

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

RICARDO ANDRÉ HERBERTS

“TRANSPORTE ATIVO DE  $\alpha$ -GLICOSÍDEOS:  
UMA METODOLOGIA PARA AVALIAR A VITALIDADE DE  
LEVEDURAS CERVEJEIRAS”

Florianópolis

2006

RICARDO ANDRÉ HERBERTS

“TRANSPORTE ATIVO DE  $\alpha$ -GLICOSÍDEOS:  
UMA METODOLOGIA PARA AVALIAR A VITALIDADE DE  
LEVEDURAS CERVEJEIRAS”

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  
Co-Orientador: Dr. Luiz Cláudio Miletti

Florianópolis  
Fevereiro/2006

Herberts, Ricardo André

Transporte Ativo de  $\alpha$ -Glicosídeos: uma Metodologia para avaliar a Vitalidade de Leveduras Cervejeiras/ Ricardo André Herberts – Florianópolis 2006

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

1. Maltose
2. *p*-nitrofenil- $\alpha$ -d-glicosídeo
3. Fermentação
4. *Saccharomyces cerevisiae*

Parte dos resultados desta dissertação foram apresentados nos seguintes eventos/congressos:

HOLLATZ C., ALVES JR . S.L., ZASTROW C.R., HERBERTS R.A., DÁRIO M.G., BADOTTI F., MILETTI L.C., STAMBUK B.U. (2004) **“Improving maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*”**. In: XI International Congress on Yeast 2004, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Book of Abstracts, p. 147

HERBERTS., R. A., DARIO, M. G., MILETTI, L. C., ALVES, S. L. JR., STAMBUK, B. U. (2005). **“Brewing yeast vitality: its evaluation through uptake and catabolism of a maltose analog.”** In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005, Águas de Lindóia. SP, Brasil, Programa e Índices. p.59

ALVES, S. L. JR., HOLLATZ, C., HERBERTS., R. A., MILETTI, L. C., STAMBUK, B. U. (2005). **“Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* *AGT1* gene renders cells incapable of maltotriose fermentation”** In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005, Águas de Lindóia. SP, Brasil, Programa e Índices. p.60

HERBERTS., R. A., DARIO, M. G., CORDIOLI, M. L. A., MILETTI, L. C., STAMBUK, B. U. (2005). **“Evaluation of Brewing Yeast Vitality through Catabolism of a Maltose Analog”** In: 5° Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras, 2005, Campos do Jordão, SP, Brasil. Programa y Libro de Resumenes. p.76

STAMBUK, B. U., HERBERTS., R. A., DARIO, M. G., CORDIOLI, M. L. A. (2005). **“Evaluation of brewing yeast vitality through uptake and catabolism of a maltose analog”** in: Annual Meeting of American Society of Brewing Chemists, Savanna, GO, USA. Program Book. p. 23

STAMBUK, B. U., HERBERTS., R. A., DARIO, M. G., CORDIOLI, M. L. A. (2005). **“Evaluation of brewing yeast vitality through uptake and catabolism of a maltose analog”** in: Joint Meeting of the 3 Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2005, San Francisco, CA, USA. Abstracts of the XI International Congress of Mycology. p. 11.

STAMBUK, B. U., ALVES, S. L. JR., HERBERTS., R. A., MILETTI, L. C., HOLLATZ, C. (2005). **“Molecular analysis of active maltotriose transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*”** in: Joint Meeting of the 3 Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2005, San Francisco, CA, USA. Abstracts of the XI International Congress of Mycology. p. 38.

“Transporte Ativo de  $\alpha$ -Glicosídeos:  
uma Metodologia para Avaliar a Vitalidade de  
Leveduras Cervejeiras”

Por

RICARDO ANDRÉ HERBERTS

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Boris U. Stambuk, pela sua orientação, apoio, dedicação, paciência e, sobretudo, pela oportunidade de experiência para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFSC, pelo auxílio prestado.

A meus amigos de laboratório, pelo apoio prestado. Em especial, Débora, Denise, Luiz, Marcelo, Maria Luiza, Sérgio, que de forma direta, ou indireta colaboraram para execução deste trabalho.

À coordenadoria, secretaria e professores da Pós-Graduação pelo apoio e muitos esclarecimentos prestados ao longo do curso.

A minha família, pelo apoio e carinho dedicado durante a execução deste trabalho, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao Conselho Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Fundação de Ciência e Tecnologia de Santa Catarina (FUNCITEC) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. Finalmente, à Toyobo do Brasil Ltda., pela doação da enzima peroxidase.

# ÍNDICE GERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>ii</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	<b>ii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
I.1 CERVEJA: HISTÓRICO E MERCADO.....	1
I.2 TIPOS DE CERVEJA.....	5
I.3 UTILIZAÇÃO DE AÇUCARES DURANTE A PRODUÇÃO DE CERVEJA.....	6
I.4 ESTRESSES OCORRIDOS DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO.....	12
I.5 TESTES DE VIABILIDADE E VITALIDADE.....	13
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
III.1 CEPAS UTILIZADAS.....	18
III.2 MÉTODOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	19
III.3 TESTES FERMENTATIVOS.....	20
III.4 DETERMINAÇÃO DE GLICOSE.....	21
III.5 DETERMINAÇÃO DE MALTOSE.....	21
III.6 DETERMINAÇÃO DE ETANOL.....	21
III.7 ANÁLISE DE AÇUCARES ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (TLC).....	22
III.8 TESTES DE VIABILIDADE.....	22
III.9 TESTES DE VITALIDADE.....	23
III.10 DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DO TRANSPORTE DE $pNF\alpha G$ .....	24
III.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE $\alpha$ -GLICOSIDASE.....	24
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
<b>V. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>53</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA I.1</b> Evolução da produção de cerveja (bilhões de litros) no Brasil.....	3
<b>FIGURA I.2</b> Evolução do consumo de cerveja (litros por ano) por habitante no Brasil.....	4
<b>FIGURA I.3</b> Custo da produção de cerveja até chegar ao consumidor final.....	5
<b>FIGURA I.4</b> Ação das $\alpha$ -amilases (flechas vermelhas) e $\beta$ -amilases (flechas azuis) na degradação do amido durante a maltação.....	7
<b>FIGURA I.5</b> Utilização de açúcares por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	8
<b>FIGURA I.6</b> Estrutura do substrato <i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -D-glicosídeo ( <i>pNF<math>\alpha</math>G</i> ).....	16
<b>FIGURA IV.1:</b> Reação da álcool oxidase e peroxidase.....	27
<b>FIGURA IV.2:</b> Dosagem colorimétrica de etanol.....	29
<b>FIGURA IV.3:</b> Importância da permease <i>AGT1</i> na fermentação de açúcares por <i>S. cerevisiae</i> .....	30
<b>FIGURA IV.4:</b> Capacidade fermentativa de populações da cepa <i>70</i> .....	33
<b>FIGURA IV.5:</b> Capacidade fermentativa de populações da cepa <i>B01</i> .....	35
<b>FIGURA IV.6:</b> Capacidade fermentativa de populações da cepa <i>L52</i> .....	36
<b>FIGURA IV.7:</b> Comparação dos métodos de determinação de viabilidade e vitalidade com a cepa <i>70</i> submetida a depleção de nutrientes .....	38
<b>FIGURA IV.8:</b> Capacidade fermentativa da cepa <i>70</i> submetida a depleção de nutrientes .....	40
<b>FIGURA IV.9:</b> Comparação dos métodos de determinação de viabilidade e vitalidade com a cepa <i>A3</i> submetida a depleção de nutrientes.....	41
<b>FIGURA IV.10:</b> Capacidade fermentativa da cepa <i>A3</i> submetida a depleção de nutrientes.....	42
<b>FIGURA IV.11:</b> Viabilidade celular durante o estresse térmico.....	44
<b>FIGURA IV.12:</b> Comparação dos métodos de determinação de viabilidade e vitalidade com a cepa <i>70</i> submetida ao estresse térmico.....	45
<b>FIGURA IV.13:</b> Capacidade fermentativa da cepa <i>70</i> submetida ao estresse térmico.....	47

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>TABELA I.1</b> Consumo de cerveja em diversos países.....	3
<b>TABELA III.1.</b> Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas.....	19
<b>TABELA IV.1</b> Atividade de transporte e hidrólise de $\alpha$ -glicosídeos das cepas CEN.PK2-1C, LCM-003, 1403-7A e LCM-001 crescidas em meio rico contendo 2% de maltose como fonte de carbono.....	32

## RESUMO

Durante o processo de produção de cerveja as leveduras são submetidas a diversos tipos de estresses (temperatura, altas concentrações de etanol, depleção de nutrientes, pH, etc), provocando a perda da capacidade fermentativa das células e conseqüente surgimento de um produto de baixa qualidade. Esta característica faz com que seja de fundamental importância a determinação da qualidade (viabilidade e vitalidade) das leveduras antes de iniciar um novo ciclo fermentativo. Com o objetivo de verificar a aplicabilidade do teste de transporte de *pNF $\alpha$ G* como método para avaliar a vitalidade das leveduras cervejeiras, foi comparado este método com os métodos comumente utilizados pelas indústrias (crescimento celular após plaqueamento das células, coloração com azul de metileno, e o teste do poder acidificante). O ensaio foi utilizado com sucesso para prever a vitalidade de populações de leveduras em testes fermentativos contendo concentrações crescentes de células vivas. Nossos resultados mostraram também que quando as células de levedura são submetidas ao estresse de depleção de nutrientes, ocorre queda na vitalidade, mas não na viabilidade das células. Já durante um estresse por temperatura (52°C), ambos os parâmetros são afetados. Enquanto que o teste de viabilidade pelo azul de metileno e o teste de vitalidade pelo poder acidificante apresentaram várias vezes resultados não confiáveis (resultados falso-positivos), o teste de vitalidade pelo ensaio de transporte de *pNF $\alpha$ G* apresentou um declínio acentuado na produção de *p*-nitrofenol pelas células, correlacionado com a queda na capacidade fermentativa das mesmas. Portanto, nossos resultados indicam que a metodologia proposta (determinação do transporte de *pNF $\alpha$ G*) poderia ser utilizada como teste de vitalidade para leveduras cervejeiras.

## ABSTRACT

During brewing fermentation yeast cells are exposed to several environmental stresses (nutrient depletion, high temperatures and ethanol concentrations) that can reduce the fermentation performance of the cells and, consequently, may lead to products with low quality. This characteristic thus makes highly important the determination of the quality (viability and vitality) of the yeast slurry before initiating a new fermentation cycle. In order to verify the applicability of the *pNF $\alpha$ G* transport assay as a method to evaluate the vitality of yeast cells, we compared this method with other methods (cell growth on plates, coloration with methylene blue and the acidification power test) frequently used by the brewing industries. The assay was successfully used to predict the vitality of yeast populations in fermentation trials containing increasing concentrations of dead cells. Our results also show that when the yeast cells are submitted to a nutrient depletion stress, occurs a significant loss in the vitality, but not in the viability of the cells. When the stress is thermal (52°C), both parameters were affected. While the viability assay using methylene blue or the vitality assay measuring the acidification power showed several times non trustable results (false-positive results), the vitality test using the *pNF $\alpha$ G* transport assay showed a sharp decline in the production of *p*-nitrophenol by the cells, correlated with the observed decline in their fermentation performance. Therefore, our results indicate that the proposed methodology (determination of *pNF $\alpha$ G* transport) can be used as a vitality test for brewing yeasts.

# **I. INTRODUÇÃO**

## **I.1. CERVEJA: HISTÓRICO E MERCADO**

Os primeiros relatos de elaboração e consumo da cerveja datam de cerca de 6.000 a.C., quando sumérios e babilônios já faziam uso desta bebida. Alguns anos mais tarde, a bebida chegou ao Egito, como demonstrado por hieróglifos, passando este país a produzir diversas variedades deste produto, como a Cerveja dos Notáveis e a Cerveja de Tebas. A cervejaria mais antiga descoberta até o momento é também desta civilização, datada de cerca de 5.400 a.C. Este povo divulgou a cerveja entre outras civilizações orientais e foram responsáveis pelo ingresso da bebida na bacia do Mediterrâneo, sendo de lá exportada para a Europa e todo o mundo (SAMUEL, 1996). Mais recentemente, na Idade Média, vários mosteiros produziam cerveja fazendo uso de várias ervas aromatizantes, como por exemplo, mirica, rosmarinho, louro, sálvia, gengibre, e lúpulo, sendo este último, utilizado até hoje e introduzido no processo entre os anos 700 e 800. Foi graças aos monges do mosteiro San Gallo, na Suíça, que o lúpulo começou a fazer parte, definitivamente, da composição da cerveja. Já no século XIX ocorreu uma revolução na indústria cervejeira, quando Louis Pasteur e Emil Christian Hansen demonstraram a importância da utilização de culturas de leveduras puras e o processo de pasteurização para conservação prolongada da cerveja, sendo que esses novos conceitos e tecnologias levaram a um aumento considerável na qualidade do produto final.

No Brasil, a primeira cerveja fabricada industrialmente foi a Bohemia, em 1853, marca hoje produzida pela AmBev - Companhia de Bebidas das Américas. Atualmente, esta é a maior cervejaria da América Latina, criada em julho de 1999, através da fusão das

cervejarias Brahma e Antarctica, sendo líder no mercado brasileiro de cervejas e estando presente em 14 países. Em 2002, foi fechada a aliança com a Quilmes Industrial S/A (Quinsa) – maior cervejaria da Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai –, para a integração das operações no Cone Sul. O acordo criou a terceira maior operação comercial de bebidas do mundo, com 10 bilhões de litros anuais e, em março de 2004, AmBev e a Interbrew, anunciaram uma aliança estratégica, constituindo a maior cervejaria do mundo e tornando-se a líder mundial do setor, com uma participação de aproximadamente 14% do mercado. Em 2005, a cerveja Brahma, vira marca mundial e passa a ser vendida em mais 15 países, entre eles Estados Unidos, Reino Unido, Canadá, Rússia, França, Espanha, Itália, Bélgica, Portugal e Holanda (AMBEV, [www.ambev.com.br](http://www.ambev.com.br)).

Segundo dados do Sindicerv (SINDICATO DA CERVEJA, [www.sindicerv.com.br](http://www.sindicerv.com.br)) o Brasil está entre os cinco maiores produtores de cerveja do mundo, com uma produção de cerca de 8,5 bilhões de litros em 2004 (Figura I.1), perdendo apenas para China (27 bilhões de litros), Estados Unidos (24 bilhões de litros), Alemanha (11 bilhões de litros) e Rússia (9 bilhões de litros). Com um faturamento de R\$ 16,5 bilhões no ano de 2003, o setor emprega mais de 150 mil pessoas direta e indiretamente, sendo que nos últimos cinco anos houve um investimento de cerca de R\$ 3 bilhões no setor, através da criação de 10 novas plantas industriais, além de ampliações e modernizações em fábricas já existentes.

Entretanto, em relação ao consumo *per capita*, o Brasil, com uma média de 47 litros/ano por habitante, está abaixo do registrado por países como México, Espanha e até mesmo Japão, além de ser significativamente inferior aos países europeus (Tabela I.1).

### MERCADO BRASILEIRO DE CERVEJAS - PRODUÇÃO (em bilhões de litros)



**Figura I.1:** Evolução da produção de cerveja (bilhões de litros) no Brasil.

**Tabela I.1:** Consumo de cerveja em diversos países.

CONSUMO PER CAPITA ( litros/habitante )	
Rep. Checa	158
Alemanha	117,7
Reino Unido	101,5
Austrália	92
Estados Unidos	84
Espanha	78,3
Japão	56
México	50
<b>Brasil</b>	<b>47</b>
França	35,5
Argentina	34
China	18

Fonte: Brewers of Europe, Alaface e Sindicerv (2002-2003)

Embora esse consumo tenha sido incrementado nos primeiros anos de implantação do Plano Real (1994/1995), saltando de aproximadamente 40 para 50 litros/ano/habitante (Figura I.2), o nível se mantém estável desde então, especialmente porque ao se levar em

conta o baixo poder aquisitivo de boa parte de seus consumidores, o preço do produto é alto. Na saída da fábrica, seu custo, de R\$ 0,60 por litro, é um dos menores do mundo. Porém, até chegar ao consumidor final a cerveja sofre a incidência de uma série de tributos, conforme demonstra a Figura I-3. Cabe salientar que apesar da cerveja brasileira ser uma das mais baratas do mundo, os dados acima indicam um potencial de produção e consumo ainda em expansão. Certamente novos avanços e/ou melhorias na produção poderão contribuir para aumentar ainda mais o desempenho das empresas envolvidas. Consideráveis progressos têm sido evidenciados na otimização da produção e processamento das matérias primas utilizadas, na engenharia de processos de fabricação e comercialização dos produtos, e numa melhora na compreensão da fisiologia e metabolismo do microrganismo utilizado neste processo, as leveduras do gênero *Sacharomyces*.



