalização foram preparados e processados como descrito [32]. A eletroforese foi realizada em géis verticais a 4°C utiliz&o-se 150 V durante 1 h e 400 V durante a noite numa corrente constante de 10 mA. Após a isoeletrofocalização os géis foram corados com Azul de Coomassie R250, ou as diferentes isoformas da α -glicosidase presentes no gel foram reveladas com X- α -glicosideo, o qual após a hidrólise por α -glicosidases produz uma coloração azul facilmente detectável [16]. Alternativamente, o gel foi embebido com tampão A por 5 min e colocado sobre dois pedaços de papel Whatman N° 1 embebidos no reagente da glicose oxidase/peroxidase utilizada para a determinação de glicose. Uma solução 200 mM de maltose ou maltotriose em tampão A foi adicionada sobre a superfície do gel, e incubada por 20-30 min a temperatura ambiente para que o reagente enzimático do papel entrasse em contato com as moléculas de glicose liberadas durante a hidrólise dos substratos.

Ensaio de Transporte

As velocidades de co-transporte de prótons com maltose ou maltotriose foram determinadas como descrito anteriormente [34-37] utilizando os açúcares de 0.2 a 150 mM. Todos os ensaios foram realizados no mínimo em duplicata, e o desvio máximo encontrado foi menor que 10%.

Resultados e discussão

Seleção de uma cepa capaz de fermentar a maltotriose

Nós descrevemos anteriormente [42] que a antimicina A, inibidor da cadeia respiratória, inibia completamente o crescimento em maltotriose de várias cepas selvagens e industriais de levedura, enquanto que o crescimento em glicose ou maltose não era afetado (vide cepa 70 na Figura 1). Utilizamos a inibição do crescimento pela antimicina A para isolar uma cepa de levedura capaz de fermentar a maltotriose. Células de levedura de um fermento cervejeiro foram semeadas em placas com maltotriose contendo antimicina A, e após 3 dias algumas colônias que apresentaram crescimento no meio foram devidamente purificadas. Uma colônia que apresentou um crescimento vigoroso na presença de maltotriose e antimicina A (vide cepa B01 na Figura 1) foi caracterizada em detalhes. A Tabela 1 mostra que enquanto a cepa 70 é capaz de produzir etanol e glicerol a partir de glicose e maltose, mas não a partir da maltotriose, a cepa B01 produziu praticamente a mesma quantidade de etanol a partir dos três açúcares. No intuito de desvendar as bases moleculares que permitem que esta cepa fermente a maltotriose foram analisadas as diferenças nas cinéticas de transporte e hidrólise de maltose e maltotriose pela cepa B01 e pela cepa 70.

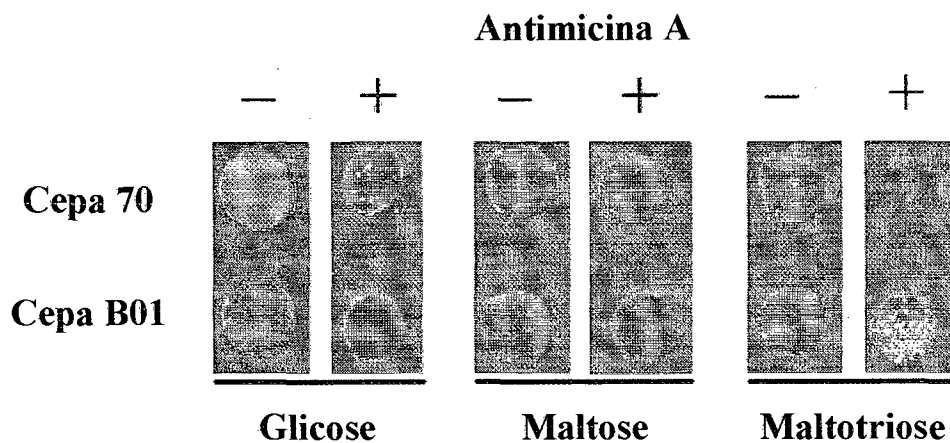


Figura 1. Inibição do crescimento em maltotriose pela antimicina A. Células da cepa 70 e B01 foram inoculadas em placas com meio YEP contendo 2% da fonte de carbono indicada na ausência (-) ou presença (+) de antimicina A, e incubadas a 28 °C durante 3 dias.

Tabela 1. Velocidades específicas de crescimento e produção de etanol e glicerol durante o crescimento das cepas *70* e *B01* em meio YEP contendo 20 g L⁻¹ da fonte de carbono indicada.

Cepa	Fonte de Carbono	μ_{\max}^a (h ⁻¹)	Biomassa ^b (g L ⁻¹)	Etanol ^c (g L ⁻¹)	Glicerol ^c (g L ⁻¹)
<i>70</i>	Glicose	0,43	7,2	8,0	0,43
	Maltose	0,35	9,0	6,2	0,06
	Maltotriose	0,21	13,8	1,1	0
<i>B01</i>	Glicose	0,30	4,7	6,5	0,28
	Maltose	0,27	7,2	6,9	0,14
	Maltotriose	0,23	12,7	7,0	0,16

^aVelocidade específica de crescimento calculada nas primeiras 8-12 h da fase exponencial.

^bOs valores máximos de biomassa foram medidos no final do crescimento celular.

^cAs concentrações máximas de etanol e glicerol foram obtidas a partir de pelo menos dois experimentos separados com erros entre os experimentos < 10 %.

Análise da hidrólise de maltose e maltotriose

As leveduras possuem muitas isoformas da α -glicosidase [16,17,19,32,39]. Enquanto que algumas isoformas são capazes de hidrolizar tanto maltose como maltotriose, outras são específicas para α -metilglicosídeo [19,32]. Entretanto, estas atividades sempre foram purificadas e/ou caracterizadas a partir de células crescidas em maltose, e não se sabe se a maltotriose é capaz de induzir a síntese de uma α -glicosidase específica para este açúcar. Portanto, realizamos a isoeletrofocalização de extratos celulares obtidos a partir de ambas as cepas crescendo tanto em maltose como em maltotriose (Figura 2). Embora ambas as cepas apresentassem diferentes padrões de isoformas da α -glicosidase, as mesmas isoformas foram expressas nas células crescidas em maltose ou maltotriose, indicando que ambos os açúcares induzem a síntese das mesmas α -glicosidases. Além disso, as mesmas isoformas que hidrolizavam maltose também hidrolizaram maltotriose (Figura 2). Portanto, nossos resultados indicam que não existe uma α -glicosidase específica para maltotriose nas cepas analisadas. Ambas as cepas apresentavam uma maior atividade α -glicosidase com maltose nas células crescidas em maltose, do que a hidrólise de maltotriose pelas células de levedura crescidas em maltotriose (Figura 3), indicando que a maltose é um indutor mais forte das enzimas. Porém, como as cinéticas de hidrólise de maltotriose (e maltose) por ambas as cepas eram muito similares (Figura 3), a hidrólise intracelular da maltotriose não pode ser o passo limitante na fermentação deste açúcar.

Cepa:	70	B01
Açúcar:	M Mt	M Mt

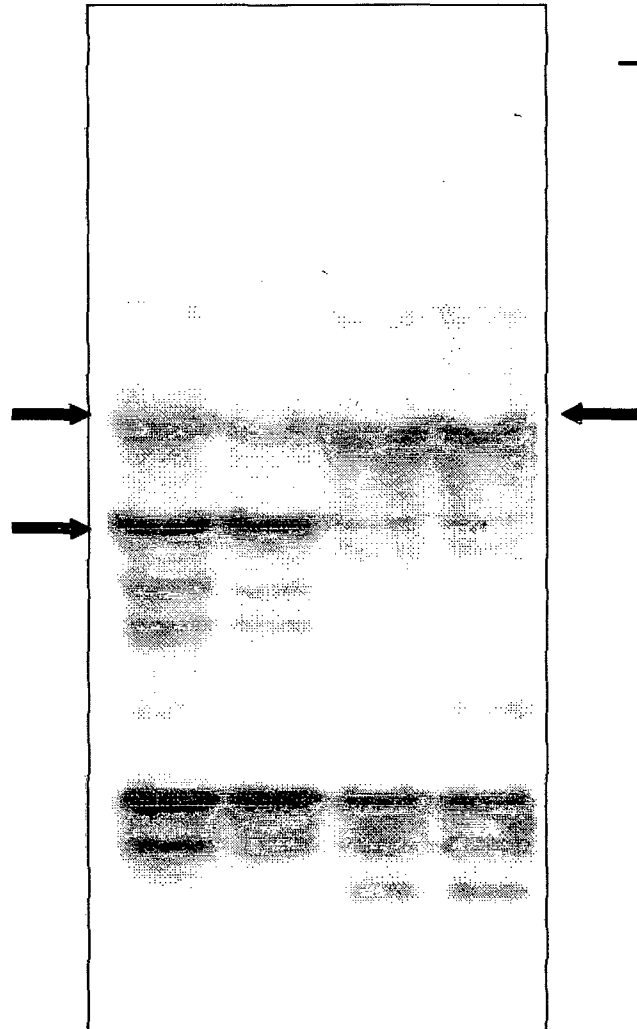


Figura 2. Caracterização das diferentes α -glicosidases por isoeletrofocalização. Os extratos celulares foram preparados a partir das cepas indicadas, crescidas em maltose (M) ou maltotriose (Mt), e as α -glicosidases separadas de acordo com seu ponto isoelétrico e reveladas com X- α -glicosídeo. As flechas indicam as isoformas capazes de hidrolizar maltose e maltotriose.

