

CLAUDIA HOLLATZ

**ANÁLISE DA FERMENTAÇÃO DE MALTOSE E
MALTOTRIOSE POR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

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

Orientador: Prof. Dr. Boris U. Stambuk

Florianópolis
Fevereiro/2004

Hollatz, Claudia

Análise da Fermentação de Maltose e Maltotriose por *Saccharomyces cerevisiae*/ Claudia Hollatz. – Florianópolis, 2004.

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

1. Maltose. 2. Maltotriose. 3. Fermentação 4. *Saccharomyces cerevisiae*.

*Dedico este trabalho a minha mãe
Maria L. Staab e ao meu irmão
André Hollatz.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Boris U. Stambuk, que me orientou desde minha “infância” no mundo da ciência, tornando-se minha principal referência de pesquisador. Agradeço pela paciência nos primeiros passos e pela confiança concedida na etapa final e, sobretudo, agradeço pela oportunidade de experiência, que foi de fundamental importância, tanto para meu desenvolvimento profissional como para o meu crescimento pessoal.

Aos meus colegas de laboratório pela amizade, companheirismo e apoio prestado. Em especial, Fernanda, Luiz, Marcelo, Ricardo e ao Sérgio, que além de tudo, me auxiliou diretamente na execução experimental deste trabalho.

Aos professores deste laboratório: Carla Tasca, Hernán Terenzi, Nelson H. Gabilán e Rodrigo B. Leal que gentilmente cederam o uso de seus equipamentos quando me foi necessário. Aos professores Afonso Celso D. Bairy e Maria Risoleta F. Marques por permitir a realização de alguns experimentos em seu laboratório.

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

Aos colegas do curso pelo apoio e amizade, em especial às “vizinhas” de laboratório e companheiras na hora do almoço: Eliana, Isabel, Ângela, Taíse, Ana, Juliana e Karim.

Ao Conselho Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Fundação de Ciência e Tecnologia de Santa Catarina (FUNCITEC) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE TABELAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
I. INTRODUÇÃO GERAL	1
I.1. PANIFICAÇÃO: HISTÓRICO E MERCADO	1
I.2. CERVEJA: HISTÓRICO E MERCADO	3
I.3. UTILIZAÇÃO DE AÇÚCARES DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO	6
II. OBJETIVOS	14
II.1. GERAL	14
II.2. ESPECÍFICOS	14
III. MANUSCRITO I	15
III. 1. INTRODUÇÃO	16
III.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
III.2.1. Cepas utilizadas.	19
III.2.2. Meios de cultura e condições de cultivo.	19
III.2.3. Determinação de etanol, glicose e maltose.	20
III.2.4. Reprodutibilidade dos resultados.	20
III.3. RESULTADOS	21
III.4. DISCUSSÃO	30
IV. MANUSCRITO II.....	33
IV. 1. INTRODUÇÃO	34
IV.2. MATERIAIS E MÉTODOS	39
IV.2.1. Cepas utilizadas.	39
IV.2.2. Plasmídeo utilizado.....	40
IV.2.3. Meios de Cultivo e Condições de Crescimento.	40
IV.2.4. Preparação de células competentes de <i>S. cerevisiae</i>	40
IV.2.5. Transformação das células de <i>S. cerevisiae</i>	41
IV.2.6. Determinação da atividade α -glicosidase.	41
IV.2.7. Determinação do transporte de α -glicosídeos.	42
IV.2.8. Determinação de glicose, maltose, maltotriose e etanol.	42
IV.3. RESULTADOS	44
IV.4. DISCUSSÃO	60
V. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	64
V.I. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
V.II. ANEXO.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA I-1. Consumo de pão (kg/habitante/ano)	2
FIGURA I-2. Evolução da produção de cerveja (bilhões de litros) no Brasil.	4
FIGURA I-3. Ação das α - e β -amilases durante degradação do amido.	7
FIGURA I-4. Utilização dos açúcares por <i>S. cerevisiae</i>	8
FIGURA III-1. Crescimento e fermentação de maltose pela cepa selvagem.	22
FIGURA III-2. Crescimento e fermentação de maltose pela cepa mutante.	23
FIGURA III-3. Crescimento e fermentação de maltose pela cepa selvagem CEN.PK2-1C à 10° C.	24
FIGURA III-4. Crescimento e fermentação de maltose pela cepa mutante CENHI13-6D à 10° C.	26
FIGURA III-5. Efeito do estresse salino na utilização de maltose pela cepa CEN.PK2-1C.	27
FIGURA III-6. Efeito do estresse salino na utilização de maltose pela cepa CENHI13-6D.	28
FIGURA III-7. Sensibilidade do mutante <i>csf1</i> Δ a cátions tóxicos.	29
FIGURA IV-1. Crescimento e fermentação de glicose, maltose e maltotriose pela cepa selvagem MC966A	45
FIGURA IV-2. Crescimento e fermentação de glicose, maltose e maltotriose pela cepa BSY09.	47
FIGURA IV-3. Crescimento e fermentação de maltose e maltotriose pela cepa KY73.	48
FIGURA IV-4. Crescimento e fermentação de maltose e maltotriose pela cepa BSY08.	50
FIGURA IV-5. Crescimento e fermentação de glicose, maltose e maltotriose pela cepa CEN.PK2-1C.	52
FIGURA IV-6. Crescimento e fermentação em meio mínimo de glicose, maltose e maltotriose pela cepa MC966A.	53
FIGURA IV-7. Crescimento e fermentação em meio mínimo de glicose, maltose e maltotriose pela cepa MC966A contendo o plasmídeo pJW5.	54
FIGURA IV-8. Crescimento e fermentação em meio mínimo de glicose, maltose e maltotriose pela cepa KY73.	56
FIGURA IV-9. Crescimento e fermentação em meio mínimo de glicose, maltose e maltotriose pela cepa KY73 contendo o plasmídeo pJW5.	57
FIGURA IV-10. Crescimento e fermentação em meio mínimo de glicose, maltose e maltotriose pela cepa 340-2B.	58
FIGURA IV-11. Crescimento e fermentação em meio mínimo de glicose, maltose e maltotriose pela cepa 340-2B contendo o plasmídeo pJW5.	59

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA I-1. Consumo de cerveja em diversos países.	5
TABELA III-1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas.	19
TABELA IV-1. Genótipos das cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas.	39
TABELA IV-2. Velocidades de transporte e hidrólise de maltotriose pelas cepas MC966A e KY73.	49

RESUMO

A fermentação da maltose e maltotriose por *Saccharomyces cerevisiae* é de fundamental importância para diversas aplicações industriais desta levedura. No presente trabalho foi analisado aspectos do metabolismo destes açúcares relevantes para os processos de panificação e cervejaria. Por exemplo, células de leveduras continuam fermentando a massa do pão mesmo quando submetidas a refrigeração, sendo esta uma característica indesejável nas cepas de panificação. Uma vez que a maltose é o principal açúcar encontrado na massa do pão, a influência do frio (10°C) na fermentação deste açúcar foi analisada em uma cepa selvagem de *S. cerevisiae*, e numa cepa *csf1Δ* mutante incapaz de transportar glicose e leucina a baixas temperaturas. A baixa temperatura afeta a cinética da fermentação por diminuir a velocidade de crescimento e rendimento celular final, com quase nenhum etanol produzido a partir de maltose pelas células selvagens a 10°C. A cepa *csf1Δ* foi incapaz de crescer em maltose a 10°C, indicando que o gene *CSF1* é também necessário para a utilização de maltose a baixas temperaturas. Entretanto, o mutante *csf1Δ* também mostrou inibição acentuada da fermentação de glicose e maltose por estresse salino, além de uma significativa sensibilidade a uma série de compostos tóxicos, incluindo higromicina B, Ca²⁺, tetrametilamônio e pH ácido, mas não a altas concentrações de K⁺. Estes resultados indicam que o gene *CSF1* estaria também envolvido na regulação de outros processos fisiológicos, incluindo a homeostase iônica.

Em cervejaria a otimização do processo fermentativo depende da eficiente utilização de maltose e maltotriose pelas células de *S. cerevisiae*. Entretanto, as leveduras têm dificuldade de fermentar a maltotriose, e a incompleta utilização deste açúcar resulta, por exemplo, em uma cerveja de baixa qualidade, com um elevado extrato filtrável e sabor atípico. Para tentar compreender melhor a metabolização da maltotriose, a utilização deste açúcar foi analisada em cepas de *S. cerevisiae* com genótipos definidos e deletadas, ou não, em permeases específicas. A cepa selvagem analisada cresce lentamente em maltotriose, somente após uma extensa fase *lag*, sem produzir etanol durante o crescimento. Este fenótipo (crescimento lento e não fermentativo) não foi alterado pela deleção do gene *AGT1*, indicando que outro(s) transportador(es) estaria(m) provavelmente envolvido(s) na lenta utilização da maltotriose. Por outro lado uma cepa deletada nos transportadores de hexoses (*hxt1-7Δ gal2Δ*) fermentou eficientemente a maltotriose, mas quando o gene *AGT1* foi deletado do genoma a cepa voltou a respirar este açúcar, indicando que a permease codificada pelo *AGT1* é fundamental para a fermentação da maltotriose. Uma vez que a expressão constitutiva dos genes *MAL* é uma característica altamente desejável em cepas de panificação e cervejaria, decidiu-se analisar a contribuição que um gene regulador constitutivo teria na fermentação da maltotriose. Enquanto que algumas cepas *MAL* constitutivas foram capazes de fermentar eficientemente a maltotriose, a transformação de uma cepa selvagem incapaz de fermentar este açúcar com um plasmídeo contendo o gene *MAL63^c* não melhorou a produção de etanol a partir de maltotriose. Estes resultados indicam a existência de outros fatores necessários para a eficiente fermentação de maltotriose por *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Maltose and maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* is of prime importance for several industrial applications of this yeast. In this work we have analyzed several aspects of the metabolism of these sugars relevant to the brewing and baking processes. For example, yeast cells still ferment the dough under refrigerated conditions, a characteristic highly undesirable for baking strains. Since maltose is the most abundant sugar in baking dough, we have studied the influence of cold temperature (10°C) on the fermentation of maltose by a *S. cerevisiae* wild-type strain, and a *csf1Δ* mutant impaired in glucose and leucine uptake at low temperatures. Cold temperature affected the fermentation kinetics by decreasing the growth rate and the final cell yield, with almost no ethanol been produced from maltose by the wild-type cells at 10°C. The *csf1Δ* strain did not grow on maltose when cultured at 10°C, indicating that the *CSF1* gene is also required for maltose consumption at low temperatures. However, this mutant also showed increased inhibition of glucose and maltose fermentation under salt stress, and an increased sensitivity to several toxic compounds, including hygromycin B, Ca²⁺, tetramethylammonium and acidic pH, but not to high K⁺ concentrations. These results indicate that the *CSF1* gene is probably involved in the regulation of other physiological processes, including ion homeostasis.

Fermentation process optimization in the brewing industry depends on the efficient utilization of maltose and maltotriose by *S. cerevisiae*. However, yeasts have a difficulty to ferment maltotriose, and the incomplete utilization of this sugar results, for example, in a low quality beer with high content of fermentable sugars and atypical flavor profiles. To further understand the utilization of maltotriose, we analyzed the uptake of this sugar in yeasts strains with defined genotypes, deleted or not in specific transporters. The wild-type strain analyzed grows slowly in maltotriose, only after an extensive *lag* phase, and no ethanol was produced during growth. This phenotype (slow growth with no fermentation) was not affected by deletion of the *AGT1* gene, indicating that probably other transporters may be involved in the slow utilization of maltotriose. On the other hand, a strain that was deleted in the hexose transporters (*hxt1-7Δ gal2Δ*) fermented maltotriose efficiently, but when the *AGT1* gene was disrupted from the genome the strain started to respire the sugar, indicating that the *AGT1* permease is required for maltotriose fermentation. Since the constitutive expression of *MAL* genes is a desired property of baker's and brewery's strains, we analyzed the contribution that a constitutive regulatory gene would have in maltotriose fermentation. While some *MAL* constitutive strains were capable to efficiently ferment maltotriose, the transformation of a wild-type strain incapable to ferment this sugar with a plasmid harboring the *MAL63^c* gene did not improve ethanol production from maltotriose. These results indicate the existence of other factors required for the efficient fermentation of maltotriose by *Saccharomyces cerevisiae*.

I. INTRODUÇÃO GERAL

I.1. PANIFICAÇÃO: HISTÓRICO E MERCADO

O pão é um alimento que resulta do cozimento de uma massa feita com água, sal e farinha de certos cereais, principalmente trigo. Seu uso na alimentação humana é antiquíssimo, sendo que o homem começou a assar pães há pelo menos 6.000 anos a.C., na chamada Nova Idade da Pedra. O Egito antigo foi o berço do pão moderno, arqueologistas escavando ruínas egípcias encontraram pedras primitivas usadas para moer grãos e câmaras para cozimento (SAMUEL, 1996). Os egípcios foram também os primeiros que usaram os fornos, sendo atribuída a eles a descoberta do acréscimo de líquido fermentado à massa do pão para torná-la leve e macia.

Foram os gregos que introduziram o pão na Europa e os romanos, por sua vez, aprenderam com os gregos a arte de fazer pão. Mas foi somente na Idade Média que o pão conquistou o mundo com o aperfeiçoamento dos métodos de fabricação. Na França, apesar de desde o século XII já ser habitual o consumo de mais de vinte variedades de pães, foi apenas no século XVII que se tornou o centro de fabricação de pães de luxo. Depois, a primazia na fabricação de pão passou a Viena, Áustria. Em 1859, Louis Pasteur, o pai da microbiologia moderna, descobriu como o fermento funcionava. Alimentando-se de farinha de amido, o fermento produzia dióxido de carbono. Este gás expande o glúten na farinha e faz a massa de pão expandir e crescer.

Conforme escreveu o sociólogo e antropólogo Gilberto Freyre, o Brasil conheceu o pão apenas no século XIX. Na colônia se usava o biju de tapioca no almoço, e no jantar a farofa, o pirão escaldado ou a massa de farinha de mandioca feita com caldo de peixe ou de

carne. A atividade da panificação no Brasil se expandiu com a vinda dos imigrantes italianos. Nos grandes centros proliferaram as padarias típicas, sendo que na cidade de São Paulo até hoje existem, em alguns bairros como o Bixiga, padarias que fabricam pães italianos muito apreciados.

Atualmente, o Brasil conta com 52.000 empresas de panificação em seu território, sendo este setor responsável pela criação de cerca de 580.000 empregos diretos. Dados recentes divulgados pela Sindipan (Sindicato Nacional das Indústrias de Panificação) indicam que este setor gerou um faturamento de aproximadamente 28 bilhões de reais no último ano.

Mesmo sendo um produto “popularmente” consumido no Brasil, o pão não chega a ocupar uma posição de destaque, quando comparado aos países europeus (Figura I-1). O consumo atual é de 27 kg/habitante/ano, sendo este valor a metade do recomendado pela OMS (Organização Mundial de Saúde - ONU) e FAO (Food Agricultural Organization). A primeira posição é ocupada pela Alemanha com um consumo de 81 kg/capita. Apesar de não aparecer neste cenário, os altos lucros atingidos nos últimos anos por este setor no Brasil justificam as profundas transformações que suas indústrias vem sofrendo, num movimento em direção à modernização, melhoria de qualidade e aumento de produtividade.

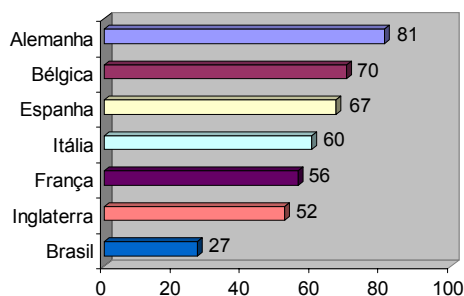


FIGURA I-1. Consumo de pão (kg/habitante/ano) . Fonte: Sindipan (2002).

I.2. CERVEJA: HISTÓRICO E MERCADO

A cerveja é uma bebida não destilada obtida da fermentação alcoólica do mosto de cereal maltado pela ação de leveduras específicas. A história da elaboração e consumo da cerveja tem pelo menos 8.000 anos de existência. Os sumérios e babilônios, antes de 6.000 anos a.C já consumiam esta bebida. Alguns anos mais tarde, a bebida chegou ao Egito, como demonstram hieróglifos. A mais antiga cervejaria descoberta por arqueólogos no Egito data de 5.400 anos a.C. e fabricava vários tipos de cerveja. Os egípcios divulgaram a cerveja entre os povos orientais e foram os responsáveis pelo ingresso da bebida na bacia do Mediterrâneo e, de lá, para a Europa e todo o mundo (SAMUEL, 1996).

Na Idade Média, vários mosteiros fabricavam cerveja, empregando diversas ervas para aromatizá-la, como mirica, rosmarinho, louro, sálvia, gengibre e o lúpulo. Foi graças aos monges do mosteiro San Gallo, na Suíça, que o lúpulo começou a fazer parte, definitivamente, da composição da cerveja. Louis Pasteur e Emil Christian Hansen, na segunda metade do século XIX, foram responsáveis por uma revolução na indústria cervejeira, ressaltando a importância da utilização de culturas puras de leveduras na sua fabricação e o processo de pasteurização para a conservação prolongada da mesma. Estes novos conceitos e tecnologias revolucionaram a qualidade e o caráter da cerveja.

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

Segundo dados da Sindicerv¹ referente ao ano de 2002, o Brasil está entre os quatro maiores fabricantes de cerveja do mundo, com um volume anual de cerca de 8,41 bilhões de litros (Figura I-2). No mercado de cerveja, o Brasil só perde, em volume, para os Estados Unidos (23,6 bilhões de litros/ano), China (18 bilhões de litros/ano) e Alemanha (11,7 bilhões de litros/ano). Este destaque também é refletido a nível das empresas envolvidas, uma vez que entre as maiores cervejarias do mundo, está a Ambev (American Beverage Company), maior cervejaria do Brasil.



FIGURA I-2. Evolução da produção de cerveja (bilhões de litros) no Brasil.

De acordo com o Sindicerv esta atividade industrial tem um faturamento de aproximadamente R\$ 14,5 bilhões por ano, e emprega mais de 150 mil pessoas entre postos diretos e indiretos. Nos últimos cinco anos, as indústrias cervejeiras investiram mais de R\$ 3 bilhões, com 10 novas plantas industriais entrando em operação, além de ampliações e modernizações em fábricas já existentes. No entanto, em relação ao consumo *per capita* o

¹ Sindicato da Cerveja, informações disponíveis no site www.sindicerv.com.br

Brasil, com uma média de 48 litros/ano por habitante, está abaixo do registrado por países como México (50 litros/ano) e Japão (56 litros/ano), e significativamente inferior aos países europeus (Tabela I-1).

TABELA I-1. Consumo de cerveja em diversos países.

CONSUMO PER CAPITA (litros/habitante)	
Rep. Checa	160
Alemanha	123
Reino Unido	97
Austrália	95
Estados Unidos	85
Espanha	75
Japão	56
México	50
Brasil	48
França	36
Argentina	35
China	15

Fonte: Brewers of Europe, Alaface e Sindicerv (2001-2002)

Cabe salientar que apesar da cerveja brasileira ser uma das mais baratas do mundo, os dados acima indicam um potencial de produção e consumo ainda em expansão. Certamente novos avanços e/ou melhorias na produção poderão contribuir para aumentar ainda mais o desempenho das empresas envolvidas.

A pesquisa básica e aplicada impulsionada pela indústria panificadora e cervejeira tem contribuído significativamente para o desenvolvimento do setor, e da ciência em geral, ao longo da história. Consideráveis progressos tem sido evidenciados na otimização da produção e processamento das matérias primas utilizadas, na engenharia de processos de fabricação e comercialização dos produtos, e numa melhor compreensão da fisiologia e metabolismo do principal microrganismo utilizado nestes processos fermentativos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

I.3. UTILIZAÇÃO DE AÇÚCARES DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO

A levedura *S. cerevisiae* é atualmente o principal microorganismo utilizado na produção de bebidas alcóolicas, álcool combustível e panificação (INGLEDEW, 1993). O grande emprego de *S. cerevisiae* pelas indústrias fermentadoras deve-se ao fato destas leveduras serem capazes de fermentar açúcares, mesmo na presença de oxigênio (De DEKEN, 1966; BARFORD & HALL, 1979; VAN DIJKEN & SCHEFFERS, 1986). Além disto, as células de *S. cerevisiae* constituem um excelente modelo experimental de estudo dos fenômenos de biologia celular, molecular e bioquímica das células eucarióticas (BOTSTEIN & FINK, 1988).

Enquanto que os principais substratos empregados na produção de vinho são os monossacarídeos glicose e frutose, no caso da panificação e cervejaria, os principais açúcares a serem utilizados por *S. cerevisiae* são os α -glicosídeos maltose e maltotriose. Em panificação, durante o processo de sovamento da massa a farinha (amido) dos grãos de trigo é hidrolisado por α -amilases (Figura I-3), produzindo pequenos oligossacarídeos contendo 5-10 unidades de glicose unidas por ligações α 1-4, e as chamadas dextrinas (contendo as ramificações com ligações α 1-6) que não podem ser hidrolisadas. A seguir os oligossacarídeos sofrem a ação das β -amilases, que hidrolisam as ligações glicosídicas a cada duas unidades, liberando moléculas de maltose e maltotriose (no caso de oligossacarídeos com número ímpar de moléculas de glicose). Situação semelhante ocorre em cervejaria durante o processo de maltação da cevada, onde o amido dos grãos será transformado em açúcares menores sob a ação das enzimas citadas acima (PANCHAL & STEWART, 1979; SUIHKO et al., 1993).