**Figura I.2:** Evolução do consumo de cerveja (litros por ano) por habitante no Brasil.



**Figura I.3:** Custo da produção de cerveja até chegar ao consumidor final.

## I.2 TIPOS DE CERVEJA

A cerveja é uma bebida não destilada obtida da fermentação alcoólica, mediada por leveduras específicas, de mosto de cereal maltado. Portanto, os quatro elementos básicos da bebida são água, malte, lúpulo e leveduras (fermento). Diferentes tipos de cervejas são obtidos através de diferentes variações na composição, concentração e no processo de fabricação. Atualmente, com exceção da Alemanha, cereais como milho, arroz e trigo também são utilizados em substituição parcial ao malte. Açúcar (sacarose), em pequenas proporções, também pode ser utilizado. Além de matérias primas distintas, as cervejas podem também diferir no tipo de levedura empregada na fermentação. As linhagens de

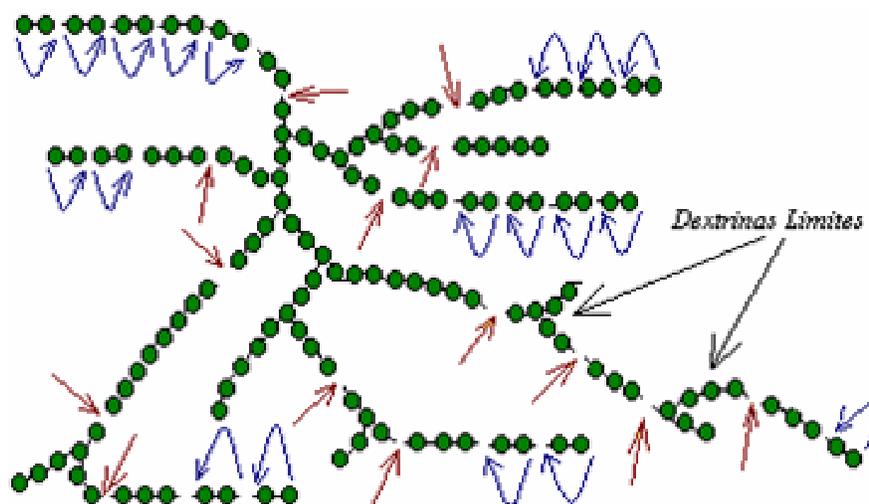
levedura mais utilizadas em cervejaria pertencem a duas espécies do gênero *Saccharomyces*, *S. cerevisiae* e *S. carlsbergensis* (também denominada *S. pastorianus*), sendo que esta última é possivelmente um híbrido natural entre *S. cerevisiae* e *S. bayanus* (também denominada *S. uvarum*). As cervejas do tipo “Lager” são produzidas pela fermentação profunda (baixa), por cepas de *S. carlsbergensis*, consideradas como de alta capacidade fermentativa e de menor capacidade respiratória que *S. cerevisiae*. Apresentam também um tempo de sedimentação rápido e pelos motivos expostos geralmente estas fermentações ocorrem em baixas temperaturas. As cervejas do tipo “Ale” são em geral produzidas por fermentação superficial (alta), realizadas por cepas de *S. cerevisiae* (AQUARONE et al., 1983; ZASTROW & STAMBUK, 2000; BOND et al., 2004). As leveduras *Saccharomyces* são de fato os principais microorganismos utilizados na produção de bebidas alcoólicas, álcool combustível e panificação (INGLEDEW, 1993). O emprego destes organismos pelas indústrias deve-se ao fato destas leveduras serem capazes de fermentar os açúcares mesmo em presença de oxigênio (DE DEKEN, 1966; BARFORD & HALL, 1979; VAN DIJKEN & SCHEFFERS, 1987). Além disso, as células de *S. cerevisiae* constituem um excelente modelo experimental de estudo da biologia celular, molecular e bioquímica de células eucarióticas (BOTSTEIN & FINK, 1988).

### **I.3 UTILIZAÇÃO DE AÇUCARES DURANTE A PRODUÇÃO DE CERVEJA**

O início do processo de produção de cerveja ocorre pela maltação da cevada, no qual o amido contido nos grãos é hidrolisado por enzimas específicas -  $\alpha$ -amilases - (Figura I.4) produzindo pequenos oligossacarídeos contendo aproximadamente 5-10

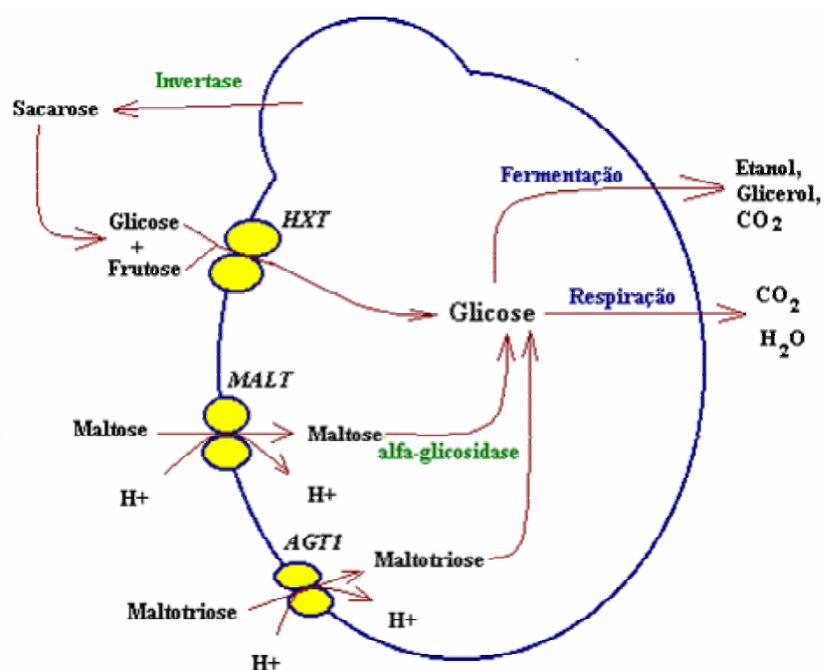
unidades de glicose unidas por ligações  $\alpha$ 1-4, e outros oligossacarídeos contendo ramificações com ligações  $\alpha$ 1-6 (dextrinas), que não serão posteriormente hidrolisadas. A seguir, os oligossacarídeos lineares são clivados, através da ação de  $\beta$ -amilases (enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas a cada duas unidades), liberando grande quantidade de maltose, maltotriose, e glicose. Por este motivo, o principal açúcar encontrado nos mostos cervejeiros é a maltose ( $\pm 55\%$ ), seguida de maltotriose ( $\pm 18\%$ ), glicose ( $\pm 12\%$ ), frutose e sacarose ( $\pm 3\%$ ), e finalmente as dextrinas ( $\pm 20\%$ ) que não são utilizadas pelas leveduras durante a fermentação (SUIHKO et al., 1993; WEUSTHUIS et al., 1993; WILLAERT, 2001; MENESES & JIRANEK, 2002).

Os principais açúcares empregados na produção de cerveja são, portanto, os  $\alpha$ -glicosídeos maltose e maltotriose, seguidos do monossacarídeo glicose. Entretanto, as células de *S. cerevisiae* apresentam uma clara e definida preferência pela utilização dos diferentes açúcares presentes nestes processos fermentativos: a glicose e a frutose constituem os primeiros substratos a serem utilizados pelas células, seguido da maltose, e finalmente a maltotriose (D'AMORE 1992; SUIHKO et al., 1993).



**Figura I.4:** Ação das  $\alpha$ -amilases (flechas vermelhas) e  $\beta$ -amilases (flechas azuis) na degradação do amido durante a maltação.

A fermentação destes açúcares por *S. cerevisiae* envolve inicialmente o seu transporte para o interior da célula (LAGUNAS, 1993). No caso da glicose e frutose, estes açúcares são captados por sistemas de transporte de difusão facilitada (genes que codificam para os transportadores *HXT1-HXT17*, *GAL2*) e são diretamente catabolizadas na via glicolítica (vide Figura I.5). Estes transportadores diferem entre eles na afinidade pelo açúcar e pelo sistema de regulação, dependente entre outros fatores da própria presença dos açúcares no meio. Todas estas permeases transportam também frutose e manose, porém com afinidades menores do que pela glicose, motivo pelo qual a glicose é captada mais rapidamente de que a frutose (OZCAN & JONHSTON, 1999; BOLES & HOLLEMBERG, 1997).



**Figura I.5:** Utilização de açúcares por *Saccharomyces cerevisiae*.

Assim como no caso da glicose, a fermentação da maltose e maltotriose envolve o transporte do carboidrato para o interior da célula (Figura I.5), onde posteriormente sofrerá ação da maltase ( $\alpha$ -glicosidase), liberando moléculas de glicose que serão metabolizadas na glicólise (ZASTROW et al., 2001; JAMES et al., 2003). A  $\alpha$ -glicosidase é uma enzima citoplasmática com um pH ótimo neutro capaz de hidrolisar maltose, sacarose, maltotriose e substratos sintéticos como o *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicosídeo (*p*NFaG). Entretanto, análises mais detalhadas tem revelado a existência de pelo menos 9 a 10 isoformas desta enzima, sendo que algumas apresentam a especificidade descrita acima, enquanto que outras são específicas para o  $\alpha$ -metil-glicosídeo (TABATA et al., 1984; ZASTROW et al., 2001).

Para que uma cepa da levedura *S. cerevisiae* seja capaz de fermentar a maltose é necessário a presença de pelo menos um dos cinco loci *MAL* (*MAL1* a *MAL4* e *MAL6*), cada um contendo os três genes necessários à metabolização da maltose: o gene *MALT* que codifica para o transportador de maltose (também denominado de *MALx1*, onde *x* representa o locus), o gene *MALS* (ou *MALx2*) que codifica para a maltase, e o gene *MALR* (ou *MALx3*) que regula, induzindo na presença de maltose, a expressão dos outros dois genes por se ligar à região *UAS<sub>mal</sub>* presente entre os genes *MALT* e *MALR* facilitando a ação da RNA-polimerase II (NEEDLEMAN, 1991; JESPERSEN et al., 1999; NOVAK et al., 2004). Além da indução, outro mecanismo de regulação da transcrição dos genes *MAL*, ocorre pela presença de glicose no meio. Este açúcar ativa a proteína Mig1, que por sua vez bloqueia as regiões promotoras *UAS<sub>mal</sub>* impedindo a expressão gênica (NEEDLEMAN, 1991; HORAK, 1997; NOVAK et al., 2004). Este é um dos motivos que fazem com que durante a fermentação do mosto cervejeiro a maltose e maltotriose não sejam utilizadas pelas células

enquanto tenha glicose, frutose ou sacarose no meio (D'AMORE et al., 1989; ERNANDES et al., 1992; 1993; SUIHKO et al., 1993).

O transportador de maltose codificado pelos genes *MALx1* é uma permease específica para maltose e turanose capaz de transportar ativamente o açúcar através do co-transporte com  $H^+$ , sendo também denominado como *symport* maltose- $H^+$  (CHANG et al., 1989; LAGUNAS, 1993; HORÁK, 1997; JESPERSEN et al., 1999; STAMBUK et al., 1999; 2000; STAMBUK & ARAUJO, 2001). Esta proteína transportadora é induzida pela maltose, e sua síntese é reprimida pela presença de glicose no meio de cultura, como já descrito anteriormente. A glicose também induz a inativação catabólica desta proteína de membrana, provocando sua endocitose e degradação proteolítica nos vacúolos (RIBALLO et al., 1995; MEDINTZ et al., 1996). Como o co-transporte de  $H^+$  com maltose impõe alterações no gradiente eletroquímico da membrana, as células tentam compensar imediatamente este gradiente expulsando íons  $K^+$  presentes no interior da célula (DIAS & PEINADO, 1984). A seguir a metabolização da glicose (proveniente da quebra da maltose), assim como a própria entrada de íons  $H^+$ , ativam a  $H^+$ -ATPase presente na membrana que expulsa o excesso de prótons do interior da célula com alto custo energético pela hidrólise de um ATP para cada  $H^+$  excretado (SERRANO, 1983). Portanto, durante a fermentação 25% da energia gerada pela glicólise fermentativa (produção de quatro ATPs a partir das duas moléculas de glicose provenientes da maltose) é gasta no transporte ativo do açúcar. Além da regulação da transcrição, ou da permanência ou não da permease na membrana plasmática, outros fatores ambientais como estresse salino ou baixas temperaturas também podem inibir o transporte de maltose para o interior das células (TRAINOTTI & STAMBUK, 2001; RAUTIO & LONDESBOROUGH, 2003; HOLLATZ & STAMBUK, 2003).

Através da análise de um alelo do transportador de maltose HAN et al. (1995) caracterizaram um outro transportador (denominado *AGTI*) responsável pela captação de diversos  $\alpha$ -glicosídeos, incluindo, trealose, sacarose, maltotriose, isomaltose,  $\alpha$ -metilglicosídeo, paltinose, melezitose e turanose. Tanto o transportador de maltose, quanto a permease codificada pelo gene *AGTI* apresentam homologia estrutural, e ambos os transportadores permitem a captação ativa dos açúcares pelo co-transporte de  $H^+$  (STAMBUK et al., 1999; 2000; STAMBUK & DE ARAUJO, 2001). O transportador *AGTI* permite a captação de maltose e maltotriose com baixa afinidade ( $K_m \sim 20mM$ ) quando comparado com os transportadores de maltose codificados pelos genes *MALx1*, que possuem alta afinidade ( $K_m \sim 5mM$ ) pelo substrato (STAMBUK et al., 1999; STAMBUK & DE ARAÚJO, 2001). Condizente com a importância que este transportador tem na fermentação do mosto cervejeiro, foi verificado que praticamente todas as cepas de cervejaria possuem o gene *AGTI* e pelo menos um transportador *MALx1* (JESPERSEN et al., 1999). Inclusive, resultados recentes indicam que, independentemente do número e tipo de genes *MALx1* presentes numa célula, muitas leveduras de cervejaria possuem como principal transportador na sua membrana a permease *AGTI* (RAUTIO & LONDESBOROUGH, 2003; VIDGREN et al., 2005).

Independentemente da energética do transporte (difusão facilitada ou transporte ativo), diversos trabalhos têm demonstrado que o passo limitante na fermentação de açúcares pelas células de *S. cerevisiae* é o transporte através da membrana plasmática (OSINGA et al., 1989; SALMON & MAURICIO, 1994; KODAMA et al., 1995; MALLUTA et al., 2000; GOFFRINI et al., 2001; ZASTROW et al., 2001). Já foi demonstrado que quando os açúcares são captados com baixas velocidades, o seu metabolismo é essencialmente respiratório (POSTMA et al., 1989). No caso da maltose, o influxo aumentado deste açúcar

para o interior da célula, com o seu conseqüente acúmulo, atuaria como um sinal na indução dos genes *MAL* através do regulador *MALR* permitindo o crescimento fermentativo. De fato, foi verificado que tanto a atividade de transporte como os níveis de concentração intracelular da maltose estão correlacionados aos níveis da indução da expressão dos genes *MAL*, ou seja, quanto maior a concentração externa de maltose, maior atividade de transporte e de acúmulo deste açúcar intracelularmente, resultando em um elevado nível de indução gênica (WANG, et al., 2002).

Como descrito anteriormente, as leveduras apresentam dificuldades de fermentar a maltotriose, já que este açúcar é o último a ser utilizado pelas células durante a fermentação do mosto cervejeiro. Como conseqüência da utilização incompleta deste açúcar, a cerveja obtida possui sabor atípico e um elevado extrato filtrável e é considerada de baixa qualidade (STEWART & RUSSEL, 1993; SUIHKO et al., 1993; ZHENG et al., 1994; WILLAERT, 2001). Conseqüentemente, as indústrias estão constantemente selecionando e otimizando cepas para o adequado uso nos processos fermentativos. Do mesmo modo, diversos pesquisadores vêm investigando não só as características fisiológicas das células durante a utilização deste açúcar, como também parâmetros físico-químicos e ambientais que poderiam favorecer a utilização desta fonte de carbono pelas leveduras, e os conhecimentos até o presente obtidos em relação ao metabolismo deste açúcar, assim como da maltose, vêm permitindo melhorar o processo fermentativo de produção de cerveja (OSINGA et al., 1989; ZHENG et al., 1994a; 1994b; KODAMA et al., 1995; REES & STEWART, 1997; 1999). No momento resta melhorar e/ou obter cepas de levedura com capacidade de fermentar tanto a maltose como a maltotriose com alta eficiência.

## **I.4 ESTRESSES OCORRIDOS DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO**

Ao serem inoculadas no mosto cervejeiro, as leveduras normalmente encontram altas concentrações de açúcares que impõem um considerável estresse osmótico nas células, além de consideráveis pressões hidrostáticas provocados pelos grandes volumes e altura da coluna do fermentador. Durante e no final da fermentação as células são expostas a altas concentrações de etanol. Ao final da fermentação as células de leveduras sedimentam, e o mosto é então removido para processamento até a obtenção do produto final. As leveduras sedimentadas são então re-inoculadas num mosto fresco para iniciar novo ciclo de fermentação. Portanto, durante o processo de produção de cerveja as leveduras são submetidas a diversos estresses, incluindo lavagens com ácido para evitar contaminações por bactérias e/ou outros microrganismos (SMART & WHISKER, 1996; HEGGART et al; 1999; CUNNINGHAM & STEWART, 2000; YAMAGISHI et al., 2001; JENKINS et al., 2003; POWELL et al., 2003; CAMPELO & BELO, 2004; KOBİ et al., 2004). Conseqüentemente, o estado fisiológico e a performance fermentativa das leveduras não permanecem constantes durante os vários ciclos de fermentação, e depois de 6 a 8 ciclos as leveduras perdem a sua capacidade fermentativa máxima (YAMAGISHI et al., 2001; HEGGART et al., 1999; KOBİ et al., 2004). As leveduras são então descartadas, e a fermentação é iniciada com um inóculo de leveduras novas. Esta característica do processo faz com que seja de fundamental importância a determinação da qualidade das leveduras em uso antes de iniciar um novo ciclo fermentativo.

