



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DAIANE DIAS LOPES

**ESTUDO MOLECULAR E MORFOLÓGICO DE LEVEDURAS
DE PROCESSOS FERMENTATIVOS DE PRODUÇÃO DE
ETANOL**

Londrina

2010

DAIANE DIAS LOPES

**ESTUDO MOLECULAR E MORFOLÓGICO DE LEVEDURAS
DE PROCESSOS FERMENTATIVOS DE PRODUÇÃO DE
ETANOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Luzia Doretto Paccola-
Meirelles

Co-Orientadora: Prof^ª Dr^ª Gisele Maria
Andrade-Nobrega

Londrina

2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L864e Lopes, Daiane Dias.

Estudo molecular e morfológico de leveduras de processos fermentativos de produção de etanol / Daiane Dias Lopes. – Londrina, 2010.
58 f. : il.

Orientador: Luzia Doretto Paccola-Meirelles.

Co-orientador: Gisele Maria Andrade-Nobrega.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Leveduras – Teses. 2. Leveduras – Aspectos moleculares – Teses. 3. Leveduras – Morfologia – Teses. 4. Genética microbiana – Teses. 5. Álcool – Combustível – Indústria – Teses. I. Paccola-Meirelles, Luzia Doretto. II. Andrade-Nóbrega, Gisele Maria. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Instituto Agrônomo do Paraná. V. EMBRAPA. VI. Título.

CDU 582.282.23

663.1

*Aos meus pais, Luiz e Cleuza, por todo amor e
compreensão que dedicaram a mim até agora e sei que
as novas etapas que virão continuarão sempre comigo.*

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus pela vida e presença em todos os momentos, seja nas alegrias ou no desespero (mais alegria do que desespero), e que me deu forças para superar situações difíceis. Quero agradecer a Deus também por ter me presenteado, além dos meus pais, as pessoas que descreverei a seguir:

À minha irmã Cintia e seu belo coração que me ensina a ser uma pessoa melhor e sei que, mais do que qualquer pessoa, sente muito orgulho de mim.

Ao meu irmão Luiz Fernando que dessa vez sou eu a pessoa que mais sente orgulho do homem que se tornou: uma pessoa digna como meu pai. Terá minha eterna admiração.

Às minhas avós queridas Dona Luzia e Dona Geny, na qual sinto muitas saudades, que mesmo sem ter a menor noção do que eu fazia, sempre se preocupavam em perguntar como andavam as coisas.

A toda minha família (meus tios e primos), pois foi ela que nos socorreu na fase mais difícil que passamos.

À minha amiga-irmã Krisle, minha inspiração, sua amizade é uma das coisas que tenho de mais preciosa e novamente agradeço a Deus por tê-la em minha vida.

Aos meus amigos anteriores a graduação, Priscila, Ruth, Angel, Angélica (prima), Carol, Junior (primo), Sílvia, Jose, Bárbara e Oscar, vocês estarão eternamente em meu coração, mesmo que a vida nos leve para caminhos diferentes.

Por último, quero agradecer a possibilidade de ter o Francisco ao meu lado, uma pessoa que recentemente entrou em minha vida, mas parece que esteve sempre aqui. Eu te amo.

Agora, quero agradecer aos que contribuíram para minha formação acadêmica e as pessoas fizeram parte da minha estória mais recente.

À Universidade Estadual de Londrina pela minha graduação em Biologia e pelo suporte e estrutura que permitiram que esta dissertação pudesse ser realizada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e todos os professores do Mestrado pela oportunidade e ensinamentos que irão contribuir para minha formação profissional. Agradeço também a Sueli Trindade pela simpatia, atenção e pela disposição, sempre.

Ao CNPq pela bolsa-auxílio, a qual literalmente me auxiliou muito durante esses dois anos de mestrado.

À Prof^a Dr^a Luzia Doretto Paccola-Meirelles pelas sugestões, amizade e principalmente pela confiança oferecida a mim, contribuindo que este sonho fosse realizado.

Aos Laboratórios de: Genética e Ecologia Animal; Marcadores e Citogenética de Plantas; e de Mutagênese e Oncogenética, por permitir o uso de seus equipamentos e em especial aos alunos pela disposição e paciência ao me auxiliar com as técnicas moleculares.

À Prof^a Célia, ao Osvaldo e todos do laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, pela permissão e grande ajuda, pois consegui obter ótimas imagens das minhas leveduras.

Aos amigos do mestrado, além dos agradecimentos, desejo que todos também consigam realizar seus sonhos.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Genética de Microrganismos, Magali Regina, Paulo Fernando, Kátia Rocha, Aline Sauer, Eliseu Pedro, Viviane Baba, Rafaela Mie e Aquilino Portera, pela amizade, ajuda com meu trabalho e principalmente pelas risadas, que não foram poucas. Vou sentir falta das festinhas e dos nossos *happy hours* no Gelobel, o nosso *point*, momentos felizes que lembrarei para sempre. Agradeço especialmente ao Ideval pelo seu trabalho, amizade e por colocar ordem nesse pardieiro!

A todos os amigos da graduação e em especial aos que todos os anos se esforçam para se encontrar. Calma que na próxima eu vou pessoal!

À galera da Curva de Itaguá, Carolzinha, Cacá, Ana, Nega, Súlho, Aline, Malaco, Fabi, Diogo, Track, Ivo, Buda, Paty e Anderson, foram muitos botecos, repúblicas e comemorações durante a minha graduação e agradeço por ter tido a companhia de algumas dessas pessoas durante o mestrado. Saudades!

A Prof^a Dr^a Floristher Elaine Carrara pelo *up* em meu currículo e pela experiência que adquiri trabalhando em sua companhia. Obrigada pela amizade e por sempre se lembrar de mim.