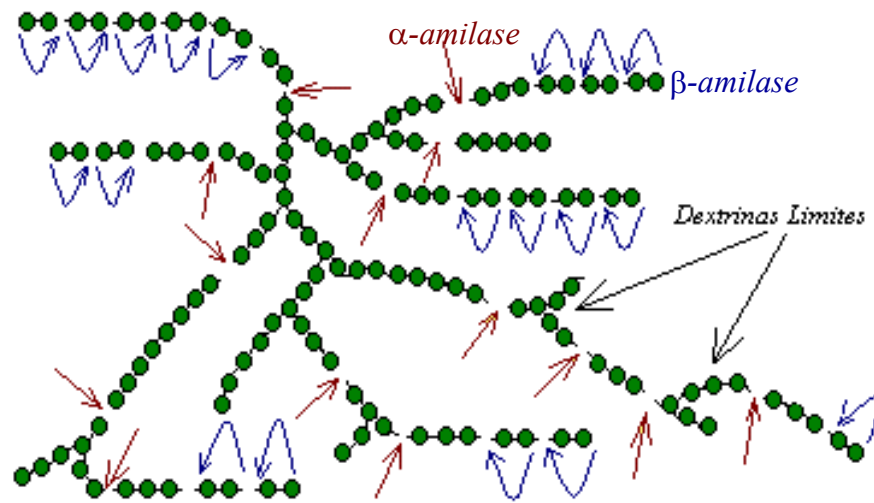


FIGURA I-3. Ação das α - e β -amilases durante degradação do amido.

Assim, o principal açúcar a ser fermentado em cervejaria e panificação é a maltose ($\pm 55\%$ do total de açúcares), seguido da maltotriose ($\pm 18\%$), glicose ($\pm 12\%$), frutose e sacarose ($\pm 3\%$), e finalmente as dextrinas ($\pm 20\%$) que não são utilizadas pelas leveduras durante a fermentação (SUIHKO et al., 1993, WILLAERT, 2001). Entretanto, as células de *S. cerevisiae* apresentam uma clara e definida preferência pela utilização dos diferentes açúcares presentes nestes processos fermentativos: a glicose, a frutose e a sacarose constituem os primeiros substratos a serem utilizados pelas células, seguidos da maltose, e finalmente a maltotriose (D'AMORE et al., 1989; SUIHKO et al., 1993).

A utilização dos açúcares pelas leveduras envolve inicialmente o seu transporte para o interior da célula (LAGUNAS, 1993). No caso dos monossacarídeos glicose e frutose, estes açúcares são captados para o interior da célula pelo mesmo sistema de transporte, utilizando o processo de difusão facilitada (Figura I-4). Atualmente, já foram caracterizados inúmeros transportadores de hexoses (*HXT1* – *HXT17*), sendo que estes diferem não só na afinidade pela glicose, mas apresentam um complexo padrão de expressão regulada entre outros fatores

pela própria presença dos açúcares no meio (OZCAN & JOHNSTON, 1999). Todas estas permeases transportam também frutose e manose, porém com afinidades menores do que pela glicose. Por este motivo a glicose do meio é captada mais rapidamente do que a frutose (BOLES & HOLLEMBERG, 1997).

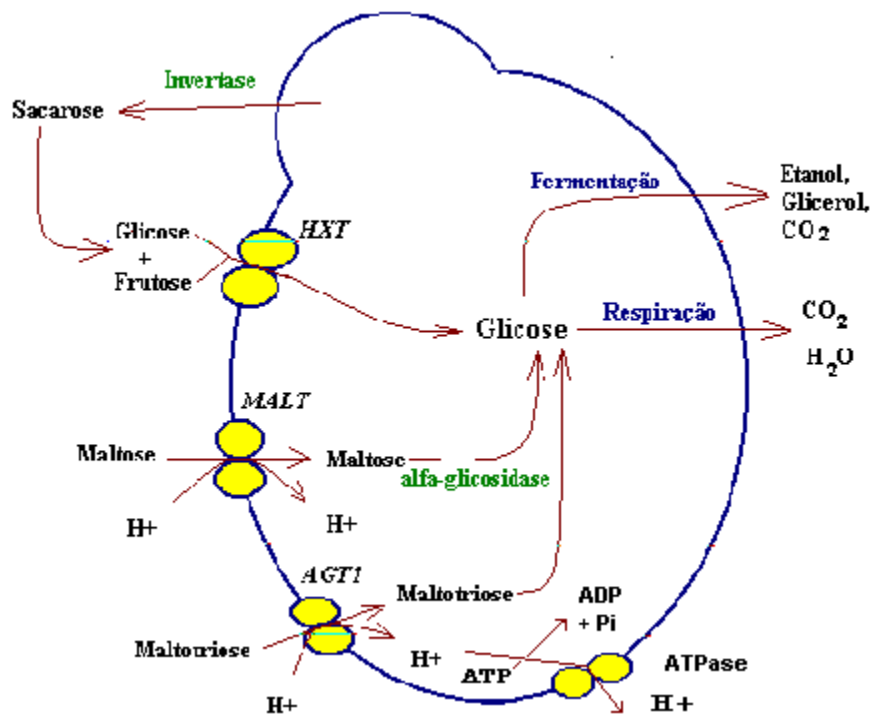


Figura I-4. Utilização dos açúcares por *S. cerevisiae*.

A sacarose, um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma de frutose unidas através de uma ligação α -1 β -2, é hidrolisada extracelularmente por invertases específicas (Fig. I-4), sendo que os monossacarídeos formados são captados pelos transportadores de hexoses descritos acima. Uma vez transportadas para o interior das células, a glicose e a frutose são degradadas pela via glicolítica até piruvato que pode ser totalmente convertido a CO₂ e H₂O pelo ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, ou então, ser degradado até etanol e CO₂ pelo processo de fermentação alcoólica (CARLSON, 1987; GANCEDO & SERRANO, 1989; TRUMBLY, 1992).

A utilização da maltose pelas leveduras envolve inicialmente seu transporte ativo para o interior da célula, onde a seguir irá sofrer a ação da maltase (α -glicosidase, E.C. 3.2.1.20) liberando as moléculas de glicose que serão metabolizadas pela glicólise (Fig. I-4). Para que uma cepa da levedura *S. cerevisiae* seja capaz de fermentar a maltose é necessário a presença de pelo menos um dos 5 loci *MAL* (*MAL1* a *MAL4* e *MAL6*), cada um contendo os três genes necessários à metabolização da maltose: o gene *MALx1* (onde *x* corresponde ao locus *MAL* envolvido) que codifica para o transportador de maltose, o gene *MALx2* que codifica para a maltase, e o gene *MALx3* que regula (induz na presença da maltose) a expressão dos outros dois genes (revisto por NEEDLEMAN, 1991). Além da indução, outro mecanismo de regulação da transcrição é a repressão dos genes *MAL* pela glicose. A presença deste açúcar no meio ativa a proteína Mig1p, que bloqueia as regiões promotoras UAS_{mal} impedindo a expressão gênica (revisto por NEEDLEMAN, 1991; HORÁK, 1997). Por este motivo é que durante a fermentação do mosto cervejeiro verifica-se que enquanto a glicose, frutose e sacarose estão presentes no meio de cultivo, a maltose e maltotriose não são utilizadas pelas células (D'AMORE et al., 1989; ERNANDES et al., 1992, 1993; SUIHKO et al., 1993).

O transportador de maltose é uma permease específica para maltose e turanose (CHANG et al., 1989) capaz de transportar ativamente o açúcar através do co-transporte com H^+ (portanto um *symport* maltose- H^+), mesmo a favor do gradiente de concentração (SERRANO, 1977; revisto por LAGUNAS, 1993; HORÁK, 1997). O co-transporte de H^+ com maltose impõe alterações no gradiente eletroquímico da membrana, que as células tentam compensar imediatamente expulsando íons K^+ presentes no interior da célula (LOUREIRO-DIAS & PEINADO, 1984). A seguir a metabolização da glicose (proveniente da quebra da maltose), assim como a própria entrada de H^+ , é capaz de ativar a H^+ -ATPase que expulsa o excesso de prótons do interior da célula às custas da hidrólise de ATP (SERRANO, 1983). Entretanto, a expulsão de H^+ pode levar a um excesso de cargas positivas no exterior da célula

e negativas no interior, resultando em uma hiperpolarização da membrana celular. Para reestabelecer o equilíbrio iônico o potássio retorna novamente à célula via transportadores específicos codificados pelos genes *TRK1* e *TRK2* (MULET et al., 1999).

Por exemplo, foi verificado que antibióticos como nistatina e anfotericina B inibem a fermentação de maltose por interagirem com esteróis da membrana plasmática aumentando sua permeabilidade para H^+ e, como consequência, ocorre o colapso do gradiente eletroquímico necessário para a entrada de maltose na célula (PALACIOS & SERRANO, 1978). Altas concentrações de NaCl podem também inibir a captação de maltose (TRAINOTTI & STAMBUK, 2001) pois a entrada de grandes quantidades de Na^+ na célula leva ao aumento da captação de K^+ para manter a homeostase iônica intracelular, perturbando o gradiente eletroquímico através da membrana celular. O estresse salino induz também mudanças na composição lipídica da membrana da levedura, provocando um aumento na quantidade de fosfatidilcolina e decréscimo de fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (SHARMA et al., 1996). Estas alterações na composição lipídica da membrana podem também afetar a atividade de transporte, como recentemente demonstrado para o transporte de aminoácidos e maltose em leveduras com quantidades diminuídas de fosfatidiletanolamina (ROBL et al., 2000; OPERAKOVÁ et al., 2002).

Além da regulação da transcrição e do gradiente eletroquímico através da membrana plasmática, para que o transportador de maltose chegue até a membrana este deve percorrer uma via biossintética e secretora que se inicia no retículo endoplasmático rugoso. A partir daí, a permease é transportada para o Golgi e deste para a membrana plasmática através de vesículas. A permanência da permease na membrana também é regulada a nível pós-tradução pela fonte de carbono, sendo que a glicose provoca a inativação catabólica desta proteína de membrana, promovendo sua endocitose e degradação proteolítica nos vacúolos (RIBALLO et al., 1995; MEDINTZ et al., 1996).

Em relação a maltotriose, pouco se sabe ainda sobre a sua utilização pelas leveduras, e análises iniciais revelaram que este açúcar possui um transportador distinto do transportador de maltose (HARRIS & THOMPSON, 1960). Analisando um alelo do transportador de maltose HAN et al. (1995) caracterizaram o gene *AGTI* como responsável pelo transporte de uma série de α -glicosídeos, incluindo maltotriose, isomaltose, α -metil-glicosídeo, palatinose, trealose, melezitose e turanose. Tanto o transportador de maltose quanto o transportador codificado pelo gene *AGTI* apresentam uma grande homologia estrutural, e ambos permitem a captação ativa dos açúcares pelo co-transporte com H^+ (STAMBUK et al., 1998; 1999). Condizente com a importância que o transporte de maltose e maltotriose têm em cervejaria, constatou-se que a maioria das cepas industriais possuem pelo menos um transportador dos loci *MAL*, e que praticamente todas contêm também o gene *AGTI* (JESPERSEN et al., 1999). O transportador *AGTI* permite a captação de maltose e maltotriose com baixa afinidade ($K_m \sim 20$ mM) quando comparado com os transportadores de maltose codificados pelos genes *MALx1*, que possuem alta afinidade ($K_m \sim 5$ mM) pelo substrato (STAMBUK et al., 1999; STAMBUK & DE ARAÚJO, 2001). Quanto à enzima responsável pela hidrólise da maltotriose, não existe relato na literatura que indique a existência de alguma α -glicosidase específica para este açúcar (STEWART & RUSSEL, 1986). Sabe-se que algumas isoformas da α -glicosidase induzidas pela maltose são capazes de hidrolisar a maltotriose, porém com uma atividade de hidrólise correspondente a cerca de 10% da observada para a hidrólise da maltose (TABATA et al., 1984). Recentemente foi caracterizado que não só maltose e maltotriose compartilham as mesmas isoformas da α -glicosidase, como ambos açúcares induzem a expressão das mesmas isoformas (ZASTROW et al., 2001).

Como mencionado acima, as leveduras têm dificuldade de fermentar a maltotriose já que este açúcar é o último a ser utilizado pelas células durante a fermentação do mosto cervejeiro. A incompleta utilização deste açúcar resulta, por exemplo, em uma cerveja de

baixa qualidade com sabor atípico e um elevado extrato filtrável (STEWART & RUSSEL, 1993). Esta peculiaridade do processo fermentativo tem levado a diversos investigadores pesquisar não só as características fisiológicas das células durante a utilização deste açúcar, como também parâmetros físico-químicos e ambientais que poderiam favorecer a utilização desta fonte de carbono pelas leveduras (ZHENG et al., 1994a; 1994b; REES & STEWART, 1997, 1999). Assim, foi recentemente caracterizado (ZASTROW et al., 2000) que uma série de leveduras industriais não fermentam a maltotriose, mas utilizam este açúcar aerobicamente uma vez que o crescimento nesta fonte de carbono é inibida na presença de antimicina A (um inibidor da cadeia respiratória). A utilização deste inibidor permitiu a seguir isolar cepas cervejeiras capazes de fermentar eficientemente a maltotriose e, a análise destas células de levedura permitiu concluir que a não fermentação deste açúcar seria provavelmente consequência da baixa expressão da permease codificada pelo gene *AGTI* (ZASTROW et al., 2001).

Independentemente da energética do transporte (difusão facilitada ou transporte ativo), muitos trabalhos têm demonstrado que o passo limitante na fermentação de açúcares pelas células de *S. cerevisiae* é o transporte através da membrana plasmática (SALMON & MAURICIO, 1994; KODAMA et al., 1995; ZASTROW et al., 2001). Já foi demonstrado que quando os açúcares são captados com baixas velocidades, o seu metabolismo é essencialmente respiratório (POSTMA et al., 1989). No caso da maltose, o influxo aumentado deste açúcar para o interior da célula, com o seu consequente acúmulo, atuaria como um sinal na indução dos genes *MAL* permitindo o crescimento fermentativo. De fato, foi verificado que tanto a atividade de transporte como os níveis de concentração intracelular da maltose estão correlacionados aos níveis de indução da expressão dos genes *MAL*, ou seja quanto maior a concentração externa de maltose, maior a atividade de transporte e de acúmulo deste açúcar intracelularmente, resultando em um elevado nível de indução gênica (WANG et al., 2002).

Em relação à maltotriose, não está claro se é este o açúcar indutor, ou se é um produto (p.ex. maltose) do processo de hidrólise pela α -glicosidase. De qualquer forma os níveis de expressão dos transportadores e enzimas intracelulares é menor quando as células estão metabolizando a maltotriose, comparado com células metabolizando a maltose (ZASTROW et al., 2001).

Como já mencionado acima, a otimização dos processos fermentativos utilizados em cervejaria e panificação depende da eficiente utilização de maltose e maltotriose pelas células de *S. cerevisiae*. Os conhecimentos adquiridos em relação à utilização da maltose pelas leveduras tem permitido, por exemplo, desenvolver cepas com expressão incrementada do transportador de maltose. Estas leveduras fermentam mais rápido e eficientemente este açúcar, já foram patenteadas e encontram-se atualmente em uso pelas indústrias (OSINGA et al., 1989b; ALDHOUS, 1990; KODAMA et al., 1995; BUTLER, 1996). Pretendemos, a seguir, fazer uma análise mais detalhada da metabolização da maltose e maltotriose pelas leveduras no intuito de otimizar a fermentação destes açúcares por *S. cerevisiae*.

II. OBJETIVOS

II.1. GERAL

Estudar os mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos na utilização de maltose e maltotriose por *Saccharomyces. cerevisiae*, visando contribuir para a otimização do processo fermentativo em cervejaria e panificação.

II.2. ESPECÍFICOS

II.2.1. *Analisar o efeito da baixa temperatura e do gene CSF1 na fermentação de maltose.*

Em panificação existe enorme interesse em estocar sob refrigeração a massa preparada, para sua posterior utilização conforme a demanda de venda do produto. Entretanto, o efeito deste tipo de tratamento na fermentação da maltose por *S. cerevisiae* ainda não foi caracterizado em detalhe.

II.2.2. *Analisar a utilização da maltotriose por cepas com genótipos conhecidos.*

Até o presente a utilização de maltotriose tem sido analisada, na maioria das vezes, em cepas industriais com genótipos indeterminados. O efeito do número de genes *MAL*, do tipo de regulação (induzível ou constitutiva), ou ainda a presença ou não do transportador *AGT1* em cepas com genótipo conhecido será avaliada quanto à fermentação, ou não, da maltotriose.

III. MANUSCRITO I

**Regulação da Fermentação de Maltose em
Saccharomyces cerevisiae por Baixas
Temperaturas e *CSF1*.**

III.1. INTRODUÇÃO

O processo de panificação onde a massa é estocada sob refrigeração e assada apenas quando há demanda do produto, traz inúmeras vantagens para as padarias e indústrias panificadoras (GAJDEROWICZ, 1979). Atualmente existem no mercado muitos produtos de panificação, em sua maioria fermentados por agentes químicos, que podem ser estocados sob refrigeração por várias semanas. Porém, suas qualidades organolépticas tendem a ser inferiores quando comparadas aos produtos que utilizam leveduras na sua fermentação. Os fermentos biológicos comumente utilizados não são aplicáveis quando se deseja estocar a massa de pão sob refrigeração por longos períodos. Seu uso torna-se limitado uma vez que a maioria das leveduras continuam fermentando sob baixas temperaturas, mesmo próximas a 0°C. A continuidade da fermentação da massa durante a refrigeração determina problemas de estocagem (o volume da massa aumenta com o tempo) e, o conseqüente consumo dos açúcares presentes na massa, altera as propriedades físico-químicas do produto (p.ex. a superfície perde cor e deixa de ser crocante), além disto a performance e a viabilidade das células fermentando açúcares tende a ser inferior após o estresse térmico (VAN DIJCK et al., 1995; ATTFIELD, 1997). Apesar de já existirem técnicas e/ou aditivos químicos que permitem melhorar a performance das leveduras após refrigeração (MYERS et al., 1998), seu uso ainda é limitado. Comercialmente, o ideal seria utilizar uma cepa de levedura capaz de interromper o processo fermentativo quando submetida a baixas temperaturas, mas que fosse capaz de restaurar sua capacidade de fermentação na temperatura ambiente.

Desta forma vários grupos de pesquisa encontram-se ativamente isolando, caracterizando e modificando leveduras de panificação apropriadas para o uso nos diferentes

processos de panificação (RANDEZ-GIL et al., 1999), incluindo cepas de panificação que possam ser utilizadas em panificação após estocagem no frio (KYOGOKU & OUCHI, 1995; GYSLER & NIEDERBERGER, 2002). Mutantes de *S. cerevisiae* sensíveis ao frio já foram descritos na literatura (MOIR & BOTSTEIN, 1982; SINGH & MANNEY, 1974; STRAUSS & GUTTHRIE, 1991), mas não existem dados sobre sua atividade e/ou performance fermentativa. Com este objetivo, KYOGOKU & OUCHI (1995) conseguiram isolar leveduras mutantes a partir de cepas de panificação com um fenótipo sensível à fermentação a baixas temperaturas (mutantes *csf*, do inglês *c*old-*s*ensitive *f*ermentation). Estes mutantes (*csf1* a *csf8*) produzem muito menos CO₂ na massa quando comparado à cepa parental a temperaturas abaixo de 15°C (praticamente cessam a fermentação a 5°C), mas sua atividade fermentativa é restaurada aos níveis normais quando a temperatura é elevada acima de 25°C.

Recentemente, TOKAI e colaboradores (2000) clonaram um gene que complementa a mutação *csf1*, e observaram que o gene *CSF1* (ORF YLR087c) está relacionado com um mecanismo, ainda desconhecido, de captação de nutrientes a baixas temperaturas. O gene *CSF1* (8.874 pb) codifica para uma proteína relativamente grande (M_r 338 kDa) com 2.958 aminoácidos. A sequência de aminoácidos da proteína não apresenta nenhum motivo ou domínio conhecido, além da existência de 4-7 possíveis segmentos transmembrana. Os resultados apresentados indicam que o gene *CSF1*, quando mutado ou deletado do genoma da levedura, provoca a perda da capacidade fermentativa das células a baixas temperaturas por inibir a captação de glicose e leucina do meio a temperaturas abaixo de 15°C (TOKAI et al., 2000). Entretanto, todas estas caracterizações foram realizadas em meios de cultura com glicose como fonte de carbono e, não existem dados sobre o comportamento deste mutante em relação à fermentação, ou não, da maltose. De fato, a maioria de trabalhos sobre o efeito do frio na performance fermentativa e fisiologia da levedura *S. cerevisiae* tem sido realizados utilizando-se glicose como fonte de carbono (KYOGOKU & OUCHI, 1995; GYSLER &

NIEDERBERGER, 2002; RODRIGUEZ-VARGAS et al., 2002; SAHARA et al., 2002). Embora os dados obtidos sejam de considerável relevância científica, o ideal seria analisar o efeito do frio em fontes de carbono de utilizadas em processos industriais. Considerando que a maltose é o principal açúcar encontrado na massa de pão e, considerando que a eficiente fermentação desta fonte de carbono é um parâmetro importante para a obtenção de um produto de qualidade (ODA & OUCHI, 1990; HIGGINS et al., 1999), no presente trabalho foi analisada a capacidade de células de *S. cerevisiae* fermentarem maltose a baixas temperaturas e o possível envolvimento do gene *CSF1* neste processo.

III.2. MATERIAIS E MÉTODOS

III.2.1. CEPAS UTILIZADAS.

Foram analisadas duas cepas de *S. cerevisiae*, cujos genótipos encontram-se detalhados na Tabela III-1. Ambas as cepas foram gentilmente cedidas pela Dra. A.F. Maris, obtidas da EUROSCARF (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis, Frankfurt – Alemanha), e descritas por ENTIAN et al. (1999).

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

Cepa	Característica	Genótipo
<i>CEN.PK2- 1C</i>	Selvagem	<i>MATa ura3-52 his3Δ1 leu2-3_112 trp1-289 MAL2-8^c SUC2</i>
<i>CENHI13-6D</i>	<i>csf1Δ</i>	<i>MATa ura3-52 his3Δ1 leu2-3_112 trp1-289 MAL2-8^c SUC2 YLR087c::URA3</i>

III.2.2. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO.

