

Eduardo Silveira Ribeiro

**CARACTERIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DE
 α -GLICOSÍDEOS PELA LEVEDURA *Spathaspora*
*arborariae***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências

Orientador: Professor Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk

FLORIANÓPOLIS-SC
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ribeiro, Eduardo
CARACTERIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DE β -GLICOSÍDEOS
PELA LEVEDURA *Spathaspora arborariae* / Eduardo
Ribeiro ; orientador, Boris Juan Carlos Ugarte
Stambuk, 2019.
93 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

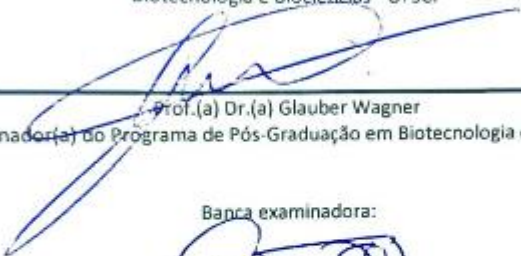
1. Biotecnologia e Biociências. 2. maltose. 3.
maltotriose. 4. cerveja. I. Juan Carlos Ugarte
Stambuk, Boris. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
e Biociências. III. Título.

"Caracterização da fermentação de α -glicosídeos pela levedura *Spathospora arborariae*"

Por


Eduardo Silveira Ribeiro

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (006/2019/PPGBTC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.




Prof.(a) Dr.(a) Glauber Wagner
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

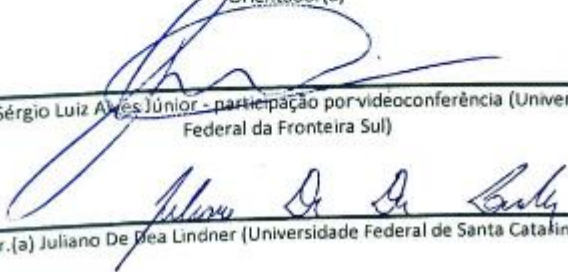
Banca examinadora:



Dr.(a) Boris Juan Carlos Ugarte Sandoval (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr.(a) Sérgio Luiz Alves Júnior - participação por videoconferência (Universidade Federal da Fronteira Sul)



Dr.(a) Juliano De Dea Lindner (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 28 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Prof. Dr. Boris por ter aceitado me orientar durante esses dois anos, por toda dedicação e conhecimento para extrair o máximo desse projeto, mesmo frente a tantas dificuldades. Obrigado por cada conselho, aula, ensinamento e puxão de orelha que extraiu o melhor de mim para chegar nesse momento o mais preparado possível.

Ao Prof. Dr. Márcio Rossi por ter colaborado com o andamento final do projeto. Desde o começo o senhor não poupou esforços em me ajudar, até levar o malte para moer em casa o senhor levou. Muito obrigado, guardarei na memória todos os conselhos e conversas que tive com o senhor.

A minha namorada, Bruna Farias, que foi meu porto seguro durante esses dois anos. Muito obrigado por ter me apoiado e incentivado, segurando a barra por mim quando eu quis desistir ou voltar para casa. Te quero para sempre ao meu lado, te amo demais, obrigado por ter entrado na minha vida.

A minha família, que mesmo de longe sempre me apoiou e confiou em mim e não media esforços para me ajudar mesmo que de longe.

Ao pessoal do laboratório que desde o começo me recebeu super bem, sempre me apoiaram e me ajudaram nos momentos de dificuldade, guardarei com carinho todos vocês na minha memória, sem vocês eu não teria chegado até aqui, muito obrigado.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite.

A UFSC e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências pela oportunidade.

A CAPES e ao CNPq pela bolsa de mestrado e financiamento do projeto.

“As long as you are learning, you are not failing”.

Robert Norman

RESUMO

O processo de fabricação de cerveja depende da eficiente fermentação de maltose e maltotriose por leveduras. Para a fermentação desses carboidratos, já foi descrito para *Saccharomyce cerevisiae* a necessidade de transportar o α -glicosídeo para dentro das células (pelas permeases *AGT1*, *MALx1* ou *MPH2/MPH3*) onde são hidrolisadas por maltases (*MALx2*) ou isomaltases (*IMA1-IMA5*). Esses genes podem fazer parte de cinco loci *MAL* não ligados que podem também abrigar um regulador *MAL* (gene *MALx3*) que ativa a transcrição das proteínas permeases e hidrolíticas. Com a grande expansão desse setor, aumenta-se cada vez mais a demanda por produtos inovadores e de qualidade superior. Dessa forma, a utilização de leveduras não convencionais permite a obtenção de características organolépticas diferenciadas no produto final. No presente trabalho, avaliou-se o consumo de α -glicosídeos e a produção de etanol pela levedura *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A¹, isolada de madeira em decomposição no Brasil, visando identificar genes de interesse para aplicação em outras linhagens assim como a aplicação da própria *Sp. arborariae* no processo de produção de cerveja. Ensaio de crescimento em condições microaeróbicas em meio YNB + 2% de cada carboidrato revelaram que a *Sp. arborariae* foi capaz de assimilar maltose ($\mu_{\text{máx}}=0,19 \text{ h}^{-1}$), maltotriose ($\mu_{\text{máx}}=0,26 \text{ h}^{-1}$), sacarose ($\mu_{\text{máx}}=0,26 \text{ h}^{-1}$), trealose ($\mu_{\text{máx}}=0,1 \text{ h}^{-1}$), α -metil glicosídeo ($\mu_{\text{máx}}=0,07 \text{ h}^{-1}$) e rafinose ($\mu_{\text{máx}}=0,08 \text{ h}^{-1}$), e fermentar maltose (1,65 g/L), maltotriose (3,59 g/L), sacarose (3,01 g/L), α -metil glicosídeo (2,81 g/L) e trealose (2,86 g/L). O cultivo em frascos de 250 mL com 50 mL de meio YP + 2% dos carboidratos sob condições aeróbicas e 160 rpm de agitação revelou que nessas condições a levedura consegue fermentar maltose (3,27 g/L), maltotriose (2,24 g/L) e sacarose (0,85 g/L). Os ensaios enzimáticos mostraram que células cultivadas em meio YP + 2% de maltose, α -metil glicosídeo ou sacarose mostraram capacidade de hidrolise para maltose, maltotriose, dentre outros α -glicosídeos indicando a presença de possíveis α -glicosidases. Ferramentas de bioinformática (BLASTp, ExPASy, TMpred e MEGA7) foram usadas para identificar uma suposta permease (ORF T1, com 44% de homologia com a permease *MAL31*) com o motivo PESP e as doze regiões transmembranas características, conservadas na maioria dos transportadores de carboidrato. Uma sequência que codifica uma α -glicosidase putativa (ORF M1, com 50% de homologia com a isomaltase *IMA1*) foi encontrada próxima a T1, e a região intergênica de

1,8 Kb possui duas caixas TATA, duas caixas GC e três sítios de ligação para o regulador *MAL*, como descrito na literatura para *S. cerevisiae*. Paralelamente a isso, foi testada a aplicabilidade da *Sp. arborariae* no processo de produção de cerveja. Testes preliminares mostram a aplicabilidade dessa linhagem para a produção de cervejas de baixo até alto teor alcoólico. Essa linhagem apresentou desempenho satisfatório com relação à produção de H₂S e capacidade de floculação. Ensaio preliminares indiciam sensibilidade dessa linhagem ao fator *Killer K4*. Analisados em conjunto, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem a aplicação da *S. arborariae* no processo de produção de cervejas. Entretanto mais estudos se fazem necessários com relação aos critérios de segurança e aplicação dessa espécie em processos alimentícios.

Palavras-chave: maltose, maltotriose, cerveja, fator *Killer*, floculação.

ABSTRACT

The brewing process depends on the efficient fermentation of maltose and maltotriose by yeast. For the fermentation of these carbohydrates, it has been described for *Saccharomyces cerevisiae* the needed to transport the α -glucoside into the cells (by the permeases *AGT1*, *MALx1* or *MPH2/MPH3*) where they are hydrolyzed by maltases (*MALx2*) or isomaltases (*IMA1-IMA5*). These genes may form part of five non-bound loci *MAL* that may also harbor an *MAL* regulator (*MALx3* gene) that activates the transcription of permeases and hydrolytics. With the great expansion of this sector, the demand for innovative products of superior quality is increasing. Thus, the use of non-conventional yeasts allows the obtaining of differentiated organoleptic characteristics in the final product. In the present work, the consumption of α -glucosides and the ethanol production by the yeast *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A^T, isolated from decomposing wood in Brazil, was evaluated in order to identify genes of interest for application in other strains as well as the application of *Sp. arborariae* itself in the beer production process. Growth assays in microaerobic conditions in YNB medium + 2% of each carbohydrate revealed that *Sp. Arborariae* was able to assimilate maltose ($\mu_{\text{máx}}=0,19 \text{ h}^{-1}$), maltotriose ($\mu_{\text{máx}}=0,26 \text{ h}^{-1}$), sucrose ($\mu_{\text{máx}}=0,26 \text{ h}^{-1}$), trehalose ($\mu_{\text{máx}}=0,1 \text{ h}^{-1}$), α -methyl-glucoside ($\mu_{\text{máx}}=0,07 \text{ h}^{-1}$) and raffinose ($\mu_{\text{máx}}=0,08 \text{ h}^{-1}$) and ferment maltose (1,65 g/L), maltotriose (3,59 g/L), sucrose (3,01 g/L), α -methyl-glucoside (2,81 g/L) and trehalose (2,86 g/L). The growth in 250 mL flasks with 50 mL of YP + 2% of each carbohydrates under aerobic conditions and 160 rpm of agitation showed that under these conditions the yeast ferment maltose (3,27 g/L), maltotriose (2,24 g/L) and sucrose (0,85 g/L). The enzymatic assays showed that cells grown in YP + 2% of maltose, α -methyl glycoside or sucrose showed hydrolyzing capacity for maltose, maltotriose, among other α -glucosides indicating the presence of possible α -glucosidases. Bioinformatics tools (BLASTp, ExPASy, TMpred and MEGA7) were used to identify a putative permease (ORF T1, with 44% homology with the *MAL31* permease) with the PESP motif and the twelve characteristic transmembrane regions conserved in most carbohydrate transporters. A sequence encoding a putative α -glucosidase (M1 ORF, with 50% homology to *IMA1* isomaltase) was found close to T1, and the 1.8 kb intergenic region has two TATA boxes, two GC boxes and three binding sites for the *MAL* regulator, as described in the literature for *S. cerevisiae*. Parallel to this, the

applicability of *Sp. arborariae* in the beer production process was tested. Preliminary tests show the applicability of this yeast to the production of beers from low to high alcohol content. This yeast presented satisfactory performance with H₂S production and flocculation capacity. Preliminary tests indicate sensitivity of this yeast to the Killer factor K4. Taken together, the results obtained in this work suggest the application of *S. arborariae* in the beer production process. However, more studies are needed regarding the safety criteria and application of this species in food processes.

Key-words: maltose, maltotriose, beer, Killer factor, flocculation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Utilização de maltose e maltotriose por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . As proteínas relevantes estão em destaque dentro das caixas azul, vermelha e amarela, e as setas indicam o sentido do fluxo das moléculas.....	24
Figura 2 – Estrutura do <i>locus MAL3</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (na linhagem S288C). Três genes estão localizados no <i>locus MAL3</i> , o regulador (<i>MAL33</i>), a permease (<i>MAL31</i>) e a maltase (<i>MAL32</i>). A região promotora entre <i>MAL31</i> e <i>MAL32</i> é mostrada em detalhes, possuindo duas caixas TATA, dois sítios de ligação da proteína Mig1, três sítios de ligação da proteína MalRp e uma região de 147 nucleotídeos que pode sofrer amplificação em <i>tandem</i>	37
Figura 3 – Estrutura química da maltose, maltotriose, trealose, α -metilglicosídeo, sacarose, melibiose, melezitose e rafinose.....	39
Figura 4 – Crescimento em microescala da levedura <i>Sp. arborariae</i> em meio YP com diferentes carboidratos na concentração de 2% a 28 °C sem agitação. A linha tracejada representa o meio YP sem adição de carboidrato.....	49
Figura 5 – Crescimento em microescala da levedura <i>Sp. arborariae</i> em meio YNB com diferentes carboidratos na concentração de 2% a 28 °C sem agitação. A linha tracejada representa o meio YNB sem adição de carboidrato.....	50
Figura 6 – Cultivo da linhagem de <i>Sp. arborariae</i> em meio YP com diferentes carboidratos na concentração de 2% a 28 °C e 160 rpm.	53
Figura 7 – Consumo dos diferentes carboidratos (2%) em meio YP pela levedura <i>Sp. arborariae</i> a 28 °C e 160 rpm.	54
Figura 8 – Produção de etanol pela levedura <i>Sp. arborariae</i> em meio YP com diferentes carboidratos (2%) a 160 rpm e 28 °C.	54
Figura 9 – Fermentação do mosto cervejeiro (11 °Brix) com (A) e sem (B) lúpulo pela levedura <i>Sp. arborariae</i> a 19 °C sem agitação.	58
Figura 10 – Fermentação do mosto cervejeiro (11 °Brix) com (A) e sem (B) lúpulo pela linhagem comercial de <i>S. cerevisiae</i> (SafAle™ US-05) a 19 °C sem agitação.	60
Figura 11 – Fermentação do extrato de malte (11 °Brix) pela levedura <i>Sp. arborariae</i> a 19 °C sem agitação.....	63
Figura 12 – Fermentação do extrato de malte (11 °Brix) pela levedura <i>Sp. arborariae</i> com células pré-cultivadas em meio YP + 2% de maltose a 19 °C sem agitação.....	64

Figura 13 – Consumo de maltose, glicose e produção de etanol (A) e crescimento celular (B) da levedura <i>Sp. arborariae</i> em meio YP com 2% de maltose e 0,5% de glicose a 28 °C e 160 rpm.	65
Figura 14 – Fermentação do extrato de malte (11 ° Brix, A) e crescimento celular (B) da levedura <i>Sp. arborariae</i> a 28 °C, com 160 rpm de agitação.	66
Figura 15 – Fermentação do extrato de malte (11 ° Brix) suplementado com 1% de sulfato de amônio (A) e crescimento celular (B) da levedura <i>Sp. arborariae</i> a 28 °C e 160 rpm.	67
Figura 16 – Fermentação do extrato de malte (11 ° Brix) suplementado com 1% de peptona (A) e crescimento celular (B) da levedura <i>Sp. arborariae</i> a 28 °C e 160 rpm.	68
Figura 17 – Indicação qualitativa da produção de H ₂ S pela levedura <i>Sp. arborariae</i> a 19 °C e 28 °C (A e C, respectivamente) e pela linhagem comercial de <i>S. cerevisiae</i> (SafAle™ US-05) a 19 °C e 28 °C (B e D, respectivamente).	70
Figura 18 – Aparentes halos de inibição (áreas mais claras) do crescimento da linhagem de <i>Sp. arborariae</i> formados em placa de Petri YPD com 0,003% de azul de metileno a partir da inoculação pontual das linhagens Perlage® BB <i>S. cerevisiae</i> fator <i>Killer</i> positiva (A) e CCT 2369 <i>Pichia anomala</i> fator <i>Killer</i> K4 (B).	71
Figura 19 – Alinhamento das ORFs T1, T2, T3 e AGT1_Sc construídas a partir do genoma de <i>Sp. arborariae</i> utilizando genes homólogos de transportadores de α -glicosidases da família de genes <i>MAL</i> de <i>S. cerevisiae</i> S288C. O alinhamento foi realizado utilizando-se o programa IBIVU Server-PRALINE (http://ww.ibi.vu.nl). As 12 regiões transmembrana estão destacadas em verde. Os motivos PESP estão circulados em amarelo. A posição do códon CUG está enquadrada em vermelho.	74
Figura 20 – Árvore filogenética do tipo máxima parcimônia gerada a partir do software MEGA7. As sequências utilizadas são de diversos transportadores conhecidos e já caracterizados e das três ORF's estudadas no presente trabalho.	76
Figura 21 – Árvore filogenética do tipo máxima parcimônia gerada a partir do software MEGA7. As sequências utilizadas são de 32 α -glicosidases distintas e das duas ORF's estudadas no presente trabalho. Em azul encontram-se as α -glicosidases que atuam como maltases, em vermelho as que atuam como isomaltases e em cinza as que possuem caráter misto.	77
Figura 22 – Região intergênica entre possível transportador e possível α -glicosidase no contig 033 da linhagem de <i>Sp. arborariae</i> . Em vermelho	

estão destacadas as caixas TATA, em verde e preto os sítios de ativação
Malx3, em roxo os sítios de ligação da Mig1p e em azul o local das
ORF's. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fermentação e assimilação de carboidratos por leveduras do gênero <i>Spathaspora</i>	32
Tabela 2 – Valores de $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}) da levedura <i>Sp. arborariae</i> em meio YP e YNB com diferentes carboidratos na concentração de 2%.....	51
Tabela 3 – Capacidade de produção de etanol da linhagem de <i>Sp. arborariae</i> em meio YP e YNB com diferentes carboidratos na concentração de 2%.....	52
Tabela 4 – Atividade de hidrólise para diversos carboidratos na concentração de 100 mM pela levedura <i>Sp. arborariae</i> pré-cultivada em meio YP com 2% de maltose, sacarose, α -metil-glicosídeo e trealose..	56
Tabela 5 – Percentual de similaridade das ORF's da linhagem de <i>Sp. arborariae</i> com sequências <i>MALx1</i> e <i>MALx2</i> da linhagem de <i>S. cerevisiae</i> S288C, selecionadas através da ferramenta BLASTp.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – Absorbância

BLASTp – *Basic Local Alignment Search Tool for proteins* (ferramenta de busca e alinhamento básico local, para proteínas)

OD – Densidade ótica

dsRNA – *Double-stranded RNA* (RNA de dupla fita)

HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de alto desempenho)

H₂S – sulfeto de hidrogênio

K_m – constante de Michaelis

Meio LB – Meio Lúria-Bertani

Meio YNB – Meio sintético

Meio YP – Meio à base de extrato de levedura 1% e peptona 2%

PCR – Reação em cadeia da polimerase

rpm – rotações por minuto

UFC – unidades formadoras de colônia

μ_{máx} – velocidade específica máxima de crescimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	PRODUÇÃO DE CERVEJA.....	24
1.2	LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS NA PRODUÇÃO DE CERVEJA.....	29
1.3	SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE CERVEJA.....	31
1.3.1	Floculação.....	33
1.3.2	Produção de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S).....	34
1.3.3	Toxinas <i>Killer</i>	34
1.4	METABOLIZAÇÃO DE α -GLICOSÍDEOS.....	35
2	OBJETIVOS.....	41
2.1	OBJETIVO GERAL.....	41
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1	LINHAGENS UTILIZADAS.....	43
3.2	CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO EM MICROESCALA.....	43
3.3	CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO.....	43
3.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE α -GLICOSIDASE.....	44
3.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA INVERTASE EXTRACELULAR.....	45
3.6	PRODUÇÃO E FERMENTAÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO.....	45
3.7	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS, ETANOL E OUTROS METABÓLITOS.....	46
3.8	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO.....	47
3.9	FLOCULAÇÃO.....	47
3.10	PRODUÇÃO DE H ₂ S.....	47
3.11	TOXINAS <i>KILLER</i>	47
3.12	SELEÇÃO DE GENES PARA TRANSPORTADORES DE CARBOIDRATOS E α -GLICOSIDASES.....	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1	ANÁLISE EM MICROESCALA DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ETANOL DA LINHAGEM DE <i>Sp. aborariae</i> UFMG-HM19.1A ^T	49
4.2	ANÁLISE DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ETANOL DA LINHAGEM DE <i>Sp. arborariae</i>	52

4.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE α -GLICOSIDASE DA LEVEDURA <i>Sp. arborariae</i> APÓS CRESCIMENTO EM DIFERENTES CARBOIDRATOS.....	54
4.4 APLICAÇÃO DA LEVEDURA <i>Sp. arborariae</i> NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA	57
4.5 OUTROS PARÂMETROS DE SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA O PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA.....	68
4.5.1 Floculação	68
4.5.2 Produção de H₂S.....	69
4.5.3 Toxinas <i>Killer</i>.....	70
4.6 SELEÇÃO DE GENES PARA TRANSPORTADORES DE CARBOIDRATOS α -GLICOSIDASES	72
5 CONCLUSÕES.....	79
6 REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

Importantes processos biotecnológicos, como a produção de cerveja, a panificação e a produção de diversas bebidas destiladas, são de grande interesse econômico devido ao seu amplo consumo, e fazem parte do desenvolvimento da civilização humana há milhares de anos. Esses processos se baseiam na eficiente fermentação realizada por diversas espécies de levedura sobre o hidrolisado de amido, o qual é rico em glicose e nos α -glicosídeos maltose e maltotriose (ALVES-JR et al., 2007). Sendo assim, estudar o metabolismo desses carboidratos por leveduras, visando à otimização do processo fermentativo, torna-se importante para a expansão dos setores industriais em questão.

Glicosídeos são por definição compostos oriundos da união de dois ou mais carboidratos através de uma ligação glicosídica, a qual é formada quando o carbono anomérico de um carboitrado, normalmente cíclico, reage com um grupo hidroxila de outra molécula de carboidrato. Essa reação representa a formação de um acetal a partir de um hemiacetal e um álcool e, pode ser do tipo α ou β dependendo da configuração do carbono anomérico (NELSON; COX, 2014).

Dentro do mosto cervejeiro, os carboidratos fermentescíveis mais abundantemente encontrados são os α -glicosídeos maltose (50-60%, formado por duas unidades de glicose α 1-4) e maltotriose (15-20%, formado por três unidades de glicose α 1-4), além da glicose (10-15%). Entre esses três carboidratos, a glicose é preferencialmente e rapidamente consumida pelas células de leveduras, devido à repressão que a glicose causa na transcrição dos genes necessários à metabolização de maltose e maltotriose. Porém, para a eficiência do processo, é necessária a fermentação completa tanto de maltose quanto de maltotriose. A maltose é facilmente fermentada após a exaustão da glicose no meio pela grande maioria das linhagens de *S. cerevisiae*, enquanto que diversas linhagens não conseguem fermentar por completo a maltotriose (ALVES-JR et al., 2007; DUVAL et al, 2010). Tanto o transporte de maltose como de maltotriose para dentro da célula, sendo essa a primeira etapa do processo, é o passo limitante na utilização desses carboidratos (KODAMA et al., 1995; STAMBUK et al., 2006). Em *S. cerevisiae*, a permeasse responsável por esse transporte atua a partir de um co-transporte de prótons (H^+) a partir de um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana plasmática; quando esse gradiente cessa, o sistema de transporte deixa de funcionar, independentemente da concentração do carboidrato dentro e fora da célula. Após o transporte desse carboidrato para dentro da célula, sob a

ação de uma α -glicosidase, a maltose e maltotriose são hidrolisadas em duas e três moléculas de glicose, respectivamente, que serão destinadas à via glicolítica para serem fermentadas ou respiradas pela célula (Figura 1) (RAUTIO; LONDESBOROUGH, 2003; SERRANO, 1977; ZASTROW et al., 2000; ZASTROW et al., 2001). Destaca-se ainda com relação à utilização de maltotriose que diversas linhagens industriais, apesar de serem capazes de consumir esse trissacarídeo, tendem a respirar esse carboidrato ao invés de fermentá-lo (ZASTROW et al., 2000).

