



**Susana Isabel Serra
Messias**

**Caraterização dos polissacarídeos da parede celular
das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e
Saccharomyces pastorianus.**



**Susana Isabel Serra
Messias**

**Caraterização dos polissacarídeos da parede celular
das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e
Saccharomyces pastorianus.**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, Especialidade Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Elisabete Coelho, Bolseira de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à minha família...

O Júri

Presidente

Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor Auxiliar do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Orientador

Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
Professor Associado com agregação do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Arguente

Licenciada Ana Isabel Ribeiro
Diretora de Inovação e Desenvolvimento da Unicer Bebidas, SA

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores Professor Doutor Manuel António Coimbra e Doutora Elisabete Coelho por todo o conhecimento transmitido, disponibilidade e motivação ao longo deste ano.

Agradeço à Unicer Bebidas, SA, pela levedura cervejeira fornecida e à Dr^a Ana Isabel Ribeiro por nos ter recebido para o fornecimento da levedura.

À Doutora Ana Rita Bezerra pela ajuda disponibilizada para pesquisar a homologia no genoma da levedura *S. cerevisiae*.

Ao QOPNA, Resposta e a todos os meus colegas de laboratório. De uma maneira especial à Joana, Ana, Rita Bastos, e aos voluntários João e Cátia. Agradeço também ao Ricardo Pinto pela ajuda na preparação das amostras para o SEM.

Agradeço a todos os meus amigos: Marisa, David, Ângela, Joana Lopes, Joana Pereira, Sofia, Rita, Andreia, Patrícia, Adriana e André por todo o apoio e força que me deram ao longo deste percurso.

Aos meus pais, irmã e avós por serem os meus pilares, por acreditarem em mim e apoiarem as minhas escolhas.

Obrigado a todos...

Palavras-chave

Levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, polissacarídeos da parede celular, β -glucanas, manoproteínas, quitina, valorização da levedura excedentária da cerveja

Resumo

A indústria cervejeira usa diferentes espécies de leveduras *Saccharomyces* para a produção de cerveja. As leveduras são normalmente reutilizadas em 3-7 ciclos fermentativos e em seguida, são descartadas, sendo designado como levedura excedentária da cerveja (BSY). A BSY é um dos maiores subprodutos resultantes da indústria cervejeira e é fonte de polissacarídeos, nomeadamente glucanas, manoproteínas e quitina, provenientes da parede celular.

No presente trabalho foram analisados os polissacarídeos das leveduras *S. cerevisiae* com 1 e 3 ciclos fermentativos e *S. pastorianus* com 2 e 6 ciclos fermentativos. Os polissacarídeos da parede celular das leveduras foram extraídos sequencialmente recorrendo à extração com água a 100 °C e à extração aquosa assistida por micro-ondas (MWE) a 180 °C. A extração com água quente permitiu extrair os polissacarídeos da superfície da parede celular que, no caso da *S. cerevisiae*, são constituídos essencialmente por resíduos de glucose em ligação (1→4) e, no caso da *S. pastorianus* são constituídos por resíduos de manose em ligação terminal, (1→2)-Man e (1→2,6)-Man. Os extratos solúveis da MWE, de *S. cerevisiae* são ricos em (1→4)-Glc e os da *S. pastorianus* são ricos em (1→2)-Man e (1→2,6)-Man. O resíduo insolúvel é composto por (1→4) e (1→3) glucanas.

Os resíduos de glucose em ligação (1→4) foram sensíveis à hidrólise com α -amilase e com celulase, permitindo inferir a presença de resíduos com configuração anomérica α e β .

Por microscopia eletrónica de varrimento verificou-se que a estrutura tridimensional das leveduras se mantém no resíduo após extração aquosa dos polissacarídeos. Uma potencial valorização deste resíduo poderá ser como microcápsula para a incorporação de compostos bioativos na área alimentar ou clínica.

A levedura excedentária da cerveja apresenta grande variabilidade dependendo da estirpe/espécie da levedura e ainda do número de ciclos fermentativos a que está sujeita. Os extratos solúveis de MWE de *S. cerevisiae* são fonte de glucose em ligação (1→3), quando provenientes de um baixo número de reutilizações, e/ou ligação (1→4), se provenientes de um elevado número de reutilizações. As *S. pastorianus* são fonte de manoproteínas.

Keywords

Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, cell wall polysaccharides, β -glucans, mannoproteins, chitin, valuation of brewer's spent yeast

Abstract

Beer industry uses different *Saccharomyces* yeast species, which are reused during 3-7 fermentative cycles. When discarded, they are named brewer's spent yeast (BSY). BSY is one of the major by-products resultant of brewery industry and it is a source of glucan, mannoprotein and chitin components of yeast cell wall polysaccharides.

In the present work, the cell wall polysaccharides of *S. cerevisiae* with 1 and 3 fermentative cycles and *S. pastorianus* with 2 and 6 fermentative cycles were analyzed. Cell wall polysaccharides were sequentially extracted with water at 100 ° C and with microwave assisted water extraction (MWE) at 180 ° C. The hot water extraction allowed to obtain the cell wall surface polysaccharides. Extracted *S. cerevisiae* polysaccharides were mainly constituted by (1→4) linked glucose and *S. pastorianus* ones were constituted by terminally-linked mannose, (1→2)-Man and (1→2,6)-Man. *S. cerevisiae* MWE extracts were enriched in (1→4)-Glc while MWE extracts of *S. pastorianus* were rich in (1→2)-Man e (1→2,6)-Man. The insoluble residue was composed mainly of (1→4) and (1→3) glucan.

The (1→4) linked glucose was hydrolysed by amylase and cellulase, allowing to infer the presence of α and β anomeric configurations.

The residue that remain after the extraction of the polysaccharides was found by scanning electron microscopy, to maintain the three dimensional structure of the yeast. This residue can be valued as a microcapsule for the incorporation of bioactive compounds in food or clinical applications.

Depending on the number of yeast reutilizations, MWE extracts of *S. cerevisiae* are a source of (1→3)-glucans or (1→4)-glucans, while MWE extracts of *S. pastorianus* are a source of mannoproteins. As BSY showed a high variability depending on the yeasts strain/ species and reutilization, able to be recovered by MWE.

Índice Geral

Índice Geral	I
Índice de Figuras	III
Índice de Tabelas	V
Lista de abreviaturas	VI
1. Introdução	1
1.1. A levedura	3
1.2. Parede celular da levedura	4
1.2.1. Polissacarídeos da parede celular	6
1.2.1.1. Glucanas	6
1.2.1.2. Manoproteínas	10
1.2.1.3. Quitina	11
1.2.2. Função dos polissacarídeos da parede celular	12
1.3. Modificações na levedura provocadas pelo stress cervejeiro	13
1.4. Métodos de extração dos polissacarídeos	16
1.5. Valorização dos Polissacarídeos da Levedura	17
1.6. Objetivo do trabalho de dissertação	19
2. Metodologias	21
2.1. Amostras	23
2.2. Isolamento das paredes celulares da amostra	23
2.2.1. Autólise térmica	23
2.3. Extração com água quente	24
2.4. Extração aquosa assistida por micro-ondas	24
2.5. Análise de açúcares totais	25
2.6. Análise de ligações glicosídicas	26
2.7. Hidrólise enzimática / Tratamento enzimático com α -amilase e celulase	28
2.8. Visualização da estrutura tridimensional das leveduras – SEM	28
2.9. Pesquisa de Homologia	29
3. Resultados e Discussão	31
3.1.1. Extração de polissacarídeos	33
3.1.2. Análise de ligações glicosídicas	38

3.1.3. Hidrólise enzimática das ligações (1→4)-Glc.....	48
3.1.4. Pesquisa de Homologia	53
3.1.5. Análise microscópica – SEM	55
3.1.6. Valorização das leveduras	58
4. Conclusões	61
5. Perspetivas Futuras.....	63
6. Referências Bibliográficas	69

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura da parede celular da levedura (adaptado de [16]).....	5
Figura 2 - Estrutura do glicogénio [20].	6
Figura 3 – Glucanas com resíduos de D-glucose em ligação ($\beta 1 \rightarrow 3$) com ramificados em ($\beta 1 \rightarrow 6$) (adaptado de Dalonso <i>et. al</i> [24]).....	7
Figura 4 – Biossíntese de polissacarídeos na parede celular da levedura. 1) Síntese de ($\beta 1 \rightarrow 3$)-glucana a partir de UDP-Glc por ação da Glucana sintase (Fks1, Fks2, e Fks3); 2) Transferência de partes da cadeia de ($\beta 1 \rightarrow 3$)-glucana pela Gas1 para uma molécula de oligossacarídeo em crescimento; 3) Síntese de quitina a partir de UDP- <i>N</i> -acetilglucosamina por ação das proteínas CHS3, CHS1 e CHS2 e adição da cadeia de quitina para a extremidade não redutora de ($\beta 1 \rightarrow 3$)-glucanas; 4) Introdução de ramificação em ($\beta 1 \rightarrow 3$)-glucana; 5) Adição de quitina; 6) Adição de ($\beta 1 \rightarrow 6$)-glucana à extremidade não redutora de ($\beta 1 \rightarrow 3$)-glucana; 7) Adição de quitina às cadeias laterais de ($\beta 1 \rightarrow 3$)-glucana e ($\beta 1 \rightarrow 6$)-glucana [27].	8
Figura 5 – Estrutura das manoproteínas da parede celular da <i>S. cerevisiae</i> [39].	10
Figura 6 – Estrutura da quitina.	11
Figura 7 – Esquema de autólise seguida de extração dos polissacarídeos da levedura.....	25
Figura 8 – Rendimento de extração de polissacarídeos em % (m/m) para as quatro leveduras em estudo.....	35
Figura 9 - Rendimentos de extração em percentagem de Glc e Man (m/m) para a <i>S. cerevisiae</i> Weiss, <i>S. cerevisiae</i> Ale, <i>S. pastorianus</i> Carls e <i>S. pastorianus</i> Lager.....	37
Figura 10 - Ligações glicosídicas das glucanas e quitina das frações Sn_H ₂ O, Sn_MW e Res_MW das leveduras <i>S. cerevisiae</i> Weiss, <i>S. cerevisiae</i> Ale, <i>S. pastorianus</i> Carls e <i>S. pastorianus</i> Lager.	47
Figura 11 - Percentagem molar de ($\alpha 1 \rightarrow 4$), ($\beta 1 \rightarrow 4$) e (1 $\rightarrow 3$)-Glc nas leveduras em estudo. O (?1 $\rightarrow 4$) -Glc corresponde à percentagem de (1 $\rightarrow 4$) cuja configuração anomérica não foi identificada.	50
Figura 12 - Ligações glucose (1 $\rightarrow 4$), (1 $\rightarrow 3$), (1 $\rightarrow 6$) e (1 $\rightarrow 4,6$) no Res_MW_Inicial, após hidrólise enzimática com a α -amilase e celulase nas leveduras em estudo.....	51

Figura 13 - Gráfico que relaciona o número de ciclos fermentativos com a % molar de ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) e ($\beta 1 \rightarrow 4$) nas <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. pastorianus</i> . Na <i>S. pastorianus</i> usamos uma referência que é o inóculo inicial [14].	52
Figura 14 - Alinhamento de sequências de diferentes celulose sintase de organismos diferentes [80].	53
Figura 15 - Pesquisa da sequência da celulose sintase da <i>Pseudozyma hubeiensis</i> no genoma da <i>S. cerevisiae</i> [81].	54
Figura 16 - Fotografias obtidas por microscopia de varrimento a 4 kV, ampliadas 3000x do resíduo insolúvel da extração aquosa assistida por micro-ondas às leveduras em estudo. .	55
Figura 17 - Fotografias obtidas por microscopia de varrimento a 4 kV, ampliadas 20000x, ao resíduo insolúvel da extração aquosa assistida por micro-ondas, ao resíduo insolúvel da extração aquosa assistida por micro-ondas mais a α -amilase e ao resíduo insolúvel da extração aquosa assistida por micro-ondas mais celulase das leveduras em estudo.	56
Figura 18 - Fotografias obtidas por microscopia de varrimento a 4 kV, ampliadas 40000x com a medição dos orifícios na <i>S. pastorianus</i> Carls e <i>S. pastorianus</i> Lager.	58

Índice de Tabelas

Tabela 1- Efeitos dos polissacarídeos da parede celular	18
Tabela 2: Frações, rendimentos, percentagem molar e concentração de hidratos de carbono (HC) total extraídos sequencialmente das leveduras <i>S. cerevisiae</i> Weiss, <i>S. cerevisiae</i> Ale, <i>S. pastorianus</i> Carls e <i>S. pastorianus</i> Lager.	34
Tabela 3: Ligações glicosídicas das três frações de leveduras: <i>S. cerevisiae</i> Weiss, <i>S. cerevisiae</i> Ale, <i>S. pastorianus</i> Carls e <i>S. pastorianus</i> Lager.	39
Tabela 4: Ligações glicosídicas após hidrólise enzimática com α -amilase e celulase ao resíduo de extração aquosa assistida por micro-ondas das leveduras <i>S. cerevisiae</i> Weiss, <i>S. cerevisiae</i> Ale, <i>S. pastorianus</i> Carls e <i>S. pastorianus</i> Lager.	48

Lista de abreviaturas

% mol – Percentagem molar

BSY – Levedura excedentária da cerveja

CLS – Celulose sintase C

CSLF – Celulose sintase F

DMSO – Dimetilsulfóxido

GC-FID – Cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama

GC-MS – Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa

GDP – Guanosina difosfato

Gfa1p – Glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase

Glc – Glucose

GlcNAc – *N*- acetilglucosamina

GTP – Guanosina trifosfato

GTPase – hidrólase de GTP

HC – Hidratos de carbono

HSP – Proteína de choque térmico

IY – Inóculo de levedura inicial

Man - Manose

min - minuto

MWE – Extração aquosa assistida por micro-ondas

PMAA - Acetatos de Alditol

Parcialmente Metilados

Res_BSY – Resíduo da autólise da levedura excedentária da cerveja

Res_H₂O – Resíduo da extração aquosa a 100 °C

Res_MW – Resíduo da extração aquosa assistida por micro-ondas

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – Rotações por minuto

SEM – Microscopia de varrimento electrónico

siRNA – Pequeno RNA de interferência

Sn_BSY – Sobrenadante da autólise da levedura excedentária da cerveja

Sn_H₂O – Extrato solúvel da extração aquosa a 100 °C

Sn_MW – Extrato solúvel da extração aquosa assistida por micro-ondas

TFA – Ácido Trifluoroacético

UDP – Uridina difosfato

η – Rendimento

1. Introdução

A indústria cervejeira usa diferentes espécies de leveduras *Saccharomyces* para a produção de cerveja, juntamente com o mosto, que é formado a partir de malte de cereais, como a cevada, e outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas, lúpulo e água [1]. A levedura é responsável pela conversão dos açúcares em etanol e dióxido de carbono e pela qualidade da cerveja, por produzir outros compostos como ésteres, ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas e compostos de enxofre que são responsáveis pelas características sensoriais da cerveja [2]. As leveduras são normalmente reutilizadas em 3-7 ciclos fermentativos e depois são descartadas como levedura excedentária da cerveja (BSY). A BSY é considerada o segundo maior subproduto resultante da indústria cervejeira [1].

1.1. A levedura

A levedura é usada no processo de fermentação que ocorre na produção de pão, cerveja ou vinho [3]. As leveduras são organismos unicelulares pertencentes ao reino Fungi e que proliferam por gemulação ou fissão. O tamanho, a forma e a cor das células de levedura podem exibir grande variabilidade, pois para um mesmo indivíduo, as células de uma estirpe pura de uma única espécie podem ostentar heterogeneidade morfológica [4]. Assim, algumas leveduras podem apresentar 2-3 μm de comprimento, enquanto outras podem atingir 20-50 μm . Relativamente à largura pode variar entre 1 e 10 μm . A forma das células de muitas espécies pode ser ovóide ou elipsoidal, ou então, pode ser cilíndrica com extremidades hemisféricas, filamentosa esférica ou alongada [4].

A *Saccharomyces cerevisiae* é usada há 8000 anos para a produção de cerveja [4]. É um organismo cujo genoma foi completamente sequenciado [5] e é utilizado como modelo no estudo de processos celulares tais como sinalização celular, tráfego de membrana, metabolismo lipídico e importação de mitocôndrias [3]. As células da *S. cerevisiae* são facilmente manuseadas quando comparadas com eucariotas superiores, podem crescer estávelmente como diplóides ou haplóides [3] e têm estrutura ovóide ou elipsoidal rodeada por uma parede celular muito espessa [4].

A *S. cerevisiae* é utilizada na fermentação de vinho e de cerveja *ale* por ser uma levedura “*Top-Fermenting*”, ocorrendo o processo a temperaturas entre 20°C e 25°C seguida de um curto tempo de envelhecimento ou mesmo nenhum [6].

A *S. pastorianus* ou *S. carlsbergensis* produz cerveja “lager” por ser levedura “Bottom Fermenting”, ou seja, fermenta a temperaturas mais baixas, entre 8 e 15°C, e em que o período de maturação é longo e ocorre a baixas temperaturas [6]. A *S. pastorianus* é um híbrido interespecífico natural que surge devido à hibridação espontânea de *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, pelo que o seu genoma contém partes do genoma destas leveduras [7,8]. A *S. pastorianus* é homóloga da *S. carlsbergensis* em 93% do seu genoma [9].

1.2. Parede celular da levedura

As leveduras e fungos são constituídos por parede celular, uma estrutura essencial para a manutenção da forma das células e proteção contra a lise celular e contra condições ambientais desfavoráveis [10]. A parede celular ajuda a estabilizar a pressão osmótica interna impedindo o fluxo da água para o exterior, confere resistência mecânica, elevada estabilidade e é responsável pela retenção de água devido aos grupos fosfato das manoproteínas carregados negativamente, e às cadeias laterais dos polissacarídeos [11]. Na *S. cerevisiae* a parede celular representa cerca de 15 a 30% do peso seco da célula e 25 a 50% do seu volume [10].

A parede celular da *S. cerevisiae* é constituída por três grupos principais de polissacarídeos: β -glucanas, que são polímeros de glucose em configuração anomérica β e representam cerca de 60% de massa seca da parede celular, manoproteínas (cerca de 40% de massa seca), que correspondem a polímeros de manose em configuração anomérica α , e quitina que é um polímero de *N*-acetilglucosamina e que, apesar de estar em pequenas quantidades (cerca de 2% de massa seca), é muito importante para a insolubilidade das fibras [12]. A parede celular de *S. cerevisiae* é ainda constituída por glicogénio, um polímero de glucose em ligação ($\alpha 1 \rightarrow 4$) ramificado com glucose ($\alpha 1 \rightarrow 6$) [13]. A parede celular da *S. pastorianus* é constituída por uma elevada porção de glucose em ligação ($1 \rightarrow 4$) e ($1 \rightarrow 3$) e manoproteínas muito ramificadas (figura 1) [14].

A estrutura da parede celular da *S. cerevisiae* e da *S. pastorianus* é similar havendo diferenças nas interações e na associação tridimensional das diversas moléculas que compõem a parede celular tornando diferente a sua hidrofobicidade, elasticidade e propriedades fermentativas [15].

As β -glucanas, manoproteínas, quitina e glicogénio são quatro tipos de polissacarídeos que constituem a parede celular das leveduras [10] e cuja organização, disposição e interação depende das estirpes de levedura. A *S. cerevisiae* e *S. carlsbergensis* apresentam superfícies lisas e homogêneas e a parede celular de *S. carlsbergensis* apresenta elasticidade homogênea [15]. A parede celular de *S. cerevisiae* parece ser menos rígida que a cicatriz do local de divisão celular devendo-se provavelmente à presença de quitina nesta. A extensão dos polissacarídeos em ambas as estirpes também é diferente, pois a *S. cerevisiae* apresenta cadeias de oligossacarídeos nas manoproteínas mais longos, constituídos por 50 a 200 unidades de manose em ligação α [15].

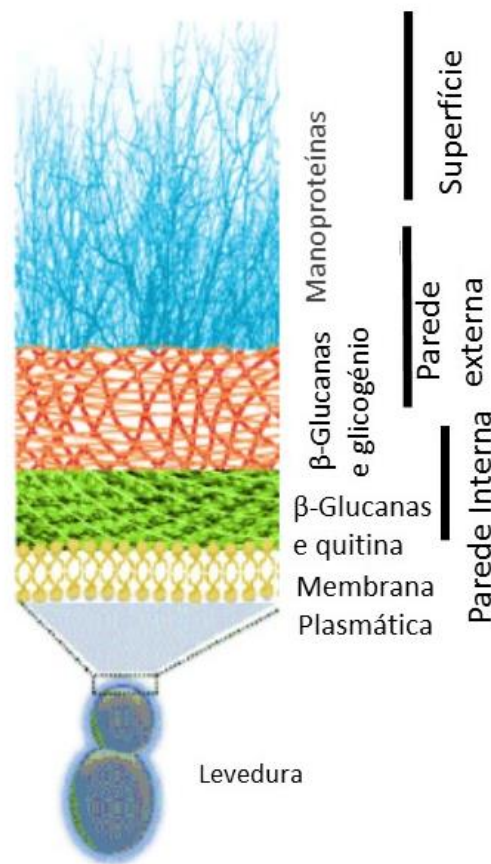


Figura 1 – Estrutura da parede celular da levedura (adaptado de [16]).

A parede celular é uma estrutura dinâmica que tende a adaptar-se a alterações morfológicas e fisiológicas [17] pois parece existir um mecanismo na parede celular que é acionado quando organismos estranhos atingem a parede celular ou há mutações para que haja a sua remodelação [11]. Mutações nos genes que codificam enzimas da via metabólica da síntese de quitina alteram a composição da parede celular neste componente [18]. Ou

seja, a ativação da expressão do gene GFA1, que codifica a enzima glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase (Gfa1p), e que está envolvida na via metabólica da síntese de quitina, leva ao aumento proporcional da atividade da enzima Gfa1p e consequentemente, ao aumento do teor em quitina nas paredes celulares para quase o triplo. No entanto, mutações no gene que codifica a enzima Gfa1p levam à redução de síntese de quitina [18]. Para além disso, o stress cervejeiro altera o ambiente de crescimento das leveduras e, no caso da *S. pastorianus*, causa alterações na parede celular como diminuição do teor de glucose em ligação (1→3), aumento de manoproteínas mais ramificadas e mais fosforiladas [14].

1.2.1. Polissacarídeos da parede celular

1.2.1.1. Glucanas

As glucanas são polissacarídeos constituídos por resíduos de D-glucose estando largamente distribuídas na parede celular de plantas, fungos e microrganismos [19].

Na parede celular da *S. cerevisiae* há essencialmente β -glucanas, no entanto também está presente glicogénio [13]. O glicogénio é uma glucana em ligação (α 1→4) com ramificações em (α 1→4,6) (figura 2) e pode estar localizado no citosol ou na parede celular. Na parede celular o glicogénio está ligado a glucanas em ligação (β 1→3) através de ligações (β 1→6)-Glc [13].