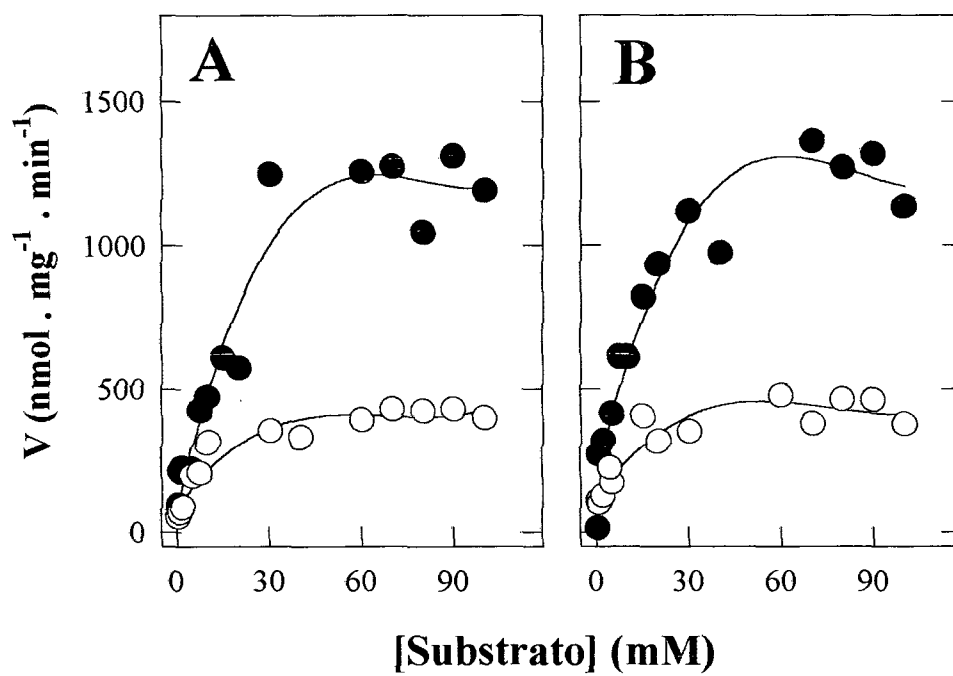


Figura 3: Cinética de hidrólise de α -glicosídeos pela cepa 70 (A) ou B01 (B). A hidrólise de maltose (●) ou maltotriose (○) foi determinada *in situ* nas células crescidas em maltose ou maltotriose, respectivamente, com as concentrações de açúcares indicadas. A atividade é expressa como nmol de glicose liberadas de cada substrato por min [mg células secas]⁻¹.

Análise do transporte ativo de maltose e maltotriose

S. cerevisiae é um microrganismo altamente adaptado para a utilização eficiente de açúcares. Como consequência ele geralmente possui inúmeras permeases, com diferentes afinidades pelo substrato, para assegurar que a captação de açúcares do meio seja realizada eficientemente. De fato já foi demonstrado que o transporte de maltose e maltotriose pelas células de levedura é realizado por sistemas de alta e baixa afinidade pelo substrato [1,37,43]. Realizamos, portanto, uma análise cinética detalhada da captação ativa destes α -glicosídeos por ambas as cepas crescidas nos respectivos açúcares (Figura 4). A captação de maltose pelas cepas 70 e B01 é realizado por duas atividades de transporte com alta ($K_m \sim 1-5$ mM) e baixa afinidade ($K_m \sim 20$ mM) pelo substrato, como previamente descrito [1,36]. No caso da captação de maltotriose foram observadas cinéticas diferentes: a cepa 70 apresentou um único sistema de transporte de baixa afinidade, realizado provavelmente pela permease do gene *AGT1* [36], enquanto que a cepa B01 apresentou sistemas de transporte de alta e baixa afinidade para maltotriose (Figura 4). Todavia, enquanto que a cepa B01 tem a mesma capacidade (V_{max}) de transporte de maltose e maltotriose, a cepa 70 apresenta uma menor capacidade de transporte de maltotriose, quando comparada com a V_{max} para a captação de maltose. Portanto, o único parâmetro metabólico que pode ser correlacionado com a capacidade (ou não) de uma determinada cepa de fermentar a maltotriose é o transporte ativo do açúcar através da membrana plasmática.

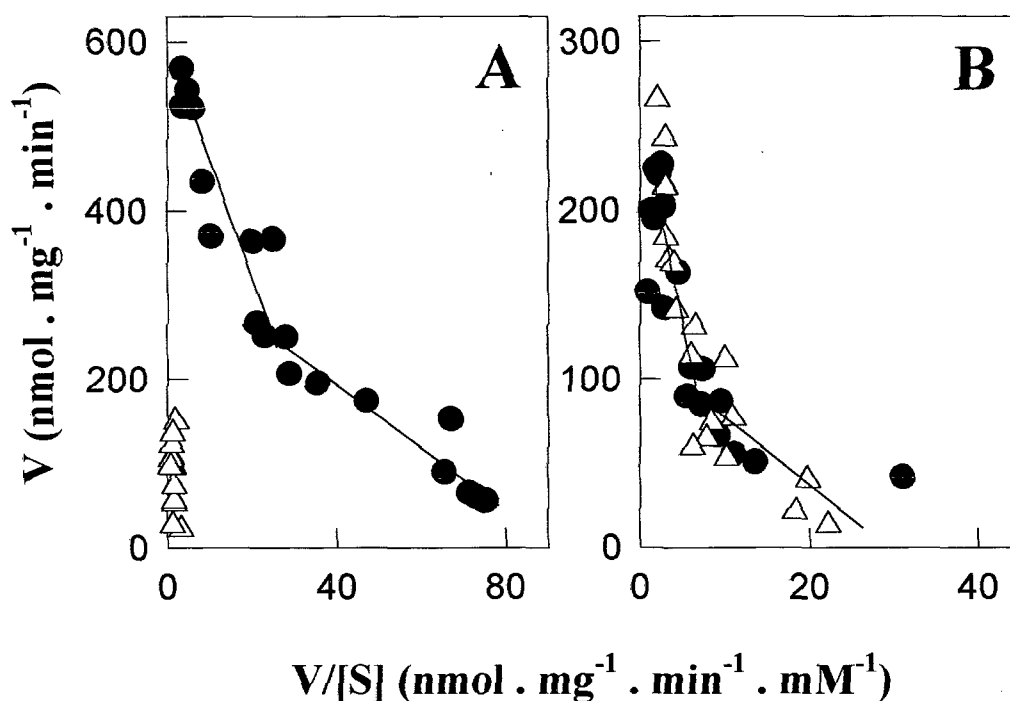


Figura 4. Cinética do transporte ativo de α -glicosídeos pela cepa 70 (A) ou B01 (B). O transporte ativo de maltose (●) ou maltotriose (Δ) foi determinado em células crescidas em maltose ou maltotriose, respectivamente, com concentrações de substrato de 0.2 a 150 mM. A atividade é expressa como nmol de equivalente de glicose transportados por min [mg células secas]⁻¹.

Otimização da fermentação de maltotriose pelas células de levedura

A maltose é um forte indutor tanto da expressão das α -glicosidases (vide acima) como da permease *AGT1* [7,34,35]. Assim, analisamos se a presença de maltose no meio de crescimento poderia melhorar a fermentação da maltotriose pelas leveduras. As fermentações foram realizadas na presença de 10 g L⁻¹ de maltose ou maltotriose separadamente, ou na presença de ambos os açúcares. Sorbitol, açúcar que não é metabolizado nem transportado pelas leveduras foi adicionado apropriadamente para igualar a pressão osmótica do meio. Como pode ser visto na Tabela 2, misturas de maltose e maltotriose não melhoraram a performance da fermentação por ambas as cepas.

O magnésio é um íon metálico essencial que incrementa a velocidade da fermentação de mostos normais e concentrados [29,30]. O aumento da fermentação pode ser consequência de um incremento (7-15%) na captação dos açúcares e/ou na vitalidade celular [29,30]. Portanto, o efeito do aumento da concentração de Mg²⁺ na fermentação da glicose, maltose e maltotriose foi analisado. Nossos resultados (Tabela 3) mostram que enquanto este íon não tem efeito significativo na performance das fermentações da cepa *B01* com nenhum destes três açúcares, e nem na cepa *70* com glicose e maltose, o aumento da concentração de Mg²⁺ incrementou significativamente (>300%) a fermentação da maltotriose pela cepa *70*. As bases moleculares do aumento da produção de etanol durante a fermentação de maltotriose são no momento desconhecidas, sendo que estamos atualmente investigando os efeitos deste íon nos parâmetros

cinéticos, na expressão e na estabilidade protéica do sistema de transporte de maltotriose pelas células de levedura.

Tabela 2. Rendimento em etanol e glicerol após o crescimento em maltose, maltotriose, ou na mistura de ambos os açúcares.

Cepa	Fonte de carbono	Rendimento máx. (g [g açúcar] ⁻¹)	
		Etanol	Glicerol
70	1% maltose (+ 1% sorbitol)	0.54	0.01
	1% maltotriose (+ 1% sorbitol)	0.08	0
	1% maltose + 1% maltotriose	0.31	0.01
B01	1% maltose (+ 1% sorbitol)	0.49	0.02
	1% maltotriose (+ 1% sorbitol)	0.38	0.02
	1% maltose + 1% maltotriose	0.47	0.02

Tabela 3. Produção de etanol durante a fermentação de 20 g L⁻¹ de glicose, maltose ou maltotriose na presença ou não de 20 mM Mg²⁺.

Cepa	Fonte de Carbono	Rendimento máx. etanol (g [g açúcar] ⁻¹)	
		Controle	+ 20 mM Mg ²⁺
<i>70</i>	Glicose	0,40	0,38
	Maltose	0,32	0,37
	Maltotriose	0,06	0,18
<i>B01</i>	Glicose	0,32	0,27
	Maltose	0,35	0,37
	Maltotriose	0,36	0,35

Conclusões e perspectivas futuras

Os resultados obtidos indicam que o transporte de maltotriose através da membrana plasmática é o passo limitante da fermentação deste açúcar pelas células de leveduras. Tentativas de melhorar a eficiência da fermentação de maltose por leveduras cervejeiras tem revelado que a expressão da permease para a maltose é o fator limitante na fermentação [15,24]. Certamente que a permease de maltotriose é de grande importância para a fermentação de mostos cervejeiros, e a manipulação genética de cepas contendo esta permease seria de enorme interesse.

Agradecimentos

Este trabalho teve apoio financeiro da FAPESP (Nº 96/1405-7), FUNPESQUISA-UFSC e CNPq (Nº 523429/95-9). C.H. recebeu bolsa de iniciação científica do CNPq. Agradecemos as valiosas e importantes colaborações com o Dr. P. S. de Araujo (IQ-USP) e o Dr. J. Ninow (CTC-UFSC).