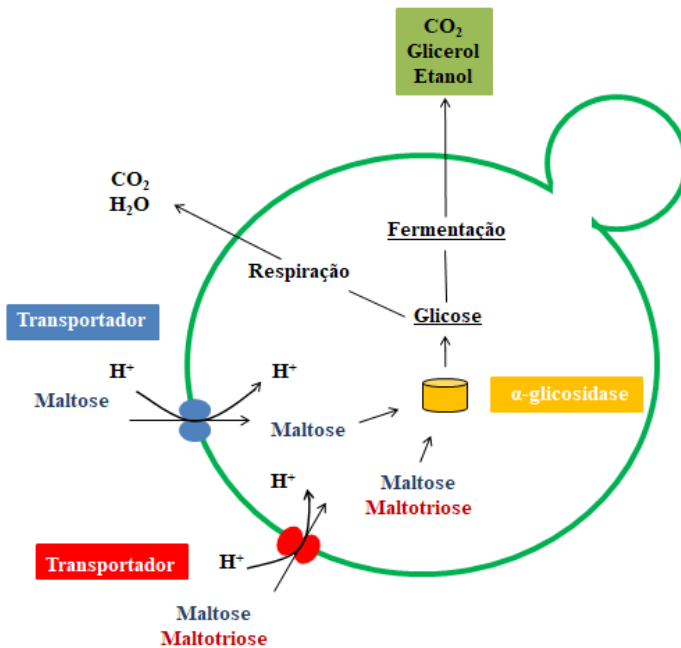


Figura 1 – Utilização de maltose e maltotriose por *Saccharomyces cerevisiae*. As proteínas relevantes estão em destaque dentro das caixas azul, vermelha e amarela, e as setas indicam o sentido do fluxo das moléculas.

1.1 PRODUÇÃO DE CERVEJA

O processo de produção de cerveja compreende uma série de etapas, que vão desde a moagem dos grãos de malte, mosturação, filtração, fervura e resfriamento do mosto para o preparo do inóculo e

fermentação onde irá ocorrer o consumo dos carboidratos e produção de etanol. Após a fermentação ocorre a maturação, clarificação e carbonatação para finalmente ocorrer o envase do produto final e posterior pasteurização.

A primeira etapa do processo consiste na operação de moagem do malte. O malte de cevada consiste em aproximadamente 65-68% de amido, 10-17% de proteína, 4-9% de β -glucanos, 2-3% de ácidos graxos e 1,5-2,5% de minerais (CZUCHAJOWSKA et al., 1998; IZYDORCZYK et al., 2000; QUINDE et al., 2004). Na operação de moagem do malte, o grão deve ter a sua casca rasgada longitudinalmente, para deixar exposto o endosperma amiláceo, o qual deve ser triturado a fim de facilitar a ação das enzimas durante a mosturação. Nesta etapa é importante evitar a produção de partículas finas, com intuito de que não ocorram problemas na filtração do mosto (AQUARONE et al., 2001). Nesse sentido, a granulometria apropriada pode ser dividida em 12% em 10 mesh; 16% em 14 mesh; 24% em 18 mesh; 27% em 30 mesh, 14% em 60 mesh; 4% em 100 mesh (STUBITS et al., 1984).

Na etapa de mosturação, as enzimas α - e β -amilases convertem o amido em carboidratos fermentescíveis, em que as α -amilases consistem em endo-amilases, as quais atuam na clivagem interna das ligações glicosídicas α -(1,4), o que resulta na formação de dextrinas (carboidratos não fermentescíveis) e distintos oligossacarídeos. As ligações α -(1,4) destes oligossacarídeos são então hidrolisados, a partir da extremidade não redutora da cadeia, pelas β -amilases, as quais são exo-amilases. Essa hidrólise resulta na formação de moléculas menores como, por exemplo, maltose e maltotriose, (DERDE et al., 2012; GUPTA et al., 2003). Além disso, as amilases costumam possuir a faixa de atuação ótima entre 60-70°C. A velocidade de reação enzimática aumenta com o aumento da temperatura até atingir a sua desativação (BRIGGS et al., 2004).

Após a mosturação, separa-se a parte sólida insolúvel da massa. O mosto é basicamente constituído pelo extrato das matérias-primas, os quais estão dissolvidos em água. Enquanto o resíduo insolúvel é composto pela casca do malte, fragmentos da camada de aleurona, plúmula, restos de parede celular e proteínas coaguladas. Estes sólidos insolúveis sedimentam-se sob o reator, o que origina o leito de filtração, através do qual o mosto permeia para poder ser separado sem traços de malte (AQUARONE et al., 2001).

A fervura do mosto tem por objetivo fornecer estabilidade biológica, bioquímica e coloidal. Além disso, nessa etapa há o

desenvolvimento de cor, aroma e sabor, bem como ocorre aumento da concentração do extrato. Durante a fervura, a carga microbiana presente no mosto é eliminada. Isto deve-se à elevada temperatura juntamente com os compostos extraídos do lúpulo, α - e β -ácidos, os quais possuem atividade bacteriostática. Ademais, a adição de lúpulo fornece aroma e sabor característicos dessa matéria-prima. O aumento da temperatura também provoca a inativação das enzimas α - e β -amilases. As proteínas e os taninos são coagulados e sedimentados, o que permite que sejam eliminados do mosto na forma de *trub*. Na ebulição, alguns compostos voláteis, os quais conferem odor e sabor desagradáveis, oriundos da cevada ou malte, são eliminados (AQUARONE et al., 2001; BRIGGS et al., 2004).

O resfriamento do mosto tem por objetivo reduzir a sua temperatura de aproximadamente 100 °C para a temperatura adequada de inoculação do fermento, que é de 15-22 °C para as leveduras de alta fermentação e de 6-12 °C para as leveduras de baixa fermentação. O resfriamento deve ser realizado rapidamente sob condições assépticas, a fim de interromper reações químicas e minimizar o crescimento de patógenos. À medida que o mosto é resfriado, o *trub* é separado do mosto. Esse material contém, aproximadamente, 50% de proteínas, 15-25% de polifenóis e 20-30% de carboidratos (BRIGGS et al., 2004). Além disso, a aeração do mosto pode ser importante para o crescimento da levedura cervejeira, a qual tem rendimento maior através de metabolismo respiro-fermentativo (AQUARONE et al., 2001). Para o preparo do inóculo é necessário fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes, além da água e oxigênio. O inóculo permite que a levedura seja adaptada ao mosto e repicada até a concentração ideal para que então possa ser aplicada na etapa de fermentação do mosto cervejeiro (AQUARONE et al., 2001; BRIGGS et al., 2004).

A *S. cerevisiae* é o principal micro-organismo utilizado para produção de cervejas do tipo *Ale*. Estima-se que o último ancestral em comum de cada linhagem dessas leveduras tenha ocorrido em 1600-1700 D.C. Este período coincide com a mudança gradual do processo de produção de cerveja para o âmbito profissional. Em que o processo de reutilização das leveduras continuamente, ao término de cada processo fermentativo, ocasionou na domesticação desses micro-organismos. Os fenótipos dessa cepa domesticada compreendem uma combinação de fatores, como resistência a meios ricos em carboidratos, ambientes com limitação de oxigênio, tolerância ao etanol e eficiente utilização de maltotriose. Vale ressaltar que este carboidrato consiste em uma importante fonte de carbono presente no mosto cervejeiro, porém não é

usualmente encontrado em elevadas concentrações no ambiente natural dessas leveduras (GALLONE et al., 2018; GONÇALVES et al., 2016).

A *Saccharomyces pastorianus*, a qual teve seu surgimento na idade média em Bavaria, foi originada a partir da hibridização entre a *S. cerevisiae* e a *Saccharomyces eubayanus*, é a levedura mais utilizada para produzir cervejas do tipo *Lager*, as quais vêm ganhando popularidade desde o advento da refrigeração requerida nesse tipo de fermentação. As leveduras utilizadas para produzir cervejas do tipo *Lager* podem ser divididas em duas linhagens, a *Saaz*, a qual possui como característica maior tolerância a temperaturas mais baixas e tendência à floculação e, a *Frohberg*, a qual apresenta uma fermentação mais rápida e consumo de maltotriose (HORNSEY 2003; MAGALHÃES et al., 2016; MONERAWELA; BOND, 2017). Destaca-se que atualmente as cervejas do tipo *Lager* representam 89% de toda a cerveja produzida, sendo portanto a *S. pastorianus* a espécie mais utilizada para a produção de cerveja (BRICKWEDDE et al., 2017).

As leveduras cervejeiras podem catabolizar carboidratos seguindo duas vias metabólicas distintas, dependendo da disponibilidade de oxigênio e da concentração de carboidratos. Na aerobiose, a levedura utiliza preferencialmente as suas reservas de glicogênio e o oxigênio disponível a fim de reestruturar a sua membrana celular, o que potencializa a permeabilidade e transferência de nutrientes e carboidratos ao longo de sua estrutura. (AQUARONE et al., 2001; BRIGGS et al., 2004; MACLNTOSH, 2015). Em anaerobiose, inicialmente moléculas de glicose e frutose são consumidas, enquanto moléculas de sacarose são hidrolisadas extracelularmente através de invertase. À medida que a concentração de glicose torna-se suficientemente reduzida, as moléculas de maltose e maltotriose são hidrolisadas intracelularmente através das maltases. O consumo destas moléculas resulta na produção de moléculas de etanol, dióxido de carbono, outros metabólitos e energia (MACLNTOSH, 2015; WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

O processo fermentativo pode ser dividido nas fases lag, crescimento exponencial, estacionária e declínio. Vale ressaltar que as células podem progredir com diferentes velocidades ao longo do processo fermentativo, em função das suas distintas condições fisiológicas, o que permite que mais de uma fase possa ocorrer simultaneamente no processo (BRIGGS et al., 2004; MACLNTOSH, 2015). Na fase lag ocorre a adaptação da levedura, em que a presença de oxigênio, assim como fontes de nitrogênio, vitaminas e minerais, permite que as leveduras sintetizem as enzimas necessárias para o seu

crescimento, além de produzir importantes compostos, como os esteróis, os quais desempenham importante função na obtenção da membrana celular com permeabilidade seletiva. Na fase exponencial ocorre o crescimento acentuado do número de células de leveduras, além da maior quantidade de produção de etanol, dióxido de carbono e outros metabólitos. Na fase estacionária, o crescimento celular começa a desacelerar até permanecer constante. Nessa fase inicia-se o processo de maturação, em que a levedura reabsorve parte dos metabólitos produzidos durante a fermentação, como por exemplo, o diacetil, o qual consiste em um composto indesejado no produto final (BOULTON, 1991; WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Por último, ocorre à fase de declínio, a partir da lise celular e/ou sedimentação celular e, conseqüentemente, a diminuição da concentração celular em suspensão pela velocidade de crescimento celular (STEWART, 2018).

As reações bioquímicas que ocorrem durante a fermentação refletem o genótipo da levedura utilizada, e a sua expressão fenotípica é influenciada pela composição do mosto e dos parâmetros de controle da fermentação. Nesse sentido, com o intuito de se obter uma fermentação satisfatória, gerando assim uma cerveja de qualidade, é necessário escolher uma linhagem de levedura com o genótipo ideal e manipular as condições a fim de se obter o comportamento metabólico apropriado. Além do etanol e do dióxido de carbono, outros subprodutos são formados através do metabolismo da levedura. Esses subprodutos contribuem para o aroma e sabor da cerveja (BRIGGS et al., 2004).

Após a formação de álcool, dióxido de carbono e alguns subprodutos, o extrato residual da cerveja continua a ser lentamente fermentado, ocorrendo assim, reações químicas e bioquímicas no líquido, as quais são responsáveis por adicionar complexidade ao produto final. Ao fim da maturação ocorre a clarificação da cerveja através da sedimentação das células de levedura e de componentes que causam turbidez à bebida. Além disso, há melhora do odor e sabor da bebida, através da redução de subprodutos indesejáveis, como diacetil, acetaldeído e ácido sulfídrico. Além da sedimentação por gravidade das células de levedura e do complexo coloidal proteína-tanino, há também a realização da clarificação da cerveja através de filtração, a fim de obter um produto cristalino. Ao final do processo fermentativo, a levedura é separada da cerveja, para que possa ser purificada e então utilizada novamente em uma nova fermentação, ou ainda ser direcionada ao tratamento de efluentes da cervejaria (AQUARONE et al., 2001; BRIGGS et al., 2004).

O dióxido de carbono (CO₂) é um constituinte muito importante na cerveja, responsável pela efervescência e a sensação de acidez deixada na boca devido às suas propriedades. Por essa razão, sua concentração na cerveja deve ser cuidadosamente controlada. Quando necessário, a carbonatação pode ser realizada pela injeção de CO₂ em linha ou em tanque, em que o gás carbônico é injetado durante a passagem da bebida por uma tubulação, através de um difusor que produz bolhas de CO₂ (10-100 µm). Além disso, a carbonatação pode ser realizada em tanque, onde o CO₂ é então injetado na cerveja através de um difusor localizado no fundo de um tanque de armazenamento. Alternativamente, em pequena escala pode se realizar a carbonatação a partir do método de *priming* que consiste na utilização de açúcares fermentescíveis no envase do produto final, onde as leveduras residuais irão utilizar esses açúcares para produção de CO₂ (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Em ambos os métodos, o nível de CO₂ na cerveja antes do envase de modo geral está entre 2,5 a 2,8% (v/v), dependendo do estilo da cerveja (VENTURINI, 2010). Logo após, ocorre o acondicionamento da cerveja através do envase da mesma. A última etapa do processo de produção de cerveja consiste na pasteurização, a qual é realizada com intuito de conferir estabilidade biológica à cerveja, mediante a eliminação de micro-organismos que deterioram a cerveja. (AQUARONE et al., 2001).

1.2 LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS NA PRODUÇÃO DE CERVEJA

Cerveja, assim como qualquer alimento fermentado, é necessariamente um produto oriundo de um processo microbiológico. Dependendo da linhagem utilizada, em função da variação da produção de metabólitos secundários, assim como do seu perfil de consumo dos carboidratos, obtém-se um produto totalmente diferente devido a esses compostos estarem relacionados com as principais características sensoriais do produto, as quais contribuem para a qualidade final do mesmo (BAMFORTH, 2006).

As leveduras utilizadas no processo cervejeiro possuem ainda diversas limitações. Destacam-se entre elas a ineficiente fermentação do mosto e a conversão dos carboidratos em etanol que é limitada tanto pelo crescimento excessivo dessas leveduras quanto pela inabilidade de fermentar todos os carboidratos do mosto. Além disso, os cervejeiros possuem apenas controle limitado sobre os sabores e aromas produzidos

pelas leveduras. Dentro desse contexto, torna-se necessário o aprimoramento das leveduras já comumente utilizadas no processo cervejeiro ou a procura de novas espécies que poderiam estar atuando dentro desse mercado (HAMMOND, 1995).

Com a grande expansão desse setor, juntamente com o aumento do número de consumidores especializados, aumenta-se cada vez mais a demanda por produtos inovadores e de qualidade superior. Dessa forma, a utilização de leveduras não convencionais permite não apenas multiplicidade de aromas e sabores, mas também de novas impressões nas características organolépticas do produto final (MICHEL et al., 2016). Dentre as leveduras não convencionais, destaca-se a espécie de *Brettanomyces*. Utilizada desde o início do século vinte, sua aplicação foi muito discutida no começo devido aos aromas e sabores que essa levedura concedia a fermentações cervejeiras convencionais, entretanto, ao longo dos anos, a mesma tornou-se essencial na formação do sabor de diversos estilos de cervejas (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Atualmente, vêm ganhando destaque as cervejas sem álcool, que deixaram de ser um mercado de nicho e tem seu consumo em constante crescimento na população devido ao aumento da preocupação com a saúde e sobrepeso (BELLUT et al., 2018). Dentro desse contexto, existe registro de patente (SAERENS; SWIEGERS, 2017) quanto à utilização da levedura *Pichia kluyveri* para produzir cervejas sem álcool ou com baixo teor alcoólico, com sabor muito próximo ao de uma cerveja convencional. Outra patente, registrada por Li et al. (2013), indica o uso da levedura *Candida shihatae* para a produção de cerveja sem álcool.

Diversas espécies de leveduras estão emergindo como candidatas para a produção dos mais variados estilos de cerveja. Esse tipo de inovação não limita sua aplicação à fermentação direta do mosto para a obtenção de novos produtos com aromas mais complexos e sabores mais característicos, mas também aumenta o número de possibilidades em diversas abordagens em um mercado em expansão. Seja na utilização de leveduras não convencionais para fermentações sequenciais ou co-fermentações, existem inúmeras estratégias e combinações que podem dar origem a cervejas diferenciadas (BASSO et al., 2016).

A levedura *Spathaspora arborariae*, pertencente ao gênero *Spathaspora*, foi isolada a partir de madeira em decomposição em dois ecossistemas diferentes, Cerrado e Mata Atlântica (CADETE et al., 2009). Essa espécie já foi descrita como capaz de fermentar maltose (Tabela 1), uma característica compartilhada com outras 13 espécies do gênero *Spathaspora*, com exceção das leveduras *Sp. boniae* e *Sp.*

gorwiae que crescem, mas não fermentam, nesta fonte de carbono. *Sp. boniae* também se mostrou incapaz de utilizar sacarose, enquanto que duas espécies (*Sp. hagerdaliae* e *Sp. gorwiae*) foram inclusive capazes de fermentar sacarose. Todas as espécies utilizam trehalose, sendo que mais da metade das espécies na Tabela 1 são capazes de fermentar esta fonte de carbono. Todas as espécies também utilizam melezitose, com exceção de *Sp. passalidarum* que fermenta este trissacarídeo, e *Sp. roraimanensis* que é incapaz de utilizar esse açúcar. Nenhuma espécie foi reportada como capaz de utilizar o trissacarídeo rafinose ou o α -galactosídeo melibiose (Tabela 1). Com menos dados disponíveis, o crescimento em α -metil-glucosídeo já foi reportado para 3 espécies de *Spathaspora* (Tabela 1). As leveduras deste gênero estão sendo propostas como leveduras importantes para a produção do chamado etanol de segunda-geração (CADETE; ROSA, 2018).

1.3 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE CERVEJA

Para a seleção de leveduras torna-se importante estabelecer as propriedades de interesse para a cerveja. A seleção de uma linhagem adequada para a produção de bebidas fermentadas depende não apenas do seu comportamento metabólico durante o processo fermentativo, mas também do seu efeito nas características organolépticas do produto final. A seleção de leveduras está relacionada a diversas propriedades, como tolerância ao etanol, osmotolerância, produção de biomassa, formação de espuma, produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), expressão do fenótipo *Killer*, capacidade floculante, entre outros (CAPECE et al., 2018; GAROFALO et al., 2018; GIANVITO et al., 2018; WILLAERT, 2017).

Além das propriedades de interesse, a utilização de uma espécie não convencional de levedura necessita passar por um processo de verificação no que diz respeito à segurança acerca de sua aplicação em alimentos e bebidas. Dentro desse contexto se considera como seguro para a utilização micro-organismos que possuem amplo histórico de uso em bebidas e alimentos no decorrer da história sem possuir relação direta com infecções e malefícios causados por esses. Enquanto que de uma maneira geral, características indesejáveis para a aplicação de micro-organismos em bebidas e alimentos incluem resistência a antibióticos, metabólitos tóxicos e infecções oportunistas entre outros (BOURDICHON et al., 2012).

Tabela 1 - Fermentação e assimilação de carboidratos por leveduras do gênero *Spathaspora*

Espécie:	Carboidrato ^a :										Ref:
	Gli	Gal	Xil	Mal	Sac	Raf	Tre	αMG	Mez	Meb	
<i>Sp. allomyrinae</i>	++	++	++	++	+	-	+	+	+	-	[1]
<i>Sp. arborariae</i>	++	++	++	++	+	-	+	nd	+	-	[2]
<i>Sp. boniae</i>	++	+	++	+	-	-	+	nd	+	-	[3]
<i>Sp. brasiliensis</i>	++	++	++	++	+	-	++	nd	+	-	[4]
<i>Sp. hagerdaliae</i>	++	++	++	++	++	-	+	nd	+	-	[5]
<i>Sp. girioi</i>	++	++	++	++	+	-	+	nd	+	-	[5]
<i>Sp. gorwiae</i>	++	++	++	+	++	-	+	nd	+	-	[5]
<i>Sp. jeffriensis</i>	++	++	++	++	+	-	++	+	+	-	[6]
<i>Sp. materiae</i>	++	+	+	++	+	-	+	nd	+	-	[7]
<i>Sp. passalidarum</i>	++	++	++	++	+	-	++	+	++	-	[6]
<i>Sp. piracicabensis</i>	++	++	++	++	+	-	++	nd	+	-	[8]
<i>Sp. roraimanensis</i>	++	++	++	++	+	-	++	nd	-	-	[4]
<i>Sp. suhii</i>	++	++	++	++	+	-	++	nd	+	-	[4]
<i>Sp. xylofermentans</i>	++	+	++	++	+	-	++	nd	+	-	[4]

^aGli: glicose, Gal: galactose, Xil: xilose, Mal: matose. Sac: sacarose, Raf: rafinose, Ter: trehalose, αMG: α-metil-glucosídeo, Mez: melezitose, Meb: melibiose. ++ indica fermentação, + indica assimilação (crescimento), nd: não determinado. Referências: [1] WANG et al., 2016; [2] CADETE et al., 2009; [3] MORAIS et al., 2017; [4] CADETE et al., 2013; [5] LOPES et al., 2016; [6] NGUYEN et al., 2006; [7] BARBOSA et al., 2009; [8] VARIZE et al., 2018.