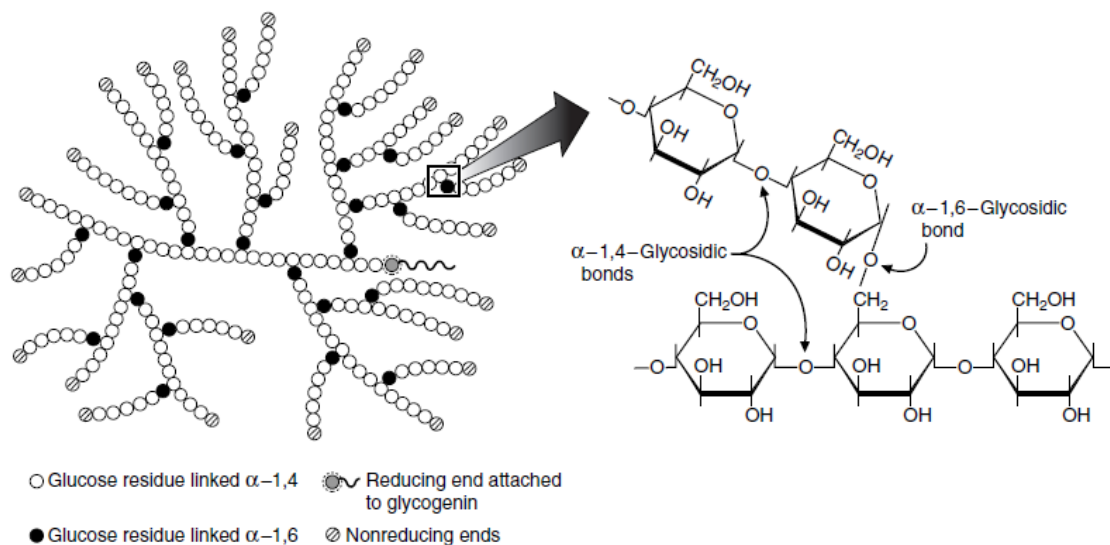


Figura 2 - Estrutura do glicogénio [20].

As β -glucanas da parede celular da *S. cerevisiae* são constituídas principalmente por resíduos de Glc com ligações ($\beta 1 \rightarrow 3$) na cadeia principal e com ramificações de Glc em ligação ($\beta 1 \rightarrow 6$) (figura 3) [11,21–23]. As ($\beta 1 \rightarrow 6$)-glucanas estão ligadas quer a componentes da parede interna (complexo quitina- ($\beta 1 \rightarrow 3$)-glucanas) quer a componentes da parede externa (manoproteínas) [10].

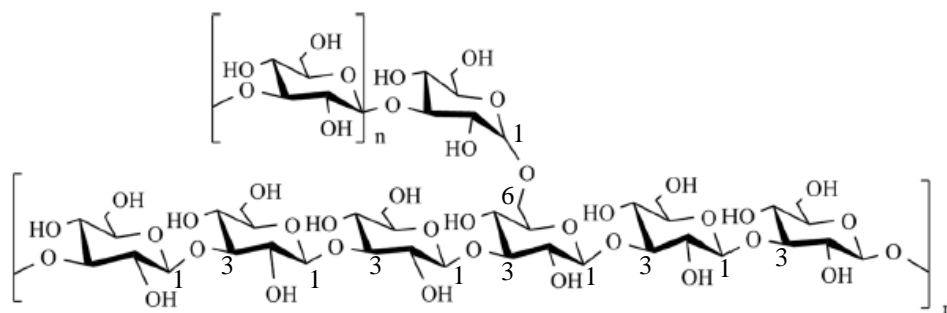


Figura 3 – Glucanas com resíduos de D-glucose em ligação ($\beta 1 \rightarrow 3$) com ramificados em ($\beta 1 \rightarrow 6$) (adaptado de Dalonso *et. al* [24]).

A *S. pastorianus*, para além de apresentar β -glucanas em ligações ($\beta 1 \rightarrow 3$)-Glc e ($\beta 1 \rightarrow 6$)-Glc, também apresenta ligações ($\beta 1 \rightarrow 4$)-Glc [25]. Muito recentemente, em 2015, Pinto *et al.* [25] através de extração em água quente e extração alcalina sequencial até 8M de KOH, foi obtido um resíduo final insolúvel rico em glucose (98%). Este resíduo foi ainda sujeito a hidrólise enzimática com α -amilase e celulase, tendo os autores verificado a presença de Glc em ligação ($\alpha 1 \rightarrow 4$) e em ligação ($\beta 1 \rightarrow 4$) [25]. Ainda em 2015, Bastos *et al.* [14], recorrendo à extração em água quente e extração alcalina sequencial até 4M de KOH, confirmaram a presença de Glc em ligação ($\beta 1 \rightarrow 4$) também no inóculo cervejeiro não submetido à fermentação alcoólica.

A síntese de glicogénio compreende três etapas, a iniciação, alongação e ramificação [26]. No caso do glicogénio citosólico a iniciação depende da proteína glicogenina que produz a partir de UDP-Glc uma cadeia curta de ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-glucosil que está covalentemente ligada a um resíduo de tirosina. No caso do glicogénio da parede celular a iniciação não depende da glicogenina [13]. A alongação ocorre devido à enzima glicogénio sintase que forma ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 4$) a partir de UDP-Glc para a extremidade não redutora linear de glicogénio em ($\alpha 1 \rightarrow 4$). As cadeias lineares de ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-glucosil são ramificadas pela ação da amilo (1,4) \rightarrow (1,6)-transglucosidase, que transfere blocos de 6 a 8 resíduos a partir da extremidade de uma cadeia linear, para criar ligações ($\alpha 1 \rightarrow 6$) [26].

A síntese das (β 1 \rightarrow 3)-glucanas na *S. cerevisiae* ocorre na membrana plasmática e depende do complexo glucana sintase, composto por uma subunidade catalítica e outra regulatória [27]. O componente enzimaticamente ativo deste complexo (Fks1) é uma proteína integral da membrana com *N*-terminal no domínio citoplasmático hidrofílico. Para além desta proteína, envolvida na síntese de (β 1 \rightarrow 3)-glucanas, a *S. cerevisiae* apresenta outras duas proteínas a Fks2 e Fks3. A síntese ocorre devido à ligação de UDP-glucose ao local ativo da enzima (figura 4), e o polissacarídeo à medida que se vai formado vai saindo para o exterior da membrana. O Fks1 é regulado por uma GTPase (Rho1) que forma um complexo ativo devido à ligação de GTP [27]. A proteína Fks2 pode ter atividade biológica complementar com a atividade da proteína Fks1 pois, em situações de stress há a indução da expressão do gene que codifica para a Fks2 [28]. Relativamente à proteína Fks3 a sua função é de modular a síntese de (β 1 \rightarrow 3)-glucanas na parede celular da levedura enquanto que, a proteína Fks2 é responsável pela síntese em leveduras em fase de esporulação [29].

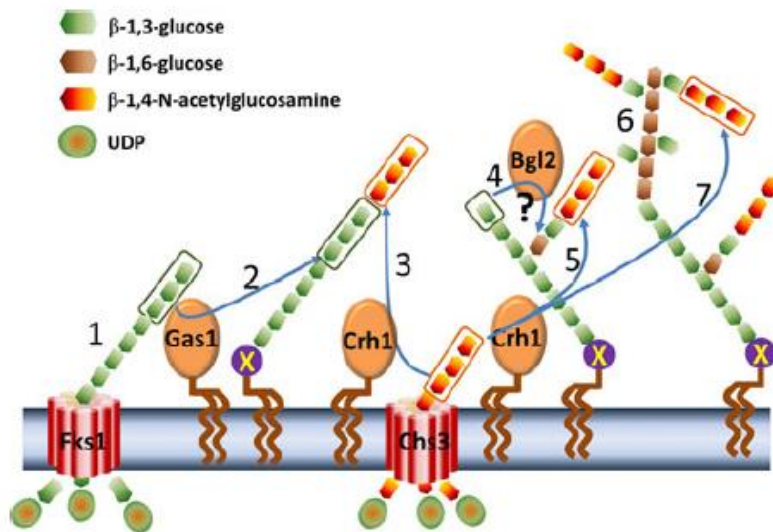


Figura 4 – Biossíntese de polissacarídeos na parede celular da levedura. 1) Síntese de (β 1 \rightarrow 3)-glucana a partir de UDP-Glc por ação da Glucana sintase (Fks1, Fks2, e Fks3); 2) Transferência de partes da cadeia de (β 1 \rightarrow 3)-glucana pela Gas1 para uma molécula de oligossacarídeo em crescimento; 3) Síntese de quitina a partir de UDP-N-acetilglucosamina por ação das proteínas CHS3, CHS1 e CHS2 e adição da cadeia de quitina para a extremidade não redutora de (β 1 \rightarrow 3)-glucanas; 4) Introdução de ramificação em (β 1 \rightarrow 3)-glucana; 5) Adição de quitina; 6) Adição de (β 1 \rightarrow 6)-glucana à extremidade não redutora de (β 1 \rightarrow 3)-glucana; 7) Adição de quitina às cadeias laterais de (β 1 \rightarrow 3)-glucana e (β 1 \rightarrow 6)-glucana [27].

A biossíntese de (β 1 \rightarrow 6)-glucanas ainda não foi bem esclarecida por não se saber quais as enzimas envolvidas no processo, nem o local onde ocorre [27]. No entanto, pensa-se que ocorre devido à interação entre várias proteínas codificadas pelos genes KRE5, GLS1, GLS2, ROT1, BIG1, KEG1, KRE6 ou SKN1. Machi *et al.* [30] verificaram que as proteínas codificadas pelos genes BIG1, KRE5 e ROT1 são necessárias para a síntese de (β 1 \rightarrow 6)-glucanas [30]. Azuma *et al.* [31] mostraram que a deleção do gene que codifica a proteína BIG1 causa, aproximadamente, 95% de redução das (β 1 \rightarrow 6)-glucanas na parede celular da *S. cerevisiae* [31].

Relativamente às ligações (β 1 \rightarrow 4)-Glc que ocorrem na *S. pastorianus* não há na literatura indicação do mecanismo enzimático responsável pela formação destas ligações do tipo celulose, apenas se encontra descrito que há enzimas responsáveis por este tipo de ligações nos tecidos vegetais, mas que nunca foi descrita em fungos [32,33].

No caso dos tecidos vegetais as ligações (β 1 \rightarrow 4) ocorrem também nas xiloglucanas, a sua síntese deve-se à celulose sintase C (CLS). Após a expressão do gene da CLS na levedura *Pichia pastoris* verificou-se a produção de (β 1 \rightarrow 4)-glucanas [32]. Neste estudo, apesar dos autores não evidenciarem, o grupo controlo (*P. pastoris* sem expressar a enzima CLS) apresentava naturalmente 5% de ligações (β 1 \rightarrow 4).

No caso dos cereais, mais propriamente a cevada (*Hordeum vulgare L.*), apresenta genes da celulose sintase F (CSLF) que é responsável pela síntese de polímeros mistos de β (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)-glucanas [33].

Tal como nas plantas e nos líquenes (liquenanas) se encontra β -glucanas com ligações mistas (β 1 \rightarrow 3)-Glc e (β 1 \rightarrow 4)-Glc, este tipo de polímero também ocorre na bactéria (*Sinorhizobium meliloti*) que, no entanto, não possui genes de celulose sintase ainda identificados [34].

Dentro do reino fungi, o *Sporothrix schenckii*, que é um organismo patogénico dimórfico, apresenta na camada interna da parede celular glucanas em ligação (β 1 \rightarrow 3), (β 1 \rightarrow 6), e também algumas glucanas em ligação (β 1 \rightarrow 4) tanto na forma de levedura (28%) como na forma de hifa (10%) [35]. Ainda dentro do reino fungi, o *Apodachlya sp.*, que é um oomiceto, apresenta nas suas paredes celulares, para além de polímeros de quitina, polímeros de celulose [36].

1.2.1.2. Manoproteínas

As manoproteínas são um dos constituintes da camada externa da parede celular da levedura estando ligadas covalentemente a oligossacarídeos. São responsáveis pela maioria das propriedades celulares e podem ser de duas classes diferentes [37]. As manoproteínas do tipo *N* estão ligadas a hidratos de carbono através do grupo amida da asparagina e as manoproteínas do tipo *O* estão ligadas a mananas pelo oxigênio do grupo hidroxilo de resíduos de serina ou treonina (figura 5) [37].

As manoproteínas do tipo *N* são sintetizadas na membrana do retículo endoplasmático e são constituídas por cerca de 50 a 200 resíduos de manose em cadeia central através de ligações ($\alpha 1 \rightarrow 6$) e é altamente ramificada em ligações ($\alpha 1 \rightarrow 2$), com pequenas cadeias, tendo nos terminais resíduos de manose em ligação ($\alpha 1 \rightarrow 3$) [37]. Esta classe de manoproteínas é composta por 90% de hidratos de carbono e 10% de proteína.

As manoproteínas da classe *O* são compostas estruturalmente por cadeias de oligossacarídeos com 1 a 5 unidades de manose em ligação ($\alpha 1 \rightarrow 2$) e ($\alpha 1 \rightarrow 3$), sendo constituídas por 50% de proteína e 50% de hidratos de carbono [10]. Estas manoproteínas são inicialmente sintetizadas no retículo endoplasmático, com transferência da primeira manose para resíduos de serina ou treonina, e depois no aparelho de Golgi [38].

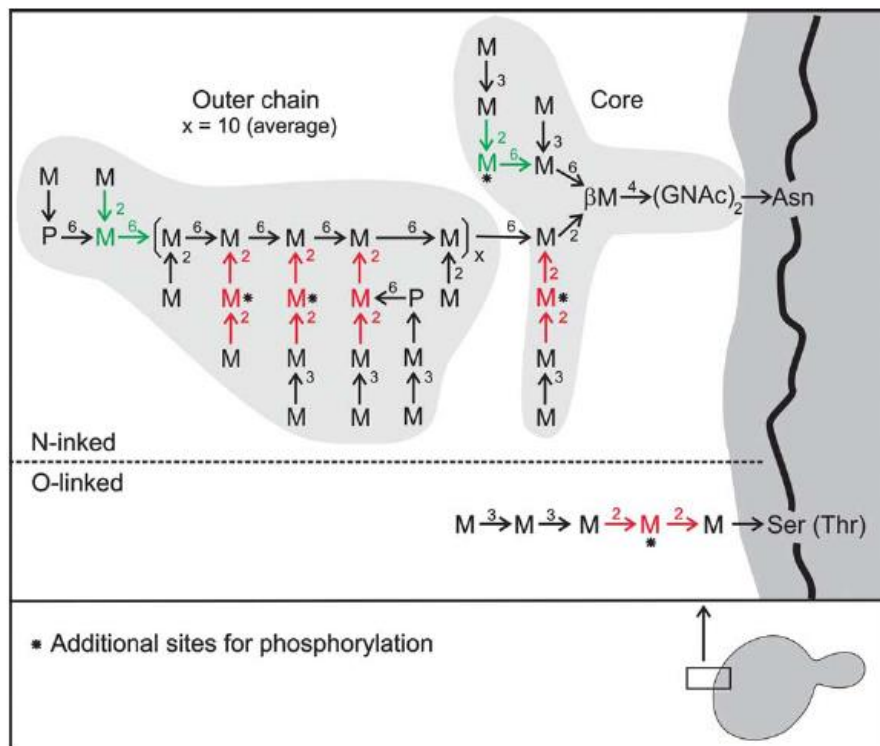


Figura 5 – Estrutura das manoproteínas da parede celular da *S. cerevisiae* [39].

1.2.1.3. Quitina

A quitina é um homopolímero com resíduos de *N*-acetilglucosamina em ligações ($\beta 1 \rightarrow 4$), como é possível visualizar na figura 6, representando 1-3% da massa seca da parede celular [27]. Este componente da parede celular é essencial para a sobrevivência das células de levedura, encontrando-se, na sua maioria, rente à célula. A quitina forma o complexo ($\beta 1 \rightarrow 3$)-glucana–quitina que corresponde ao maior constituinte da parede interna [10].

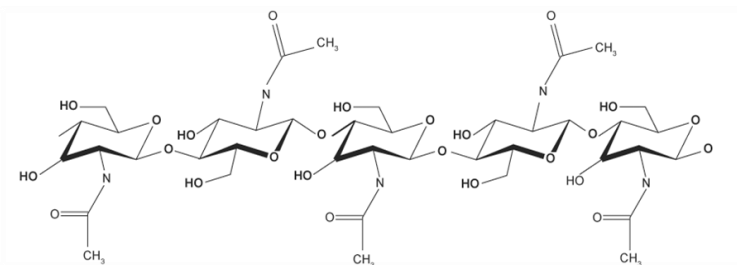


Figura 6 – Estrutura da quitina.

A quitina é adicionada às extremidades não redutoras de Glc em ligação ($\beta 1 \rightarrow 3$) das cadeias de ($\beta 1 \rightarrow 3$)-glucanas e cadeias laterais de ($\beta 1 \rightarrow 6$)-glucanas (figura 4). Devido a esta característica, a solubilidade das ($\beta 1 \rightarrow 3$)-glucanas diminui e a resistência das paredes celulares em condições de stress aumenta. Para além disso, a quitina é essencial para fortalecer o local de cicatrização aquando da divisão celular, uma vez que se deposita em anel para criar um septo primário entre a célula mãe e as células filhas [27].

A síntese de quitina depende da enzima quitina sintase codificada pelos genes CHS1, CHS2 e CHS3. A quitina sintase, codificada pelo gene CHS3, é a principal quitina sintase e a responsável pela síntese de cerca de 90% da quitina durante o crescimento vegetativo das células de levedura, e a quitina sintase codificada pelo gene CHS1 é armazenada nos quitosomas (compartimentos intracelulares) e transportadas para a membrana plasmática quando necessário [3]. Quando a quitina sintase codificada pelo gene CHS3 já não é necessária, é internalizada por endocitose e vai para o quitosoma. Na *S. cerevisiae* estas sintases têm funções fisiológicas diferentes. A CHS3 é responsável pela síntese de quitina nas paredes celulares, a CHS2 sintetiza quitina no septo primário entre a célula mãe e a célula filha, e a CHS1 está envolvida na reparação da parede celular [40]. O mecanismo da síntese de quitina ocorre devido à reação de UDP-*N*-acetilglucosamina ativada com um quito-oligossacarídeo final não redutor. Este tem que possuir pelo menos quatro resíduos

de *N*-acetilglucosamina [41]. A biossíntese da UDP-*N*-acetilglucosamina ativada (UDP-GlcNAc) inicia-se com a conversão da glucose a glucose-6-fosfato pela hexocinase, esta é convertida a frutose-6-fosfato por ação da fosfogluco-isomerase [42]. A frutose-6-fosfato-aminotransferase converte a frutose-6-fosfato em glucosamina-6-P. Esta é acetilada por uma glucosamina-P-*N*-acetiltransferase dando origem a *N*-acetilglucosamina-6-P que, devido à ação da *N*-acetilglucosamina-fosfomutase origina *N*-acetilglucosamina-1-P que é precursor da UDP-GlcNAc pela ação da UDP-GlcNAc pirofosforilase.

1.2.2. Função dos polissacarídeos da parede celular

Os polissacarídeos da parede celular da levedura apresentam funções específicas na célula relevantes para a sua vitalidade. As glucanas são o maior constituinte da parede celular e são responsáveis pela forma da célula e pela sua força física [12]. Na camada interna da parede celular, as glucanas estão entrelaçadas por fibrilhas de quitina o que ajuda na manutenção da rigidez e forma celular. As glucanas e a quitina formam ligações covalentes e complexos macromoleculares que contribuem para a força e resistência que a levedura apresenta. As glucanas ($\beta 1 \rightarrow 3$) podem estar organizadas de tal maneira que formam uma rede flexível de extensão variada e que é fortalecida por múltiplas pontes de hidrogénio, conferindo elasticidade à célula, podendo esta, adaptar o seu volume em resposta a condições externas. As glucanas ($\beta 1 \rightarrow 6$) ajudam na manutenção da estrutura e integridade da camada externa de manoproteínas [12].

As manoproteínas desempenham uma panóplia de funções na célula como controlo da permeabilidade, pelo facto de servirem de suporte a proteínas periplasmáticas que limitam a permeabilidade celular a macromoléculas, e desta forma, previnem o ataque de proteínas estranhas ou a saída para o meio extracelular de compostos intracelulares [12]. Para além disso, as manoproteínas, ao apresentarem a parte proteica altamente glicosilada e devido a cargas negativas de grupos fosfatos, podem contribuir para a retenção de água. Este constituinte da parede celular pode ser também responsável pela adesão e floculação [43].

A floculação é um processo reversível dependente de cálcio, no qual as células aderem e formam flocos constituídos por aglomerados de células [44]. Estes flocos de células de levedura podem separar-se de formas distintas dependendo do tipo de levedura.

Se a separação ocorrer por sedimentação, a levedura denomina-se de levedura *lager*, se ocorrer por flutuação à superfície, denomina-se de levedura *ale* [44]. Este processo ocorre devido à interação de proteínas do tipo lectina, floculinas [43]. Estas emergem da parede da célula para o exterior e ligam-se a resíduos de manose, que se encontram na parede celular de células adjacentes. Este processo é importante que ocorra na indústria cervejeira para que haja a remoção rápida da levedura do tanque de fermentação e se dê novamente a re-inoculação [43].

1.3. Modificações na levedura provocadas pelo stress cervejeiro

Durante o processo cervejeiro, a levedura está sujeita a condições ambientais adversas como pressão barométrica, pressão osmótica e concentração de etanol elevadas, atividade da água e pH reduzidos, variação de temperatura e dos níveis de oxigénio, e escassez de nutrientes [45]. As condições de stress induzem modificações nas membranas e macromoléculas celulares, nomeadamente proteínas e ácidos nucleicos levando à inibição do crescimento e viabilidade das células e ainda, diminuição da performance na fermentação [46]. Perante estas modificações, as células de levedura têm a capacidade de adquirir vários mecanismos de adaptação ao stress a que estão sujeitas.

Na fase de propagação, que é realizada num ambiente sem oxigénio, as células de levedura estão sujeitas a stress oxidativo que estimula a síntese de ácidos gordos, esteróis e hidratos de carbono de reserva [47]. Durante a fase de propagação o stress oxidativo leva ao aumento da atividade da catalase e ao aumento dos níveis de glicogénio e trealose. A trealose evita a agregação de proteínas mal enroladas sobre a membrana e protege as proteínas da desnaturação [48].