Referências Bibliográficas

- 1 CRUMPLEN R. M., J. C. SLAUGHTER & G.G. STEWART **Characteristics of maltose transporter activity in an ale and lager strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae***. *Lett Appl Microbiol* 23: 448-452, 1996.
- 2 D'AMORE T., I. RUSSELL & G.G. STEWART **The effects of carbohydrate adjuncts on brewer's wort fermentation by *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*)**. *J Ins Brew* 95: 333-336, 1989.
- 3 D'AMORE T., I. RUSSELL & G.G. STEWART **Sugar utilization by yeast during fermentation**. *J Ind Microbiol* 4: 315-324, 1989.
- 4 ERNANDES J. R., T. D'AMORE, I. RUSSELL & G. G. STEWART **Regulation of glucose and maltose transport in strains of *Saccharomyces***. *J Ind Microbiol* 9: 127-130, 1992.
- 5 ERNANDES J. R., J. W. WILLIAMS, I. RUSSELL & G. G. STEWART **Effect of yeast adaptation to maltose utilization on sugar uptake during the fermentation of brewer's wort**. *J Inst Brew* 99: 67-71, 1993.
- 6 GRIFFIN S. R. **Fast and slow fermentation of brewer's wort by strains of *Saccharomyces cerevisiae***. *J Inst Brew* 76: 41-45, 1970.
- 7 HAN E. K., F. COTTY, C. SOTTAS, H. JIANG & C. A. MICHELS **Characterization of *AGT1* encoding a general α -glucoside transporter from *Saccharomyces***. *Mol Microbiol* 17: 1093-1107, 1995.

- 8 HARRIS G. & C. C. THOMPSON **Uptake of nutrients by yeasts. II. Maltotriose permease and the utilization of maltotriose by yeasts.** *J Inst Brew* 66: 293-297, 1960.
- 9 HAZELL B. W. & P. V. ATTFIELD **Enhancement of maltose utilization by *Saccharomyces cerevisiae* in medium containing fermentable hexoses.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 22: 627-632, 1999.
- 10 HIGGINS V. J., M. BRAIDWOOD, P. BELL, P. BISSINGER, I. W. DAWES & P. V. ATTFIELD **Genetic evidence that high noninduced maltase and maltose permease activities, governed by *MALx3*-encoded transcriptional regulators, determine efficiency of gas production by baker's yeast in unsugared dough.** *Appl Environ Microbiol* 65: 680-685, 1999.
- 11 HU Z., J. O. NEHLIN, H. RONNE & C. A. MICHELS ***MIG1*-dependent and *MIG1*-independent glucose regulation of *MAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Curr Genet* 28: 258-266, 1995.
- 12 HU Z., Y. YUE, H. JIANG, B. ZHANG, P. W. SHERWOOD & C. A. MICHELS **Analysis of the mechanism by which glucose inhibits maltose induction of *MAL* gene expression in *Saccharomyces*.** *Genetics* 154: 121-132, 2000.
- 13 JESPERSEN L., L. B. CESAR, P. G. MEADEN & M. JAKOBSEN **Multiple α -glucoside transporter genes in brewer's yeast.** *Appl Environ Microbiol* 65: 450-456, 1999.

- 14 KLEIN C. J. L., L. OLSSON, B. RONNOW, J. D. MIKKELSEN & J. NIELSEN **Alleviation of glucose repression of maltose metabolism by *MIG1* disruption in *Saccharomyces cerevisiae*.** Appl Environ Microbiol 62: 4441-4449, 1996.
- 15 KODAMA Y., N. FUKUI, T. ASHIKARI, Y. SHIBANO, K. MORIOKA-FUJIMOTO, Y. HIRAKI & K. NAKATANI **Improvement of maltose fermentation efficiency: constitutive expression of *MAL* genes in brewing yeasts.** J Am Soc Brew Chem 53: 24-29, 1995.
- 16 KOPETZKI E., P. BUCKEL & G. SCHUMACHER **Cloning and characterization of baker's yeast α -glucosidase: over-expression in a yeast strain devoid of vacuolar proteinases.** Yeast 5: 11-24, 1989.
- 17 KRAKENAITE R. P. & A. A. GLEMZHA **Some properties of two forms of α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* II.** Biokhimiia 48: 62-68, 1983.
- 18 MALLUTA E. F., P. DECKER & B. U. STAMBUK **The Kluyver effect for trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*.** J Basic Microbiol 40: 199-205, (2000)
- 19 MATSUSAKA K., S. CHIBA & T. SHIMOMURA **Purification and substrate specificity of brewer's yeast α -glucosidase.** Agric Biol Chem 41: 1917-1923, 1977.

- 20 MICHALJANICOVA D., J. HODAN & A. KOTYK **Maltotriose transport and utilization in baker's and brewer's yeast.** *Folia Microbiol* 27: 217-221, 1982.
- 21 NEEDLEMAN R. **Control of maltase synthesis in yeast.** *Mol Microbiol* 5: 2079-2084, 1991.
- 22 NOVAK S., T. D'AMORE, I. RUSSELL & G. G. STEWART **Characterization of sugar transport in 2-deoxy-D-glucose resistant mutants of yeast.** *J Ind Microbiol* 6: 149-156, 1990.
- 23 ODA Y. & OUCHI K. **Role of the yeast maltose fermentation genes in CO₂ production rate from sponge dough.** *Food Microbiol* 7: 43-47, 1990.
- 24 OSINGA K. A., A. C. H. M. RENNIERS, J. W. WELBERGEN, R. H. ROOBOL & W. VAN DER WILDEN **Maltose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 5: S207-S212, 1989.
- 25 PANCHAL C. J. & G. G. STEWART **Utilization of wort carbohydrates.** *Brew Dig* 54: 26-48, 1979.
- 26 PATEL G. B. & W. M. INGLEDEW **Trends in wort carbohydrate utilization.** *Appl Microbiol* 26: 349-353, 1973.
- 27 PHAWENI M., E. S. C. O'CONNOR-COX, A. T. W. PICKERELL & B. AXCELL **The effects of glucose adjunct in high gravity fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* 2036.** *J Inst Brew* 98: 179-185, 1992.

- 28 RANDEZ F. & P. SANZ **Construction of industrial baker's yeast strains able to assimilate maltose under catabolite repression conditions.** Appl Microbiol Biotechnol 42: 581-586, 1994.
- 29 REES E. M. R. & G. G. STEWART **The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts.** J Inst Brew 103: 287-291, 1997.
- 30 REES E. M. R. & G. G. STEWART **Effects of magnesium, calcium and wort oxygenation on the fermentative performance of ale and lager strains fermenting normal and high gravity worts.** J Inst Brew 105: 211-217, 1999.
- 31 RUSSELL I. & G. G. STEWART **Transformation of maltotriose uptake ability into a haploid strain of *Saccharomyces* spp.** J Inst Brew 86: 55-59, 1980.
- 32 SPIELMAN L. L. & D. B. MOWSHOWITZ **A specific stain for α -glucosidases in isoelectric focusing gels.** Anal Biochem 120: 66-70, 1982.
- 33 STAMBUK B. U. **A simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast α -glucosidase.** Biochem Educ 27: 177-180, 1999.
- 34 STAMBUK B. U., A. D. PANEK, J. H. CROWE, L. M. CROWE & P. S. DE ARAUJO **Expression of high-affinity trehalose- H^+ symport in *Saccharomyces cerevisiae*.** Biochim Biophys Acta 1379: 118-128, 1998.

- 35 STAMBUK B. U., M. A. DA SILVA, A. D. PANEK & P. S. DE ARAUJO **Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae***. FEMS Microbiol Lett 170: 105-110, 1999.
- 36 STAMBUK B. U., A. S. BATISTA & P. S. DE ARAUJO **Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae***. J Biosci Bioeng 89: 213-216, 2000.
- 37 STAMBUK B. U., & P. S. DE ARAUJO **Kinetics of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae***. Biochim Biophys Acta (Submetido) 2000.
- 38 STEWART G. G., J. ERRATT, I. GARRISON, T. GORING & I. HANCOCK **Studies on the utilization of wort carbohydrates by brewer's yeast strains**. Tech Q Master Brew Assoc Am 16: 1-7, 1979.
- 39 TABATA S., T. IDE, Y. UMEMURA & K. TORII **Purification and characterization of α -glucosidases produced by *Saccharomyces cerevisiae* in response to three distinct maltose genes**. Biochim Biophys Acta 797: 231-238, 1984.
- 40 VISURI K. & B. H. KIRSOP **The influence of pH and of selected cations on the fermentation of maltose and maltotriose**. J Inst Brew 76: 362-366, 1970.
- 41 YAMAMOTO Y. & T. INOUE **Studies of the poor attenuative yeasts. I. Permeation of maltotriose through the cell wall of poor attenuative yeasts**. Rep Res Lab Kirin Brew Co Ltd 1961: 49-53, 1961.

- 42 ZASTROW C. R., M. A. MATTOS, C. HOLLATZ & B. U. STAMBUK **Maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae***. *Biotechnol Lett* 22: 455-459, 2000.
- 43 ZHENG X., T. D'AMORE, I. RUSSELL & G. G. STEWART **Transport kinetics of maltotriose in strains of *Saccharomyces***. *J Ind Microbiol* 13: 159-166, 1994.
- 44 ZHENG X., T. D'AMORE, I. RUSSELL & G.G. STEWART **Factors influencing maltotriose utilization during brewery wort fermentations**. *J Am Soc Brew Chem* 52: 41-47, 1994.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

A maltotriose é o segundo açúcar mais abundantemente encontrado no mosto cervejeiro, constituindo entre 15 e 20% do total de carboidratos presentes. Apesar disso, é também o açúcar que tem a última prioridade de utilização pelas células de *Saccharomyces*. Esta lenta, e muitas vezes incompleta, utilização de maltotriose pelas leveduras provoca um problema comum entre as cervejarias: um produto final com elevado extrato fermentável, e uma cerveja com sabor atípico e qualidade inferior. A utilização da maltotriose durante a fermentação do mosto é, portanto, um dos principais fatores determinantes de uma fermentação eficiente e de um produto final de qualidade. Apesar disto, o estudo do metabolismo da maltotriose pelas leveduras tem sido pouco pesquisado, pelo menos quando comparado aos estudos que já caracterizaram os mecanismos moleculares envolvidos na utilização de maltose e glicose por *Saccharomyces*.

Os poucos trabalhos existentes na literatura são justamente originários de pesquisas desenvolvidas pelo setor produtivo visando um melhor aproveitamento da maltotriose pelas leveduras cervejeiras. Entretanto, os resultados obtidos foram muitas vezes contraditórios, provavelmente refletindo as diferentes características de cada cepa estudada. Além disso, as análises sobre a utilização da maltotriose se limitavam à determinação da depleção deste açúcar do mosto, e pouco era conhecido sobre o tipo de metabolismo que as células realizavam quando utilizavam este açúcar.