Os meios de cultura utilizados contém 2% bacto-peptona, 1% extrato de levedura (ambos da Difco), 2% da fonte de carbono de interesse: glicose ou maltose e, no caso de meios sólidos, acrescidos de 2% bacto-agar. Alternativamente, foram preparados meios contendo 1,0 M NaCl, 1,3 M KCl, 1mM tetrametilamônio (TMA), 0,2 M CaCl₂, ou 0,1 mg/ml higromicina B (HygB). Estes dois últimos compostos foram esterilizados por filtração e adicionados aos meios já autoclavados a 120°C por 20 min. Todos os meios tiveram seu pH ajustado para pH 5,0 com HCl. Placas com meio a pH 3,5 foram preparadas utilizando-se meio 2x concentrado contendo 50 mM ácido succinico, o pH desejado foi ajustado com Tris, e a este meio foi adicionado a uma solução 2x concentrada de bacto-ágar, após esterilização em separado por autoclave.

As células, pré-crescidas até a fase estacionária em meio contendo glicose, foram inoculadas em erlenmeyers contendo 1/5 do seu volume de meio líquido, sendo a cultura incubada em um agitador orbital a 10 ou 30°C e 160 rotações por minuto. O crescimento celular foi medido determinando-se a massa celular a partir de medidas espectrofotométricas a 570 nm.

III.2.3. DETERMINAÇÃO DE ETANOL, GLICOSE E MALTOSE.

Amostras das culturas foram centrifugadas (2.600 g, 1 min), e os sobrenadantes foram utilizados para a determinação da produção de etanol e consumo de glicose e maltose. Etanol e glicose foram determinados através de kits enzimáticos comerciais (Sigma e Analisa Diagnostica Ltda., respectivamente). A maltose foi determinada colorimetricamente através da reação com metilamina conforme descrito por Cáceres et al. (2000).

III.2.4. REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS.

Todos os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes. Resultados representativos são mostrados.

III.3. RESULTADOS

Na intenção de confirmar os dados descritos na literatura (TOKAI et al., 2000), foi avaliado o crescimento das cepas *CEN.PK2-1C* (parental selvagem) e *CENHI13-6D* (mutante *csf1Δ*) às temperaturas de 10°C e 30°C em meios de cultura contendo glicose como fonte de carbono. Tanto a cepa selvagem como a cepa mutante apresentaram o mesmo perfil de crescimento e fermentação de glicose a 30°C, enquanto que a cepa *CENHI13-6D* foi incapaz de crescer nesta fonte de carbono a 10°C mesmo após >300 h de cultivo (dados não mostrados), confirmando o fenótipo já descrito para o mutante *csf1Δ*. A seguir avaliamos o perfil fermentativo destas cepas em meios de cultura contendo maltose como fonte de carbono. Como pode ser observado nas Figuras III-1 e III-2, tanto a cepa selvagem quanto a cepa *csf1Δ* apresentaram um comportamento semelhante quando crescidas em meios contendo maltose a temperatura de 30°C. Observa-se em ambos os casos um crescimento exponencial nas primeiras 20 h, acompanhado do rápido declínio da maltose no meio de cultura e concomitante produção de etanol pelas células atingindo até ~10 g ethanol L⁻¹.

A temperatura de 10°C afetou significativamente os parâmetros de crescimento da cepa selvagem em maltose (Figura III-3): tanto a velocidade de crescimento quanto a biomassa produzida foram menores nesta temperatura do que quando as células foram incubadas a 30°C. A maltose só foi consumida após uma significativa fase *lag* (>200 h) com praticamente nenhum etanol (~1.5 g L⁻¹) sendo produzido durante o crescimento, o que contrasta com a fermentação de glicose nestas mesmas condições (10°C) que conseguiu produzir 4,5 g etanol L⁻¹. A cepa mutante *csf1Δ* foi incapaz de crescer e consumir a maltose quando submetida a esta

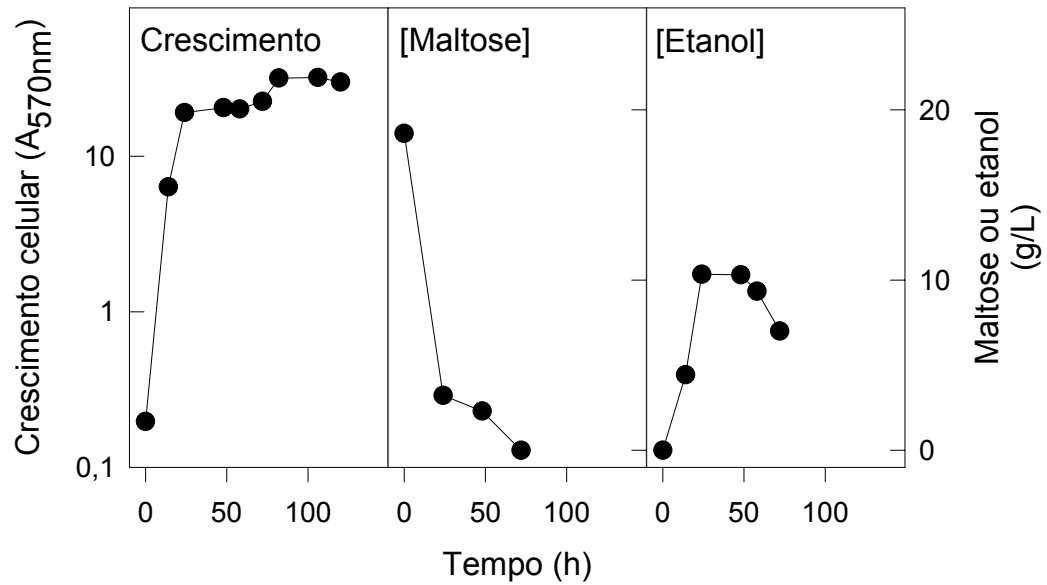


FIGURA III-1. Crescimento e fermentação de maltose pela cepa selvagem *CEN.PK2-1C* à 30°C. O crescimento, consumo de maltose e a produção de etanol foram determinados em meio de cultura contendo 2% de maltose como fonte de carbono.

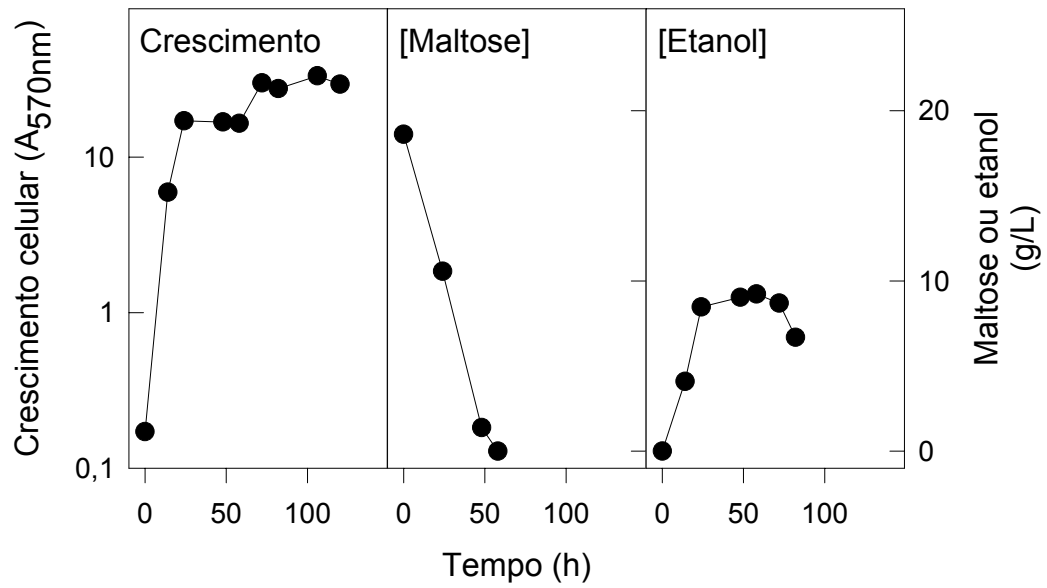


FIGURA III-2. Crescimento e fermentação de maltose pela cepa mutante *CENHI13-6D* à 30°C. O crescimento, consumo de maltose e a produção de etanol foram determinados em meio contendo 2% de maltose como fonte de carbono.

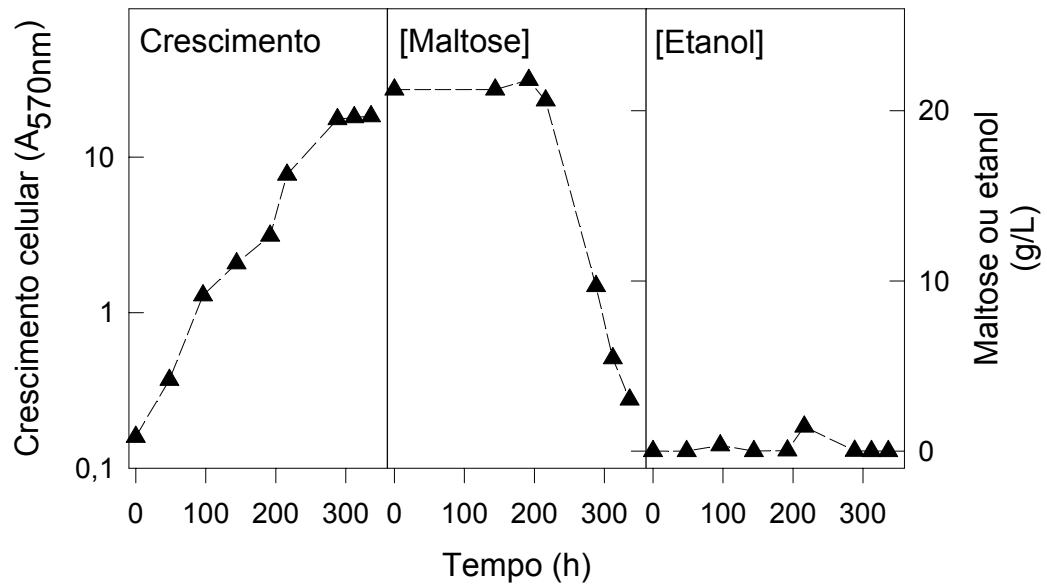


FIGURA III-3. Crescimento e fermentação de maltose pela cepa selvagem *CEN.PK2-1C* à 10° C. O crescimento, consumo de maltose e a produção de etanol foram determinados em meio contendo 2% de maltose como fonte de carbono.

mesma temperatura (Figura III-4), indicando que o gene *CSFI* estaria também envolvido na captação de maltose a baixas temperaturas.

No intuito de melhor caracterizar a função da proteína Csf1p no metabolismo celular foi analisado o envolvimento desta proteína na tolerância das células ao estresse salino (ENTIAN et al. 1999), um tipo de estresse que afeta significativamente mais a fermentação da maltose do que da glicose pelas células de *S. cerevisiae* (TRAINOTTI & STAMBUK, 2000). Na Figura III-5 pode-se observar que a cepa selvagem, na presença de 1M de NaCl, consumiu a maltose lentamente, sendo este açúcar totalmente depletado do meio somente após 100 h de crescimento. Durante este lento crescimento as células produzem significativamente menos etanol do que na ausência do sal. Já a cepa mutante, apresentou uma maior sensibilidade ao efeito do sal uma vez que o consumo deste açúcar foi completamente inibido pelo estresse salino, não sendo verificado crescimento celular, nem consumo do substrato ou produção de etanol (Figura III-6). O estresse salino inibiu também a utilização da glicose pela cepa mutante *csf1Δ* (dados não mostrados, ENTIAN et al. 1999), o que indicava que o gene *CSFI* estaria envolvido em outros processos fisiológicos, incluindo a homeostase iônica da célula.

Considerando que a atividade dos transportadores de K^+ é fundamental para conferir resistência ao NaCl (GOMEZ et al., 1996), principalmente por permitir a despolarização da membrana plasmática, verificamos se a cepa mutante *csf1Δ* seria mais sensível a outros cátions tóxicos que dependem da despolarização-hiperpolarização da membrana para exercer seu efeito tóxico (MADRID et al., 1998; MULET et al., 1999). Como pode se observar na Figura III-7, a cepa mutante mostrou maior sensibilidade, em relação a cepa parental, ao estresse provocado por uma série de compostos tóxicos, incluindo higromicina B, tetrametilamônio, $CaCl_2$ e prótons (pH 3,5), mas não a altas concentrações de K^+ . Novamente, a maior sensibilidade aos cátions tóxicos pela cepa mutante *csf1Δ* também foi verificado em meios contendo glicose como fonte de carbono (dados não mostrados).

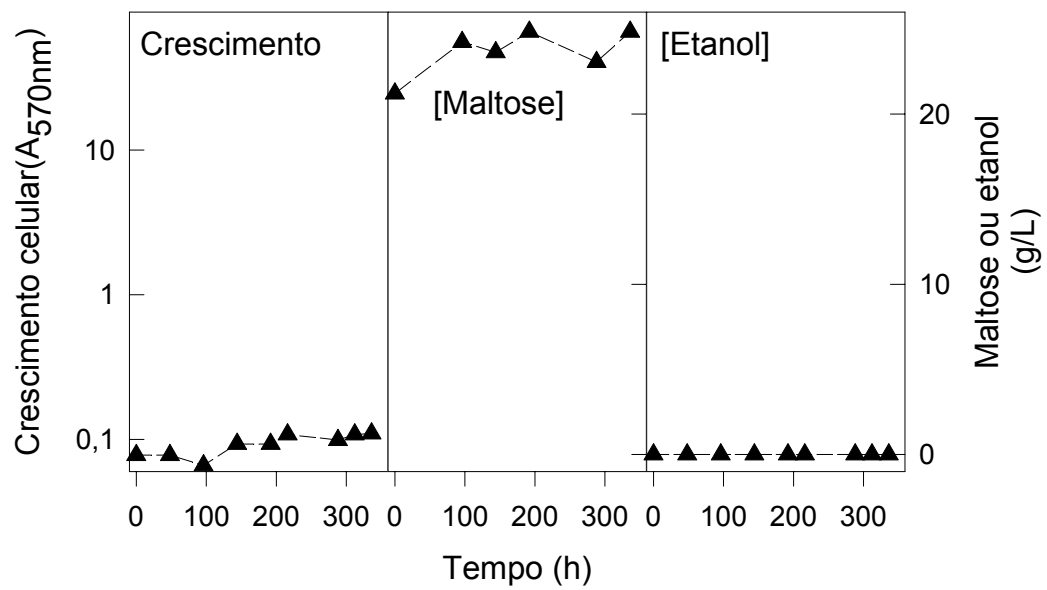


FIGURA III-4. Crescimento e fermentação de maltose pela cepa mutante *CENHI13-6D* à 10° C. O crescimento, consumo de maltose e a produção de etanol foram determinados em meio contendo 2% de maltose como fonte de carbono.

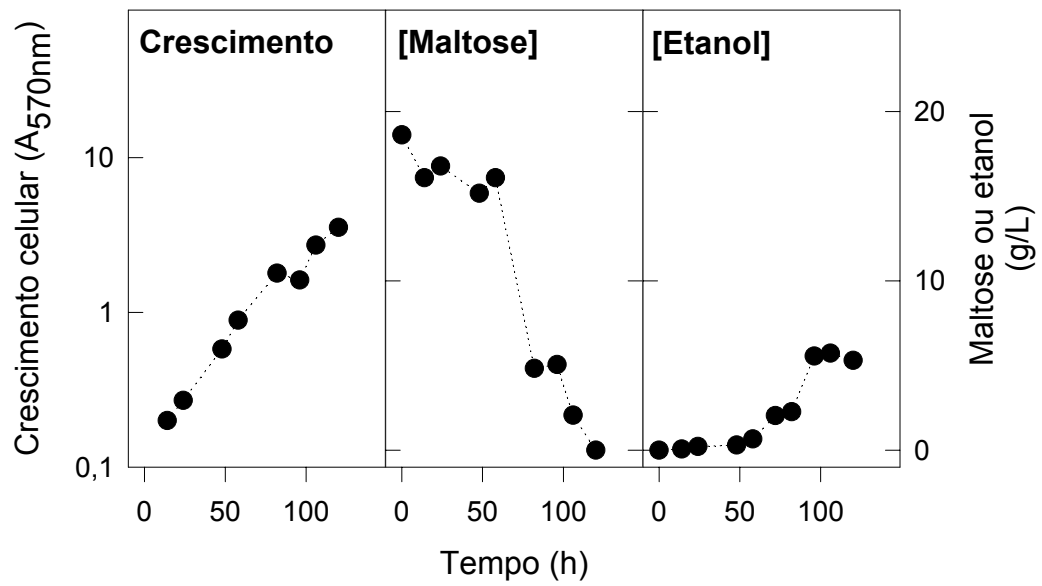


FIGURA III-5. Efeito do estresse salino na utilização de maltose pela cepa *CEN.PK2-1C*.

O crescimento, consumo de maltose e a produção de etanol foram determinados em meio contendo 2% de maltose como fonte de carbono na presença de 1 M de NaCl.

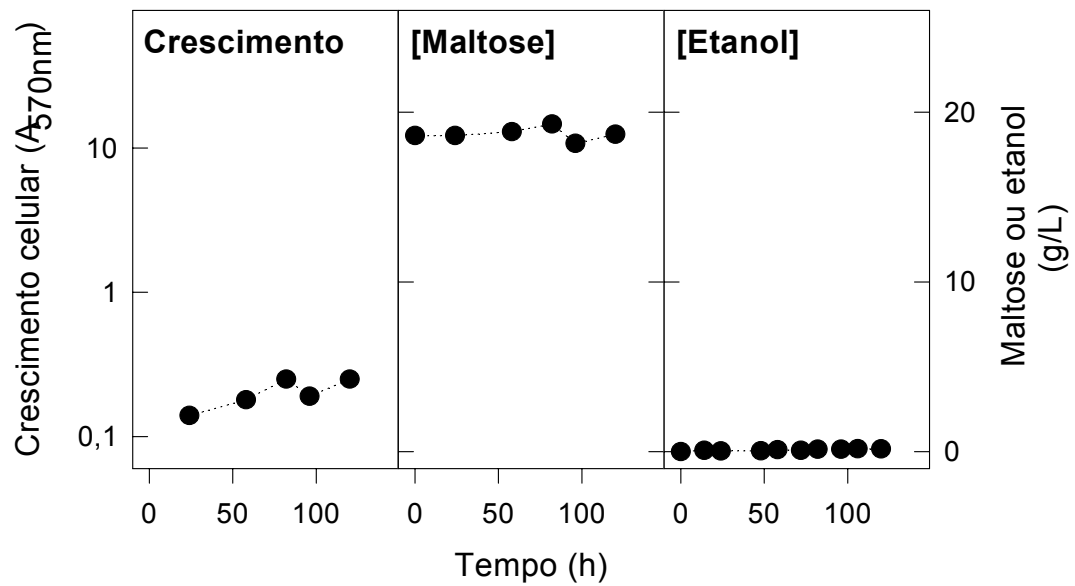


FIGURA III-6. Efeito do estresse salino na utilização de maltose pela cepa *CENHI13-6D*.

O crescimento, consumo de maltose e a produção de etanol foram determinados em meio contendo 2% de maltose como fonte de carbono na presença de 1 M de NaCl.

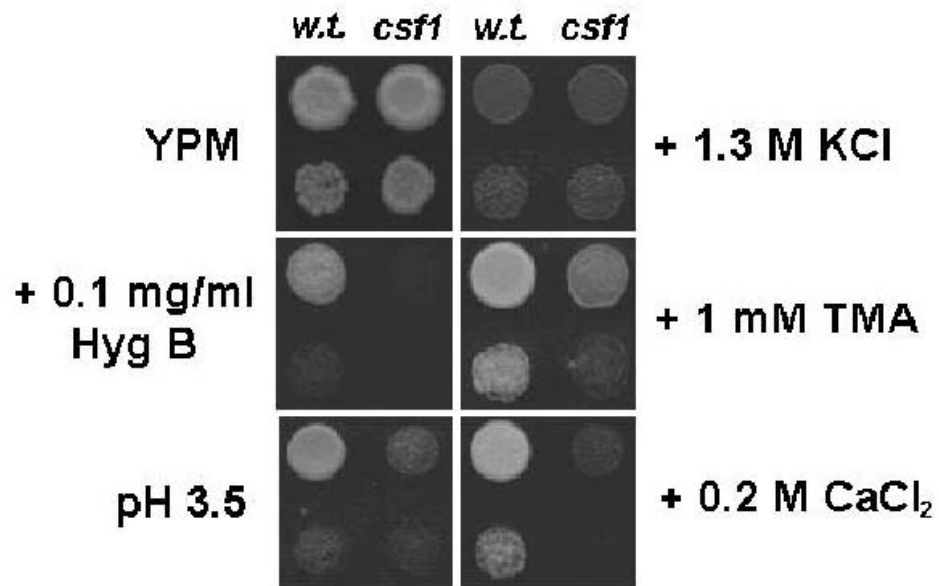


FIGURA III-7. Sensibilidade do mutante *csf1*Δ a agentes tóxicos. Diluições seriadas (1/10 e 1/100 em água) da cepa selvagem *CEN.PK2-1C* (*w.t.*) e da cepa mutante *CEN.H113-6D* (*csf1*) foram inoculadas em meio YEP contendo 2% de maltose (YPM), ou neste meio contendo as concentrações indicadas de agentes tóxicos ou tampão ajustado a pH 3,5. As células foram crescidas durante dois dias a 30°C.