A variação da temperatura é outro fator de stress que afeta a levedura, esta tem uma temperatura de crescimento ótimo entre os 25 e 30 °C, sendo capaz de tolerar temperaturas baixas entre 1 e 3 °C e temperaturas elevadas até 40 °C. Caso as temperaturas de exposição sejam fora do intervalo ótimo, as leveduras ativam mecanismos de resposta por forma a manterem a homeostasia [47]. As variações de temperaturas causam a quebra de ligações hidrogénio e interações hidrofóbicas com conseqüente desnaturação de proteínas e de ácidos nucleicos. A temperatura elevada do meio causa elevadas taxas de mortalidade, divisão celular atípica, afeta a fase G1 do ciclo celular, aumenta a fluidez da membrana

plasmática, altera a permeabilidade das células a nutrientes essenciais e reduz o pH das células [49]. Em contrapartida, a temperatura reduzida leva à diminuição da célula de levedura e comprometimento da integridade da membrana plasmática devido ao aumento dos ácidos gordos insaturados que são responsáveis pelo transporte lento do soluto para as células. A temperatura reduzida causa ainda a destruição dos vacúolos celulares e paragem do crescimento celular [49].

De uma forma geral quer o stress seja físico ou químico ele induz alterações nas proteínas, que podem levar à sua agregação desencadeando problemas no funcionamento de todos os compartimentos celulares [47]. A levedura tem a capacidade de se adaptar a esse stress aumentando a síntese de proteínas de choque térmico. Mais concretamente, a proteína de choque térmico 104 (HSP 104) é tolerante a temperaturas elevadas e em conjunto com a HSP 70 e HSP 40 forma um complexo proteico capaz de reativar proteínas que tenham sido parcialmente desnaturadas pela temperatura elevada [48]. A síntese de proteínas de choque térmico pode também ser induzida devido a elevadas concentrações de etanol. Em condições de stress térmico as leveduras respondem através da acumulação de compostos protetores como é o caso da trealose, do glicerol ou enzimas como a catalase e a superóxido dismutase mitocondrial [47].

A elevada pressão hidrostática é outro fator que pode influenciar a performance das leveduras na fermentação, sendo as células capazes de tolerar essa pressão elevada preservando a fluidez da membrana e acumulando trealose [47].

Níveis elevados de etanol provocam o aumento da fluidez e da permeabilidade da membrana plasmática com comprometimento do transporte de componentes essenciais como aminoácidos e glucose [47]. O stress provocado pela concentração elevada de etanol abrange outras funções celulares como redução do crescimento, da taxa metabólica e da viabilidade celular [49], influenciando também a regulação e a tradução de genes levando à inibição de algumas vias celulares.

A formação da parede celular é altamente controlada uma vez que a composição em polissacarídeos, a sua estrutura e espessura podem variar consideravelmente dependendo das condições ambientais [50]. O aumento da temperatura de crescimento leva ao aumento do conteúdo de quitina e de (β 1 \rightarrow 6)-glucanas e o aumento da resistência das células à zymoliase [50]. A zymoliase é uma enzima catalítica que atua em polímeros lineares de glucose em ligação (β 1 \rightarrow 3) [21] mas o aumento de ligações (β 1 \rightarrow 6) na parede celular

reforça a rede fibrilar das glucanas ($\beta 1 \rightarrow 3$) por aglomeração de manoproteínas [18], impedindo a acessibilidade da enzima ao substrato aumentando assim a resistência das células à ação da zymoliase. A proporção de ($\beta 1 \rightarrow 6$)-glucanas na parede celular sofre um aumento na presença de etanol, comparativamente à proporção de ($\beta 1 \rightarrow 6$)-glucanas observada na presença de glucose, manose e sacarose [50]. Na presença de etanol também se verifica uma maior resistência à ação da zymoliase nas células de levedura [50]. Também se verificou que as α -glucanas aumentaram exponencialmente na parede celular na presença de concentrações de etanol até 8% (v/v) [51]. O glicogénio na parede celular da levedura é importante para a adaptação da célula ao etanol, sendo importante no mecanismo de tolerância a este. No caso da *S. pastorianus* submetida à fermentação alcoólica, verifica-se não só a presença de ligações Glc ($\alpha 1 \rightarrow 4$) mas também de Glc ($\beta 1 \rightarrow 4$) [25]. As ligações Glc ($1 \rightarrow 4$) aumentam de 16 % no inóculo (IY) para 43% com as reutilizações parecendo uma resposta da levedura ao stress cervejeiro [14]. Relativamente à Glc ligada em ($1 \rightarrow 3$), a levedura excedentária da cerveja (*S. pastorianus*) apresentava apenas 17% de ligações enquanto que o IY apresenta cerca de 42%. Verifica-se também a presença de Glc em ligação ($\beta 1 \rightarrow 4$) na levedura não submetida a fermentação alcoólica [14].

O stress provocado por o etanol pode ativar genes que estão envolvidos na manutenção da integridade da célula como na síntese de ergosterol, que é importante para recuperar a rigidez da membrana [48]. Concentrações elevadas de etanol levam ao aumento dos níveis de HSP e controlo dos níveis de trealose no citoplasma a fim de se estabilizar e evitar a agregação de proteínas desnaturadas e mal enroladas [47]. A levedura responde ao stress provocado pelo etanol através da diminuição do pH nos vacúolos, redução de ácidos gordos saturados (ácido palmítico), aumento de ácidos gordos insaturados (ácido oleico), elevada taxa de biossíntese de esqualeno, ergosterol e fosfatidilinositol contribuindo para um rácio de fosfolípidos/proteínas elevado, aumento da atividade superóxido dismutase, elevado nível de trealose, aumento da síntese do citocromo P450 e elevado metabolismo do etanol [47,48]. Os efeitos do stress provocado pelo etanol na levedura podem ser aumentados quando a temperatura do meio for elevada, quando há défice de nutrientes e quando o pH e a atividade da água forem baixos [52].

A falta de nutrientes é outro fator de stress que afeta a performance das leveduras na fermentação uma vez que quando as fontes de carbono, fosfato e azoto estão

comprometidas as células de levedura perdem a sua viabilidade [47]. Na *S. cerevisiae* a falta de alimento conduz à inibição da síntese de RNA ribossomal e modificações nos níveis intracelulares de trealose e glicogénio.

1.4. Métodos de extração dos polissacarídeos

Para a rentabilização dos polissacarídeos da levedura cervejeira é necessário que estes sejam extraídos. O interesse no desenvolvimento de métodos de extração e purificação dos polissacarídeos que constituem a parede celular da *S. cerevisiae* tem aumentado à medida que se conhecem os seus efeitos biológicos.

Existe uma panóplia de métodos de extração aos quais se pode recorrer para obtenção das β -glucanas, nomeadamente à extração com água quente, extração alcalina a quente, extração por solvente acelerada, extração assistida por ultra-sons, extração assistida por micro-ondas, extração com água superaquecida, extração ácida, extração sequencial alcalina e explosão de vapor [53]. Alguns destes métodos estão mais focados na extração em polissacarídeos de origem vegetal, no entanto, poderá recorrer-se a eles para aplicação em extração em microrganismos como a levedura.

Relativamente aos métodos usados para extração de polissacarídeos, na *S. cerevisiae*, o mais usado era a extração sequencial ácido-alcalina [22], extrações ácidas ou alcalinas a quente [54,55] e oxidação das células de levedura com recurso a hipoclorito de sódio [56], para a solubilização de proteínas e polissacarídeos. No entanto, este tipo de tratamento pode levar à degradação das cadeias de polissacarídeos da parede celular da levedura, o que iria influenciar os seus possíveis efeitos.

Um estudo, realizado em 2003, sugeriu um método de extração menos destrutivo, através do recurso a extração a água quente com solventes orgânicos e extração enzimática [57]. Mais recentemente, em 2008, Liu *et al.* [58] sugeriram um método de extração que se baseia inicialmente na indução da autólise, seguida de extração com água quente, extração com solventes orgânicos e tratamento enzimático [58]. A indução da autólise permite a saída do material celular e a água quente, que torna as paredes celulares menos resistentes mecanicamente devido à saída das manoproteínas, causa a disrupção da parede celular [58].

Na literatura não há indicação de recurso à extração de polissacarídeos assistida por micro-ondas na levedura. No entanto, este tipo de extração está descrita para cogumelos [59]. A energia de micro-ondas é composta por campos elétricos e magnéticos, tendo uma frequência que pode variar de 300 a 300,000 MHz [60]. Funciona como uma radiação não ionizante que causa a rotação dos dipolos sem afetar a estrutura molecular. Nesta técnica, a temperatura é localizada, o que pode levar à migração seletiva de compostos alvo da amostra para o ambiente, mais rapidamente que no caso da extração convencional [60]. A extração assistida por micro-ondas depende de vários fatores como a temperatura, pressão, tempo e rácio de amostra: água [61]. O fator que influencia mais o rendimento é a temperatura, pelo que, na maioria das vezes, quanto maior a temperatura maior o rendimento de extração. Apesar disso, temperaturas elevadas podem levar à formação de produtos de degradação [61].

A extração assistida por micro-ondas quando comparada com a extração convencional com água quente mostrou ser mais eficiente na extração de polissacarídeos de uma espécie de cogumelos (*Clitocybe maxima*) [59]. Na extração convencional com água quente o rendimento foi de 5,86% e a quantidade de polissacarídeos extraídos foi de 40,23%. Já na extração assistida por micro-ondas, o rendimento foi superior (9,24%) e a quantidade de polissacarídeos foi de 52,62%. O tempo de extração dos polissacarídeos pelo método de extração assistida por micro-ondas correspondeu a metade do tempo usado na extração convencional com água quente [59].

A extração de polissacarídeos da parede celular da levedura recorrendo à radiação de micro-ondas tem vantagens por ser uma metodologia que permite a obtenção de um maior rendimento de extração, redução do tempo de extração e do uso de solventes [61].

1.5. Valorização dos Polissacarídeos da Levedura

A levedura excedentária da cerveja é um dos maiores subprodutos da indústria cervejeira [11]. Este subproduto é fonte de polissacarídeos, como β -glucanas e manoproteínas, que têm efeitos biológicos comprovados, e que por isso, podem ser usados como ingredientes alimentares [53] na produção de alimentos funcionais visto que, no caso das β -glucanas, estas podem trazer benefícios ao consumidor através da diminuição do risco de algumas doenças [62].

Têm sido realizados numerosos estudos para perceber possíveis efeitos biológicos das β -glucanas e manoproteínas (tabela 1) [63-69]. As β -glucanas estimulam o sistema imunitário permitindo a ação em vários tipos de infecções [63]. As β -glucanas na presença de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, apresentam atividade antimicrobiana [63]. As β -glucanas, como não são degradadas pelas enzimas do trato digestivo, são consideradas fibra dietética, tendo efeito sobre a redução do colesterol [64]. A ingestão de β -glucanas aumenta a viscosidade e o volume das fezes diminuindo a absorção intestinal de colesterol, sendo depois excretado. As β -glucanas podem ter atividade antitumoral, inibindo o crescimento de tumores, nomeadamente, o crescimento do carcinoma na glândula mamária [65] e do sarcoma 180 [66]. Este tipo de compostos pode ter ainda efeito antioxidante e imunomodulador [67].

As manoproteínas têm propriedade bioemulsionante [68] devido à ligação covalente de cadeias hidrofílicas de manose a proteínas. Para além disso, as manoproteínas podem apresentar efeito antioxidante e antimutagénico [69] por reagirem com os radicais livres evitando assim lesões no DNA.

As β -glucanas e manoproteínas podem ser usadas como emulsionantes, gelificantes e estabilizantes na indústria alimentar com a finalidade de se produzirem alimentos menos calóricos e com menor teor de gordura [70].

A valorização da levedura pode abranger outros componentes/nutrientes como ácidos nucleicos, vitaminas, proteínas e nucleótidos que podem ser incluídos na alimentação [1].

Tabela 1- Efeitos dos polissacarídeos da parede celular

Polissacarídeo	Efeito	Referência
β -Glucanas	Antimicrobiano	[63]
	Antitumoral	[65,66]
	Redução do colesterol	[64]
	Antioxidante e imunomodulador	[67]
Manoproteínas	Bioemulsionante	[68]
	Antioxidante e antimutagénico	[69]

Para além das β -glucanas, que se extraem da parede celular da levedura excedentária da cerveja, no final da extração sequencial com KOH obtém-se um resíduo insolúvel, que preserva a estrutura tridimensional da levedura excedentária da cerveja [14]. Esta estrutura tridimensional pode ser destruída quer por hidrólise enzimática com α -amilase e celulase [29], quer por tratamento com clorito [71].

A levedura pode ser usada para a incorporação de diversos compostos ativos. Através de difusão passiva é possível a incorporação de terpenos em células de levedura *S. cerevisiae* [72]. As leveduras também podem ser usadas para a encapsulação de outro tipo de compostos como agentes terapêuticos, usando a levedura como uma microcápsula em sistemas de libertação controlada [73]. Esta é uma aplicação que é possível pois, a levedura é considerada como sendo geralmente reconhecida como segura (GRAS), e para além disso é de fácil cultivo, é unicelular e o seu genoma está totalmente sequenciado [1].

A aplicação da levedura como sistemas de libertação controlada pode incluir o desenvolvimento de vacinas orais, permitindo assim, a administração de drogas que sejam sensíveis às secreções e enzimas do trato intestinal [74]. Esta aplicação pode regular a expressão genética controlando a libertação de fármacos. Através da administração oral de cápsulas de levedura *S. cerevisiae* recombinantes foi possível verificar a entrega de compostos ativos ou de secreção de proteínas e péptidos a nível intestinal [73].

A terapia genética é outra área na qual se poderá usar as cápsulas de glucanas um vez que estas, quando administradas oralmente, são internalizadas através da ligação à dectina-1 ou a recetores de complemento (CR3), após isso as nanopartículas transportadas por estas, podem conter pequeno RNA de interferência (siRNA), formando nanocomplexos estáveis, que vão silenciar genes de fagócitos [75].

1.6. Objetivo do trabalho de dissertação

A *S. pastorianus* apresenta na parede celular glucanas em ligação ($\beta 1 \rightarrow 4$) [14,25] no entanto ainda não está descrito este tipo de ligações para a levedura *S. cerevisiae*. Sendo assim, o objetivo do trabalho de dissertação é conhecer a estrutura e tipos de ligações glicosídicas das glucanas e manoproteínas que constituem a parede celular das leveduras *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*, submetidas a ciclos de reutilização, para se perceber se as alterações estruturais observadas na parede celular estão relacionadas com a espécie ou

com a sua reutilização. Com recurso a ferramentas bioinformáticas, é também objetivo procurar sequências de genes de celulose sintase no genoma da levedura *S. cerevisiae*. Um terceiro objetivo é a obtenção de cápsulas de levedura nanoporosas através da extração aquosa assistida por micro-ondas.

2. Metodologias

2.1. Amostras

As amostras estudadas no presente trabalho foram cedidas pela empresa Unicer Bebidas SA, sediada no Porto. A empresa forneceu quatro leveduras de espécies diferentes e com ciclos de reutilização diferentes. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* que fermenta cerveja do tipo *weiss* que não foi reutilizada (1 ciclo fermentativo com duas fermentações em propagação). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* usada na cerveja do tipo *ale* com três ciclos fermentativos. A levedura *Saccharomyces pastorianus* usada na produção da cerveja *carlsberg* com dois ciclos fermentativos e a levedura *Saccharomyces pastorianus* usada na fermentação de cerveja do tipo *lager* com seis ciclos fermentativos. As leveduras antes de irem para o reator são propagadas de 100 mL para 15 L, após isso as leveduras são colocadas no reator com 1300 L de mosto onde vão fazendo fermentações sucessivas, sendo que um ciclo fermentativo corresponde de duas a cinco fermentações de 1300 L em propagação. As leveduras fornecidas foram recolhidas de um tanque antes de serem filtradas. As amostras foram centrifugadas a 15000 rpm durante 15 min a 4°C, foram lavadas uma vez com água destilada e foram recolhidas e congeladas.

2.2. Isolamento das paredes celulares da amostra

2.2.1. Autólise térmica

A autólise térmica serviu para solubilizar o conteúdo intracelular da levedura e isolar a parede celular desta. Para isso, a amostra de levedura foi pesada, colocada num banho com uma temperatura de 60 °C e com agitação durante 2 horas. Após isso, elevou-se a temperatura até os 80 °C durante 10 min para inativar enzimas hidrolíticas. A seguir, centrifugou-se a amostra durante 15 min a 4 °C e a 15000 rpm, tendo-se lavado três vezes o precipitado com água destilada. O conteúdo citoplasmático correspondia ao sobrenadante obtido da centrifugação. Este foi recolhido, concentrado no evaporador rotativo, congelado e liofilizado. O precipitado foi congelado e liofilizado.

2.3. Extração com água quente

A fim de se extraírem os polissacarídeos da parede celular das diferentes leveduras recorreu-se à extração aquosa a quente. Para isso pesou-se cerca de 500 mg de resíduo da autólise seco e 8 mL de H₂O numa proporção de 1:16 (massa amostra/ volume H₂O). Colocou-se em agitação numa placa de aquecimento durante 15 min a 100 °C. Deixou-se arrefecer, centrifugou-se a 15000 rpm, a 4 °C durante 20 min e recolheu-se o resíduo e o sobrenadante. O sobrenadante foi dialisado em mangas de diálise com poros de 1 kDa contra água destilada a 4 °C, o que pode resultar em perdas notáveis. Depois disso o sobrenadante e o resíduo foram congelados e liofilizados.

2.4. Extração aquosa assistida por micro-ondas

A extração aquosa assistida por micro-ondas também serviu para extrair os polissacarídeos da parede celular das quatro leveduras. Para isso ressuspendeu-se em água destilada os resíduos obtidos após a extração aquosa a quente numa proporção de 1:6 (mg de amostra/mL de H₂O) e colocou-se nos reatores de Teflon (compostos por politetrafluoroetileno e <1% de éter perfluoropropílico de vinilo que são resistentes a temperaturas até 250°C e pressões até 55 bar) durante 2 min a 180 °C e sob agitação no micro-ondas EthosSYNTH Labstation (output máximo, 1 kW, 2,45 GHz; Milestone Inc., Shelton, CT). Após a extração e despressurização da amostra, esta foi recolhida e centrifugada a 15000 rpm, a 4 °C durante 10 min. Recolheu-se o precipitado e o sobrenadante, congelou-se e liofilizou-se.

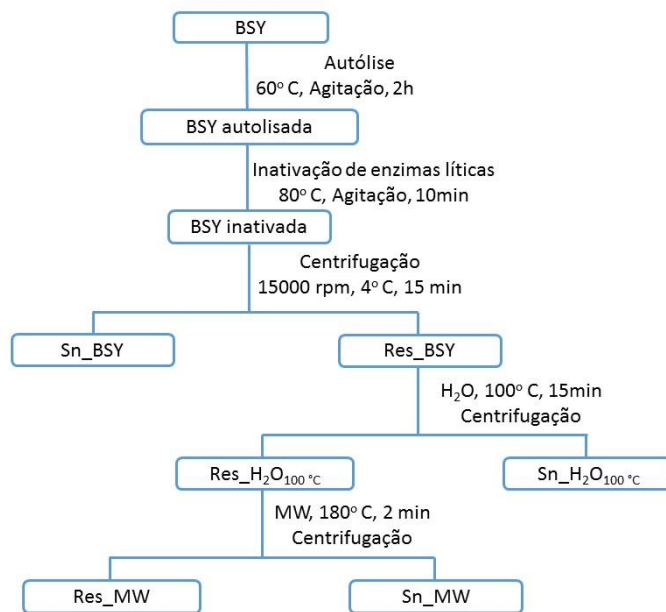


Figura 7 – Esquema de autólise seguida de extração dos polissacarídeos da levedura.

2.5. Análise de açúcares totais

Numa primeira fase submeteu-se os polissacarídeos presentes na parede celular das leveduras a uma hidrólise ácida, com despolimerização, de acordo com o método de Selvendran [76]. Em seguida, os produtos da hidrólise foram sujeitos a uma redução e acetilação, sendo transformados em acetatos de alditol [77]. Posteriormente os acetatos de alditol foram analisados quantitativa e qualitativamente em GC-FID [76].

Para pré-hidrolisar as ligações glicosídicas dos polissacarídeos pesaram-se cerca de 2 mg de levedura liofilizada para um tubo de cultura, adicionaram-se 200 μ L de H_2SO_4 72% e deixou-se a incubar durante 3 h. A seguir, para hidrolisar, adicionou-se 1 mL de água destilada, obtendo-se a concentração final de 2 M de H_2SO_4 , e colocaram-se os tubos num bloco de aquecimento a 120 $^{\circ}C$ durante uma hora. Após esta etapa, os tubos foram arrefecidos num banho de gelo e passou-se à redução e acetilação dos monossacarídeos obtidos. Os sobrenadantes das extrações foram hidrolisados com 1 M de H_2SO_4 durante 1 h a 100 $^{\circ}C$.

Feita a hidrólise passou-se à redução, e para isso, adicionou-se a cada tubo, 200 μ L de padrão interno (1 mg de 2-desoxiglucose/ mL) e transferiram-se 0,5 mL de amostra para novos tubos de cultura e neutralizou-se com 200 μ L de NH_3 a 25%. A seguir, adicionou-se 100 μ L de $NaBH_4$ (15 % (m/v) em NH_3 3 M) e colocou-se num bloco de aquecimento a

30°C. Passado uma hora arrefeceram-se os tubos num banho de gelo e adicionou-se 2 vezes 50 µL de ácido acético glacial a fim de eliminar o excesso de íon BH_4^- . Feita a completa eliminação e libertação de H_2 , transferiu-se 300 µL para tubos Sovirel e colocaram-se num banho de gelo para se iniciar a acetilação, adicionando-se 450 µL de 1-metilimidazol que serviu de catalizador e 3 mL de anidrido acético, o agente acetilante, agitou-se bem e incubou-se a 30°C num bloco de aquecimento. Passado meia hora, num banho de gelo, adicionou-se 3,0 mL de água destilada que decompôs o excesso de anidrido acético e 2,5 mL de diclorometano. Para extrair os acetatos de alditol agitou-se muito bem e centrifugou-se cerca de 30 s a 3000 rpm a fim de separar as duas fases. Quando separadas aspirou-se a fase aquosa por sucção. Adicionou-se de novo 3,0 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano, agitou-se, centrifugou-se e removeu-se totalmente a fase aquosa. Para lavar a fase orgânica, adicionou-se 3 mL de água destilada, agitou-se, centrifugou-se e removeu-se totalmente a fase aquosa repetindo-se de novo a lavagem e removendo-se a fase aquosa por completo. Posto isto, transferiu-se a fase orgânica para novos tubos adaptados para evaporar o diclorometano no evaporador centrífugo. Quando evaporado, adicionou-se 1 mL de acetona anidra e evaporou-se de novo no evaporador centrífugo repetindo-se de novo este passo. No final, dissolveu-se os acetatos de alditol em 30 µL de acetona anidra e analisou-se em GC-FID usando-se uma coluna capilar DB-225 com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 µm de espessura, e um cromatógrafo Perkin Elmer-Clarus 400. As condições da análise usadas foram o volume de injeção 2 µL, a temperatura do injetor 220°C e do detetor 230°C e o programa de temperaturas teve início aos 200°C, elevando-se 40°C por minuto até 220°C, mantendo-se esta temperatura durante 7 minutos e depois elevando-se 20°C por minuto até 230°C. Quando se atinge esta temperatura mantém-se durante 1 minuto.