Os resultados apresentados na presente dissertação mostram que a maioria de cepas de leveduras industriais, embora sejam capazes de utilizar a maltotriose como fonte de carbono para o crescimento, não fermentam este açúcar. Esta característica foi inicialmente evidenciada pela utilização de inibidores da respiração (p. ex. antimicina A) que, apesar de não interferirem no crescimento das células em glicose e maltose (açúcares sabidamente fermentados por *Saccharomyces*), inibiram totalmente o crescimento de diversas cepas no meio contendo maltotriose como fonte de carbono. A não fermentação da maltotriose foi a seguir confirmada pela ausência da produção de etanol e glicerol durante o crescimento das células neste açúcar. Além disso, durante o crescimento em maltotriose as velocidades específicas de crescimento foram menores, e as massas celulares atingidas foram maiores, comparando com os parâmetros obtidos quando maltose ou glicose eram utilizados como fonte de carbono para o crescimento. Esta série de resultados indicavam que as células de *S. cerevisiae* realizam o metabolismo aeróbico para utilizar este açúcar.

Analisando o transporte e hidrólise de maltose e maltotriose por uma das cepas ficou evidente que o transporte é o passo limitante para a metabolização destes açúcares por *S. cerevisiae*. Os resultados indicavam também que a ausência de fermentação da maltotriose seria provavelmente consequência de um baixo fluxo de moléculas de glicose para a via glicolítica, levando à respiração do substrato. Desta forma, a utilização incompleta da maltotriose por *S. cerevisiae* poderia ser consequência das baixas concentrações de oxigênio

normalmente encontradas ao final das fermentações, impossibilitando assim a respiração deste açúcar.

Dada a importância que os sistemas de transporte de açúcares possuem na metabolização da maltose e maltotriose, foram a seguir analisados os sistemas de transporte destes α -glicosídeos em diversas cepas de levedura. As leveduras são microrganismos altamente adaptados para utilizar de forma muito eficiente um amplo espectro de carboidratos, possuindo assim diversas permeases que apresentam diferentes afinidades para cada açúcar a ser transportado. Nossos resultados mostraram que as cepas analisadas possuem sistemas de transporte de maltose de alta e baixa afinidade pelo substrato. No caso da maltotriose foi verificado a existência de um único sistema de transporte com baixa afinidade pelo açúcar, provavelmente mediado pela permease *AGTI*.

Este resultado explicaria em parte o porque da maltotriose ser o último açúcar utilizado pelas leveduras. Enquanto que a maltose é captada por várias permeases com alta e baixa afinidade pelo substrato, a maltotriose é transportada apenas pela permease *AGTI* que, além de possuir baixa afinidade pelo açúcar, também transporta maltose com aproximadamente a mesma afinidade. Desta forma, a maltotriose só será captada eficientemente pelas células quando a concentração de maltose no meio for inferior à concentração de maltotriose.

No intuito de verificar se é possível incrementar a fermentação da maltotriose foi isolada uma cepa, a partir do fermento de uma cervejaria local, capaz de crescer em placas com maltotriose como fonte de carbono e acrescidas

do antibiótico antimicina A. Como esperado esta cepa foi capaz de produzir praticamente a mesma quantidade de etanol e glicerol quando crescida em glicose, maltose ou maltotriose. Para melhor caracterizar as bases metabólicas que permitiriam a fermentação ou não da maltotriose, foram analisadas as atividades de transporte e hidrólise de maltose e maltotriose por esta cepa, e por uma cepa incapaz de fermentar este último açúcar.

Em relação à atividade de hidrólise de maltose e maltotriose foi verificado que, embora as cepas analisadas apresentaram um padrão diferente de isoformas, ambos os açúcares induziam a síntese das mesmas α -glicosidases, e as mesmas isoformas que hidrolizavam maltose também hidrolizavam maltotriose, indicando que nenhuma destas enzimas é específica para maltotriose. Além disso, as cinéticas de hidrólise de maltose e maltotriose por ambas as cepas eram semelhantes. Estes resultados indicavam que a hidrólise intracelular da maltotriose não é o fator limitante na fermentação ou não deste açúcar.

Uma situação diferente foi observada quando foram analisadas as atividades de transporte. A cepa capaz de fermentar a maltotriose apresentou praticamente os mesmos níveis de transporte de maltose ou maltotriose. Já a cepa que não fermenta a maltotriose apresentou uma atividade de transporte deste açúcar significativamente menor (baixa $V_{m\acute{a}x}$ e alto Km) quando comparado aos resultados obtidos com maltose. Desta forma podemos concluir que o único passo limitante para a fermentação ou não da maltotriose pelas leveduras é o transporte deste açúcar para o interior da célula.

No intuito de incrementar a fermentação da maltotriose foram testados alguns fatores que poderiam melhorar a utilização deste açúcar pelas leveduras. Uma vez que a maltose é um forte indutor das α -glicosidases e da atividade de transporte, foi verificado o efeito da mistura destes açúcares na fermentação da maltotriose. Entretanto, a presença de maltose no meio não incrementou a fermentação de maltotriose nas duas cepas analisadas. Por outro lado a adição de magnésio permitiu que a cepa incapaz de fermentar este açúcar passasse a produzir uma quantidade significativa de etanol.

Pelos dados apresentados acima fica evidente que o fator limitante na fermentação de maltotriose pela maioria das leveduras industriais é o transporte ativo deste açúcar para o interior das células. Como já foi verificado que o aumento da atividade de transporte de maltose em cepas manipuladas geneticamente melhorou significativamente a fermentação deste açúcar, seria de extremo interesse produzir cepas de leveduras que apresentem uma atividade de transporte de maltotriose incrementada, e verificar a performance que estas apresentariam na fermentação dos açúcares presentes no mosto cervejeiro.

Por outro lado, seria também importante analisar as bases moleculares envolvidas no melhoramento da fermentação de maltotriose pela presença de concentrações mais elevadas de magnésio no meio de cultura. Desta forma poderiam ser desenvolvidas estratégias que permitiriam uma fermentação incrementada deste açúcar no mosto cervejeiro, e conseqüentemente um aumento na eficiência do processo fermentativo industrial.

A presente dissertação relata uma caracterização bioquímica inicial da fermentação de maltotriose por *Saccharomyces cerevisiae*, fornecendo as bases necessárias para estudos posteriores que eventualmente permitirão melhorar a utilização de açúcares pelas cepas de leveduras industriais.

ANEXO

Transporte e fermentação de açúcares por leveduras da indústria cervejeira

Claudio Roberto Zastrow¹
Boris Ugarte Stambuk²

RESUMO: A maltose, maltotriose e glicose constituem os principais açúcares utilizados por *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação do mosto cervejeiro. A glicose é o primeiro açúcar a ser fermentado, seguido da maltose e finalmente a maltotriose. A utilização da maltose requer o seu transporte através da membrana plasmática, para a seguir ser hidrolisada por α -glicosidases intracelulares. A detalhada análise dos genes e proteínas envolvidas na utilização da maltose têm permitido otimizar, através de engenharia genética, a fermentação deste açúcar por cepas de *S. cerevisiae*. Por outro lado, um problema comumente encontrado na indústria cervejeira é a utilização incompleta da maltotriose. No intuito de melhorar a eficiência do processo fermentativo, atualmente estão sendo analisados os transportadores e as enzimas envolvidas na fermentação deste açúcar por *Saccharomyces cerevisiae*.

Palavras-chave: Fermentação. Transporte de açúcares. *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT: Maltose, maltotriose and glucose are the major sugars used by *Saccharomyces cerevisiae* during the brewer's must fermentation. Glucose is the first sugar to be fermented, followed by maltose and finally maltotriose. Maltose utilization requires its transport across the plasma membrane, and further hydrolysis by intracellular α -glucosidase. The detailed analysis of the genes and proteins involved in maltose utilization has allowed the optimization, by genetic engineering, the fermentation of maltose by strains of *Saccharomyces cerevisiae*. A common problem encountered in the breweries is the incomplete utilization of maltotriose. In order to optimize the efficiency of the brewing process, the transporters and enzymes involved in the fermentation of this sugar by *Saccharomyces cerevisiae* are currently being analyzed.

Key-words: Fermentation. Sugar Transporters. *Saccharomyces Cerevisiae*.

Introdução

O mosto cervejeiro é obtido pelo processo denominado mosturação, onde o malte moído é misturado com água e outros complementos, como cereais (milho, arroz, trigo e cevada não maltada) ou carboidratos (sacarose, glicose e maltose), além do lúpulo e outros adjuntos específicos

(BOHATCH, 1994). O amido do malte e dos outros cereais utilizados no processo é transformado em açúcares menores pela ação das α - e β -amilases, enzimas que atacam as ligações α -1,4 das cadeias do amido pela extremidade não-redutora (Figura 1). A α -amilase dá origem a oligossacarídeos de

¹ Mestrando em Biotecnologia/ Departamento de Bioquímica - UFSC

² Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica - UFSC

cadeias curtas com no mínimo cinco a seis unidades de glicose, sendo que estes, pela ação da β -amilase são transformados em moléculas de maltose e

maltotriose (no caso de cadeias com número ímpar de moléculas de glicose).

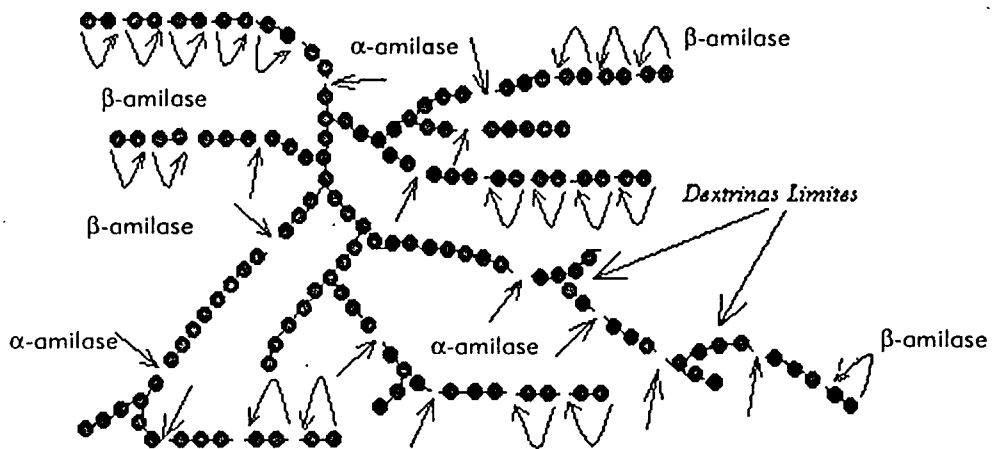


Figura 1: Forma de ação das α - e β -amilases na degradação do amido.