E finalmente, agradeço à Prof^a Dr^a Gisele Maria Andrade-Nobrega pela dedicada orientação, sendo mais que isso, uma verdadeira companheira de bancada, que me ensinou praticamente tudo que sei e que muitas vezes me ajudou quando algo não dava certo ou quando o tempo era curto. Essa dissertação é mérito seu, obrigada por tudo!

"Diante de Deus todos somos igualmente sábios e igualmente tolos".

Albert Einstein

LOPES, Daiane Dias. **Estudo molecular e morfológico de leveduras de processos fermentativos de produção de etanol**. 2010. 58 fls. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

Leveduras são microrganismos considerados de grande importância econômica por participarem de diversos processos industriais de fermentação. Linhagens comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*, selecionadas por melhor se adaptarem a processos industriais, são utilizadas como inóculo na produção de álcool combustível. Durante o processo de produção de etanol, a linhagem do início da safra pode ser rapidamente substituída por leveduras que, *a priori* são consideradas selvagens. O isolamento e caracterização morfológica e genética de leveduras industriais envolvidas neste processo fermentativo são importantes, visto que objetivam identificar as linhagens de maior produtividade, bem como os indesejáveis contaminantes. Sabe-se que, normalmente, estes contaminantes são todos do gênero *Saccharomyces* e desta forma, sua identificação se torna muito difícil devido às características semelhantes às linhagens comerciais do mesmo gênero. O presente trabalho tem por objetivo estudar comparativamente metodologias moleculares e morfológicas de identificação de leveduras de processo industrial de fermentação alcoólica. Contribuindo para o monitoramento destas leveduras neste processo, a técnica RFLP do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA) foi testada e comparada à cariotipagem eletroforética em campo pulsado (PFGE). Paralelamente a isso, um estudo mais detalhado das colônias lisas e rugosas foi realizado por meio da microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que a técnica RFLP-mtDNA foi eficiente na discriminação das linhagens de leveduras assim como a técnica PFGE. As duas técnicas apresentaram resultados que corroboram para a conclusão de que as leveduras parecem sofrer rearranjos cromossômicos, permitindo que as melhores adaptadas sobrevivam ao processo fermentativo. Em resposta ao estresse, essas leveduras podem expressar genes que alteram seu comportamento, causando mudanças na morfologia. As leveduras morfológicamente definidas como contaminantes, muitas vezes não possuem diferenças significativas quando analisadas por PFGE e RFLP-mtDNA. A microscopia eletrônica de varredura revelou padrões de brotamento distintos entre essas amostras semelhantes no genótipo, porém com morfologia de colônias diferentes, contrariando o que muitos estudos indicam, onde as leveduras com comportamento alterado seriam leveduras contaminantes.

Palavras-chave: Etanol combustível. *Saccharomyces cerevisiae*. Linhagens comerciais. Técnicas moleculares. Morfologia da colônia.

LOPES, Daiane Dias. **Molecular and morphological study of yeast fermentation processes for ethanol production.** 2010. 58 fl. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ABSTRACT

Yeasts are microorganisms considered of great economic importance for participating in various industrial processes of fermentation. Commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae*, selected for better adaptation to industrial processes, are used as inoculum in the production of fuel ethanol. During the process of ethanol production, the strains of the crop's beginning can be quickly replaced by yeast, which a priori are considered wild. Isolation and morphological characterization and genetics of industrial yeasts involved in fermentation are important seeing that they aim to identify the strains of greater productivity, as well as undesirable contaminants. It is known that, normally, these contaminants are all from the genus *Saccharomyces* and so their identification becomes very difficult due to similar features to commercial strains of the same genus. This work has the objective to study molecular and morphological methods of identification of yeasts for industrial process of fermentation. Contributing to the monitoring of these strains in this process, the technique RFLP of mitochondrial DNA (mtDNA-RFLP) was tested and compared to electrophoretic karyotyping pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Alongside this, a more detailed study of smooth and rough colonies was performed by scanning electron microscopy. The results showed that the mtDNA-RFLP technique was efficient in the discrimination of yeast strains as the PFGE technique. Both techniques showed results that corroborate the conclusion that the yeasts seem to suffer chromosomal rearrangements, allowing the best adapted survive the fermentation process. In response to stress, these yeasts can express genes that alter their behavior, causing changes in morphology. The yeasts morphologically defined as contaminants often have no significant differences when analyzed by PFGE and RFLP-mtDNA. The scanning electron microscopy revealed distinct patterns of budding between these samples similar in genotype, although with different morphology of colonies, contrary to what many studies indicate, where the yeasts with altered behavior would be wild yeasts.

Keywords: Ethanol fuel. *Saccharomyces cerevisiae*. Commercial strains. Molecular techniques. Morphology of colony.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Produção de etanol no Brasil entre o período de 1997/98 e 2008/09. Nota-se que a introdução dos veículos "flex-fuel" em 2003, estimulou o crescimento da produção de etanol..... 18
- Figura 2** - Principais pólos brasileiros de exploração da cana-de-açúcar..... 18
- Figura 3** - Diversidade estrutural em *S. cerevisiae*: domínios conservados e variáveis do genoma. O modelo apresenta um conjunto de cromossomos homólogos hipotéticos em várias linhagens de *S. cerevisiae*. A linha superior (contínua cinza) retrata a configuração estrutural do cromossomo de uma primeira linhagem seqüenciada (isto é, a linhagem utilizada como referência), enquanto os cromossomos mostrados abaixo representam os rearranjos encontrados em outras linhagens. 24
- Figura 4** - Aspecto morfológico das colônias de leveduras isoladas a partir do fermento industrial das usinas. A. Colônias lisas (morfologia característica de linhagens comerciais). B. Colônias rugosas (morfologia característica de leveduras contaminantes) 31
- Figura 5** - Isolados de colônias lisas e rugosas crescidos sobre filtros de acetato de celulose depositados na superfície de placas contendo meio YPD sólido 35
- Figura 6** - Fragmento amplificado da região ITS1-5,8S-ITS2 das amostras padrões (A) e dos isolados das usinas (B). M1=Marcador molecular Ladder 100 pb (500), M2=Marcador molecular Ladder 100 pb (600)..... 37
- Figura 7** - Cariótipo Molecular das linhagens padrões em detalhe. A. Linhas 1 (CA-1), 2 (PE-2), 3 (BG-1), 4 (SA-1), 5 (NCYC 738), 6 (NCYC 1006), 7 (*S. boulardii*). B. Detalhe dos cromossomos da linhagem CAT-1, estimados através da similaridade entre o padrão de bandas do marcador molecular S288C 38
- Figura 8** - Dendograma UPGMA das amostras padrões e dos isolados das usinas a partir do PFGE. Os valores sobre os ramos indicam os valores de bootstrap (2000 replicações)..... 39