## **I.5 TESTES DE “VIABILIDADE” E “VITALIDADE”**

Com o objetivo de avaliar a qualidade das leveduras, são realizados testes que permitem determinar a “viabilidade” (percentual de células vivas) e “vitalidade” (poder fermentativo) do fermento a ser utilizado. É necessário também que estes testes sejam precisos, reprodutíveis, simples e de rápida execução para poderem ser utilizados pelas indústrias cervejeiras (LENTINI, 1993; LLOYD & HAVES, 1995; MOCHABA et al., 1998; HEGGART et al., 1999). Normalmente são utilizados diversos métodos que permitem determinar a viabilidade das leveduras. O mais confiável consiste na determinação do número de colônias formadas após plaqueamento de uma diluição conhecida de células em meio de cultura sólido. Entretanto, este método é pouco utilizado pelas indústrias devido ao longo tempo necessário (24-48 horas) para obter o resultado. Mesmo o método atualmente recomendado pela Sociedade Americana de Químicos Cervejeiros (ASBC 2004), que determina o crescimento celular em meio de cultura sólido em lâminas de microscópio, requer 18 horas para obter um resultado confiável.

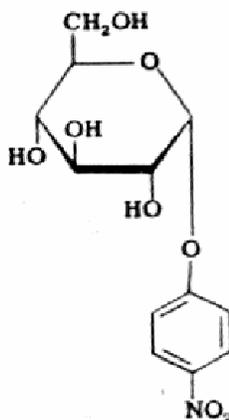
Assim, foram desenvolvidos vários métodos, geralmente baseados na coloração diferencial de células, que permitem distinguir rapidamente as células vivas das mortas. O método mais empregado faz uso do corante azul de metileno (ou variantes como o violeta de metileno) que é excluído das células vivas, mas que cora fortemente células mortas com lesões na membrana citoplasmática (SAMI et al., 1994; SMART et al., 1999; 2003). Apesar de ser um teste rápido e fácil, trata-se de um teste indireto, uma vez que mede a integridade da membrana plasmática das células e não tem mostrado resultados confiáveis, havendo vários relatos de diferenças significativas com a real morte celular observada (falso positivo) ocorrida em alguns tipos de estresse (O’CONNOR-COX et al., 1997). Existem outros métodos baseados em substratos fluorescentes (MCGAIR, 1990; BOUIX & LEVEAU,

2001; OH & MATSUOKA, 2002; VAN ZANDYCKE et al., 2003), porém de pouca utilidade para as indústrias fermentadoras, pois além de serem testes indiretos, requerem equipamentos sofisticados (fluorímetros, citometria de fluxo, etc.) geralmente não disponíveis e/ou com preços proibitivos.

A situação torna-se mais complicada com os testes existentes para determinar a vitalidade das células. A maioria dos métodos empregados determina diversas propriedades ou atividades que não estão diretamente vinculados à capacidade fermentativa das células. O recomendado seria determinar a produção de etanol ou CO<sub>2</sub> com os açúcares encontrados no mosto, mas novamente a metodologia não é utilizada devido ao grande tempo necessário para se obter o resultado. Desta forma, atualmente são utilizados outros métodos indiretos, como a capacidade das células extrudarem prótons (teste de “acidificação”, vide KARA et al., 1988; DINSDALE et al., 1995; CUNNINGHAM & STEWART, 1998; SMART et al., 1999; HEGGART et al., 2000) ou outros íons como o Mg<sup>2+</sup> (MOCHABA et al., 1997; 1998). Entretanto, em inúmeras ocasiões estes métodos não mostraram correlações claras com a real capacidade fermentativa das células (vide ROSA & SA-CORREIA, 1994; O’CONNOR-COX et al., 1997; CLARKE et al., 2001).

Considerando que na fermentação dos açúcares, o passo limitante é o transporte através da membrana (KODAMA et al., 1995; MALLUTA et al., 2000; ZASTROW et al., 2000; 2001; GOFFRINI et al., 2001), um método que avalie a capacidade de transporte dos principais açúcares encontrados no mosto cervejeiro seria um grande candidato para teste de vitalidade das leveduras. Recentemente demonstrou-se que o substrato *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicosídeo (*p*NF $\alpha$ G), um análogo à maltose (Figura I.6) pode ser utilizado para determinar a atividade de transporte de maltose e maltotriose em *S. cerevisiae* (HOLLATZ & STAMBUK,

2001). Este substrato tem sido largamente utilizado na determinação da atividade maltase das leveduras. É transportado com alta afinidade ( $K_m \sim 3$  mM) pela permease *AGT1*, sendo que após a hidrólise no interior das células pela maltase (que possui altíssima afinidade pelo *pNF $\alpha$ G*, com um  $K_m = 0,1-0,2$  mM, NEEDLEMAN et al., 1978; YOSHIKAWA et al., 1994) é liberado *p*-nitrofenol que pode ser facilmente quantificado colorimetricamente a 400 nm, permitindo a determinação da atividade de transporte desta permease nas leveduras (HOLLATZ & STAMBUK, 2001).



**Figura I.6:** Estrutura do substrato *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicosídeo (*pNF $\alpha$ G*).

## II. OBJETIVOS

Tendo em vista que o substrato cromogênico *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicosídeo (*pNF $\alpha$ G*) pode ser utilizado para determinar a atividade de transporte de maltose e maltotriose em *S. cerevisiae* (HOLLATZ & STAMBUK, 2001), pretendíamos:

- Verificar se existe uma correlação nos dados de transporte de *pNF $\alpha$ G* por diversas cepas industriais com a performance fermentativa (produção de etanol) das leveduras.
- Verificar o comportamento dos vários métodos descritos na literatura para determinar a viabilidade e vitalidade das leveduras, muitos deles corriqueiramente utilizados pelas indústrias, após submeter as células ao estresse de depleção de nutrientes, ou ao estresse de temperatura.
- Comparar o ensaio de transporte do *pNF $\alpha$ G* com os outros métodos de determinação da viabilidade e vitalidade nas células expostas aos estresses mencionados acima.

Desta forma acreditamos que o trabalho também contribua para o estudo os mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos na utilização de maltose e maltotriose por *Saccharomyces cerevisiae*, visando contribuir para a otimização do processo fermentativo em cervejaria.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### III.1. CEPAS UTILIZADAS

Foram utilizadas cepas de levedura industriais, incluindo leveduras de cervejaria do tipo “Lager” e “Ale”, assim como cepas laboratoriais, conforme descrito na Tabela III.1. A maioria das cepas foram gentilmente cedidas pela Dra. Anita Dolly Panek (Inst. de Química da UFRJ, Rio de Janeiro) ou pelo Dr. Dr. José Roberto Ernandes (Inst. de Química da Unesp-Araraquara). O gene *AGTI* foi apagado do genoma das cepas *CEN.PK2-1C* e *1403-7A* por recombinação homóloga e metodologias baseadas em PCR como descrito por LONGTIME et al. (1998), DEMARINI et al. (2001), e BATISTA et al. (2004). Brevemente, para deleção deste gene foram utilizados dois primers para, através de PCR, produzirem um fragmento linear de DNA com ~1,6 kb portando em suas extremidades regiões homólogas à região *upstream* e *downstream* do gene *AGTI* e, entre essas extremidades, o gene *kan<sup>r</sup>* que confere resistência à Geneticina. Quando as células de levedura são transformadas com esse fragmento, ele tende a integrar-se em seu genoma substituindo o gene de interesse pelo marcador em questão (*kan<sup>r</sup>*), permitindo a seleção dos mutantes deletados em meios contendo Geneticina. Em seguida as cepas parentais (não deletadas) e os transformantes deletados no gene *AGTI* foram analisados por PCR com primers que permitem a amplificação de uma banda de pouco mais de 800 pb apenas nas cepas contendo a deleção esperada, e de uma banda de aproximadamente 1900 pb apenas nas cepas que ainda continham o *AGTI* (vide BATISTA et al., 2004).

**Tabela III.1.** Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas.

Cepa	Característica	Procedência <sup>a</sup>
<b>70</b>	Levedura de panificação	<b>1</b>
<b>B01</b>	Levedura de cervejaria tipo “Ale”	<b>2</b>
<b>L-52</b>	Levedura de cervejaria tipo “Lager”	<b>1</b>
<b>A-3</b>	Levedura de cervejaria tipo “Ale”	<b>1</b>
<b>CEN.PK2-1C</b>	<i>MATa MAL21 MAL22 MAL23-8<sup>c</sup> AGT1 MAL12 mal13 SUC2 ura3-52 his3Δ1 leu2-3,112 trp1-289</i>	<b>3</b>
<b>LCM-003</b>	Isogênica a <i>CEN.PK2-1C</i> , mas <i>agt1Δ</i>	<b>Este trabalho</b>
<b>1403-7A</b>	<i>MATa MAL41 MAL42 MAL43<sup>c</sup> AGT1 MAL12 mal13 MAL31 MAL32 mal33 MGL3 suc<sup>-</sup> gal3 gal4 trp1 ura3</i>	<b>4</b>
<b>LCM-001</b>	Isogênica a <i>1403-7A</i> , mas <i>agt1Δ</i>	<b>Este trabalho</b>

<sup>a</sup> 1) Labatt Breweries Company Limited of Canada. 2) AmBev- Companhia Brasileira de Bebidas. 3) European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Funcional Analysis, Frankfurt – Alemanha. 4) ATCC #208023.

### III.2. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram utilizados para crescimento das células o meio de cultura rico YP contendo 2% peptona, 1% extrato de levedura (ambos da Difco), 2% da fonte de carbono de interesse (glicose, maltose ou maltotriose) e no caso de meios sólidos, acrescidos de 2% bacto-agar. Todos os meios tiveram seu pH ajustado para pH 5,0 com HCl e esterilizados a 120°C por 15 min. As células foram inoculadas em erlenmeyers contendo 1/5 do seu volume de meio líquido, sendo a cultura incubada em um agitador a 28°C e 160 rotações por minuto. O crescimento celular foi determinado pela contagem de células em câmara hemocitométrica,

e determinando-se a massa celular (expressa em massa de células secas) a partir de medidas espectrofotométricas a 570 nm. Após atingir a fase exponencial de crescimento as células foram centrifugadas (3.000 rpm por 3 min), lavadas três vezes com água destilada estéril a 4°C, e ressuspensas de forma a atingir uma concentração celular de 20 g/l. Esta suspensão celular resultante foi utilizada como base para realizar todos os testes descritos posteriormente.

### **III.3. TESTES FERMENTATIVOS**

A capacidade das cepas de fermentar as diferentes fontes de carbono foi determinada utilizando-se 10 g/l de células em meio mínimo YNB líquido contendo 1,4% Yeast Nitrogen Base without amino acids (Difco) suplementados com 6% de maltose e 2% de glicose, para simular as condições e concentrações dos açúcares encontrados em um processo fermentativo utilizado pelas indústrias cervejeiras. Alternativamente foi utilizado o meio YNB líquido contendo 5% de extrato de malte (Sigma Chemical Co.). Os testes fermentativos foram realizados em erlenmeyers contendo 1/5 do seu volume de meio líquido, sendo a cultura incubada em um agitador a 28°C e 160 rotações por minuto. O consumo de açúcares, assim como a produção de etanol e glicerol, foram determinados nos sobrenadantes das culturas obtidos após remoção das células por centrifugação a 2.600 g por 3 min.

### **III.4. DETERMINAÇÃO DE GLICOSE**

A concentração de glicose foi determinada através de kits enzimáticos comerciais baseados na glicose oxidase e peroxidase seguindo as instruções do fabricante (Análisa Diagnóstica Ltda).

### **III.5. DETERMINAÇÃO DE MALTOSE**

A maltose foi determinada colorimetricamente através da reação com metilamina em meio alcalino conforme descrito por CÁCERES et al. (2000).

### **III.6. DETERMINAÇÃO DE ETANOL**

O etanol foi determinado colorimetricamente através da reação com álcool oxidase e peroxidase seguindo um método adaptado dos protocolos descrito por SALGADO et al. (2000) e RODIONOV et al. (2002). As amostras a serem analisadas (10 µL) foram depositadas nos orifícios de placas de Elisa de fundo chato (96 orifícios por placa) mantidas sobre o gelo, e em seguida utilizando um multipipetador de 8 canais adicionou-se 200 µL de reagente enzimático contendo 0,5 U/ml de álcool oxidase (de *P. pastoris*, Sigma), 4,0 U/ml de peroxidase (de raiz-forte, Toyobo do Brasil), 14 mM de aminoantipirina e 60 mM de fenol em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5 em cada orifício. Após incubação por 1

h a 37°C, a absorvância a 400 nm em cada orifício foi determinada com um leitor de placas marca TECAN SUNRISE utilizando-se o programa MAGELLAN V.3.11.

### **III.7. ANÁLISE DE AÇUCARES ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (TLC)**

Foi determinado, semi quantitativamente, a concentração dos carboidratos presentes nos sobrenadantes de meios contendo extrato de malte (2 µL de amostra) através de Cromatografia em Camada Delgada (TLC), utilizando-se placas de Sílica gel 60 (Merck) e *n*-butanol/etanol/água (5/2/1 v/v) como solvente. A posição dos diferentes açúcares nas amostras, assim como os padrões utilizados (10 µg de glicose, maltose, ou maltotriose, ou ainda 50 µg de extrato de malte), foram revelados com 20% de ácido sulfúrico a 120°C por 20min.

### **III.8. TESTES DE VIABILIDADE**

A viabilidade das células foi determinada utilizando-se dois métodos: O primeiro através do plaqueamento de suspensões celulares em meio YP-glicose sólido e contagem das colônias (unidades formadoras de colônias, CFU) após 2-3 dias de crescimento a 28°C. O segundo através do método de coloração com azul de metileno como descrito por SAMI et al. (1994), SMART et al. (1999) e SMART (2003). Este método vem sendo utilizado há

muitos anos por diversas indústrias cervejeiras (HEGGART et al., 1999) e consiste em dissolver 0,01% de azul de metileno (Sigma Chemical Co.) em uma solução de 2% citrato de sódio. A essa solução é adicionado igual volume da suspensão celular a ser analisada. Homogeneizou-se a suspensão resultante e, após 5 min a 25°C, contou-se às células em câmara hemocitométrica. As células mortas permaneceram fortemente coradas de azul durante toda a contagem. Os valores de células viáveis foram sempre expressos em percentagem de células não coradas.

### **III.9. TESTE DE VITALIDADE**

A vitalidade das células foi determinada pelo teste de acidificação (“acidification power”) após a adição de solução de glicose (KARA et al. 1988) ou maltose a uma suspensão celular, esta última mais recentemente adaptada à rotina das indústrias cervejeiras, como descrito por DINSDALE et al. (1995), SMART et al. (1999) e SMART (2003). Como descrito anteriormente, partiu-se de uma suspensão celular previamente lavada com água destilada de a 4°C e ressuspendidas de modo a atingir a concentração de 20 g/l. Em seguida 1,0 ml desta suspensão foi adicionada a 7,0 ml de água destilada. Ajustou-se o pH (solução 0,05 N de ácido clorídrico) a 5,0 e adicionou-se 1,0 ml de solução 3% de glicose ou maltose. O pH foi monitorado constantemente, sendo que o poder acidificante foi expresso pela diferença entre o pH inicial e o pH após 10 min de adição do açúcar (expresso em  $\Delta\text{pH}/10\text{min}$ ).

### III.10. DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DO TRANSPORTE DE *p*NF $\alpha$ G

A atividade de transporte de maltose e maltotriose foi determinada utilizando-se o substrato *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicosídeo (*p*NF $\alpha$ G) como descrito por HOLLATZ & STAMBUK (2001). Aproximadamente 100  $\mu$ L de uma suspensão contendo 20 g/l de células foi adicionada a igual volume de substrato de transporte (tampão 100 mM succinato-Tris pH 5,0 contendo 40 mM *p*NF $\alpha$ G). Após intervalos de tempos pré-estabelecidos (5-10 min) a reação foi interrompida pela adição de um ml de solução 2 M de bicarbonato de sódio, as células removidas por centrifugação (2.600 g, 3 min), e o *p*-nitrofenol produzido foi determinado a 400 nm ( $\Delta\epsilon = 14,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , no pH >9,0). Todas as medidas foram realizadas em triplicata e foram utilizados controles negativos com células fervidas. As atividades de transporte foram sempre expressas em  $\mu\text{moles transportados por [g de células secas]}^{-1} \text{ por min}^{-1}$ .