Dessa forma, a maltose constitui o principal açúcar encontrado no mosto cervejeiro, seguido da maltotriose (Tabela 1). Outros açúcares importantes também estão presentes no mosto, mas em quantidades menores, como a glicose, a frutose

e a sacarose. Além destes carboidratos, as chamadas dextrinas limites, contendo os pontos de ramificação, representam os açúcares não-fermentáveis (MUNROE, 1978; UCHIDA et al., 1991).

Tabela 1: Concentração de açúcares presentes no mosto cervejeiro.

Açúcar	Quantidade (% do total)
Maltose	50 - 60
Maltotriose	15 - 20
Glicose	10 - 15
Frutose	1 - 2
Sacarose	1 - 2
Dextrinas Limites	20 - 30

1. Utilização de açúcares durante o processo fermentativo

As linhagens de levedura mais utilizadas em cervejaria pertencem a duas espécies do gênero *Saccharomyces*, *S. cerevisiae* e *S. uvarum* (também chamada de *S. carlsbergensis*). As cervejas do tipo "Lager" são produzidas pela fermentação profunda (baixa), por cepas de *S. uvarum*, consideradas como de alta atividade fermentativa e de menor capacidade respiratória que *S. cerevisiae*. As cervejas do tipo "Ale" são em geral produzidas por fermentação superficial (alta), realizadas por cepas de *S. cerevisiae* (AQUARONE *et al.*, 1983).

A partir do momento em que as células de *Saccharomyces* entram em contato com o mosto cervejeiro, a glicose, a frutose e a sacarose constituem os primeiros substratos a serem utilizados pelas células, seguidos da maltose e, finalmente, da maltotriose, restando as dextrinas que não são fermentadas (PATEL & INGLEDEW, 1973; D'AMORE *et al.* 1989; SUIHKO *et al.*, 1993). Como os açúcares não atravessam a membrana celular livremente, a sua passagem requer a ação de proteínas transportadoras denominadas permeases (LAGUNAS, 1993; HORÁK, 1997). Inclusive, logo nos primeiros estudos que visavam analisar a utilização e metabolização dos açúcares pelas leveduras, ficou evidente que o passo limitante do processo fermentativo é o transporte dos açúcares presentes no mosto para o interior das células (GRIFFIN, 1975; HAUTERA & LÖVGREN, 1975).

Os monossacarídeos glicose e frutose são captados para o interior das células pelo mesmo sistema de transporte, utilizando o processo de difusão facilitada. Atualmente, já foram caracterizados inúmeros transportadores de hexoses (HXT1 - HXT7), sendo que alguns

possuem alta e outros baixa afinidade pela glicose. Todas estas permeases transportam também frutose e manose, porém com afinidades menores do que pela glicose. Por este motivo a glicose do meio é captada mais rapidamente do que a frutose (BOLES & HOLLENBERG, 1997). A sacarose, dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma de frutose unidas através de uma ligação a-1 b-2, é hidrolizada extracelularmente por invertases específicas, sendo que os monossacarídeos formados são captados pelos transportadores de hexoses descritos acima (CARLSON, 1987). Uma vez transportadas para o interior das células, a glicose e a frutose são degradadas pela via glicolítica até piruvato que pode ser totalmente convertido a CO₂ e H₂O pelo ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa, ou então, ser degradado até etanol e CO₂ pelo processo denominado de fermentação alcoólica (GANCEDO & SERRANO, 1989).

A utilização da maltose pelas leveduras requer também o transporte deste dissacarídeo para o interior das células, onde será hidrolizado por glicosidases intracelulares. Para que a maltose possa ser utilizada pelas cepas de *Saccharomyces*, estas devem possuir pelo menos um dos cinco loci MAL: MAL1, MAL2, MAL3, MAL4 e MAL6. Cada um destes locus contém geralmente os três genes necessários à metabolização da maltose (Figura 2), o gene MALS que codifica para a maltase, o gene MALT que codifica para o transportador de maltose e o gene MALR que regula a expressão dos outros dois genes (NEEDLEMAN, 1991).

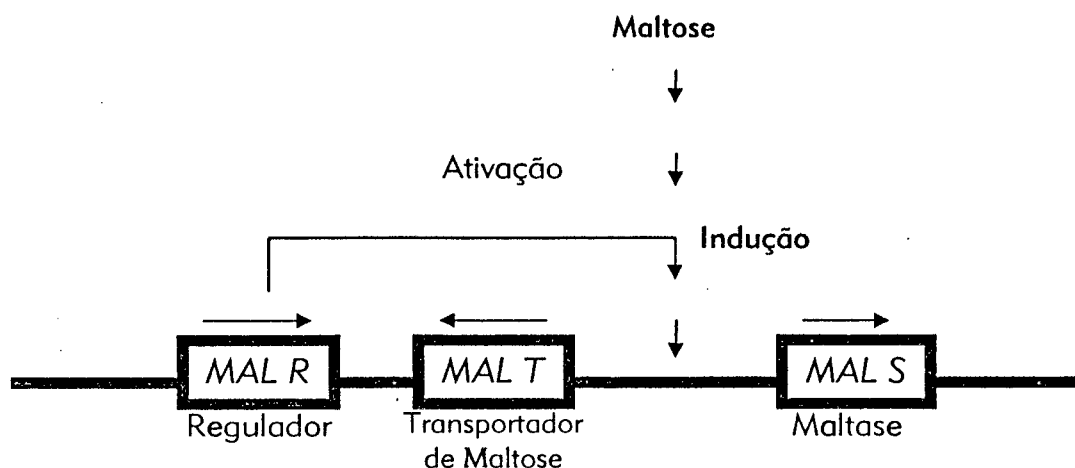


Figura 2: Estrutura e regulação do locus MAL. As setas representam a direção da transcrição.

Estudos iniciais com cepas de laboratório demonstraram a existência de dois sistemas de transporte de maltose, um de alta afinidade ($K_m = 4$ mM) e outro de baixa afinidade ($K_m = 70$ mM) pelo substrato (BUSTURIA & LAGUNAS, 1985). Análises posteriores indicaram que a atividade de transporte de baixa afinidade era provavelmente devido à ligação da maltose radioativa com a parede celular e/ou a membrana plasmática, ou seja, um simples "artefato experimental" (BENITO & LAGUNAS, 1992). Entretanto, trabalhos efetuados por NOVAK et al. (1990) e CRUMPLEM et al. (1996) com cepas de cervejaria demonstraram que nestas células existem também os dois sistemas de transporte, de alta afinidade ($K_m = 1-2$ mM) e de baixa afinidade ($K_m = 20$ mM) pelo substrato. O transportador de maltose de alta afinidade, codificado pelos genes MALT, é uma permease específica para maltose e turanose (CHANG et al., 1989). Esta permease é capaz de transportar ativamente o açúcar através do co-transporte com H^+ , mesmo a favor do gradiente de concentração (SERRANO, 1977). Uma vez captada, a maltose é hidrolisada pela maltase (α -glicosidase, E.C. 3.2.1.20) em duas moléculas de glicose que são metabolizadas até etanol (Figura 3). A α -glicosidase, enzima que têm pH ótimo em torno de 6,8, é capaz de hidrolisar maltose,

isomaltose, sacarose, maltotriose e substratos sintéticos como o *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (MATSUSAKA, et al., 1977; NEEDLEMAN et al., 1978).

Análises iniciais do transporte de maltotriose revelavam que este açúcar possui um transportador distinto do transportador de maltose (HARRIS & THOMPSON, 1960). Embora já tenham sido descritos vários trabalhos sobre o transporte de maltotriose em leveduras (MICHALJANICOVA et al., 1982; ZHENG et al., 1994a), até pouco tempo não se sabia qual era o gene responsável pela síntese deste transportador. Recentemente, analisando um alelo do transportador de maltose, foi caracterizado um gene (AGT1) responsável pelo transporte de uma série de α -glicosídeos, como trealose, maltose, melezitose, α -metilglicosídeo e maltotriose (HAN et al., 1995). Tanto o transportador de maltose quanto a permease codificada pelo gene AGT1 apresentam uma grande homologia estrutural e ambos permitem a captação ativa dos açúcares pelo co-transporte com H^+ (STAMBUK et al., 1998; 1999). Condizente com a importância deste transportador para a metabolização da maltotriose, foi verificado recentemente que a maioria das cepas de cervejaria possui o gene AGT1, além dos transportadores de maltose codificados pelos genes MALT (JESPERSEN et al., 1999).

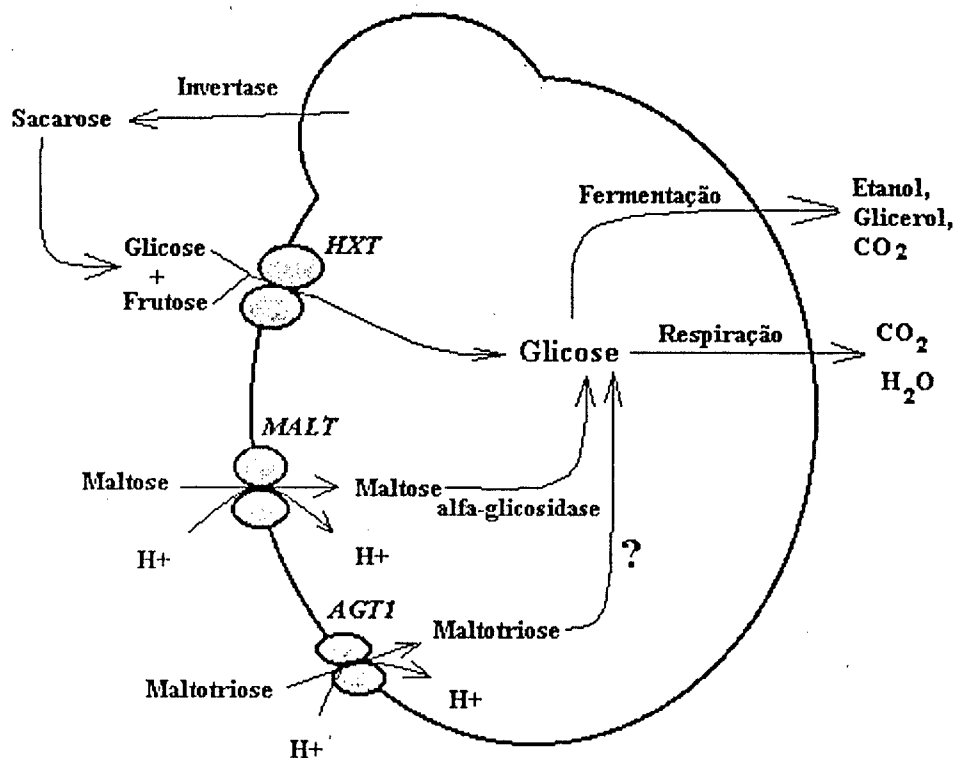


Figura 3: Esquema representando a utilização de açúcares por leveduras.