- Figura 9** - Cariótipo molecular por PFGE dos isolados das usinas. Linhas 1, 13-15 e 19-21 (CAT-1); 10, 11, 28, 31, 32 (PE-2); 16-18, 22 e 24 (SA-1); 2-9, 12, 23, 25-27, 29, 30, 33-36 (Inespecífico - 13 perfis diferentes que não foram incluídos nos grupos das linhagens comerciais) B. Identificação das amostras de cada usina baseado no dendograma construído a partir da análise dos cariótipos. PI=perfil inespecífico 40
- Figura 10** - Perfil eletroforético do DNAm_t das amostras padrões digerido com a enzima *Hinfl*. M=marcador molecular A HindIII. Linhas 1-6 *Saccharomyces cerevisiae* (1. NCYC 738, 2. NCYC 1006, 3. BG-1, 4. CAT-1, 5. PE-2, 6. SA-1); 7 *Saccharomyces boulardii*. As linhas vermelhas representam resto de DNA total não digerido 42
- Figura 11** - Dendograma UPGMA das amostras padrões e dos isolados das usinas a partir do RFLP-mtDNA. Os valores sobre os ramos indicam os valores de bootstrap (2000 replicações) 43
- Figura 12** - A. Perfil eletroforético do DNAm_t digerido com a enzima *Hinfl* dos isolados das usinas. M=marcador molecular A HindIII. Linhas 1, 2, 13-15, 19-21 e 27 (CAT-1); 10, 11, 28, 30-32 e 34 (PE-2); 16-18, 22-24 (SA-1); 3 (NCYC 1006); 4-9, 12, 29, 33 e 35 (Inespecífico - 6 perfis diferentes que não foram incluídos nos grupos das linhagens padrões); 25, 26 e 36 não obtiveram perfis. As linhas vermelhas representam resto de DNA total não digerido. B. Identificação dos isolados de cada usina baseado no dendograma construído a partir da análise dos perfis de restrição. PI=perfil inespecífico 44
- Figura 13** - Morfologia das colônias lisas e rugosas por microscopia eletrônica de varredura. A. Isolados da usina Goioerê 2007. B. Isolados da usina Pioneiros 2006. C. Amostra padrão PE-2 47
- Figura 14** - Padrão de brotamento das células de colônias lisas e rugosas. No brotamento polarizado, as células permanecem conectadas (setas). A. Células da colônia lisa do isolado da usina Goioerê com brotamento aleatório. B. Células da colônia rugosa do isolado da usina Goioerê com brotamento polarizado. C. Células da colônia lisa do isolado da usina Pioneiros com brotamento aleatório. D. Células da colônia rugosa do isolado da usina Pioneiros com brotamento polarizado 49

Figura 15 - Organização das células nas colônias lisas e rugosas. A. Células de colônia lisa distribuídas uniformemente. B. Aspecto da superfície da colônia lisa. C. Células de colônia rugosa interconectadas formando aglomerados. D. Aspecto da superfície da colônia rugosa ... 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Unidade e data da coleta do fermento industrial.....	31
Tabela 2 -	Isolados obtidos de Usinas de produção de etanol utilizadas no estudo	32
Tabela 3 -	Amostras padrões.....	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 O BIOETANOL.....	16
2.2 LEVEDURAS: AS ARTESÃS DO ETANOL	19
2.3 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	24
3 OBJETIVOS	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS UTILIZADAS NO ESTUDO.....	30
4.1.1 Coleta	30
4.1.2 Caracterização Morfológica e Seleção dos Isolados.....	30
4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	33
4.2.1 Cariotipagem Eletroforética em Campo Pulsado (PFGE)	33
4.2.2 Isolamento do DNA.....	33
4.2.3 Amplificação da Região ITS pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	34
4.2.4 Perfil de Restrição do DNA Mitocondrial (RFLP-mtDNA).....	34
4.2.5 Construção dos Dendogramas	34
4.3 ESTUDO DA MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS LISAS E RUGOSAS POR MEIO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	35
4.3.1 Preparação das Amostras em Meio Sólido	35
4.3.2 Observação em Microscópio Eletrônico de Varredura	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1 - 5,8S - ITS2	37
5.2 ANÁLISE DO PERFIL DE BANDAS DO PFGE	38
5.3 ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DE RFLP-MTDNA:	41
5.4 MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DAS LEVEDURAS:	46
5.4.1 Colônias Lisas e Rugosas.....	46
5.4.2 Organização das Células nas Colônias.....	48
6 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

As leveduras são organismos amplamente encontrados na natureza e possuem grande importância econômica por participarem de diversos processos industriais de fermentação.

Um dos processos industriais mais difundidos atualmente é a produção de etanol combustível, ou bioetanol, que no Brasil se dá por meio da fermentação do caldo e/ou melaço da cana-de-açúcar.

A produção do bioetanol envolve a participação de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. As linhagens industriais desta espécie são de grande interesse comercial visto que possuem características desejáveis tais como, rápida taxa de fermentação e alto rendimento em etanol, grande produção de biomassa, entre outros. O isolamento e caracterização de leveduras podem contribuir para a cadeia de produção de etanol, pois auxiliam na identificação das linhagens de maior produtividade para sua utilização na industrial.