### III.11. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE $\alpha$ -GLICOSIDASE

A atividade  $\alpha$ -glicosidase foi determinada *in situ* utilizando-se células permeabilizadas como descrito por STAMBUK (1999). Aproximadamente 2 mg de células foram lavadas com 0,5 ml de tampão 100 mM MOPS-NaOH pH 6,8 (tampão A), e posteriormente ressuspensas em 200  $\mu$ l do mesmo tampão contendo 20 % de glicerol, 1 mM de EDTA, e 1 mM DTT. Em seguida, foram adicionados 12  $\mu$ l de uma solução de tolueno/etanol/10 % Triton X-100 em água (1:4:1 v/v) e as células foram vigorosamente

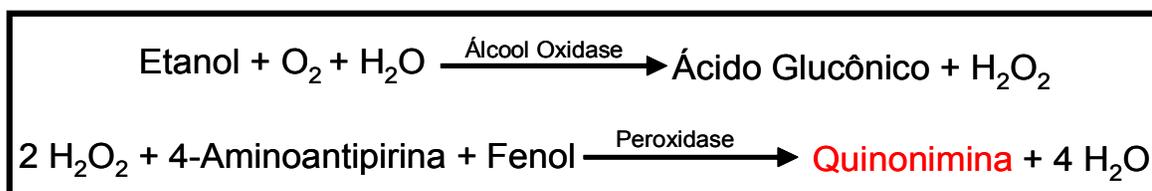
vortexadas durante 1 min. Após centrifugação as células permeabilizadas foram lavadas duas vezes com o mesmo tampão e ressuspensas em 1 ml de tampão A. Aproximadamente 50  $\mu$ l de células permeabilizadas foram adicionados a 0,95 ml de uma solução 1 mM de *p*NF $\alpha$ G em tampão A e incubadas durante 1 min a 30°C. Após a interrupção da reação por 5 min a 100°C, as células foram centrifugadas (2.600 g, 3 min), e o *p*-nitrofenol produzido foi determinado nos sobrenadantes a 400 nm ( $\Delta\epsilon = 7,28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , no pH 6,8). Todas as medidas foram realizadas em triplicata e foram utilizados controles com células previamente fervidas. As atividades  $\alpha$ -glicosidase foram expressas em  $\mu$ moles hidrolisados por [g de células secas] $^{-1}$  por min $^{-1}$ .

## IV. RESULTADOS

Considerando que o objetivo do presente trabalho visa prever a capacidade fermentativa de leveduras cervejeiras, a chamada “vitalidade” do fermento a ser utilizado num ciclo fermentativo, era necessário possuir uma metodologia que permitisse dosar etanol (o produto da fermentação dos açúcares presentes no mosto cervejeiro) num grande número de amostras. A quantificação da concentração de etanol na indústria de alimentos e bebidas é, de fato, importante para o monitoramento e otimização do processo industrial. Atualmente existem diversos métodos para quantificar etanol, e os mais utilizados fazem uso de técnicas cromatográficas (cromatografia gasosa ou cromatografia líquida) que dependem de equipamentos relativamente caros e sofisticados não disponíveis em nosso laboratório. Além disso, estes métodos possuem pouca utilidade quando o número de amostras a ser analisado é grande devido ao longo tempo necessário (10-30 min por amostra) para se obter o resultado final. No mercado existem também métodos enzimáticos para a determinação de etanol baseados na enzima álcool desidrogenase, que ao reduzir o álcool oxida o NADH, produzindo  $\text{NAD}^+$  que é quantificado a 340 nm. Entretanto, esta técnica apresenta a desvantagem de se tratar de um método cinético (cada amostra leva 10-20 min para ser analisada), sendo o produto da reação incolor e quantificado na faixa ultravioleta de comprimento de onda, além de apresentar elevados custos (US\$ >1,00/amostra).

Portanto, desenvolvemos um método de dosagem de etanol que pudesse ser aplicado utilizando-se a tecnologia já existente para placas de 96 orifícios (p. ex. placas de Elisa), o que permitiria utilizar pequenos volumes (~200  $\mu\text{L}$ ) de reativo enzimático, barateando os

custos, além do grande número de amostras que podem ser determinadas simultaneamente. Por uma série de motivos técnicos, incluindo os filtros disponíveis no leitor de placas de Elisa disponível, optamos por um método colorimétrico para determinar a concentração de etanol através da reação com álcool oxidase e peroxidase (Figura IV.1) que produz quinonimina, facilmente quantificável a 400 nm (SALGADO et al., 2000; GONCHAR et al., 2000; RODIONOV et al., 2002).

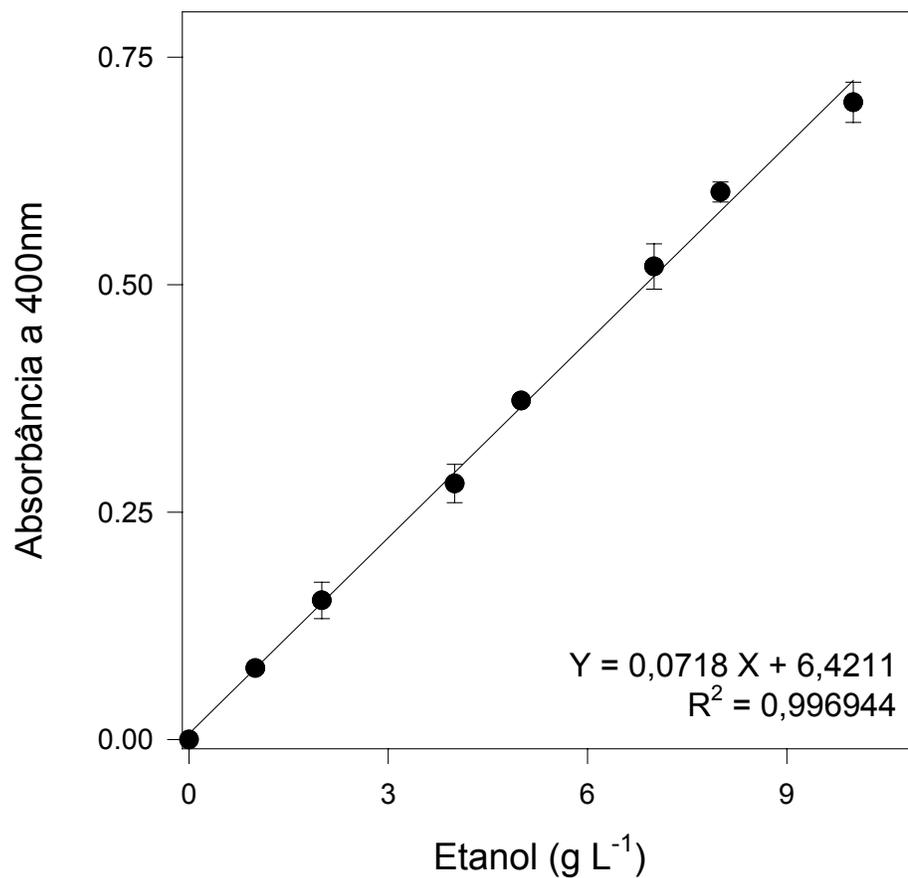


**Figura IV.1: Reação da álcool oxidase e peroxidase.** É mostrada a reação estequiométrica da conversão de etanol para o produto quinonimina, facilmente quantificado a 400 nm, pela ação das enzimas álcool oxidase e peroxidase.

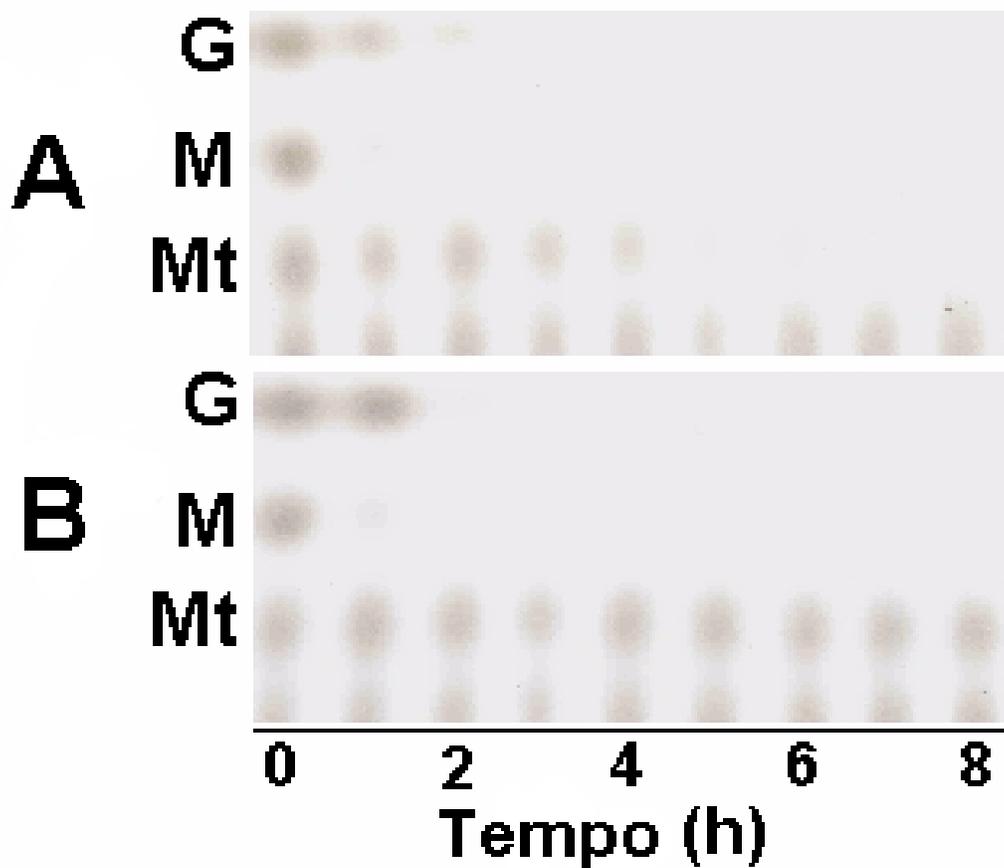
Inicialmente testamos as condições descritas por SALGADO et al. (2000) onde o reativo enzimático contém 0,25 U/ml de álcool oxidase, 2,0 U/ml de peroxidase, 0,7 mM de aminoantipirina e 6,0 mM de fenol em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5. A adição de 10 µl de amostra a 200 µl deste reativo e posterior incubação a 37°C por tempos pré-estabelecidos (0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 h), permitiu verificar que os maiores valores de absorvância a 400 nm ocorriam no intervalo de incubação de 1,0 h, não incrementando significativamente com tempos maiores. Entretanto, a linearidade da reação ficava limitada até a concentração de 5,0 g/l de etanol. Considerando que o ideal seria uma metodologia que nos permitisse a determinação de uma concentração maior de etanol, uma vez que

geralmente as leveduras podem produzir até um máximo de 10 g/l de etanol a partir de 20 g/l de açúcar (a concentração normalmente utilizada nos meios de crescimento das células), foi necessário incrementar a concentração dos reativos. Desta forma, passou-se a utilizar um reativo enzimático contendo 0,5 U/ml de álcool oxidase, 4,0 U/ml de peroxidase, 14 mM de aminoantipirina e 60 mM de fenol em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5. Como se pode observar na Figura IV.2, nestas condições obtivemos uma significativa absorvância a 400 nm e boa linearidade até a concentração de 10 g/l de etanol. A determinação da concentração de etanol de uma solução padrão que continha 5,0 g/l de etanol pelo método proposto, e com um kit comercial (Sigma) que faz uso da enzima álcool desidrogenase, revelou valores de 5,27 e 5,14 g/l de etanol na amostra analisada, respectivamente, valores com um erro abaixo do esperado pela precisão na manipulação dos reativos (~5% de erro). Aplicações desta técnica de dosagem colorimétrica de etanol serão apresentados no decorrer do trabalho.

Como descrito na Introdução, o substrato sintético *pNFαG* é transportado na levedura *Saccharomyces cerevisiae* através da permease *AGT1* (HOLLATZ & STAMBUK, 2001). Para demonstrar a importância que este transportador possui na fermentação dos açúcares presentes no mosto cervejeiro, inicialmente realizamos um teste fermentativo onde extrato de malte foi incubado na presença de 10 g/l de uma levedura selvagem (cepa *CEN.PK2-1C*), ou sua isogênica deletada no gene *AGT1* (cepa *LCM-003*) pré-crescidas em meio YP contendo 2% de maltose com fonte de carbono. Como pode ser observado na Figura IV.3-A, a cepa selvagem *CEN.PK2-1C* consumiu rapidamente a maltose e glicose presentes no extrato de malte, enquanto que a maltotriose foi consumida lentamente refletindo provavelmente a baixa afinidade que a permease *AGT1* apresenta por este açúcar (STAMBUK & DE ARAUJO, 2001). Quando este gene foi deletado do genoma da levedura,



**Figura IV.2: Dosagem colorimétrica de etanol.** Amostras (10  $\mu\text{L}$ ) contendo as concentrações indicadas de etanol foram determinadas utilizando-se a reação com álcool oxidase e peroxidase em microplacas como descrito em Materiais e Métodos. Os valores representam a média e desvio padrão de 3 determinações distintas.



**Figura IV.3:** Importância da permease *AGT1* na fermentação de açúcares por *S. cerevisiae*. Análise do consumo dos açúcares pela cepa *CEN.PK2-1C* (painel **A**) e sua isôgena *LCM003* deletada no gene *AGT1* (painel **B**) previamente crescidas em YP-maltose, em meio YNB líquido contendo 5% de extrato de malte. A posição dos diferentes açúcares, assim como de padrões de glicose (G), maltose (M) e maltotriose (Mt), foram determinados por cromatografia em camada delgada como descrito em Materiais e Métodos.

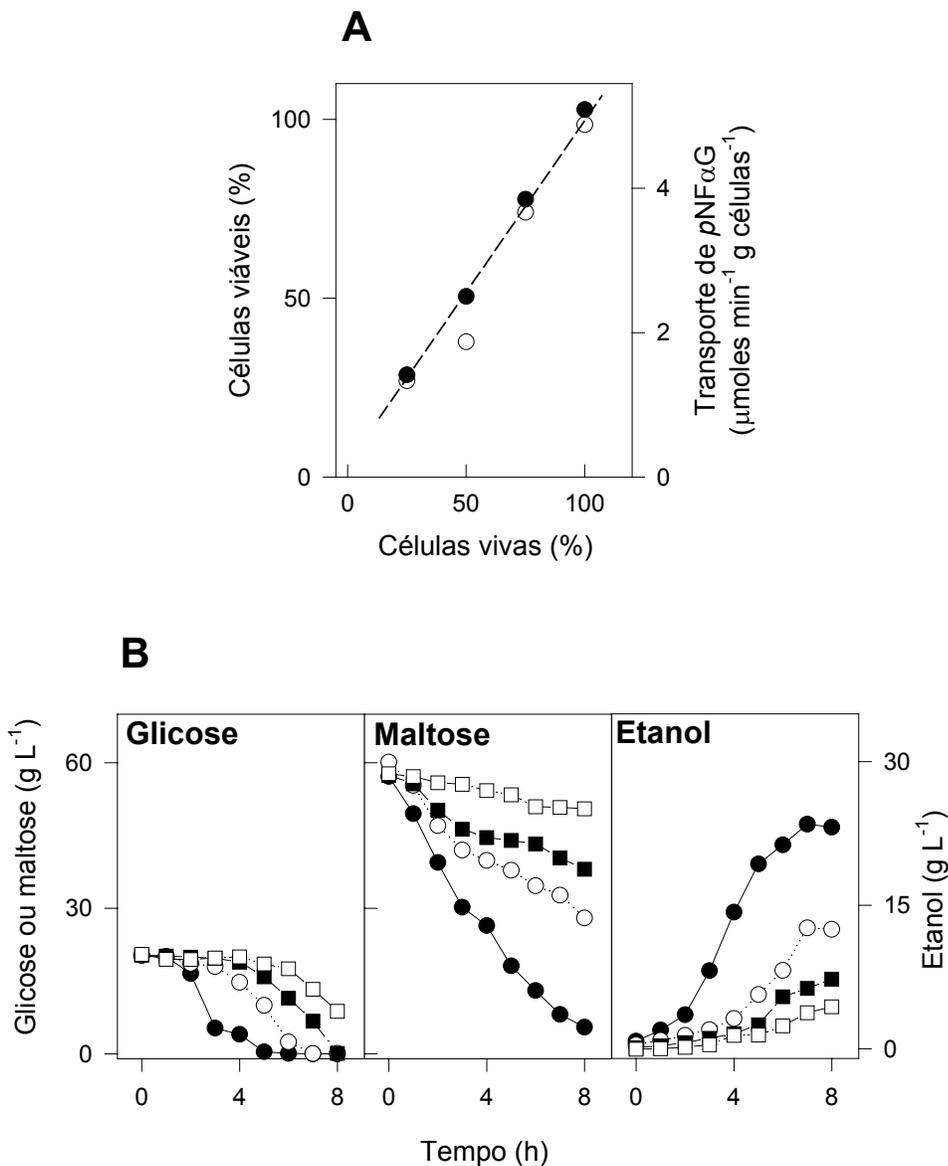
produzindo a cepa *LCM003*, a maltotriose não foi consumida pelas células (Figura IV.3-B). Conseqüentemente, enquanto a cepa *CEN.PK2-1C* produziu até 9,2 g/l de etanol a partir do extrato de malte, a cepa *LCM003* deletada na permease *AGT1* produziu apenas 6,5 g/l de etanol, ressaltando a importância deste transportador na fermentação dos açúcares presentes no mosto cervejeiro (principalmente a maltotriose) pela levedura *S. cerevisiae* (ZASTROW et al., 2001). Inclusive, a Tabela IV.1 mostra que duas linhagens distintas de leveduras, deletadas gene *AGT1* (cepas *LCM001* e *LCM003*), tornam-se incapazes de transportar o substrato sintético *pNF $\alpha$ G*, apesar de não terem perdido a capacidade de hidrolisar este substrato intracelularmente. Portanto, o ensaio proposto utilizando o *pNF $\alpha$ G* permite determinar a presença (atividade) da permease *AGT1* na membrana plasmática das leveduras, e não a atividade da  $\alpha$ -glicosidase intracelular.