Em relação à enzima responsável pela hidrólise da maltotriose, não existe relato na literatura que indique a existência de alguma α -glicosidase específica para este açúcar, embora nunca tenha sido testada a presença e especificidade desta enzima nas células crescidas ou induzidas em maltotriose (STEWART et al., 1979; STEWART & RUSSELL, 1986). Estudos realizados com células crescidas em maltose têm revelado a existência de pelo menos 9 a

10 isoformas da enzima α -glicosidase, algumas das quais específicas para maltose e outras para α -metilglicosídeo (Spielman & Mowshowitz, 1982; Tabata et al., 1984; Kopetzki et al., 1989). Algumas isoformas da α -glicosidase induzidas pela maltose são capazes de hidrolisar maltotriose, porém com uma atividade correspondente a cerca de 10% da observada para a hidrólise da maltose (Tabata et al., 1984).

2. Melhoramento do Processo Fermentativo

Durante a fermentação do mosto cervejeiro, verifica-se que enquanto glicose, frutose e sacarose estão presentes no meio de cultivo, a maltose e a maltotriose não são utilizadas pelas células. A maltose somente começa a ser captada quando os

níveis de glicose no mosto atingem a metade dos níveis iniciais. Este problema torna-se mais pronunciado quando a concentração de glicose no mosto é maior (D'AMORE et al., 1989; D'AMORE, 1992; ERNANDES et al., 1993; Suihko

et al., 1993). A não utilização completa da maltose e da maltotriose enquanto as concentrações de glicose são altas é devido ao efeito que este último açúcar exerce sobre a célula: a glicose reprime a síntese dos transportadores e das α -glicosidases (NEEDLEMAN, 1991), e a glicose também provoca a rápida endocitose e degradação proteolítica das proteínas transportadoras no vacúolo celular (RIBALLO et al., 1995; MEDINTZ et al., 1996). Este problema tem sido em parte resolvido, através da modificação das cepas por técnicas de engenharia genética, promovendo a síntese constitutiva do transportador de maltose em *S. cerevisiae* (OSINGA et al., 1989; KODAMA et al., 1995)

Outro problema comumente encontrado em mostos cervejeiros, como consequência da não utilização completa de maltotriose pelas leveduras, é a presença deste açúcar no final da fermentação, o que dificulta a filtração do mosto e a cerveja obtida apresenta sabor atípico e qualidade inferior (Panchal & Stewart, 1979). Inúmeros trabalhos

têm tentado otimizar a utilização da maltotriose durante a fermentação do mosto (ERNANDES et al., 1993; D'AMORE et al., 1989; D'AMORE, 1992; ZHENG et al., 1994b). Entretanto, os resultados relatados são muitas vezes contraditórios, provavelmente refletindo as características das diferentes cepas utilizadas. Por exemplo, inúmeras cepas de *S. cerevisiae* respiram a maltotriose até CO_2 e água, portanto são incapazes de fermentar este açúcar (ZASTROW et al., 1999). Aparentemente, o transporte do açúcar para o interior da célula, e não a posterior hidrólise pelas α -glicosidases, é o fator limitante na fermentação da maltotriose (ZASTROW et al., 1999). Somente após uma completa análise dos transportadores e α -glicosidases envolvidas na metabolização da maltotriose e dos mecanismos regulatórios que afetam a síntese destas proteínas, é que será possível otimizar a utilização da maltotriose pelas leveduras.

● Conclusões e Perspectivas Futuras

A utilização de açúcares durante a fermentação do mosto cervejeiro é um fenômeno complexo que envolve inúmeras enzimas, vários sistemas de transporte e complexos mecanismos regulatórios. Os estudos sobre a metabolização da maltose por *S. cerevisiae* permitiram incrementar significativamente a eficiência da fabricação de cerveja. Entretanto, a não

utilização completa da maltotriose presente no mosto constitui ainda um problema para a indústria cervejeira. Somente após serem desvendados os mecanismos moleculares que permitem às células de *S. cerevisiae* fermentarem este açúcar é que poderão ser desenvolvidas estratégias visando a otimização do processo fermentativo.

● Referências bibliográficas

AQUARONE, E. ; LIMA, U.A. ; BORZANI, W. Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo : Edgard Blücher, 1983. 243 p.

BENITO, B. ; LAGUNAS, R. The low-affinity component of *Saccharomyces cerevisiae* maltose transport is an artifact. *J. Bacteriol.*, 174, p. 3065-3069, 1992.

- BOHATCH, A. Cerveja : fabricação em pequena escala. Curitiba : EMATER, 1994. 66 p.
- BOLES, E. ; HOLLENBERG, C. The molecular genetics of hexose transport in yeast. *FEMS. Microbiol. Rev.*, 21, p. 85-111, 1997.
- BUSTURIA, A. ; LAGUNAS, R. Identification of two forms of the maltose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* and their regulation by catabolite inactivation. *Biochim. Biophys.*, 820, p. 324-326, 1985.
- CARLSON, M. Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces* species. *J. Bacteriol.*, 169, p. 4873-4877, 1987.
- CHANG, Y. S. et al. Identification and characterization of maltose permease in a genetically defined *Saccharomyces* strain. *J. Bacteriol.*, 171, p. 6148-6154, 1989.
- CRUMPLEN, R. M. ; SLAUGHTER, J. C. ; STEWART, G. G. Characteristics of maltose transporter activity in an ale and lager strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Letts. Appl. Microbiol.*, 23, p. 448-452, 1996.
- D'AMORE, T. Improving yeast fermentation performance. *J. Inst. Brew.*, 98, p. 375-382, 1992.
- _____ ; RUSSELL, I. ; STEWART, G. G. The effect of carbohydrate adjuncts on Brewer's wort fermentation by *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*). *J. Inst. Brew.*, 95, p. 333-336, 1989.
- ERNANDES, J. R. et al. Effect of yeast adaptation to maltose utilization on sugar uptake during the fermentation of Brewer's wort. *J. Inst. Brew.*, 99, p. 67-71, 1993.
- GANCEDO, C. ; SERRANO, R. Energy-yielding metabolism. *The Yeast*, New York, v.3, p. 205-259, 1989.
- GRIFFIN, S. R. Fast and slow fermentations of brewer's wort by strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.*, 76, p. 41-45, 1975.
- HAN, E-K. et al. Characterization of AGT1 encoding a general α -glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.*, 17, p. 1093-1107, 1995.
- HARRIS, G. ; THOMPSON, C. C. Uptake of nutrients by yeast : II Maltotriose permease and the utilization of maltotriose by yeast. *J. Inst. Brew.*, 66, p. 293-297, 1960.
- HAUTERA, P. ; LÖVGREN, T. α -Glucosidase, α -glucoside permease, maltose fermentation and leavening ability of baker's yeast. *J. Inst. Brew.*, 81, p. 309-313, 1975.
- HORÁK, J. Yeast nutrient transporters. *Biochim. Biophys.*, 1331, p. 41-79, 1997.
- JESPERSEN, L. et al. Multiple α -glucoside transporter genes in brewer's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, p. 450-456, 1999.
- KODAMA, Y. et al. Improvement of maltose fermentation efficiency : constitutive expression of MAL genes in brewing yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 53, p. 24-29, 1995.
- KOPETZKI, E. ; BUCKEL, P. ; SCHUMACHER, G. Cloning and characterization of Baker's yeast α -glucosidase : over-expression in a yeast strain devoided of vacuolar proteinases. *The Yeast*, New York, 5, p. 11-24, 1989.
- LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 104, p. 229-242, 1993.
- MATSUSAKA, K. ; CHIBA, S. ; SHIMOMURA, T. Purification and substrate specificity of brewer's yeast α -glucosidase. *Agric. Biol. Chem.*, 41, p. 1917-1923, 1977.

- MEDINTZ, I. et al. Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 178, p. 2245-2254, 1996.
- MICHALJANICOVA, D. ; HODAN, J. ; KOTYK, A. Maltotriose transport and utilization in Baker's and Brewer's yeast. *Folia Microbiol.*, 27, p. 217-221, 1982.
- MUNROE, J. H. Fermentable carbohydrates in wort and beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 36, p. 107-111, 1978.
- NEEDLEMAN, R. B. et al. Purification and characterization of an α -glucosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochemistry*, 17, p. 4657-4661, 1978.
- _____. Control of maltase synthesis in yeast. *Mol. Microbiol.*, 5, p. 2079-2084, 1991.
- NOVAK, S. et al. Characterization of sugar transport in 2-deoxy-D-glucose resistant mutants of yeast. *J. Ind. Microbiol.*, 6, p. 149-156, 1990.
- OSINGA, K. et al. Maltose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Yeast*, New York, 5, p. S207-S212, 1989.
- PANCHAL, C. J. ; STEWART, G. G. Utilization of wort carbohydrates. *Brew. Dig.*, 54, p. 26-48, 1979.
- PATEL, G. B. ; INGLEDEW, W. M. Trends in wort carbohydrate utilization. *Appl. Microbiol.*, 26, p. 349-353, 1973.
- RIBALLO, E. et al. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *J. Bacteriol.*, 177, p. 5622-5627, 1995.
- SERRANO, R. Energy requirements for maltose transport in yeast. *Eur. J. Biochem.*, 80, p. 97-102, 1977.
- SPIELMAN, L. L. ; MOWSHOWITZ, D. B. A specific stain for α -glucosidases in isoelectric focusing gels. *Anal. Biochem.*, 120, p. 66-70, 1982.
- STAMBUK, B. U. et al. Expression of high-affinity trehalose-H⁺ symport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys.*, 1379, p. 118-128, 1998.
- _____. Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170, p. 105-110, 1999.
- STEWART, G. G. ; RUSSELL, I. One hundred years of yeast research and development in the brewing industry. *J. Inst. Brew.*, 92, p. 537-558, 1986.
- _____. et al. Studies on the utilization of wort carbohydrates by brewer's yeast strains. *MBAA Tech. Quart.*, 16, p. 1-7, 1979.
- SUIHKO, M.-L. ; HOME, S. ; LINKO, M. Wort sugar, yeast sugar uptake and beer quality. *Monatsschr. Brauwiss.*, 5, p. 185-192, 1993.
- TABATA, S. et al. Purification and characterization of α -glucosidases produced by *Saccharomyces* in response to three distinct maltose genes. *Biochim. Biophys.*, 797, p. 231-238, 1984.
- UCHIDA, M. et al. Carbohydrates in brewing. I. determination of fermentable sugars and oligosaccharides in wort and beer by partition high-performance liquid chromatography. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 49, p. 65-73, 1991.