Com relação a *S. arborariae*, por ter sido isolada de madeira em decomposição não há relatos no decorrer da história da sua presença e/ou aplicação em processos alimentícios devido ao fato de seu ambiente natural ser diferente das matérias primas normalmente utilizadas em processos alimentícios. Entretanto, até o presente momento também não há relatos de possíveis malefícios causados por essa levedura. Ressalta-se que visando sua aplicação no processo de produção de cerveja trabalhos futuros necessitam assegurar a utilização desta espécie de levedura em produtos alimentícios. Entre esses parâmetros mencionados, a produção de sulfeto de hidrogênio, a expressão do fenótipo *Killer* e a capacidade floculante destacam-se devido a sua relevância na seleção de leveduras com potencial para serem aplicadas no processo de produção de cervejas.

1.3.1 Floculação

A habilidade de leveduras se aderirem em aglomerados compostos por milhares de células ocorre através da floculação (SUZZI et al., 1984). Esse fenômeno é reversível, assexual e dependente de cálcio (VERSTREPEN et al., 2003).

A floculação é mediada por uma família de adesinas de superfície celular, conhecidas como floculinas. A linhagem laboratorial S288C de *S. cerevisiae* já sequenciada possui cinco genes de floculinas: *FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10* e *FLO11*, sendo os quatro primeiros genes teloméricos. As proteínas codificadas a partir desses genes interagem com as mananas, que são polissacarídeos formados a partir de resíduos de manose, presentes na parede celular, acarretando na floculação das leveduras (MULDERS et al., 2010). No geral, temperaturas mais frias tendem a favorecer a floculação, enquanto que grandes concentrações de carboidratos e a presença de oxigênio inibem a floculação (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Após sua formação, esses aglomerados rapidamente se separam do meio líquido e se depositam ou no fundo do fermentador por sedimentação em leveduras do tipo *Lager* ou no topo do fermentador em leveduras do tipo *Ale* (VERSTREPEN et al., 2003).

A capacidade de células de leveduras flocularem é considerada de grande importância dentro da indústria cervejeira, pois fornece um método simples, efetivo e de baixo custo para separar as células de leveduras da cerveja ao final da fermentação. Entretanto, é importante que essa floculação não ocorra antes do mosto estar completamente atenuado, pois floculação prematura tende a causar diversos sabores e

odores indesejáveis (*off-flavours*) no produto final (VERSTREPEN et al., 2003),

1.3.2 Produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)

Sulfeto de hidrogênio é um composto organosulfurado, altamente reativo e volátil, produzido durante a fermentação alcoólica. Coletivamente, o sulfeto de hidrogênio produzido, assim como seus derivados, destacando-se nesse caso o etil mercaptano e o dietil dissulfeto, são responsáveis por gerar aromas desagradáveis normalmente associados com cheiro de ovo podre (DAHABIEH et al., 2015).

S. cerevisiae é capaz de reduzir o sulfato presente em seu meio a sulfeto e então incorporá-lo em aminoácidos através de diversas reações catalisadas por enzimas específicas. O sulfeto que não for incorporado a esses aminoácidos é então convertido a sulfeto de hidrogênio através de uma reação mediada pelo pH. Sua produção varia bastante dependendo das condições de crescimento aplicadas à levedura, à presença de enxofre elementar, dióxido de enxofre, compostos orgânicos contendo enxofre, limitação de nitrogênio entre outros (LINDERHOLM; BISSON, 2005).

No geral, a maioria das leveduras aplicadas na produção de cerveja produz esses compostos durante a fermentação, os quais são carreados para fora do mosto junto com o CO₂ produzido durante a fermentação devido a sua volatilidade (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Entretanto, uma alta produção desses compostos durante a fermentação acarreta na presença desses odores relacionados a ovos podres no nosso produto final, sendo essa uma característica indesejável, a produção de H₂S torna-se um parâmetro importante para a seleção de leveduras para produção de cerveja.

1.3.3 Toxinas *Killer*

Existem uma vasta variedade de substância antimicrobianas que são produzidas tanto por micro-organismos eucariotos como procariotos, com o intuito de dominar certos tipos de ambiente, matando ou inibindo o crescimento de micro-organismos competidores. Dentro desse contexto, as chamadas toxinas *Killer* são proteínas ou glicoproteínas de baixa massa molar capazes de atuar sobre outras células e inibir o crescimento de leveduras sensíveis (SCHAFFRATH et al., 2018).

O fenótipo *Killer* foi descrito pela primeira vez por Bevan e Makower (1963) em linhagens de *S. cerevisiae* aplicadas nos processos de produção de vinho e cerveja. Atualmente, baseadas em suas propriedades de atuação e na falta de imunidade cruzada, quatro tipos diferentes de toxinas *Killer* são descritas na literatura para *S. cerevisiae*, K1, K2, K28 e Klus. Cada um desses tipos mostra atividade contra linhagens não *Killer*, assim como linhagens *Killer* pertencentes a outro grupo, enquanto que está protegida e imune contra sua própria toxina (BECKER; SCHMITT, 2018).

Em *S. cerevisiae*, o fenótipo *Killer* é determinado pela presença duas cadeias de RNA de dupla fita (dsRNA). Uma cadeia menor chamada de M dsRNA que codificada a toxina *Killer* e que também torne seu hospedeiro imune a toxina e uma cadeia maior chamada de L dsRNA presente também em linhagens não *Killer* que dará origem ao capsídeo que irá encapsular ambas as formas de dsRNA produzindo partículas do tipo *virus-like* (HAMMOND; ECKERSLEY, 1984). As leveduras podem ser divididas em três fenótipos distintos com relação às toxinas *Killer*: *Killer*, neutra ou sensível. Linhagens *Killer* produzem a toxina extracelular capaz de matar linhagens do tipo sensíveis, enquanto que linhagens neutras não são capazes de produzir essa toxina e nem são afetadas por ela (EL-BANNA et al., 2011).

Para a aplicação de leveduras em processos industriais como a produção de cerveja, torna-se promissora a utilização de leveduras do tipo *Killer*. Fermentações em larga escala estão sempre sujeitas a contaminações e, a utilização de uma levedura do tipo *Killer* poderia auxiliar contra a presença de micro-organismos contaminantes (HAMMOND; ECKERSLEY, 1984).

1.4 METABOLIZAÇÃO DE α -GLICOSÍDEOS

Para ser possível a utilização da maltose pelas leveduras *Saccharomyces*, essas devem possuir no mínimo um dos cinco *loci* *MAL*, encontrados em diferentes cromossomos: *MAL1* (cromossomo VII), *MAL2* (cromossomo III), *MAL3* (cromossomo II), *MAL4* (cromossomo VI) e *MAL6* (cromossomo VIII). Cada um desses *locus* contém geralmente os três genes necessários para a metabolização de maltose. Outros alelos já foram descritos, que além de conter uma cópia de cada um dos três genes necessários para a metabolização de maltose, possuem cópias extras de um ou mais genes *MAL* (CHARRON et al., 1989; HORÁK, 1997; MICHELS et al., 1992).

Entretanto, existem também outros alelos *MAL* parcialmente funcionais descritos na literatura (*locus malg*, *malp* e *mal⁰*). O alelo *malg* possui os genes que codificam o transportador e a α -glicosidase, o alelo *malp* possui apenas o gene que codifica a proteína reguladora MalRp, enquanto que o alelo *mal⁰* possui apenas o gene que codifica a α -glicosidase (NAUMOV et al., 1994).

O gene responsável pela captação do carboidrato (*MALx1*, onde “x” corresponde ao número do *locus* correspondente) codifica uma permease específica que permite a entrada do carboidrato dentro da célula. O gene responsável pela clivagem do carboidrato codifica a α -glicosidase (maltase, E.C. 3.2.1.20, ou isomaltase, E.C. 3.2.1.10) citoplasmática, que atua diretamente na clivagem de diversos carboidratos, como por exemplo, a maltose, em duas moléculas de glicose a partir da ação de uma maltase, as quais serão direcionadas para a via glicolítica. E o gene responsável pela proteína reguladora (*MALx3*), que na presença de maltose induz a transcrição dos dois genes, vai até o núcleo da célula e se liga em uma região específica da região promotora UAS_{mal} localizada entre as sequências dos genes responsáveis pela α -glicosidase e o transportador (NEEDLEMAN, 1991).

Destaca-se que a indução dos genes *MALx1* e *MALx2* pela proteína ativadora MalRp ocorre em trans e, portanto, depende da presença de qualquer alelo *MALx3* funcional em qualquer *locus MAL* (MICHELS; NEEDLEMAN, 1984; NEEDLEMAN; MICHELS, 1983). Além da indução, existe a repressão dos genes *MAL* pela glicose. A presença desse carboidrato ativa a proteína Mig1p, a qual se liga em uma região específica da região promotora UAS_{mal}, impedindo a expressão gênica do transportador e da α -glicosidase (HORÁK, 1997).

Um *locus MAL* completo, além de possuir pelo menos uma cópia de cada um dos três genes (*MALx1*, *MALx2* e *MALx3*) ainda compartilha uma região intergênica específica localizada entre a sequência *MALx1* e a *MALx2*, na qual os dois genes são transcritos em sentidos opostos (Figura 2). Essa região possui duas caixas TATA, as quais desempenham um importante papel na maquinaria de transcrição de genes (BASEHOER et al., 2004). Dois sítios de ligação do fator de transcrição Mig1, responsável pela inibição da transcrição dos genes em questão, na presença de glicose (HU et al., 1995). Uma região de 147 pb, a qual pode sofrer ampliações em *tandem*, acredita-se possuir como função diminuir a expressão do transportador em função da menor expressão da α -glicosidase, evitando assim, possíveis efeitos tóxicos provenientes da sobre expressão do gene transportador (BELL et al.,

1997). A região intergênica entre a sequência da α -glicosidase e do transportador pode ser regulada por dois sistemas distintos, governados por diferentes fatores de transcrição, *MAL13*, *MAL33* e *YFL052W* que são expressos na presença de palatinose e *MAL63* que é expresso na presença maltose, maltotriose, turanose, α -metil-glicosídeo, isomaltose, sacarose e palatinose (BROWN et al., 2010). Nesse caso, os fatores de transcrição expressos pelo gene *MAL63*, tipicamente se ligam a sequências específicas de três nucleotídeos ricas em “GC” separadas por um espaçador de comprimento fixo. Esse sítio é formado por três sequências próximas CGC(9N)CGN, enquanto que o sítio de ligação para o fator de transcrição expresso pelos genes *MAL13*, *MAL33* e *YFL052W* é formado por apenas uma sequência CGG(9N)CGG (POUGACH et al., 2014).

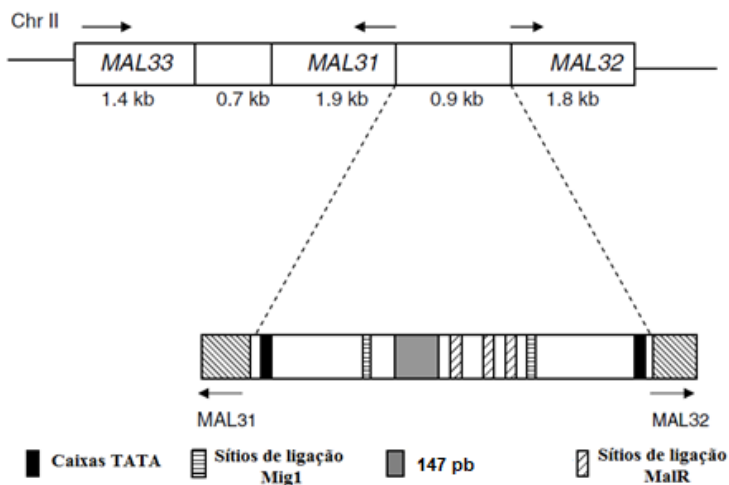


Figura 2 – Estrutura do locus *MAL3* de *Saccharomyces cerevisiae* (na linhagem S288C). Três genes estão localizados no locus *MAL3*, o regulador (*MAL33*), a permease (*MAL31*) e a maltase (*MAL32*). A região promotora entre *MAL31* e *MAL32* é mostrada em detalhes, possuindo duas caixas TATA, dois sítios de ligação da proteína Mig1, três sítios de ligação da proteína MalR e uma região de 147 nucleotídeos que pode sofrer amplificação em *tandem*.

Fonte: Adaptado de Vidgreen et al., (2011).

Os genes encontrados nos loci *MAL* possuem alto grau de homologia entre eles, entretanto, ainda existe enorme variabilidade com

relação a suas sequências e especificidades devido ao fato desses genes serem teloméricos. Existem diversos alelos diferentes que determinam fenótipos distintos, como por exemplo, as linhagens *MAL* induzíveis e as linhagens *MAL* constitutivas, sendo essa altamente desejável nas linhagens de cervejaria e panificação (MICHELS; NEEDLEMAN, 1984).

Os genes *MAL* possuem uma enorme variação no seu número de cópias entre as espécies de leveduras, inclusive entre as próprias linhagens, variando também na sua especificidade pelos substratos. A linhagem laboratorial S288C de *S. cerevisiae*, sequenciada em 1996, possui quatro sequências para reguladores *MAL* distintos (*MAL13*, *MAL33*, *YFL052W* e *YPR196W*), quatro sequências para transportadores *MAL* (*MAL11*, *MAL31*, *MPH2* e *MPH3*) e sete diferentes α -glicosidases (*MAL12*, *MAL32*, *IMA1-IMA5*). *Yarrowia lipolytica* possui apenas um regulador e um transportador *MAL*, *Schizosaccharomyces pombe* apenas uma α -glicosidase da família *MAL*, e *Kluyveromyces lactis* possui dois transportadores e duas α -glicosidases da família *MAL*. Existem ainda diversas leveduras que não possuem nenhum gene da família *MAL* e não conseguem fermentar maltose e maltotriose, como por exemplo, *Candida glabrata* e *Aphis gossypii*, as quais também já possuem seu genoma sequenciado (BROWN et al., 2010).

Em *S. cerevisiae* já foram encontrados pelo menos três tipos de transportadores de maltose e maltotriose atuando de maneira distinta nas células: *MALx1* que codifica uma permease de alta afinidade para maltose (K_m 2-4 mmol/L), o qual também consegue transportar turanose; a permease *AGT1* (permease com 57% de similaridade com os transportadores *MALx1*) que transporta diversos α -glicosídeos e tem alta afinidade (K_m 8 mmol/L) para trealose e sacarose e baixa afinidade ($K_m \geq 20$ mmol/L) para maltose, maltotriose e α -metil-glicosídeo; e dois alelos *MPH2* e *MPH3* (genes com 75 e 55% de homologia para genes *MALx1* e *AGT1*, respectivamente), que mostram capacidade de transportar apenas turanose (ALVES-JR et al., 2007; BROWN et al., 2010; STAMBUK; DE ARAUJO, 2001).

Com relação às α -glicosidases em *S. cerevisiae*, uma sequência ancestral, promíscua, que possuía baixa atividade de hidrólise, porém para diversos carboidratos diferentes, evoluiu no decorrer do tempo e deu origem a dois tipos de α -glicosidase (VOORDECKERS et al., 2012). As maltases que hidrolisam carboidratos formados a partir de ligações α 1-4, α 1-3 e α 1-2 e as isomaltases que hidrolisam carboidratos formados a partir de ligações α 1-6 e α 1-2. Destaca-se que tanto as maltases quanto as isomaltases são α -glicosidases que possuem entre 63

e 77% de similaridade entre suas sequências. As maltases Mal12p e Mal32p possuem especificidade para maltose, maltotriose, turanose, maltulose e sacarose. As isomaltases possuem especificidade para outros carboidratos, como por exemplo, palatinose, isomaltose, sacarose e α -metil-glicosídeo. Dentro desse grupo *IMA2* e *IMA3* apresentam apenas 3 aminoácidos distintos entre as proteínas codificadas por esses dois últimos genes, *IMA4* possui 100% de similaridade com *IMA3* enquanto que *IMA5* possui 66% de similaridade com o restante do grupo. (BROWN et al., 2010; DENG et al., 2014; NAUMOV; NAUMOV, 2012; TESTE et al., 2010).

O presente trabalho avaliou o consumo de maltose, maltotriose, trealose, α -metil-glicosídeo, sacarose, melibiose, melezitose e rafinose (Figura 3), assim como a respectiva capacidade de hidrólise desses carboidratos pela levedura de *Sp. arborariae*. Visou-se identificar, através de ferramentas de bioinformática, os possíveis genes da família *MAL* envolvidos no transporte e hidrólise desses carboidratos. Testou-se também a aplicação dessa linhagem no processo de produção de cerveja, com relação à fermentação do mosto cervejeiro e a fatores de seleção para a aplicabilidade dessa levedura nesse processo.

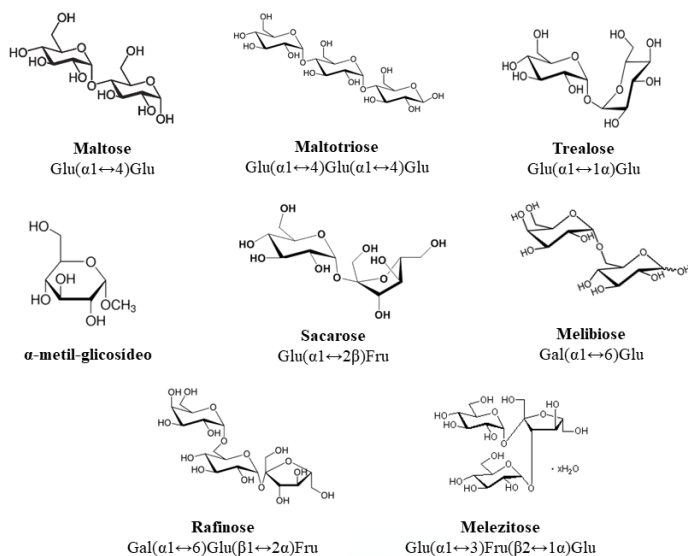


Figura 3 – Estrutura química da maltose, maltotriose, trealose, α -metil-glicosídeo, sacarose, melibiose, melezitose e rafinose.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar fenotipicamente e a nível molecular a utilização de maltose, maltotriose, α -metil-glicosídeo, trealose, melezitose, melibiose, rafinose e sacarose, assim como a possível aplicação no processo de produção de cerveja da levedura *Sp. arborariae*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a cinética fermentativa (velocidade específica máxima de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol) a partir da utilização de maltose, maltotriose, α -metil-glicosídeo, trealose, melezitose, melibiose, rafinose e sacarose pela levedura de *Sp. arborariae*.
- Testar e caracterizar a aplicação da linhagem de *Sp. arborariae* para produção de cerveja.
- Analisar a capacidade de flocculação, produção de sulfeto de hidrogênio e fator *Killer* pela levedura *Sp. arborariae*.
- Identificar, através de ferramentas de bioinformática, os possíveis genes de α -glicosidasas e transportadores de *S. arborarie* relacionados aos genes da família *MAL*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS UTILIZADAS

Nesse trabalho, como objeto de estudo foi utilizada a linhagem de *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A^T isolada de madeira em decomposição em Minas Gerais, Brasil, por Cadete et al. (2009). Para comparação utilizou-se em fermentações paralelas do mosto cervejeiro a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* comercial (SafAleTM US-05, Fermentis, Marcq-en-Baroeul, França). Para as análises referentes às toxinas *Killer* utilizaram-se as linhagens CCT 2369 *Pichia anomala* fator *Killer* K4, CCT 3437 *Candida kefir* fator *Killer* neutra, CCT 0765 *S. cerevisiae* fator *Killer* sensível, CCT 0761 *S. cerevisiae* fator *Killer* K2 e a linhagem comercial oriunda da Perlage[®] BB *S. cerevisiae* fator *Killer* positiva.

3.2 CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO EM MICROESCALA

Os pré-cultivos das leveduras foram realizados em tubos contendo 3 mL de meio YP base ou YNB, acrescidos de 2% de glicose, por 48 horas, com agitação constante de 160 rpm a 28 °C em agitador INNOVA 44 (New Brunswick Scientific). Posteriormente, os cultivos foram realizados em micro placas de 96 poços utilizando-se meio YP ou YNB com 2% da fonte de carbono desejada (maltose, maltotriose, α -metil-glicosídeo, trealose, melezitose, melibiose, rafinose, sacarose) e DO_{600nm} inicial de 0,1. A fim de evitar a contaminação e/ou evaporação as placas foram seladas com AccuClear Sealing Film for qPCR (E & K Scientific), objetivando condições de crescimento limitadas por oxigênio (microaeróbias). As placas foram incubadas a 28°C e 160 rpm por até 48 h em um leitor multifuncional (TECAN ECHISTO INFINITE M200 PRO) e o crescimento celular determinado pela medida da densidade ótica (DO_{600nm}) a cada 15 minutos. Ao final do cultivo as placas foram congeladas a -20 °C para posterior análise do etanol produzido.

3.3 CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO

Os crescimentos foram realizados com DO_{600nm} inicial de 0,1 das células pré-cultivadas em meio YP ou YNB, contendo 20 g/L de glicose, em erlenmeyers de 250 mL, cada um contendo 50 mL de meio YP ou

YNB e uma fonte de carbono diferente (maltose, maltotriose, α -metilglicosídeo, trealose, melezitose, melibiose, rafinose, sacarose), incubados como descrito anteriormente. Os ensaios foram realizados durante 60 horas e alíquotas dos meios foram retiradas em intervalos predeterminados. Essas alíquotas foram utilizadas para analisar a densidade celular (a 600 nm), consumo de carboidratos e produção de etanol.

Fermentações utilizando-se extrato de malte com concentração inicial de 10 °Brix a fim de simular o mosto cervejeiro foram feitas em reatores de 50 mL com volume útil de 45 mL variando-se agitação e temperatura. As células foram pré-cultivadas no próprio mosto e as fermentações iniciaram com uma concentração de 7×10^6 UFC/mL e duraram até 168 horas. Para comparação, utilizou-se em fermentações paralelas uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial (SafAle™ US-05, Fermentis, Marcq-en-Baroeul, França). Por fim, alíquotas dos meios foram retiradas em intervalos predeterminados para analisar a densidade celular (a 600 nm), consumo de carboidratos e produção de etanol.

3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE α -GLICOSIDASE

A atividade da α -glicosidase foi determinada como descrito por Stambuk (1999). Os pré-cultivos das leveduras foram realizados *overnight* em meio YP com 2% do carboidrato de interesse, a 28 °C e 160 rpm, com posterior centrifugação a 2600 g durante 3 minutos para a separação das células.