A seguir analisamos o comportamento do ensaio proposto quando populações de leveduras contendo diferentes proporções de células vivas são utilizadas para fermentar um meio que simula as concentrações de açúcares encontradas no mosto cervejeiro (6% maltose na presença de 2% glicose, vide ERNANDES et al., 1993). As leveduras previamente crescidas até a fase exponencial em YP-2% maltose foram lavadas, centrifugadas, e ressuspensas de modo a atingir uma concentração de 20 mg/ml. Uma porção desta suspensão de leveduras foi morta pelo calor (100°C durante 5 min), e misturadas em diferentes proporções (25, 50, 75 e 100%) às mesmas células mantidas no gelo (células vivas). Nestas diferentes populações foram realizados o teste de viabilidade que faz uso do corante azul de metileno (técnica que cora fortemente as células mortas em azul) e o de vitalidade pelo ensaio de transporte de *pNF $\alpha$ G* como descrito em Materiais e Métodos. Como pode ser observado na Figura IV.4-A, no caso da cepa 70 tanto o teste de viabilidade

**Tabela IV.1** Atividade de transporte e hidrólise de  $\alpha$ -glicosídeos das cepas *CEN.PK2-1C*, *LCM-003*, *1403-7A* e *LCM-001* crescidas em meio rico contendo 2% de maltose como fonte de carbono

Cepa	Transporte de <i>pNP</i> $\alpha$ G <sup>a</sup>	Hidrólise de <i>pNP</i> $\alpha$ G <sup>a</sup>
<i>CEN.PK2-1C</i>	4,8	<b>1107,0</b>
<i>LCM-003</i>	0,0	<b>1171,1</b>
<i>1403-7A</i>	2,9	<b>540,7</b>
<i>LCM-001</i>	<b>0,0</b>	<b>434,9</b>

<sup>a</sup>A atividade de transporte e hidrólise de  $\alpha$ -glicosídeos estão expressas em  $\mu\text{mol (g de células)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

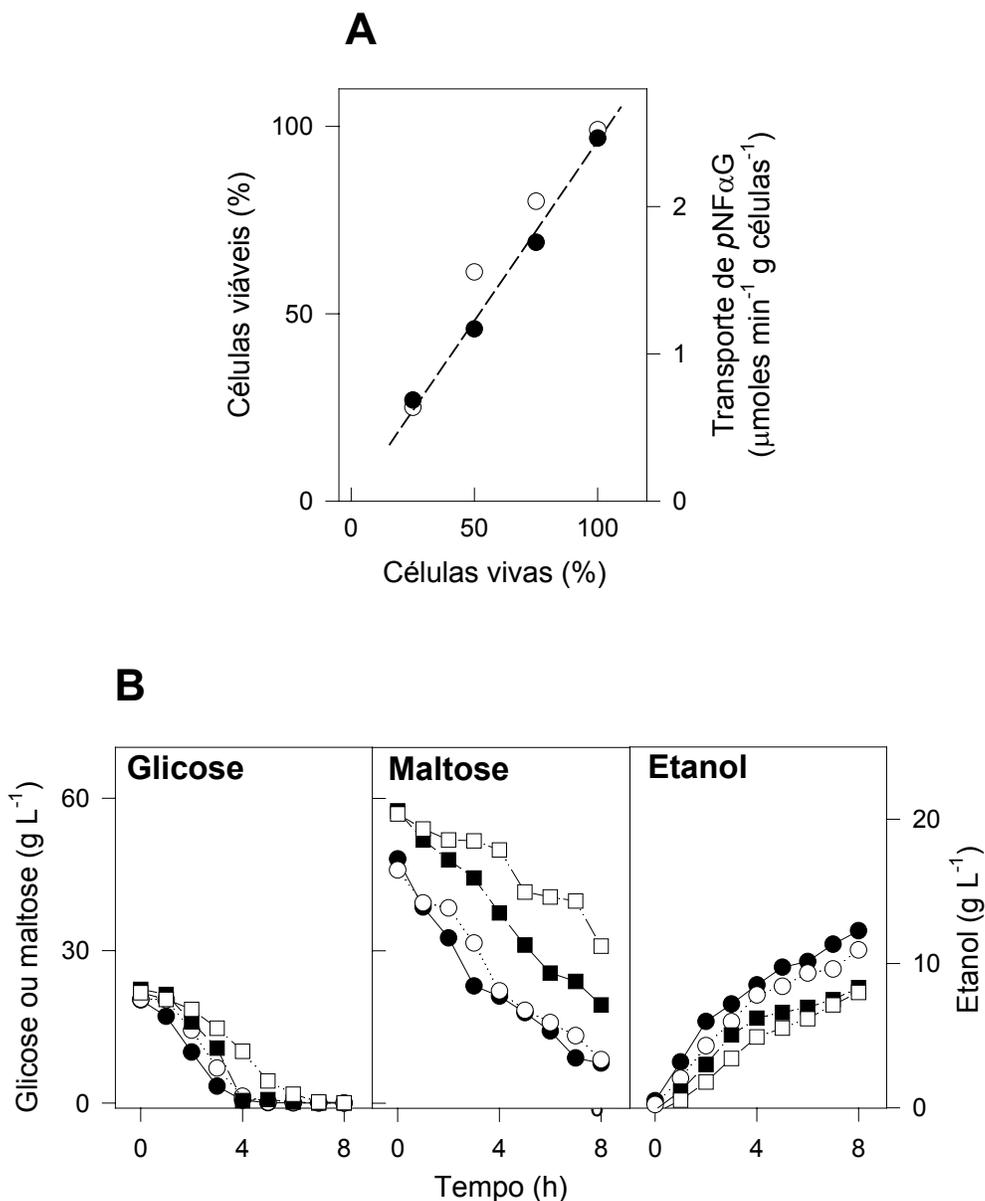


**Figura IV.4: Capacidade fermentativa de populações da cepa 70.** A viabilidade (determinado com azul de metileno, ○) e vitalidade (determinado pelo transporte de  $pNF\alpha G$ , ●) de populações da cepa 70, previamente crescida em YP-maltose e contendo diferentes proporções de células mortas (células incubadas 5 min a  $100^{\circ}C$ ) encontra-se representada na Figura A, enquanto que a capacidade fermentativa (consumo de glicose e maltose, e produção de etanol) das mesmas populações (□ = 25%, ■ = 50%, ○ = 75%, ● = 100% de células vivas) está mostrada na Figura B.

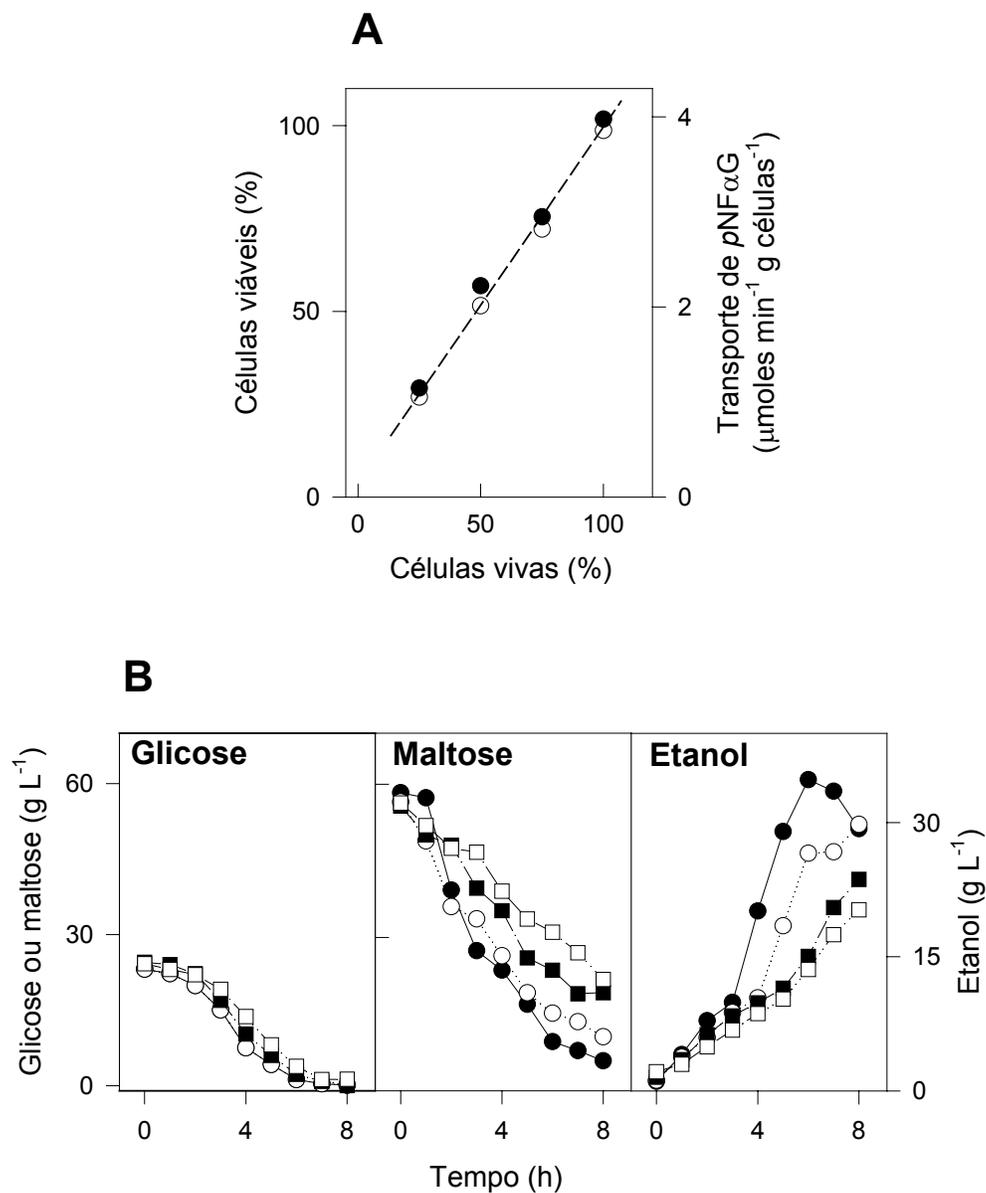
com azul de metileno como o ensaio colorimétrico de determinação de transporte de *pNFαG* apresentaram uma boa correlação com a real concentração de células vivas na população de leveduras presentes na mistura. Conforme a quantidade de células vivas diminuía, a produção de *p*-nitrofenol pelas leveduras também diminuía proporcionalmente. Resultados semelhantes foram obtidos com outras cepas de leveduras, incluindo a cepa *B01* (Figura IV.5-A) e *L52* (Figura IV.6-A).

Entretanto, ao avaliar a capacidade fermentativa da cultura observaram-se diferenças significativas na velocidade de consumo dos açúcares, não só entre as diferentes cepas analisadas, mas também em relação a cada açúcar presente no ensaio. Por exemplo, no caso da cepa *70* ambos a maltose e glicose foram consumidos mais lentamente conforme a proporção de células vivas diminuía (Figura IV.4-B). Já no caso da cepa *L52*, mesmo com apenas 25% de células vivas, manteve a velocidade de consumo de glicose praticamente inalterada (Figura IV.6-B), apesar do consumo mais lento de maltose conforme a proporção de células vivas diminuía. A cepa *B01* apresentou um comportamento intermediário, e o consumo de ambos os açúcares foi afetado (Figura IV.5-B). As diferenças observadas entre as diferentes cepas (e açúcares) provavelmente refletem diferenças na quantidade e tipo de transportadores que cada cepa apresenta em sua membrana plasmática, incluindo as diferentes afinidades que cada transportador apresenta pelo açúcar a ser transportado.

Entretanto, a produção de etanol em todos os casos mostrou uma fortemente correlação com a proporção de células vivas no ensaio, e com a metodologia proposta de determinação do transporte de *pNFαG*, uma vez que a quantidade de etanol produzido, apesar de ser cepa-dependente (Figuras IV.4-B, IV.5-B e IV.6-B), diminuiu nas populações



**Figura IV.5: Capacidade fermentativa de populações da cepa *B01*.** A viabilidade (determinado com azul de metileno,  $\circ$ ) e vitalidade (determinado pelo transporte de *pNFαG*,  $\bullet$ ) de populações da cepa *B01*, previamente crescida em YP-maltose e contendo diferentes proporções de células mortas (células incubadas 5 min a  $100^{\circ}\text{C}$ ), encontra-se representada na Figura A, enquanto que a capacidade fermentativa (consumo de glicose e maltose, e produção de etanol) das mesmas populações ( $\square$  = 25%,  $\blacksquare$  = 50%,  $\circ$  = 75%,  $\bullet$  = 100% de células vivas) está mostrada na Figura B.

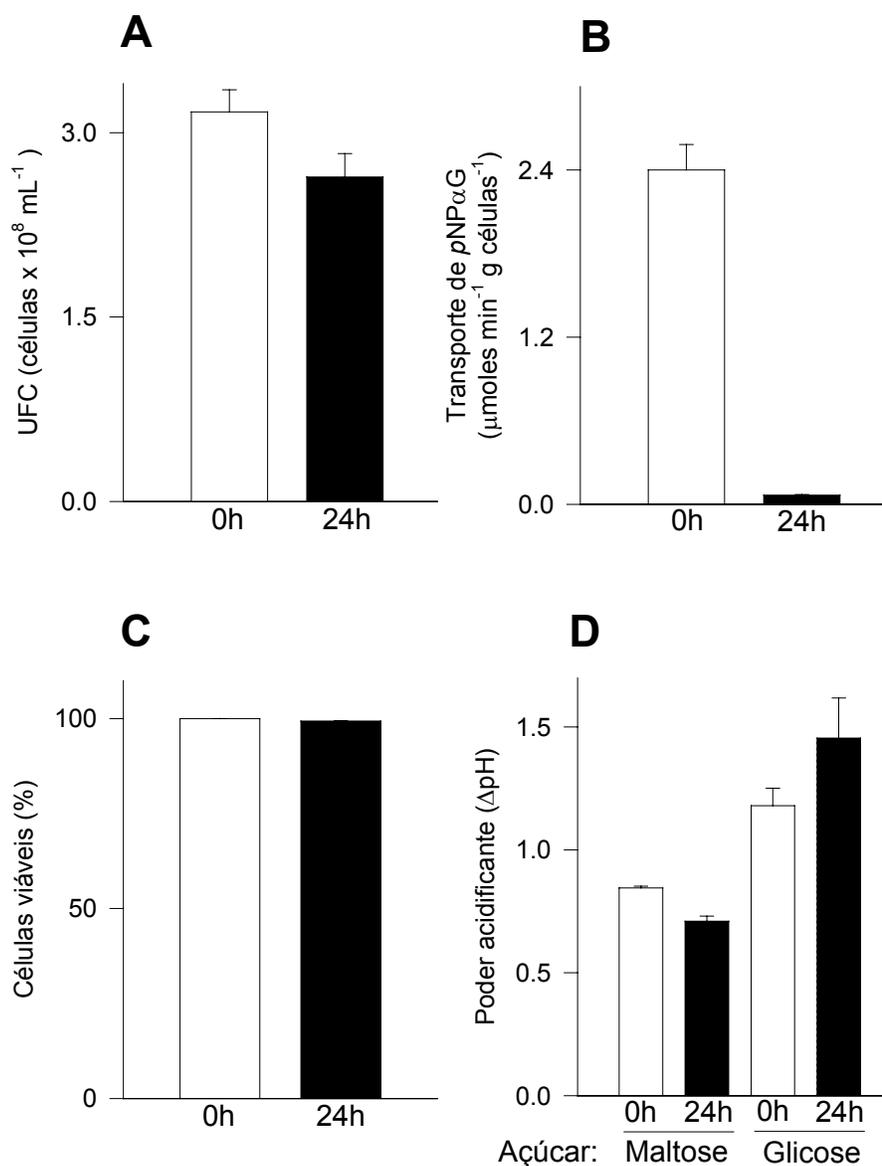


**Figura IV.6: Capacidade fermentativa de populações da cepa *L52*.** A viabilidade (determinado com azul de metileno, ○) e vitalidade (determinado pelo transporte de *pNFαG*, ●) de populações da cepa *L52*, previamente crescida em YP-maltose e contendo diferentes proporções de células mortas (células incubadas 5 min a 100°C) encontra-se representada na Figura A, enquanto que a capacidade fermentativa (consumo de glicose e maltose, e produção de etanol) das mesmas populações (□ = 25%, ■ = 50%, ○ = 75%, ● = 100% de células vivas) está mostrada na Figura B.

contendo maior quantidade de células mortas. Nossos resultados indicam, portanto, que tanto o teste de viabilidade determinado com azul de metileno, quanto a determinação do transporte de  $pNF\alpha G$  (ensaios realizados antes dos testes fermentativos) podem servir para prever a vitalidade e qualidade das leveduras a serem utilizadas num novo ciclo fermentativo.

A seguir analisamos o comportamento destes dois testes, juntamente com o teste de vitalidade através do “poder acidificante”, durante o estresse de depleção de nutrientes, um ensaio proposto pela Sociedade Americana de Químicos Cervejeiros para analisar a vitalidade das leveduras (ASBC, 2005). Após crescimento da cultura em meio YP-2% maltose, as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas em água destilada estéril de maneira a atingir uma concentração de 5 mg/ml. Esta suspensão de células foi dividida em duas alíquotas. A primeira foi imediatamente utilizada para realizar os testes de viabilidade e vitalidade propostos, servindo como controle positivo das células não estressadas, e a segunda mantida sob agitação (160 rpm) a 28°C durante 24 h, e então novamente realizados os testes de viabilidade, vitalidade e fermentação como descrito em Materiais e Métodos.