III.4. DISCUSSÃO

O transportador de maltose é uma permease capaz de transportar ativamente o açúcar através do co-transporte com H^+ , mesmo a favor do gradiente de concentração (SERRANO, 1977; CHANG et al., 1989; revisto por LAGUNAS, 1993; HORÁK, 1997). Desta forma, o gasto energético envolvido na captação de maltose do meio pode chegar a consumir 25% da energia gerada durante a fermentação do açúcar (WEUSTHUIS et al., 1993). Este maior gasto energético, comparado à utilização da glicose pelas leveduras, certamente deve contribuir para uma maior susceptibilidade ao frio quando as células estão fermentando a maltose. Assim, provavelmente menos carbono é utilizado para a produção de etanol, para poder ser direcionado à maior produção de energia para a manutenção celular durante o estresse de temperatura. Nossos resultados são condizentes também com a significativa inibição que o transporte de maltose sofre quando submetido a baixas temperaturas (RAUTIO & LONDESBOROUGH, 2003). Enquanto que a afinidade do transportador pela maltose permanece inalterado entre 30 e 0°C, a velocidade máxima de transporte a 10°C cai para ~20% do valor encontrado a 30°C (RAUTIO & LONDESBOROUGH, 2003). As menores taxas de captação do açúcar do meio, somadas ao maior gasto energético das células durante o estresse térmico, certamente contribuem para a baixa atividade fermentativa com maltose quando as leveduras são submetidas a 10°C.

Nossos resultados também demonstram que a proteína codificada pelo gene *CSFI* é necessária para que as leveduras utilizem maltose a baixas temperaturas. Nos últimos anos têm sido caracterizadas uma série de proteínas envolvidas no correto direcionamento de transportadores ou permeases para a membrana celular. Como exemplos podemos citar a proteína codificada pelo gene *SHR3*, necessária para que permeases de aminoácidos sejam

levadas para a membrana plasmática (LJUNGDAHL et al., 1992), ou o gene *GSF2* envolvido na correta localização dos transportadores de glicose (*HXT1*) e galactose (*GAL2*) na membrana (SHERWOOD & CARLSON, 1999), ou ainda o gene *PHO86* necessário para que o transportador de fosfato (*PHO84*) atinja a membrana citoplasmática (LAU et al., 2000). Em todos estes casos mutações e/ou a falta na célula dos genes indicados determinam o acúmulo dos transportadores em membranas intracelulares (retículo endoplasmático, golgi, etc), impedindo assim que os substratos transportados pelas permeases sejam captados pelas células. O gene *CSFI* analisado no presente trabalho parece diferir destas proteínas na medida que mutantes *csf1Δ* são afetados numa série de atividades de transporte (glicose, leucina, maltose) mediados por distintas permeases (vide abaixo).

Após o seqüenciamento do genoma da levedura *S. cerevisiae* uma série de abordagens genômicas tem sido desenvolvidas para tentar desvendar a possível função fisiológica de mais de 40% de genes desconhecidos no genoma deste organismo. Numa iniciativa patrocinada pela EUROSCARF ENTIAN e colaboradores (1999) descreveram que cepas deletadas na ORF YLR087c são mais sensíveis a diversos estresses, incluindo frio. A seguir TOKAI e colaboradores (2000) nomearam esta ORF de “*CSFI*” por que mostrou-se necessário para a fermentação de glicose a baixas temperaturas. Um mutante *csf1Δ* foi também descrito como incapaz de utilizar lactato para o crescimento (STEINMETZ et al., 2002). Não existem muitos dados sobre a regulação da transcrição do *CSFI* pois geralmente, os níveis de expressão encontrados são extremamente baixos ou praticamente inexistentes (TOKAI et al., 2000; GHAEMMAGHAMI et al., 2003), inclusive durante a exposição das células a 10°C (SAHARA et al., 2002). Os únicos dados significativos de expressão deste gene indicam indução por peróxido de hidrogênio e fatores de transcrição envolvidos no metabolismo aeróbico e na resposta a múltiplos estresses (GASCH et al., 2000; LIN et al., 2002; COHEN et al., 2002), e repressão da transcrição por choques térmicos (GASCH et al., 2000; CAUSTON et al., 2001). Da

mesma forma, tentativas de analisar a expressão e localização intracelular da proteína Csf1p fusionada à GFP (proteína verde fluorescente) não tiveram sucesso (HUH et al., 2003), o que provavelmente reflete sua baixa expressão. Por outro lado, a deleção do *CSFI* do genoma, em conjunto com a deleção de uma série de genes/proteínas envolvidas em funções celulares do retículo endoplasmático e golgi, tornam a dupla-deleção letal à célula (TONG et al., 2001).

A extrema susceptibilidade do mutante *csf1Δ* ao sal e a outros compostos tóxicos como cálcio, higromicina B, tetrametilamônio e prótons, mas não à altas concentrações de potássio, é um fenótipo idêntico ao observado em cepas deletadas nos transportadores de potássio (*TRK1*, *TRK2*), ou nas quinases que ativam estes transportadores e portanto evitam a hiperpolarização da membrana (MULET et al., 1999). Portanto, o gene *CSFI* estaria envolvido na regulação, por um mecanismo ainda desconhecido, de vários transportadores de membrana incluindo os de glicose, leucina, maltose, K^+ , e provavelmente lactato. Estes resultados indicam que o papel que esta proteína de 338 kDa tem na arquitetura molecular e/ou fisiologia da célula, deverá ser melhor analisado, particularmente nos processos moleculares do retículo endoplasmático e golgi envolvidos no tráfego de transportadores até a membrana celular durante situações de estresse.

IV. MANUSCRITO II

**Análise da Fermentação de Maltose e
Maltotriose por cepas de *Saccharomyces
cerevisiae* com Genótipos Conhecidos.**

IV. 1. INTRODUÇÃO

Apesar da maltose e maltotriose serem os açúcares presentes em maior quantidade no mosto cervejeiro, estas fontes de carbono são as últimas a serem utilizadas pelas leveduras. Geralmente, a captação da maltose e maltotriose começa após metade da glicose presente no mosto ser consumida, sendo que a velocidade de utilização da maltotriose é mais lenta do que a maltose (STEWART et al., 1979). A lenta, e muitas vezes incompleta, utilização da maltotriose pelas leveduras provoca um problema comum entre as cervejarias: um produto final com elevado conteúdo de açúcares fermentáveis e uma cerveja com um perfil de sabor atípico. Deste modo, a velocidade de captação e metabolização da maltose e maltotriose durante a fermentação do mosto é um dos fatores determinantes de uma fermentação eficiente e de um produto final de qualidade (D'AMORE et al., 1989; ERNANDES et al., 1993).

A utilização da maltose e maltotriose pelas leveduras envolve inicialmente seu transporte para o interior da célula, onde a seguir irão sofrer a ação da maltase (α -glicosidase, E.C. 3.2.1.20) liberando as moléculas de glicose que serão metabolizadas até etanol pela glicólise. A metabolização da maltose tem sido extensivamente estudada, tanto do ponto de vista bioquímico quanto genético. Para que uma cepa da levedura *S. cerevisiae* seja capaz de fermentar a maltose é necessário a presença de pelo menos um dos 5 loci *MAL*, cada um destes localizados em diferentes cromossomos: *MAL1* (cromossomo VII), *MAL2* (III), *MAL3* (II), *MAL4* (XI) e *MAL6* (VIII). Cada locus deve conter pelo menos três genes necessários à metabolização da maltose: o gene *MALx1* (onde *x* representa o locus) que codifica para o transportador de maltose, o gene *MALx2* que codifica para a maltase, e o gene *MALx3* que codifica uma proteína reguladora que induz a expressão dos genes *MAL* na presença de maltose no meio (revisto por NEEDLEMAN, 1991). Além destes loci, existem ainda pelo menos

três tipos de loci *MAL* parcialmente funcionais (*malp*, *malg* e *mal⁰*), sendo que todas as cepas incapazes de fermentar maltose geralmente apresentam um destes loci. O locus *malp* contém apenas o gene regulador *MALx3*, o locus *malg* contém os genes para o transportador de maltose e a α -glicosidase (*MALx1* e *MALx2*, respectivamente) e o locus *mal⁰* apenas o gene para a α -glicosidase (NAUMOV et al., 1991; MICHELS et al., 1992).

A proteína reguladora MALx3p é membro de uma família de fatores de transcrição com motivos “C₆ zinc-cluster” que, na presença de maltose, se liga ao DNA na região promotora entre os genes *MALx2* e *MALx1* (sequência UAS_{mal}), induzindo a transcrição na presença de maltose (CHANG et al., 1988; GOLDENTHAL et al., 1987; LEVINE et al., 1992; SIRENKO et al., 1995). Já a presença de glicose no meio ativa a proteína Mig1p que bloqueia as regiões promotoras UAS_{mal}, reprimindo a expressão dos genes *MAL* (revisto por NEEDLEMAN, 1991; HORÁK, 1997). Além da regulação da transcrição, a glicose exerce um maior controle na fermentação de outras fontes de carbono promovendo a inativação dos seus respectivos sistemas de transporte (revisto em STAMBUK, 2002). Esta inativação envolve a fosforilação e ubiquitinação dos transportadores, sendo que a seguir as permeases são endocitadas e degradadas no vacúolo (RIBALLO et al., 1995; MEDINTZ et al., 1996). A repressão e inativação provocadas pela glicose constituem os principais fatores que determinam a rápida e preferencial utilização da glicose em meios contendo uma mistura de açúcares (p.ex. mosto cervejeiro), sendo que outras fontes de carbono só passam a ser utilizadas pelas células após a glicose ser consumida.

Porém, a indução por maltose e a repressão pela glicose dos genes *MAL* não são os únicos processos de regulação que controlam a fermentação de maltose. Já foi caracterizada a existência de alelos para alguns dos genes *MAL* que determinam a expressão constitutiva (independente da indução pela maltose) da proteína transportadora e da α -glicosidase, fenótipo este encontrado nas chamadas cepas *MAL* constitutivas (*MAL^c*). Estes alelos são

mutações dos loci *MAL*, principalmente nos genes que codificam para a proteína reguladora (WANG & NEEDLEMAN, 1996; GIBSON, 1997). Na natureza estas mutações podem ocorrer de forma espontânea, como no caso das cepas com genótipo *MAL4*, todas constitutivas por possuírem alterações no gene regulador (*MAL43^c*), ou também podem ser obtidas por mutagênese em laboratório, o que já foi feito para praticamente todos os outros loci *MAL* (revisto por VANONI et al., 1989). Geralmente cepas industriais são também *MAL* constitutivas, sendo esta característica altamente desejável em cepas de panificação e cervejaria (ODA & OUCHI, 1990; KODAMA et al., 1995; HIGGINS et al., 1999). Cepas *MAL* constitutivas podem ainda apresentar tanto sensibilidade como insensibilidade à repressão pela glicose (CHARRON & MICHELS, 1987).

Em relação a utilização da maltotriose, pouco é conhecido sobre a metabolização deste açúcar, quando comparado ao detalhamento molecular já descrito para o metabolismo de maltose em *S. cerevisiae*. Testes utilizando parâmetros fisiológicos para avaliar a captação da maltose e maltotriose pelas células de leveduras já indicavam a possibilidade de um transportador específico para maltotriose (HARRIS & THOMPSON, 1960) e de fato, mais tarde ficou demonstrado que estes açúcares possuem sistemas de transporte distintos (STEWART et al., 1979; RUSSEL & STEWART, 1980). Ao analisar alelos naturais do transportador de maltose presentes em locus *maltg*, Han e colaboradores (1995) caracterizaram um gene, que passou a ser chamado *AGT1* (α -glucoside transporter), responsável pelo transporte ativo (através do co-transporte com H^+) de uma série de α -glicosídeos, incluindo maltose, trealose, sacarose, melezitose, α -metilglicosídeo e maltotriose (HAN et al., 1995; STAMBUK et al., 1998; 1999; 2000). Embora seja um transportador com especificidade distinta ao transportador de maltose codificado pelos genes *MALx1* (estes específicos para maltose e turanose), a permease *Agt1p* é aparentemente regulada pelos mesmos mecanismos de regulação gênica dos genes *MAL* por possuir uma sequência UAS_{mal} na sua região promotora (HAN et al., 1995). Dados cinéticos

mostram a existência de transportadores de alta e baixa afinidade para maltose e/ou maltotriose em *S. cerevisiae*, mas apenas alguns dos seus componentes são conhecidos (LAGUNAS, 1993; ZHENG et al., 1994a; CRUMPLEN et al., 1996; STAMBUK & DE ARAÚJO, 2001). Condizente com a importância que o transporte de maltose e maltotriose têm em cervejaria, constatou-se que a maioria destas cepas industriais possuem pelo menos um transportador dos loci *MAL*, e que praticamente todas contêm também o gene *AGTI* (JESPERSEN et al., 1999).

Recentemente ZASTROW e colaboradores (2000) demonstraram que várias cepas industriais são capazes de crescer utilizando maltotriose como fonte de carbono, mas sem fermentar o açúcar até etanol. Por outro lado, o isolamento e caracterização de cepas capazes de fermentarem maltotriose permitiu identificar o transporte da maltotriose como sendo o fator limitante na fermentação deste açúcar por *S. cerevisiae* (ZASTROW et al., 2001; LONDESBOROUGH, 2001). De fato, o transporte através da membrana plasmática é o passo limitante na fermentação (ou não) de diversos açúcares por leveduras (OSINGA et al., 1989a; ODA & OUCHI, 1990; GALAZZO & BAILEY, 1990; KODAMA et al., 1995; MALLUTA et al., 2000; GOFFRINI et al., 2002).

A maioria de estudos sobre a metabolização de maltose e maltotriose têm sido realizados em cepas industriais, geralmente poliplóides e com genótipos desconhecidos. Estudos onde foram utilizadas cepas com transportadores específicos (HAN et al., 1995) lamentavelmente analisaram apenas o crescimento (ou não) nas diferentes fontes de carbono, e a fermentação do açúcar era avaliada qualitativamente e através de métodos indiretos (p.ex. produção de CO₂ em tubos de Durham). Não existem dados quantitativos sobre a fermentação (produção de etanol) da maltotriose em cepas contendo, ou não, o transportador codificado pelo gene *AGTI*. No presente trabalho foi avaliada a performance fermentativa de diversas cepas de *S. cerevisiae* com genótipos conhecidos, tanto *MAL* induzíveis quanto *MAL^c*

constitutivas, no intuito de melhor caracterizar os fatores envolvidos na eficiente fermentação de maltose e maltotriose pelas leveduras.

IV.2. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.2.1. CEPAS UTILIZADAS.

Os genótipos das cepas de *S. cerevisiae* utilizadas no presente trabalho encontram-se detalhados na Tabela 1. As cepas MC966A e KY73 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Arhur L. Kruckberg (University of Amsterdam) A cepa 340-2B foi obtida do Dr. R. Needleman (Wayne University School of medicine, Michigan) e a cepa CEN.PK2-1C foi obtida da EUROSCARF (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis, Frankfurt – Alemanha) e descrita por ENTIAN et al. (1999). As cepas BSY08 e BSY09 foram obtidas neste laboratório, sendo que o gene *AGT1* foi deletado destas cepas através de recombinação homóloga utilizando-se o gene que confere resistência à kanamicina, seguindo-se os procedimentos descritos por Longtine et al. (1998) e Knop et al. (1999). A cepa MC966A deletada no *AGT1* foi denominada BSY09 e a cepa KY73 deletada neste mesmo gene foi denominada BSY08.

Tabela IV-1. Genótipos das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas.

Cepa	Genótipo
MC966A	<i>MATa MAL2 AGT1 ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 GAL SUC2</i>
BSY09	<i>MATa MAL2 agt1::kan^r ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 GAL SUC2</i>
KY73	<i>MATa MAL2 AGT1 ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 GAL SUC2 gal2Δ</i> <i>hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt7::HIS3 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::hxt6</i>
BSY08	<i>MATa MAL2 agt1::kan^r ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 GAL SUC2 gal2Δ</i> <i>hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt7::HIS3 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::hxt6</i>
340-2B	<i>MATα AGT1 MAL12 mal13Δ trp1-1 ura3-52 lys2</i>
CEN.PK2-1C	<i>MATa MAL2-8^c ura3-52 his3Δ1 leu2-3_112 trp1-289</i>

IV.2.2. PLASMÍDEO UTILIZADO.

Para as transformações das cepas de leveduras MC966A, KY73 e 340-2B foi utilizado o plasmídeo pJW5 (*CEN URA3 MAL63^c*), plasmídeo centromérico contendo um gene regulador *MAL63^c* constitutivo (WANG & NEEDLEMAN, 1995).

IV.2.3. MEIOS DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.

Foram utilizados dois tipos de meios para o crescimento das cepas de *S. cerevisiae*: um meio rico contendo 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L da fonte de carbono de interesse, e um meio mínimo contendo 20 g/L da fonte de carbono, 6,7 g/L de base nitrogenada sem aminoácidos (Difco) contendo 1,92 g/L de uma mistura de todos os aminoácidos necessários ao crescimento das células mas sem uracila (Ura drop-out, Sigma). Quando requerido foi adicionado também 4 g/l de uracila aos meios. Todos os meios tiveram seu pH ajustado para 5,0 com ácido clorídrico e foram esterilizados por autoclave, a 120° C por 20 min. Para confecção dos meios sólidos foram adicionados 20 g/L de ágar nos meios descritos acima.

As células foram inoculadas em erlenmeyers contendo 1/5 do volume de meio líquido, sendo a cultura incubada em um agitador a 28° C a 160 rotações por minuto. O crescimento celular foi medido determinando-se a massa celular a partir de medidas espectrofotométricas a 570 nm.

IV.2.4. PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES DE *S. CEREVISIAE*.

A preparação das células competentes de *S. cerevisiae* foi realizada seguindo protocolos descritos por Ausubel et al. (1995). Células de *S. cerevisiae* foram inoculadas no dia anterior ao experimento em meio líquido rico contendo glicose ou maltose e crescidas até atingir a densidade ótica de 0,5-0,7. As células foram então centrifugadas (2.600 g por 3 min)

e lavadas inicialmente com água destilada a 4°C e, posteriormente com uma solução contendo 100 mM acetato de lítio, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA/NaOH pH 8 e 1 M sorbitol pH 8. A seguir, as células foram ressuspensas em 360 µl desta mesma solução adicionando-se, logo após, 40 µl de DNA carreador (DNA de fita simples proveniente de esperma de salmão e desnaturado a 100°C). As células foram divididas em alíquotas de 50 µl em tubos estéreis e congeladas a - 80°C.

IV.2.5. TRANSFORMAÇÃO DAS CÉLULAS DE *S. CEREVISIAE*.

Ao microtubo contendo as células competentes foram adicionados 8 µl do plasmídeo desejado, seguidos de 348 µl de 36% PEG-4000 em tampão LiTE (0,1 M acetato de lítio, 10 mM Tris-Cl pH 7,6 e 1 mM EDTA). Esta mistura foi mantida a temperatura ambiente por 30 min e após este tempo, foram adicionados 45 µl de dimetilsulfóxido e as células foram então incubadas por 15 min em banho a 42°C. Depois desse choque térmico, as células foram centrifugadas (2.600 g por 2 min) e ressuspensas com 200 µl de sorbitol 1 M em água. e, plaqueadas em meio mínimo sólido sem uracila a fim de selecionar as células transformadas com o plasmídeo de interesse contendo o gene *URA3*.

IV.2.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE α -GLICOSIDASE.

A atividade α -glicosidase foi determinada *in situ* usando-se células permeabilizadas como descrito por Stambuk (1999). Aproximadamente 2 mg de células foram lavadas em 10 ml de tampão 100 mM MOPS-NaOH pH 6,8 (tampão A). Em seguida as células foram ressuspensas em 2 ml do mesmo tampão A e 2 ml de uma solução contendo 20% glicerol, 1 mM EDTA e 1 mM DTT. A seguir, foram adicionados 250 µl de tolueno/etanol/10% Triton X-100 em água (1:4:1; v/v) e as células foram vigorosamente agitadas em vortex durante 1

min. Após centrifugação as células foram lavadas com 0,5 ml de tampão A e no final ressuspensas em 4 ml do mesmo tampão. A atividade α -glicosidase foi determinada utilizando-se como substrato maltotriose 100 mM. A reação enzimática foi realizada em tampão A, incubada durante 5 min a 30°C e logo após, as células foram fervidas por 3 min a 100°C. A seguir, a glicose liberada proveniente da quebra da maltotriose foi determinada enzimaticamente utilizando kits comerciais (vide abaixo). Foram utilizados controles com células previamente fervidas e todas as medidas foram realizadas em duplicata.

IV.2.7. DETERMINAÇÃO DO TRANSPORTE DE α -GLICOSÍDEOS.

A atividade da permease *AGTI* foi determinada colorimetricamente, utilizando-se o substrato sintético *p*-nitrofenil- α -D-glicosídeo (*pNP α G*) como descrito por Hollatz & Stambuk (2001). As células crescidas em maltotriose foram centrifugadas, lavadas duas vezes com água a 4°C, e ressuspensas de modo a atingirem a concentração de 30 mg/ml. Em seguida 50 μ l desta suspensão foram adicionadas a 50 μ l de tampão 100 mM succinato-Tris pH 5,0 e incubado por 1 min a temperatura ambiente. A seguir, 14 μ l de 40 mM de *pNP α G* (5 mM final) foram adicionados às células. A intervalos de tempo predeterminados a solução contendo as células foram imediatamente fervidas à 100°C por 3 min. Acrescentou-se 114 μ l de 2 M bicarbonato de sódio às amostras obtidas acima e o *p*-nitrofenol liberado foi estimado a 400nm. Todas as medidas foram realizadas no mínimo em triplicata e foram utilizados controles com células fervidas.

IV.2.8. DETERMINAÇÃO DE GLICOSE, MALTOSE, MALTOTRIOSE E ETANOL.

Amostras das culturas foram centrifugadas a 2.600 g por 2 min, e os sobrenadantes foram utilizados para a determinação da produção de etanol e consumo de glicose, maltose e maltotriose. A glicose foi determinada através de kits enzimáticos comerciais (Análisa

Diagnostica Ltda.). O etanol foi determinado colorimetricamente através da reação com a álcool oxidase e peroxidase seguindo um método adaptado dos protocolos descrito por Salgado et al. (2000) e Rodionov et al. (2002). A maltose e maltotriose foram determinadas colorimetricamente através da reação com metilamina conforme descrito por Cáceres et al. (2000).