Para a permeabilização das células de leveduras, cada amostra dos cultivos (1 mL) foi centrifugada a 2600 g durante 1 minuto, as células foram lavadas uma vez com água destilada gelada e uma vez com 100 mM MOPS-NaOH, pH 6,8 (tampão A) à 4 °C, e suspenso em 0,2 mL do mesmo tampão, contendo 20% glicerol (v/v), 1 mM EDTA E 1 mM ditiotreitól. Depois de adicionar 12 μ L tolueno/etanol/10% Triton X-100 em água (1:4:1, em volume), as células foram vigorosamente agitadas durante 1 minuto, centrifugadas, lavadas com tampão A e finalmente ressuspendidas em 1 mL do mesmo tampão.

A partir dessa suspensão 40 μ L foram adicionados a 60 μ L de cada um dos carboidratos a serem testados, na concentração final de 100 mM. A seguir cada uma dessas amostras foi incubada a 30 °C durante 30 minutos e posteriormente fervidas durante 3 minutos a 100°C. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas e os respectivos controles

em duplicata com células previamente fervidas (10 minutos). A atividade de hidrólise foi expressa em nmol de glicose liberada (mg de células de leveduras secas)⁻¹ min⁻¹, o qual foi mensurado a partir de um kit comercial de glicose oxidase e peroxidase da marca Bioclin® (CasaLab, Belo Horizonte Brasil).

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA INVERTASE EXTRACELULAR

A atividade da invertase extracelular foi determinada como descrito por Silveira et al. (1996). Os pré-cultivos das leveduras foram realizados *overnight* em meio YP com 2% de sacarose, a 28 °C e 160 rpm, com posterior centrifugação a 5000 g durante 5 minutos para a separação das células. As células foram lavadas 3 vezes com água destilada a 4 °C e ressuspensas na concentração de 20 mg/mL. Aliquotas de 100 uL da suspensão celular foram incubadas durante 30 minutos a 30 °C com 100 uL de 150 mM de Succinato – Tris pH 5,0; 150 mM de NaF. Após o término do tempo foi adicionado 100 uL de 300 mM de sacarose e as amostras foram incubadas a 30 °C durante 5 minutos. Por fim esfriaram-se os tubos em gelo (3 minutos), com posterior centrifugação a 5000 g durante 5 minutos para dosagem da glicose liberada a partir de um kit comercial de glicose oxidase e peroxidase da marca Labtest (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Todas as amostras foram realizadas em triplicatas e os respectivos controles em duplicata com células previamente fervidas (10 minutos). A atividade de hidrólise foi expressa em nmol de glicose liberada (mg de células de leveduras secas)⁻¹ min⁻¹.

3.6 PRODUÇÃO E FERMENTAÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO

O mosto cervejeiro foi preparado com e sem adição de lúpulo. Foi utilizado 1 kg de malte Pilsen (Agrária Malte, Guarapuava, Brasil) para cada mosto, que passou pelo processo de moagem em um moinho de discos com abertura de 1 mm entre os discos, visando aumentar a área de contato do grão. Posteriormente o malte moído foi adicionado de 3 litros de água e utilizado as seguintes rampas de temperatura para o processo de mosturação: 53 °C durante 15 minutos, 64 °C durante 45 minutos, 70 °C durante 20 minutos e 78 °C durante 15 minutos. Em seguida foi realizada a operação de filtração utilizando a torta formada pelo bagaço de malte. Durante a etapa de fervura, que teve 60 minutos

de duração, foi adicionado 3 gramas de lúpulo (Lúpulo Hallertau Tradition, Barth Haas Group, Faddock Wood, Reino Unido) em um dos mostos. Os mostos fervidos passaram pela etapa de clarificação durante 40 minutos à temperatura ambiente para separação do *trub*.

As fermentações ocorreram em reatores de 1 L com volume útil de 500 mL sem agitação e com temperatura constante à 19 °C. As células foram pré-cultivadas no próprio mosto e as fermentações iniciaram com uma concentração de 7×10^6 UFC/mL e duraram até 168 horas. Para comparação utilizou-se em fermentações paralelas uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial (SafAle™ US-05, Fermentis, Marcq-en-Baroeul, França). Por fim, alíquotas dos meios foram retiradas em intervalos predeterminados para analisar a densidade celular (a 600 nm), consumo de carboidratos e produção de etanol.

3.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS, ETANOL E OUTROS METABÓLITOS

Para determinação do etanol produzido no crescimento em microescala, as enzimas álcool oxidase (Sigma) e peroxidase (Toyobo do Brasil) foram utilizadas conforme previamente descrito por Salgado et al. (2000). Para essa determinação, 10 µL de amostra de cada crescimento foi incubado com 200 µL do reagente enzimático contendo 0,5 U/mL de álcool oxidase, 4 U/mL de peroxidase, 14 mM de 4-aminoantipirina e 60 mM de fenol em tampão 0,1 M fosfato de sódio. As amostras foram incubadas com o reagente enzimático por 1 h à 28 °C em leitor de placas TECAN Infinite® M200 Pro, onde ao longo da incubação, cada poço terá sua absorbância a 600 nm determinada pelo leitor. A concentração de etanol em cada poço será determinada através da correlação do valor de absorbância obtido com a equação da reta extraída de uma curva padrão previamente construída com soluções padrão de etanol (0-10 g/L).

As concentrações dos carboidratos, assim como do etanol dos cultivos em frasco sob agitação e da fermentação em batelada simples serão determinadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC – Jasco XLC), com detector por índice de refração (RI 2031 plus – Jasco) e coluna para ácidos orgânicos (Aminex HPX-87H Column – Bio-rad). A fase móvel utilizada será de 5,0 mM de ácido sulfúrico à 50 °C com fluxo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ durante 30 minutos. Com exceção da sacarose, que para sua quantificação será utilizada a coluna para ácidos orgânicos (Aminex HPX-87P Column – Bio-rad) utilizando-se água

milliQ como fase móvel à 85 °C com fluxo de 0,6 mL min⁻¹ durante 30 minutos. As curvas de calibração serão previamente estabelecidas para todas as amostras analisadas utilizando-se quatro concentrações diferentes, na faixa de 0,5 a 20,0 g/L.

3.8 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO

A velocidade máxima de crescimento, representada por μ_{\max} (em d⁻¹), foi determinada de acordo com Doran (1995) através da regressão exponencial das curvas de crescimento. O valor de μ_{\max} é o coeficiente b da Equação 1.

$$Y = a.e^{b.x} \quad (1)$$

3.9 FLOCULAÇÃO

As linhagens foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio YPD e foram incubadas a 28 °C por 48 horas sem agitação. Transcorrido o período da incubação, a cultura depositada no fundo do tubo foi homogeneizada com meio de cultura em agitador do tipo Vortex e a avaliação consistiu na visualização dos flocos suspensos no meio de cultura de acordo com Suzzi et al. (1984).

3.10 PRODUÇÃO DE H₂S

Para a detecção de traços de H₂S as leveduras foram plaqueadas em duplicata utilizando-se o meio Agar Sulfito de Bismuto (BSA) durante 48 h, de acordo com Jiranek et al. (1995). As leveduras que não produziram H₂S formaram colônias brancas, enquanto que as leveduras produtoras de H₂S formaram colônias com colorações que variaram desde marrom claro a preto dependendo da intensidade da produção de H₂S.

3.11 TOXINAS KILLER

Para verificar o nível de sensibilidade e a expressão da toxina pela linhagem de *Sp. arborariae*, um volume de inóculo da levedura na concentração de 10⁵ células por mL foi espalhado utilizando-se uma alça de Drigalsky sobre o meio de cultura YPD + 0,003% de azul de metileno em placas de Petri de acordo com Petering et al. (1991). Em

paralelo foi feito o mesmo inóculo utilizando-se uma linhagem sensível ao fator *Killer*. Em seguida foi realizada a inoculação pontual no meio de cultura de leveduras *Killer*, neutras e sensíveis quanto ao fator *Killer* já previamente identificadas, assim como da linhagem de *Sp. arborariae* no caso da placa que foi inoculada com a levedura de fator *Killer* sensível. As placas foram incubadas por 6 dias a 28 °C em duplicatas e analisadas quanto a formação de halos claros ao redor da região inoculada pontualmente, indicando ausência de crescimento da levedura sensível padrão ou daquelas em análise, além de um círculo azul escuro entre o halo e a região de crescimento da levedura sensível, indicando a morte das leveduras. As leveduras foram classificadas como *Killer*, sensível ou neutra quanto à interação entre os isolados.

3.12 SELEÇÃO DE GENES PARA TRANSPORTADORES DE CARBOIDRATOS E α -GLICOSIDASES

A partir do genoma.1; da espécie *Sp. arborariae* (LOBO *et al.*, 2014) foram identificados possíveis genes da família *MAL* que codifiquem transportadores e α -glicosidases. A busca foi feita no banco de dados do site NCBI, através da ferramenta BLASTp (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), procurando-se no genoma dessa levedura por genes com homologia a transportadores e α -glicosidases da família de genes *MAL* já conhecidos. Após a localização dos *contigs* que possuíssem tais genes, foi utilizado o Software ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>) para a tradução dessas sequências em suas respectivas ORF's (open reading frame), as quais foram mais uma vez analisadas através da ferramenta BLASTp para a confirmação da possível identidade dessas ORF's com os genes de interesse. Análises adicionais utilizando ferramentas de bioinformática como TMpred (http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html) foram utilizadas para identificar a presença dos 12 segmentos transmembrana, presentes em todos os transportadores de carboidratos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE EM MICROESCALA DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ETANOL DA LINHAGEM DE *Sp. arborariae* UFMG-HM19.1A^T

Como forma de pré-avaliar a capacidade da *S. arborariae* UFMG-HM19.1A^T de crescer e fermentar diversos α -glicosídeos, as Figuras 4 e 5 apresentam as curvas de crescimento em microescala da linhagem de *Sp. arborariae* UFMG-HM19.1A^T, em meio YP e YNB + 2% dos diferentes carboidratos testados nesse trabalho. Sem a adição de carboidrato a levedura é capaz de se desenvolver e multiplicar utilizando apenas a fonte de carbono presente nesses meios, que no caso do meio YP seria o extrato de levedura. A fim de avaliar o crescimento da levedura em função apenas do carboidrato utilizado, foi realizada a comparação da curva de crescimento utilizando diferentes carboidratos, com a curva adicionada apenas de água em ambos os meios.

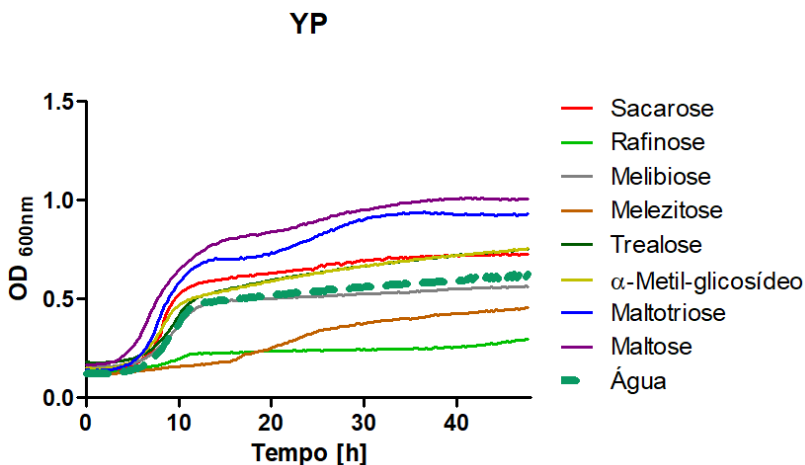


Figura 4 – Crescimento em microescala da levedura *Sp. arborariae* em meio YP com diferentes carboidratos na concentração de 2% a 28 °C sem agitação. A linha tracejada representa o meio YP sem adição de carboidrato

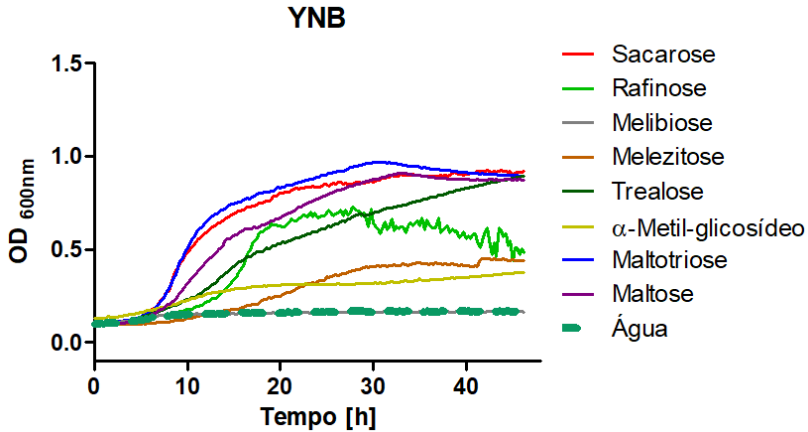


Figura 5 – Crescimento em microescala da levedura *Sp. arborariae* em meio YNB com diferentes carboidratos na concentração de 2% a 28 °C sem agitação. A linha tracejada representa o meio YNB sem adição de carboidrato

Analisando a Tabela 2, pôde-se observar a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) dessa linhagem, em meios YP e YNB, com adição de todos os carboidratos testados e nos meios sem adição de carboidrato. Em ambos os casos, a levedura mostrou desempenho inferior ou similar ao controle para melezitose e melibiose, indicando a incapacidade dessa linhagem de utilizar estes carboidratos. Com relação à trealose, rafinose e α -metil glicosídeo em meio YP, o desempenho de crescimento da levedura foi inferior ou igual à do tratamento controle, entretanto, em meio YNB, apesar da diferença ser baixa, a levedura mostrou capacidade de utilizar esses carboidratos. Maltose, maltotriose e sacarose mostraram valores de velocidade específica máxima de crescimento superiores ao grupo controle em ambos os casos, indicando alta capacidade dessa linhagem de utilizar estes carboidratos, principalmente em meio YNB, no qual a diferença destes valores mostra-se maior em relação a curva que não continha adição de carboidrato ao meio.

Os resultados obtidos corroboram com os dados qualitativos reportados por Cadete et al. (2009), que já haviam verificado a capacidade desta linhagem de assimilar maltose, sacarose e trealose e, a incapacidade da mesma de assimilar melibiose e melezitose. Entretanto, o mesmo estudo afirmou que a levedura não seria capaz de assimilar

rafinose, diferente do resultado obtido em meio YNB, como já discutido anteriormente.

Tabela 2 – Valores de $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}) da levedura *Sp. arborariae* em meio YP e YNB com diferentes carboidratos na concentração de 2%.

Carboidrato	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	
	YP	YNB
Maltose	0,23	0,19
Maltotriose	0,26	0,26
α -Metil-glicosídeo	0,21	0,07
Trealose	0,17	0,10
Melezitose	0,02	0,06
Melibiose	0,16	0,06
Rafinose	0,07	0,08
Sacarose	0,23	0,26
Controle (sem adição de carboidrato)	0,21	0,06

A Tabela 3 apresenta os valores de produção de etanol pela levedura *Sp. arborariae*, em meio YP e YNB, obtidos com os diferentes carboidratos testados. Em ambos os meios, a levedura foi capaz de produzir etanol a partir dos mesmos carboidratos, com exceção apenas da trealose, a qual foi fermentada somente em meio YNB. Isso pode ser atribuído às diferentes condições aplicadas em função do meio. O meio YP, por ser um meio com teor relativamente alto em nutrientes, é provável que a levedura tenha utilizado apenas os nutrientes presentes no meio para seu crescimento e não tenha utilizado a trealose disponível, corroborando com dados mostrado na Tabela 2. Logo, não houve consumo desse carboidrato nem produção de etanol. Em meio YNB, por ser um meio com baixo teor de nutrientes, como única opção de crescimento, é provável que a levedura tenha sido obrigada a utilizar a trealose disponível. Apesar deste consumo não ter se mostrado muito eficiente de acordo com a Tabela 2, a levedura ainda assim demonstrou capacidade de consumir esse carboidrato e produzir etanol a partir dele. Dentre os carboidratos, houve diferença na produção de etanol em função do meio utilizado. Em meio YP, a maior produção de etanol ocorreu a partir de maltose (5,7 g/L), já em meio YNB, a maior produção foi utilizando maltotriose (3,59 g/L), sendo esses os principais

carboidratos do mosto cervejeiro. Tais resultados corroboram com os dados obtidos por Cadete et al. (2009), que já haviam verificado a capacidade desta levedura de fermentar maltose.

Tabela 3 – Capacidade de produção de etanol da linhagem de *Sp. arborariae* em meio YP e YNB com diferentes carboidratos na concentração de 2%.

Carboidrato	Etanol (g/L)	
	YP	YNB
Maltose	5,7	1,65
Maltotriose	2,67	3,59
α -Metil-glicosídeo	2,05	2,81
Trealose	0	2,86
Melezitose	0	0
Melibiose	0	0
Rafinose	0	0
Sacarose	1,92	3,01

4.2 ANÁLISE DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ETANOL DA LINHAGEM DE *Sp. arborariae*

Todos os carboidratos que a *Sp. arborariae* foi capaz de utilizar para a produção de etanol nos experimentos em microescala foram selecionados para uma ampliação de escala. A ampliação de escala ocorreu em erlenmeyers de 250 mL de volume com 50 mL de meio YP e YNB com 2% dos carboidratos selecionados. Entretanto, em função da mudança de escala e da aerobiose, a *Sp. arborariae* foi capaz de produzir etanol apenas em meio YP. Sendo este um dos focos do trabalho, apenas este meio foi selecionado para os experimentos seguintes. A Figura 6 apresenta o cultivo desta linhagem em erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio YP com 2% dos carboidratos selecionados a 28 °C e com agitação de 160 rpm.

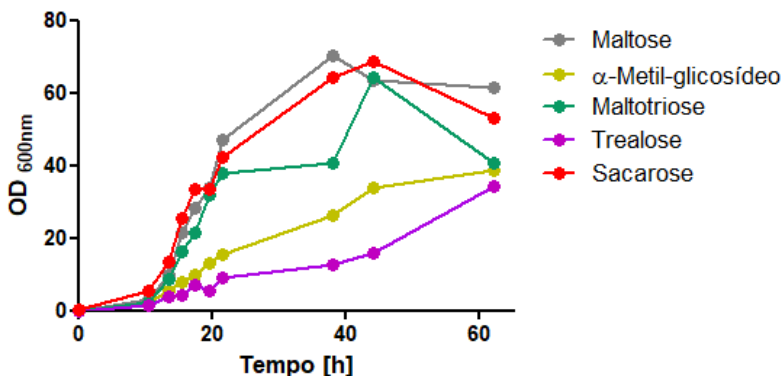


Figura 6 – Cultivo da linhagem de *Sp. arborariae* em meio YP com diferentes carboidratos na concentração de 2% a 28 °C e 160 rpm.

A linhagem foi capaz de se crescer em todos os carboidratos testados. Maltose, maltotriose e sacarose foram rapidamente consumidos até a 20^a hora de cultivo (Figura 7). Com relação ao α -metil-glicosídeo, o mesmo foi totalmente consumido apenas em torno de 40 h de cultivo. Entretanto, a linhagem mostrou-se incapaz de consumir totalmente a trealose até o tempo de 60 horas. Todos os resultados gerados nessa ampliação de escala corroboram com os dados obtidos anteriormente, os quais demonstram valores de $\mu_{\text{máx}}$ maiores que o meio adicionado apenas de água para maltose, maltotriose e sacarose, $\mu_{\text{máx}}$ similar ou inferior ao do para α -metil-glicosídeo e trealose, evidenciando a menor capacidade de utilização desses carboidratos por esta linhagem (Tabela 2).

Com relação à produção de etanol, a Figura 8 mostra que nas condições testadas, esta linhagem foi capaz de produzir etanol apenas a partir de maltose, maltotriose e sacarose. Esses carboidratos foram aqueles para os quais a linhagem apresentou maior velocidade máxima específica de crescimento nos experimentos anteriores (Tabela 2). A maior concentração de etanol foi atingida em torno das 20 h de cultivo, independente do tipo de carboidrato. Após esse tempo, o etanol foi totalmente consumido, visto que os carboidratos utilizados como fonte de carbono foram totalmente consumidos em torno das 20 h de cultivo. Isto ocorre devido ao término da repressão promovida pela presença da fonte de carbono, permitindo que as leveduras passem a respirar os produtos da fermentação, neste caso o etanol (LEWIS et al., 1993).

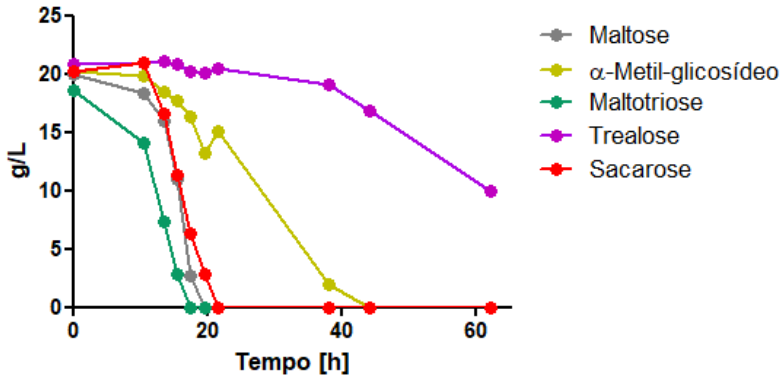


Figura 7 – Consumo dos diferentes carboidratos (2%) em meio YP pela levedura *Sp. arborariae* a 28 °C e 160 rpm.

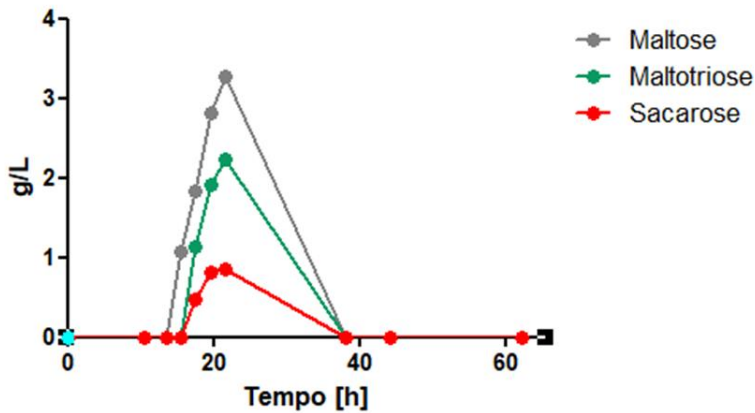


Figura 8 – Produção de etanol pela levedura *Sp. arborariae* em meio YP com diferentes carboidratos (2%) a 160 rpm e 28 °C.