ZASTROW, C.R. et al. Maltotriose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (28. : 1999 : Caxambú, MG). **Anais...** São Paulo : SBBBM, 1999. p. 58

ZHENG, X. et al. Transport kinetics of maltotriose in strains of *Saccharomyces*. **J. Ind. Microbiol.**, 13, p. 159-166, 1994a.

_____. Factors influencing maltotriose utilization during brewery wort fermentations. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, 52, p. 41-47, 1994b.



Maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*

Claudio R. Zastrow, Marcelo A. Mattos, Claudia Hollatz & Boris U. Stambuk*

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

*Author for correspondence (Fax: +5548 331-9672; E-mail: bstambuk@mbox1.ufsc.br)

Received 1 December 1999; Revisions requested 15 December 1999; Revisions received 24 January 2000; Accepted 25 January 2000

Key words: brewing, maltose, maltotriose, *Saccharomyces*, transport

Abstract

Saccharomyces cerevisiae grew slower but reached higher cellular densities when grown on 20 g maltotriose l⁻¹ than on the same concentration of glucose or maltose. Antimycin A (3 mg l⁻¹) prevented growth on maltotriose, but not on glucose or maltose, indicating that it is not fermented but is degraded aerobically. This was confirmed by the absence of ethanol and glycerol production. Active uptake of maltotriose across the plasma membrane is the limiting step for metabolism, and the low rate of maltotriose transport observed in maltotriose-grown cells is probably one of the main reasons for the absence of maltotriose fermentation by *S. cerevisiae* cells.

Introduction

The most abundant fermentable sugars in brewer's wort are maltose (50–60%), maltotriose (15–20%) and glucose (10–15%). Maltotriose though has the lowest priority for uptake by yeast cells. In general, only when half of the glucose in wort has been taken up by the yeast will the uptake of maltose and maltotriose commence with a slower uptake rate for maltotriose than for maltose (Stewart *et al.* 1979). This slower, and sometimes incomplete uptake of maltotriose leads to one of the problems experienced by some breweries, namely a high content of fermentable sugars in the finished beer, and atypical beer flavor profiles. The rate of uptake and metabolism of maltotriose during wort fermentations is, therefore, one of the major determinants of fermentation efficiency and product quality. However, maltotriose metabolism has received little attention compared with the mechanisms of maltose and glucose utilization by yeast cells.

Maltose and maltotriose have independent transport systems, but seem to share a common hydrolytic enzyme, α -glucosidase (Stewart *et al.* 1979). The maltotriose transport system has been studied in a number of industrial strains (Zheng *et al.* 1994a), and we have recently shown that the *AGT1* perme-

ase is an active maltotriose-H⁺ symporter (Stambuk *et al.* 1999). In accordance with the importance of maltotriose transport for the industrial applications of yeast, practically all brewing strains harbor the *AGT1* permease (Jespersen *et al.* 1999).

The majority of studies on maltotriose utilization by yeast cells have dealt with the analysis of environmental factors, or yeast strain characteristics, that may influence uptake of this carbon source during brewing fermentations (Stewart *et al.* 1979, Zheng *et al.* 1994b). Little is known about the type of metabolism (fermentative or respiratory) that *S. cerevisiae* cells use when they are growing on maltotriose. The results shown in the present report indicate that, although *S. cerevisiae* has a strong tendency towards alcoholic fermentation (Lagunas 1979), maltotriose is not fermented by several industrial yeast strains.

Materials and methods

Materials

Media components were purchased from Difco. Glucose, maltose, maltotriose and antimycin A were obtained from Sigma. Commercial enzymatic kits for

Table 1. *Saccharomyces cerevisiae* strains used.

Strain	Characteristics	Source ^a
S-14	w.t. diploid	1
254	Commercial strain used for fuel ethanol production	2
70	Baking strain	2
CC3	Brewing ale strain	2

^aSource key: (1) A. Rapoport, August Kirchenstein Institute of Microbiology, Latvia; (2) Labatt Culture Collection, Labatt Breweries of Canada, Ontario.

glucose and glycerol determination were from Biobras (Brazil). All other chemicals were of analytical grade.

Yeast strains

The *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. All strains were kindly provided by Dr Anita D. Panek (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil).

Media and culture conditions

Cells were grown aerobically in batch culture (28 °C and 160 rpm) on YEP medium (pH 5.0) containing 20 g peptone l⁻¹, 10 g yeast extract l⁻¹, and 20 g of the indicated carbon source (glucose, maltose or maltotriose) l⁻¹. Sugar fermentation was determined as production of gas and acid in Durham tubes containing the above media and 15 mg Bromocresol Purple l⁻¹. Alternatively, 3 mg antimycin A l⁻¹ was added to inhibit respiration and favour fermentative growth. Growth was followed turbidometrically at 570 nm and correlated to the cell dry weight.

Ethanol and glycerol determinations

Culture samples were centrifuged (10 000 g, 3 min) and the supernatant used for determination of ethanol and glycerol. Ethanol was determined by gas chromatography with a Poropak Q-80-100 column, a flame ionization detector and a computing integrator system. Glycerol was determined with a commercial enzymatic assay based on glycerol kinase, glycerol-3-phosphate oxidase and peroxidase.

Transport assays

The rates of active maltose- or maltotriose-H⁺ symport were assayed as previously described (Stambuk *et al.* 1998, 1999) using sugars at 0.2–150 mM. All

assays were carried out at least in duplicate, and the maximum deviation was less than 10%.

α -Glucosidase assays

The α -glucosidase activity towards maltose or maltotriose (at 0.5–100 mM) was determined *in situ* with permeabilized yeast cells as previously described (Stambuk 1999). Glucose released was measured by the glucose oxidase and peroxidase method using a commercial kit. All assays were done at least in duplicate, and controls using previously boiled permeabilized yeast cells were used.

Results

Antimycin A inhibits cell growth on maltotriose

A common practice used for screening cells with sugar-transport defects (or their transformed and complemented counterparts) is to include in selection media a respiratory inhibitor, like antimycin A, to ensure that other substrates (e.g., amino-acids) are not used as carbon sources. However, this approach could not be used for maltotriose since antimycin A completely inhibited the growth of several wild-type and industrial yeast strains on this carbon source, while growth on glucose or maltose was not affected (data not shown). This result indicated that the mitochondrial respiratory chain is necessary for growth on maltotriose, and prompted us to perform a more detailed analysis of the type of metabolism used by *S. cerevisiae* cells during growth on this carbon source.

Kinetics of growth on glucose, maltose and maltotriose

Figure 1 shows the growth patterns obtained when several yeast strains were grown on medium containing glucose, maltose or maltotriose as carbon and energy sources. While yeast cells grew on glucose and maltose with a mixed respiro-fermentative metabolism, in the case of maltotriose a single exponential growth phase was observed with a growth rate significantly lower, and a biomass yield higher, than those obtained with glucose or maltose (Table 2). Practically no ethanol or glycerol were produced during growth on maltotriose (Table 2 and Figure 2) indicating that the metabolism of maltotriose by these yeast strains is probably oxidative.

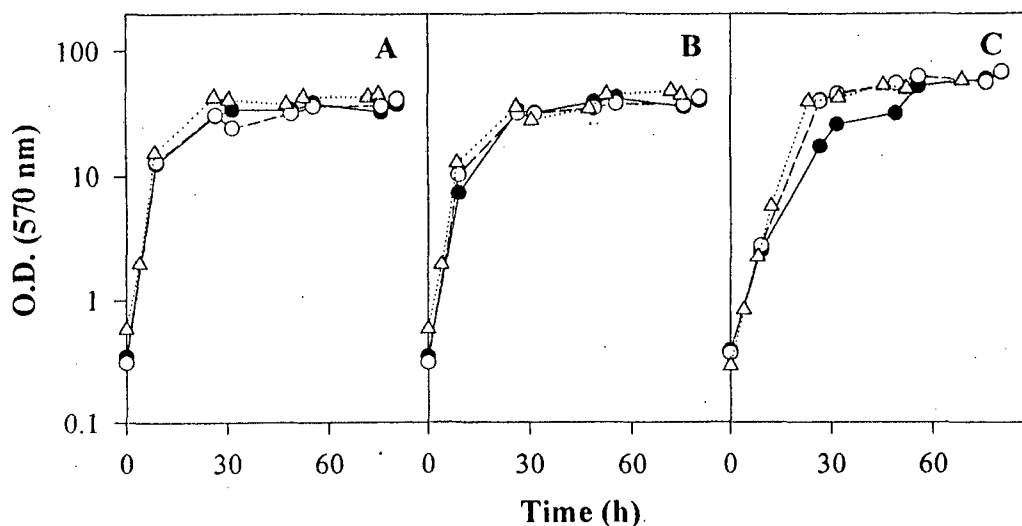


Fig. 1. Aerobic batch growth of strain 70 (Δ), CC3 (\bullet), and 254 (\circ) on YEP medium containing 2% (w/v) of glucose (A), maltose (B) or maltotriose (C). Incubations were carried out at 28 °C with shaking (160 rpm) in Erlenmeyer flasks filled to $\frac{1}{3}$ of their volume.