2.6. Análise de ligações glicosídicas

As ligações glicosídicas foram analisadas por determinação dos acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAA) [78] em que inicialmente, pesou-se cerca de 1 mg de amostra para tubos adaptados ao evaporador centrífugo, sendo a amostra seca sob vácuo na presença de P_2O_5 durante a noite. Após isso, dissolveu-se a amostra em 1 mL de DMSO ficando também durante a noite em agitação. Adicionou-se cerca de 40 mg de NaOH em

pó à solução e deixou-se em agitação durante 30 min à temperatura ambiente. Passado isso, passou-se à metilação com CH_3I em que se adicionou 80 μL deste agente metilante e deixou-se reagir durante 20 min com agitação vigorosa. Este passo foi repetido duas vezes. Após isso as amostras foram dissolvidas em 3 mL de uma solução de clorofórmio:metanol (1:1, v/v) e foram depois dialisadas em membranas com poros entre os 12-14000 Daltons, contra uma solução 50% etanol:água três vezes. No fim concentrou-se até à secura e remetilou-se para garantir que todos os polissacarídeos ficam metilados em todas as posições disponíveis.

Após isso os polissacarídeos foram hidrolisados com 500 μL de TFA 2 M a 121 °C. Passado 1 h colocou-se os tubos no evaporador centrífugo para evaporar o TFA. De seguida passou-se à redução dos monossacarídeos metilados, em que, se adicionaram 300 μL de NH_3 2 M e 20 mg de NaBD_4 e deixou-se a reagir durante 1 h a 30°C. Depois arrefeceram-se os tubos num banho de gelo e adicionou-se 2 vezes 50 μL de ácido acético glacial para destruir o NaBD_4 em excesso. Após a redução foi feita a acetilação dos monossacarídeos em que se adicionaram 450 μL de 1-metilimidazole e 3 mL de anidrido acético, agitou-se e deixou-se a incubar a 30 °C num bloco de aquecimento durante 30 min, formando-se assim os PMAA. Para se extrair os PMAA adicionou-se num banho de gelo 3 mL de H_2O e 2,5 mL de CH_2Cl_2 , agitou-se e centrifugou-se e removeu-se a fase aquosa. Após isso repetiu-se o passo anterior e passou-se depois à lavagem da fase orgânica (2 vezes) com 3 mL de H_2O , agitou-se, centrifugou-se e removeu-se na totalidade a fase aquosa. Depois evaporou-se no evaporador centrífugo o CH_2Cl_2 e fez-se duas lavagens com acetona anidra seguidas de evaporação.

Após os PMAA estarem formados dissolveu-se os PMAA em 100 μL de acetona anidra e analisou-se em GC-MS usando-se uma coluna capilar DB-1 com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,10 μm de espessura, num cromatógrafo GC-MS-QP 2010 Plus Shimadzu. As condições da análise usadas foram o volume de injeção 0,2 μL , a temperatura do injetor 250°C e do detetor 300°C e o programa de temperaturas teve início aos 80 °C, elevando-se 8 °C por minuto até 140 °C, mantendo-se esta temperatura durante 5 minutos e depois elevando-se 1,5 °C por minuto até 150 °C. Após isso a temperatura sobe 50 °C por minuto até aos 250 °C, permanecendo durante 1 minuto.

2.7. Hidrólise enzimática / Tratamento enzimático com α -amilase e celulase

A metodologia de hidrólise enzimática utilizada baseou-se num trabalho já desenvolvido [68]. Os polissacarídeos das leveduras *S. cerevisiae* Weiss, *S. cerevisiae* Ale, *S. pastorianus* Carls e *S. pastorianus* Lager foram hidrolisados enzimaticamente com uma α -amilase de *Bacillus subtilis* (EC 3.2.1.1, Fluka BioChemika) e uma celulase de *Trichoderma viride* (EC 3.2.1.4, Sigma) que atuam nas ligações glicosídicas α e (β 1 \rightarrow 4)-Glc, respetivamente.

Para hidrolisar as ligações (α 1 \rightarrow 4)-Glc de 10 mg de amostra (Res_MW) em 15 mL de tampão fosfato 50 mM com pH 7,0 usou-se a α -amilase de *Bacillus subtilis* 62 U/mg. Esta reação decorreu durante 2 h a uma temperatura de 25 °C. Para controlos desta hidrólise enzimática recorreu-se a 10 mg de amilose em pó dialisada (12-14 kDa) e liofilizada, que serviu como controlo positivo, e a 10 mg de papel higiénico (celulose) dialisado (12-14 kDa) e liofilizado, que foi o controlo negativo.

Relativamente à hidrólise das ligações (β 1 \rightarrow 4)-Glc de 10 mg de amostra (Res_MW) em 15 mL de tampão acetato 20 mM com pH 5,0 recorreu-se à celulase de *Trichoderma viride* 6,9 U/mg numa reação durante a noite de 13 h a 37 °C. Como controlos positivo e negativo para esta hidrólise foram usados 10 mg de papel higiénico (celulose) e 10 mg de amilose em pó.

Após o tempo da reação de hidrólise de cada enzima, estas foram inativadas durante 10 min num banho a 100 °C. Após isso as amostras e controlos foram colocados em mangas de diálise de poro 12-14 kDa contra água a 4 °C. Terminada a diálise as amostras foram centrifugadas e os resíduos e sobrenadantes foram congelados e liofilizados. Aos resíduos foi feita análise de ligações glicosídicas por metilação.

2.8. Visualização da estrutura tridimensional das leveduras – SEM

Os resíduos obtidos após extração aquosa assistida por micro-ondas foram analisados microscopicamente a fim de se verificar qual a estrutura tridimensional que a levedura apresenta após extração. Usou-se um microscópio eletrónico de varrimento (SEM) (gun-SEM Hitachi SU70) que opera até 15 kV, para visualizar as quatro leveduras antes e após tratamento enzimático. As amostras liofilizadas foram ressuspendidas em água

destilada durante 24 h. Depois num suporte de alumínio colocou-se fita de carbono e um pedaço de lamela de vidro sobre o qual se colocou uma gota da suspensão da amostra [79]. Após isso deixou-se a secar no exsiccador e depositou-se um filme de carbono, tendo-se visualizado a amostra a 4 kV com ampliações de 3000x, 20000x e 40000x.

2.9. Pesquisa de Homologia

A fim de se pesquisar qual a enzima responsável pelas ligações (β 1 \rightarrow 4)-Glc na parede celular das leveduras recorreu-se a ferramentas bioinformáticas. Estas ferramentas foram principalmente o *Biological sequence alignment editor (Bioedit)* [80], que nos permite comparar sequências e ver se há homologia entre elas, e o *Basic Local Alignment Search Tool (Blast)* [81], que pesquisa no genoma de um determinado organismo a sequência da proteína que se pretende encontrar, a fim de se ver se há homologia com esse genoma. Foi usado o *software Bioedit*, onde se introduziram todas as sequências de celulose sintase disponíveis, foram selecionados os comandos “File”, “New alignment”, “Sequence”, “New sequence” colocou-se a sequência da enzima e selecionou-se “protein” no comando “Sequence Type”. Depois fez-se o alinhamento entre elas selecionando os comandos “Accessory”, “Alignment”, “Output” e “Run”.

No *Blast* pesquisaram-se várias sequências de celulose sintase de organismos distintos, eucalipto (*Eucalyptus globulus*), bactéria acidófila (*Acidobacterium capsulatum*) e de uma levedura (*Pseudozyma hubeiensis*), no genoma da *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*. Para efetuar esta pesquisa primeiro selecionou-se o nome do organismo seguido de *tblastn*, após este passo introduziu-se a sequência em nucleótidos da enzima seguido do comando “Blast”. A sequência da celulose sintase da levedura *Pseudozyma hubeiensis* foi também comparada com a sequência da glucana sintase da *S. cerevisiae* usando o *Blast*.

3. Resultados e Discussão

3.1.1. Extração de polissacarídeos

Os polissacarídeos da parede celular das leveduras *S. cerevisiae* Weiss (não reutilizada), *S. cerevisiae* Ale (reutilizada em 3 ciclos fermentativos), *S. pastorianus* Carls (reutilizada em 2 ciclo fermentativo) e *S. pastorianus* Lager (reutilizada em 6 ciclos fermentativos) foram extraídos sequencialmente a partir da levedura autolisada (Res_BSY). A primeira extração foi feita com água quente, seguida de uma extração aquosa assistida por micro-ondas. A extração com água quente permitiu extrair os polissacarídeos que se encontram na superfície da parede celular (Sn_H₂O_{100°C}), enquanto que a extração aquosa assistida por micro-ondas permitiu extrair os polissacarídeos da parede externa das leveduras (Sn_MW), resultando um resíduo insolúvel que corresponde à parede interna da levedura (Res_MW). Os polissacarídeos extraídos foram caracterizados recorrendo à análise de açúcares que foi realizada em duplicado. Na tabela 2 encontram-se descritos os rendimentos de extração em massa e em hidratos de carbono, assim como a percentagem molar e o total de hidratos de carbono realizados às quatro leveduras a partir da levedura autolisada.

O rendimento em massa da extração com água quente foi de aproximadamente 3 % em leveduras não reutilizadas ou com menos ciclos fermentativos, *S. cereveviae* Weiss e *S. pastorianus* Carls, respetivamente. Nas leveduras com mais ciclos fermentativos (*S. cerevisiae* Ale e *S. pastorianus* Lager) o rendimento em massa da extração com água do sobrenadante foi cerca de 2 %.

Na extração aquosa assistida por micro-ondas (180°C) os rendimentos em massa obtidos para o sobrenadante da extração da *S. cerevisiae* Weiss foi de 38 % e da *S. pastorianus* Carls foi de 39 %. O resíduo insolúvel corresponde em massa 34 % e 35 % para a *S. cerevisiae* Weiss e *S. pastorianus* Carls, respetivamente. Relativamente às leveduras com mais reutilizações os rendimentos em massa do sobrenadante da extração aquosa assistida por micro-ondas foram aproximadamente 34 % para ambas as leveduras enquanto que os resíduos resultantes correspondem a 51 % na levedura *S. cerevisiae* Ale e 45 % na levedura *S. pastorianus* Lager.

Tabela 2: Frações, rendimentos, percentagem molar e concentração de hidratos de carbono (HC) total extraídos sequencialmente das leveduras *S. cerevisiae* Weiss, *S. cerevisiae* Ale, *S. pastorianus* Carls e *S. pastorianus* Lager.

	Fracção	η massa (%)	η HC (%)	Hidratos de carbono (% mol)		Total HC (mg/g)
				Man	Glc	
<i>S. cerevisiae</i> Weiss	Res_BSY	-	-	31	69	532
	Sn_H ₂ O 100°C	3,1	2,2	31	69	386
	Res_H ₂ O 100°C	79,1	57,4	30	70	386
	Sn_MW	37,6	40,5	23	77	573
	Res_MW	33,8	14,7	8	92	232
<i>S. cerevisiae</i> Ale	Res_BSY	-	-	17	83	668
	Sn_H ₂ O 100°C	2,2	1,3	20	80	402
	Res_H ₂ O 100°C	93,2	67,2	16	84	420
	Sn_MW	34,1	27,8	18	82	545
	Res_MW	51,1	40,3	6	94	528
<i>S. pastorianus</i> Carls	Res_BSY	-	-	43	57	491
	Sn_H ₂ O 100°C	3,3	1,9	73	27	285
	Res_H ₂ O 100°C	81,0	65,1	39	61	395
	Sn_MW	38,5	22,5	48	52	287
	Res_MW	34,7	25,2	13	87	357
<i>S. pastorianus</i> Lager	Res_BSY	-	-	45	55	516
	Sn_H ₂ O 100°C	2,3	0,8	73	27	181
	Res_H ₂ O 100°C	86,5	87,2	47	53	520
	Sn_MW	33,6	21,2	65	35	325
	Res_MW	44,6	40,5	21	79	468

A figura 8 mostra-nos de uma forma mais intuitiva os rendimentos em percentagem de hidratos de carbono (m/m) relativamente ao Sn_H₂O_{100°C}, ao Sn_MW e ao Res_MW. Verifica-se pela observação da figura 8 que o rendimento obtido na extração com água é reduzido e que o rendimento da extração com micro-ondas é mais elevado, verificando-se que é ainda mais elevado na levedura que não é reutilizada, *S. cerevisiae* Weiss. O fato do rendimento da extração com água a 100 °C ser mais reduzido que o rendimento de extração aquosa assistida por micro-ondas vai ao encontro com resultados da literatura para o mesmo tipo de polissacarídeos, com origem fúngica [59].

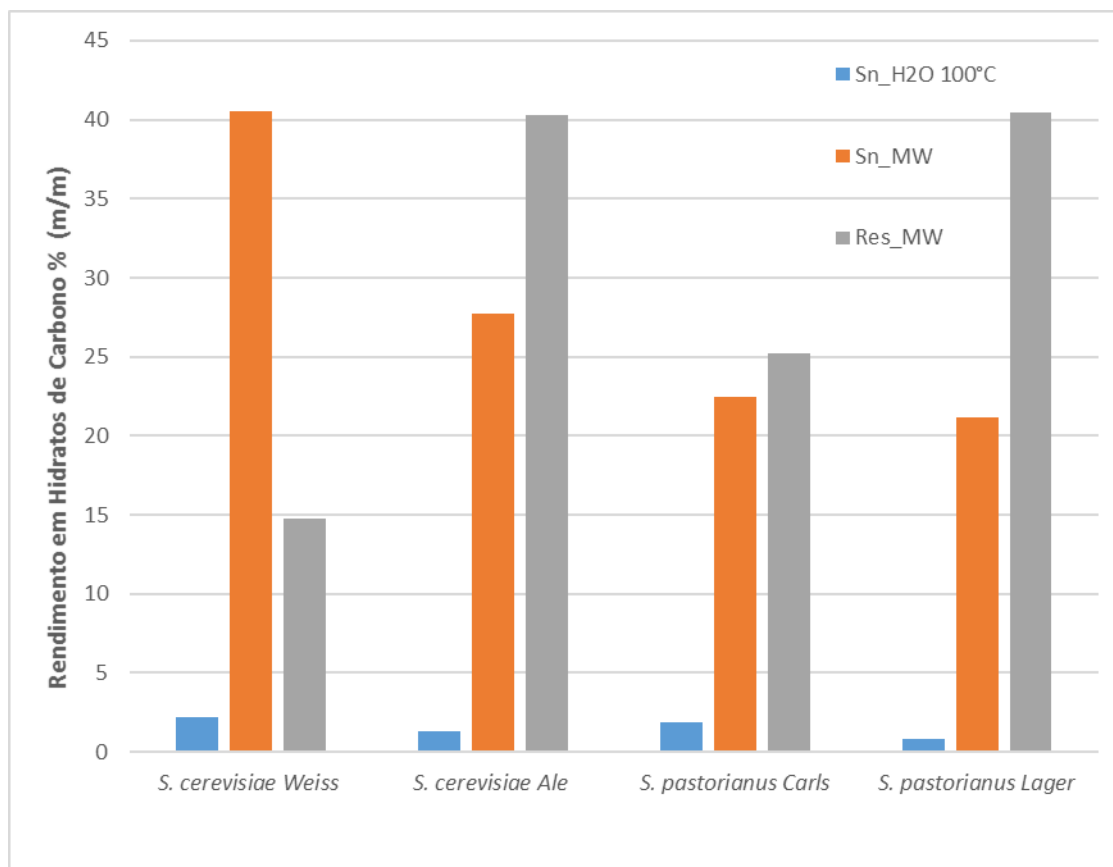


Figura 8 – Rendimento de extração de polissacarídeos em % (m/m) para as quatro leveduras em estudo.

A extração aquosa permitiu extrair da parte mais superficial da parede celular cerca de 1 a 2 % de HC em todas as leveduras. No caso da extração aquosa assistida por micro-ondas foi possível extrair-se os polissacarídeos da parede externa, sendo 41 % de HC na *S. cerevisiae* Weiss, 28 % de HC na *S. cerevisiae* Ale, 23 e 21 % na *S. pastorianus* Carls e *S. pastorianus* Lager, respetivamente. Na extração assistida por micro-ondas resulta um resíduo insolúvel que corresponde na *S. cerevisiae* Weiss a 15 % de HC, na *S. cerevisiae* Ale 40 % de HC, na *S. pastorianus* Carls 25 % de HC e na *S. pastorianus* Lager 41 % de HC. Dentro da mesma espécie, nas leveduras menos reutilizadas foi possível extrair-se mais HC com o recurso ao micro-ondas do que em leveduras mais reutilizadas, notando-se mais essa diferença na *S. cerevisiae*. É de notar que devido ao facto de ser feita diálise e lavagens aos resíduos após centrifugação que há algumas perdas de massa visíveis nos rendimentos obtidos.

O resíduo da autólise é composto por 53, 67, 49 e 52 % de hidratos de carbono nas leveduras *S. cerevisiae* Weiss, *S. cerevisiae* Ale, *S. pastorianus* Carls e *S. pastorianus*

Lager, respetivamente. A *S. cerevisiae* Weiss apresenta 69 % mol de Glc e 31 % mol de Man enquanto a *S. cerevisiae* Ale apresenta 83 % mol de Glc e 17 % mol de Man. As *S. pastorianus* são constituídas por 55-57 % mol de Glc e 43-45 % mol de Man.

A extração com água permitiu extrair na *S. cerevisiae* Weiss 69 % mol de Glc e 31 % mol de Man e na *S. cerevisiae* Ale 80 % mol Glc e 20 % mol de Man. No caso das leveduras *S. pastorianus*, a extração com água extraiu da parede celular 73 % mol de Man e 27 % mol de Glc. Desta forma, a superfície da parede celular das leveduras é composta, no caso das *S. cerevisiae*, mais por Glc do que Man, sendo que nas *S. pastorianus* esta parte da parede celular é mais rica em Man do que Glc. O resíduo resultante da extração com água na *S. cerevisiae* Weiss é composto por 70 % mol de Glc e 30 % mol de Man, e no caso da *S. cerevisiae* Ale é constituído por 84 e 16 % mol de Glc e Man respetivamente. Na *S. pastorianus* Carls o resíduo resultante da extração com água é composto por 61 % mol de Glc e 39 % mol de Man enquanto a *S. pastorianus* Lager apresenta no resíduo da extração com água 53 % mol de Glc e 47 % mol de Man.

Os resíduos da extração com água foram suspensos em água e superaquecidos no micro-ondas permitindo extrair mais polissacarídeos da parede celular externa das leveduras. No caso das *S. cerevisiae* a extração assistida por micro-ondas permitiu extrair uma elevada quantidade de Glc, cerca de 77 e 82 % mol na *S. cerevisiae* Weiss e *S. cerevisiae* Ale respetivamente, sendo o resíduo desta extração igualmente rico em Glc (92 % mol no caso da *S. cerevisiae* Weiss e 94 % mol no caso da *S. cerevisiae* Ale). No que diz respeito às leveduras *S. pastorianus* constatou-se que a extração aquosa assistida por micro-ondas permitiu extrair 48 % mol de Man e 52 % mol de Glc na *S. pastorianus* Carls, e 65 % mol de Man e 35 % mol de Glc na *S. pastorianus* Lager. Relativamente ao resíduo resultante da extração assistida por micro-ondas este é constituído por 13 % mol de Man e 87 % mol de Glc na *S. pastorianus* Carls e na *S. pastorianus* Lager é composto por 21 % mol de Man e 79 % mol de Glc.

Considerando que na extração com água a 100 °C se extraem os polissacarídeos da superfície celular e que estes correspondem ao Sn_H₂O_{100°C}, verifica-se pela observação da figura 9 que a superfície celular da *S. pastorianus* é constituída principalmente por manose enquanto a *S. cerevisiae* apresenta na superfície celular quantidades equimolares de manose e glucose. A diferença na composição da parede celular entre as diferentes leveduras está relacionada com a estirpe de levedura. Apesar da parede celular das

diferentes leveduras ser constituída pelo mesmo tipo de polissacarídeos, a organização destes assim como a disposição e interação dos polissacarídeos na parede celular varia de acordo com a estirpe de levedura [15]. Relativamente ao método de extração utilizado verificou-se que extraiu principalmente as manoproteínas da parede celular e de acordo com a literatura a extração com água quente permite extrair as manoproteínas, tornado as paredes celulares mecanicamente menos resistentes [58].

Relativamente à extração aquosa assistida por micro-ondas foi possível extrair-se os polissacarídeos da parede externa da célula e que constituem o Sn_MW e o resíduo insolúvel (Res_MW) corresponde à parede interna das células de levedura. De acordo com a figura 9, a parede externa das células da *S. cerevisiae* é mais rica em glucose que a parede externa da *S. pastorianus*. Para além disso nas leveduras mais reutilizadas há maior conteúdo de glucose na parede interna das células.

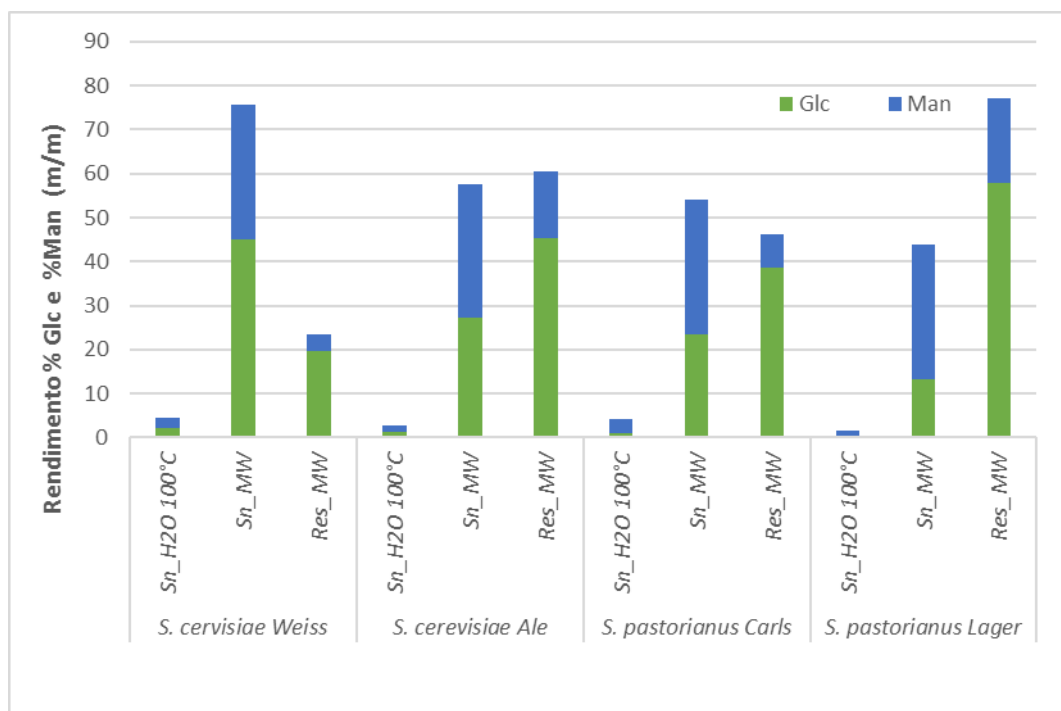


Figura 9 - Rendimentos de extração em percentagem de Glc e Man (m/m) para a *S. cerevisiae* Weiss, *S. cerevisiae* Ale, *S. pastorianus* Carls e *S. pastorianus* Lager.