4.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE α -GLICOSIDASE DA LEVEDURA *Sp. arborariae* APÓS CRESCIMENTO EM DIFERENTES CARBOIDRATOS

A atividade enzimática foi determinada com células permeabilizadas da linhagem de *Sp. arborariae* pré-cultivadas nos

α -glicosídeos selecionados a partir do item 4.1 (Tabela 4). As células pré-cultivadas em maltose mostraram capacidade de hidrólise de maltose, maltotriose, melibiose, melezitose, sacarose, rafinose e trealose. As células pré-cultivadas em sacarose apresentaram capacidade de hidrólise para maltose, maltotriose e sacarose. As células pré-cultivadas em α -metil-glicosídeo mostraram atividade de hidrólise de maltose, maltotriose, melibiose, sacarose, trealose e α -metil-glicosídeo, enquanto que as células pré-cultivadas em trealose não apresentaram atividade de hidrólise para nenhum dos carboidratos testados.

Para a hidrólise de maltose, maltotriose e sacarose já foi descrito para *S. cerevisiae* que as maltases Mal12p e Mal32p possuem atividade de hidrólise para esses carboidratos, indicando a possível presença de uma α -glicosidase similar nessa linhagem. As maltases Mal12p e Mal32p também possuem capacidade de hidrólise para ligações do tipo α 1-3, sendo capazes de hidrolisar também a melezitose, a qual é um trissacarídeo [Glu(α 1-3 β)Fru(β 2-1 α)Glu]. Essa hidrólise resulta na liberação de uma molécula de glicose e uma de sacarose, que também pode ser hidrolisada por esse tipo de enzima (BROWN et al., 2010).

A melibiose [Gal(α 1-6 α)Glu] e rafinose [Gal(α 1-6 α)Glu(α 1-2 β)Fru] possuem uma ligação do tipo α 1-6 entre uma galactose e uma glicose. Nesse caso, para a hidrólise dessa ligação se faz necessário à enzima α -D-galactosidase (EC 3.2.1.22), provavelmente também presente nessa linhagem (LAHUTA et al., 2000). A rafinose depois de clivada pela ação dessa enzima libera uma molécula de galactose e uma de sacarose que também pode ser clivada pela ação de uma α -glicosidase como já discutido anteriormente. É importante destacar que no caso da sacarose ainda existe a possibilidade dessa molécula ser clivada a partir da ação de invertase (E.C. 3.2.1.26), liberando uma molécula de glicose e uma de frutose, como descrito para *S. cerevisiae* (MARQUES et al., 2006).

Ao se referir as maltases e isomaltases, presentes nos *loci* MAL, como já descrito anteriormente, faz-se necessário um gene regulador que, na presença de determinados carboidratos, codifica a proteína MalRp que induz a transcrição dessas enzimas. E para *S. cerevisiae* já foi descrito reguladores *MALx3* que respondem a presença de maltose, sacarose e α -metil-glicosídeo, usados no pré-cultivo das células para a atividade de hidrólise (BROWN et al., 2010).

Para a hidrólise da trealose já foi descrito para *S. cerevisiae* a presença de dois sistemas enzimáticos distintos. Uma trealase neutra (com pH ótimo no pH 7) codificada pelo gene *NTH1* (KOPP et al., 1993) e uma trealase ácida (com pH ótimo no pH 5) codificada pelo gene *ATH1* (DESTRUELLE et al., 1995). No caso da atividade enzimática realizada nesse trabalho utilizou-se pH 6,8, logo, para a hidrólise desse carboidrato, pode estar presente uma trealase neutra. É importante destacar que esta linhagem mostrou capacidade para consumir trealose (vide acima), onde o pH do meio era 5, indicando a possível presença de uma trealase ácida também que não foi detectada no ensaio a pH 6,8.

As células pré-cultivadas em α -metil-glicosídeo foram às únicas que mostraram atividade de hidrólise para este carboidrato. Em *S. cerevisiae* já foi descrito que para a hidrólise do α -metil-glicosídeo se faz necessário uma isomaltase, indicando a possível presença de uma enzima similar na linhagem testada (DENG et al., 2014).

As células pré-cultivadas em maltose, sacarose e α -metil-glicosídeo mostraram maior capacidade de hidrolisar maltose, dentre os carboidratos testados, atingindo uma atividade de 125 ± 32 , $708,\pm 39$ e 394 ± 24 nmol/mg_{cel}.min, respectivamente. Stambuk (1999), utilizando *S. cerevisiae* pré-cultivadas em maltose, atingiu em torno de 250 nmol/mg_{cel}.min com 1 h de incubação em maltose. Destaca-se nesse caso, a capacidade semelhante para hidrólise deste açúcar pela linhagem de *Sp. arborariae* quando comparada com *S. cerevisiae*.

Por fim, testou-se ainda a atividade enzimática para invertase extracelular das células pré-cultivadas em sacarose. Nesse caso, não se obteve atividade, indicando a ausência de uma possível invertase extracelular na levedura *Sp. arborariae*.

4.4 APLICAÇÃO DA LEVEDURA *Sp. arborariae* NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA

Visando a possível aplicação da levedura *Sp. arborariae* no processo de produção de cerveja, a mesma foi testada com relação à sua capacidade de fermentar o mosto cervejeiro. A Figura 9 apresenta o consumo dos principais carboidratos presentes no mosto cervejeiro (glicose, maltose e maltotriose), e a produção de etanol durante o crescimento celular da linhagem de *Sp. arborariae* em mosto cervejeiro com e sem lúpulo.

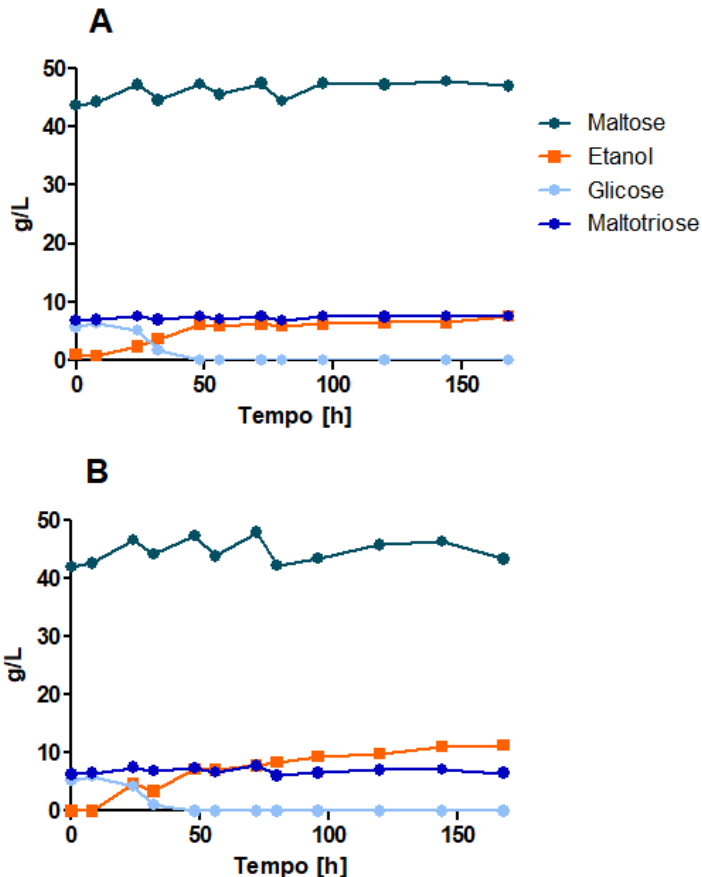


Figura 9 – Fermentação do mosto cervejeiro (11 °Brix) com (A) e sem (B) lúpulo pela levedura *Sp. arborariae* a 19 °C sem agitação.

De acordo com a Figura 9, a presença do lúpulo no mosto alterou levemente a capacidade fermentativa dessa linhagem, atingindo 7,5 g/L de etanol no mosto com lúpulo e 11 g/L de etanol no mosto sem lúpulo, os quais referem-se, respectivamente, aos teores alcoólicos 0,95% e 1,3% v/v. Vale ressaltar que ambos os valores são baixos quando comparados ao teor alcoólico de uma cerveja comercial, em torno de 5% (v/v). A presença do lúpulo não teve efeito no crescimento celular, evidenciado a partir da biomassa ao final da fermentação decantada no fundo do fermentador. Entretanto, devido à formação dos grumos pela floculação desde o terceiro dia de fermentação o acompanhamento do

crescimento celular por densidade óptica não pode ser realizado. A resistência contra os iso- α -ácidos, extraídos do lúpulo e o estresse causado pelos ácidos orgânicos fracos induzidos por este, são um fator importante para a utilização da levedura no mosto cervejeiro, muito estudado em linhagens de *S. cerevisiae*, porém pouco investigado em espécies não convencionais (HAZELWOOD et al., 2010; MICHEL et al., 2016).

Com relação ao consumo dos carboidratos, as leveduras não foram capazes de consumir/fermentar maltose e maltotriose em ambos os cenários, sendo esses carboidratos os mais abundantes no mosto cervejeiro. No âmbito comparativo, a fermentação pela linhagem comercial de *S. cerevisiae* (SafAle™ US-05, Fermentis, Marcq-en-Baroeul, França), nas mesmas condições aplicadas para a linhagem de *Sp. arborariae* está apresentada na Figura 10. Nesse caso, a levedura comercial consumiu totalmente maltose, maltotriose e glicose, produzindo 34,81g/L de etanol no mosto sem lúpulo e 28,87 g/L de etanol no mosto com lúpulo. Esse comportamento é esperado, visto que é uma linhagem comercial amplamente empregada no processo de produção de cervejas. Apesar disso, a linhagem comercial também possui sua capacidade fermentativa um pouco alterada em função do estresse causado pelo lúpulo.

A fermentação foi conduzida a 19 °C, temperatura dentro da faixa utilizada para leveduras do tipo *Ale* (16-22 °C), uma vez que a linhagem de *Sp. arborariae*, por não ser capaz de consumir melibiose (Tabela 3), assemelha-se com esse grupo de leveduras. Entretanto, outras temperaturas necessitam ser testadas, pois a utilização de uma temperatura equivocada é o principal motivo para que uma fermentação não ocorra, principalmente ao se utilizar uma levedura selvagem. Leveduras do tipo *Ale* apresentam temperatura ótima de fermentação desde 16 °C, mas tem espécies que mostram melhor desempenho em temperaturas mais altas (>25 °C), destacando-se ainda que a linhagem de *Sp. arborariae* se mostrou capaz de consumir esses carboidratos (maltose e maltotriose) em temperaturas maiores (28 °C, Figura 7) (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Além disso, pode ter ocorrido também a repressão dos genes MAL, responsáveis pelo consumo de maltose e maltotriose, devido à presença de glicose no mosto cervejeiro (HORÁK, 1997).

Considerando que a maltose e a maltotriose não foram consumidas durante a fermentação pela *S. arborariae*, o rendimento máximo teórico de etanol utilizando apenas a glicose do mosto (concentração inicial em torno de 5,5 g/L), seria de 2,8 g/L. O mosto

cervejeiro possuía inicialmente 11 °Brix, sendo que maltose, maltotriose e glicose representam metade desse valor. Logo, ainda restariam aproximadamente 50 g/L de carboidratos no mosto cervejeiro, sendo uma boa parte composta por sacarídeos maiores não fermentescíveis, como as dextrinas.

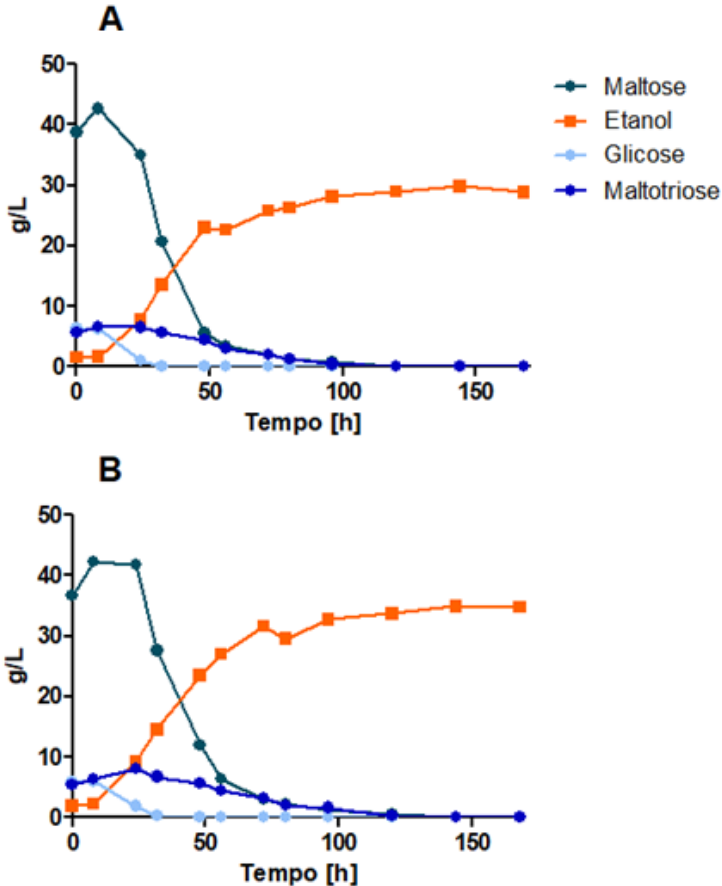


Figura 10 – Fermentação do mosto cervejeiro (11 °Brix) com (A) e sem (B) lúpulo pela linhagem comercial de *S. cerevisiae* (SafAle™ US-05) a 19 °C sem agitação.

A produção de etanol superior ao valor teórico baseado apenas na glicose pode ser um indicativo da ocorrência de fermentação de

sacarídeos menores presentes em baixas concentrações no mosto cervejeiro, como a frutose (0-0,3 °Brix), sacarose (0-0,85 °Brix), maltotetraose (0-0,7 °Brix), entre de outros, não mensurados nas nossas análises em função da complexidade que é o mosto cervejeiro (HE et al., 2014; MACWILLIAM, 1968). É importante destacar que a porcentagem e a presença não apenas desses carboidratos menores, mas de todos os carboidratos fermentescíveis no mosto cervejeiro depende do malte utilizado e, principalmente, das rampas de temperaturas utilizadas no processo de mosturação, as quais são responsáveis por liberar esses carboidratos fermentescíveis no mosto cervejeiro (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Ao final do processo cervejeiro utilizando *S. arborariae*, obtiveram-se cervejas com teor alcoólico de 0,95% e 1,3% (v/v) no mosto com e sem lúpulo, respectivamente. Apesar desses valores estarem bem abaixo do teor alcoólico da maioria das cervejas (~5% v/v) produzidas por linhagens comerciais de *S. cerevisiae*, ainda se enquadram dentro do esperado para cervejas com baixo teor alcoólico ou sem álcool, dependendo da legislação do país. Países como Brasil, Alemanha e Bélgica consideram como cerveja sem álcool aquelas que possuem teor alcoólico menor que 0,5% de etanol (v/v). Itália e França classificam como cervejas sem álcool aquelas com teor alcoólico menor que 1,2% (v/v) (AQUARONE et al., 2001; BRASIL, 1997; FRANCESCO et al., 2018; WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Alguns trabalhos sugerem a utilização de leveduras selvagens incapazes de utilizar maltose e maltotriose para a produção de cervejas com baixo teor alcoólico. Bellut et al. (2018) indicam para a produção de cervejas com baixo teor alcoólico a utilização das espécies *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, *Hanseniaspora vineae*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Torulaspota delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*. Essas leveduras produziram rendimentos de etanol que variaram desde 0,34 até 0,5% (v/v). Michel et al. (2015) sugerem a utilização da espécie *Torulaspota delbrueckii*, a qual produz 0,94% de álcool (v/v). Francesco e colaboradores (2018) sugerem a utilização *Mrakia gelida* a qual produz 1,4% de álcool (v/v). Destaca-se que o teor alcoólico alcançado pela linhagem de *Sp. arborariae* é similar ao alcançado também por linhagens comerciais para a produção de cervejas com baixo teor alcoólico, como por exemplo, a *S. cerevisiae* WLP001 (California Ale yeast®), que mesmo capaz de consumir maltose, produz 2,61% de álcool (v/v) e a *Saccharomycodes ludwigii* WSL17, a qual produz 1,32% de álcool (v/v) (BELLUT et al., 2018; FRANCESCO et al., 2018).

A fermentação de mosto sem lúpulo também teve como objetivo avaliar preliminarmente o potencial aromático da linhagem de *S. arborarie* UFMG-HM19.1A[†], a fim de motivar a continuidade de estudos para aplicação em diferentes processos de produção de bebidas. A preparação do mosto cervejeiro passou por todas as etapas do processo (mosturação, filtração e fervura), posteriormente foi fermentado, maturado, clarificado, carbonatado e acondicionado em garrafas. Análises olfativas do produto final detectaram um aroma agradável de maçã verde. Esse aroma, encontrado em diversos produtos alimentícios, está associado à alta presença de acetaldeído, um composto volátil, nesse caso gerado no mosto cervejeiro. Sua concentração final pode variar normalmente de 10 a 200 mg/L, dependendo das condições operacionais do mosto e levedura utilizadas no processo. Devido à forte presença do odor, estima-se que concentrações maiores de acetaldeído podem ter sido produzidas (ROSCA et al., 2016).

É importante destacar que leveduras fermentam glicose em etanol e CO₂ em uma via metabólica de diversas etapas. Primeiro, a glicose é convertida a piruvato pela glicólise e em seguida o piruvato é convertido a etanol em um processo de duas reações. Primeiro, o piruvato é descarboxilado em uma reação irreversível catalisada pela piruvato-decarboxilase, gerando o acetaldeído que é reduzido a etanol pela ação da álcool-desidrogenase (NELSON; COX, 2014). Dessa forma, a presença qualitativa elevada de acetaldeído, detectada no produto final, ajuda a explicar o baixo teor alcoólico encontrado, visto que o mesmo não foi convertido a etanol.

Na tentativa de compreender melhor o metabolismo da levedura *Sp. arborariae* e melhorar sua capacidade fermentativa, aumentando a produção de etanol, utilizou-se duas diferentes estratégias que foram testadas em fermentações em menor escala, utilizando 45 mL de extrato de malte (a 11 °Brix), para mimetizar o mosto cervejeiro. A primeira estratégia consistiu na utilização de um tempo maior de fermentação, até 19 dias (Figura 11), uma vez que em função das condições de processo aplicadas, assim como da linhagem utilizada um tempo de fermentação maior pode ser necessário às leveduras para adaptarem-se ao consumo dos carboidratos presentes no mosto. Alia-se a essa hipótese, como discutido anteriormente, a possível repressão dos genes *MAL*, em função da presença de glicose. Logo, após a glicose ser totalmente consumida, com o decorrer de um tempo mais longo, também pode ocorrer à expressão desses genes.

A utilização de um tempo maior de fermentação possibilitou o consumo lento e gradual de uma pequena quantidade de maltose (5 g/L).

Entretanto, em função das condições proporcionadas pelo extrato de malte utilizado como mosto, ao invés do próprio mosto cervejeiro, a linhagem não foi capaz de consumir toda a glicose e, conseqüentemente, obteve baixa produção de etanol, atingindo 3,6 g/L. Como segunda alternativa, visou-se a fermentação do mosto de extrato de malte utilizando como inóculo células pré-cultivadas em meio YP + 2% de maltose, para a fermentação do extrato de malte (Figura 12). Nesse caso o intuito foi possibilitar a ativação prévia dos genes *MAL* para melhorar o consumo de maltose, como já apontado por Alves Jr. et al. (2007) e Alves Jr. et al. (2014) em outras espécies de leveduras.

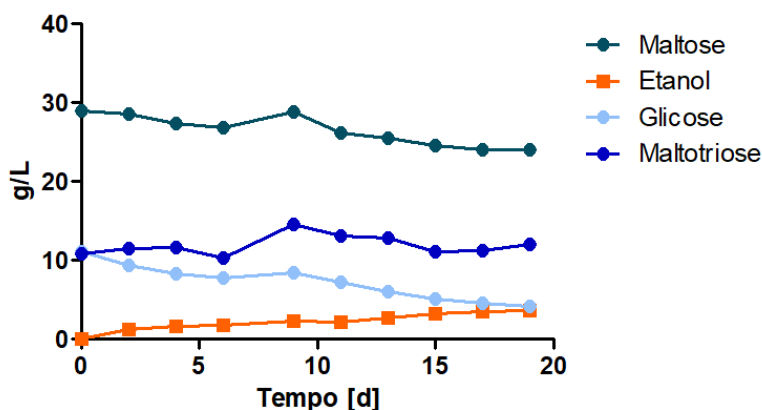


Figura 11 – Fermentação do extrato de malte (11 °Brix) pela levedura *Sp. arborariae* a 19 °C sem agitação.

A utilização de células pré-cultivadas em meio YP com 2% de maltose, quando comparadas às células pré-cultivadas no próprio extrato de malte apresentaram uma pequena melhora no consumo de maltose e glicose, cerca de 6 g/L a mais de maltose e 2 g/L a mais de glicose. Entretanto, apesar da produção de etanol ter praticamente dobrado, de 3,7 g/L nas células pré-cultivadas em extrato de malte para 6,9 g/L para as células pré-cultivadas em meio YP com 2% de maltose, os resultados ainda não foram satisfatórios para a aplicação no processo de produção de cervejas convencionais. Para comparação, o mesmo experimento foi realizado em paralelo para a linhagem comercial de *S. cerevisiae* (SafAle™ US-05). Porém, por se tratar de uma levedura habituada ao mosto cervejeiro, provavelmente com seus genes *MAL* expressos de maneira constitutiva, não foram detectadas diferenças no decorrer da fermentação entre células pré-cultivadas em meio YP + 2% de maltose

ou células pré-cultivadas no próprio extrato de malte (dados não mostrados).