No Paraná e no interior de São Paulo, quatro linhagens industriais de leveduras da espécie *S. cerevisiae* (CAT-1, PE-2, SA-1 e BG-1) são as principais utilizadas como inóculo na produção de álcool combustível. Essas leveduras foram isoladas de usinas do interior de São Paulo e mostram ser bastante adaptadas ao processo de fermentação.

Os procedimentos adotados durante a fermentação alcoólica nas usinas se dão em situação não estéril. Por este motivo a levedura industrial propagada no início da safra pode ser rapidamente substituída por leveduras selvagens contaminantes, muitas vezes mais adaptadas ao processo industrial. No entanto, estas leveduras contaminantes podem apresentar baixa produtividade, causando decréscimo do rendimento e conseqüentemente, consideráveis prejuízos. Desta forma, o monitoramento da fermentação é de fundamental importância para a atenuação desses problemas.

Muitas vezes, as linhagens de leveduras contaminantes e residentes do processo de fermentação são da mesma espécie, tornando a identificação muito difícil. Técnicas de identificação tendo como base aspectos morfológicos ou fisiológicos são necessárias, mas não suficientes para discriminação espécie-específica. Porém, técnicas que envolvem a biologia molecular têm sido empregadas

com sucesso quando se busca caracterizar e identificar as diferentes linhagens industriais bem como as contaminantes.

O presente trabalho tem como objetivos o estudo comparativo de metodologias moleculares para a identificação de linhagens comerciais e contaminantes de leveduras contidas no creme de levedo, além de um estudo mais detalhado do modo de formação de colônias lisas e rugosas de leveduras com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura. Para isso, foram utilizadas amostras de unidades produtoras de etanol do norte do Estado do Paraná e interior do Estado de São Paulo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O BIOETANOL

A utilização de combustíveis produzidos a partir de fontes renováveis como alternativa ao uso de combustível fóssil tornou-se uma preocupação universal, devido aos danos que a poluição e o consumo podem trazer ao meio ambiente (Matienzo, 2002). Além disso, os biocombustíveis têm sido fundamentais para o desenvolvimento econômico de alguns países, sendo o Brasil um dos principais beneficiados (Andrietta *et al.*, 2006).

O etanol combustível é o tipo mais conhecido de biocombustível e atualmente é considerado um mercado bastante promissor, movimentando milhões de reais todos os anos (Silva-Filho *et al.*, 2005a; Lima & Costa, 2007) devido a suas vantagens econômicas pois apresenta um menor custo de produção e, conseqüentemente, menor custo do produto (Lima & Costa, 2007). Brasil e Estados Unidos são os países que mais usam etanol na forma de combustível. Juntos, são responsáveis por mais de 70% da produção mundial (Argueso *et al.*, 2009).

Quase todo álcool produzido no Brasil é utilizado como combustível e representa 44% do combustível total consumido (Basso *et al.*, 2008). Segundo a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento, www.conab.org.br), no ano de 2008 foram produzidos cerca de 26,7 bilhões de litros de álcool, com estimativa de produção de 27,8 bilhões para 2009. O crescimento da produção da safra 2008/2009 foi de 4,79%, considerado pouco quando comparada à safra de 2007/2008, onde o crescimento foi de quase 21%. A queda se deu com o início da crise financeira mundial que fez diminuir as exportações, principalmente para os Estados Unidos. Mas a tendência é que este quadro mude na safra de 2010/2011, primeiro porque a produção e o consumo mundial de açúcar esta caindo, segundo porque existe uma expectativa de retomada de crescimento da economia dos principais países importadores de etanol e terceiro porque o mercado doméstico de etanol continua crescendo devido ao aumento das vendas de carros que podem utilizar o etanol como combustível (CONAB).

Desde o surgimento do Proálcool, o programa instituído para amenizar os efeitos da crise do petróleo nos anos 70, o setor sucroalcooleiro ganhou maior importância na economia do país (Lima & Costa, 2007). A introdução dos

veículos com tecnologia bicom bustível (popularizado como "flex-fuel") em 2003 estimulou o interesse dos consumidores pelo álcool combustível e aumentaram as perspectivas de utilização do etanol carburante. A venda mensal para este tipo de veículo representa 92% dos veículos novos, sendo que a frota em circulação já ultrapassou 8,5 milhões de unidades. Segundo a Conab, esta é a principal razão para a tendência de expansão mais acentuada para o álcool do que para o açúcar (Figura 1).

O álcool brasileiro é proveniente da cana-de-açúcar (gênero *Saccharum* L.), uma gramínea tropical que acumula sacarose a qual pode ser convertida em etanol diretamente por microrganismos, sem pré-tratamento enzimático (Argueso *et al.*, 2009). Até o momento, o caldo da cana é a única matéria prima utilizada em escala industrial para a produção de etanol no Brasil (Andrietta *et al.*, 2006), pois o rendimento é superior ao método de obtenção de etanol a partir de grãos, como é feito nos Estados Unidos (UNICA - União da Indústria de Cana-de-açúcar, www.unica.com.br; Argueso *et al.*, 2009). A cana-de-açúcar é uma planta semi-perene e tem relação simbiótica com microrganismos que fixam nitrogênio, permitindo que este sistema produza um excedente de energia estimada em cerca de oito vezes (Argueso *et al.*, 2009).

A produção brasileira de cana-de-açúcar é explorada praticamente em todo território nacional, embora os principais pólos produtores estejam situados nas regiões centro-sul e nordeste (Figura 2). A participação da produção da cana para a região centro-sul, que inclui os Estados da região sudeste, sul e centro-oeste, está próxima de 90% do total nacional. O Estado de São Paulo é o maior produtor de cana e também o maior produtor dos principais derivados desta, o açúcar e o álcool, obtendo uma parcela acima de 50% do total nacional. O Paraná é o segundo maior produtor brasileiro, tanto de cana quanto dos seus derivados, com produção estimada superior a 2 bilhões de litros de álcool em 2009 (CONAB; UNICA).