Assim, a parede celular das leveduras *S. cerevisiae* é mais rica em Glc que as leveduras *S. pastorianus*, e estas são mais ricas em Man. O resíduo insolúvel é rico em Glc nas quatro leveduras. Relativamente ao número de reutilizações nas leveduras *S. cerevisiae* parece estar a incrementar o conteúdo de Glc enquanto nas leveduras *S. pastorianus* o

maior número de reutilizações parece induzir o incremento de Man na parede celular. Estes resultados indicam-nos que a composição da parede celular das duas espécies de leveduras em estudo é diferente mostrando-nos que essas diferenças estão relacionadas com a espécie [15]. No entanto, as variações na composição da parede celular também podem estar relacionadas com a resposta das diferentes espécies às condições ambientais [50].

No que diz respeito ao total de hidratos de carbono verificou-se que a levedura *S. cerevisiae* Ale é mais rica em HC que a *S. cerevisiae* Weiss, que não é reutilizada. As leveduras *S. pastorianus* são aproximadamente semelhantes em termos de total de hidratos de carbono.

3.1.2. Análise de ligações glicosídicas

Com o objetivo de estudar a estrutura dos polissacarídeos presentes na parede celular das leveduras recorreu-se à análise por metilação, permitindo a análise das ligações glicosídicas. A análise de metilação foi realizada ao sobrenadante da extração aquosa (Sn_H₂O_{100°C}), ao sobrenadante da extração aquosa assistida por micro-ondas (Sn_MW) realizada com água a 180 °C, e ao resíduo da extração aquosa assistida por micro-ondas (Res_MW). As ligações glicosídicas das três frações das leveduras *S. cerevisiae* Weiss, *S. cerevisiae* Ale, *S. pastorianus* Carls e *S. pastorianus* Lager encontram-se descritas na tabela 3.

Na *S. cerevisiae* Weiss a extração com água permitiu extrair os açúcares que se encontram na superfície da parede celular sendo estes ricos em glucose (47 % mol) com 38,4 % mol de glucose em ligação (1→4) ramificadas com 3,6 % mol de glucose em ligação (1→4,6) e 4,0 % mol de glucose terminal. A existência de (1→4)-Glc e (1→4,6)-Glc indica a presença de glicogénio. Os extratos da água da *S. cerevisiae* Weiss são ainda constituídos por 18,5 % mol de manose terminal, 13,0 % mol de manose em ligação (1→2) e 18,3 % mol de (1→2,6)-Man. A razão entre a (1→2,6)-Man e a manose total corresponde a 1 ramificação por cada 4 resíduos de manose, o que indica a presença de manoproteínas muito ramificadas. Os extratos solúveis resultantes da extração aquosa assistida por micro-ondas são constituídos por 56 % mol de glucanas das quais 26,3 % mol de glucose em ligação (1→4), 24,1 % mol correspondem a glucose em ligação (1→3), 6,8 % mol de terminais glucose, 5,1 % mol de glucose em ligação (1→6) e 3,1 % mol de

glucose em ligação (1→4,6). A razão entre a (1→4,6)-Glc e a (1→4)-Glc indica que de 8 em 8 resíduos de glucose em ligação (1→4) há uma ramificação em (1→4,6)-Glc sendo que é similar ao encontrado para o glicogénio (7 e 10 resíduos por ramificação) [82].

Tabela 3: Ligações glicosídicas das três frações de leveduras: *S. cerevisiae* Weiss, *S. cerevisiae* Ale, *S. pastorianus* Carls e *S. pastorianus* Lager.

Ligações Glicosídicas	<i>S. cerevisiae</i> Weiss			<i>S. cerevisiae</i> Ale			<i>S. pastorianus</i> Carls			<i>S. pastorianus</i> Lager		
	Sn_H ₂ O 100°C	Sn_ MW	Res_ MW	Sn_H ₂ O 100°C	Sn_ MW	Res_ MW	Sn_H ₂ O 100°C	Sn_ MW	Res_ MW	Sn_H ₂ O 100°C	Sn_ MW	Res_ MW
t-Ara	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2	0,5	0,5	0,4	0,4	0,2	0,2	0,1
Total	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2	0,5	0,5	0,4	0,4	0,2	0,2	0,1
t-Man	18,5	10,6	2,8	12,1	8,5	1,6	30,6	20,8	4,9	25,8	22,1	7,3
3-Man	-	1,2	0,6	-	0,2	0,1	0,0	0,6	0,1	0,0	0,3	0,8
2-Man	13,0	5,7	1,8	6,9	7,9	1,2	17,7	16,3	3,6	19,0	17,5	5,8
4-Man	-	0,2	0,1	-	-	0,1	0,2	-	0,2	0,4	-	0,1
6-Man	1,4	1,2	0,3	1,1	1,1	0,1	2,7	1,7	0,5	2,4	1,8	0,6
3,4-Man	0,2	0,4	0,5	0,3	0,5	0,1	-	-	0,3	0,1	0,1	0,3
2,3-Man	0,1	0,2	1,3	-	0,1	0,3	0,2	-	1,5	0,4	0,2	1,6
2,4-Man	0,2	0,1	-	0,3	0,3	0,2	0,2	-	0,0	0,2	0,1	0,1
2,6-Man	18,3	13,3	1,7	10,1	10,1	0,6	20,5	23,3	2,7	23,1	23,8	4,6
3,6-Man	-	0,4	0,2	-	0,4	0,1	0,8	0,8	0,4	-	0,9	0,5
3,4,6-Man	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3,6-Man	0,4	-	-	0,3	-	-	-	-	-	1,7	1,2	-
2,3,4,6-Man	0,3	0,1	0,6	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3	0,6	0,2	0,2	0,4
Total	52,3	33,5	10,0	31,1	29,1	4,7	72,9	63,8	14,8	73,3	68,3	22,1
t-Glc	4,0	6,8	7,1	8,0	7,2	11,1	1,9	3,0	6,9	1,4	1,6	7,2
2-Glc	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	-	-
3-Glc	-	24,1	64,9	-	1,8	11,8	0,8	5,8	49,2	1,0	1,4	34,3
4-Glc	38,4	26,3	2,4	52,5	51,0	60,8	22,0	21,9	14,2	20,1	24,2	21,4
6-Glc	0,7	5,1	3,7	0,8	3,2	2,9	0,5	2,4	7,4	0,7	1,4	8,0
2,3-Glc	0,1	0,5	0,1	0,0	0,1	0,5	0,0	-	0,1	0,2	0,2	0,1
2,4-Glc	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,0	-	-	0,0	0,4	0,3	0,1
3,4-Glc	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	0,1	-	-
4,6-Glc	3,6	3,1	0,3	6,5	6,6	6,1	0,8	1,5	1,4	1,7	1,3	2,2
3,6-Glc	-	-	4,4	-	-	1,1	-	-	3,5	-	-	3,0
3,4,6-Glc	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-
2,3,4,6-Glc	-	-	0,4	0,4	0,1	0,3	0,0	-	1,0	0,0	0,7	0,8
Total	46,8	66,0	83,3	68,4	70,3	94,8	26,1	34,5	83,7	25,7	31,1	76,9
4-GlcNAc	0,5	0,3	6,6	0,2	0,4	1,1	0,5	1,3	1,1	0,7	0,4	0,9
Total	0,5	0,3	6,6	0,2	0,4	1,1	0,5	1,3	1,1	0,7	0,4	0,9

Na extração aquosa assistida por micro-ondas foi possível extrair-se 33,5 % mol de manose com 14,4 % mol de resíduos ramificados, principalmente (1→2,6)-Man (13,3 % mol). A razão de manose em ligação (1→2,6) com a manose em ligação (1→6) indica presença de 11 resíduos ramificados por cada resíduo de manose sem ramificação. Relativamente à razão entre a (1→2,6)-Man e a manose total indica a presença de 1 ramificação por cada 3 resíduos de manose, ou seja o extrato solúvel resultante da extração aquosa assistida por micro-ondas é uma fonte de manoproteínas muito ramificadas. O extrato insolúvel da extração aquosa assistida por micro-ondas (Res_MW) na *S. cerevisiae* Weiss é constituído essencialmente por glucose, sendo que 64,9 % mol corresponde a glucose em ligação (1→3), 7,1 % mol a glucose terminal, 4,4 % mol a glucose em ligação (1→3,6)-Glc e 3,7 % mol a glucose em ligação (1→6). Como o rácio entre a (1→3)-Glc e a (1→3,6)-Glc é de 15, significa que de 15 em 15 resíduos de glucose em ligação (1→3) há uma ramificação em (1→3,6). Já o rácio entre a glucose em ligação (1→4,6) e a glucose em ligação (1→4) corresponde a uma ramificação por cada 8 resíduos de (1→4)-Glc.

O resíduo insolúvel da *S. cerevisiae* Weiss distingue-se dos extratos das outras leveduras por apresentar 6,6 % mol de (1→4)-GlcNAc. A levedura que foi sujeita a apenas um ciclo fermentativo, *S. cerevisiae* Weiss, apresenta uma percentagem elevada de *N*-acetilglucosamina que provém da quitina da parede celular da levedura. Esta presença elevada de quitina comparativamente às restantes pode dever-se ao fato de que as outras leveduras como são reutilizadas e apresentam mais ciclos fermentativos estão mais sujeitas ao stress cervejeiro que pode induzir mutações no gene GFA1, que codifica a enzima glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase, responsável pela síntese de quitina, com consequente diminuição do teor de quitina na parede celular [18].

No caso da levedura *S. cerevisiae* Ale, a extração com água quente permitiu a extração de 6,9 % mol de manose em ligação (1→2) e 1,1 % mol de manose em ligação (1→6). As manoproteínas extraídas apresentam 11 % mol de resíduos ramificados, essencialmente (1→2,6)-Man (10,1 % mol), e 12,1 % mol de manose terminal. A razão entre a (1→2,6)-Man e a manose total corresponde a 1 ramificação por cada 3 resíduos de manose, o que indica a presença de manoproteínas muito ramificadas. Relativamente à glucose extraída com água quente é principalmente glucose em ligação (1→4) (52,5 % mol) com 6,5 % mol de resíduos ramificados em (1→4,6)-Glc e 8,0 % mol de glucose em terminal. Com a extração aquosa assistida por micro-ondas extraiu-se mais polissacarídeos

da parede celular da levedura que, no caso da *S. cerevisiae* Ale, são principalmente glucanas (56,0 % mol) com 6,6 % mol de glucose em ligação (1→4,6) e 7,2 % mol de glucose terminal. As glucanas extraídas são pouco ramificadas uma vez que o rácio entre a glucose em ligação (1→4,6) e a glucose em ligação (1→4) corresponde a uma ramificação por cada 8 resíduos de (1→4)-Glc, estando de acordo com o observado para o glicogénio [82]. Também são extraídas 29,1 % mol de manoproteínas com 11,4 % mol de resíduos ramificados e 8,5 % mol de manose terminal. As manoproteínas extraídas são muito ramificadas por o rácio entre a (1→2,6)-Man e a manose total corresponder a 1 ramificação por cada 3 resíduos de manose. O resíduo resultante da extração por microondas é rico em glucose em ligação (1→4) (60,8 % mol) e apresenta ainda 11,8 % mol de glucose em ligação (1→3), 11,1 % mol de glucose terminal, 6,1 % mol de glucose em ligação (1→4,6), 2,9 % mol de glucose em ligação (1→6) e 1,1 % mol de (1→3,6)-Glc. As glucanas (1→4) do resíduo insolúvel são pouco ramificadas pois a razão entre a glucose em ligação (1→4,6) e a glucose em ligação (1→4) corresponde a uma ramificação por cada 10 resíduos de (1→4)-Glc o que corresponde ao glicogénio [82]. As glucanas (1→3) também são pouco ramificadas pois de 11 em 11 resíduos de glucose em ligação (1→3) há 1 ramificação em (1→3,6)-Glc. A glucose em ligação (1→4) e (1→4,6) corresponde a ligações glicosídicas associadas ao glicogénio da parede celular [83] enquanto que a glucose em ligação (1→3) e (1→6) corresponde às β-glucanas que compõem a parede celular da levedura [12,37].

As ligações (1→3,6)-Glc variam com a espécie de levedura pelo que na *S. cerevisiae* podem corresponder a 7 %, no caso da *Cândida albicans* a 15 % e no caso da *Schizosaccharomyces pombe* a 75 % [37,84]. A *S. cerevisiae* Weiss apresenta ramificados de glucose (1→3,6) superiores aos níveis da *S. cerevisiae* Ale, no entanto o rácio entre a (1→3)-Glc e a (1→3,6) na *S. cerevisiae* Weiss (1 ramificação de 15 em 15 resíduos de (1→3)-Glc) é inferior ao da *S. cerevisiae* Ale (1 ramificação de 11 em 11 resíduos de (1→3)-Glc), o que indica que a síntese de ramificação das glucanas (1→3) com as glucanas (1→6) podem ser o primeiro mecanismo da resposta ao stress cervejeiro que pode induzir alterações estruturais na parede celular por forma a fortalecer a rede estrutural [14]. A proporção de glucose em ligação (1→6) na *S. cerevisiae* Ale aumenta para o dobro quando comparada com a *S. cerevisiae* Weiss que não foi reutilizada provavelmente devido ao stress cervejeiro e a uma maior concentração de etanol [50]. A *S. cerevisiae* Ale

apresenta menos resíduos de glucose em ligação (1→3), e conseqüentemente menos resíduos de glucose em ligação (1→3,6), passando a apresentar mais ligações (1→4)-Glc. O stress cervejeiro induz a diminuição das glucanas em ligação (1→3) e o aumento das glucanas em ligação (1→4), tal verifica-se na *S. cerevisiae* Ale que foi reutilizada quando comparada com a *S. cerevisiae* Weiss que não foi reutilizada [14]. O valor elevado da percentagem de glucose em ligação (1→4) no caso da levedura *S. cerevisiae* Ale pode dever-se ao número de reutilizações que proporcionam o incremento deste tipo de ligações glucose.

Ambas as leveduras *S. cerevisiae* apresentam manose cujas ligações glicosídicas mais elevadas são a (1→2)-Man e (1→2,6)-Man o que indica a presença de manoproteínas na parede celular [85]. As manoproteínas da parede celular em ambas as leveduras são muito ramificadas (1 ramificação por cada 3 resíduos de manose) notando-se um grau de ramificação ligeiramente inferior nas manoproteínas da levedura *S. cerevisiae* não reutilizada no extrato da água quente (1 ramificação por cada 4 resíduos de manose).

A levedura *S. pastorianus* Carls quando sujeita a extração com água mostrou conter maioritariamente manoproteínas (72,9 % mol) com 21,7 % mol de resíduos ramificados de manose, principalmente (1→2,6)-Man (20,5 % mol) e 30,6 % mol de manose terminal. O Sn_{H₂O} apresenta 1 ramificação (1→2,6)-Man por cada 4 resíduos de manose indicando que as manoproteínas da superfície da parede celular são muito ramificadas. Os extratos da água quente são ainda constituídos por 23,3 % mol de glucanas com 1 % mol de resíduos ramificados de glucose e 1,9 % mol de glucose terminal. A extração aquosa assistida por micro-ondas permitiu a extração de uma fração enriquecida em manose obtendo-se um resíduo insolúvel rico em glucose. O extrato solúvel em água resultante da extração aquosa assistida por micro-ondas é constituído por 16,3 % mol de manose em ligação (1→2), 1,7 % mol de manose em ligação (1→6), 24,1 % mol de resíduos ramificados de manose, nomeadamente 23,3 % mol de (1→2,6)-Man, e 20,8 % mol de manose terminal. O rácio entre a (1→2,6)-Man e a manose total do extrato solúvel do micro-ondas corresponde a 1 ramificação por cada 3 resíduos de manose que indica a presença de manoproteínas muito ramificadas na parede externa da célula da levedura *S. pastorianus* Carls. As glucanas que compõem este extrato solúvel são essencialmente glucanas em ligação (1→4) (21,9 % mol) havendo também 5,8 e 2,4 % mol de glucose em ligação (1→3) e (1→6), respetivamente, com 1,5 % mol de resíduos ramificados em (1→4,6)-Glc. O rácio entre a

glucose em ligação (1→4) e a glucose em ligação (1→4,6) indica que de 15 em 15 resíduos de (1→4)-Glc há uma ramificação em (1→4,6)-Glc não sendo estas glucanas da parede externa da célula muito ramificadas, este rácio é maior que o intervalo de ramificação previsto para o glicogénio, que é entre 7 e 10 resíduos de glucose [82]. A glucose em ligação (1→4) e (1→4,6) corresponde ao glicogénio da parede celular [83] e a glucose em ligação (1→3) e (1→6) corresponde às β-glucanas da parede celular [12,37]. No que diz respeito ao resíduo insolúvel da levedura *S. pastorianus* Carls, resultante da extração aquosa assistida por micro-ondas, verificou-se que é composto essencialmente por glucanas em ligação (1→3) (49,2 % mol) e ainda 14,2 % mol de glucose em ligação (1→4) e 7,4 % mol de glucose em ligação (1→6). As glucanas deste resíduo apresentam 5 % mol de ramificações, principalmente em (1→3,6)-Glc (3,5 % mol) e em (1→4,6)-Glc (1,4 % mol), e 6,9 % mol de glucose terminal. Sendo que o rácio entre a (1→3)-Glc e a (1→3,6)-Glc indica a presença de glucanas pouco ramificadas pois de 14 em 14 resíduos de glucose em ligação (1→3) há uma ramificação em (1→3,6)-Glc. Relativamente às manoproteínas que constituem a parede celular da levedura e que ainda estão presentes no resíduo insolúvel da extração com micro-ondas são essencialmente manose em ligação (1→2) (3,6 % mol) com 4,9 % mol de resíduos ramificados, principalmente em (1→2,6)-Man (2,7 % mol), e 4,9 % mol de manose terminal. O rácio entre a (1→2,6)-Man e a manose total indica que há 1 ramificação por cada 5 resíduos de manose, pelo que as manoproteínas da parede interna da célula são menos ramificadas que as manoproteínas da parede externa. De acordo com a literatura, a levedura excedentária apresenta 1 ramificação de (1→2,6)-Man por cada 3 resíduos de manose o que indica que as manoproteínas da *S. pastorianus* Carls são menos ramificadas podendo estar relacionado com o stress cervejeiro [14], pois durante o processo cervejeiro a *S. pastorianus* devido às condições ambientais pode aumentar a quantidade de manoproteínas da parede celular assim como a resistência a enzimas líticas e as interações dos recetores lectina [49]. O aumento das interações dos recetores lectina deve-se à alteração da estrutura das manoproteínas que ficam mais ramificadas favorecendo o processo de floculação que ao proteger a levedura contra o stress provocado pelo etanol também permite impedir a perda de viabilidade celular [49,86].

O extrato solúvel resultante da extração aquosa a quente à levedura *S. pastorianus* Lager é constituído principalmente por 19,0 % mol de manose em ligação (1→2) e 2,4 %

mol de manose em ligação (1→6) com 25,5 % mol de resíduos ramificados, principalmente em (1→2,6)-Man (23,1 % mol), e 25,8 % mol de manose terminal. O rácio entre a (1→2,6)-Man e a manose total corresponde a 1 ramificação por cada 3 resíduos de manose que indica a presença de manoproteínas muito ramificadas na superfície da célula da levedura *S. pastorianus* Lager. A glucose extraída é essencialmente em ligação (1→4) (20,1 % mol) sendo estas glucanas ramificadas com 1,7 % mol de glucose em ligação (1→4,6) e 1,4 % mol de terminais. Relativamente à extração aquosa assistida por microondas o extrato solúvel da levedura *S. pastorianus* Lager é rico em manose, enquanto que o resíduo insolúvel (Res_MW) é rico em glucose. O extrato solúvel (Sn_MW) é composto por 17,5 % mol de manose em ligação (1→2) e 1,8 % mol de manose em ligação (1→6) apresentando 23,8 % mol de resíduos ramificados de manose em (1→2,6) e 22,1 % mol de terminal manose. O rácio entre a (1→2,6)-Man e a manose total corresponde a 1 ramificação por cada 3 resíduos de manose que indica a presença de manoproteínas muito ramificadas na parede externa da célula da levedura *S. pastorianus* Lager. Este extrato solúvel apresenta 27,0 % mol de glucanas com 1,8 % mol de resíduos ramificados e 1,6 % mol de terminal glucose. O rácio entre a glucose em ligação (1→4,6) e a (1→4)-Glc mostra que há uma ramificação em (1→4,6)-Glc a cada 19 resíduos pelo que, as glucanas em (1→4) da parede externa da levedura são pouco ramificadas e este rácio afasta-se muito do esperado para o glicogénio [82]. Relativamente ao resíduo insolúvel é constituído por 34,3 % mol de glucose em ligação (1→3), 21,4 % mol de glucose em ligação (1→4) e 8,0 % mol de glucose em ligação (1→6) sendo estas glucanas ramificadas em (1→3,6)-Glc (3,0 % mol), (1→4,6)-Glc (2,2 % mol) e com 7,2 % mol de glucose em ligação terminal. O rácio entre a (1→3)-Glc e a (1→3,6)-Glc indica a presença de glucanas pouco ramificadas pois de 11 em 11 resíduos de glucose em ligação (1→3) há uma ramificação em (1→3,6)-Glc. As manoproteínas desta fração são compostas por 5,8 % mol de manose em ligação (1→2) com 7,1 % mol de resíduos ramificados, principalmente em (1→2,6)-Man (4,6 % mol) e 7,3 % mol de terminais manose. O rácio entre a (1→2,6)-Man e a manose total corresponde a 1 ramificação por cada 5 resíduos de manose que indica a presença de manoproteínas menos ramificadas na parede interna da célula da levedura *S. pastorianus* Lager.