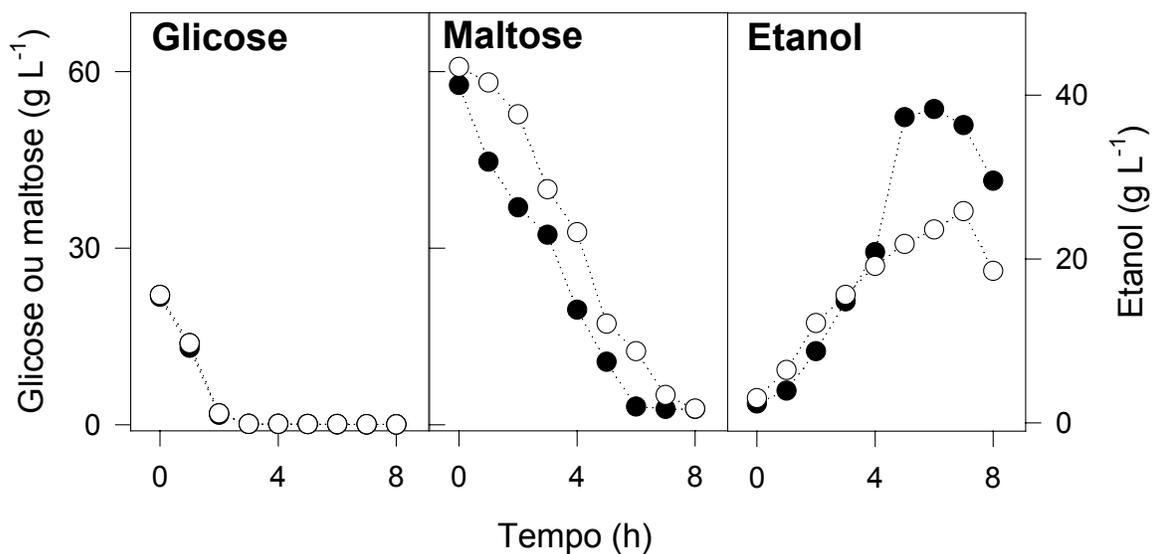
Como se pode observar na Figura IV.7, com a cepa 70 submetida à depleção de nutrientes por 24 h não ocorre perda significativa de viabilidade na população, comprovado pelas UFC's formadas após plaqueamento de uma suspensão celular de concentração conhecida (Figura IV.7-A), ou pelo teste que faz uso do corante azul de metileno (Figura IV.7-C) que indica 100% de células viáveis. Ao avaliarmos a vitalidade pelo teste de acidificação após a adição de glicose ou maltose à suspensão celular, também não foi observada mudança significativa neste parâmetro (diferença de pH após 10 min da adição do açúcar) entre uma cultura fresca e a que sofreu o estresse (Figura IV.7-D). Entretanto ao



**Figura IV.7: Comparação dos métodos de determinação de viabilidade e vitalidade com a cepa 70 submetida a depleção de nutrientes.** A quantidade de células vivas (A), o transporte de *pNPαG* (B), a viabilidade celular pela coloração com azul de metileno (C) e o poder acidificante (D) foi determinado após o crescimento da cepa 70 em maltose (0h, colunas brancas), ou após a incubação das células em água (160 rpm, 28°C) por 24 horas (24h, colunas pretas) como descrito em Materiais e Métodos.

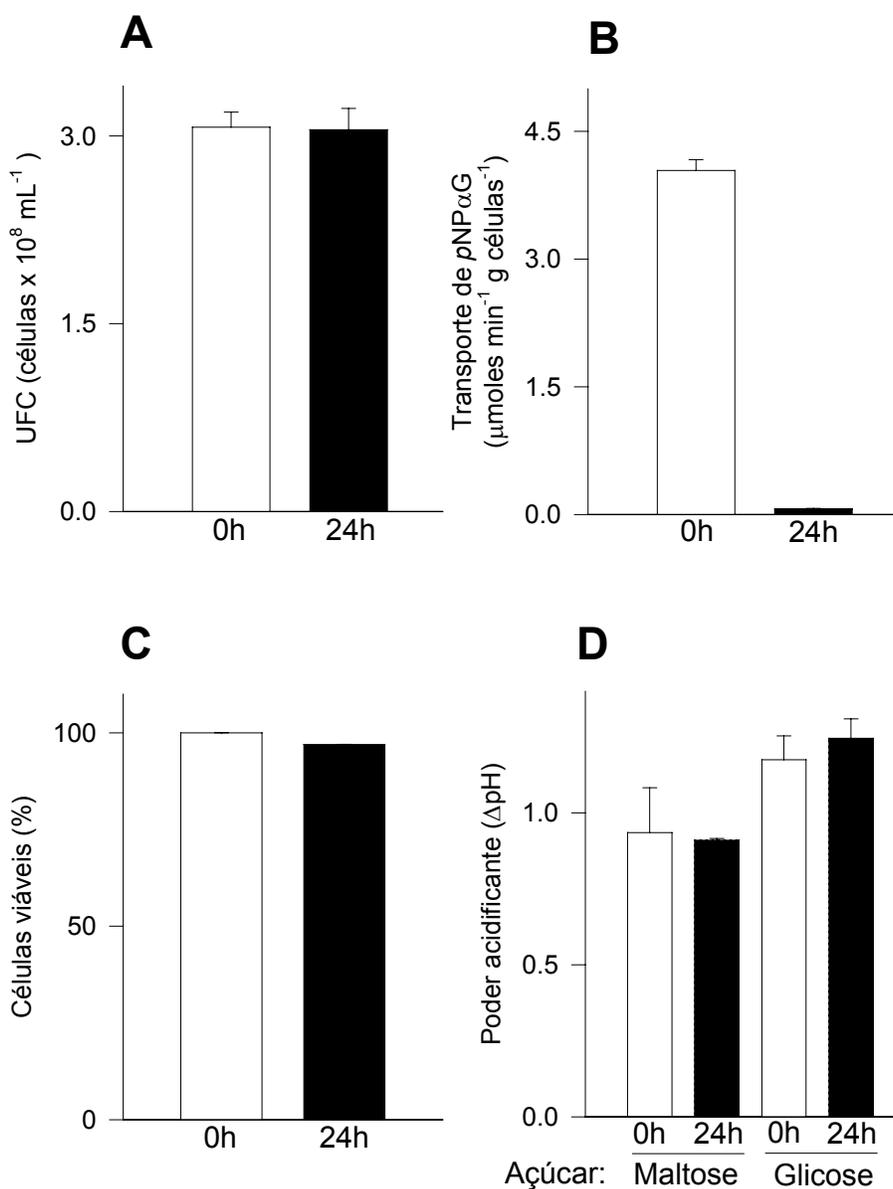
analisarmos a vitalidade pelo teste colorimétrico de determinação de transporte de *pNF $\alpha$ G* comprovou-se uma queda significativa na produção de *p*-nitrofenol, indicando uma possível queda na vitalidade da população (Figura IV.7-B). De fato, ao analisar a capacidade fermentativa das células estressadas pela depleção de nutrientes verifica-se um atraso de pelo menos duas horas para começar o consumo da maltose contida no meio (Figura IV.8), apesar de não ser observado diferença no consumo da glicose entre as células estressadas ou não. Significativamente, a produção de etanol pela população estressada foi menor que a obtida com a população não submetida à depleção de nutrientes (Figura IV.8). O atraso no consumo da maltose é provavelmente devido à falta de transportadores para este açúcar na membrana plasmática das células, já que estes devem ter sido retirados da membrana durante o período de estresse. Uma vez que as células detectaram a presença do açúcar novamente, houve a síntese do transportador e conseqüente re-início do consumo. No caso da glicose, o sistema de transporte deste açúcar possui vários membros com afinidades distintas pelo açúcar, muitos dos quais são transportadores constantemente expressos uma vez que a glicose é o carboidrato de escolha deste microrganismo. Desta forma, provavelmente mesmo durante a depleção de nutrientes as células desta cepa mantêm sua capacidade de fermentar glicose inalterada.

Resultados semelhantes foram obtidos ao avaliar a viabilidade e vitalidade com a cepa *A3* (Figura IV.9), onde novamente o teste colorimétrico de determinação de transporte de *pNF $\alpha$ G* apresentou uma queda significativa na produção de *p*-nitrofenol, indicando uma possível queda na vitalidade da população (Figura IV.9-B), apesar da viabilidade (UFC's e coloração com azul de metileno, Figuras IV.9-A e IV.9-C) e vitalidade determinada pelo teste do poder acidificante (Figura IV.9-D) não terem sofrido variação significativa.

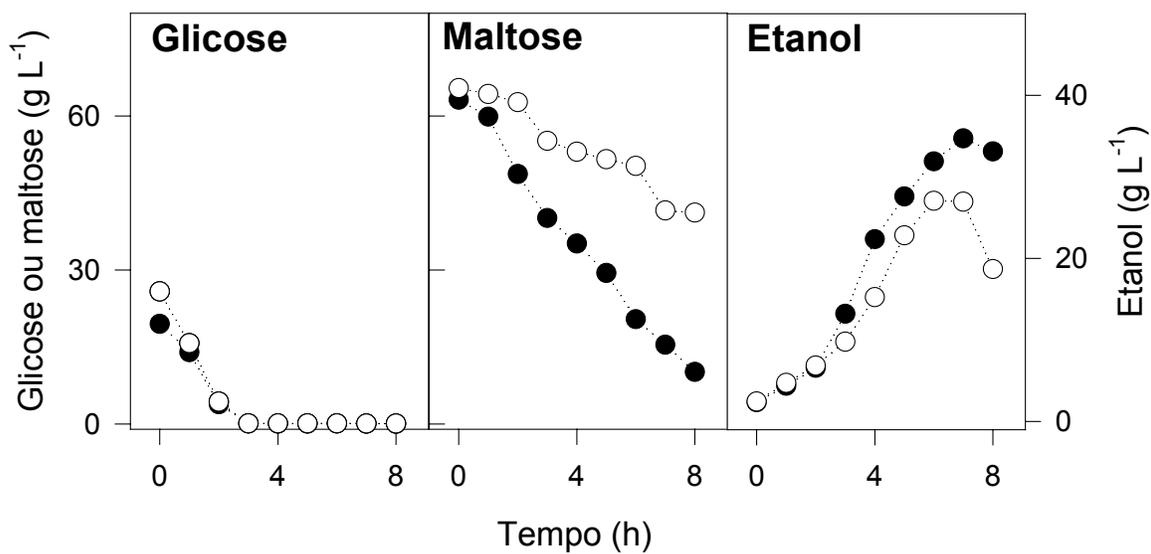


**Figura IV.8: Capacidade fermentativa da cepa 70 submetida a depleção de nutrientes.**

O consumo de glicose e maltose, e a produção de etanol pela cepa 70 recém crescida em YP-maltose (●), ou as mesmas células previamente incubadas (160 rpm, 28°C) por 24 horas em água (○), foi determinado como descrito em Materiais e Métodos.



**Figura IV.9: Comparação dos métodos de determinação de viabilidade e vitalidade com a cepa *A3* submetida a depleção de nutrientes.** A quantidade de células vivas (A), o transporte de *pNPαG* (B), a viabilidade celular pela coloração com azul de metileno (C) e o poder acidificante (D) foi determinado após o crescimento da cepa *A3* em maltose (0h, colunas brancas), ou após a incubação das células em água (160 rpm, 28°C) por 24 horas (24h, colunas pretas) como descrito em Materiais e Métodos.

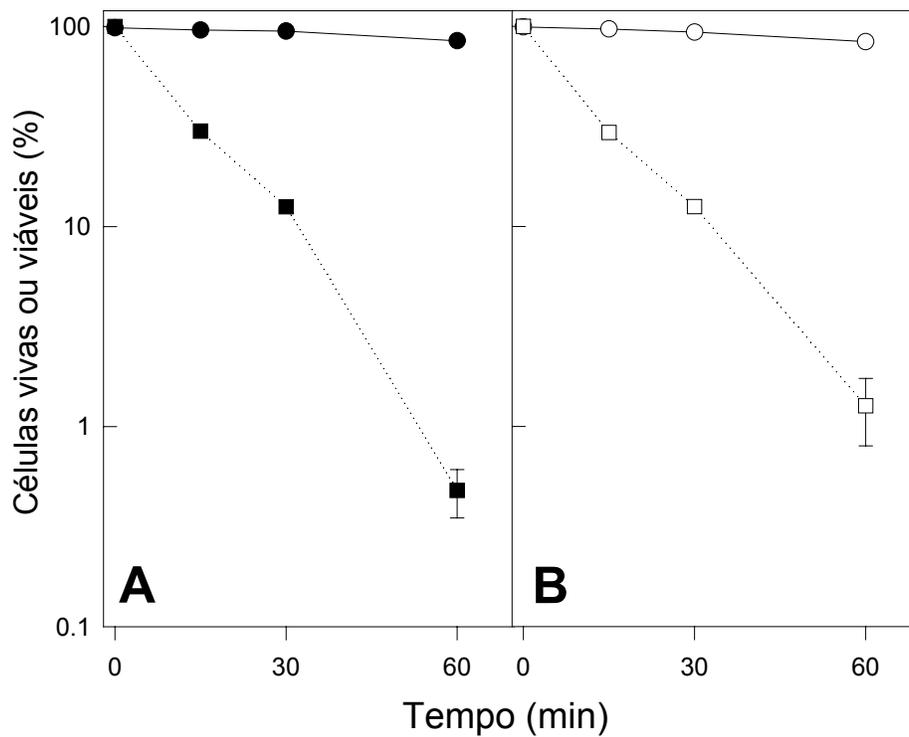


**Figura IV.10: Capacidade fermentativa da cepa *A3* submetida a depleção de nutrientes.** O consumo de glicose e maltose, e a produção de etanol pela cepa *A3* recém crescida em YP-maltose (●), ou as mesmas células previamente incubadas (160 rpm, 28°C) por 24 horas em água (○), foi determinado como descrito em Materiais e Métodos.

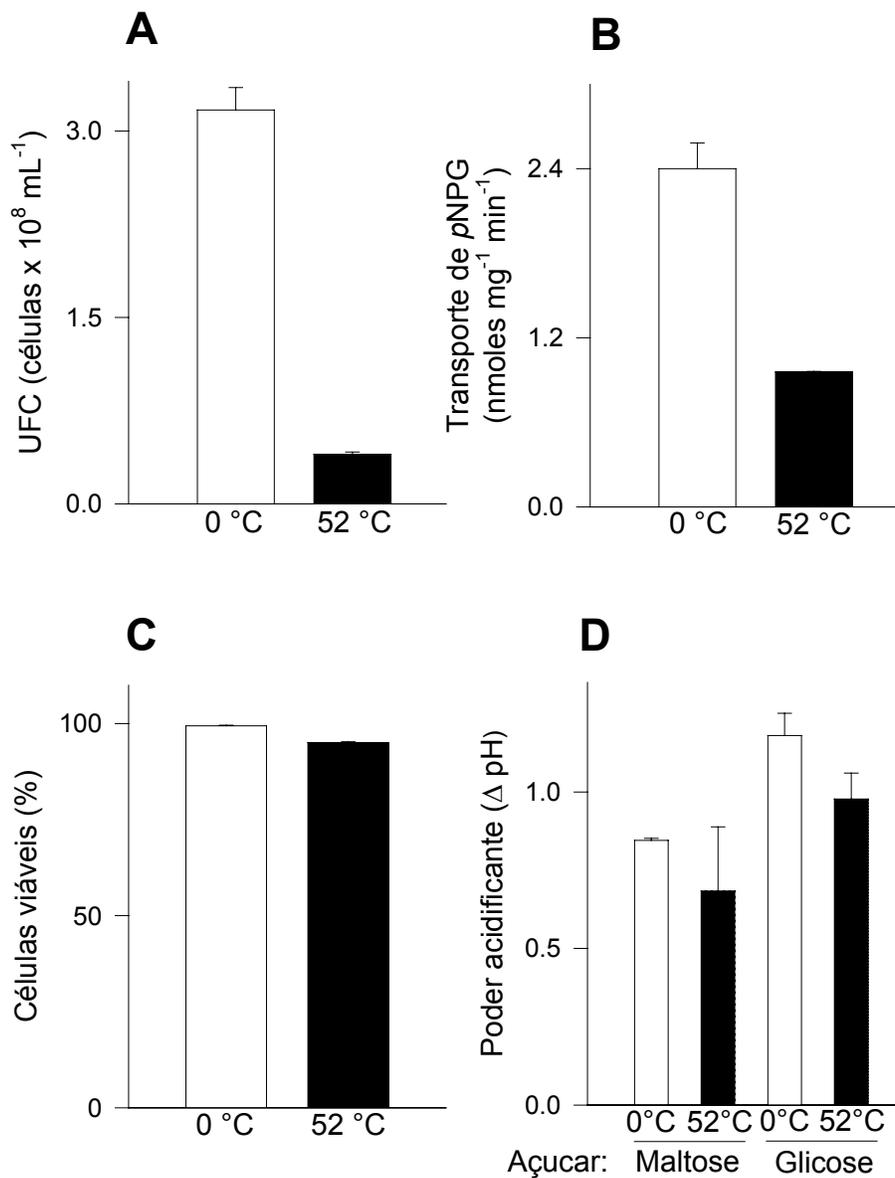
Entretanto, estas células estressadas apresentaram uma clara deficiência para consumir a maltose contida no meio, e conseqüentemente produziram menos etanol do que a população controle (Figura IV.10), comprovando uma queda na vitalidade da população de leveduras.