IV.3. RESULTADOS

Para a melhor compreensão da metabolização da maltose e maltotriose pelas células de leveduras avaliamos inicialmente a fermentação destes açúcares por quatro cepas de *S. cerevisiae* com genótipos isogênicos contendo, ou não, modificações em alguns transportadores específicos. A Figura IV-1 mostra as curvas de crescimento, consumo de açúcares e produção de etanol obtidos para a cepa selvagem MC966A crescida em meios contendo glicose, maltose ou maltotriose como fonte de carbono. Enquanto que em glicose e maltose foi observado o rápido crescimento desta cepa já nas primeiras 24 h, no caso da maltotriose observou-se um crescimento lento, com uma significativa fase *lag* de aproximadamente 100 h, sendo que após este tempo, verificou-se um lento crescimento exponencial acompanhado do declínio deste açúcar no meio de cultura. Como o etanol é o principal produto da fermentação das células de *S. cerevisiae*, a produção deste composto foi analisada para avaliar o tipo de metabolismo (respiratório ou fermentativo) utilizado pelas diferentes cepas estudadas neste trabalho. Assim, em meios contendo glicose ou maltose observou-se que a cepa MC966A foi capaz de fermentar estes açúcares produzindo até ~10 g/L de etanol, porém quando esta mesma cepa foi crescida em maltotriose não se observou a produção de etanol, indicando que a utilização da maltotriose por estas células é provavelmente oxidativa. A fase *lag* extremamente longa poderia ser um indicativo que a maltotriose é um pobre indutor dos genes *MAL* nesta cepa. De fato, esta cepa quando crescida em maltotriose apresentou uma baixa atividade de transporte de α -glicosídeos (~1,2 nmoles [mg.min]⁻¹) e mais significativamente, uma atividade α -glicosidase extremamente baixa (~2,4 nmoles [mg.min]⁻¹) (Tabela IV-2), quando comparada à atividade α -glicosidase presente em outras cepas (vide abaixo).

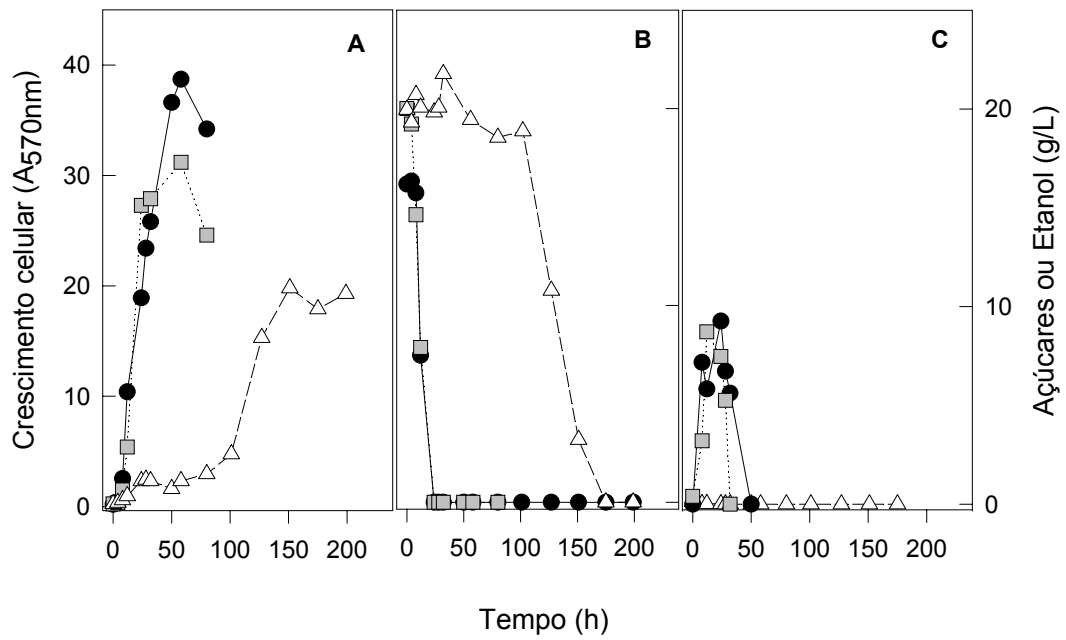


FIGURA IV-1. Crescimento e fermentação de glicose, maltose e maltotriose pela cepa selvagem MC966A. O crescimento (A), consumo dos açúcares (B) e produção de etanol (C) foram determinados em meio rico contendo 2% de glicose (●), maltose (□) ou maltotriose (Δ) como fonte de carbono.

Para avaliar a influência que o *AGTI* teria no crescimento e fermentação de maltotriose, este gene foi deletado da cepa MC966A, que passou então a ser denominada de cepa BSY09. Pode-se observar na Figura IV-2 que esta cepa, mesmo sem o transportador de maltotriose codificado pelo gene *AGTI*, continuou sendo capaz de crescer e utilizar esta fonte de carbono, apresentando o mesmo perfil de crescimento, consumo de açúcares e produção de etanol quando comparada a sua correspondente selvagem MC966A. Este resultado indica que o lento crescimento observado na cepa parental selvagem independe da presença da permease *AGTI*.

A seguir, os mesmos parâmetros foram avaliados com a cepa KY73, deletada nos 7 principais transportadores de hexoses e conseqüentemente incapaz de crescer, utilizar e produzir etanol a partir de glicose como fonte de carbono (dados não mostrados, vide KRUCKEBERG et al., 1999). Quando esta cepa foi crescida em maltose e maltotriose, observou-se um rápido crescimento exponencial acompanhado do consumo destes açúcares do meio de cultura. Ao contrário das outras cepas isogênicas analisadas previamente (MC966A e BSY09), a cepa KY73 foi capaz de fermentar eficientemente a maltotriose, sendo que a produção de etanol chegou a ~9 g/L (Figura IV-3). Condizente com a observada fermentação de maltotriose, verifica-se que esta cepa KY73 apresentou não só uma significativa atividade de transporte de α -glicosídeos (~7 nmoles [mg.min]⁻¹), como também atividade α -glicosidase alta (~32,8 nmoles [mg.min]⁻¹) (Tabela IV-2).

A seguir analisou-se o comportamento da cepa BSY08, cepa que contém o mesmo genótipo que a KY73, à exceção do *AGTI* que foi deletado do genoma. Embora o mesmo perfil de utilização de glicose e maltose tenha sido observado para a cepa BSY08 quando comparada a sua parental KY73, os resultados mostraram um comportamento distinto quando esta cepa foi crescida em maltotriose. Pode-se observar na Figura IV-4 que no meio de crescimento contendo maltotriose como fonte de carbono as células apresentaram uma fase

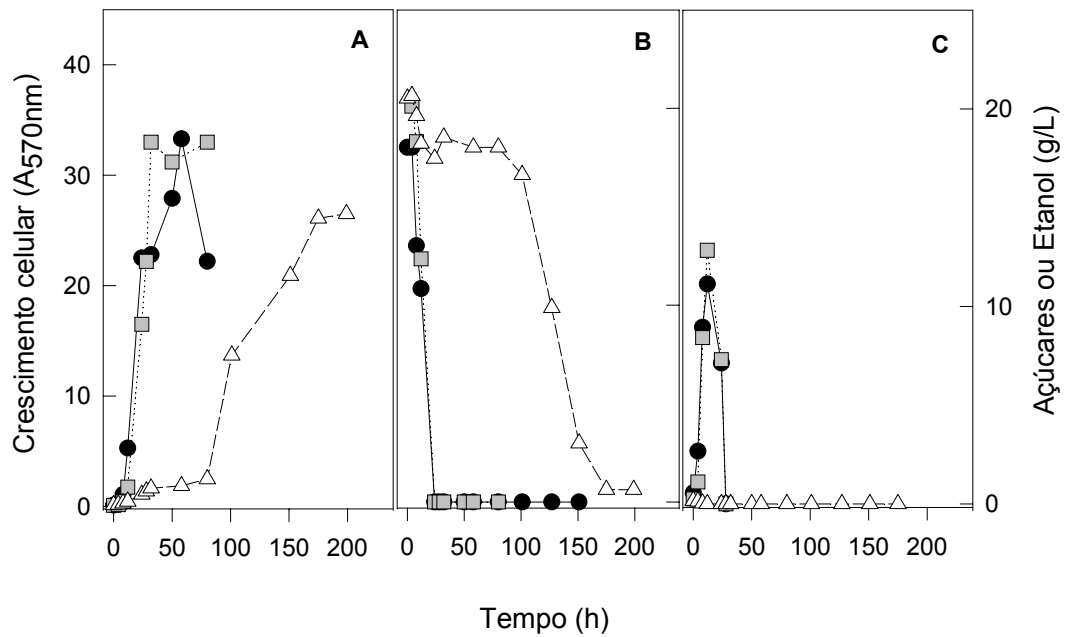


FIGURA IV-2. Crescimento e fermentação de glicose, maltose e maltotriose pela cepa BSY09. O crescimento (A), consumo dos açúcares (B) e a produção de etanol (C) foram determinados em meio rico contendo 2% de glicose (●), maltose (□) ou maltotriose (Δ) como fonte de carbono.

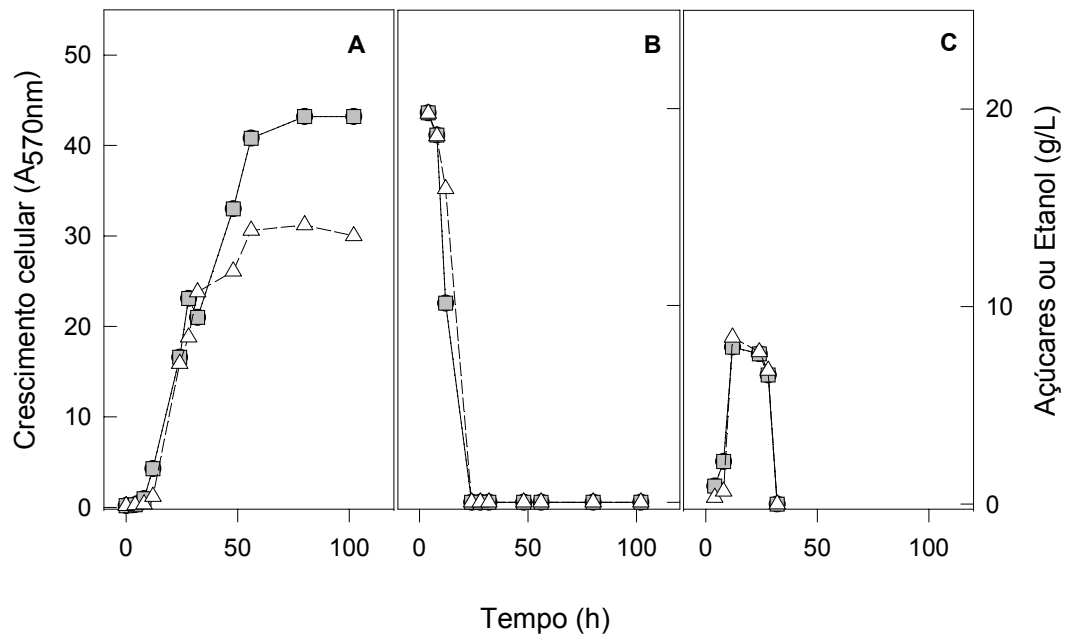


FIGURA IV-3. Crescimento e fermentação de maltose e maltotriose pela cepa KY73. O crescimento (A), consumo dos açúcares (B) e a produção de etanol (C) foram determinados em meio rico contendo 2% de maltose (□) ou maltotriose (Δ) como fonte de carbono.

Tabela IV-2: Velocidades de transporte e hidrólise de α -glicosídeos pelas cepas MC966A e KY73 crescidas em meio YEP contendo 2% (p/v) de maltotriose.

Cepa	V (nmoles [mg.min] ⁻¹)*	
	Transporte	Hidrólise
MC966A	1,2	2,4
KY73	7,0	32,8

* O transporte foi determinado com 5 mM de *pNP* α G e expresso em nmol de substrato transportados por min⁻¹ (mg de células)⁻¹, e a hidrólise foi determinada com células permeabilizadas e 100 mM de maltotriose e expresso como nmol de glicose liberada por min⁻¹ (mg de células)⁻¹.

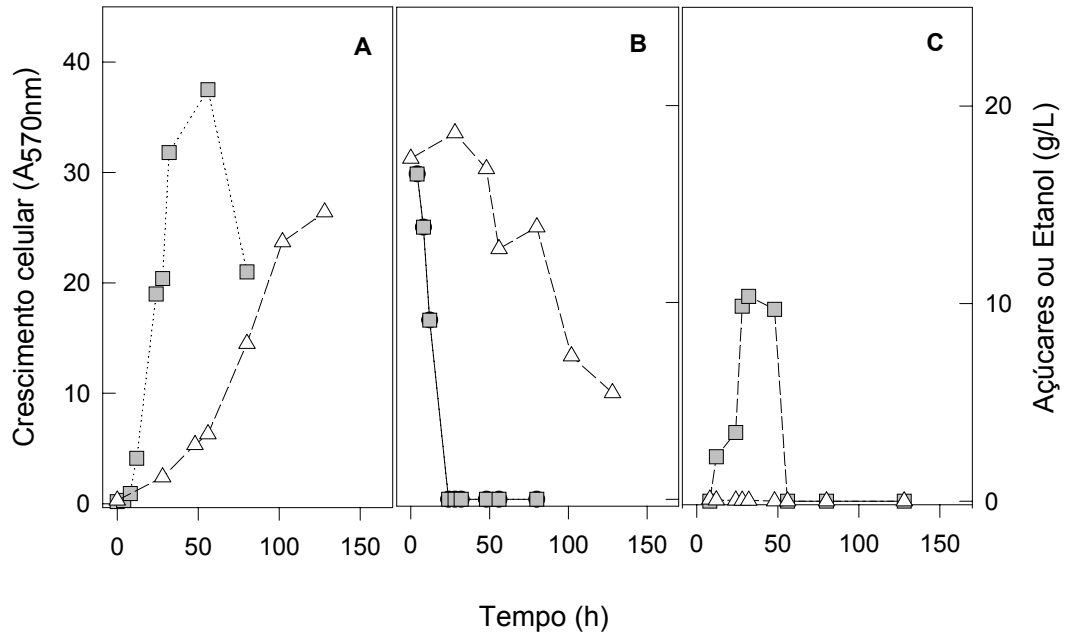


FIGURA IV-4. Crescimento e fermentação de maltose e maltotriose pela cepa BSY08. O crescimento (A), consumo dos açúcares (B) e a produção de etanol (C) foram determinados em meio rico contendo 2% de maltose (□) ou maltotriose (Δ) como fonte de carbono.

lag maior em relação à cepa parental KY73 e, mais significativamente, verificou-se que a capacidade de fermentar a maltotriose foi perdida pela deleção do gene *AGT1*.

As primeiras quatro cepas analisadas neste trabalho apresentam em seu genótipo um gene regulador *MALx3* induzível, ou seja, é necessária a presença de maltose no meio de cultura para que os genes *MAL* sejam expressos. Por outro lado, a maioria das cepas industriais de *S. cerevisiae* são *MAL* constitutivas. Portanto, a seguir analisamos uma cepa de laboratório (CEN.PK2-1C) com expressão constitutiva dos genes *MAL* por possuir o alelo *MAL23-8^c* constitutivo (ENTIAN et al, 1999). A Figura IV-5 mostra que esta cepa foi capaz de crescer e utilizar todos os açúcares já nas primeiras 24 h, e ao mesmo tempo, verificou-se uma elevada produção de etanol a partir das três fontes de carbono utilizadas, sendo que em maltotriose a produção de etanol atingiu a quantidade de ~8 g/L.

A partir dos resultados apresentados para a cepa CEN.PK2-1C, especulou-se que a expressão constitutiva do regulador poderia estar estimulando a fermentação da maltotriose pelas células de leveduras. Uma maneira de avaliar esta possibilidade seria inserir um plasmídeo contendo um gene regulador constitutivo em cepas incapazes de fermentar maltotriose. Deste modo, foi escolhido o plasmídeo pJW5, contendo um gene *MAL63^c* constitutivo (WANG & NEEDLEMAN, 1995), para transformar a cepa selvagem MC966A que não fermenta maltotriose e, para efeitos comparativos, a cepa KY73 que fermenta eficientemente o açúcar.

Quando se analisa os parâmetros de crescimento em meio mínimo da cepa MC966A não transformada ou transformada com o pJW5 (Figura IV-6 e IV-7) verifica-se que praticamente não houve diferença na metabolização dos açúcares. A glicose e maltose são consumidos do meio em até 50 h, produzindo ~ 6 g/L de etanol, enquanto que a maltotriose praticamente não foi utilizada pelas células. Como estes experimentos foram realizados em meio mínimo a quantidade de etanol produzida é menor, já que as células destinam mais

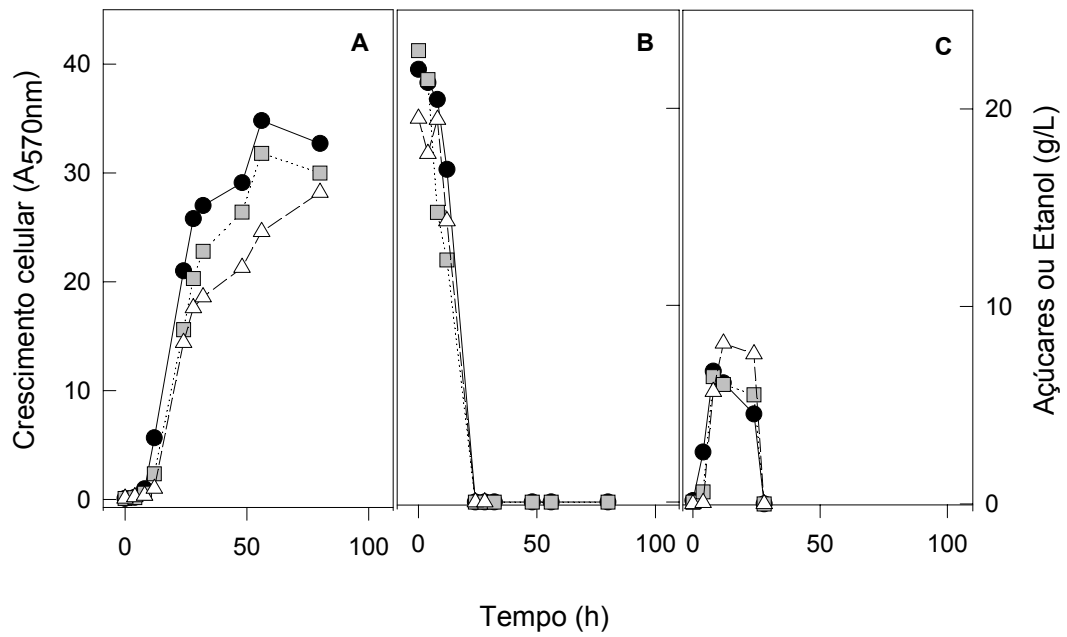


FIGURA IV-5. Crescimento e fermentação de glicose, maltose e maltotriose pela cepa CEN.PK2 -1C. O crescimento (A), consumo dos açúcares (B) e a produção de etanol (C) foram determinados em meio rico contendo 2% de glicose (●), maltose (□) ou maltotriose (Δ) como fonte de carbono.

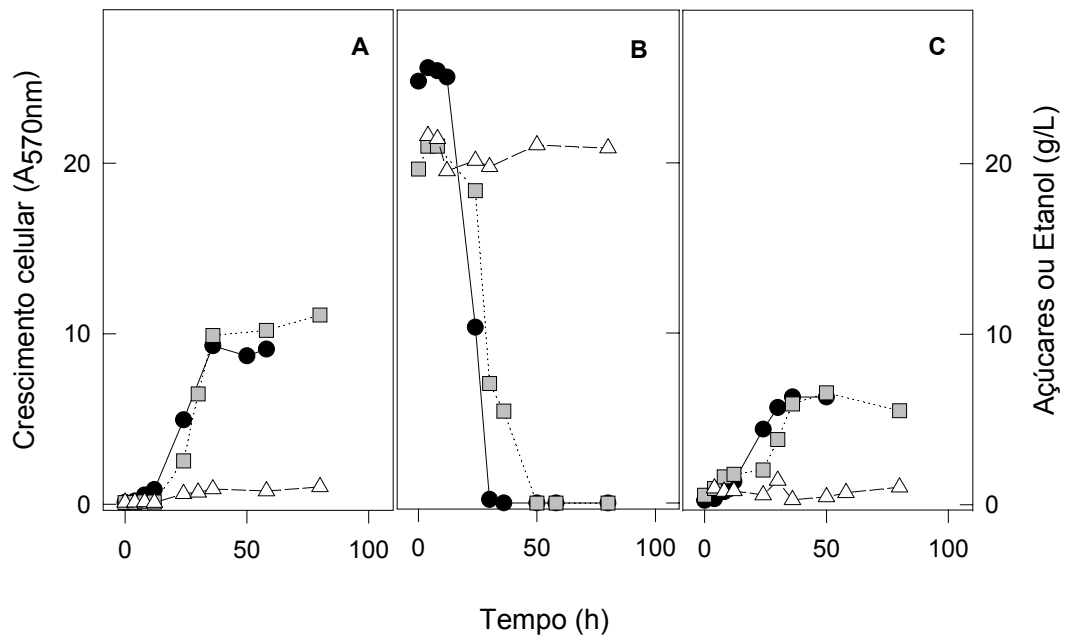


FIGURA IV-6. Crescimento e fermentação em meio mínimo de glicose, maltose e maltotriose pela cepa MC966A. O crescimento (A), consumo dos açúcares (B) e a produção de etanol (C) foram determinados em meio mínimo contendo 2% de glicose (●), maltose (□) ou maltotriose (Δ) como fonte de carbono.