A *S. pastorianus* Carls (2 ciclos fermentativos) apresenta maior percentagem molar de glucose em ligação (1→3) que a *S. pastorianus* Lager (6 ciclos fermentativos) e esta em

contrapartida apresenta maior percentagem molar de glucose em ligação (1→4) que a *S. pastorianus* Carls, isto pode dever-se ao stress cervejeiro que induz a diminuição das glucanas em ligação (1→3) e o aumento das glucanas em ligação (1→4) [14]. As glucanas (1→4) da parede externa da levedura *S. pastorianus* Carls são mais ramificadas (15 em 15 resíduos de (1→4)-Glc há uma ramificação em (1→4,6)-Glc) que as glucanas (1→4) da *S. pastorianus* Lager (19 em 19 resíduos de (1→4)-Glc há uma ramificação em (1→4,6)-Glc). O que vai de encontro a um estudo realizado, que indica que o aumento do glicogénio de reserva, que neste caso se verifica devido à reutilização, diminui o grau de ramificação do glicogénio [87]. Relativamente às glucanas da parede interna da célula de levedura verificou-se que as glucanas em (1→3) são mais ramificadas na *S. pastorianus* Lager (11 em 11 resíduos de (1→3)-Glc há uma ramificação em (1→3,6)-Glc) que na *S. pastorianus* Carls (14 em 14 resíduos de (1→3)-Glc há uma ramificação em (1→3,6)-Glc). Já as glucanas em (1→4) da parede interna da célula apresentam um grau de ramificação similar ao glicogénio por estar no intervalo de ramificação esperado (7 a 10 resíduos de glucose) [82]. Em ambas as leveduras de 10 em 10 resíduos de (1→4)-Glc há uma ramificação em (1→4,6)-Glc, o que vai ao encontro de um outro trabalho que mostra um rácio semelhante para *S. pastorianus*, 1 ramificação para cada 8 resíduos de glucose em (1→4) [14].

Ambas as leveduras *S. pastorianus* apresentam manose cujas ligações glicosídicas mais elevadas são a (1→2)-Man e (1→2,6)-Man. As manoproteínas da superfície da parede celular da *S. pastorianus* Lager são mais ramificadas (1 ramificação por 3 resíduos de manose) que as manoproteínas da superfície da parede celular da *S. pastorianus* Carls (1 ramificação por cada 4 resíduos de manose). As manoproteínas da parede externa de ambas as *S. pastorianus* são muito ramificadas com 1 ramificação por cada 3 resíduos de manose enquanto as manoproteínas da parede interna são menos ramificadas com 1 ramificação por 5 resíduos de manose.

De acordo com a figura 10 e a tabela 3 a extração com água permitiu extrair no caso das duas leveduras da espécie *S. cerevisiae* maior quantidade de glucose, enquanto nas duas leveduras da espécie *S. pastorianus* a extração com água permitiu extrair mais manose que glucose tal como se obteve num estudo realizado usando a *S. pastorianus* em que a extração com água quente permitiu a extração de elevado conteúdo de manoproteínas e baixo teor de glucanas [14]. A glucose extraída nas leveduras *S. cerevisiae* apresenta-se em ligação (1→4) e com ramificados em ligação (1→4,6) (figura 10) que correspondem a

ligações típicas do glicogénio [83]. No caso das leveduras *S. pastorianus* a manose extraída é maioritariamente em ligação (1→2), terminal e (1→2,6)-Man (tabela 3) que correspondem a manoproteínas [85]. As manoproteínas da superfície da parede celular são mais ramificadas (1 ramificação por 3 resíduos de manose) nas leveduras *S. cerevisiae* Ale e *S. pastorianus* Lager, com 3 e 6 ciclos fermentativos, respetivamente. Na *S. pastorianus* o perfil de ramificação das manoproteínas é alterado devido ao stress cervejeiro em que no inóculo inicial as manoproteínas têm 1 ramificação para cada 6 resíduos de manose e na levedura excedentária as manoproteínas têm 1 ramificação por cada 3 resíduos de manose [14]. As manoproteínas da superfície da parede celular das leveduras não reutilizadas ou menos reutilizadas *S. cerevisiae* Weiss (1 ciclo fermentativo) e *S. pastorianus* Carls (2 ciclos fermentativos) são menos ramificadas pois apresentam 1 ramificação por cada 4 resíduos de manose, um valor intermédio entre o inóculo e as mais reutilizadas.

Relativamente à extração assistida por micro-ondas os extratos solúveis obtidos das leveduras *S. pastorianus* são ricos em manose, com ligações glicosídicas típicas das manoproteínas ((1→2)-Man, terminal-Man e (1→2,6)-Man) (tabela 3), e ricos em glucose no caso das leveduras *S. cerevisiae* cujas ligações glicosídicas são maioritariamente (1→4)-Glc e (1→4,6)-Glc na *S. cerevisiae* Ale e (1→4)-Glc, (1→4,6)-Glc, (1→3)-Glc e (1→6)-Glc na *S. cerevisiae* Weiss (figura 10). Ou seja, na *S. cerevisiae* Weiss extrai-se quantidades equimolares de glicogénio e β-glucanas enquanto na *S. cerevisiae* Ale extrai-se principalmente glicogénio. As glucanas (1→4) da parede externa da célula de levedura são mais ramificadas nas leveduras *S. cerevisiae* que nas *S. pastorianus*. Já as manoproteínas da parede externa das leveduras são muito ramificadas em todas as leveduras com 1 ramificação por cada 3 resíduos de manose.

Os resíduos insolúveis são ricos em glucose em todas as leveduras nomeadamente em glucose em ligação (1→3) e (1→4). As glucanas (1→3) da parede interna da *S. cerevisiae* Ale e *S. pastorianus* Lager apresentam o mesmo perfil de ramificação (11 em 11 resíduos de (1→3)-Glc há uma ramificação em (1→3,6)-Glc) assim como as glucanas (1→4) (10 em 10 resíduos de (1→4)-Glc há uma ramificação em (1→4,6)-Glc). A *S. cerevisiae* Weiss apresenta as glucanas (1→4) mais ramificadas que as glucanas das restantes leveduras sendo que as glucanas (1→3) são menos ramificadas que as outras leveduras em estudo. O glicogénio da parede celular pode ser três vezes superior ao glicogénio citosólico. [83]. O glicogénio da parede celular forma complexos αβ-glucanas

que correspondem ao glicogénio ligado covalentemente às β -glucanas, ou seja, o glicogénio está ligado às $\beta(1\rightarrow6)$ e estas por sua vez ligadas às $\beta(1\rightarrow3)$ criando-se uma rede de ligações que causa insolubilidade [13,88]. A presença de glicogénio na parede celular é importante para fenómenos de osmotolerância e para a manutenção da viabilidade celular pois os níveis deste aumentam na parede celular até 8% (v/v) de etanol.[51]

Os ciclos de reutilização parecem também influenciar a composição da parede celular das leveduras uma vez que os ciclos de reutilização aumentam o teor de glucose em ligação (1 \rightarrow 4) na parede celular e diminuem a glucose em ligação (1 \rightarrow 3) (figura 10). Tal como já tinha sido observado para a levedura *S. pastorianus* [14] em que o teor de glucose em ligação (1 \rightarrow 3) diminuía cerca de 2 vezes com os ciclos de reutilização e que o teor de glucose em ligação (1 \rightarrow 4) aumenta cerca de 3 vezes. Neste caso em concreto verifica-se a mesma tendência mas em proporções diferentes. Relativamente à *S. cerevisiae* verifica-se que a reutilização diminui seis vezes a percentagem das ligações (1 \rightarrow 3)-Glc e aumenta vinte e cinco vezes a percentagem das ligações (1 \rightarrow 4)-Glc. No caso da *S. pastorianus* verificou-se que as ligações (1 \rightarrow 3)-Glc diminuem duas vezes com os ciclos de reutilização, e que as ligações (1 \rightarrow 4)-Glc incrementam duas vezes mais com reutilizações.

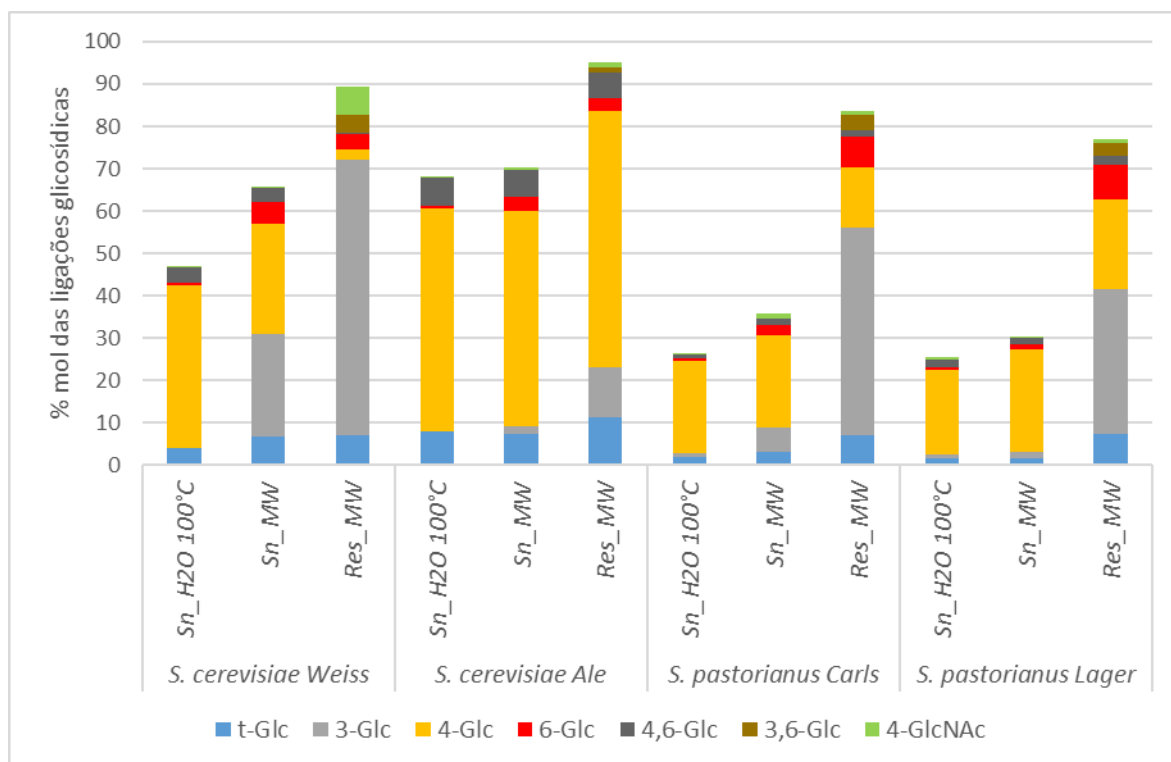


Figura 10 - Ligações glicosídicas das glucanas e quitina das frações Sn_H₂O, Sn_MW e Res_MW das leveduras *S. cerevisiae* Weiss, *S. cerevisiae* Ale, *S. pastorianus* Carls e *S. pastorianus* Lager.

3.1.3. Hidrólise enzimática das ligações (1→4)-Glc

A fim de se conhecer qual a conformação anomérica dos resíduos de glucose em ligação (1→4) recorreu-se à hidrólise enzimática, do Res_MW das quatro leveduras com uma α -amilase e uma celulase. A tabela 4 mostra as ligações glicosídicas obtidas após hidrólise para as quatro leveduras em estudo.

Tabela 4: Ligações glicosídicas após hidrólise enzimática com α -amilase e celulase ao resíduo de extração aquosa assistida por micro-ondas das leveduras *S. cerevisiae* Weiss, *S. cerevisiae* Ale, *S. pastorianus* Carls e *S. pastorianus* Lager.

Ligações Glicosídicas	<i>S. cerevisiae</i> Weiss			<i>S. cerevisiae</i> Ale			<i>S. pastorianus</i> Carls			<i>S. pastorianus</i> Lager		
	Res_MW	α -amilase	celulase	Res_Mw	α -amilase	celulase	Res_MW	α -amilase	celulase	Res_MW	α -amilase	celulase
t-Ara	0,2	0,4	0,4	0,5	2,2	0,7	0,4	0,8	0,6	0,1	0,3	0,1
Total	0,2	0,4	0,4	0,5	2,2	0,7	0,4	0,8	0,6	0,1	0,3	0,1
t-Man	2,8	2,5	2,5	1,6	4,2	1,5	4,9	5,2	2,4	7,3	7,7	4,0
3-Man	0,6	0,2	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,8	0,1	0,1
2-Man	1,8	2,4	2,3	1,2	2,6	1,1	3,6	3,9	2,2	5,8	5,0	3,9
4-Man	0,1	0,3	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1
6-Man	0,3	0,4	0,3	0,1	1,6	0,2	0,5	0,5	0,2	0,6	0,8	0,8
3,4-Man	0,5	0,4	0,4	0,1	0,6	0,6	0,3	0,4	0,5	0,3	0,5	0,8
2,3-Man	1,3	1,3	1,4	0,3	0,1	0,8	1,5	1,9	1,3	1,6	2,9	2,9
2,4-Man	-	-	-	0,2	0,2	0,4	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
2,6-Man	1,7	1,7	0,3	0,6	3,3	1,0	2,7	3,5	1,1	4,6	5,7	4,2
3,6-Man	0,2	0,3	0,4	0,1	0,8	0,2	0,4	1,7	0,3	0,5	0,7	0,4
2,3,6-Man	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3,4,6-Man	0,6	2,3	1,6	0,2	0,6	0,5	0,6	0,9	1,1	0,4	0,6	0,7
Total	10,0	11,8	9,6	4,7	14,3	6,4	14,8	18,4	9,4	22,1	24,2	17,9
t-Glc	7,1	7,8	6,4	11,1	7,8	9,8	6,9	6,6	6,4	7,2	7,2	6,8
3-Glc	64,9	58,5	61,3	11,8	33,9	21,1	49,2	53,3	66,6	34,3	42,2	51,0
4-Glc	2,4	2,0	2,1	60,8	16,5	49,0	14,2	7,4	7,1	21,4	8,4	9,8
6-Glc	3,7	3,0	1,5	2,9	9,2	2,5	7,4	7,4	2,1	8,0	10,1	4,2
2,3-Glc	0,1	0,0	0,1	0,5	2,4	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,2	0,1
2,4-Glc	-	-	-	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
4,6-Glc	0,3	0,1	3,7	6,1	2,9	7,4	1,4	0,2	0,3	2,2	0,6	1,5
3,6-Glc	4,4	3,4	1,7	1,1	4,0	1,1	3,5	2,1	3,6	3,0	4,2	3,4
2,3,4,6-Glc	0,4	0,5	0,2	0,3	4,1	0,5	1,0	1,8	1,8	0,8	1,3	3,5
Total	83,3	75,3	76,7	94,8	80,9	91,4	83,7	78,9	87,9	76,9	74,2	80,4
4-GlcNAc	6,6	12,4	13,3	1,1	2,6	1,5	1,1	1,9	2,2	0,9	1,4	1,6
Total	6,6	12,4	13,3	1,1	2,6	1,5	1,1	1,9	2,2	0,9	1,4	1,6
%Hidrólise	-	18	15	-	73	19	-	48	50	-	61	54

O tratamento com a α -amilase levou à diminuição da percentagem molar de glucose em ligação (1→4) em todas as leveduras em estudo. No caso da *S. cerevisiae* Weiss, que tem um ciclo fermentativo, o tratamento com a α -amilase levou à diminuição das ligações de (1→4)-Glc de 2,4 % mol para 2,0 % mol o que corresponde a 18 % de hidrólise de resíduos em ligação (α 1→4). Relativamente à *S. cerevisiae* Ale, que tem dois ciclos fermentativos, verificou-se que a α -amilase hidrolisou 73 % de resíduos em ligação (α 1→4) uma vez que diminuiu a glucose em ligação (1→4) de 60,8 % mol para 16,5 % mol. A *S. pastorianus* Carls quando hidrolisada pela α -amilase perdeu 48 % de glucose em ligação (α 1→4) com uma perda de glucose em ligação (1→4) de 14,2 % mol para 7,8 % mol. Já a *S. pastorianus* Lager perdeu com a hidrólise da α -amilase 61 % de resíduos de glucose em ligação (1→4) que diminuiu de 21,4 % molar para 10,1 % molar.

O tratamento com celulase levou uma pequena diminuição da percentagem molar de glucose em ligação (1→4) nas *S. cerevisiae* e a uma grande diminuição da percentagem molar de glucose em ligação (1→4) nas *S. pastorianus*. As ligações glucose (1→4) da *S. cerevisiae* Weiss, que tem um ciclo fermentativo, foram hidrolisadas pela celulase tendo sofrido uma diminuição de 2,4 % mol para 2,1 % mol, o que correspondeu a 15 % de hidrólise. Relativamente à *S. cerevisiae* Ale, que tem três ciclos fermentativos, verificou-se que a celulase hidrolisou 19 % de resíduos em ligação (β 1→4) uma vez que diminuiu a glucose em ligação (1→4) de 60,8 % mol para 49,0 % mol. A *S. pastorianus* Carls que tem 2 ciclos fermentativos, quando hidrolisada pela celulase perdeu 50 % de glucose em ligação (β 1→4) com uma perda de glucose em ligação (1→4) de 14,2 % mol para 7,1 % mol. Já a *S. pastorianus* Lager perdeu com a hidrólise da celulase 54 % de resíduos de glucose em ligação (1→4) que diminuiu de 21,4 % molar para 9,8 % molar.

De acordo com a figura 11 verifica-se que a hidrólise das ligações (1→4)-Glc não é total na *S. cerevisiae* Weiss uma vez que a percentagem molar de (1→4)-Glc presente é relativamente reduzida (2,4 % mol) quando comparada com a percentagem molar de (1→3) (64,9 % mol) que poderá ter impedido o acesso das enzimas utilizadas para hidrolisar as ligações (1→4). Na *S. cerevisiae* Ale apresenta maior % mol de glucose em ligação (α 1→4) (3/4) do que (β 1→4) (1/5) apesar da hidrólise das glucanas (1→4) não ter sido total. Esta levedura apresenta menor quantidade de glucanas em ligação (1→3) como se pode verificar na figura 11. Relativamente à *S. pastorianus* Carls a hidrólise enzimática das ligações glucose (1→4) foi praticamente total pelo que as (α 1→4)-Glc correspondem a

1/2 assim como as ($\beta 1 \rightarrow 4$). No caso da *S. pastorianus* Lager as ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-Glc e as ($\beta 1 \rightarrow 4$) correspondem igualmente a 1/2. A percentagem molar de glucose em ligação ($1 \rightarrow 3$) é maior na *S. pastorianus* Carls que na *S. pastorianus* Lager como se pode verificar na figura 11.

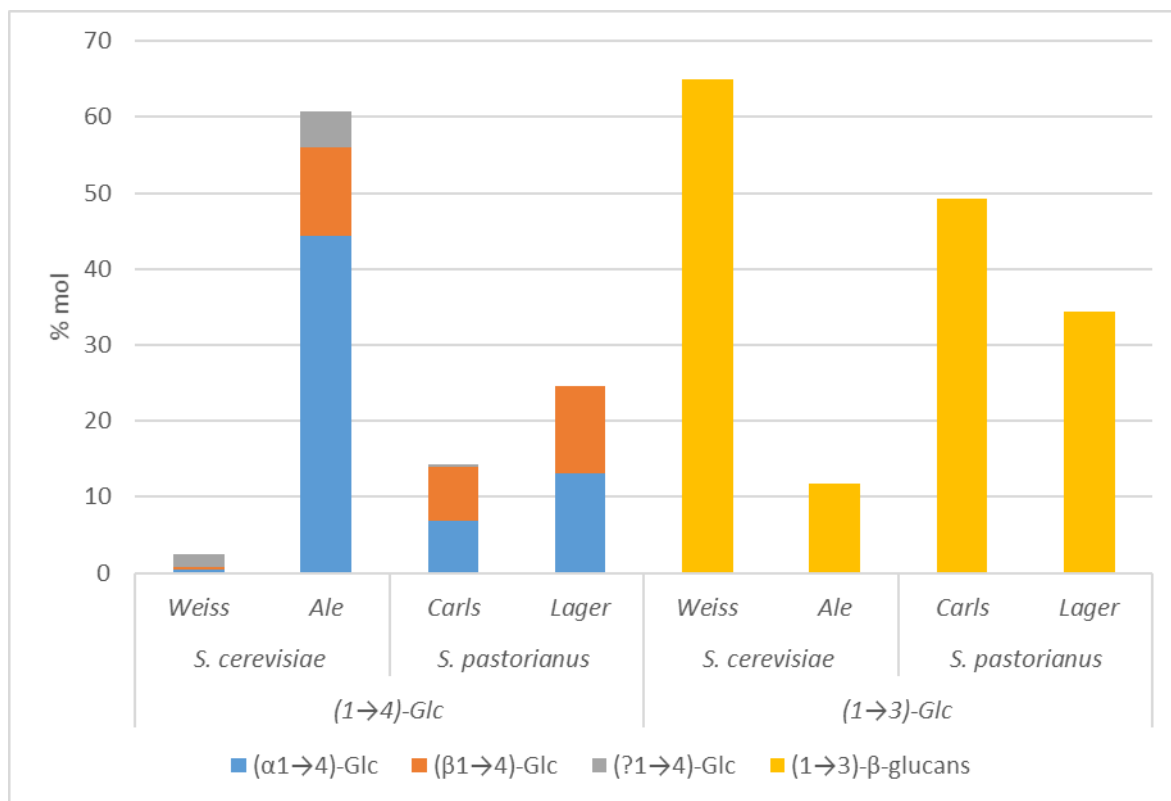


Figura 11 - Percentagem molar de ($\alpha 1 \rightarrow 4$), ($\beta 1 \rightarrow 4$) e ($1 \rightarrow 3$)-Glc nas leveduras em estudo. O ($?1 \rightarrow 4$)-Glc corresponde à percentagem de ($1 \rightarrow 4$) cuja configuração anomérica não foi identificada.

Quando se faz a hidrólise com a α -amilase verifica-se que há diminuição para além das ligações ($1 \rightarrow 4$)-Glc das ligações ($1 \rightarrow 4,6$) em todas as leveduras o que seria de esperar visto que se hidrolisa o glicogénio em ($\alpha 1 \rightarrow 4$) formando-se pequenos segmentos constituídos pelas ligações ($1 \rightarrow 4,6$)-Glc, típicas do glicogénio (Figura 12 e tabela 4). No caso de ambas as *S. pastorianus* verifica-se que quando se hidrolisa com a celulase para além de diminuírem as ligações ($1 \rightarrow 4$)-Glc também diminuem as ligações ($1 \rightarrow 6$) e ($1 \rightarrow 4,6$) glucose. Este resultado leva-nos a colocar a hipótese de que às ($\beta 1 \rightarrow 4$) estão ligadas as ($\beta 1 \rightarrow 6$), assim sendo quando se hidrolisam as ($\beta 1 \rightarrow 4$) os fragmentos possivelmente ramificados difundem pela membrana de diálise. No entanto, estes complexos ($\beta 1 \rightarrow 4$)-Glc/ ($\beta 1 \rightarrow 6$)-Glc não estão descritos na literatura. Uma das formas de confirmar seria com recurso ao RMN nomeadamente ao HSQC que nos iria relacionar a

interação do carbono com o próton e permitiria saber qual a conformação dos complexos de glucanas. Para além disso, também se verifica que a hidrólise com a celulase leva à diminuição das manoproteínas nomeadamente em ligação (1→2)-Man e terminal de manose (tabela 4). Estes resultados podem explicar-se pelo fato de as manoproteínas estarem covalentemente ligadas às glucanas em ligação (β1→6) [89], uma vez que estas diminuem com a hidrólise com a celulase, consequentemente pequenas sequências oligossacarídicas que estejam ligadas às glucanas (β1→6) poderão difundir pela manga de diálise. As manoproteínas que estão ligadas às glucanas em ligação (β1→6)-Glc são compostas por di-, tri, ou tetrassacarídeos de (1→2)-Man [89]. O que justifica a diminuição de (1→2)-Man e terminal de manose com a hidrólise com a celulase.