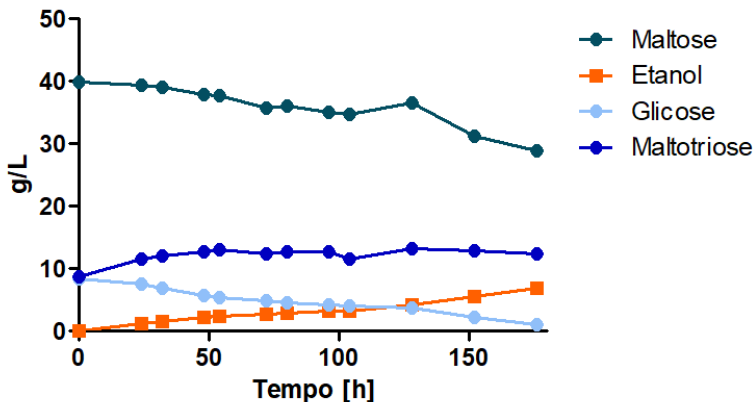


Figura 12 – Fermentação do extrato de malte (11 °Brix) pela levedura *Sp. arborariae* com células pré-cultivadas em meio YP + 2% de maltose a 19 °C sem agitação.

A Figura 13 apresenta o consumo de maltose e glicose e o crescimento celular da levedura *Sp. arborariae* em meio YP + 2% de maltose + 0,5% de glicose em meio com agitação a 160 rpm e temperatura de 28 °C. Nessa situação os dois carboidratos foram totalmente consumidos até a 20^a hora de cultivo, não havendo a inibição do consumo de maltose pela glicose. Obteve-se alta produção de etanol, quando comparada com os resultados obtidos na seção 4.2, o qual trata do consumo de carboidrato e produção de etanol nas mesmas condições (meio YP, 160 rpm e 28 °C). Atribui-se a esse fato, a presença de 0,5% de glicose no meio de cultivo, diferente dos experimentos anteriores que contavam apenas com cada carboidrato de maneira isolada.

A partir dos resultados obtidos, acredita-se em três diferentes alternativas para melhorar a fermentação alcoólica do mosto cervejeiro pela levedura *Sp. arborariae*: alteração da temperatura de 19 para 28 °C, utilização de 160 rpm de agitação e adição de uma fonte extra de nitrogênio ao extrato de malte, que no caso do meio de cultivo YP base, a fonte era 1% de peptona. O nitrogênio representa cerca 10% do peso das leveduras e são estritamente necessários para a produção das enzimas que serão utilizadas para o transporte e consumo dos

carboidratos do mosto cervejeiro (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Análises mais detalhadas das velocidades individuais de absorção de aminoácidos e seus efeitos sobre as velocidades de utilização dos carboidratos presentes no mosto cervejeiro revelaram que alguns aminoácidos, como por exemplo, o aspartato, pode aumentar a consumo de maltose pelas leveduras cervejeiras (SHIMIZU et al., 2002).

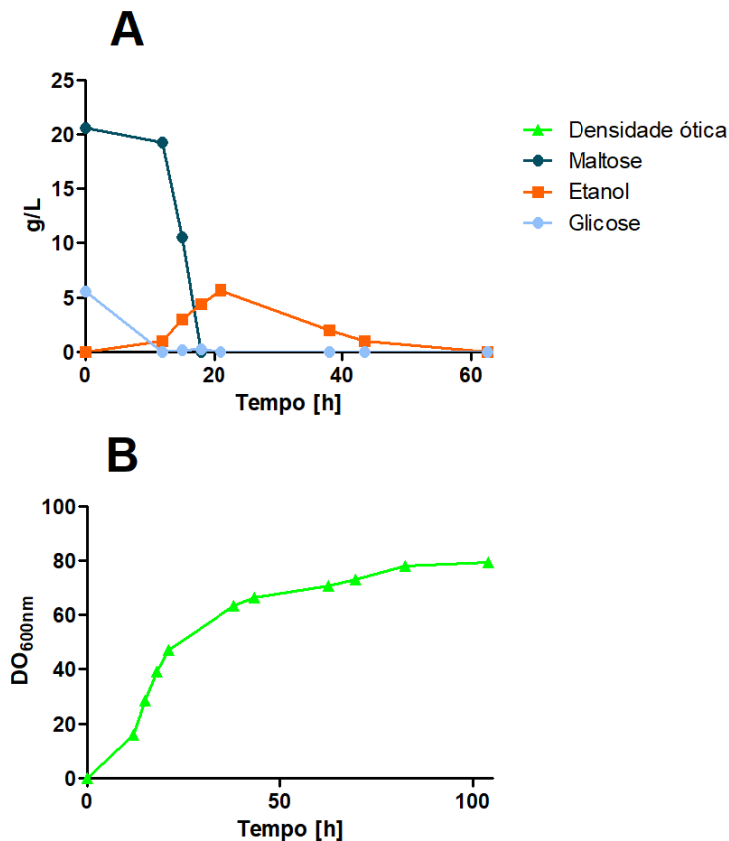


Figura 13 – Consumo de maltose, glicose e produção de etanol (A) e crescimento celular (B) da levedura *Sp. arborariae* em meio YP com 2% de maltose e 0,5% de glicose a 28 °C e 160 rpm.

A Figura 14 apresenta a fermentação do extrato de malte com 160 rpm de agitação a 28 °C pela levedura *Sp. arborariae*. Apenas a alteração de temperatura e agitação já foram suficientes para a linhagem

consumir totalmente maltotriose, glicose e boa parte da maltose presente no meio, restando apenas em torno de 4 g/L. Porém, esse maior consumo dos carboidratos foi praticamente todo convertido em crescimento celular, gerando apenas um pico máximo de 1,8 g/L de etanol no decorrer da fermentação.

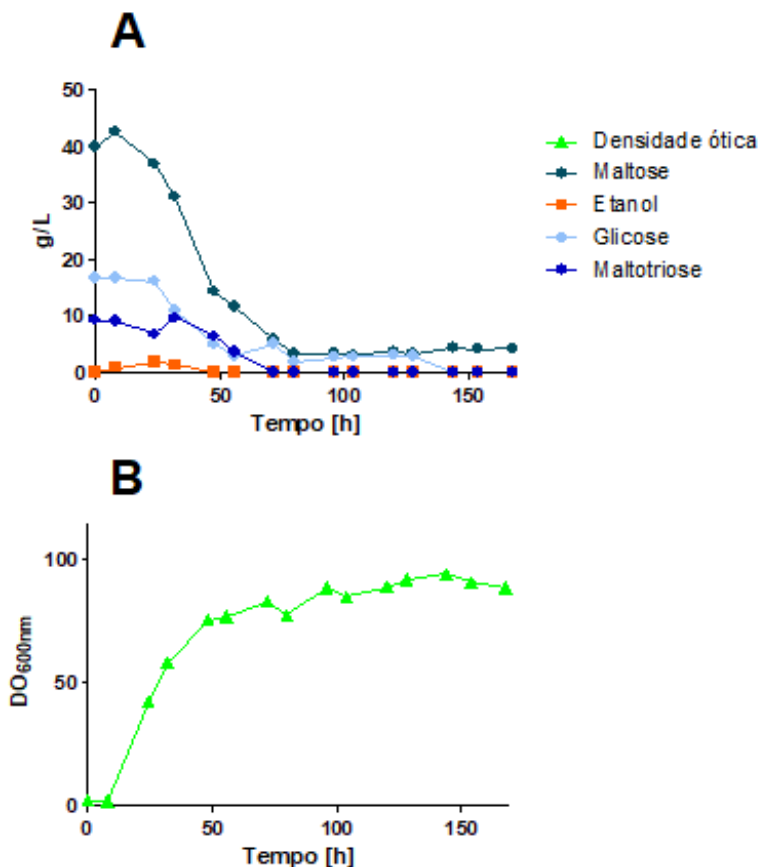


Figura 14 – Fermentação do extrato de malte (11 ° Brix, A) e crescimento celular (B) da levedura *Sp. arborariae* a 28 °C, com 160 rpm de agitação.

As Figuras 15 e 16 apresentam a fermentação do extrato de malte com 160 rpm de agitação a 28 °C pela linhagem de de *Sp. arborariae*

suplementadas com 1% de sulfato de amônio e 1% de peptona, respectivamente. Com a adição de uma fonte de nitrogênio, seja sulfato de amônio ou peptona, a linhagem foi capaz de produzir em torno de 10 g/L de etanol em ambas as situações. Entretanto, a adição de peptona possibilitou um crescimento celular muito maior dessa linhagem. Dessa forma, experimentos futuros visam a utilização da linhagem de *Sp. arborariae* para fermentação do mosto cervejeiro suplementado com sulfato de amônio, buscando apenas o consumo efetivo dos carboidratos e produção de etanol ao invés de crescimento celular.

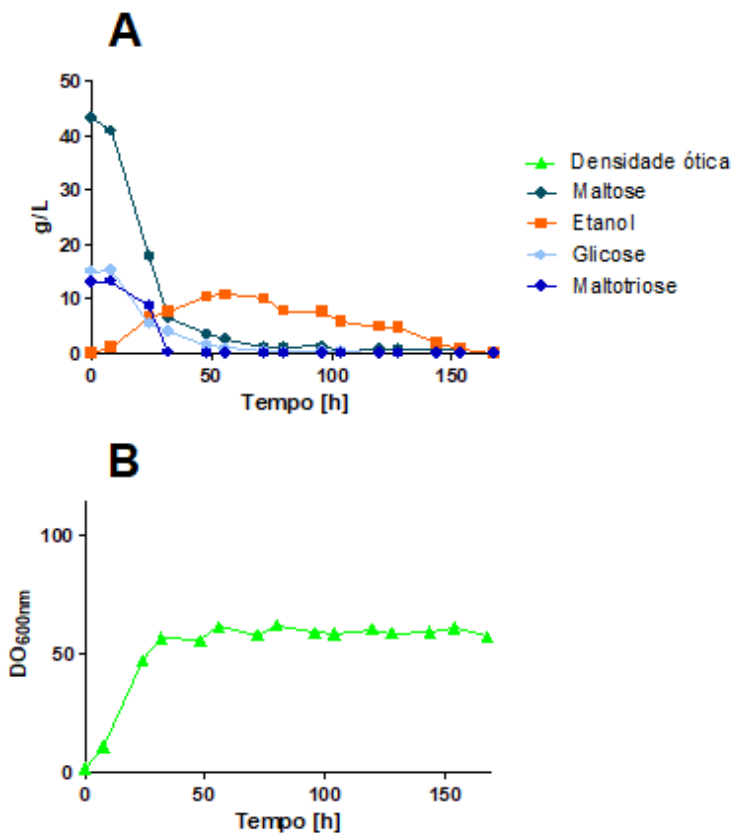


Figura 15 – Fermentação do extrato de malte (11 ° Brix) suplementado com 1% de sulfato de amônio (A) e crescimento celular (B) da levedura *Sp. arborariae* a 28 °C e 160 rpm.

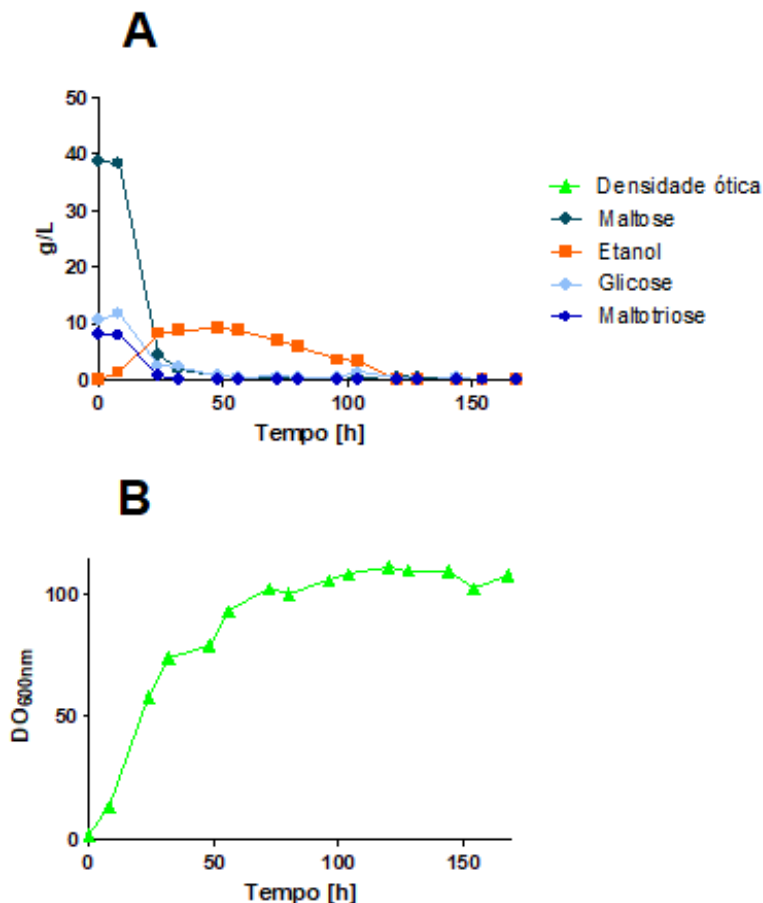


Figura 16 – Fermentação do extrato de malte (11 ° Brix) suplementado com 1% de peptona (A) e crescimento celular (B) da levedura *Sp. arborariae* a 28 °C e 160 rpm.

4.5 OUTROS PARÂMETROS DE SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA O PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA

4.5.1 Floculação

Após o período de incubação, as células depositadas no fundo dos tubos foram homogeneizadas para observação de flocos suspensos no meio de cultivo. Nesse experimento avaliou-se a capacidade de

floculação da linhagem de *Sp. arborariae* em comparação com a linhagem comercial de *S. cerevisiae* (SafAle™ US-05).

As duas linhagens apresentaram a formação de grumos característicos da floculação. Após o período de incubação a densidade óptica foi medida na parte superior do tubo de ensaio para ambas as linhagens que obtiveram o mesmo resultado, atingindo uma densidade óptica a 600 nm de 0, indicando que todo o conteúdo celular havia se depositado no fundo do tubo de ensaio.

Destaca-se que além do desempenho de flocular da linhagem de *Sp. arborariae* ter sido semelhante em comparação com a linhagem de *S. cerevisiae*, essa linhagem obteve resultados satisfatórios nos experimentos de aplicação no processo de produção de cervejas de baixo teor alcoólico, no qual passou pelo processo de maturação e clarificação em baixas temperaturas (~5°C), sendo suficiente para ocorrer a separação das células do produto final.

4.5.2 Produção de H₂S

A Figura 17 apresenta uma imagem comparativa entre a linhagem de *Sp. arborariae* e a linhagem comercial de *S. cerevisiae* (SafAle™ US-05) com relação a produção qualitativa de H₂S. Em ambos os casos um aumento na temperatura (C e D) propiciou maior produção de H₂S, como descrito na literatura (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). A *Sp. arborariae* exibiu maior crescimento celular nas duas temperaturas quando comparada a linhagem comercial de *S. cerevisiae*. Um maior crescimento celular, conseqüentemente, acarretou em manchas escuras maiores na placa de cultura, os quais indicam uma maior produção de H₂S. Porém, focando-se nas partes da placa em que houve um crescimento maior da linhagem de *S. cerevisiae*, a intensidade das cores é semelhante para ambas as linhagens, indicando uma produção semelhante de H₂S entre as duas linhagens em função de seu crescimento celular.

Durante a fermentação é normal à produção de H₂S pelas leveduras, entretanto, esse composto é carregado para fora do mosto juntamente com CO₂ produzido durante a fermentação (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Portanto, com relação a esse quesito, a produção de H₂S pela linhagem *Sp. arborariae* parece não ser um problema para sua aplicação no processo de produção de cerveja. Destaca-se também que não foi detectada a presença do odor característico de H₂S na cerveja produzida nesse trabalho, a partir de análises olfativas do produto final.

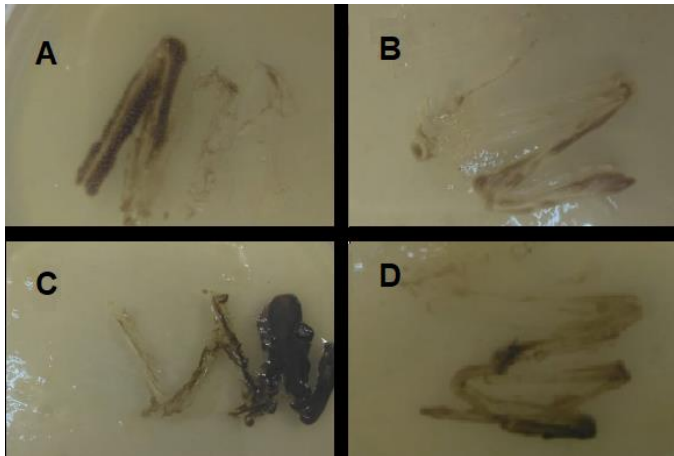


Figura 17 – Indicação qualitativa da produção de H_2S pela levedura *Sp. arborariae* a 19 °C e 28 °C (A e C, respectivamente) e pela linhagem comercial de *S. cerevisiae* (SafAle™ US-05) a 19 °C e 28 °C (B e D, respectivamente).

4.5.3 Toxinas Killer

A Figura 18 mostra o halo de inibição do crescimento de *S. arborariae* causado pelas linhagens Perlage® BB *S. cerevisiae* fator Killer positiva (A) e *Pichia anomala* CCT 2369 fator Killer K4 (B) inoculadas pontualmente (100 uL) nos poços feitos em placa de cultura. A linhagem de *Sp. arborariae* foi inoculada no restante da placa. Os halos claros ao redor do inóculo das linhagens Killer indicam uma região de baixa densidade de *S. arborariae* em comparação com o restante da placa, gerada a partir das toxinas Kiler liberadas pelas duas linhagens. As toxinas impediram o crescimento de *Sp. arborariae* ao redor desses poços, indicando que pode ser sensível ao fator Killer dessas duas linhagens. Nesse mesmo experimento, a linhagem de *S. cerevisiae* CCT 0761 fator Killer K2 também foi utilizada. Entretanto, a *Sp. arborariae* não se mostrou sensível ao seu fator Killer. Ressalta-se que esses resultados são de caráter preliminar e que necessitam de confirmação.

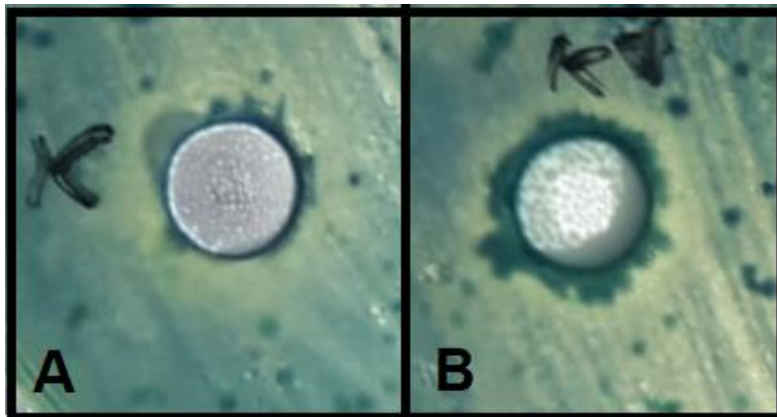


Figura 18 – Aparentes halos de inibição (áreas mais claras) do crescimento da linhagem de *Sp. arborariae* formados em placa de Petri YPD com 0,003% de azul de metileno a partir da inoculação pontual das linhagens Perlage® BB *S. cerevisiae* fator *Killer* positiva (A) e CCT 2369 *Pichia anomala* fator *Killer* K4 (B).

Cada fator *Killer* atua de modo diferente, o mecanismo de ação do fator *Killer* K2 atua através da ligação da toxina gerada nas $\beta(1-6)$ D-glucanas da parede celular da célula alvo, gerando um canal iônico na célula, permitindo a entrada da toxina dentro da célula (ANKE; WEBER, 2009). Enquanto que o fator *Killer* K4 parece possuir outro tipo de alvo na membrana celular (BUSSEY, 1981).

A aplicação de linhagens de fator *Killer* sensível possuem maior restrição no processo de produção de vinhos, pela alta variabilidade de micro-organismos no mosto, que por sua vez pode conter linhagens *Killer* que irão eliminar as linhagens sensíveis a essa toxina (DOYLE; BEUCHAT, 2007). Entretanto, para a aplicação no processo de produção de cervejas, cujo mosto passa pelo processo de fervura que o sanitiza, a chance de contaminação por leveduras *Killer* é muito reduzida. Assim a aplicação de uma linhagem *S. arborariae* sensível não representa um potencial problema. Destaca-se ainda que essa análise visa além de caracterizar o fator *Killer* da *S. arborariae*, sendo esse um importante parâmetro a ser caracterizado, a utilização dessa levedura em co-fermentações ou fermentações sequenciais. Uma vez que sua aplicação no processo de produção de cerveja obteve uma cerveja de aroma agradável e baixo teor alcoólico, pode-se contornar essa problema através de uma co-fermentação ou fermentação sequencial aonde a *S. arborariae* seria responsável por produzir o aroma

da cerveja enquanto que uma levedura convencional produziria o etanol. Nesse caso, sugere-se co-fermentações apenas com leveduras de fator *Killer* neutro devido à sensibilidade da *S. arborariae* e em fermentações sequenciais sugere-se primeiro a utilização da *S. arborariae* e depois a utilização de uma levedura convencional independente do seu fator *Killer*.

4.6 SELEÇÃO DE GENES PARA TRANSPORTADORES DE CARBOIDRATOS E α -GLICOSIDASES

Os dados obtidos nos cultivos em microescala mostram que a linhagem de *Sp. arborariae* é capaz de assimilar e fermentar maltose e maltotriose. Em meio YP e YNB a utilização desses carboidratos possibilitou um elevado crescimento e produção de etanol. Portanto, investigou-se em seu genome a presença dos genes responsáveis pela utilização desses dois carboidratos, semelhantes aos transportadores *MALx1* e *AGT1* e às maltases *MALx2* de *S. cerevisiae* (BROWN *et al.*, 2010; STAMBUK; DE ARAUJO, 2001).

De acordo com Needleman (1991) um *locus MAL* completo possui os três genes responsáveis pela α -glicosidase, transportador e regulador próximos. Dentro desse modelo existe uma região intergênica, entre o gene que codifica o transportador *MALx1* e o gene que codifica a maltase *MALx2*, a qual possui regiões promotoras específicas que dão início a transcrição de ambos os genes em sentidos opostos (VIDGREN *et al.*, 2011). Apesar da linhagem de *Sp. arborariae* não possuir, a princípio, os três genes próximos, encontrou-se ORF's com homologia a *MALx1* e *MALx2* (Tabela 5) que compartilham a mesma região intergênica, sendo esse *locus* parcialmente funcional e previamente caracterizado como *malg*, encontrado em diversas leveduras (NAUMOV *et al.*, 1994).