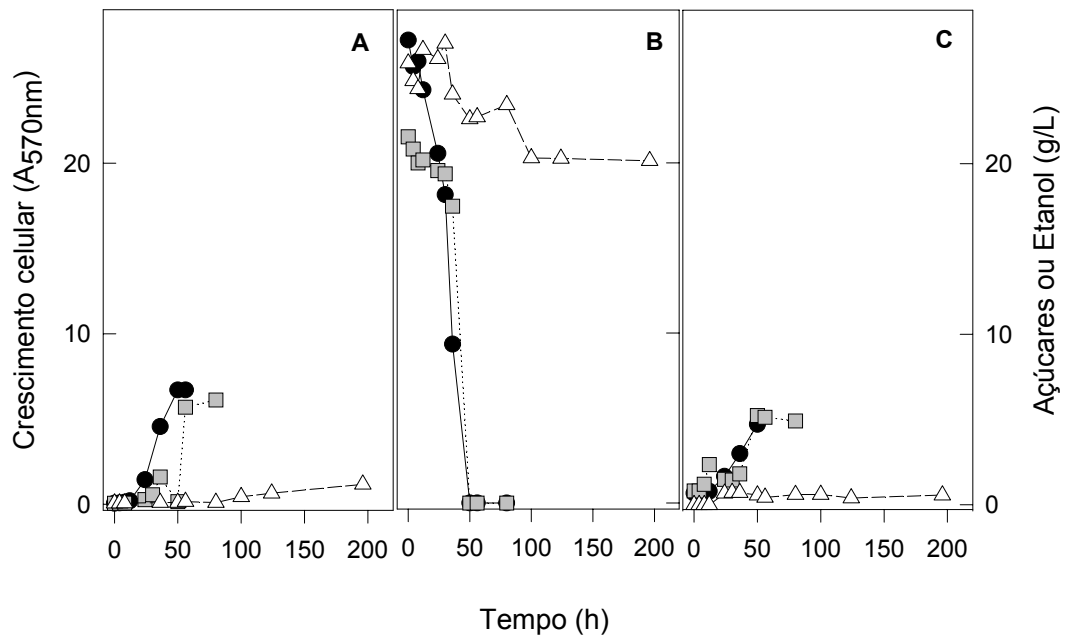


FIGURA IV-7. Crescimento e fermentação em meio mínimo de glicose, maltose e maltotriose pela cepa MC966A contendo o plasmídeo pJW5. O crescimento (A), consumo dos açúcares (B) e a produção de etanol (C) foram determinados em meio mínimo contendo 2% de glicose (●), maltose (□) ou maltotriose (Δ) como fonte de carbono.

moléculas da fonte de carbono para o crescimento. Por outro lado, a não utilização da maltotriose (durante o período analisado) estaria de acordo com a extensa fase *lag* observada no meio rico (vide Figura IV-1 acima), fenótipo provavelmente aumentado pelo uso do meio mínimo. A cepa KY73 com e sem o plasmídeo pJW5 continuou fermentando normalmente a maltose e a maltotriose como também produzindo etanol a partir destes açúcares (Figuras IV-8 e IV-9), não sendo observadas maiores diferenças nos parâmetros fermentativos pela presença ou não do plasmídeo pJW5 com o gene regulador *MAL63^c*.

A funcionalidade do plasmídeo pJW5 foi testada com a cepa 340-2B, cepa que possui somente os genes para a permease *AGT1* e a α -glicosidase presentes num loci *mallg* parcialmente funcional que não possui o gene regulador (*AGT1 MAL12 mall3 Δ*). Esta cepa é incapaz de metabolizar a maltose e a maltotriose tanto em meio rico (dados não mostrados), como em meio mínimo (Figura IV-10) pois a ausência do gene regulador impossibilita a expressão do transportador e α -glicosidase. No entanto, quando esta cepa foi transformada com o plasmídeo pJW5 passou a metabolizar estes açúcares, sendo capaz inclusive de produzir etanol, embora em menores quantidades (Figura IV-11) do que o obtido durante a fermentação da glicose. Portanto, o gene *MAL63^c* presente no plasmídeo pJW5 permitiu a expressão da permease *AGT1* e α -glicosidase, mas esta expressão constitutiva não foi suficiente para que ocorra a fermentação da maltotriose.

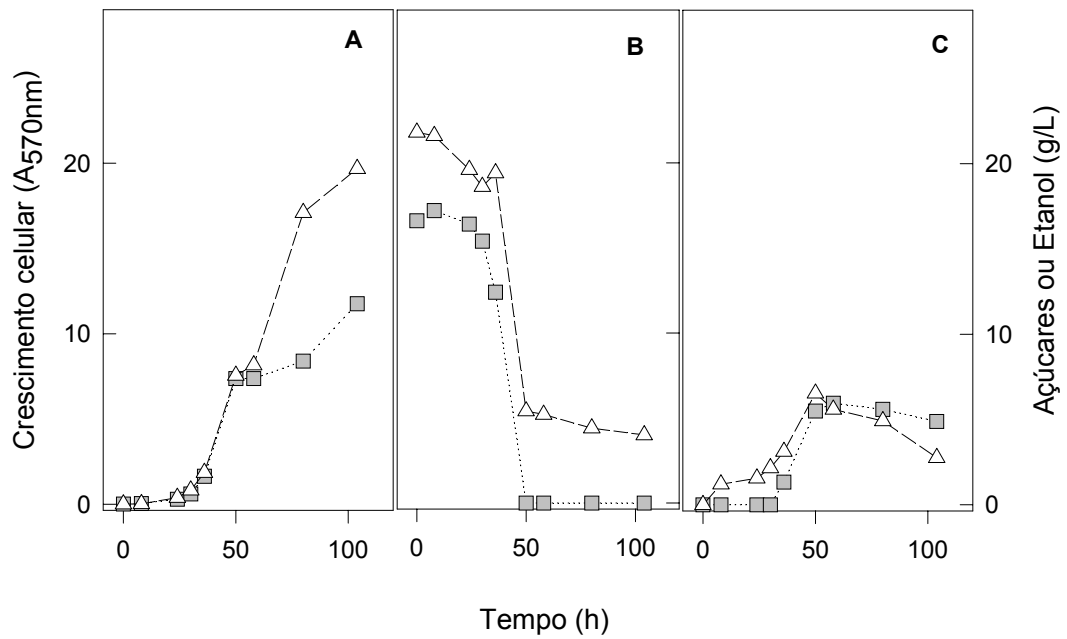


FIGURA IV-8. Crescimento e fermentação em meio mínimo de maltose e maltotriose pela cepa KY73. O crescimento (A), consumo dos açúcares (B) e a produção de etanol (C) foram determinados em meio mínimo contendo 2% de maltose (□) ou maltotriose (Δ) como fonte de carbono.

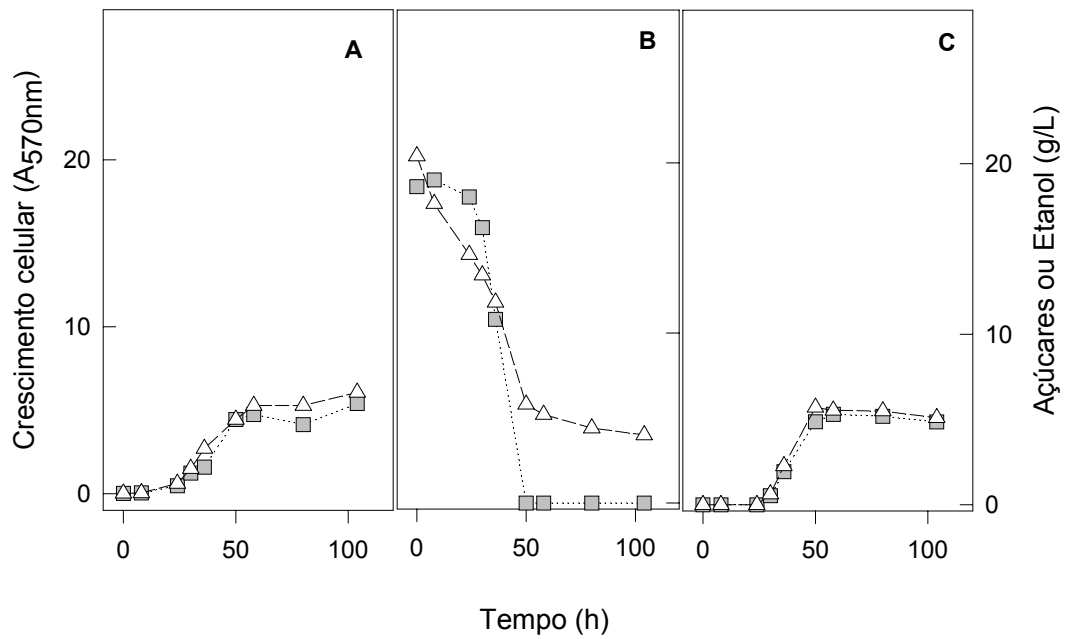


FIGURA IV-9. Crescimento e fermentação em meio mínimo de maltose e maltotriose pela cepa KY73 contendo o plasmídeo pJW5. O crescimento (A), consumo dos açúcares (B) e a produção de etanol (C) foram determinados em meio mínimo contendo 2% de maltose (□) ou maltotriose (Δ) como fonte de carbono.

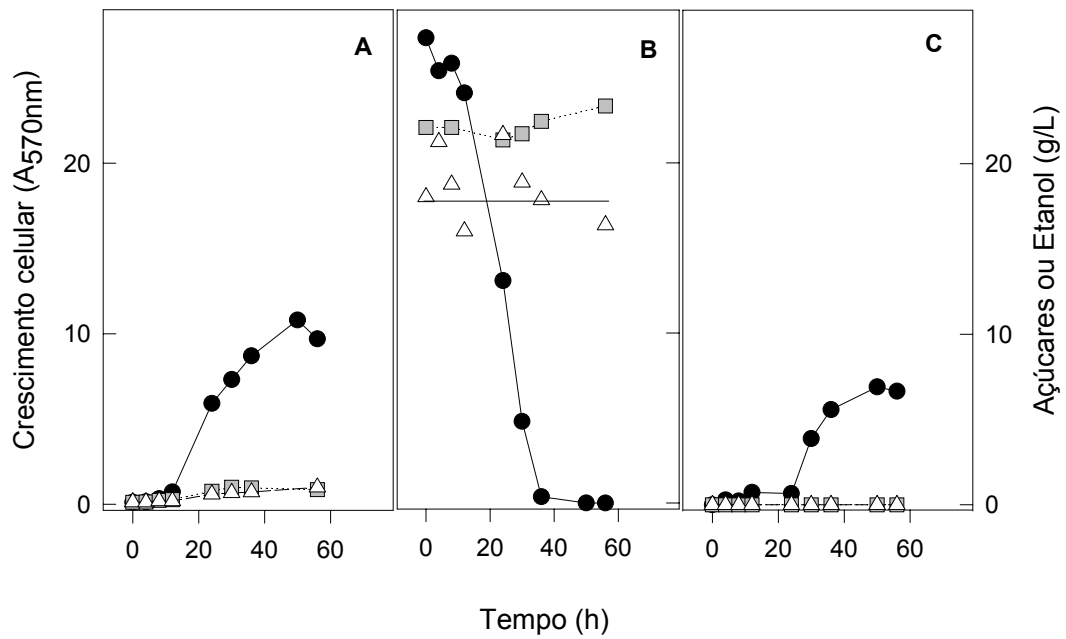


FIGURA IV-10. Crescimento e fermentação em meio mínimo de glicose, maltose e maltotriose pela cepa 340-2B. O crescimento (A), consumo dos açúcares (B) e a produção de etanol (C) foram determinados em meio mínimo contendo 2% de glicose (●), maltose (□) ou maltotriose (Δ) como fonte de carbono.

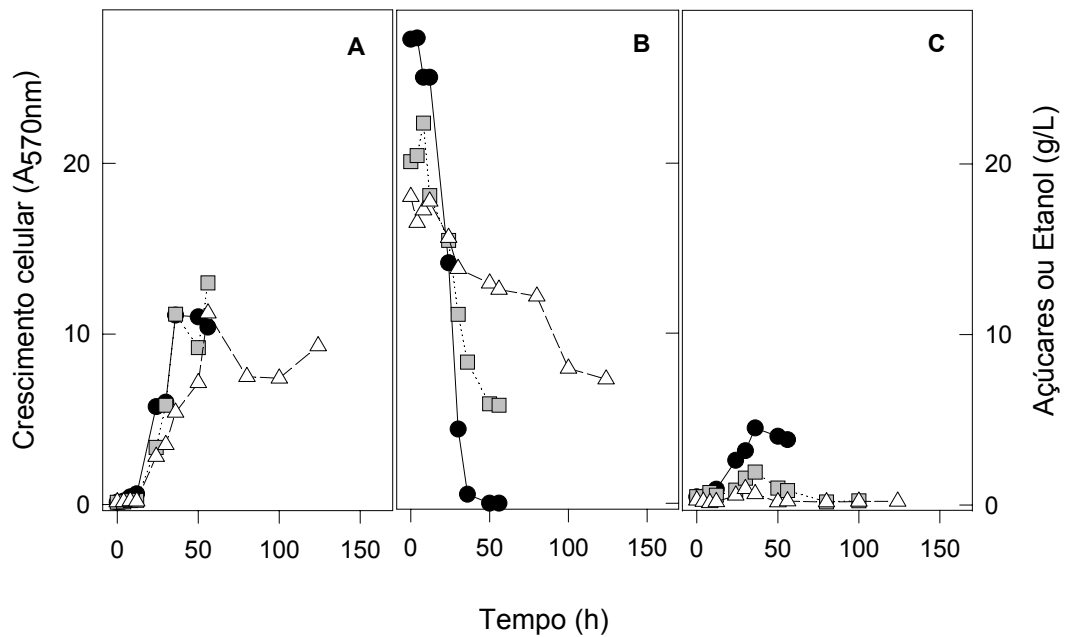


FIGURA IV-11. Crescimento e fermentação em meio mínimo de glicose, maltose e maltotriose pela cepa 340-2B contendo o plasmídeo pJW5. O crescimento (A), consumo dos açúcares (B) e a produção de etanol (C) foram determinados em meio mínimo contendo 2% de glicose (●), maltose (□) ou maltotriose (Δ) como fonte de carbono.

IV.4. DISCUSSÃO

A fermentação de maltotriose é um fator determinante para a obtenção de diversos produtos na indústria cervejeira e de panificação. Algumas cepas de *S. cerevisiae* são capazes de crescer e utilizar maltotriose como fonte de carbono, mas não fermentam este açúcar (ZASTROW et al., 2000). Outras cepas são capazes de fermentar a maltotriose, sendo que algumas necessitam de um período de adaptação maior para iniciar sua utilização (ZASTROW et al., 2001; LONDESBOROUGH, 2001). A análise destas cepas revelou que o transporte através da membrana é o fator determinante na capacidade, ou não, de fermentar a maltotriose.

Dados cinéticos já mostraram a existência de transportadores de alta e baixa afinidade para maltose e maltotriose em *S. cerevisiae*, mas apenas alguns dos seus componentes são conhecidos (BUSTURIA & LAGUNAS, 1985; LAGUNAS, 1993; ZHENG et al., 1994a; CRUMPLEN et al., 1996; STAMBUK & DE ARAÚJO, 2001). Enquanto que os transportadores de maltose codificados pelos genes *MALx1* possuem alta afinidade ($K_m \sim 5$ mM) pela maltose (CHENG & MICHELS, 1991; BENITO & LAGUNAS, 1992; VAN LEEUWEN et al., 1992; WEUSTHUIS et al., 1993), a permease *AGT1* é capaz de transportar tanto maltose como maltotriose, porém com uma afinidade menor ($K_m \sim 20$ mM) do que os transportadores *MALx1* (HAN et al., 1995; STAMBUK et al., 1999; STAMBUK & DE ARAÚJO, 2001).

Recentemente foram caracterizados dois novos genes (YDL247w e YJR160c) que compartilham 100% de similaridade entre si e possuem 75% de similaridade com *MALx1* e 55% de similaridade com o *AGT1*. Estes genes codificam para transportadores de α -glicosídeos que permitem às leveduras utilizarem maltose e maltotriose porque possuem alta afinidade ($K_m \sim 5-7$ mM) por estes substratos (DAY et al., 2002a). Além disto, resultados apresentados por este mesmo grupo (DAY et al., 2002b) indicam que o transportador de

maltose codificado pelo gene *MAL61* também transportaria maltotriose com alta afinidade ($K_m \sim 7$ mM). Entretanto, a maioria destas análises avaliaram apenas o crescimento das cepas em diferentes fontes de carbono, sem analisar o efeito de cada transportador na fermentação (produção de etanol) ou não pelas leveduras.

A cepa selvagem MC966A apresentou um crescimento lento em maltotriose, que ocorreu somente após um longo período de adaptação, e foi incapaz de fermentar o açúcar. Além disso, nesta cepa aparentemente a maltotriose foi incapaz de induzir os genes do transportador e α -glicosidase, o que estaria de acordo com a baixa velocidade de crescimento e utilização da maltotriose observado. Como a cepa isogênica deletada no *AGT1* (cepa BSY09) apresentou o mesmo padrão de crescimento lento e não fermentativo do que a cepa selvagem, podemos concluir que a permease *AGT1* não estaria envolvida neste fenótipo. Provavelmente nestas condições as células estariam utilizando os outros transportadores de maltotriose descritos acima.

Inesperadamente, a cepa deletada nos transportadores de glicose codificados pelos genes *HXT1-HXT7* e *GAL2* (cepa KY73, isogênica à MC966A) foi capaz de crescer e fermentar eficientemente a maltotriose. Tanto o transporte como a atividade da α -glicosidase foi significativamente maior na cepa KY73, indicando que nesta cepa a maltotriose conseguiu induzir a expressão destas proteínas. Quando a cepa KY73 teve o *AGT1* deletado de seu genoma (cepa BSY08), verificou-se um crescimento lento, e a incapacidade das células de levedura de produzir etanol a partir da maltotriose. Estes resultados indicam que a presença do *AGT1* é fundamental para a fermentação de maltotriose por *S. cerevisiae*. Fermentação eficiente de maltotriose foi também verificada com a cepa CEN.PK2-1C, uma cepa *MAL* constitutiva.

Os resultados obtidos com a cepa KY73 poderiam indicar que a ausência dos transportadores de hexoses na membrana plasmática poderia estar disponibilizando espaço

para outros transportadores de açúcares, inclusive a permease *AGT1*. Isto pode explicar em parte a maior atividade de transporte pela KY73, e com o influxo aumentado de açúcares supõe-se que vários intermediários da glicólise se acumulam nas células, atuando como sinais de indução/repressão de vários processos metabólicos que permitem o crescimento fermentativo (revisto por GONÇALVES & PLANTA, 1998, WANG et al., 2002). Por outro lado, já é conhecido que esta cepa deletada nos transportadores de hexoses é menos reprimida pela glicose, o que poderia estar favorecendo a utilização da maltotriose e conseqüentemente o processo fermentativo (REIFENBERGER et al., 1997). Além disto, já foi verificado que os transportadores *HXT* são também capazes de mediar o efluxo de glicose para fora da célula quando as células metabolizam maltose (JANSEN et al., 2002). Desta forma, é possível que na cepa KY73 estas moléculas de glicose provenientes da hidrólise da maltotriose não saíam da célula, provocando um influxo aumentado na via glicolítica e estimulando a fermentação da maltotriose.

Os resultados obtidos com a cepa CEN.PK2-1C indicam que a presença de um gene regulador *MALx3* constitutivo, característica desejável em leveduras industriais (ODA & OUCHI, 1990a; HIGGINS et al., 1999), poderia também estar envolvido na eficiente fermentação da maltotriose. Entretanto, os dados obtidos com a cepa MC966A transformada com o plasmídeo pJW5 contendo o gene *MAL63^c* indicam que a expressão constitutiva do regulador não é fundamental para a fermentação de maltotriose. De fato, análises sobre a influência deste gene na fermentação de maltose já haviam demonstrado que o *MAL63^c* foi incapaz de melhorar o processo fermentativo em cepas industriais (KODAMA et al., 1995). Inclusive, uma cepa contendo apenas o gene *AGT1* (cepa 340-2B) e transformada com o plasmídeo pJW5 foi capaz de utilizar a maltose e a maltotriose como fonte de carbono, porém novamente não foi observada produção de etanol a partir de maltotriose. Portanto, nossos resultados indicam que não só a presença e expressão da permease *AGT1* é fundamental para

a fermentação da maltotriose, como provavelmente existam outros fatores ainda não caracterizados (mecanismos de indução, regulação pós-tradução, etc.) que certamente contribuem para a eficiente fermentação deste açúcar pelas leveduras. A cepa CEN.PK2-1C certamente poderá constituir uma excelente plataforma para, através de técnicas de biologia molecular, poder identificar os vários genes/proteínas envolvidas na fermentação de maltotriose por *S. cerevisiae*.

V. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente trabalho foi analisado aspectos do metabolismo da maltose e maltotriose por *Saccharomyces cerevisiae* relevantes para os processos de panificação e cervejaria. Por exemplo, um problema encontrado nas indústrias de panificação é a inviabilidade de se estocar a massa de pão por longos períodos, já que células de leveduras não interrompem a fermentação quando submetidas à refrigeração. Uma vez que a maltose é o principal açúcar encontrado na massa do pão, a influência do frio (10°C) na fermentação deste açúcar foi analisada em uma cepa selvagem, e numa cepa mutante *csf1Δ* incapaz de transportar glicose e leucina a baixas temperaturas.

A baixa temperatura afetou a cinética da fermentação por diminuir a velocidade de crescimento e rendimento celular final, com quase nenhum etanol produzido a partir de maltose pelas células selvagens a 10°C. A cepa *csf1Δ* foi incapaz de crescer em maltose a 10°C, indicando que o gene *CSF1* é também necessário para a utilização de maltose a baixas temperaturas. Entretanto, o mutante *csf1Δ* também mostrou inibição acentuada da fermentação de glicose e maltose por estresse salino, além de uma significativa sensibilidade a uma série de cátions tóxicos. Estes resultados indicam que o gene *CSF1* estaria também envolvido na regulação de outros processos fisiológicos, incluindo a homeostase iônica. Portanto, os resultados indicam o gene *CSF1* estaria envolvido na regulação, por um mecanismo ainda desconhecido, de vários transportadores de membrana incluindo os de glicose, leucina, maltose, K^+ , e provavelmente lactato. Seria de extremo interesse analisar futuramente o papel que esta proteína teria na arquitetura molecular e/ou fisiologia da célula, particularmente nos processos moleculares do retículo endoplasmático e golgi envolvidos no tráfego de transportadores até a membrana celular durante situações de estresse.