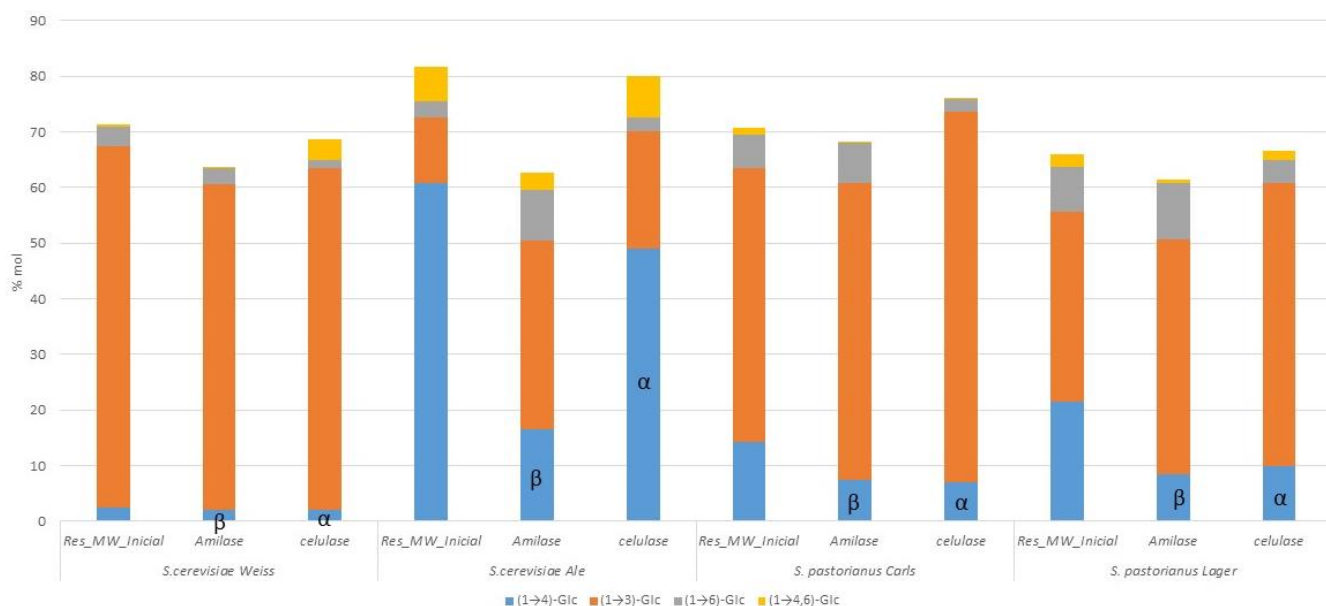


Figura 12 - Ligações glicose (1→4), (1→3), (1→6) e (1→4,6) no Res_MW_Inicial, após hidrólise enzimática com a α -amilase e celulase nas leveduras em estudo.

De uma forma geral as glucanas em ligação (1→4) são principalmente em conformação (α 1→4) pelo que as glucanas em conformação (β 1→4), no caso das *S. cerevisiae* corresponde a uma pequena parte do total das glucanas (1→4) enquanto que nas *S. pastorianus* as glucanas (1→4) em conformação β correspondem a cerca de metade do total das glucanas (1→4).

Na *S. cerevisiae* o aumento do número de ciclos fermentativos incrementa mais as ligações de glicose (α 1→4) que as ligações de glicose em (β 1→4) (figura 13). No que diz respeito à *S. pastorianus* o aumento dos ciclos fermentativos aumenta ligeiramente e

aproximadamente na mesma proporção a percentagem de ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) e ($\beta 1 \rightarrow 4$)-Glc (figura 13).

Desta forma, conclui-se que, as ligações ($\beta 1 \rightarrow 4$), do tipo celulose, não são características da espécie/estirpe mas podem no caso das *S. cerevisiae* estar relacionadas com o número de ciclos fermentativos. No caso da *S. pastorianus* verifica-se que a partir de um determinado número de reutilizações as ligações ($\beta 1 \rightarrow 4$)-Glc não incrementam mais. No entanto, de acordo com a literatura, as ligações glucose ($\beta 1 \rightarrow 4$) aumentam do inóculo inicial para a levedura excedentária o que indica que a reutilização incrementa este tipo de ligações glucose [14]. Este tipo de polímero já foi encontrado na parede celular de um fungo, *Phytophthora cinnamomi*, no qual cerca de 10 % das ligações glucose ($1 \rightarrow 4$) correspondiam à porção não celulósica das paredes celulares [90].

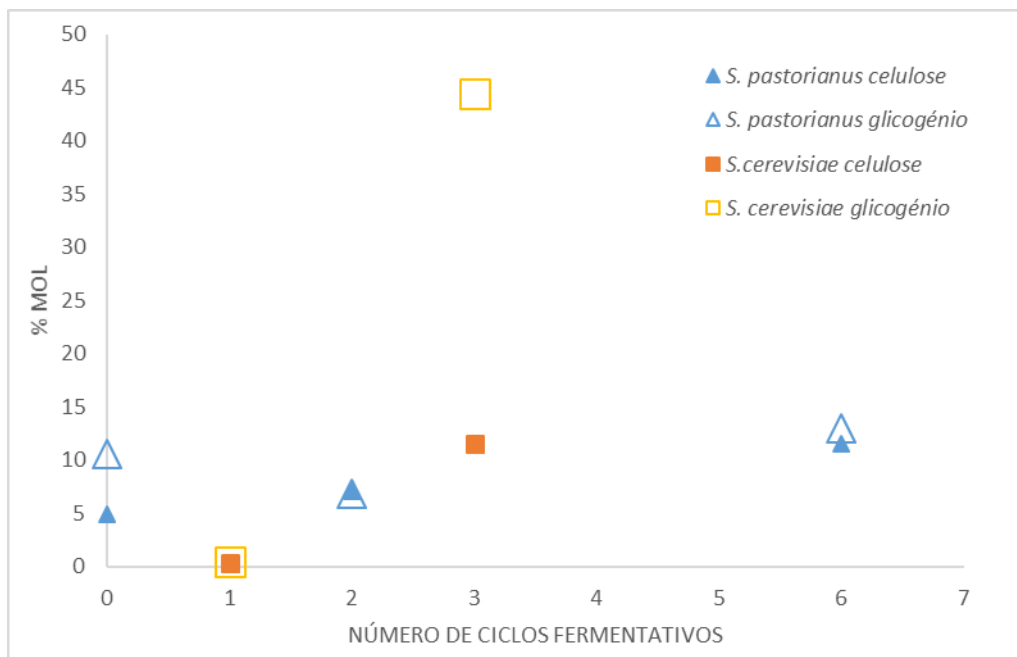


Figura 13 - Gráfico que relaciona o número de ciclos fermentativos com a % molar de ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) e ($\beta 1 \rightarrow 4$) nas *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*. Na *S. pastorianus* usámos uma referência que é o inóculo inicial [14].

3.1.4. Pesquisa de Homologia

Como foi possível verificar no tópico anterior, as leveduras são constituídas por resíduos de glucose em ligação (1→4) que podem ter conformação anomérica α ou β , não se sabendo qual a enzima responsável pela síntese das ligações (β 1→4) que já foram descritas como constituintes da parede celular da levedura *S. pastorianus* [14,25]. Para isso recorreu-se a ferramentas bioinformáticas para se procurar no genoma da *S. cerevisiae*, que está mais sequenciado, a sequência de uma celulose sintase. Iniciou-se a pesquisa comparando a sequência da proteína celulose sintase de vários organismos diferentes para se perceber se a sequência desta proteína era muito diferente entre os diferentes organismos onde ela existe (figura 14).

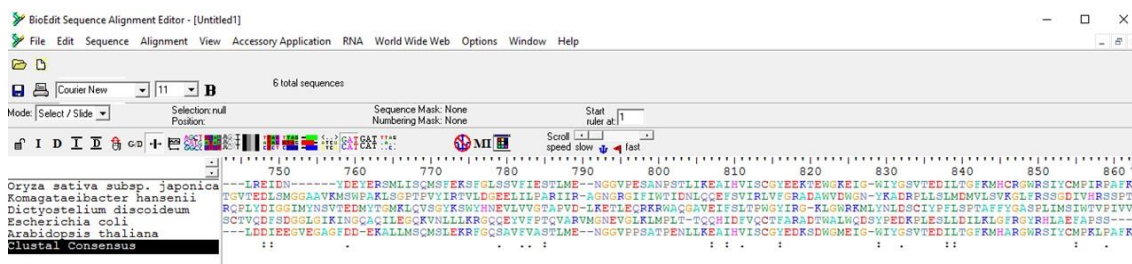


Figura 14 - Alinhamento de sequências de diferentes celulose sintase de organismos diferentes [80].

Recorrendo ao *BioEdit* [80] fez-se o alinhamento de sequências de celulose sintase de organismos diferentes e constatou-se que não há conservação da sequência da proteína entre organismos. Desta forma, a sequência desta proteína é muito diferente em todos os organismos. Apesar de se ter verificado que as sequências de celulose sintase são muito distintas de organismo para organismo comparou-se a sequência da celulose sintase mais comum, de uma espécie de eucaliptos (*Eucalyptus globulus*), com o genoma da *S. cerevisiae* e da *S. pastorianus*. Para isso recorreu-se a uma ferramenta bioinformática, o *Blast* [81], em que se conclui que não há homologia. Pois, não se encontra similaridade significativa no genoma da *S. cerevisiae* e da *S. pastorianus*. A pesquisa de homologia da celulose sintase de uma bactéria acidófila (*Acidobacterium capsulatum*) também foi procurada no genoma da levedura, tendo-se concluído que não existe similaridade da sequência no genoma das duas leveduras em estudo tendo-se verificado que não há homologia com o genoma da *S. cerevisiae* e da *S. pastorianus*. Quando se recorre ao *Blast*

[81] para se procurar a sequência da celulose sintase de *Pseudozyma hubeiensis*, que é a celulose sintase que se encontra sequenciada proveniente de uma levedura, considerando-se este o organismo mais próximo filogeneticamente da *S. cerevisiae*, verifica-se que esta sequência não se encontra no genoma da *S. cerevisiae* (figura 15). De acordo com a figura 15 o *E-value* não é próximo de zero e os alinhamentos que surgem dizem respeito a outras proteínas.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome VIII, complete sequence	30.4	30.4	8%	2.0	28%	NC_001140.6
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome XVI, complete sequence	30.4	30.4	8%	2.1	28%	NC_001148.4
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome X, complete sequence	30.4	30.4	8%	2.1	28%	NC_001142.9

Figura 15 - Pesquisa da sequência da celulose sintase da *Pseudozyma hubeiensis* no genoma da *S. cerevisiae* [81].

No entanto, ainda se comparou a sequência da celulose sintase, da *Pseudozyma hubeiensis* próxima da *S. cerevisiae*, com a sequência de glucana sintase tendo-se verificado que não há homologia por não haver conservação entre as sequências.

Para se conhecer qual o gene responsável pela síntese das ligações ($\beta 1 \rightarrow 4$)-Glc seria sujeitar a *S. pastorianus* ao stress cervejeiro porque esta característica parece estar a ser mais expressa em condições de stress. Comparando o genoma do inóculo e da levedura submetida a vários ciclos fermentativos para se observar onde há deleção ou sobre-expressão de genes. Outra forma de tentar pesquisar a sequência da celulose responsável pela síntese das ($\beta 1 \rightarrow 4$)-Glc na *S. pastorianus* será recorrendo à pesquisa da sequência no genoma da *S. bayanus* uma vez que a *S. pastorianus* resulta da hibridação entre a *S. cerevisiae* e a *S. bayanus* e como de acordo com os resultados obtidos as *S. cerevisiae* não têm grandes quantidades de ($\beta 1 \rightarrow 4$)-Glc na parede celular pelo que esta característica na *S. pastorianus* terá sido ‘herdada’ do genoma da *S. bayanus*.

3.1.5. Análise microscópica – SEM

Para avaliar a estrutura tridimensional e a porosidade obtida no resíduo da extração aquosa assistida por micro-ondas das leveduras, recorreu-se à microscopia eletrónica de varrimento (SEM). Pela observação da figura 16 verifica-se que nas leveduras *S. cerevisiae* a extração aquosa assistida por micro-ondas já destruiu a estrutura tridimensional de algumas células comparativamente com as leveduras *S. pastorianus* o que pode indicar que as paredes celulares das células da levedura *S. cerevisiae* são menos resistentes.

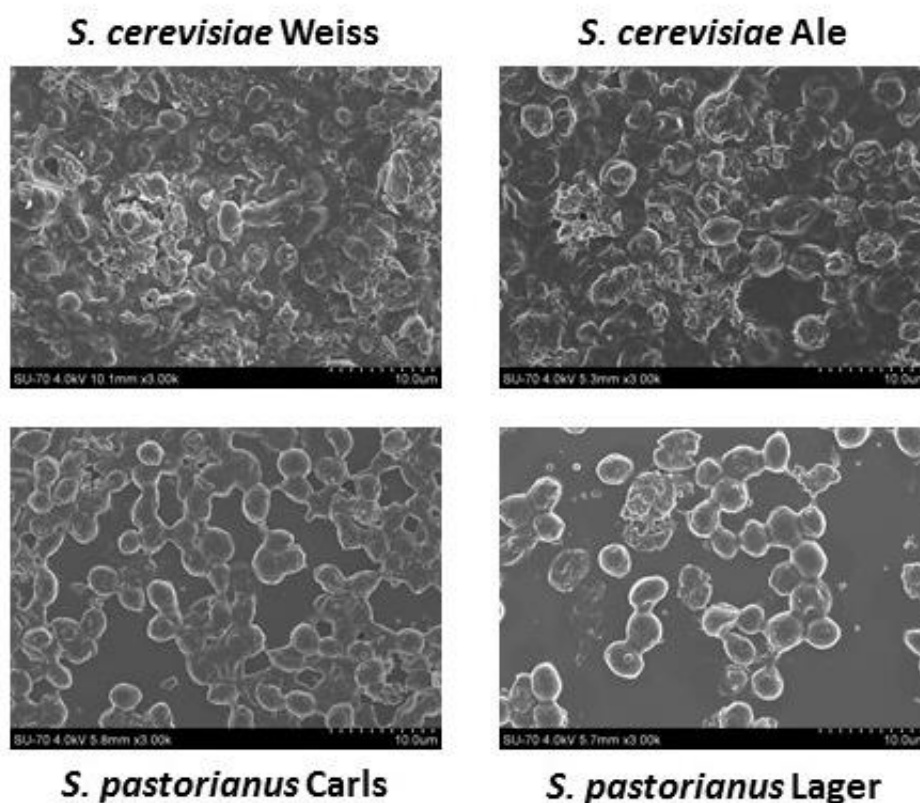


Figura 16 - Fotografias obtidas por microscopia de varrimento a 4 kV, ampliadas 3000x do resíduo insolúvel da extração aquosa assistida por micro-ondas às leveduras em estudo.

As figuras seguintes mostram a estrutura tridimensional das quatro leveduras obtida após extração aquosa assistida por micro-ondas (Res_MW_Final), após hidrólise enzimática com a α -amilase ao resíduo insolúvel obtido após extração com micro-ondas (Res_MW_Final + α -amilase) e após hidrólise enzimática com a celulase ao resíduo insolúvel obtido após extração com micro-ondas (Res_MW_Final + celulase). Pela

observação da figura 17 verifica-se que, após a extração aquosa assistida por micro-ondas dos polissacarídeos da parede celular, a levedura mantém a sua estrutura tridimensional, sendo esta constituída por uma rede de glucanas e manoproteínas [13].

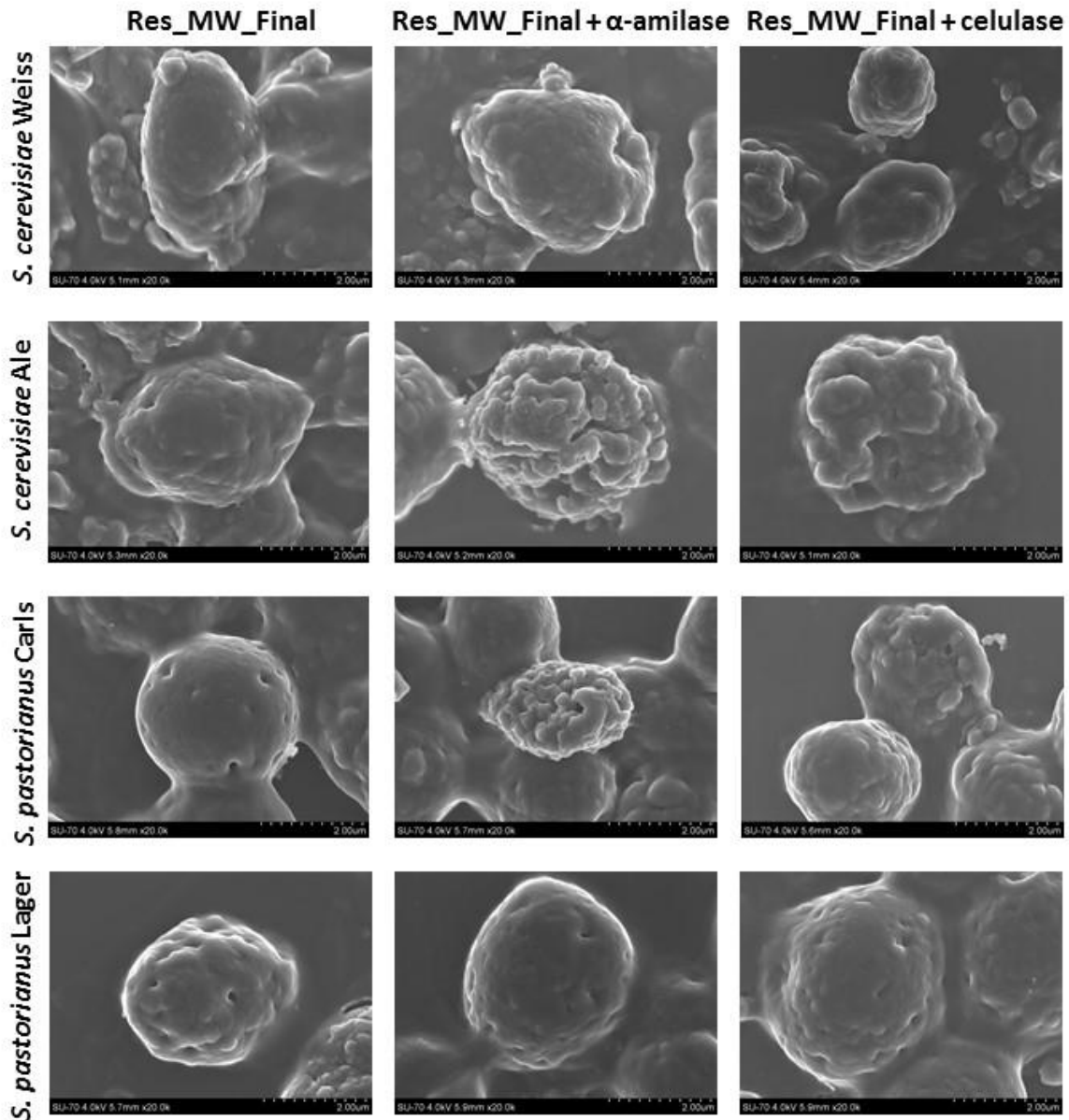


Figura 17 - Fotografias obtidas por microscopia de varrimento a 4 kV, ampliadas 20000x, ao resíduo insolúvel da extração aquosa assistida por micro-ondas, ao resíduo insolúvel da extração aquosa assistida por micro-ondas mais a α -amilase e ao resíduo insolúvel da extração aquosa assistida por micro-ondas mais celulase das leveduras em estudo.

No que diz respeito à *S. cerevisiae* Weiss verificou-se que a extração aquosa assistida por micro-ondas dos polissacarídeos da parede celular permitiu a manutenção da estrutura tridimensional da levedura, após hidrólise com a α -amilase e celulase as paredes celulares mantiveram-se com a mesma aparência, pelo fato desta levedura apresentar uma pequena percentagem de (1 \rightarrow 4)-Glc não sendo significativa a ação das enzimas.

Relativamente à *S. cerevisiae* Ale após a hidrólise das ligações (α 1 \rightarrow 4)-Glc com a α -amilase a sua estrutura tridimensional manteve-se, mas a sua superfície ficou parcialmente degradada, tendo um aspeto visual rugoso com uma aparência similar a “erosão” devido à ação enzimática, o que era de esperar visto que se obteve uma percentagem de hidrólise das ligações (1 \rightarrow 4)-Glc de 73 %. A hidrólise com a celulase também alterou a superfície da parede celular da levedura mas observa-se menos locais de “erosão” (figura 17), estando de acordo com os resultados da tabela 4 onde a percentagem de hidrólise das ligações (1 \rightarrow 4)-Glc foi menor (19%).

A *S. pastorianus* Carls após hidrólise com a α -amilase também alterou a sua superfície, deixou de apresentar uma superfície lisa para uma mais erodida, o mesmo também se verificou com a hidrólise enzimática com a celulase. Como a percentagem de hidrólise das ligações (1 \rightarrow 4)-Glc foi de 48 % com a α -amilase e 50 % com a celulase as imagens de SEM podem indicar que as ligações (α 1 \rightarrow 4)-Glc estão mais à superfície por vermos mais irregularidades, enquanto que as ligações (β 1 \rightarrow 4)-Glc estarão mais na parte interna, tendo em conta que em termos percentuais são equivalentes e foi observado menos extensão da erosão na superfície celular.

A *S. pastorianus* Lager após hidrólise enzimática com ambas as enzimas parece não alterar muito a superfície da célula uma vez que a superfície apresenta irregularidades de uma forma mais homogénea, o que pode indicar que quer as ligações (α 1 \rightarrow 4)-Glc quer as ligações (β 1 \rightarrow 4)-Glc se encontram mais distribuídas pela parede e também num nível mais interno da parede celular. Como a estrutura tridimensional não é destruída após a hidrólise enzimática, quer dizer que as ligações (α 1 \rightarrow 4)-Glc e (β 1 \rightarrow 4)-Glc são ambas responsáveis pela manutenção da microcápsula de levedura pois já se tinha verificado que a hidrólise enzimática sequencial com ambas as enzimas tinha destruído a estrutura das células de levedura na *S. pastorianus* [14].

Para além disso parece que foi observado o surgimento orifícios na superfície de algumas leveduras. Na parede celular das leveduras *S. pastorianus* verifica-se que há

formação de orifícios com diâmetro ligeiramente inferiores a 200 nm tanto na *S. pastorianus* Lager como na *S. pastorianus* Carls (figura 18). A presença destes orifícios, na estrutura tridimensional ainda mantida, poderia ser útil para a incorporação de nanopartículas. Experimentalmente ainda se tentou incorporar nano partículas de prata no interior destas microcápsulas recorrendo à pressão exercida dentro do reator do micro-ondas. No entanto, os resultados obtidos foram inconclusivos uma vez que recorrendo à microscopia eletrônica de transmissão (TEM), não se obteve contraste suficiente entre as nano partículas e a levedura, não foi possível verificar se as nano partículas de prata tinham entrado para o interior das leveduras.