As ORF's com homologia aos transportadores *MALx1* localizados no genoma de *S. arborarie* possuem as 12 regiões transmembranas e o motivo PESP (Figura 19), conservado na maioria dos transportadores de carboidratos (WEIERSTALL *et al.*, 1999; HENDERSON, 1993). Porém, duas das três sequências que possuem similaridade com as sequências *MALx1* (T1 e T2) apresentam o códon CUG, o qual codifica serina na espécie *Sp. arborariae*, enquanto que em *S. cerevisiae*, assim como na maioria dos eucariotos, tal códon codifica leucina (MUHLHAUSEN; KOLLMAR, 2014).

Tabela 5 – Percentual de similaridade das ORF's da linhagem de *Sp. arborariae* com sequências *MALx1* e *MALx2* da linhagem de *S. cerevisiae* S288C, selecionadas através da ferramenta BLASTp.

Similaridade (%)		
ORF	<i>MALx1</i>	<i>MALx2</i>
M1	-	50
M2	-	35
T1	45	-
T2	23	-
T3	23*	-

*A ORF T3 apresentou 23% de identidade com transportadores do tipo *HXT*, entretanto, trabalhos anteriores do grupo mostraram semelhança dessa ORF a transportadores *MALx1*.

A substituição de uma serina (aminoácido polar não carregado) por uma leucina (aminoácido apolar) é passível de alteração conformacional na estrutura terciária das proteínas em questão, não apenas pela diferença de cargas entre esses dois aminoácidos, mas também em função de seu tamanho e massa, sendo a leucina o maior dentre esses dois aminoácidos (NELSON; COX, 2014). Entretanto, a sequência T1 apresenta essa substituição entre a região transmembrana 5 e 6, a qual está voltada para o lado de fora da célula e após as 12 regiões transmembrana. A sequência T2 também apresenta duas substituições, a primeira entre a região transmembrana 2 e 3, a qual está voltada para o interior da célula, e na região transmembrana 12, o que pode acarretar em alguma possível perda da atividade de transporte (HENDERSON, 1993).

Trichez et al. (2019) identificou quatro resíduos de aminoácidos conservados nas regiões transmembranas preditas pelo gene *AGT1* e também conservadas em outros transportadores *MAL* já caracterizados, essenciais para o transporte de maltotriose assim como de outros α -glicosídeos. Um ácido glutâmico na posição 120 e um ácido aspártico na posição 123, ambos dentro da primeira região transmembrana, um ácido glutâmico ou uma glutamina, no caso da permease codificada pelo gene *MalP* da *Aspergillus orizae*, na posição 167, dentro da segunda região transmembrana e uma arginina na posição 535 dentro da décima primeira região transmembrana, de acordo com o alinhamento mostrado na Figura 19. Todos também conservados na ORF T1 analisada nesse trabalho.

```

.....10.....20.....30.....40.....50
(PRED) T3 .....
(PRED) T2 -----MADYK PVEQRVNTF EDNNTSEFES LVSGFSTIIP
(PRED) T1 -----MSSSDVDEK
(PRED) AGT1_ScMKNIISLVSK KKAASKNEDK NISESSRDIV NQQEVFNTEF FREGKSDAF

.....60.....70.....80.....90.....100
(PRED) T3 MTTTPKQKPI EVSDTDSETS TLEGELFNEH DADKAYLAKS KLVALAIGEI
(PRED) T2 NKNSPVELTD SEEDDPIRYK NEENLPIDEF GNSYHNIDFD NKRYTSKLSF
(PRED) T1 YKGAALVEER TETDSQNDRI QDYISKFLDM SNEAKANDQQ EKQMPLEGCI
(PRED) AGT1_ScELDHLEFFT N SAQLGDSDED NENVINEMNA TDDANEANSE EKSMTLKQAL

.....110.....120.....130.....140.....150
(PRED) T3 GFGKYQICL PFAAGFQMLSD NAWFIATGLI PRNLEVQGV -----
(PRED) T2 KGNRLVLPIS AFVFLVFLVLP GYKQVCGSI RFETFNRYF N-----
(PRED) T1 RTFFKAVNSG VILSTALINR GYDTHLASF YATPGFARKF GOWYFDIQGY
(PRED) AGT1_ScLKYPKA LRS IADSTFLVNS GIDTA LSAAL TALPVPFQRKF GTLNG-EGSY

.....160.....170.....180.....190.....200
(PRED) T3 MAPVGGKAPY VLAQVIGLLM GALTMLSD IIGRKPWFNL TFLITGVWAV
(PRED) T2 NFNATTGVV ISLELEIGAMI SELLVLSID RFGRRRILL GYFIFIGQGV
(PRED) T1 GIPANWGL SMDVRCGLLI SFLALIFAD MICYRRLNS ALIAYVQLLI
(PRED) AGT1_ScRITSQWGL SMDVRCGLLI SFLALIFAD MICYRRLNS ALIAYVQLLI

.....210.....220.....230.....240.....250
(PRED) T3 TAGSPPHFTA LSEESAFWFF GVGGNLHVDS AIFLEALPKS HQM-LGVWV
(PRED) T2 GQTFVPIFM LGIDRRLRVS GQELISTIVE SYGSLISFSE DAKM-LGVWV
(PRED) T1 GQFPFHREY LLLYLGLD NNGRQYQINR TYSREVAPT LRVYVGVWV
(PRED) AGT1_ScLVYKSLAM IAVGQLSA RMGCPQLAV TYSREVCPLA LRVYVGVWV

.....260.....270.....280.....290.....300
(PRED) T3 PWAAGDILIA RLRGRLAW F-SGASRATD CHRAQKQWV YEDFNGDIL
(PRED) T2 GQTFVPIFM LGIDRRLRVS GQELISTIVE SYGSLISFSE DAKM-LGVWV
(PRED) T1 NCVVFGQLIS SQVKGITPM --E----- --GETAYR IAFATQWVF
(PRED) AGT1_ScSNDGQGVFA SGRMKNSEQEN LGN----- --SDLGYK SFAAGUMIM

.....310.....320.....330.....340.....350
(PRED) T3 LNFVYQKAL RVLSPRVIY ARGNDEKAIQ TNNIARING KECFISLADI
(PRED) T2 VLVFGQGFPI --VESSPWLL DNDMDQGGFN VLSELLD--- -SDLTITPR
(PRED) T1 RFLGQGVVLA --PESSPWFLV KGRFQEAKE SLTRLLTENK NLPKKEILAE
(PRED) AGT1_ScRFLMSSDFA --PESSPWMLV RKRDRVAEARK SLRSLRSGK -GAEKDIQDV

.....360.....370.....380.....390.....400
(PRED) T3 QEIDIKFGDG TSKNNKLIVE EKLKRYNLSH IRQCFTEKKL AIKALVYV
(PRED) T2 SEFFMIENSI -------QE RITSPKRSR MKKLFTNH-L LRVEIACAM
(PRED) T1 HMLTKIOMTI K-----EE DALK-SG-AT IKDCFTGVNS RRTRAGVWV
(PRED) AGT1_ScLTLKQIELTI E-----EK RLLA-SKSGS FFNCFKGVNG RRTRLGDTA

.....410.....420.....430.....440.....450
(PRED) T3 NGISGLAVFL VMAKPYLLE TRGNANQPLS VHDITRNFL VAVLQVDFAL
(PRED) T2 RFAQLQNGMI LLYYAPMVKF EAG----FT NASTLMTQI NMLTYLGGT
(PRED) T1 SAQSTGSSAL NGLTTFYFT QAG-----LA ESMATFTRQI QYGLQIGQTV
(PRED) AGT1_ScRAGSRSRMI LGLTTFYFE RAG----MA TDRAETFRQI QYGLQIGQTV

.....460.....470.....480.....490.....500
(PRED) T3 GRSVDELRI GRKCLFFPL ILTGIFLYGS TPL----K TSNANQWNV
(PRED) T2 NPLVD-RW GRKCLSSGQ AANGICLIMV RLVMLDQVSA TFSVGLM
(PRED) T1 GRSVDELRI GRKCLSSGQ AANGICLIMV RLVMLDQVSA TFSVGLM
(PRED) AGT1_ScGRSVDELRI GRKCLSSGQ AANGICLIMV RLVMLDQVSA TFSVGLM

.....510.....520.....530.....540.....550
(PRED) T3 NPLVSNMNS --SVAATK VFFSKIRLVA VLRAAFNNS GVVAFVGLM
(PRED) T2 NPLVSNMNS --SVAATK VFFSKIRLVA VLRAAFNNS GVVAFVGLM
(PRED) T1 VYFFYDGLI SFLCYCVKAE IPNARLRAR VMLRAANLNL ANITATLIP
(PRED) AGT1_ScNPLVSNMNS --SVAATK VFFSKIRLVA VLRAAFNNS GVVAFVGLM

.....560.....570.....580.....590.....600
(PRED) T3 YADLTT -- --SVAATK VFFSKIRLVA VLRAAFNNS GVVAFVGLM
(PRED) T2 ILKQDIGW-- --KMLVYAY KCLLSIVVV LPFETKQVE LEDMDQVKE
(PRED) T1 YMLNPTENNW KAKSDFLWAG FATAGCVNVV FEPETKGRS FAELDKLFD
(PRED) AGT1_ScYMLNVDNWNW GAKSDFLWAG FATAGCVNVV FEPETKGRS FAELDKLFD

.....610.....620.....630.....640.....650
(PRED) T3 FYQDSTITV TKMLRKKRRM QRNVHEYRNI EHNREGLSAI ELEEINDLDY
(PRED) T2 FYQDSTITV TKMLRKKRRM QRNVHEYRNI EHNREGLSAI ELEEINDLDY
(PRED) T1 GVPARFKFYT EVNTPDAIQM MEQLGEGQIK DFVQKQENIG TEDQVLSISK
(PRED) AGT1_ScGVPARFKFAST VVDFPGKGRY QHDSLADESI SQSSSIKQRE LNAADKCC--

(PRED) T3 -----
(PRED) T2 ERRQML
(PRED) T1 -----
(PRED) AGT1_Sc-----

```

Figura 19 – Alinhamento das ORFs T1, T2, T3 e AGT1_Sc construídas a partir do genoma de *Sp. arborariae* utilizando genes homólogos de transportadores de α -glicosidasés da família de genes *MAL* de *S. cerevisiae* S288C. O alinhamento foi realizado utilizando-se o programa IBIVU Server-PRALINE (<http://ww.ibi.vu.nl>). As 12 regiões transmembrana estão destacadas em verde. Os motivos PESP estão circulosados em amarelo. A posição do códon CUG está enquadrada em vermelho.

A Figura 20 mostra o filograma obtido utilizando-se o método de máxima parcimônia descrito por Jones e colaboradores (1992), utilizando-se de genes presentes no banco de dados de diversos transportadores *MAL* já caracterizados, assim como das três sequências analisadas nesse trabalho (T1, T2 e T3). A ORF T1, foi a única sequência que se alinhou próxima das sequências conhecidas dos genes *MAL*, corroborando com o alto grau de homologia entre eles mostrado anteriormente (Tabela 5). Destaca-se que ela se alinhou próximo da sequência Mal2 Op de *Ogataea (Hansenula) polymorpha* capaz de transportar maltose, maltotriose, sacarose, trealose, melezitose, turanose, maltulose, isomaltose, palatinose e p-nitro fenol glicopiranosídeo (VIIGAND et al., 2016; VIIGAND; ALAMÃE, 2007). Entretanto, das sequências analisadas por Trichez et al., (2019), também utilizadas nesse filograma, a sequência Malp Ao de *Aspergillus oryzae*, que já foi descrita como capaz de transportar maltose, foi a única que dos 4 resíduos de aminoácidos identificados possuía uma glutamina na posição 167, dentro da segunda região transmembrana, igual a ORF T1 analisada nesse trabalho (HASEGAWA et al., 2010). A ORF T2, assim como a ORF T3 provavelmente devido ao menor grau de homologia com os genes *MAL* (23%, Tabela 5), não se alinharam próximo aos genes *MAL*.

A Figura 21 mostra o filograma obtido utilizando-se o mesmo método de máxima parcimônia descrito por Jones e colaboradores (1992) utilizando-se nesse caso 32 sequências de aminoácidos de diversas maltases e isomaltases, além das duas sequências que visou-se analisar nesse trabalho (M1 e M2). A ORF M1 apesar de possuir a sequência TAG próxima de seu sítio ativo, sequência característica de maltases, alinhou-se mais próxima de sequências com caráter misto, que atuam tanto como maltase ou isomaltase. A ORF M2 possui a sequência VGS, característica de isomaltases, porém a mesma se encontra distante de seu sítio ativo. A M2 não se alinhou próxima de nenhuma maltase ou isomaltase e, apesar de possuir homologia aos genes *MAL* (Tabela 5), pode não possuir atividade de α -glicosidase (VOORDECKERS et al., 2012).

De acordo com Vidgren et al. (2011) os principais elementos promotores da região intergênica presente nos *loci MAL* são duas caixas TATA e sítios de ativação específicos dos genes *MAL*. Os genes *MALx1* e *MALx2* possuem dois sistemas distintos de regulação, governados por diferentes fatores de transcrição em resposta a diferentes carboidratos. Possuindo um sítio de ativação específico em resposta a palatinose, no qual o fator de transcrição Mal13p, por exemplo, se liga a região

promotora específica entre a sequência da α -glicosidase e do transportador. Enquanto que o fator de transcrição Mal63p, em resposta a outros carboidratos, como maltose e maltotriose, por exemplo, possui três sítios de ligação específicos (POUGACH *et al.*, 2014).

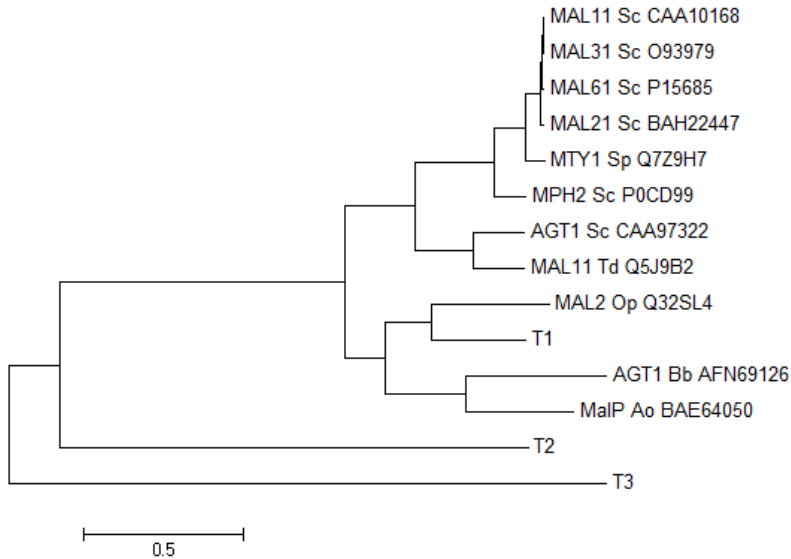


Figura 20 – Árvore filogenética do tipo máxima parcimônia gerada a partir do software MEGA7. As sequências utilizadas são de diversos transportadores conhecidos e já caracterizados e das três ORF's estudadas no presente trabalho.

A Figura 22 mostra em verde e preto os sítios de ativação encontrados entre o possível transportador (T1) e a possível maltase (M1) da linhagem de *Sp. arborariae* localizada no *contig* 033 dessa levedura. Encontrou-se quatro sítios de ativação para a proteína Mal63p induzida na presença de maltose, formados por uma sequência CGC(9N)CGN, um sítio a mais do que o descrito na literatura, sendo três deles em uma fita do DNA e o outro sítio na fita complementar (POUGACH *et al.*, 2014). A Figura 22 ainda destaca em vermelho as duas caixas TATA, localizadas entre -200 e -50 pb do códon inicial ATG, formadas por uma sequência TA(A/T)(A/T)NNNN, como descrito por Basehoar *et al.*, (2004). Além disso, encontrou-se os sítios de ligação responsáveis por reconhecer os dois dedos de zinco da proteína Mig1p, a qual inibe a transcrição dos genes em questão, formados por uma caixa GC de sequência (G/C)(C/T)GG(G/A)G.

Destaca-se ainda a preferência por um “G” na posição 5 para uma maior afinidade na ligação da Mig1p e uma região rica em “AT” na região 5’ da caixa GC, a qual também é importante para a ligação da Mig1p, ambas encontradas nesse caso (HU *et al.*, 1995).

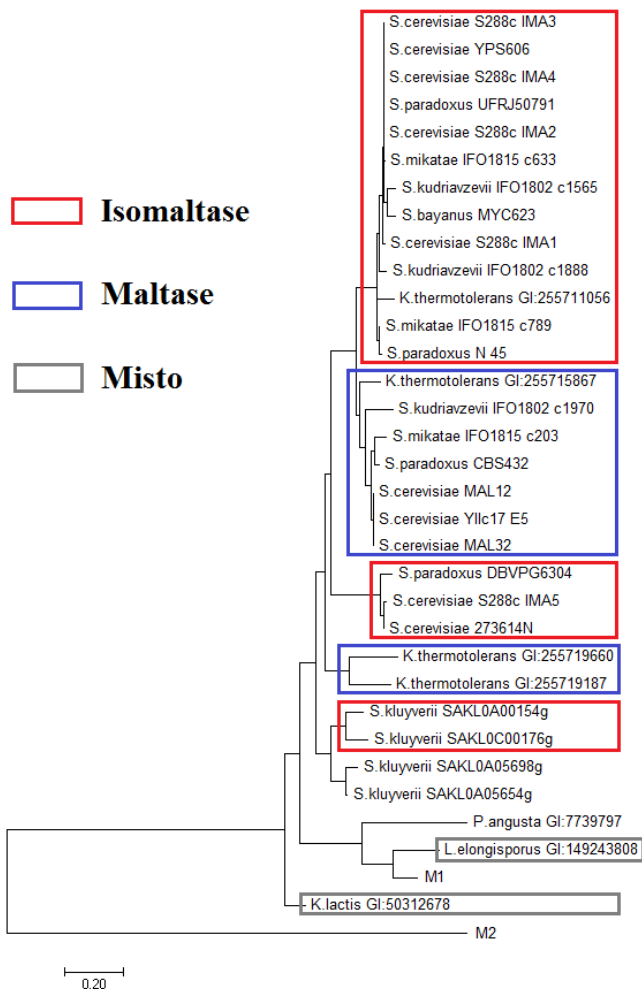


Figura 21 – Árvore filogenética do tipo máxima parcimônia gerada a partir do software MEGA7. As sequências utilizadas são de 32 α -glicosidases distintas e das duas ORF’s estudadas no presente trabalho. Em azul encontram-se as α -glicosidases que atuam como maltases, em vermelho as que atuam como isomaltases e em cinza as que possuem caráter misto.

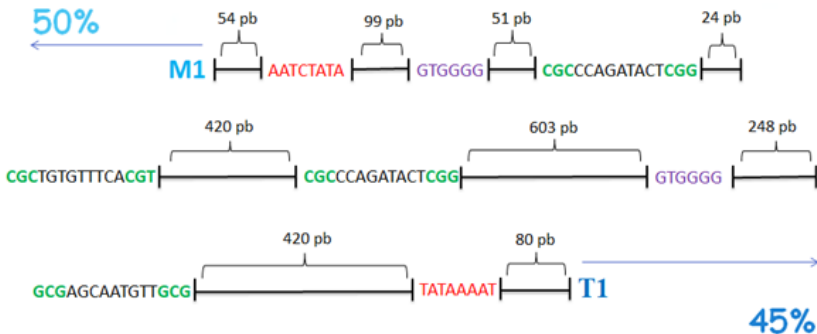


Figura 22 – Região intergênica entre possível transportador e possível α -glicosidase no contig 033 da linhagem de *Sp. arborariae*. Em vermelho estão destacadas as caixas TATA, em verde e preto os sítios de ativação Malx3, em roxo os sítios de ligação da Mig1p e em azul o local das ORF's.

A região intergênica entre o possível transportador (T2) e a possível maltase (M2) da linhagem de *Sp. arborariae* no contig 185 dessa levedura não mostra sítios de ligação para os fatores de transcrição relacionados à presença de maltose ou palatinose, próximos as duas ORF's. Destaca-se ainda que essas ORF's estão bem distantes uma da outra (41,5 kbp) apesar de ambas possuírem homologia com genes *MALx1* e *MALx2* da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* S288C e duas possíveis caixas TATA, localizadas entre -200 e -50 pb do códon inicial ATG, formadas por uma sequência TA(A/T)(A/T)NNNN, como descrito por Basehoar et al. (2004), assim como os sítios de repressão da Mig1p, formados por uma caixa GC de sequência (G/C)(C/T)GG(G/A)G, os quais também possuem uma região rica em "AT" na região 5' da caixa GC e um "G" na posição 5 (HU et al., 1995).

5 CONCLUSÕES

A linhagem de *Sp. arborariae* mostrou alta capacidade de consumo e produção de etanol a partir de maltose, maltotriose e sacarose nos experimentos em microescala em condições microaeróbicas e também em condições aeróbicas em erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio. Os ensaios enzimáticos mostraram que células cultivadas em meio YP suplementado com 2% de maltose ou sacarose mostram alta capacidade de hidrolisar maltose entre outros α -glicosídeos indicando a presença de possíveis α -glicosídeses nessa linhagem.

A linhagem de *Sp. arborariae* UFMG-HM19.A^T tem potencial para aplicação na produção de cervejas. O controle da temperatura, agitação e suplementação de nitrogênio é uma ferramenta interessante para desenvolver cervejas de baixo até alto teor alcoólico. Dentre os parâmetros pré-avaliados a linhagem apresentou desempenho satisfatório com relação a produção de H₂S e capacidade de floculação. Sua aparente sensibilidade a fatores *Killer* não representa um problema significativo para a produção de cervejas, devido às condições mais assépticas dos mostos cervejeiros, embora possa ser um problema em outros tipos de mostos.

As análises de bioinformática identificaram um possível *locus malg* formado por uma ORF T1, que possui as 12 regiões transmembrana e o motivo PESP conservado, com 44% de similaridade a permease *MAL31* e outra ORF M1 com 50% de similaridade a isomaltase *IMAI*. A região intergênica entre essas duas sequências possui duas caixas TATA, duas caixas GC (locais de ligação para a Mig1p) e os três sítios de ligação para o respectivo fator de transcrição, como descrito na literatura. Devido a esse alto índice da presença do *locus malg*, estudos posteriores devem clonar e expressar tais sequências em linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* para sua devida caracterização.