Já em cervejaria a otimização do processo fermentativo depende da eficiente utilização de maltose e maltotriose pelas células de *S. cerevisiae*. Para tentar compreender melhor a metabolização da maltotriose, a utilização deste açúcar foi analisada em cepas de *S. cerevisiae* com genótipos definidos e deletadas, ou não, em permeases específicas. A cepa selvagem analisada cresceu lentamente em maltotriose, sem produzir etanol durante o crescimento. Nesta cepa aparentemente a maltotriose foi incapaz de induzir a expressão do transportador e α -glicosidase. Este fenótipo (crescimento lento e não fermentativo) não foi alterado pela deleção do gene *AGTI*, indicando que outro(s) transportador(es) estaria(m) provavelmente envolvido(s) na lenta utilização da maltotriose. Tentativas de analisar a presença destes outros genes no genoma das cepas por eletroforese de pulso invertido (que permite a separação dos cromossomos) e hibridização com sondas específicas foram infrutíferas, e certamente deverão ser melhor caracterizados no futuro. Alternativamente, seria interessante analisar a presença dos RNAm dos transportadores e da α -glicosidase após incubar as células em maltotriose no intuito de melhor caracterizar a indução (ou não) deste genes.

Por outro lado uma cepa deletada nos transportadores de hexoses (*hxt1-7 Δ gal2 Δ*) fermentou eficientemente a maltotriose, mas quando o gene *AGTI* foi deletado do genoma a cepa voltou a respirar este açúcar, indicando que a permease codificada pelo *AGTI* é fundamental para a fermentação da maltotriose. Seria interessante verificar as bases moleculares que permitem que a cepa deletada nos transportadores de hexoses fermente eficientemente a maltotriose. Por exemplo, existem algumas questões que podem ser melhor esclarecidas tais como: será que a permease *AGTI* é mais estável na membrana desta cepa? A repressão pela glicose estaria envolvida na ausência de fermentação da maltotriose?

Uma vez que a expressão constitutiva dos genes *MAL* é uma característica altamente desejável em cepas de panificação e cervejaria, decidiu-se analisar a contribuição que um gene regulador constitutivo teria na fermentação da maltotriose. Enquanto que algumas cepas

MAL constitutivas foram capazes de fermentar eficientemente a maltotriose, a transformação de uma cepa selvagem incapaz de fermentar este açúcar com um plasmídeo contendo o gene *MAL63^c* não melhorou a produção de etanol a partir de maltotriose. Seria interessante deletar o gene *AGT1* nas cepas *MAL* constitutivas que fermentam a maltotriose, e verificar o efeito que esta manipulação teria no perfil fermentativo das células.

De qualquer forma os resultados apresentados no presente trabalho indicam a existência de vários fatores que seriam necessários para a eficiente fermentação de maltotriose por *Saccharomyces cerevisiae* e, certamente estes aspectos do metabolismo da levedura deverão ser melhor esclarecidos no intuito de desenvolver cepas, técnicas e/ou processos que garantam a eficiente fermentação dos açúcares presentes no mosto cervejeiro.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDHOUS P. Genetic engineering: modified yeast fine for food. **Nature**, v.344, p. 186, 1990.
- ATTFIELD, P. V. Stress tolerance, the key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nat. Biotechnol.**, v. 15, p. 1351-1357, 1997.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. G & STRUHL, J. A. Short protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates, John Wiley & Sons. NY; 1995.
- BARFORD, J. P.& HALL, R. J. An examination of the crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of respiratory adaptation. **J. Gen. Microbiol.**, v. 114, p. 267-275, 1979.
- BENITO, B. & LAGUNAS, R. The low-affinity component of *Saccharomyces cerevisiae* maltose transport is an artifact. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 3065-3069, 1992.
- BOLES, E.; HOLLEMBERG, C. The molecular genetics of hexose transport in yeast. **FEMS MICROBIOL. REV.**, v.21, p. 85-111, 1997.
- BOTSTEIN, D.& FINK, G. R. Yeast: an experimental organism for modern biology. **Science**, v. 240, p. 1439-1443, 1988.
- BUTLER, D. Interest ferments in yeast genome sequence. **Nature**, v. 38, p. 660-661, 1996.
- CÁCERES, A.; CÁRDENAS, S.; GALLEGO, M. & VALCÁRCEL, M. A continuous spectrophotometric system for the discrimination/determination of monosaccharides and oligosaccharides in foods. **Analytica Chimica Acta**, v. 404, p. 121-129, 2000.
- CARLSON, M. Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces* species. **J. Bacteriol.**, v, 169, p. 4873-4877, 1987.
- CAUSTON, H. .C.; REN, B.; KOH, S. S. ; HARBISON, C. T.; KANIN, E.; JENNINGS E. G. , LEE, T. I.; TRUE, H. L.; LANDER, E. S.& YOUNG, R. A. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. **Mol. Biol. Cell.**, v. 12, p. 323-337, 2001.

CHANG, Y. S.; DUBIN, R. A.; PERKINS, E.; MICHELS, C.A. & NEEDLEMAN, R.B. Identification and characterization of maltose permease in a genetically defined *Saccharomyces* strain. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 6148-6154, 1989.

CHARRON, M. J. & MICHELS, C. A. The constitutive glucose-repression-insensitive mutation of the yeast *MAL4* locus is an alteration of the *MAL3* gene. **Genetics**, v.116, p. 23-31, 1987.

COHEN, B. A.; PILPEL, Y.; MITRA, R. D.& CHURCH, G. M. Discrimination between paralogs using microarray analysis: Application to the Yap1p and Yap2p transcriptional networks. **Mol. Biol. Cell.**, v.13, p. 1608-1614, 2002.

CRUMPLEN, R. M.; SLAUGHTER, J. C.& STEWART, G. G. Characteristics of maltose transporter activity in na ale and lager strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 23, p. 448-452.

D'AMORE, T.; RUSSELL, I. & STEWART, G. G. The effect of carbohydrate adjuncts on brewer's wort fermentation by *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*). **J. Inst. Brew.**, v. 95, p. 333-336, 1989.

DAY, R. E., HIGGINS, V. J., ROGERS, P. J. & DAWES, W. Characterization of the putative maltose transporters encoded by YDL247w and YJR160c. **Yeast**, v. 19, p. 1015-1027, 2002a.

DAY, R. E.; HIGGINS, V. J.; ROGERS, P. J. & DAWES, I. W. Characterization of the putative maltose transporters encoded by YJR160c and YDL247w. **Yeast**, v. 19, p1015-1027, 2002b.

DE DEKEN, R. H. The crabtree effect: a regulatory system in yeast. **J. Gen. Microbiol.**, v. 44, p. 149-156, 1966.

ENTIAN, K. D.; HINNEN, A. et al. Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. **Mol. Gen. Genet.**, v. 262, p. 683-702, 1999.

ERNANDES, J.R.; WILLIAMS, J.W.; RUSSELL, I. & STEWART, G. G. Effect of yeast adaptation to maltose utilisation on sugar uptake during the fermentation of brewer's wort. **J. Inst. Brew.**, v. 99, p. 67-71, 1993.

ERNANDES, J.R.; D' AMORE, T.; RUSSELL, I. & STEWART, G. G. Regulation of Glucose and maltose transport in strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ind. Microbiol.**, v.9, p. 127-130, 1992.

GAJDEROWICZ, L. J. Progress in the refrigerated dough industry. **Cereal Food World**, v. 24, p. 44-45, 1979.

GALAZZO, J. L. & BAILEY, J. E. Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microb. Technol.**, v.12, p. 162-172, 1990.

GANCEDO, C.& SERRANO, R. Energy-yielding metabolism. **The Yeast**, v. 3, p. 205-259, 1989.

GASCH, A. P.; SPELLMAN, P. T.; KAO, C. M.; CARMEL-HARE, O., EISEN, M. B.; STORZ, G.; BOTSTEIN, D.& BROWN, P. O. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Mol. Biol. Cell.**, v. 11: p. 4241-4257, 2000.

GHAEMMAGHAMI, S.; HUH, W.; BOWER, K.; HOWSON, R. W.; BELLE, A.; DEPHOURE, N.; O'SHEA, E. K. & WEISSMAN, J. S. Global analysis of protein expression in yeast. **Nature**, v. 425, p. 737-741, 2003.

GIBSON, A.W.; WOJCIECHOWICZ, L. A.; DANZI, S. E.; ZHANG, B.; KIM, J. H.; HU, Z. & MICHELS, C.A. Constitutive mutations of the *Saccharomyces cerevisiae* *MAL*-activator genes *MAL23*, *MAL43*, *MAL63*, and *mal64*. **Genetics**, v. 196. p. 1287-1298, 1996.

GOFFRINI, P., FERRERO, I. & DONNINI, C. Respiration-dependent utilization of sugars in yeasts: a determinant role for sugar transporters. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 427-432, 2002.

GOLDENTHAL, M. J.; VANONI, M.; BUCHFERER, B. & MARMUR, J. Regulation of *MAL* gene expression in yeast: Gene dosage effects. **Mol. Gen. Genet.**, v. 209, p. 508-517, 1987

GÓMEZ, M. J.; LUYTEN, K. & RAMOS, A. The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 135, p. 157-160, 1996.

GONÇALVES, P. M. & PLANTA, R. J. Starting up yeast glycolysis. **Trends Microbiol.**, v. 6, p. 314-319, 1998.

GYSLER, C.& NIEDERBERGER, P. The development of low temperature inactive (Lti) baker's yeast. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 61: p. 639-642, 2002.

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

HARRIS, G. & THOMPSON, C.C. Uptake of nutrients by yeast. II. Maltotriose permease and the utilization of maltotriose by yeasts. **J. Inst. Brew.**, v. 66, p. 293-297, 1960.

HIGGINS, V. J.; BRAIDWOOD M.; BELL, P.; BISSINGER, P. ; DAWES, I. W. & ATTIFIELD, P. V. Genetic evidence that high noinduced maltase and maltose permease activities, governed by *MALx3*-encoded transcriptional regulators, determine efficiency of gas production by baker's yeast in unsugared dough. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 680-685, 1999.

HOLLATZ, C. & STAMBUK, B. U. Colorimetric determination of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Microbiol. Meth.**, v. 46, p. 253-259, 2001.

HORÁK, J. Yeast nutrient transporters. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 331, p. 41-79, 1997.

HUH, W. K.; FALVO, J. V.; GERKE, L. C.; CARROLL, A. S., HOWSON, R. W., WEISSMAN, J. S. & O'SHEA, E. K. Global analysis of protein localization in budding yeast. **Nature**, v. 425: p. 686-691, 2003.

INGLEDEW, W. M. Yeasts for production of fuel ethanol *In: The Yeasts*, Rose, A. H. & Harrison, J. S. (eds), **Academic Press**, San Diego, USA, v. 5, p. 245-291, 1993.

JANSEN, M. L. A.; JOHANNES, H.; DE WINDE, H. & PRONK, J. T. Hxt-carrier-mediated glucose efflux upon exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to excess maltose. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 4259-4265, 2002.

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

KNOP, M.; SIEGERS, K.; PEREIRA, G.; ZACHARIAE, W.; WINSOR, B.; NASMYTH, K. & SCHIEBEL, E. Yeast functional analysis reports: Epitope tagging of yeasts genes using PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. **Yeast**, v. 15, p. 963-972, 1999.

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

- KYOGOKU, Y. & OUCHI, K. Isolation of cold-sensitive fermentation mutant of a baker's yeast strain and its use in refrigerated dough process. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 639-642, 1995.
- LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 104, p. 229-242, 1993.
- LAU, W. W. T.; HOWSON, R. W.; MALKUS, P.; SHECKMAN, R. & O'SHEA, E. Pho86p, an endoplasmic reticulum (ER) resident protein in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for ER exit of the high-affinity phosphate transporter Pho84p. **Cell Biol.**, v. 97, p. 1107-1112, 2000.
- LEVINE, J.; TANOUYE, L. & MICHELS, C. A. The UAS_{MAL} is bidirectional promoter element required for the expression of both the *MAL61* and *MAL62* genes of the *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 22, p. 181-189, 1992.
- LIN, S. J.; KAEBERLEIN, M.; ANDALIS, A. A.; STURTZ, L. A.; DEFOSSEZ, P. A.; CULOTTA, V. C. & FINK, G. R.; GUARENTE, L. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. **Nature**, v. 418: p. 344-348, 2002.
- LJUNGDAHL, P. O.; GIMENO, C. J.; STYLES, C. A. & FINK, G. R. SHR3: A novel component of the secretory pathway specifically required for localization of amino acid permeases in yeast. **Cell**, v. 71, p. 463-478, 1992.
- LONGTINE, M. S., MCKENZIE, A., DEMARINI, D. J., SHAH, N.G., WACH, A., BRACHAT, A., PHILIPPSEN, P. & PRINGLE, J. R. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.14, p. 953-961, 1998.
- LOUREIRO-DIAS, M. C. & PEINADO, J. M. Transport of maltose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. J.**, v. 222, p. 293-298, 1984.
- MADRID, R.; GÓMEZ, M.; RAMOS, A. & RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. Ectopic potassium uptake in *trk1 tkk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 14838-14844, 1998.
- MALLUTA, E.F.; DECKER, P. & STAMBUK, B. U. The Kluyver effect for trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Basic Microbiol.**, v. 40, p. 199-205, 2000.

MEDINTZ, I.; JIANG, H.; HAN, E-K.; CUI, W. & MICHELS, C.A. Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 2245-2254, 1996.

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. 655-65.

MOIR, D.; STEWART S. E.; OSMOND, B. C. & BOTSTEIN, D. Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties and pseureversion studies. **Genetics**, v. 100, p. 547-563, 1982.

MULET, J. M.; LEUBE, M. P.; KRON, S. J. RIOS, G. & FINK, G. R.; SERRANO, R. A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, p. 3328-3337, 1999.

MYERS, D. K.; Joseph, V. M.; PEHM, S.; GALVAGNO, M. & ATTFIELD, P. V. Loading of *Saccharomyces cerevisiae* with glycerol leads to enhanced fermentation in sweet bread doughs. **Food Microbiol.**, v. 15, p. 51-58, 1998.

NAUMOV, G. I. , NAUMOVA, E. S., SANCHO E. D. & KORHOLA, M. P. Polymeric *SUC* genes in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 135, p. 31-35, 1996.

NEEDLEMAN, R. Control of maltase synthesis in yeast. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 2079-2084, 1991.

ODA, Y. & OUCHI, K. Role of the yeast maltose fermentation genes in CO₂ production rate from sponge dough. **Food Microbiol.**, v. 7, p. 43-47, 1990.

OPERAKOVÁ, M.; ROBL, I. & TANNER, W. Phosphatidyl ethanolamine is essential for targeting the arginine transporter Can1p to the plasma membrane of yeast. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1564, p. 9-13, 2002.

OSINGA, K. A.; RENNIERS, A. C. H. M.; WELBERGEN, J.W.; ROOBOL, R. H. & VAN DER WILDEN, W. Maltose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** v. 5, p.S207-S212, 1989.

- OZCAN, S.& JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, p. 554-559, 1999.
- PALACIOS, J. & SERRANO, R. Proton permeability induced by polyene antibiotics. A plausible mechanism for their inhibition of maltose fermentation in yeast. **FEBS Lett.** v. 91, p. 198-201, 1978.
- PANCHAL, C. J. & STEWART, G.G. Utilization of wort carbohydrates. **Brew. Dig.**, v. 54, p. 26-48, 1979.
- POSTMA, E. SCHEFFERS, W. A.& VAN DIJIKEN, J. D. Kinetics of growth and glucose transport in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **CBS 8066 Yeast**, v.5, p. 159-165, 1989.
- RANDEZ-GIL, F.; SANZ, P.& PRIETO, J. A. Engineering baker's yeast: room for improvement. **Trends Biotechnol.**, v.17, p. 237-244, 1999.
- RAUTIO, J.& LONDESBOROUGH, J. Maltose transport by brewer's yeasts in brewer's wort. **J. Inst. Brew.**, v. 109, p. 251-261, 2003.
- REES E. M. R. & STEWART, G. G. Effects of magnesium, calcium and wort oxygenation on the fermentative performance of ale and lager strains fermenting normal and high gravity worts. **J. Inst. Brew.**, v. 105, p. 211-217, 1999.
- REES E. M. R. & STEWART, G. G. The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts. **J. Inst. Brew.**, v. 103, p. 287-291, 1997.
- REIFENBERGER, E.; BOLES, E. & CIRIACY, M. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **Eur. J. Biochem.**, v. 245, p. 324-333, 1997.
- RIBALLO, E.; HERWIJER, M.; WOLF, D. H. & LAGUNAS, R. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 5622-5627, 1995.

- ROBL, I.; GRABL, R.; TANNER, W. & OPERAKOVÁ, M. Effect of phosphatidylethanolamine on amino acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the 18th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics, p. 37, Ouro Preto, Brasil, 2000.
- RODIONOV, Y. V.; KEPPEL, O. I. & SUKHACHEVA, M. V. A photometric assay for ethanol. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 38, p. 395-396, 2002.
- RODRIGUEZ-VARGAS, S.; ESTRUCH, F. & RANDEZ-GIL, F. Gene expression analysis of cold and freeze stress in Baker's yeast. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 3024-3030, 2002.
- ROSE, A. H. & VIJAYALAKSHMI, G. *In: The Yeasts*, vol. 5, pp 357-397. Rose, A.H. & Harrison, J.S. (eds), **Academic Press**, USA, 1993.
- SAHARA, T.; GODA, T. & OHGIYA, S. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. **J. Biol. Chem.**, v.277, p. 5015-50021, 2002.
- SALGADO, A. M.; FOLLY, R. O. M.; VALDMAN, B. COS, O. & VALERO, F. Colorimetric method for the determination of ethanol by flow injection analysis. **Biotechnol. Lett.**, v. 22, p. 327-330, 2000.
- SALMON, J. M.; MAURICIO, J. C. Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *S. cerevisiae* strains during alcoholic fermentation. **Biotechnol. Lett.**, v. 16, p. 89-94, 1994.
- SAMUEL, D. Investigation of ancient egyptian baking and brewing methods by correlative microscopy. **Science**, v. 273, p. 488-490, 1996.
- SERRANO, R. In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. **FEBS Lett.**, v. 156, p. 11-14, 1983.
- SERRANO, R. Energy requirements for maltose transport in yeast. **Eur. J. Biochem.**, v. 80, p. 97 -102, 1977.
- SHARMA, S. C.; RAJ, D.; FOROUZANDEH, M. & BANSAL, M. P. Salt-induced changes in lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 56, p. 189-195, 1996.

SHERWOOD, P. W. & CARLSON, M.. Efficient export of the glucose transporter Hxt1p from the endoplasmic reticulum requires Gsf2p. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p.7415-7420, 1999.

SINGH, A. & MANNEY, T. R. Genetics analysis of mutations affecting growth of *Saccharomyces cerevisiae* at low temperature. **Genetics**, v. 77, p. 651-659, 1974.

SIRENKO, O. I.; Ni, B.& Needleman, R. B. Purification properties of Mal63p activator of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 27, p. 509-516, 1995.

STAMBUK, B. U. Transcriptional and posttranslational regulation of a membrane nutrient transporter. **Biochem. Mol. Biol. Edu.**, v. 30, p. 388-393, 2002.

STAMBUK, B. U. & DE ARAÚJO, P. S.. Kinetics of active α -glucoside transport by *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v. 1, p. 73-78, 2001.

STAMBUK, B.U.; DA SILVA, M. A.; PANEK, A.D. & DE ARAÚJO, P.S. Active transport of α -glucosides in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 170, p. 105-110, 1999.

STAMBUK, B. U.; PANEK, A. D.; CROWE, J. H.; CROWE, L.M. & DE ARAÚJO, P.S. Expression of high-affinity trehalose- H^+ symport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1379, p. 118-128, 1998.

STAMBUK, B. U., DE ARAUJO, P.S., PANEK, A. D. & SERRANO, R. Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 237, p. 876-881, 1996.

STAMBUK, B. U., CROWE, J.H., CROWE, L. M., PANEK, A. D. & DE ARAUJO, P.S. A dependable method for the synthesis of [^{14}C]trehalose. **Anal. Biochem.**, v. 212, p. 150-153, 1993.

STEINMETZ, L. M.; SCHARFE, C., DEUTSCHBAUER, A. M.; MOKRANJAC, D.; HERMAN, Z. S., JONES, T.; CHU, A. M.; GIAEVER, G.; PROKISCH, H.; OEFNER, P. J.& DAVIS, R. W. Systematic screen for human disease genes in yeast. **Nat. Genet.**, v. 31: p. 400-4004,2002.

STEWART, G. G.& RUSSEL, I. Fermentation – “the black box” of the brewing process. **MBAA Tech. Quart.**, V. 30, p. 159-168, 1993.

STEWART, G. G.; ERRAT, J.; GARRINSON, I. GORING, T & HANCOCK, I. Studies on the utilization of wort carbohydrates by brewer's yeast strains. **MBAA Tech. Quarterly**, v. 16, p. 1-7, 1989.

STRAUSS, E. J. & GUTTHRIE, C. A cold-sensitive m RNA splicing mutant is a member of the RNA helicase gene family. **Genes Dev.**, v. 5, p. 629-641, 1991.

SUIHKO, M. L.; HOME, S. & LINKO, M. Wort sugars, yeast sugar uptake and beer quality. **Monatsschr. Brauwiss.**, v.46, p. 185-192. 1993.

TABATA, S.; IDE, T.; UMEMURA, Y. & TORII, K. Purification and characterization of α -glucosidases produced by *Saccharomyces* in response to three distinct maltose genes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 797, p. 231-238, 1984.