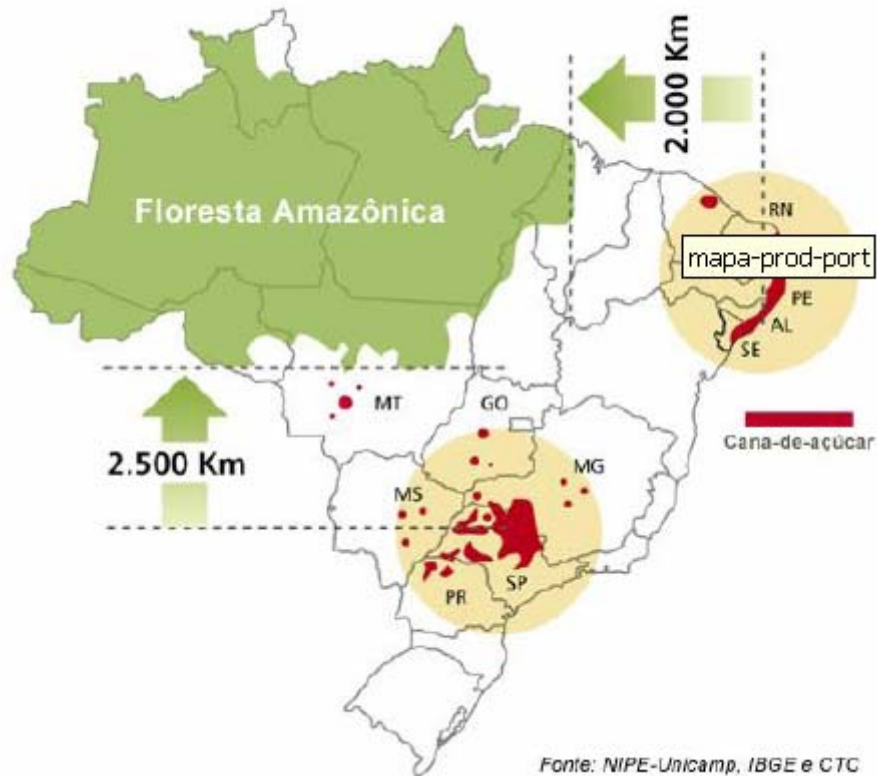
O Brasil, que sempre se destacou como produtor de açúcar foi o pioneiro na produção de álcool como combustível e hoje dispõe de uma ampla estrutura de produção, distribuição e abastecimento de álcool em todo o país (Matienzo, 2002). Além disso, a expansão do mercado externo deixa o Brasil em uma condição favorável para exportação, já que é um dos poucos países que detêm boas condições climáticas, disponibilidade de terra para produtividade e tecnologias de ponta nas lavouras e na indústria sucroalcooleira (Lima & Costa, 2007; CONAB).

Figura 1 - Produção de etanol no Brasil entre o período de 1997/98 e 2008/09. Nota-se que a introdução dos veículos “flex-fuel” em 2003, estimulou o crescimento da produção de etanol.



Fonte: ÚNICA (www.unica.com.br)

Figura 2 Principais pólos brasileiros de exploração da cana-de-açúcar.



Fonte: ÚNICA (www.unica.com.br)

2.2 LEVEDURAS: AS ARTESÃS DO ETANOL

As leveduras são microrganismos eucarióticos unicelulares formadores de colônias que se reproduzem principalmente por brotamento (ciclo vegetativo). Amplamente estudados, contribuem muito para o progresso científico, sendo consideradas modelos de estudo para compreensão das células eucarióticas (Goffeau *et al.*, 2000).

As leveduras utilizam como principal fonte de carbono os monossacarídeos, como glicose e frutose, ou dissacarídeos, como sacarose e maltose, moléculas abundantes em flores, frutos, sementes e no caldo de algumas plantas, como por exemplo, a cana, o que torna estes substratos um habitat natural para as leveduras (Marques-Marçal, 2005). São obrigatoriamente aeróbias, porém algumas podem ser anaeróbias facultativas e são conhecidas como leveduras fermentativas. Estes organismos têm a capacidade de fermentar açúcares produzindo etanol e dióxido de carbono e por isso são utilizados há milhares de anos na produção de pão e de bebidas alcoólicas, tendo importância econômica em escala industrial (Carvalho *et al.*, 2006).

O gênero *Saccharomyces* é o mais utilizado na indústria produtora de fermentados que tem como produto final o álcool, seja para uso carburante ou na indústria farmacêutica e de bebidas (Gomes *et al.*, 2007). Sua rápida capacidade de transformar açúcares em etanol, alta tolerância ao produto formado, osmotolerância, tolerância a grandes variações de temperatura, atividade celular em ambiente ácido e alta taxa de produtividade, são atributos que contribuíram para que o gênero fosse o mais desejável para o uso industrial (Souza Liberal, *et al.*, 2005; Silva-Filho *et al.*, 2005b).

Linhagens de leveduras comerciais

O etanol combustível é produzido atualmente por um processo baseado na capacidade da levedura *S. cerevisiae* em fermentar o caldo ou melaço da cana-de-açúcar (Silva-Filho *et al.*, 2005b).