6 REFERÊNCIAS

- ALVES-JR, S. L.; HERBERTS, R. A.; HOLLATZ, C.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U. Maltose and maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. v. 65, n. 2, p. 99-104, 2007.
- ALVES-JR, S. L.; THEVELEIN, J. M.; STAMBUK, B. U. Expression of *Saccharomyces cerevisiae* α -glucoside transporters under different growth conditions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 31, n. 1, p. 1-8, 2014.
- ANKE, T.; WEBER, D. **Physiology and Genetics: selected basis and applied aspects**. Springer, Berlin, 2009.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial**. v. 4. Edgard Blucher, 1 Ed, São Paulo, 2001.
- BAMFORTH, C. W. **Scientific principles of malting and brewing**. American Society of Brewing Chemists, St. Paul, MN, 2006.
- BARBOSA, A. C.; CADETE, R. M.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M.; ROSA, C. A. *Candida materiae* sp. nov., a yeast species isolated from rotting wood in the Atlantic Rain Forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59, p. 2104-2106, 2009.
- BASEHOAR, A. D.; ZANTON, S. J.; PUGH, B. F. Identification and distinct regulation of yeast TATA-Box containing genes. **Cell**, v. 116, p. 699-709, 2004.
- BASSO, R. F.; ALCARDE, A. R.; PORTUGAL, C. B.. Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? **Food Research International**. v. 86, p. 112–120, 2016.
- BECKER, B.; SCHMITT, M. Yeast killer toxin K28: biology and unique strategy of host cell intoxication and killing. **Toxins**. v. 9, p. 1-15, 2017.

- BELL, P. J. L.; HIGGINS, V. J.; DAWES, I. W.; BISSINGER, P. H. Tandemly repeated 147 bp elements cause structural and functional variation in divergent *MAL* promoters of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. v. 13, p. 1135-1144, 1997.
- BELLUT, K.; MICHEL, M.; ZARNKOW, M.; HUTZLER, M.; JACOB, F.; SCHUTTER, D. P.; DAENEN, L.; LYNCH, K. M.; ZANNINI, M.; ARENDT, E. K. Application of non-*Saccharomyces* yeasts isolated from kombucha in the production of alcohol-free beer. **Fermentation**. v. 4, n. 66, p; 1-19, 2018.
- BEVAN, E. A.; MAKOWER, M. The physiology basis of the killer character in yeast. Proceedings of the 11 th International Conference on Genetics, v. 1 p. 202-203, 1963.
- BOULTON, C. A. **Biotechnology and genetic engineering reviews**. Taylor & Francis, United Kingdom, 1991.
- BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J. C.; GERDS, M. L.; HAMMES, W. P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL, I. B.; PRAJAPATI, J. B.; SETO, Y.; SCHURE, E. T.; BOVEN, A. V.; VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJTELAARS, S.; HANSEN, E. B. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology**. v. 154, p. 87-97, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretária Nacional de Defesa Agropecuária. Decreto n° 2.314, de 4 de Setembro de 1997. Diário oficial da União. Poder executivo, Brasília, Distrito Federal, 1997.
- BRICKWEDDE, A.; BROEK, M. V. D.; GEERTMAN, J. A.; MAGALHÃES, F.; KUJIPERS, N. G. A.; GIBSON, B.; PRONK, J. T.; DARAN, J. G. Evolutionary engineering in chemostat cultures for improved maltotriose fermentation kinetics in *Saccharomyces pastorianus* lager brewing yeast. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, p. 1-15, 2017.
- BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing science and practice**. CRC Press, New York, 2004.

- BROWN, C. A.; MURRAY, A. W.; VERSTREPEN, K. J. Rapid expansion and functional divergence of subtelomeric gene families in yeasts. **Current Biology**, v. 20, n. 10, p. 895-903, 2010.
- BUSSEY, H. Physiology of killer factor in yeast. **Advances in Microbial Physiology**. v. 22, p. 93-122, 1981.
- CADETE, R. M.; ROSA, C. A. The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. **Yeast Primer**. v. 35, p. 191-199, 2018.
- CADETE, R. M.; MELO, M. A.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J. S.; MOURO, A.; PROMPT, A. H.; GOMES, F. C. O.; STAMBUK, B. U.; LACHANCE, M.; ROSA, C. A. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov., and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel D-xylose fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 103, p. 421-431, 2013.
- CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; MELO, M. A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D. L.; STAMBUK, B. U.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M.; ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**. v. 9, n. 8, p. 1338-1342, 2009.
- CAPECE, A.; ROMANIELLO, R.; PIETRAFESA, A., SIESTO, G.; PIETRAFESA, R., ZAMBUTO, M.; ROMANO, P. Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. **International Journal of Food Microbiology**. v. 284, n.1, p. 22-30, 2018.
- CHARRON, M. J.; READ, E.; HAUT, S. R.; MICHELS, C. A. Molecular Evolution of the telomere-associated MAL loci of *Saccharomyces*. **Genetics**. v. 122, p. 307-316, 1989.
- CZUCHAJOWSKA, Z.; KLAMCZYNSKI, A.; PASZCZYNSKA, B.; BAIK, B. K. Structure and functionality of barley starches. **Cereal Chemistry**. v. 75 p. 747-754, 1998.

- DAHABIEH, M.; SWANSON, J.; KINTI, E.; HUSNIK, J. Hydrogen sulfide production by yeast during alcoholic fermentation: mechanisms and mitigation. **Wine & Viticulture**. v. 30, p. 23-28, 2015.
- DENG, X.; PETITJEAN, M.; TESTE, M.; KOOLI, W.; TRANIER, S.; FRANÇOIS, J. M.; PARROU, J. Similarities and differences in the biochemical and enzymological properties of the four isomaltases from *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Open Bio**. v. 4, p. 200-212, 2014.
- DERDE, L. J.; GOMAND, S. V.; DOURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A. Hydrolysis of b-limit dextrins by α -amylases from porcine pancreas, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas saccharophila* and *Bacillus stearothermophilus*. **Food Hydrocolloids**. v. 26, n. 1, p. 232-239, 2012.
- DESTRUELLE, M.; HOLZER, H.; KLIONSKY, D. Isolation and characterization of a novel yeast gene, *ATH1* that is required for vacuolar acid trehalase. **Yeast**. v. 2, p. 1015-1025, 1995.
- DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. ASM Press, Washington, 2007.
- DUVAL, E. H.; ALVES JR, S. L.; DUNN, B.; SHERLOCK, G.; STAMBUK, B. U. Microarray karyotyping of maltose-fermenting *Saccharomyces* yeasts with differing maltotriose utilization profiles reveals copy number variation in genes involved in maltose and maltotriose utilization. **Journal of Applied Microbiology**. v. 109, p. 248-259, 2010.
- ENTIAN, K. D.; BARNETT, J. A. Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 17, p. 506-510, 1992.
- EL-BANNA, A. A.; MALAK, A. E.; SHEHATA, M. G. Yeasts producing killer toxins: an overview. **Alexandria Journal of Food Science and Technology**. v. 8, n. 2, p. 41-53, 2011.
- FRANCESCO, G.; SANNINO, C.; SILEONI, V.; MARCONI, O.; FILIPPUCI, S.; TASSELLI, G.; TURCHETTI, B. *Mrakia gelida* in

- brewing process: an innovative production of low alcohol beer using a psychophilic yeast strain. **Food Microbiology**. v. 76, p. 354-362, 2018.
- GALLONE, B.; MERTENS, S.; GORDON, J.; MAERE, S.; VERSTREPEN, K. J.; STEENSELS, J. Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 49, n. 1, p. 148-155, 2018.
- GAROLFO, C.; BERBEGAL, C.; GRIECO, F.; TUFARIELLO, M.; SPANO, G.; CAPOZZI, V. Selection of indigenous yeast strains for the production of sparkling wines from native Apulian grape varieties. **International Journal of Food Microbiology**. v. 285, n. 1, p. 7-17, 2018.
- GIANVITO, P.; PERPETUINI, G.; TITTARELLI, F.; SCHIRONE, M.; ARFELLI, G.; PIVA, A.; PATRIGNANI, F.; LANCIOTTI, R.; OLIVASTRI, L.; SUZZI, G.; TOFALO, R. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* strains on traditional sparkling wines production. **Food Research International**. v. 109, n. 1, p. 552-560, 2018.
- GONÇALVES, M.; PONTES, A.; ALMEIDA, P.; BARBOSA, R.; SERRA, M.; LIBKIND, D.; HUTZLER, M.; GONÇALVES, P.; SAMPAIO, J. P. Distinct domestication trajectories in top-fermenting beer yeasts and wine yeasts. **Current Biology: CB**, v. 26, n. 20, p. 2750-2761, 2016.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**. v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.
- HAMMOND, J. R. M.; ECKERSLEY, K. W. Fermentation properties of brewing yeast with killer character. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 90, p. 167-177, 1984.
- HAMMOND, J. R. Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century. Progress to date. **Yeast**. v. 11, n. 16, p. 1613-1627, 1995.
- HASEGAWA, S.; TAKIZAWA, M.; SUYAMA, H.; SHINTANI, T.; GOMI, K. Characterization and expression analysis of a maltose-

utilizing (*MAL*) cluster in *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 47, p. 1-9, 2010.

HAZELWOOD, L.A.; WALSH, M.C.; PRONK, J.T.; DARAN, J.M. Involvement of vacuolar sequestration and active transport in tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to hop iso- α -acids. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 76, p. 318-328, 2010.

HE, Y.; DONG, J.; YIN, H.; ZHAO, Y.; CHEN, R.; WAN, X.; CHEN, P.; HOU, X.; LIU, J.; CHEN, LU. Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer – a review. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 120, p. 157-163, 2014.

HENDERSON, P. J. F. The 12-transmembrane helix transporters. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 5, p. 708-721, 1993.

HORÁK, J. Yeast nutrient transporters. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1331, p. 41-79, 1997.

HORNSEY, I. **A history of beer and brewing**. RSC Paperbacks, Cambridge, United Kingdom, 2003.

HU, Z.; NEHLIN, J. O.; RONNE, H.; MICHELS, C. A. *MIG1*-dependent and *MIG1*-independent glucose regulation of *MAL* gene expression. In *Saccharomyces cerevisiae*. **Current genetics**. v. 28, p. 258-266, 1995.

IZYDORCZYK, M. S.; STORSLEY, J.; LABOSSIERE, D.; MACGREGOR, A. W.; ROSSNAGEL, B. G.; Variation in total and soluble β -glucan content in hulless barley: effects of thermal, physical, and enzymic treatments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, p. 982–989, 2000.

JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. A. Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H₂S-producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts under enological conditions. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 46, n. 2, p. 269-273, 1995.

- JONES, D. T.; TAYLOR, W. R.; THORTON, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Computer Applications in the Biosciences**. v. 8, p. 275-282, 1992.
- KODAMA, Y.; FUKUI, N.; ASHIKARI, T.; SHIBANO, Y.; MORIOKA-FUJIMOTO, K.; HIKARI, Y.; NAKATANI, K. Improvement of maltose fermentation efficiency: constitutive expression of *MAL* genes in brewing yeasts. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. v. 53, p. 24-29, 1995.
- KOPP, M.; MULLER, H.; HOLZER, M. Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae**. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 268, n. 7, p. 4766-4774, 1993.
- LAHUTA, L. B.; GÓRECKI, R. J.; MICHALCZYK, D.; PIOTROWICZ-CIEŚLAK, A. I. (2000). Alpha-D-galactosidase activity in stored yellow lupin (*Lupinus luteus L.*) seeds. **Electronic Journal of Polish Agriculture University**. v. 3, p. 1-10, 2000.
- LEWIS, J. G.; NORTHCOTT, C. J.; LEARMONTH, R. P.; ATTFIELD, P. V.; WATSON, K. The need for consistent nomenclature and assessment of growth phases in diauxic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**. v. 139, p. 835-839, 1993.
- LI, H.; LIU, Y.; ZHANG, W. Method for manufacturing alcohol-free beer through *Candida shehatae*. China Patent CN102220198, 6 February 2013.
- LINDERHOLM, A.L.; BISSON, L.F. Eliminating formation of hydrogen sulfide by *Saccharomyces*. **Practical winery e wineryard**. Dept. of Viticulture & Enology. University of California, 2005.
- LOBO, F. P.; GONÇALVES, D. L.; ALVES JR, S. L.; GERBER, A. L.; VASCONCELOS, A. T. R.; BASSO, L. C.; FRANCO, G. R.; SOARES, M. A.; CADETE, R. M.; ROSA, C. A.; STAMBUK, B. U. Draft genome sequence of the D-xylose-fermenting yeast *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A^T. **Genome Announcements**, v. 2, n. 1, p.1-13, 2014.

- LOPES, M. R.; MORAIS, C. G.; KOMINEK, J.; CADETE, R. M.; SOARES, M. A.; UETANABARO, A. P. T.; FONSECA, C.; LACHANCE, M.; HITTINGER, C. T.; ROSA, C. A. Genomic analysis and D-xylose fermentation of three novel *Spathaspora* species: *Spathaspora girioi* sp. nov., *Spathaspora hagerdaliae* f. a., sp. nov. and *Spathaspora gorwiae* f. a., sp. nov. **FEMS Yeast Research**. v. 16, p. 1-12, 2016.
- MAGALHÃES, F.; VIDGREN, V.; RUOHONEN, L.; GIBSON, B. Maltose and maltotriose utilization by group I strains of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. **FEMS Yeast Research**. v. 16, n. 5, p. 1-11, 2016.
- MARQUES, W. L.; RAGHAVENDRAN, V.; STAMBUK, B. U.; GOMBERT, A. K. Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae* a relationship most sweet. **FEMS Yeast Research**. v. 16, n. 1, p. 1-16, 2006.
- MACWILLIAM, I. C. Wort composition – a review. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 74, p. 38-54, 1968.
- MICHEL, M.; KOPECKÁ, J.; MEIER-BORNBERG, T.; ZARNKOW, M.; JACOB, F.; HUTZLER, M. Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as a model. **Yeast**, v. 33(4), p. 129-144, 2016.
- MICHELS, C. A.; READ, E.; NAT, K.; CHARRON, M. J. The telomere-associated *MAL3* locus of *Saccharomyces* is a tandem array of repeated genes. **Yeast**. v. 8, p. 655-665, 1992.
- MICHELS, C. A.; NEEDLEMAN, R. B. The dispersed, repeated family of *MAL* loci in *Saccharomyces* spp. **Journal of Bacteriology**, v. 157, n. 3, p. 949-952, 1984.
- MONERAWELA, C.; BOND, U. Brewing up a storm: the genomes of lager yeasts and how they evolved. **Biotechnology Advances**. v. 35, n. 4, p. 512-519, 2017.
- MORAIS, C. G.; BATISTA, T. M.; KOMINEK, J.; BORELLI, B. M.; FURTADO, C.; MOREIRA, R. G.; FRANCO, G. R.; ROSA, L. H.; FONSECA, C.; HITTINGER, C. T.; LACHANCE, M.; ROSA, C.

- A.; *Spathaspora boniae* sp. nov., a D-xylose-fermenting species in the *Candida albicans/Lodderomyces* clade. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 67, p. 3798-3805, 2017.
- MUHLHAUSEN, S.; KOLLMAR, M. Molecular phylogeny of sequenced Saccharomycetes reveals polyphyly of the alternative yeast codon usage. **Genome Biology and Evolution**. v. 6, n. 12, p. 3222-3237, 2014.
- MULDERS, S. E. V.; GHEQUIRE, M.; DAENEN, L.; VERBELEN, P. J.; VERSTREPEN, K. J.; DELVAUX, F. R. Flocculation gene variability in industrial brewer's yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 88 p. 1321-1331, 2010.
- NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; MICHELS, C. A. Genetic variation of the repeat *MAL* loci in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*. **Genetics**, v. 136, p. 803-812, 1994.
- NAUMOV, G. I.; NAUMOV, D. G. Molecular genetic differentiation of yeast α -glucosidases: maltase and isomaltase. **Microbiology**. v. 81, n. 3, p.276-280, 2012.
- NEEDLEMAN, R. Control of maltase synthesis in yeast. **Molecular Microbiology**. v. 5, p.2079-2084, 1991.
- NEEDLEMAN, R. B.; MICHELS, C. Repeat family of genes controlling maltose fermentation in *Saccharomyces carlsbergensis*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 3 n. 5, p. 796-802, 1983.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NGUYEN, N. H.; SUH, S.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**. v. 110, p. 1232-1241, 2006.

- PETERING, J. E.; SYMONS, M. R.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. A. Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces* wine yeast strain. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 57, n. 11, p. 3232-3236, 1991.
- POUGACH, K.; VOET, A.; KONDRASHOV, F. A.; VOORDECKERS, K.; CHRISTIAENS, J. F.; BAYING, B.; BENES, V.; SAKAI, R.; AERTS, J.; ZHU, B.; VAN DIJCK, P.; VERSTREPEN, K. J. Duplication of a promiscuous transcription factor drives the emergence of a new regulatory network. **Nature Communications**, 5, p. 1-11, 2014.
- QUINDE, Z.; ULLRICH, S. E.; BAIK, B. K. Genotypic variation in color and discoloration potential of barley-based food products. **Cereal Chemistry**. v. 81 p. 752–758, 2004.
- RAUTIO, J.; LONDESBOROUGH, J. Maltose transport by brewer's yeasts in brewer's wort. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 109, n. 3, p. 251-261, 2003.
- ROSCA, I.; PETROVICI, A. R.; BREBU, M.; STOICA, I.; MINEA, B.; MARANGOCI, N. An original method for producing acetaldehyde and diacetyl by yeast fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 47, p. 949-959, 2016.
- SAERENS, S.; SWIEGERS, J. H. Production of low-alcohol or alcohol-free beer with *Pichia kluyveri* yeast strains. U.S. Patent US9,580,675, 28 February 2017.
- SALGADO, A. M., FOLLY, R. O. M., VALDMAN, B., COS, O., VALERO, F. Colorimetric method for the determination of ethanol by Flow Injection Analysis. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 327-330, 2000.
- SCHAFFRATH, R.; MEINHARDT, F.; KLASSEN, R. Yeast killer toxins: fundamentals and applications. **Physiology and Genetics**. v. 2, p. 87-118, 2018.
- SERRANO, R. Energy Requirements for maltose transport in yeast. **European Journal of Biochemistry**. v. 80, p. 97-102, 1977.

- SHIMIZU, H.; MIZUNO, S.; HIROSHIMA, T.; SHIOYA, S. Effect of carbon and nitrogen additions on consumption activity of apparent extract of yeast cells in a brewing process. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. v. 60, n. 4, p. 163-169, 2002.
- SILVEIRA, M. C. F.; CARVAJAL, E.; BON, E. P. S. Assay for in vivo yeast invertase activity using NaF. **Analytical Biochemistry**. v. 238, p. 26-28, 1996.
- STAMBUK, B. U. A simple experimente illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast α -glucosidase. **Biochemical Education**. v. 27, p. 177-180, 1999.
- STAMBUK, B. U.; ALVES JR, S. L.; HOLLATZ, C.; ZASTROW, C. R. Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 43, p. 370-376, 2006.
- STAMBUK, B. U.; DE ARAUJO, P. S. Kinetics of active α -glucosidase transport by *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Society Yeast Research**. v. 27, n. 1, p. 73-78, 2001.
- STEWART, G. G. Yeast flocculation-sedimentation and flotation. **Fermentation**, v. 4, n. 2, p. 28, 2018.
- SUZZI, G. P.; ROMANO, P.; ZAMBONELLI, C. Flocculation of wine yeasts: frequency, differences and stability of character. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 30, p. 36-39, 1984.
- TESTE, M.; FRANÇOIS, J. M.; PARROU, J. Characterization of a new multigene family encoding isomaltases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the *IMA* family. **Journal of Biological Chemistry**. v. 285, n. 35, p. 26815-26824, 2010.
- TRICHEZ, D.; KNYCHALA, M. M.; FIGUEIREDO, C. M.; ALVES JR, S. L.; DA SILVA, M. A.; MILETTI, L. C.; DE ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. Key amino acids residues of the *AGT1* permease required for maltotriose consumption and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 126, p. 580-594, 2019.

- VARIZE, C. S.; CADETE, R. M.; LOPES, L. D.; CHRISTOFOLETI-FURLAN, R. M.; LACHANCE, M.; ROSA, C. A.; BASSO, L. C. *Spathaspora piracicabensis* f. a., sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 111, p. 525-531, 2018.
- VENTURINI, W. G. **Bebidas alcoólicas. Ciência e Tecnologia**. Blucher, v. 1, 2010
- VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H.; DELVAUX, F. R. Yeast flocculation: what brewers should know. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 61, p. 197-205, 2003.
- VIIGAND, K.; VISNAPUU, T.; MARDO, K.; AASAMETS, A.; ALAMÃE, T. Maltase protein of *Ogataea (Hansenula) polymorpha* is a counterpart to the resurrected ancestor protein ancMALS of yeast maltases and isomaltases. **Yeast**. v. 33, p. 415-532, 2016.
- VIIGAND, K.; ALAMÃE, T. Further study os the *Hansenula polymorpha* MAL locus: characterization of α -glucoside permease encoded by the *HpMAL2* gene. **FEMS Yeast Research**. v. 7, p. 1134-1144, 2007.
- VIDGREN, V.; KANKAINEN, M.; LONDESBOROUGH, J.; RUOHONEN, L. Identification of regulatory elements in the AGT1 promoter of ale and lager strains of brewer's yeast. **Yeast** v. 28, p. 579-594, 2011.
- VOORDECKERS, K.; BROWN, C. A.; VANNESTE, K.; ZANDE, E. V. D.; VOET, A.; MAERE, S.; VERSTREPEN, K. J. Reconstruction of ancestral metabolic enzymes reveals molecular mechanisms underlying evolutionary innovation through gene duplication. **PLOS Biology**, v. 10, n. 12, p. 1-17, 2012.
- WANG, Y.; REN, Y.; ZHANG, Z.; KE, T.; HUI, F. *Spathaspora allomyrinae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from a scarabeid beetle *Allomyrina dichotoma*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 66, p. 2008-2012, 2016.

WEIERSTALL, T.; HOLLENBERG, C. P.; BOLES, E. Cloning and characterization of three genes (*SUT1-3*) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. **Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 871-883, 1999.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Yeast: the practical guide to beer fermentation**. Boulder: Brewers Publications, New York, 2010.

WILLAERT, R. G. **Yeast biotechnology**. MPDI, Suíça, 2017.

ZASTROW, C. R.; HOLLATZ, C.; DE ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 27, p. 34-38, 2001.

ZASTROW, C. R.; MATTOS, M. A.; HOLLATZ, C.; STAMBUK, B. U. Maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**. v. 22, p. 455-459, 2000.