TOKAI, M.; KAWASAKI, H.; KIKUCHI, Y. & OUCHI, K. Cloning and characterization of the *CSF1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which is required for nutrient uptake at low temperature. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 2865-2868, 2000.

TONG, A. H. Y.; EVANGELISTA, M.; PARSONS, A. B.; XU, H.; BADER, G. D.; PAGE, N.; ROBINSON, M.; RAGHIBIZADEH, S.; HOGUE, C. W. V.; BUSSEY, H.; ANDREWS, B.; TYERS, M. & BOONE, C. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. **Science**, v. 294, p. 2364-2368, 2001.

TRAINOTI, N. & STAMBUK, B. U. NaCl stress inhibits maltose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett.**, v. 23, p. 1703-1707, 2001.

TRUMBLY, R. J. Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol.**, v. 1, p. 15-21, 1992.

VAN DIJCK, P.; COLAVIZZA, D.; SMET, P. & THEVELEIN, J. M. Differential importance of trealose in stress resistance in fermenting and non fermenting *S. cerevisiae* cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 109-115, 1995.

VAN DIJKEN, J. P. & SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 43, p. 275-278, 1987.

VAN LEEUWEN, C. C. M.; WEUSTHUIS, R. A.; POSTMA, E.; VAN DEN BROEK, P. J. A. & VAN DIJCKEN, J. P. Maltose proton co-transport in *S. cerevisiae*. Comparative study with cells and plasma membrane vesicles. **Biochem. J.**, v. 284, p. 441-445, 1992.

VANONI, M.; SPLITT, P.; GOLDENTHAL, M. & MARMUR, J. Structure and regulation of the multigene family controlling maltose fermentation in budding yeast. **Progr. Nucl. acid Res. Mol. Biol.**, v. 37, p. 281-322, 1989.

WANG, X.; BALI, M.; MEDINTZ, I. & MICHAELS, C. A. Intracellular maltose is sufficient to induce *MAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukariot. Cell**, v. 1, p. 696-703, 2002.

WANG, J. & NEEDLEMAN, R. Removal of a Mig1p binding site converts a *MAL63* constitutive mutant derived by interchromosomal gene conversion to glucose insensitivity. **Genetics.**, v. 142, p. 51-63, 1995.

WEUSTHUIS, R.A.; ADAMS, H.; SCHEFFERS, W.A. & VAN DIJCKEN, J.P. Energetics and kinetics of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*: a continuous culture study. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 3102-3109, 1993.

WILLAERT, R. Sugar consumption kinetics by brewer's yeast during the primary beer fermentation. **Cerevisia**, v. 26, p. 43-49, 2001.

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

ZASTROW, C. R.; MATOS, M. A.; HOLLATZ, C. & STAMBUK, B. U. Maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett.**, v.22, p. 455-459, 2000.

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

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

VII. ANEXO

REGULATION OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MALTOSE FERMENTATION BY COLD TEMPERATURE AND *CSF1*.

(artigo publicado na revista *Brazilian Journal of Microbiology*)

Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Maltose Fermentation by Cold Temperature and *CSF1*

CLAUDIA HOLLATZ; BORIS U. STAMBUK*

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, FLORIANÓPOLIS, SC, BRAZIL.

ABSTRACT

We studied the influence of cold temperature (10°C) on the fermentation of maltose by a *S. cerevisiae* wild-type strain, and a *csf1*Δ mutant impaired in glucose and leucine uptake at low temperatures. Cold temperature affected the fermentation kinetics by decreasing the growth rate and the final cell yield, with almost no ethanol been produced from maltose by the wild-type cells at 10°C. The *csf1*Δ strain did not grow on maltose when cultured at 10°C, indicating that the *CSF1* gene is also required for maltose consumption at low temperatures. However, this mutant also showed increased inhibition of glucose and maltose fermentation under salt stress, indicating that *CSF1* is probably involved in the regulation of other physiological processes, including ion homeostasis.

Key words: refrigerated dough, maltose fermentation, Baker's yeast, salt stress.

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brasil.

Fax: +5548 331-9672, e-mail: bstambuk@mbox1.ufsc.br

INTRODUCTION

Refrigerated doughs are of increasing importance in the bakery sector. These doughs permit the separation of the processes of dough production and baking, allowing large-scale production and distribution of doughs independent of the subsequent baking process (3). Various refrigerated dough products are currently available on the market, but since they are mostly leavened by chemical agents, they tend to have an inferior organoleptic quality compared with yeast-leavened dough products. Currently available commercial baker's yeasts are not applicable for such applications as they are too active under refrigerated conditions. Although glycolytic activity decreases with decreased temperature, baker's yeast still ferments even at

extremely low temperatures when stored for days. The initiation of fermentation by baker's yeast is associated with a rapid loss of stress resistance, including cold resistance (1,15). Furthermore, the consumption of sugars in dough during storage decreases the browning of the crust during baking, an excess production of metabolites it is likely to deteriorate the flavor, and expansion of dough under refrigeration is undesirable because more storage space is needed. Although special dough preparation methods and/or additives have been developed to overcome these problems (6), these special techniques have restricted the spread of refrigerated dough usage. Therefore, it would be highly desirable to develop specific tailored baker's yeast strains with a strongly reduced fermenting activity under refrigeration, but maintaining normal leavening power at proofing temperatures (4,9).

Recently Kyogoku and Ouchi (5) described the isolation of cold sensitive fermentation (*csf*) mutants of baker's yeast which displayed substantially reduced fermentative activity at cold temperatures (below 15°C), but with normal fermentation activity when the temperature is raised to 25°C or above. The molecular analysis of one of such mutants (*csf1*) revealed that the *CSF1* gene corresponds to the ORF encoded by YLR087c located on chromosome XII (13). The predicted protein has a calculated molecular mass of 338 kDa containing four transmembrane motifs, and strains deleted on this gene (*csf1*Δ) do not grow or ferment only at low temperatures. This phenotype of the *csf1*Δ strain was a consequence of low glucose and leucine uptake at the restrictive temperature (10°C), while at 30°C the rates of transport were normal (13). Cold temperature effects on yeast fermentation performance have mainly been studied using glucose as carbon source (5,11-13). Although this has intrinsic fundamental value, the main sugar present in unsugared dough is maltose (8) and the response of *S. cerevisiae* to cold temperatures during fermentation of maltose has not been characterized in detail. In this work, we have analyzed the maltose fermentation performance of wild-type and *csf1*Δ strains under different temperatures and stress conditions.

MATERIALS AND METHODS

The *S. cerevisiae* wild-type strain CEN.PK2-1C (*MATa ura3-52 his3ΔI leu2-3,112 trp1-289 MAL2-8^c SUC2*) and the *csf1*Δ deleted mutant strain CEN.H113-6D (*MATa ura3-52 his3ΔI leu2-3,112 trp1-289 YLR087c::URA3 MAL2-8^c SUC2*) were obtained from

EUROSCARF (Institute for Microbiology, University of Frankfurt, Germany). Cells were grown aerobically in batch culture (160 rpm) at 10 or 30°C on YEP medium (pH 5.0) containing 2% peptone, 1% yeast extract, and 2% of glucose or maltose. Solid medium plates contained 2% agar. When indicated the YEP medium was supplemented with 1 M NaCl, 1.3 M KCl, 1 mM tetramethylammonium (TMA), 0.2 M CaCl₂, or 0.1 mg hygromycin B (Hyg B) mL⁻¹. These last two compounds were added to the already autoclaved medium. Plates at pH 3.5 were prepared by adjusting a twofold-concentrated medium containing 50 mM succinic acid to the desired pH with Tris, autoclaving, and mixing with concentrated agar before pouring. Growth was measured at 570 nm on a UV-vis spectrophotometer after appropriate dilution of the medium. Samples were taken regularly, the cells harvested by centrifugation (2,600 g, 3 min), and the supernatant used to determine the consumption of sugars and ethanol production. Glucose and ethanol were determined using commercial enzymatic kits (Gold Analisa Diagnóstica Ltda. and Sigma, respectively). Maltose was assayed as described elsewhere (2). The experiments were repeated at least three times with consistent results. Representative results are shown.

RESULTS AND DISCUSSION

The growth and maltose fermentation profile of the wild-type strain incubated at 10 and 30°C (Fig. 1) shows that cold temperatures affect not only the fermentation kinetics (rates and length of fermentation), but also yeast metabolism. Although at 30°C glucose or maltose were efficiently fermented reaching ~10 g ethanol L⁻¹, at 10°C the growth rates decreased and almost no ethanol was produced from maltose (~1.5 g ethanol L⁻¹), while under this temperature glucose fermentation yielded ~4.5 g ethanol L⁻¹. This probably is a consequence of a higher energy demand for maintenance under cold temperature, affecting maltose fermentation due to the further energy requirement for active maltose uptake by yeasts (16). Our results are also in agreement with a strong temperature dependence recently observed for

maltose transport by yeast (10). The *csf1Δ* strain did not ferment or grow on maltose (Fig. 2) when cultured at 10°C, but at 30°C both glucose and maltose were fermented at rates similar to the ones obtained with the wild-type strain. Thus, our results clearly indicate that the *CSF1* gene is also required for maltose utilization at low temperatures.

We next analyzed the effect of high salt stress on the fermentation performance of both strains, since this stress is known to inhibit maltose fermentation by yeast cells while glucose fermentation is unaffected (14). The wild-type strain was able to produce ~5.5 g ethanol L⁻¹ from maltose in the presence of 1 M NaCl at 30°C (Fig. 1), but maltose fermentation by the *csf1Δ* strain was completely inhibited under this condition (Fig. 2). Our results also showed that the salt stress affected glucose fermentation by the *csf1Δ* strain to the same degree as maltose fermentation is inhibited by this stress (data not shown). Indeed, the *csf1Δ* strain showed an increased sensitivity (Fig. 3) to several toxic cations (calcium, hygromycin B, tetramethylammonium) and acidic pH, but not to high potassium concentrations. This phenotype is consistent with hyperpolarization of the plasma membrane, a phenomenon observed in strains lacking the Trk1-Trk2 potassium transporters, or lacking the kinases that activate these transporters (7). Although the mechanism by which *CSF1* allows normal nutrient uptake at low temperatures is still unknown, our results indicate that the *csf1Δ* mutant strain displays a complex pleiotropic phenotype which includes deficiencies in ion homeostasis and salt tolerance. Further research efforts will be directed towards the identification of the molecular mechanism(s) involved in the inhibition of sugar fermentation triggered by cold temperature or salt stress in the *csf1Δ* mutant.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. A.F. Maris for providing yeast strains. This work was supported by FAPESP, CNPq and FUNCITEC. During the course of this work, C.H. was supported by a fellowship from CAPES.

RESUMO

Regulação da fermentação de maltose em *Saccharomyces cerevisiae* por baixas temperaturas e *CSFI*

Foi estudado o efeito da baixa temperatura (10°C) na fermentação de maltose por uma cepa de *S. cerevisiae* selvagem, e uma cepa *csf1Δ* mutante incapaz de transportar glicose e leucina a baixas temperaturas. A baixa temperatura afeta a cinética da fermentação por diminuir a velocidade de crescimento e rendimento celular final, com quase nenhum etanol produzido a partir de maltose pelas células selvagens a 10°C. A cepa *csf1Δ* foi incapaz de crescer em maltose a 10°C, indicando que o gene *CSFI* é também necessário para a utilização de maltose a baixas temperaturas. Entretanto, o mutante também mostrou inibição acentuada da fermentação de glicose e maltose por estresse salino, indicando que *CSFI* também estaria envolvido na regulação de outros processos fisiológicos, incluindo a homeostase iônica.

REFERENCES

1. Attfield, P.V. Stress tolerance, the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat. Biotechnol.*, 15: 1351-1357, 1997.
2. Caceres, A.; Cardenas, S.; Gallego, M.; Valcarcel, M. A continuous spectrophotometric system for the discrimination/determination of monosaccharides and oligosaccharides in foods. *Anal. Chim. Acta*, 404: 121-129, 1999.
3. Gajderowicz, L.J. Progress in the refrigerated dough industry. *Cereal Food. World*, 24: 44-45, 1979.
4. Gysler, C.; Niederberger, P. The development of low temperature inactive (Lti) baker's yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58: 210-216, 2002.
5. Kyogoku, Y.; Ouchi, K. Isolation of cold-sensitive fermentation mutant of a baker's yeast strain and its use in refrigerated dough process. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 639-642, 1995.
6. Myers, D.K.; Joseph, V.M.; Pehm, S.; Galvagno, M.; Attfield, P.V. Loading of *Saccharomyces cerevisiae* with glycerol leads to enhanced fermentation in sweet bread doughs. *Food Microbiol.*, 15: 51-58, 1998.
7. Mulet, J.M.; Leube, M.P.; Kron, S.J.; Rios, G.; Fink, G.R.; Serrano, R. A novel mechanism of ion

- homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 3328-3337, 1999.
8. Oda, Y.; Ouchi, K. Role of the yeast maltose fermentation genes in CO₂ production rate from sponge dough. *Food Microbiol.*, 7: 43-47, 1990.
9. Randez-Gil, F.; Sanz, P.; Prieto, J.A. Engineering baker's yeast: room for improvement. *Trends Biotechnol.*, 17: 237-244, 1999.
10. Rautio, J.; Londesborough, J. Maltose transport by brewer's yeasts in brewer's wort. *J. Inst. Brew.*, 109: 251-261, 2003.
11. Rodriguez-Vargas, S.; Estruch, F.; Randez-Gil, F. Gene expression analysis of cold and freeze stress in Baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 3024-3030, 2002.
12. Sahara, T.; Goda, T.; Ohgiya, S. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *J. Biol. Chem.*, 277: 5015-50021, 2002.
13. Tokai, M.; Kawasaki, H.; Kikuchi, Y.; Ouchi, K. Cloning and characterization of the *CSFI* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which is required for nutrient uptake at low temperature. *J. Bacteriol.*, 182: 2865-2868, 2000.
14. Trainotti, N.; Stambuk, B.U. NaCl stress inhibits maltose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, 23: 1703-1707, 2001.
15. Van Dijck, P.; Colavizza, D.; Smet, P.; Thevelein, J.M. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 109-115, 1995.
16. Weusthuis, R.A.; Adams, H.; Scheffers, W.A.; van Dijken, J.P. Energetics and kinetics of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*: a continuous culture study. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3102-3109, 1993.

Figure legends:

Figure 1. Growth and maltose fermentation by the wild-type CEN.PK2-1C strain. Cell density (A), sugar consumption (B) and ethanol production (C) were determined during growth at 10°C (▲), or at 30°C in the absence (●) or presence of 1 M NaCl (□).

Figure 2. Growth and maltose fermentation by the *csf1* Δ mutant strain CEN.H113-6D. Cell density (A), sugar consumption (B) and ethanol production (C) were determined during growth at 10°C (\blacktriangle), or at 30°C in the absence (\bullet) or presence of 1 M NaCl (\square).

Figure 3. Sensitivity of the *csf1* Δ mutant to toxic cations. Serial dilutions (1/10 and 1/100 in water) of the wild-type CEN.PK2-1C strain (*w.t.*) and the *csf1* Δ mutant CEN.H113-6D strain (*csf1*) were spotted on YEP medium containing 2% maltose (YPM), or this medium containing the indicated concentrations of toxic cations or acidic buffer, and growth was monitored after 2 days at 30°C.

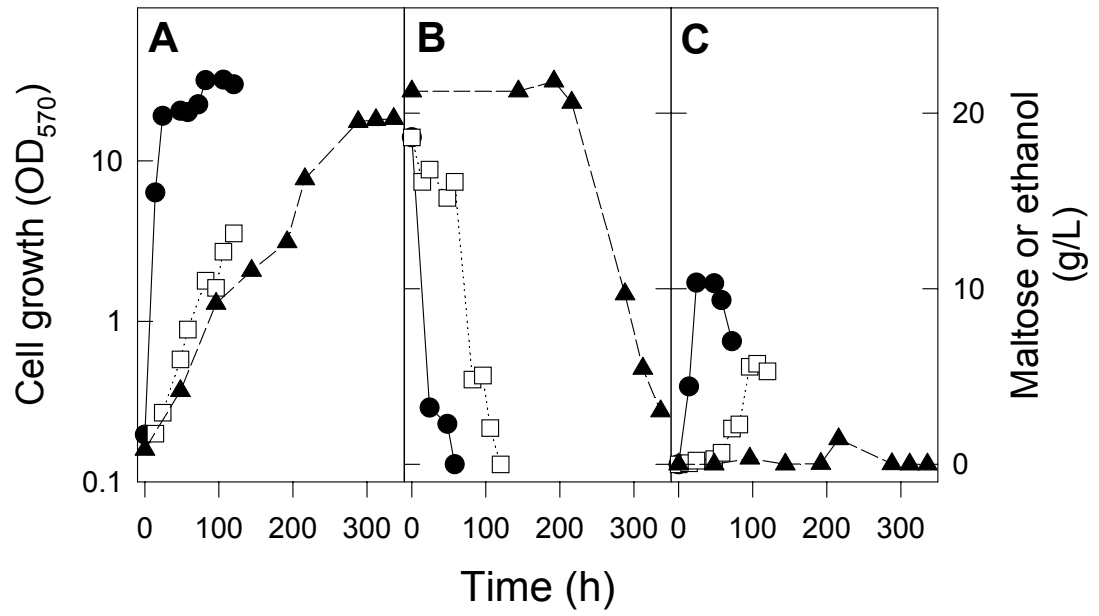


FIG. 1. HOLLATZ & STAMBUK

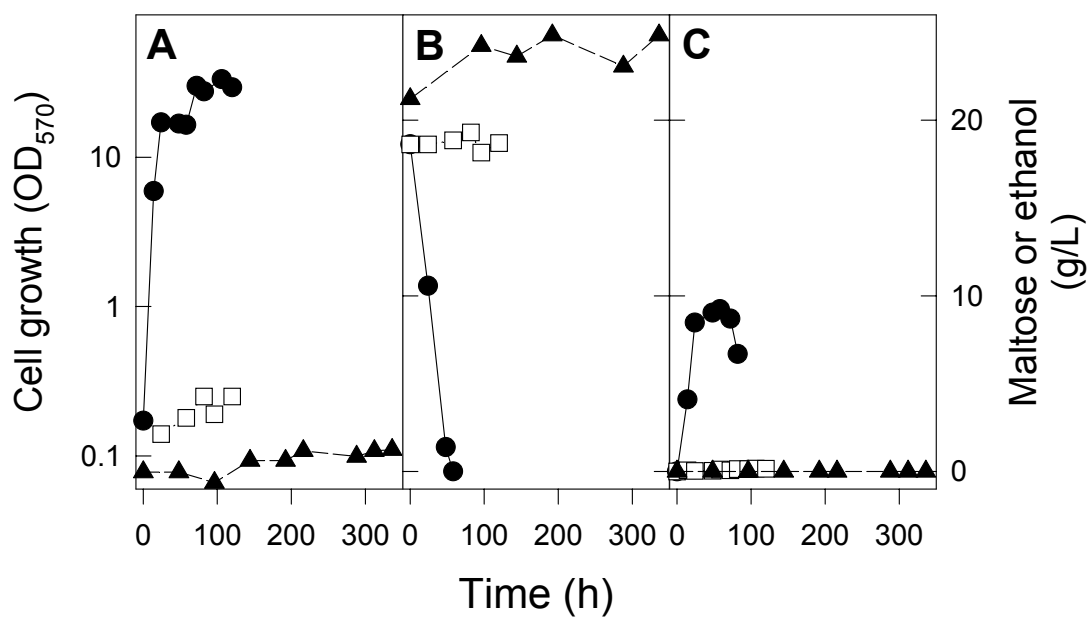


FIG. 2. HOLLATZ & STAMBUK

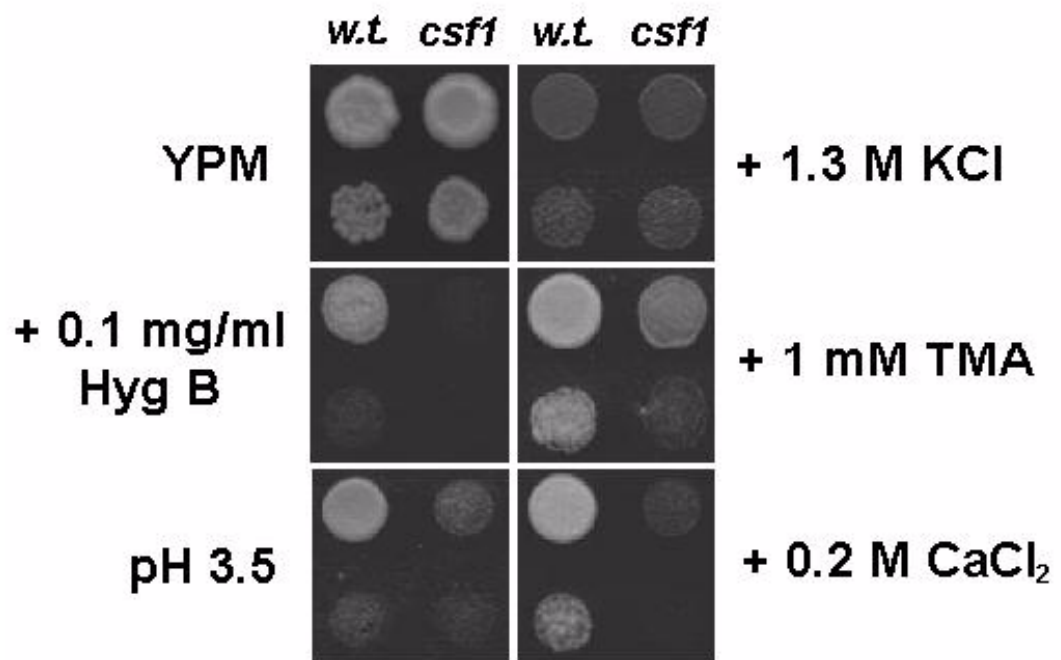


FIG. 3. HOLLATZ & STAMBUK