As linhagens comerciais de *S. cerevisiae* são organismos altamente especializados que evoluíram para seu máximo potencial em diferentes ambientes fornecidos pela atividade humana (Howell *et al.*, 2004). Existem muitas linhagens

conhecidas e cada unidade industrial vai empregar a que melhor se adaptar ao processo de fermentação (Andrietta, *et al.*, 2006). No Brasil, seis principais linhagens de *S. cerevisiae* têm sido utilizadas como iniciadoras para produção do etanol combustível em diferentes unidades industriais. Estas incluem: PE-2 (Usina da Pedra), BG-1 (Usina Barra Grande), VR-1 (Usina Vale do Rosário), CR-1 (Usina Cresciuma), CAT-1 (Usina Catanduva) e SA-1 (Usina Santa Adélia) (Silva-Filho *et al.*, 2005b). Estas linhagens foram selecionadas em destilarias localizadas no interior do Estado de São Paulo e foram nomeadas de acordo com as iniciais das unidades de origem (Andrietta, *et al.*, 2006). No sul e sudeste do Brasil, a PE-2, BG-1, CAT-1 e SA-1 são as quatro principais linhagens utilizadas como inóculo na produção de álcool combustível (Azeredo, 1998, Basso *et al.*, 2008). A utilização destas linhagens de levedura apresenta como principais vantagens o alto rendimento fermentativo e a predominância sobre outras leveduras, bem como sobre leveduras selvagens (Basílio, *et al.*, 2008; Souza Liberal *et al.*, 2005; Azeredo, 1998; Silva-Filho *et al.*, 2005b).

O processo fermentativo

O processo fermentativo no Brasil se baseia na reciclagem das células, ou seja, mais de 90% das leveduras são reutilizadas de uma fermentação para a próxima, resultando em uma alta densidade celular que diminui o tempo de fermentação. Após cada ciclo fermentativo, as células são coletadas por centrifugação, lavadas em ácido (para reduzir a contaminação bacteriana) e ressuspensas no caldo da cana para mais um ciclo. Pelo menos dois ciclos de fermentação são realizados por dia durante todo o período da safra, que dura cerca de 200-250 dias (Wheals *et al.*, 1999).

Todo o conjunto do processo, incluindo as etapas de reciclagem e de fermentação, é considerado estressante para as leveduras, visto que estas ficam constantemente expostas a condições adversas como oscilações de temperatura e pH, alta concentração de açúcar e álcool e competição com leveduras selvagens que vieram juntamente com o caldo não esterilizado (Lucena *et al.*, 2007). Tais condições favorecem uma pressão seletiva, onde somente leveduras mais tolerantes poderão sobreviver até o fim do processo (Basso *et al.*, 2008). Apesar das leveduras selecionadas serem fisiologicamente e geneticamente melhores adaptadas, muitas

vezes, as leveduras mais adaptadas a um determinado processo são linhagens não comerciais, que podem afetar o rendimento da produção (Andrietta, *et al.*, 2006; Silva-Filho *et al.*, 2005a). Desse modo, o monitoramento do processo industrial torna-se necessário para identificação e correção de problemas que possam gerar baixa produtividade.

Características genéticas das leveduras

O genoma das leveduras é bastante pequeno e constituído por DNA cromossomal e elementos extracromossomais. Em 1996, a linhagem S288c da espécie *Saccharomyces cerevisiae* teve seu genoma completamente seqüenciado (Pretorius, 2000; Argueso *et al.*, 2009) apresentando cerca de 6000 genes (Goffeau *et al.*, 2000). As células haplóides contêm aproximadamente 12-13 megabases (Mb) de DNA nuclear distribuídos em 16 cromossomos lineares, com pouco DNA repetitivo e poucos introns (Pretorius, 2000). No entanto, a ploidia entre espécies e linhagens pode variar. A maioria das leveduras, incluindo linhagens de laboratório de *S. cerevisiae*, consiste em um estado diplóide ou haplóide (Pretorius, 2000; Blodin *et al.*, 2009). Entretanto, um estudo mostrou que linhagens comerciais para fermentação do vinho são predominantemente diplóides ou aneuplóides, e ocasionalmente poliplóides (Pretorius, 2000).

As leveduras possuem outros elementos genéticos que são herdados de forma não mendeliana podendo-se citar transposons, DNA plasmidial, DNA mitocondrial e partículas vírus-like (Kaback, 1995). Os elementos *Ty* (*transposons of yeast*) são seqüências repetidas no DNA de leveduras (35-55 cópias em *S. cerevisiae*) que são transcritas em RNA e apresentam a propriedade de se translocar de uma região do genoma para outro (Kaback, 1995; Pretorius, 2000). Estes elementos podem estar envolvidos na evolução das linhagens comerciais de leveduras (Argueso *et al.*, 2009), uma vez que a super-expressão de transposons tem sido relatada como um evento comum em resposta ao estresse (Kuthan *et al.*, 2003). Os transposons também são muito utilizados na engenharia genética para analisar genomas e na obtenção de mutantes (Dmytruk & Sibirny, 2007).

O DNA plasmidial, conhecido como 2 μ , ocorre naturalmente no núcleo da levedura, estando na forma circular e em múltiplas cópias (Wickner, 1995; Pretorius, 2000). Está presente na maioria das linhagens de *S. cerevisiae* e sua

função, a não ser a própria replicação, ainda não está esclarecida (Sherman, 1998). Esse plasmídeo, com cerca de 5,9 Kb e com 50-100 cópias por célula, é muito usado em trabalhos de tecnologia do DNA recombinante, pois sua origem de replicação é utilizada em plasmídeos artificiais de leveduras (Azevedo, 1998).