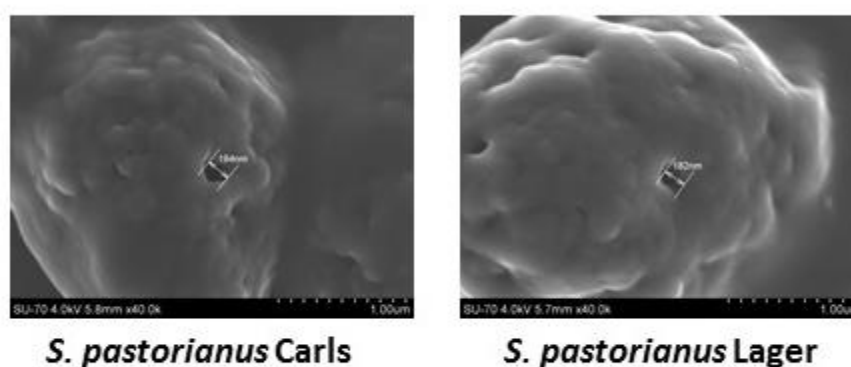


Figura 18 - Fotografias obtidas por microscopia de varrimento a 4 kV, ampliadas 40000x com a medição dos orifícios na *S. pastorianus* Carls e *S. pastorianus* Lager.

3.1.6. Valorização das leveduras

A indústria cervejeira usa diferentes espécies de leveduras *Saccharomyces* para a produção de cerveja. Duas das leveduras mais usadas são a *S. pastorianus* e a *S. cerevisiae*. Nesta dissertação foram estudadas duas *S. cerevisiae*, a Weiss com um ciclo fermentativo e a Ale com três ciclos fermentativos, e duas *S. pastorianus*, a Carls com dois ciclos fermentativo e a Lager com seis ciclos fermentativos. A levedura após ser usada é descartada e denominada de levedura excedentária da cerveja que corresponde a um subproduto desta indústria. Este subproduto é fonte de polissacarídeos que podem ser incorporados em alimentos.

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que as duas leveduras *S. cerevisiae* são uma fonte de glucanas extratáveis com água, enquanto que, os extratos das duas *S. pastorianus* são mais ricos em manoproteínas. Dependendo do número de reutilizações as leveduras *S. cerevisiae* são fonte de glucose em ligação (1→3) ou ligação (1→4), sendo que a *S. cerevisiae* Weiss que não é reutilizada contém mais glucose em ligação (1→3) que a *S. cerevisiae* Ale que tem três ciclos fermentativos.

Desta forma a levedura excedentária da cerveja apresenta grande variabilidade dependendo da estirpe/espécie da levedura e ainda do número de ciclos fermentativos a que está sujeita. A levedura ao apresentar diferente composição química permite em função da espécie e reutilização que os seus extratos aquosos sejam ricos em manoproteínas ou β -glucanas, podendo ser valorizados como ingrediente alimentar em diferentes aplicações, em que as manoproteínas podem ser usadas como emulsificantes e as β -glucanas como fibra dietética com atividades biológicas [91].

Para além disso quando se extraem os polissacarídeos da parede celular a estrutura desta mantém a sua forma tridimensional fazendo lembrar uma microcápsula que poderá ser usada para a incorporação de compostos que podem ser usados na área alimentar ou clinica.

4. Conclusões

A indústria cervejeira usa diferentes espécies de leveduras *Saccharomyces* para a produção de cerveja. Duas das leveduras mais usadas são a *S. cerevisiae* e a *S. pastorianus* que são normalmente reutilizadas em 1-7 ciclos fermentativos sofrendo transformações ao longo do processo cervejeiro. Neste trabalho pretendeu-se conhecer a estrutura e tipos de ligações glicosídicas das glucanas e manoproteínas que constituem a parede celular das leveduras *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*, submetidas a ciclos de reutilização, para se perceber se as alterações estruturais observadas na parede celular estão relacionadas com a espécie ou com a sua reutilização. Os resultados mostram que o stress cervejeiro altera a estrutura e o tipo de polissacarídeos nas leveduras *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* e essas alterações não dependem da espécie nem da estirpe. Verifica-se que há um aumento da proporção de glicogénio e de polímeros semelhantes à celulose na parede celular das leveduras com o stress cervejeiro. A proporção em que estes aumentam varia entre as espécies de levedura cervejeira. O glicogénio aumenta numa proporção muito superior à celulose na *S. cerevisiae* (73 %) comparativamente à *S. pastorianus* que apresenta uma proporção de 50 % entre os dois polímeros. Atendendo às diferenças na estrutura e composição dos polissacarídeos da parede celular das diferentes leveduras, é possível obter polissacarídeos diferentes com o tipo de levedura e extração utilizados. Assim, os extratos de *S. cerevisiae* são ricos em β -glucanas e glicogénio, enquanto os de *S. pastorianus* são ricos em manoproteínas. Os polissacarídeos extratáveis da levedura podem ser valorizados como ingredientes alimentares. As manoproteínas podem ser usadas como emulsificantes e as β -glucanas como fibra dietética com atividades biológicas. O resíduo resultante da extração aquosa assistida por micro-ondas mantém a estrutura tridimensional das leveduras *S. pastorianus* e *S. cerevisiae*. Esta última sofre alguma destruição mostrando menos resistência da parede celular à temperatura e pressão exercida durante a extração. Assim, este resíduo insolúvel pode também ser valorizado através do uso das microcápsulas de levedura, principalmente a partir da *S. pastorianus*, que apresentam após extração uma estrutura com orifícios que poderá ser usada para fins de transporte de nanopartículas na área clínica.

A hidrólise com a celulase não altera muito a superfície da parede celular da levedura nem destrói a sua estrutura enquanto a hidrólise com α -amilase promove uma maior degradação da superfície da levedura, mostrando que a parede celular é composta por uma

rede compacta e interligada entre os diferentes polímeros sendo essa rede mais resistente na *S. pastorianus*.

Relativamente ao gene da enzima responsável pela síntese das ligações ($\beta 1 \rightarrow 4$) na levedura não foi possível encontrar no genoma da *S. cerevisiae* a sequência de uma celulose sintase. No entanto, verificou-se que as celulosas sintase que existem descritas para diferentes organismos não têm domínios conservados, ou seja, as sequências são muito diferentes de organismo para organismo.

Este trabalho mostra que a levedura excedentária da cerveja pode ser valorizada quer em termos dos polissacarídeos extratáveis quer em termos do resíduo insolúvel que permanece após extração dos polissacarídeos. De uma forma geral, a *S. cerevisiae* não reutilizada pode ser usada como fonte de ($\beta 1 \rightarrow 3$)-glucanas solúveis enquanto a *S. cerevisiae* reutilizada é fonte de glicogénio solúvel. As β -glucanas podem ser usadas como ingredientes alimentares, podendo ter aplicação como fibra dietética solúvel. As *S. pastorianus* não apresentam alteração na sua composição dependendo da reutilização pelo que são fonte de manoproteínas solúveis. Em termos de fibra insolúvel a *S. pastorianus* é rica em glucanas ($\beta 1 \rightarrow 3$) independentemente da sua reutilização, enquanto a *S. cerevisiae* só o é quando não sofre reutilização.

5. Perspetivas Futuras

O presente trabalho permitiu estudar a composição e estrutura dos polissacarídeos que constituem a parede celular da levedura de diferentes espécies/estirpe e sujeitas a ciclos de reutilização diferentes. No entanto, outros estudos poderiam vir a realizar-se para perceber ou caracterizar com mais pormenor os polissacarídeos da parede celular. Desta forma podia-se:

- Purificar, fracionar e estudar por RMN as glucanas em ligação (1→4) a fim de se perceber melhor a estrutura das glucanas em ligação (β 1→4);
- Perceber se o genoma das leveduras é alterado durante o processo cervejeiro através de estudos genéticos. Ou seja, sequenciar o genoma das diferentes leveduras e perceber se há genes que são alterados, silenciados ou expressados durante o processo cervejeiro e se esses genes estão relacionados com a síntese das ligações (β 1→4);
- Perceber, ainda com recurso a estudos genéticos, se o gene GFA1 envolvido na síntese de quitina é mutado/alterado com o stress cervejeiro;
- Desenvolver um portefólio de microcápsulas de levedura para a incorporação de compostos terapêuticos ou alimentares, por forma a se valorizar parte deste subproduto.

6. Referências Bibliográficas

-
1. Ferreira IMPLVO, Pinho O, Vieira E, Tavarela JG. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*. 2006; 77–84.
 2. Pinho O, Ferreira IMPLVO, Santos HMLM. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *Journal of Chromatography*. 2006; 145–153.
 3. Feyder S, Craene J De, Bär S, Bertazzi DL, Friant S. Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 1509–1525.
 4. Branduardi P, Dujon B, Gaillardin C, Porro D. Molecular and cell biology. *Yeast*. 2010; 1–433.
 5. Fay JC, Benavides JA. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics*. 2005; 1–6.
 6. Kodama Y, Kielland-brandt MC, Hansen J. *Lager* brewing yeast. 2005; 145–164.
 7. Broek M van den, Bolat I, Nijkamp JF, Ramos E, Luttik MAH, Koopman F, Geertman JM, Ridder D De, Pronk JT, Daran JM. Chromosomal copy number variation in *Saccharomyces pastorianus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015; 6253–6267.
 8. Casaregola S, Nguyen H, Lapathitis G, Kotyk A, Gaillardin C. Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015; 1607–1618.
 9. Martini AV, Martini A. Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1987; 77–84.
 10. Lipke PN, Ovalle R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of bacteriology*. 1998; 3735–3740.
 11. Klis FM, Boorsma A, De Groot PWJ. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2006; 185–202.

-
12. Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology. 2002; 239–259
 13. Arvindekar AU, Patil NB. Glycogen- a covalently linked component of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 2002; 131–139.
 14. Bastos R, Coelho E, Coimbra MA. Modifications of *Saccharomyces pastorianus* cell wall polysaccharides with brewing process. Carbohydrate polymers. 2015; 322–330.
 15. Alsteens D, Dupres V, Evoy KM, Wildling L, Gruber HJ, Dufre YF. Structure, cell wall elasticity and polysaccharide properties of living yeast cells, as probed by AFM. Nanotechnology. 2008; 1–9.
 16. Bastos R. Caracterização dos polissacarídeos da parede celular de leveduras. Tese de Mestrado. Aveiro; 2013.
 17. Orlean P. Cell Wall Biogenesis. In the molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press. 1988; 229–362.
 18. Lagorce A, Berre-anton V Le, Aguilar-uscanga B, Martin-yken H. Involvement of GFA1, which encodes glutamine–fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. European Journal of Biochemistry. 2002; 1697–1707.
 19. Dijkgraaf GJP, Li H, Bussey H. Cell- β -glucans of *Saccharomyces cervisiae*. Biopolymers polysaccharides. 2002; 179–213.
 20. Wood EJ. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach (second edition). Biochemistry and molecular biology education: a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. 2006; 1-922.
 21. Bacon JSD, Farmer VC. The presence of predominantly $\beta(1\rightarrow6)$ component in preparations of yeast glucan. Biochemical Journal. 1968; 34–35.
 22. Manners BDJ, Masson AJ, Patterson JC. The Structure of a $\beta(1\rightarrow3)$ -D-Glucan from yeast cell walls. Biochemical Journal. 1973; 19–30.
 23. Kopecká Marie, Phaff HJ, Fleet GH. Demonstration in the of a fibrillar of the yeast component and its chemical nature. The Journal of cell Biology. 1974; 66–76.

-
24. Dalonso N, Goldman GH, Gern RMM. β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015; 7893–7906.
 25. Pinto M, Coelho E, Nunes A, Brandão T, Coimbra MA. Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: a structural characterization approach. *Carbohydrate polymers*. 2015; 215–222.
 26. François J, Parrou JL, Francois J. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2001; 125–145.
 27. Teparić R, Mrša V. Proteins involved in building, maintaining and remodeling of yeast cell walls. *Current Genetics*. 2013; 171–185.
 28. Lagorce A, Hauser NC, Labourdette D, Rodriguez C, Martin-Yken H, Arroyo J, Hoheisel JD, Francois J. Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 20345–20357.
 29. Ishihara S, Hirata A, Nogami S, Beauvais A, Latge JP, Ohya Y. Homologous subunits of 1,3-Beta-Glucan synthase are important for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*. 2007; 143–156.
 30. Machi K, Azuma M, Igarashi K, Matsumoto T, Fukuda H, Kondo A, Ooshima H. Rot1p of *Saccharomyces cerevisiae* is a putative membrane protein required for normal levels of the cell wall 1,6- β -glucan. *Microbiology*. 2004; 3163–3173.
 31. Azuma M, Levinson JN, Page N, Bussey H. *Saccharomyces cerevisiae* Big1p, a putative endoplasmic reticulum membrane protein required for normal levels of cell wall β -(1,6)-glucan. *Yeast*. 2002; 783–793.
 32. Doblin MS, Pettolino FA, Wilson SM, Campbell R, Burton RA, Fincher GB, Newbigin Ed, Basic A. A barley cellulose synthase-like CSLH gene in transgenic *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 5996–6001.
 33. Cocuron J-C, Lerouxel O, Drakakaki G, Alonso AP, Liepman AH, Keegstra K, Raikhel N, Wilkerson CG. A gene from the cellulose synthase-like C family

-
- encodes a β -1,4 glucan synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007; 8550–8555.
34. Pérez-Mendoza D, Rodríguez-Carvajal MÁ, Romero-Jiménez L, Farias GDA, Lloret J, Gallegos MT, Sanjuán J. Novel mixed-linkage β -glucan activated by c-di-GMP in *Sinorhizobium meliloti*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015; E757–E765.
 35. Travassos LR. *Sporothrix schenckii*. In fungal dimorphism, with emphasis on fungi pathogenic for humans, Szaniszló PJ. Plenum: New York. 1985; 121–163.
 36. Lin CC, Aronson JM. Chitin and cellulose in the cell walls of the oomycete, *Apodachlya* sp. Archiv für Mikrobiologie. 1970; 111–114.
 37. Lesage G, Bussey H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2006; 317–343.
 38. Strahl-bolsinger S, Gentsch M, Tanner W. Protein *O*-mannosylation. Biochimica et biophysica acta. 1999; 297–307.
 39. Corbacho I, Olivero I, Hernández LM. A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides. Fungal genetics and biology. 2005; 773–790.
 40. Demarini DJ, Adams AEM, Fares H, Virgilio C De, Valle G, Chuang JS, Pringle JR. A septin-based hierarchy of proteins required of localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. The Journal of cell Biology. 1997; 75–93.
 41. Becker HF, Piffeteau A, Thellend A. *Saccharomyces cerevisiae* chitin biosynthesis activation by *N*-acetylchitooses depends on size and structure of chito-oligosaccharides. BioMed Central. 2010; 2–7.
 42. Burda P, Aebi M. The dolichol pathway of *N*-linked glycosylation. Biochimica et biophysica acta. 1999; 239–257
 43. Wendland J. *Lager* yeast comes of age. American Society for Microbiology. 2014; 1256–1265.
 44. Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert HDF. Yeast flocculation: what brewers should know. Applied microbiology and biotechnology. 2003; 197–205.

-
45. Briggs DE, Boulton CA, Brookes PA, Steven R. Brewing: science and practice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2004; 881.
 46. Shima J, Takagi H. Stress-tolerance of baker's-yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells: stress-protective molecules and genes involved in stress tolerance. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2009; 155–164.
 47. Bleoanca I, Bahrim G. Overview on brewing yeast stress factors. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2013; 1689–1699.
 48. Ding J, Huang X, Zhang L, Zhao N, Yang D, Zhang K. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009; 253–263.
 49. Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JPR, Powell CD, Smart KA. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews*. 2007; 535-569
 50. Aguilar-Uscanga B, Francois JM. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*. 2003; 268–274.
 51. Dake MS, Khetmalas MB, Amarapurkar SV. Role of insoluble glycogen in ethanol adaptation mechanism of *Saccharomyces italicus*. *Indian Journal of Science and Technology*. 2011; 52–55.
 52. Ekberg J, Rautio J, Mattinen L, Vidgren V, Londesborough J, Gibson BR. Adaptive evolution of the lager brewing yeast *Saccharomyces pastorianus* for improved growth under hyperosmotic conditions and its influence on fermentation performance. *FEMS Yeast Research*. 2013; 335–349
 53. Zhu F, Du B, Xu B. A critical review on production and industrial applications of β -glucans. *Food Hydrocolloids*. 2016; 275–288.
 54. Aspinall GO, Krishnamurthy TN. Base-catalyzed degradations of carbohydrates. Alkaline degradation of 3,6-Di-O-substituted hexoses. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 1975; 2171–2177.
 55. Whistler RL, BeMiller JN. Alkaline degradation of polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry*. 1958; 289–329.

-
56. Ohno N, Miura T, Miura NN, Adachi Y, Yadomae T. Structure and biological activities of hypochlorite oxidized zymosan. *Carbohydrate polymers*. 2001; 339–349.
 57. Freimund S, Sauter M, Käppeli O, Dutler H. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers*. 2003; 159–171.
 58. Liu XY, Wang Q, Cui SW, Liu HZ. A new isolation method of β -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocolloids*. 2008; 239–247.
 59. Chen J, Lai P, Shen H, Zhen H, Fang R. Effect of extraction methods on polysaccharide of *Clitocybe maxima* stipe. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 2013; 370–373.
 60. Clark DE, Sutton WH. Microwave Processing of Materials. *Annual Review of Materials Science*. 1996; 299–331.
 61. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*. 2006; 300–312.
 62. Ahmad A, Anjum FM, Zahoor T, Nawaz H, Dilshad SMR. Beta Glucan: A valuable functional ingredient in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2012; 201–212.
 63. Shin MS, Lee S, Lee KY, Lee HG. Structural and biological characterization of aminated-derivatized oat-glucan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 5554–5558.
 64. Angeli PF, Oliveira RJ, Silva AF. β -Glucans in promoting health: prevention against mutation and cancer. *Mutation Research*. 2008; 154–161.
 65. Luzio NRD, Williams DL, Mcnamee RB, Edwards BF, Kitahama A. Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucan. *International Journal of Cancer*. 1979; 773–779.
 66. Kiho T, Matsushita M, Usui S, Ukai S. Biological Activities of (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans with reducing glucose side chains. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1998; 570–572.

-
67. Göksel Ş, Ek E, Çetiner M, Ercan F, Ye BÇ. β -glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *European Journal of Pharmacology*. 2006; 170–178.
 68. Dikit P, Methacanon P, Visessanguan W, H-kittikun A. Characterization of an unexpected bioemulsifier from spent yeast obtained from Thai traditional liquor distillation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010; 465–470.
 69. Šandula J, Durař Z. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. *Mutation Research*. 2001; 213–222.
 70. Thammakiti S, Suphantharika M, Phaesuwan T, Verduyn C. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry. *International journal of food science and technology*. 2004; 21–29.
 71. Coelho E, Pinto M, Pinto RJB, Freire CSR, Coimbra MA. Polysaccharide characterization of brewers spent yeast insoluble residue after chlorite oxidation treatment. *Trends in Carbohydrate Research*. 2015; 33–40.
 72. Ciamponi F, Duckham C, Tirelli N. Yeast cells as microcapsules. Analytical tools and process variables in the encapsulation of hydrophobes in *S. cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012; 1445–1456.
 73. Blanquet S, Antonelli R, Laforet L, Denis S, Marol-Bonnin S, Alric M. Living recombinant *Saccharomyces cerevisiae* secreting proteins or peptides as a new drug delivery system in the gut. *Journal of Biotechnology*. 2004; 37–49.
 74. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryneck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting Interleukin-10. *Science*. 2000; 1352–1355.
 75. Tesz GJ, Aouadi M, Prot M, Nicoloro SM, Boutet E, Amano SU, Goller A, Wang M, Chang-An G, Salomon WE, Virbasius JV, Baum RA, O'Connor MJ, Soto E, Ostroff GR, Czech MP. Glucan particles for selective delivery of siRNA to phagocytic cells in mice. *Biochemical Journal*. 2011; 351–362.
 76. Selvendran SG, March RR, Ring JF. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetables fiber. *Analytical Biochemistry*. 1979; 282–292.

-
77. Coimbra MA, Deldalillo I, Waldron KW, Selvendran SG. Isolation and analysis of cell wall polymers from Olive Pulp. *Modern Methods of Plant Analysis*. 1996; 484–489.
 78. Ciucanu I, Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*. 1984; 209–217.
 79. Sousa AF, Matos M, Pinto RJB, Freire CSR, Silvestre AJD. One-pot synthesis of biofoams from castor oil and cellulose microfibers for energy absorption impact materials. *Cellulose*. 2014; 1723–1733.
 80. Biological sequence alignment editor. <http://bioedit.software.informer.com/>, acedido em 03.05.2016.
 81. Basic Local Alignment Search Tool. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acedido em 05.05.2016.
 82. Tolmasky DS, Krisman CR. The degree of branching in (α 1,4)-(α 1,6)-linked glucopolysaccharides is dependent on intrinsic properties of the branching enzymes. *European Journal of Biochemistry*. 1987; 393–397.
 83. Deshpande PS, Sankh SN, Arvindekar AU. Study of two pools of glycogen in *Saccharomyces cerevisiae* and their role in fermentation performance. *Journal of the Institute of Brewing*. 2011; 113–119.
 84. Aïmanianda V, Clavaud C, Simenel C, Fontaine T, Delepierre M, Latgé JP. Cell wall β -(1,6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: Structural characterization and *in situ* synthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 13401–13412.
 85. Coelho E, Rocha SM, Coimbra MA. Foamability and foam stability of molecular reconstituted model sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 8770–8778.
 86. Soares EV. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Journal of Applied Microbiology*. 2011; 1–18.

-
87. Wilson WA, Hughes WE, Tomamichel W, Roach PJ. Increased glycogen storage in yeast results in less branched glycogen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004; 416–423.
 88. Kwiatkowski S, Thielen U, Glenney P, Moran C. A study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucans. *Journal of the Institute of Brewing*. 2009; 151–158.
 89. Kollár R, Reinhold BB, Petra E, Yeh HJC, Ashwell G, Kapteyn JC, Klis FM, Cabib E. Architecture of the yeast cell wall in a previous study. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997; 17762–17775.
 90. Tobergte DR, Curtis S. Chemical structure of the insoluble hyphal wall glucan of *Phytophthora cinnamomi*. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2013; 1689–1699.
 91. Hong F, Yan J, Baran JT, Allendorf DJ, Hansen RD, Ostroff GR, Xing PX, Cheung NK, Ross GD. Mechanism by which orally administered β -1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *The Journal of Immunology*. 2004; 797–806.