A seguir, com o objetivo de avaliar a viabilidade e vitalidade frente a um outro tipo de estresse, as células de leveduras foram submetidas à temperatura de 52°C por tempos pré-estabelecidos. Como pode ser observado na Figura IV.11, a exposição a esta temperatura provoca a morte exponencial das células (determinado pela queda nas UFC's), independentemente da fonte de carbono onde foram crescidas (glicose ou maltose), de forma que após uma hora apenas ~1% das células permanecem vivas. Entretanto, ao avaliarmos a viabilidade celular pela coloração com azul de metileno verificou-se que este método indicava que mais de 90 % das células se encontravam vivas (Figura IV.11). Resultados semelhantes foram obtidos com um estresse térmico a 65°C, sendo que neste caso a morte celular ocorreu mais rapidamente, não existindo células vivas após 15 min de incubação. Novamente a coloração com azul de metileno indicava mais de 90 % de células viáveis nestas condições (dados não mostrados). Portanto, nossos resultados indicam que este método não serve para quantificar a viabilidade celular durante o estresse térmico.

A seguir passamos a avaliar a viabilidade e vitalidade da cepa 70, após 30 min de estresse térmico a 52°C, utilizando dos diferentes métodos já empregados acima (Figura IV.12), incluindo o teste colorimétrico de determinação de transporte de *pNFαG*. Os resultados obtidos mostraram um declínio expressivo na produção de *p*-nitrofenol pelas células após o estresse a 52°C (Figura IV.12-B), condição onde ocorreu significativa morte celular (evidenciado pela queda significativa nas UFC's, Figura IV.12-A), apesar da coloração com azul de metileno indicar uma viabilidade de mais de 90% (Figura IV.12-C) e



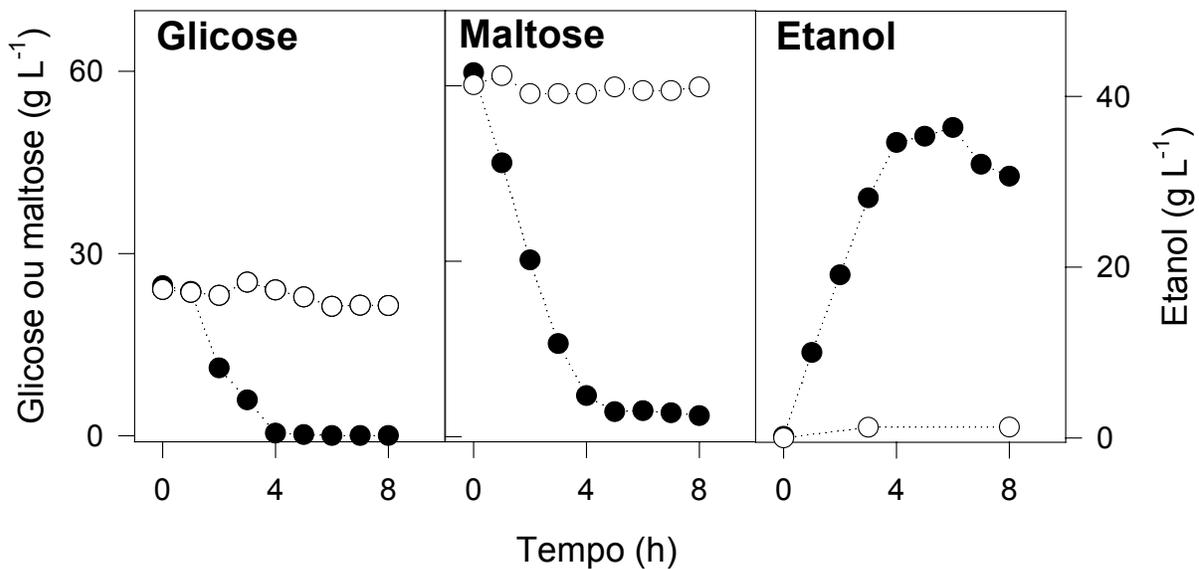
**Figura IV.11: Viabilidade celular durante o estresse térmico.** Células da cepa 70, pré-crescidas em glicose (A) ou maltose (B), foram expostas a 52°C e a quantidade de células vivas foi determinada por plaqueamento (UFC, □ e ■) ou através da coloração com azul de metileno (○, ●) como descrito em Materiais e Métodos.



**Figura IV.12: Comparação dos métodos de determinação de viabilidade e vitalidade com a cepa 70 submetida ao estresse térmico.** A quantidade de células vivas (A), o transporte de pNPG (B), a viabilidade celular pela coloração com azul de metileno (C) e o poder acidificante (D) foi determinado após o crescimento da cepa 70 em maltose e as células mantidas no gelo (0°C, colunas brancas), ou após a incubação a 52°C por 30 min (52°C, colunas pretas) como descrito em Materiais e Métodos.

o teste do poder acidificante também não acompanhar a expressiva morte celular (Figura IV.12-D). Resultados semelhantes foram obtidos com a cepa *B01* (expressiva morte celular, apesar da coloração com azul de metileno e poder acidificante mostrarem valores próximos aos das células não estressadas), incluindo uma significativa queda no transporte de *pNFαG* após a incubação das células a 52°C ou 65°C (dados não mostrados).

Com o objetivo de confirmar os valores obtidos com o transporte de *pNFαG*, indicativos de queda na vitalidade da levedura, células previamente submetidas, ou não, ao estresse térmico foram inoculadas em meios que simulam as condições industriais, e o consumo dos açúcares e produção de etanol foram avaliados ao longo do tempo (Figura IV.13). Condizente com a expressiva morte celular, as células submetidas ao estresse de temperatura foram incapazes de consumir a glicose e maltose e, conseqüentemente, praticamente nenhum etanol foi produzido (Figura IV.13). Portanto, estes resultados indicam que a queda na produção de *p*-nitrofenol durante o ensaio de transporte de *pNFαG* correlacionou-se diretamente com a queda na capacidade fermentativa (queda na vitalidade), provocada pela morte das células.



**Figura IV.13: Capacidade fermentativa da cepa 70 submetida ao estresse térmico.** O consumo de glicose e maltose, e a produção de etanol pela cepa 70 recém crescida em YP-maltose (●), ou as mesmas células previamente incubadas por 30 min a 52°C (○), foi determinado como descrito em Materiais e Métodos.

## V. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A quantificação da concentração de etanol em plasma e outros fluidos é uma rotina freqüente em laboratórios de análises clínicas e/ou toxicológicas. Além disso, constantemente a indústria de alimentos e bebidas necessitam de métodos e técnicas que permitam quantificar de maneira rápida e segura a produção de etanol (VERDUYN et al 1984, PRENCIPE et al., 1987, GONCHAR et al., 2001, RODIONOV et al., 2002). Como tínhamos a necessidade de dosar a produção de etanol num grande número de amostras, inicialmente desenvolvemos um método colorimétrico de dosagem de etanol em placas de 96 orifícios que, além da grande quantidade de amostras que podem ser analisadas simultaneamente, apresenta como vantagem um baixo custo em relação aos outros métodos disponíveis no mercado. A linearidade da reação (até 10,0 g/l) permite a quantificação direta do etanol produzido a partir de meios de cultura contendo 20 g/l de açúcar por microrganismos, concentração esta normalmente utilizada, por exemplo, na triagem de microrganismos fermentadores. Neste caso o crescimento de um determinado microrganismo seria realizado em placas, e depois realizado testes fermentativos também em placas com os diferentes açúcares de interesse e posterior dosagem do etanol no sobrenadante da cultura.

Considerando que a maltose e a maltotriose são os açúcares mais abundantes no mosto cervejeiro, o principal objetivo do presente trabalho visava verificar se o transporte de *pNF $\alpha$ G* (HOLLATZ & STAMBUK, 2001) poderia ser utilizado para a análise da vitalidade, portanto da capacidade fermentativa, de leveduras cervejeiras. Os resultados obtidos mostraram que ao deletarmos o gene que codifica ao transportador *AGT1*, as células de

leveduras perdem a capacidade de transportar o  $pNF\alpha G$  e de consumir eficientemente a maltotriose, produzindo portanto menos etanol a partir do extrato de malte, um problema comumente encontrado na indústria cervejeira (STEWART et al. 1979; ZHENG et al. 1994b; ZASTROW et al. 2000, 2001; MENESES & JIRANEK 2002; DAY et al. 2002a, b; YOON et al. 2003). Apesar de que não observamos alterações no consumo de maltose na cepa deletada no *AGTI*, por ela possuir vários outros transportadores de maltose codificados por genes *MALx1*, acreditamos que o consumo deste açúcar também seria afetado no caso da levedura possuir como principal transportador na membrana a permease *AGTI*, como já relatado para várias leveduras cervejeiras (ZASTROW et al. 2001, RAUTIO & LONDESBOROUGH, 2003; VIDGREN et al., 2005). De fato, nossos resultados mostraram uma forte correlação ( $R^2 = 0,95 \pm 0,02$ ) entre a capacidade de uma determinada população de leveduras de transportar o  $pNF\alpha G$ , e a produção de etanol quando as células eram incubadas em misturas de glicose e maltose que simulam as concentrações encontradas no mosto cervejeiro, independentemente das significativas diferenças no perfil fermentativo observado entre as varias cepas analisadas.

Como descrito por SMART & WHISKER (1996), HEGGART et al (1999), CUNNINGHAM & STEWART (1999), JENKINS et al. (2003) e POWELL et al., (2003), durante o processo de produção de cerveja as leveduras são submetidas a diversos estresses, o que leva a uma perda na capacidade fermentativa das células depois de um número (variável) de ciclos fermentativos, sendo necessário então o descarte das leveduras e inicio de um novo ciclo com o inóculo de células novas. YAMAGISHI e colaboradores, em 2001, demonstraram que, por exemplo, o estresse térmico leva ao aparecimento de cepas de leveduras cervejeiras que perdiam a capacidade de fermentar, principalmente, a maltose presente no mosto.

Conseqüentemente, as indústrias estão constantemente selecionando cepas mais resistentes, com maior poder fermentativo e, sobretudo, desenvolvendo métodos e técnicas que possam avaliar de forma rápida e eficaz a qualidade do fermento antes de ser inoculado em um novo mosto cervejeiro.

Com o objetivo de analisar as diversas técnicas utilizadas pelas indústrias cervejeiras para avaliar a viabilidade e vitalidade, e compará-las com a metodologia proposta de determinação colorimétrica de transporte de *pNF $\alpha$ G*, as células de levedura foram submetidas a dois tipos diferentes de estresse: a depleção de nutrientes e o estresse de temperatura. No caso do estresse por depleção de nutrientes, apesar da viabilidade celular ter sido mantida, ocorreu uma queda na capacidade fermentativa das células (provocada provavelmente pelo atraso ou lenta utilização da maltose) que só o teste colorimétrico de determinação de transporte de *pNF $\alpha$ G* foi capaz de detectar, enquanto que o teste do poder acidificante indicava que as células apresentava a mesma vitalidade do que a população não estressada. Observou-se ainda, em algumas cepas, um discreto aumento neste parâmetro (poder acidificante), indicando que a população estressada estaria em condições fermentativas superior a do controle sem estresse. ROSA & SA-CORREA (1994) já haviam demonstrado que este teste não serve para avaliar a vitalidade de células de leveduras submetidas ao estresse alcoólico. Nossos resultados indicam que este método também não serve para avaliar a vitalidade celular durante um estresse por depleção de nutrientes.

THOMSSON e colaboradores (2003, 2005) demonstraram que cepas de leveduras submetidas à depleção de fonte de nitrogênio e/ou de carbono durante 24 h perdem de 70 a 95% de sua capacidade fermentativa. A depleção causa uma queda rápida nos níveis de

ATP, fazendo com quem as células comessem a degradar as reservas de trealose e glicogênio com o objetivo de manter os níveis de ATP. Uma vez utilizada toda a reserva de carboidratos, passam então a degradar proteínas celulares, sendo as de membrana (transportadores) mais susceptíveis à degradação. A perda na capacidade fermentativa das células é então explicado não só pela queda nos níveis de ATP, necessário para o primeiro passo da glicolise (conversão da glicose em glicose-6 fosfato), como também pela perda de transportadores de glicose e maltose da membrana (fenômeno denominado inativação catabólica), restringindo portanto o influxo dos açúcares para o interior da célula (LAGUNAS et al., 1982; SVHULZE et al., 1996; ROSSEL et al., em 2002, PEÑALVER et al. 1998).

Durante o estresse de temperatura (incubação das células a 52°C) observou-se uma queda significativa na viabilidade celular, apesar que a coloração com azul de metileno indicar que mais de 90% das células se encontravam vivas. O'CONNOR-COX et al. (1997) já havia relatado que a coloração com azul de metileno não serviria como método eficaz para quantificar células viáveis após um estresse alcoólico. Nossos resultados indicam que este método também não serve para quantificar a viabilidade celular durante um estresse térmico. O teste do poder acidificante também não foi capaz de mostrar a morte celular que estaria ocorrendo, sendo que o teste colorimétrico de determinação de transporte de  $pNF\alpha G$  foi o único que apresentou uma queda significativa na população de leveduras expostas por 30 min a 52°C. Como esperado, as células não submetidas ao estresse térmico degradam rapidamente a maltose e glicose contidas no meio, produzindo quantidades consideráveis de etanol. Já as células submetidas a estresse de temperatura foram incapazes de consumir estes açúcares, e portanto incapazes de produzir etanol.

Concluindo, enquanto que o teste de viabilidade com azul de metileno e de vitalidade pelo poder acidificante apresentaram resultados falso-positivos nas leveduras submetidas a diversos estresses, a metodologia proposta (determinação do transporte de *pNF $\alpha$ G*) foi o único a predizer a o real estado fisiológico das células. A queda na produção de *p*-nitrofenol durante o ensaio de transporte de *pNF $\alpha$ G* correlacionou-se diretamente com uma queda na capacidade fermentativa provocada pelo estresse ao que as células foram submetidas. Desta forma, nossos resultados nos permitem propor que o transporte de *pNF $\alpha$ G* poderia ser utilizado como teste de vitalidade para leveduras cervejeiras. Entretanto, resta agora testar o ensaio proposto no ambiente industrial de produção de cerveja.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. (1983) Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: Edgard Blücher, p. 243.
- Ambev (2006) Companhia de Bebidas das Américas. Disponível em: <<http://www.ambev.com.br/>>. Acesso em: 27 jan. 2006.
- AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS (2005). Method of Measurement of Yeast Vitality. **Report of Subcommittee. J. Am. Soc. Brew. Chem.** v. 63, p. 205-208.
- AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS (2004). Yeast Viability by slide culture. **Methods of Analysis**, 8<sup>th</sup> ed. The Society, St, Paul, MN.
- BATISTA, A. S., MILETTI, L. C., STAMBUK, B. U. (2004). Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **J. Gen. Microbiol.**, v. 114, p. 267-275.
- BARFORD, J. P. & HALL, R. J. (1979). An examination of the crabtree effects in *Saccharomuces cerevisiae*: the role of respiratory adaptacion. **J. Gen. Microbiol.**, p. 3065-3069.
- BOLES, E.; HOLLEMBERG, C. (1997). The molecular genetics of hexoses transport in yeast. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 21, p. 111.
- BOND, U., NEAL, C., DONNELLY, D., JAMES, T. C. (2004). Aneuploidy and copy number breakpoints in the genome of lager yeasts mapped by microarray hybridisation. **Current Genetics**, v. 24, p. 360-370.
- BOUIX, M. & LEVEAU, J. -Y. (2001) Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation. **J. Inst. Brew.** v. 107, p. 217-225.
- BOTSTEIN, D. & FINK, G. R. (1988) Yeast: an experimental organism for model biology. **Science.** v. 240, p. 1439-1443.
- CACERES, A., CARDENAS, S., GALLEGRO, M. (2000). A continuous spectrophotometric system for the discrimination determination of monosaccharides and oligosaccharides in foods. **Anal. CHIM. ACTA.** v. 404, p. 121-129.

- CAMPELO, A. F., BELO, I. (2004) Fermentative capacity of baker's yeast exposed to hyperbaric stress. **Biotechnol. Lett.** v. 26, p.1237-1240.
- CHANG, Y. S., DUBIN, R. A., PERKINS, E., MICHELS, C. A., NEEDLEMAN, R. B. (1989) Identification and characterization of maltose permease in genetically defined *Saccharomyces* strain. **J. Bacteriol.** v. 171, p. 6148-6154.
- CLARKE, J. M., GILLINGS, M. R., ALTAVILLA, N. & BEATTIE, A. J. (2001) Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. **J. Microbiol. Methods.** v.46, p. 262-267.
- CUNNINGHAM, S. & STEWART, G. G. (2000) Acid washing and serial repitching a brewing Ale strain of *Saccharomyces cerevisiae* in high gravity wort and the role of wort oxygenation conditions. **J. Inst. Brew.** v. 106. p. 389-402.
- CUNNINGHAM, S. & STEWART, G. G. (1998) Effects of high-gravity brewing and acid washing on Brewer's yeast. **J. Am. Soc. Brew. Chem.** v. 56. p. 12-18.
- D'AMORE, A. (1992) A improve yeast fermentation performance. **J. Am. Soc. Brew.** v. 98. p. 375-382.
- D'AMORE, T., RUSSEL, I. & STEWART, G. G. (1989) The Effect of carbohydrate adjuncts on brewer's wort fermentation by *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis). **J. Inst. Brew.** v. 95. p. 333-336.
- DAY, R. E., HIGGINS, V. J., ROGERS, P. J., DAWES, W. (2002a) Characterization of the purative maltose transporters encoded by YDL247w and YJR160c. **Yeast.** v. 19. p. 1015-1027.
- DAY, R. E., HIGGINS, V. J., ROGERS, P. J., DAWES, W. (2002b) Characterization of the purative maltose transporters encoded by YJR160c and YDL247w. **Yeast.** v. 19. p. 1015-1027.
- DE DEKEN, R. H. (1966). The crabtree effect: a regulatory system in yeast. **Yeast.** v. 44, p. 149-156.
- DEMARINI, D. J., CARLIN, E. M., LIVI, G. P. (2001). Constitutive promoter modules for PCR-based gene modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast.** v. 18, p. 723-728.