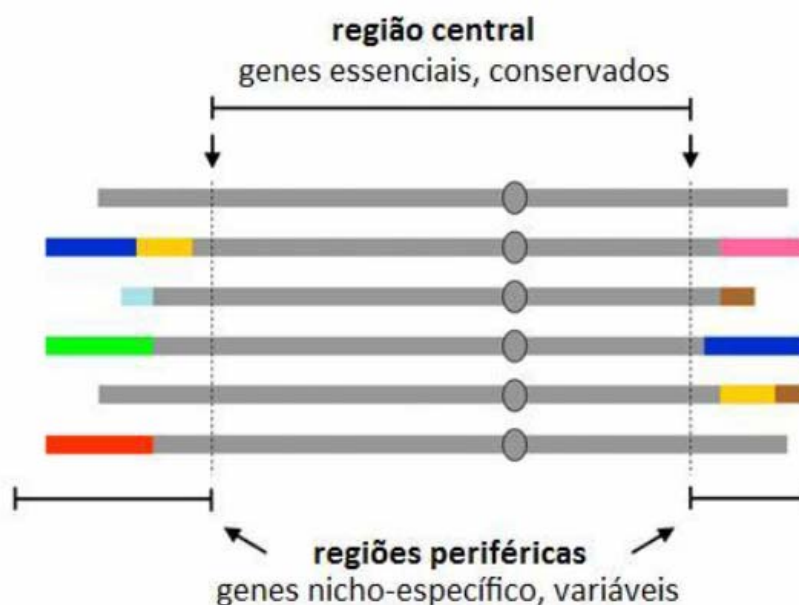
O DNA presente nas mitocôndrias, herdado citoplasmaticamente, também faz parte do genoma das leveduras. Em *S. cerevisiae*, o DNA mitocondrial (mtDNA) é considerado grande entre os outros organismos eucariontes, constituindo uma molécula circular de 75 kb (Pretorius, 2000). Possui poucos genes, apenas para os seus próprios mecanismos de síntese e de uma pequena parte de proteínas estruturais (Sherman, 1998). Dessa forma, não é essencial para as células, pois não codifica a maioria das enzimas envolvidas na produção do ATP durante o crescimento aeróbio (Pretorius, 2000; Blondin *et al.*, 2009). O mtDNA das diferentes espécies de leveduras variam muito em tamanho, devido a presença/ausência de introns ao longo das regiões intergênicas. Estas seqüências, ricas em G-C (*GC clusters*), demonstram atuar como elementos móveis em *S. cerevisiae*, constituindo pontos de recombinação (*hot spots*) e assim, alteram as ordens dos genes gerando variabilidade entre espécies e linhagens (Zamaroczy & Bernardi, 1986; Cardazzo *et al.*, 1997; Cardazzo *et al.*, 1998).

Partículas vírus-like (VLPs) estão presentes no citoplasma de muitas linhagens de *S. cerevisiae* produtoras de toxinas *killer*. Esses compostos protéicos com atividade antimicrobiana são codificados por um RNA fita dupla (dsRNA), conhecido como M dsRNA, o qual depende de um VLP auxiliar, o L-A dsRNA, que codifica os componentes necessários para replicação e manutenção do M dsRNA, além de produzir proteínas virais que encapsula ambos os genomas (Wickner, 1995; Sherman, 1998; Pretorius, 2000; Marques-Marçal, 2005). O desenvolvimento de leveduras *killer* no processo prejudica a fermentação, pois podem atrasar o início do processo ou deixá-lo mais lento (Pretorius, 2000).

Diversos trabalhos descrevem a possibilidade dos cromossomos das leveduras sofrerem rearranjos (Pretorius, 2000; Lucena *et al.*, 2007; Argueso *et al.*, 2009; Blondin *et al.*, 2009). Esta suspeita foi fundada devido ao alto nível de polimorfismos encontrado em linhagens comerciais, tanto para produção do vinho quanto para etanol, e falsas interpretações poderiam levar ao erro na diferenciação das linhagens (Silva-Filho *et al.*, 2005b). As diversas formas de rearranjos cromossômicos tais como, translocações, deleções, inserções e ampliações de

regiões nos cromossomos, podem ocorrer de forma homóloga ou ectópica. Estes rearranjos podem ser observados em gel de eletroforese em campo pulsado (*PFGE-Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), uma técnica molecular que separa os cromossomos de acordo com seu tamanho (Schwartz & Cantor, 1984). Segundo Blondin e colaboradores (2009), a presença de seqüências repetidas de elementos *Ty* intercaladas ao longo do genoma e de outras seqüências repetidas nas regiões teloméricas ou de RNA transportador (tRNA), seria possivelmente as responsáveis pelos rearranjos nestes cromossomos. Existem algumas indicações de que os rearranjos nos cromossomos seria uma evolução adaptativa para que as leveduras possam sobreviver às condições industriais (Silva-Filho *et al.*, 2005b). Estudos apontam que os rearranjos estão limitados as extremidades dos cromossomos (Argueso *et al.*, 2009). Nas regiões centrais estão presentes os genes essenciais para as leveduras e por isso é altamente conservada. Em *S. cerevisiae*, as extremidades dos cromossomos normalmente contêm genes, muitas vezes repetidos, que participam de uma via de uso de fonte alternativa de carbono e metabolismo de vitaminas, transporte de íons e aminoácidos, floculação, e outros processos que não são essenciais para a viabilidade e por isso, são consideradas regiões com flexibilidade, livres para sofrerem recombinações, e experimentarem estruturas alternativas de adaptação (Figura 3) (Argueso *et al.*, 2009).

Figura 3 - Diversidade estrutural em *S. cerevisiae*: domínios conservados e variáveis do genoma. O modelo apresenta um conjunto de cromossomos homólogos hipotéticos em várias linhagens de *S. cerevisiae*. A linha superior (contínua cinza) retrata a configuração estrutural do cromossomo de uma primeira linhagem seqüenciada (isto é, a linhagem utilizada como referência), enquanto os cromossomos mostrados abaixo representam os rearranjos encontrados em outras linhagens.



Fonte: Adaptado de Argueso *et al.* (2009).

2.3 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

O processo de fermentação alcoólica é realizado sem esterilização prévia da cana-de-açúcar ou do caldo. Isso favorece o desenvolvimento de leveduras selvagens bem como de espécies de leveduras não *Saccharomyces* contaminantes. Por isso, a detecção, quantificação e identificação das leveduras e outros microrganismos são etapas importantes no processo industrial (Basílio, *et al.*, 2008).