Table 2. Specific growth rates and biomass, ethanol and glycerol yields during growth of strains 70 and 254 on YEP medium containing 2% (w/v) of the indicated carbon sources. Incubations were carried out in Erlenmeyer flasks, filled to $\frac{1}{3}$ of their volume, with shaking at 160 rpm and 28 °C.

Strain and carbon source	μ^a (h^{-1})	Maximum yield ($\text{g} [\text{g sugar}]^{-1}$)		
		Biomass	Ethanol	Glycerol
Strain 70				
Glucose	0.43	0.37	0.40	0.20
Maltose	0.35	0.45	0.31	0.05
Maltotriose	0.21	0.70	0.05	0.00
Strain 254				
Glucose	0.41	0.64	0.33	0.04
Maltose	0.39	0.67	0.18	0.02
Maltotriose	0.18	0.90	0.01	0.00

^aSpecific growth rate calculated from the first 8–12 h of exponential growth.

It is important to emphasise that all the strains used in this study showed a positive result when fermentation of maltotriose was scored by gas and acid production in Durham tubes. This result indicates that the classical Durham test is prone to false-positive results. A previous report had already shown that this test also gives several false-negative results (Van Dijken *et al.* 1986). Therefore, the use of such tests may have led to an erroneous assessment of which carbohydrates are really fermented by *S. cerevisiae* cells. When antimycin A was added to the Durham

tubes positive results were still obtained for glucose and maltose, but not for maltotriose, indicating that the addition of this respiratory inhibitor may overcome the problem with false-positive results.

Analysis of maltose and maltotriose transport and hydrolysis

The metabolism of maltose and maltotriose is highly interconnected. Both sugars are α -glucosides transported by the active α -glucoside- H^+ symporter encoded by *AGT1*. This permease, which is maltose inducible, has the same affinity for maltose and maltotriose (data not shown). Both sugars are also hydrolysed by maltose inducible α -glucosidases that have approximately the same affinity for both α -glucosides (data not shown). In order to gain insight into the molecular basis of the absence of maltotriose fermentation by yeast cells, we analyzed the differences in the rates of transport and hydrolysis of these two α -glucosides by strain 70. This strain was chosen because it is the only strain that is able to produce ethanol (0.9 g l^{-1}) when grown in maltotriose (see Figure 2 and Table 2).

Table 3 shows the rates of active maltotriose transport and hydrolysis obtained in maltotriose-grown cells, compared with the same data obtained for maltose in maltose-grown cells. Two conclusions can be drawn: (i) transport, and not intracellular hydrolysis, is the rate limiting step for the utilization of these α -glucosides, (ii) the flux of glucose molecules into

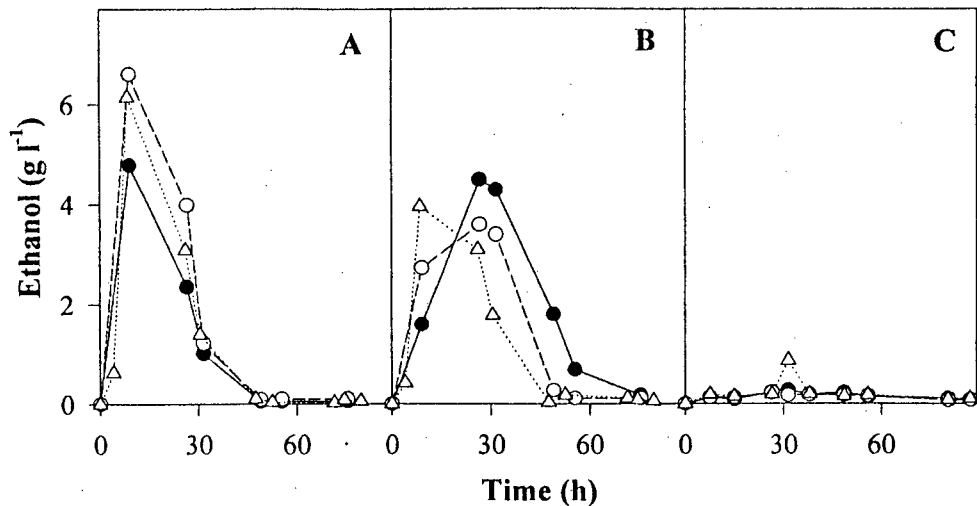


Fig. 2. Ethanol production during aerobic batch growth of strain 70 (Δ), CC3 (\bullet), and 254 (\circ) on YEP medium containing 2% (w/v) of glucose (A), maltose (B) or maltotriose (C). Incubations were carried out as described in Figure 1.

Table 3. Rates of maltose and maltotriose transport and hydrolysis by cells from strain 70 grown on YEP medium containing 2% (w/v) maltose or maltotriose, respectively.

Sugar	V_{max} (nmol min ⁻¹ [mg dry yeast cells] ⁻¹) ^a	
	Transport	Hydrolysis
Maltose	580	1390
Maltotriose	180	405

^aFor comparative purposes, transport is expressed as nmol glucose equivalents transported min⁻¹ (mg dry yeast cells)⁻¹, and hydrolysis as nmol glucose liberated min⁻¹ (mg dry yeast cells)⁻¹.

glycolysis when yeast cells are growing on maltose may exceed 3 times that obtained with maltotriose.

Discussion

Although maltotriose is considered as a 'fermentable' sugar of brewer's wort, the results shown above indicate that maltotriose is not fermented by several industrial yeast strains. The misleading assumption that maltotriose is fermented may be a consequence of the type of analysis generally done during brewing fermentations, where the uptake (depletion) of this sugar is determined, but not necessarily its fermentation into ethanol. Our results also give a clue into the problem encountered by several breweries, i.e. the incomplete utilization of this sugar at the end of the fermentation (Stewart *et al.* 1979). It is well known that oxygen fulfils critical roles in brewing yeast physiology, in-

cluding the fermentation performance (O'Connor-Cox *et al.* 1996). Indeed, Zheng *et al.* (1994b) showed that the only factors that enhanced maltotriose assimilation from the wort were increased wort oxygenation and/or agitation. Our results indicate that oxygen is necessary for respiration of maltotriose, and it is probable that the oxygen levels in wort would be limiting at the end of the fermentation, when maltotriose uptake takes place (Stewart *et al.* 1979).

Independently of the energetics of transport (facilitated diffusion or active transport), several reports have shown that the rate limiting step for fermentation by *S. cerevisiae* cells is the transport of the sugar across the plasma membrane (Postma *et al.* 1989, Salmon & Mauricio 1994, Kodama *et al.* 1995). Although it is generally accepted that *S. cerevisiae* cells have a strong tendency to perform alcoholic fermentation, chemostat experiments have shown that this only occurs in the presence of high rates of sugar uptake. When sugar is fed to the cultures at a low rate, and consequently a low rate of sugar uptake is obtained, sugar metabolism is fully respiratory (Postma *et al.* 1989). Due to a increased sugar influx several compounds are expected to accumulate in the cells, acting as signals in the induction/repression pathways of several key metabolic steps that allow fermentative growth (reviewed by Gonçalves & Planta 1998). Our results confirm these aspects of sugar metabolism in yeast cells. Maltotriose is probably not fermented by *S. cerevisiae* due to a low sugar influx into the cells. As a consequence, low levels of signal compounds are

likely to be formed, and thus this sugar is respired by yeast cells.

Attempts to improve maltose fermentation efficiency in brewing yeasts are currently being undertaken, and these have revealed that the major limiting factor in the fermentation rate is the expression of the maltose permease (Kodama *et al.* 1995). It is obvious that the α -glucoside- H^+ symporter encoded by *AGT1* may be of great importance for the fermentation of worts containing both maltose and maltotriose, and thus the genetic manipulation of strains containing this permease would be of major interest.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPESP (No. 96/1405-7), Funpesquisa-UFSC and CNPq (No. 523429/95-9). M.A.M. and C.H. were recipients of undergraduate fellowships from CNPq. We appreciate the invaluable discussions and collaboration with Dr P.S. de Araujo (IQ-USP) and Dr J. Ninow (CTC-UFSC).

References

- Gonçalves PM, Planta RJ (1998) Starting up yeast glycolysis. *Trends Microbiol.* **6**: 314-319.
- Jespersen L, Cesar LB, Meaden PG, Jakobsen M (1999) Multiple α -glucoside transporter genes in brewer's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 450-456.
- Kodama Y, Fukui N, Ashikari T, Shihanó Y, Morioka-Fujimoto K, Hiraki Y, Nakatani K (1995) Improvement of maltose fermentation efficiency: constitutive expression of *MAL* genes in brewing yeasts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **53**: 24-29.
- Lagunas R (1979) Energetic irrelevance of aerobicity for *S. cerevisiae* growing on sugars. *Mol. Cell. Biochem.* **27**: 139-146.
- O'Connor-Cox ESC, Lodolo EJ, Axcell BC (1996) Mitochondrial relevance to yeast fermentative performance: a review. *J. Inst. Brew.* **102**: 19-25.
- Postma E, Scheffers WA, van Dijken JP (1989) Kinetics of growth and glucose transport in glucose-limited chemostat cultures of *S. cerevisiae* CBS 8066. *Yeast* **5**: 159-165.
- Salmon JM, Mauricio JC (1994) Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcoholic fermentation. *Biotechnol. Lett.* **16**: 89-94.
- Stambuk BU (1999) A simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast α -glucosidase. *Biochem. Educ.* **27**: 177-180.
- Stambuk BU, Panek AD, Crowe JH, Crowe LM, de Araujo PS (1998) Expression of high-affinity trehalose- H^+ symport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1379**: 118-128.
- Stambuk BU, da Silva MA, Panek AD, de Araujo PS (1999) Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 105-110.
- Stewart GG, Erratt J, Garrison I, Goring T, Hancock I (1979) Studies on the utilization of wort carbohydrates by Brewer's yeast strains. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **16**: 1-7.
- van Dijken JP, van den Bosch JJ, Hermans L, de Miranda R, Scheffers WA (1986) Alcoholic fermentation by 'non-fermenting' yeasts. *Yeast* **2**: 123-127.
- Zheng X, D'Amore T, Russell I, Stewart GG (1994a) Transport kinetics of maltotriose in strains of *Saccharomyces*. *J. Ind. Microbiol.* **13**: 159-166.
- Zheng X, D'Amore T, Russell I, Stewart GG (1994b) Factors influencing maltotriose utilization during brewery wort fermentations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **52**: 41-47.