- DIAS, L. M. C. & PEINADO, J. M. (1984). Transport of maltose in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of pH and potassium ions. **Yeast**. v. 44, p. 149-156.
- DINSDALE, M. G., LOYD, D. & JARVIS, B. (1995) Yeast vitality during cider fermentation: two approaches to the measurement of membrane potential. **J. Inst. Brew.** **101**: 453-458.
- ERNANDES, J .R., WILLIAMS, J. W., RUSSEL, I. & STEWART, G. G. (1993) Effect of yeast adaptation to maltose utilisation on sugar uptake during the fermentation of brewer's wort. **J. Inst. Brew.** v. 101, p. 67-71.
- ERNANDES, J .R., D'AMOSRE, T., RUSSEL, I. & STEWART, G. G. (1992) Regulation of Glucose and maltose transport in strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ind. Microbiol.** v. 9, p. 127-130.
- GOFFRINI, P., FERRERO I. & DONNINI C. (2001) Respiration-dependent utilization of sugars in yeasts: a determinant role for sugar transporters. **J. Bacteriol.** **184**: 427-432.
- GONCHAR, M. V., MAIDAN, M. M., PAVLISHKO, H. M., SIBIRNY, A. A. (2000). A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages. **Food Technol. Biotechnol.** v. 39, p. 37-42.
- HAN, E. K., COTTY, F., SOTTAS, C., JIANG, H., MICHELS, C. A. (1995). Characterization of *AGT1* encoding a general  $\alpha$ -glucoside transporter from *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol.**, v. 17, p. 1093-1107.
- HEGGART, H.; MARGARITIS, A.; STEWART, R. J.; PILKINGTON, H.; SOBEZAJ, J. & RUSSELL, I. (2000). Measurement of brewing yeast viability and vitality: A review of methods. **Techni. Quarter.**, v. 37, p. 409-430.
- HEGGART, H.; MARGARITIS, A.; PILKINGTON, H.; STEWART, R. J.; DOWHANICK, T. M. & RUSSELL, I. (1999). Factors affecting yeast viability and vitality characteristics: a review. **Techni. Quarter.**, v. 36, p. 383-406.
- HOLLATZ, C. & STAMBUK, B. U. (2003) Regulation of *Saccharomyces cerevisiae*.maltose fermentation by cold temperature and *csf1*. **Braz.J. Microbiol.**: v. 34, p. 99-101.
- HOLLATZ, C. & STAMBUK, B. U. (2001) Colorimetric determination of active  $\alpha$ -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Microbiol. Methods** **46**: 253-259.
- HORÁK, J. (1997). Yeast nutrient transporters. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 331, p. 41-79.

- INGLEDEW, W. M. (1993). Yeasts for production of fuel ethanol *In: The yeasts*, Rose, A. H. & Harrison, J. S. (eds). **Academic Press**, San Diego, USA, v. 5, p. 245-291.
- JAMES, T. C., CAMPBELL, S., DONNELLY, D. & BOND, U. (2003) Transcription profile of brewery yeast under fermentation conditions. **J. Appl. Microbiol.** **94**: 432-448.
- JENKINS, C. L., KENNEDY, A. I., HODGSON, J. A., THURSTON, P. & SMART, K. A. (2003) Impact of serial repitching on Lager brewing yeast quality. **J. Am. Soc. Brew. Chem.** v. 61, p. 1-9.
- JESPERSEN, L., CESAR, L. B., MEADEN, P. G. & JAKOBSEN, M. (1999) Multiple  $\alpha$ -glucoside transporter genes in brewer's yeast. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65, p. 450-456.
- KARA, B. V., SIMPSON, W. J. & HAMMOND, J. R. M. (1988) Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. **J. Inst. Brew.** v. 94, p. 153-158.
- KOBI, D., ZUGMEYER, S., POTIER S., GUTFREUND, L. J. (2004) Two-dimensional protein map of an "ale"-brewing yeast strain: proteome dynamics during fermentation. **FEMS.** v. 5, p. 213-230.
- KODAMA, Y., FUKUI, N., ASHIKARA, T., SHIBANO, 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.** v. 53, p. 24-29.
- LAGUNAS, R., DOMINGUEZ, C., BUSTURIA, A., SÁEZ, M. J. (1982). Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport. **J. Bacteriol.** v. 152, p.19-25.
- LAGUNAS, R. (1993). Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 104, p.1107-1112.
- LENTINI, A. (1993) A review of the various methods available for monitoring the physiological status of yeast: yeast viability and yeast vitality. **Ferment.** v. 6, p. 321-327.
- LLOYD, D. & HAYES, A. J. (1995) Vigour, vitality and viability of microorganisms. **FEMS Microbiol. Let.** v. 133, p. 1-7.
- LONGTINE, M. S., MCKENZIE III, A., DEMARINI, D. J., SHAH, N. G., WACH, A., BRACHAT, A., PHILIPPSEN, P., PRINGLE, J. R. (1998) Additional modules for versatile and

- economical PRC-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. v. 14, p. 953-961.
- MALLUTA, E. F., DECKER, P. & STAMBUK, B. U. (2000) The Kluyver effect for trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Basic Microbiol.** v. 40, p. 199-205.
- MCCAIG, R. (1990) Evaluation of the fluorescent dye 1-anilino-8-naphthalene sulfonic acid for yeast viability determination. **J. Am. Soc. Brew. Chem.** v. 48, p. 22-25.
- MEDINTZ, I.; JIANG, H.; HAN, E-R.; CUI, W. & MICHELS, C. A. (1996). Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 2245-2254.
- MENESES, F. J., JIRANEK, V. (2002). Expression patterns of genes and enzymes involved in sugar catabolism in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains displaying novel fermentation characteristics **J. inst. Brew.**, v. 108, p. 322-335.
- MOCHABA, F., O'CONNOR-COX E. S. C. & AXCELL B. C. (1997) A novel and practical yeast vitality method based on magnesium ion release. **J. Inst. Brew.** v. 103, p. 99-102.
- MOCHABA, F., O'CONNOR-COX E. S. C. & AXCELL B. C. (1998) Practical procedures to measure yeast viability and vitality prior to pitching. **J. Am. Soc. Brew. Chem.** v. 56, p. 1-6.
- NEEDLEMAN, R. (1991). Control of maltase synthesis in yeast. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 2079-2084.
- NOVAK, S., KRPAN, V. Z., MARIC, V. (1991). Regulation of maltose transport and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technol. Biotechnol.** v. 42, p. 213-218.
- O'CONNOR-COX, E., MOCHABA, F. M., LODOLO, E. J., MAJARA, M. & AXCELL, B. (1997) Methylene blue staining: use at your own risk. **Tech. Q. Master Brew. Assoc.** v. 34, p. 306-312.
- OH, K. -B. & MATSUOKA, H. (2002) Rapid viability assessment of yeast cells using vital staining with 2-NBDG, a fluorescent derivative of glucose. **Int. J. Food Microbiol.** v. 76, p. 47-53.
- OSINGA, K.A., BEUDEKER, R.F., VAN DER PLAAT, J.B. & DE HOLLANDER, J.A. (1989) Recombinant yeast for more efficient sugar fermentation. **Eur. Pat. Appl.** EP 306, 107; 43 pp.

- OZCAN, S. & JOHNSTON, M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, p. 554-559.
- PEÑALVER, É., LUCERO, P., MORENO, E., LAGUNAS, R. (1998) Catabolic inactivation of maltose transporter in nitrogen-starvation yeast could be due to the stimulation of general protein turnover. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 166, p. 317-324.
- POSTMA, E., SCHEFFERS, W. A., VAN DIJKEN, J. D. (1989) Kinetics of growth and glucose transport in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **CBS 8066 Yeast**. v. 3, p. 159-165.
- POWELL, C. D., QUAIN, D. E. & SMART, K. A. (2003) The impact of brewing yeast age on fermentation performance, attenuation and flocculation. **FEMS Yeast Res.** v. 3, p. 149-157.
- PRENCIPE, L., IACCHERI, E., MANZATIC, C. (1987) Enzymic ethanol assay: a new method based on measurement of hydrogen. **Clin. Chem.** v. 33, p. 486-489
- RAUTIO, J., LONDESBOROUGH, J. (2003). Maltose transport by brewer's yeasts in brewer's wort *J. Inst. Brew.*, v. 109, p. 251-261.
- REES, E. M. R. & STEWART, G. G. (1997). The effects of increase magnesium and calcium concentration on yeast fermentation performance in high gravity worts **J. Inst. Brew.**, v. 103, p. 287-291.
- REES, E. M. R. & STEWART, G. G. (1999). Effects of magnesium, calcium and wort oxygenation on the fermentative performance of ale and lager strains fermenting normal and high gravityworts. **J. Inst. Brew.**, v. 105, p. 211-217.
- RIBALLO, E.; HERWIJER, M.; WOLF, D. H. & LAGUNAS, R. (1995). Catabolite inactivation of yeast maltose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **Eur. J. Biochem.**, v. 245, p. 324-333.
- RODIONOV, Y. V., KEPPEM, O. I., SUKHACHEVA, M. V. (2002) A photometric assay for ethanol. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 38, p. 395-396.
- ROSA, F.M. & SA-CORREIA, I. (1994) Limitations to the use of extracellular acidification for the assessment of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity and ethanol tolerance in yeasts. **Enzyme Microb. Technol.** v. 16, p. 808-812.

- ROSSEL, S., WEIJDEN, C. C. V. DER, KRUCKEBERG, A., BAKKER, B. M., WESTERHOFF, H. V. (2002) Loss of fermentative capacity in baker's yeast can partly be explained by reduced glucose uptake capacity. **Mol. Biol. Rep.** v. 29, p. 255-257.
- SALGADO, A. M., FOLLY, R. O. M., VALDMAN, B., COS, O., VALERO, F. (2000) Colorimetric method for the determination of ethanol by flow injection analysis. **Biotechnol. Lett.** v. 22, p. 327-330.
- SALMON, J. M., MAURICIO, J. C. (1994) Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *S. cerevisiae* strains during alcoholic fermentation. **Biotechnol. Lett.** v. 16, p. 89-94.
- SAMI, M., IKEDA, M. & YABUUCHI, S. (1994) Evaluation of the alkaline methylene blue staining method for yeast activity determination. **J. Ferment. Bioeng.** v. 78, p. 212-216.
- SAMUEL, D. (1996) Investigation of ancient Egyptian baking and brewing methods by correlate microscopy. **Science**, v. 273, p. 488-490.
- SCHULZE, U., LIDÉN, G., NIELSEN, J., VILLADSEN, J. (1996) Physiological effects of nitrogen starvation in an anaerobic batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol.** v. 142, p. 2299-2310.
- SERRANO, R. (1983) In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. **Febs Lett**, v. 156, p. 11-14.
- SINDICERV (2005) Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. Disponível em: <<http://www.sindicerv.com.br>>. Acesso em: 10 nov. 2005.
- SINGH, K. A. & WHISKER, S. W. (1996) Effect of serial repitching on fermentation properties and condition of brewing yeast. **J. Am. Soc. Brew. Chem.** v. 54, p. 41-44.
- SMART, K. A. & WHISKER, S. W. (1996) Effect of serial repitching on fermentation properties and condition of brewing yeast. **J. Am. Soc. Brew. Chem.** v. 54, p. 41-44.
- SMART, K. A., CHAMBERS, K. M., LAMBERT, I. & JENKINS, C. (1999). Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality. **J. Am. Soc. Brew. Chem.** v. 57, p. 18-23.
- SMART, K. (2003). **Brewing yeast fermentation performance**. 2° ed., Editora: Blackwell, Oxford, UK.

- STAMBUK, B. U. (1999). A simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast  $\alpha$ -glucosidase. **Biochem. Educ.** v. 27, p. 178-181.
- STAMBUK, B. U. (2000). A simple laboratory exercise illustrating active transport in yeast cells. **Biochem. Mol. Biol. Edu.** v. 28, p. 313-317.
- STAMBUK, B. U. & DE ARAUJO, P. S. (2001) Kinetics of active  $\alpha$ -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.** v. 1, p. 73-78.
- STAMBUK, B. U., DA SILVA, M. A., PANEK, A. D. & DE ARAUJO, P. S. (1999). Active transport of  $\alpha$ -glucosides in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 170, p. 105-110.
- STAMBUK, B. U., BATISTA, A. S. & DE ARAUJO, P. S. (2000). Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biosci. Bioeng.** v. 89, p. 212-214.
- STEWART, G. G. & RUSSEL, I. (1993). Fermentation – “the black box” of the brewing process. **MBAA Tech. Quart.** v. 30, p. 159-168.
- STEWART, G. G. ERRATT, J., GARRISSON, I., GORING, T., HANCOCK, I. (1979). Studies on the utilization of wort carbohydrates by brewer’s yeast strain. **Tecch. Q. Master Brew. Assoc. Am.** v. 16, p. 1-7.
- SUIHKO, M. -L., HOME, S. & LINKO, M. (1993) Wort sugars, yeast sugar uptake and beer quality. **Monatsschr. Brauwiss.** v. 46, p. 185-192.
- TABATA, S.; IDE, T.; UMEMURA, Y. & TORII, K. (1984). Purification and characterization of  $\alpha$ -glucosidases produced by *Saccharomyces* in response to three distinct maltose genes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 797, p. 231-238.
- THOMSSON, E., SVENSSON, M., LARSSON, C. (2005). Rapamycin pre-treatment preserves viability, ATP level and catabolic capacity during carbon starvation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast.** v. 22, p. 615-623.
- THOMSSON, E., LARSSON, C., ALBERS, E., NILSSON, A., FRANZE, C. J., GUSTAFSSON, L. (2003). Carbon starvation can induce energy deprivation and loss of fermentative capacity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 69, p. 3251-3257.
- TRAINOTTI, N., STAMBUK, B. U. (2001). NaCl stress inhibits maltose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* **Biotechnol. Lett.**, v. 23, p. 1703-1707.

- VAN DIJKEN, J. P. & SCHEFFERS, W. A. (1987). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 43, p. 275-278.
- VAN ZANDYCKE, S. M., SIMAL, O., GUALDONI, S. & SMART, K. A. (2003) Determination of yeast viability using fluorophores. **J. Am. Soc. Brew. Chem.** v. 61, p. 15-22.
- VERDUYN, C., VAN-DIJKEN, J. P., SCHEFFERS, W. A. (1984) Colorimetric alcohol assays with alcohol oxidase. **J. Microbiol. Meth.** v. 61, p. 15-22.
- VIDGREN, V., RUOHONEN, L., LONDESBOROUGH, J. (2005) Characterization and functional analysis of the MAL and MPH Loci for maltose utilization in some ale and lager yeast strains. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 71, p. 7846-7857.
- WANG, X., BALI, M., MEDINTZ, I., MICHAELS, C. A. (2002) Intracellular maltose is sufficient to induce *MAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukariot. Cell.** v. 1, p. 696-703.
- WEUSTHUIS, R. A., ADAMS, H., SCHEFFERS, W. A. & VAN DIJKEN, J. P. (1993) Energetics and kinetics of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*: a continuous culture study. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 59, p. 3102-3109.
- WILLAERT, R. (2001) Sugar consumption kinetics by Brewer's yeast during the primary beer fermentation. **Cerevisia** v. 26, p. 43-49.
- YAMAGISHI, H., YUUKI, T., KAGAMI, N. YOKOGAWA, Y., SHIBATA, K., MINEMURA, M. & OHYA, Y. (2001) Appearance of poor-fermenting variants in Brewing yeast culture. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 65, p. 2361-2363.
- YOSHIKAWA, K., YAMAMOTO, K., OKADA, S. (1994) Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation. **Biotechnol. Biochem.** v. 58, p. 1392-1398.
- YOON, S. H., MUKERJEA, R., ROBYT, J. F. (2003) Classification of some  $\alpha$ -glucosidases and  $\alpha$ -xylosidases en the basis of substrate specificity. **Carbohydr. Res.** v. 338, p. 1127-1132.
- ZASTROW, C. R. & STAMBUK, B. U. (2000). Transporte e fermentação de açúcares por leveduras da indústria cervejeira. **Revista Univille.** v. 5, p. 39-46.
- ZASTROW, C. R., MATOS, M. A., HOLLATZ, C. & STAMBUK, B. U. (2000) Maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett.** v. 22, p. 455-459.

ZASTROW, C. R., HOLLATZ, C., DE ARAUJO, P. S. & STAMBUK, B. U. (2001) Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 27, p. 34-38.

ZHENG, X.; D'AMORE, T.; RUSSELL, I. & STEWART, G. G. (1994). Transport Kinetics of maltotriose in strain of *Saccharomyces*. **J. Ind. Microbiol.**, v. 13, p. 159-166.

ZHENG, X.; D'AMORE, T.; RUSSELL, I. & STEWART, G. G. (1994). Factors influencing maltotriose utilization during brewery wort fermentation **J. Am. Soc. Brew. Chem.** v. 52, p. 41-47.