A identificação das leveduras é tradicionalmente realizada por testes de assimilação e fermentação e/ou por critérios morfológicos. No entanto, tais métodos geralmente são trabalhosos e exigem tempo, além de não serem suficientes quando se deseja discriminar variedades dentro de uma mesma espécie (Flores-Berrios *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2006). Além disso, o comportamento das leveduras de mesma linhagem pode ser alterado de acordo com o ambiente em que

se encontram, ocorrendo assim, mudanças na morfologia da colônia. Por exemplo, Kuthan e colaboradores (2003) observaram que uma linhagem selvagem de *S. cerevisiae* isolada da natureza apresentava morfologia de colônia do tipo rugoso (linhagens de laboratório e comerciais geralmente apresentam morfologia de colônia do tipo liso). Por eletromicrografia de varredura, os autores verificaram que células de colônias rugosas eram conectadas por uma matriz extracelular e acompanharam a perda dessa matriz enquanto as células eram mantidas em ambiente favorável. Com o tempo, as leveduras passavam a apresentar morfologia de colônia lisa, tornando-se indistinguível das linhagens de *S. cerevisiae* de laboratório.

Diante disso, técnicas que tem como base a biologia molecular têm permitido identificar e caracterizar leveduras envolvidas no processo fermentativo. Os métodos moleculares se baseiam em estudos das moléculas de DNA e RNA e têm focado na identificação e diferenciação de linhagens de *S. cerevisiae* (Ratón, 2004).

Uma das metodologias mais utilizada como rotina na identificação de leveduras é a cariotipagem molecular por eletroforese em campo pulsado, o PFGE. Isso porque a técnica permite identificar linhagens de *S. cerevisiae* devido à grande variabilidade presente na constituição cromossomal das leveduras comerciais (Vezinhet *et al.* 1990; Pretorius, 2000). Apesar de ser utilizada no monitoramento em várias destilarias, tanto na fermentação de bebidas quanto na produção de etanol combustível, este método apresenta desvantagens por ser muito demorado, oneroso e inviável ao setor produtivo (Silva-Filho *et al.*, 2005b; Capece *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, diversas pesquisas vêm sendo realizadas na busca de técnicas moleculares que permitam o monitoramento do processo fermentativo de forma rápida, eficiente e não muito dispendiosa. As técnicas incluem o polimorfismo do fragmento de restrição do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA) (Querol *et al.*, 1992), reação em cadeia da polimerase (PCR), usadas para amplificação *in vitro* de regiões espaçadoras transcritas do DNA ribossômico (ITS) seguida de digestão com enzimas de restrição (PCR-RFLP) (Granchi *et al.*, 1999; Zarzoso *et al.*, 1999), polimorfismo de DNA-PCR amplificados aleatoriamente (RAPD-PCR) (Walczak *et al.*, 2007), eletroforese em gel com gradiente desnaturante do PCR de genes do RNA ribossômico (DGGE-PCR) (Manzano *et al.*, 2004) e análise de polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) (Flores-Berrios *et al.*, 2005; Lopandic *et al.*, 2007). Alguns autores utilizam algumas destas

técnicas de forma combinada, por exemplo, Agnolucci e colaboradores (2007) combinaram RFLP-mtDNA com ITS-PCR e RAPD-PCR para caracterizar linhagens selvagens de *Saccharomyces spp.* associadas ao processo de fermentação.

Trabalhos utilizando as técnicas RFLP-PCR/ITS e RFLP-mtDNA são os mais descritos na literatura para caracterizar leveduras presentes na fermentação do vinho. O PCR da região ITS do rDNA é uma técnica rápida e acessível. A região correspondente ao gene 5,8S rRNA flanqueado pelas regiões ITS 1 e 2, ou simplesmente região 5,8S-ITS, apresenta maiores diferenças interespecíficas do que os genes 18S e 28S rRNA (Cai *et al.*, 1996; James *et al.*, 1996; Kurtzman, 1992; Kurtzman, 1993; Zarzoso *et al.*, 1999). A amplificação da região ITS1 - 5,8S - ITS2 é muito utilizada para identificar vestígios de leveduras contaminantes no processo fermentativo (Basílio *et al.*, 2008), no entanto a técnica está limitada à identificação de espécies de leveduras. Muitas vezes, espécies pertencentes ao mesmo gênero costumam apresentar o mesmo padrão de bandas. Por exemplo, espécies do gênero *Saccharomyces* possui um fragmento correspondente a 850 pb. Sendo assim, as diferentes espécies deste gênero não podem ser distinguidas frente a esta técnica.

Digerir o fragmento amplificado pode garantir maiores informações quando se deseja diferenciar espécies (McCullough *et al.*, 1998; Granchi *et al.*, 1999; Redzepovic *et al.*, 2002; Combina *et al.*, 2008). Granchi e colaboradores (1999) conseguiram uma discriminação mais precisa das populações de leveduras presentes na fermentação do vinho com a técnica RFLP-PCR/ITS do que outros métodos tradicionais utilizados, mostrando que a técnica pode ser eficiente em monitorar alterações na comunidade de leveduras ao longo do processo fermentativo. Mesmo assim, quando se trata do gênero *Saccharomyces*, nem sempre o resultado é seguro. Com RFLP-PCR/ITS, McCullough e colaboradores (1998) não conseguiram separar linhagens da espécie *S. boulardii* dos isolados de *S. cerevisiae* com nenhuma das 10 endonucleases de restrição utilizadas no estudo.

A técnica RFLP-mtDNA foi primeiramente descrita na literatura para diferenciar leveduras de vinho (Querol *et al.*, 1992) e demonstrou ser um dos melhores métodos de diferenciação de linhagens (López *et al.*, 2001). Este método consiste no isolamento do DNA total da levedura e o uso de uma endonuclease de restrição reconhecadora de seqüências G-C. A enzima reconhece um alto número de sítios G-C no DNA nuclear, mas poucos no DNA mitocondrial, permitindo a

obtenção de fragmentos de mtDNA que podem ser visualizados em gel de agarose (López *et al.*, 2001).

Mais recentemente, técnicas que utilizam *primers* baseados em regiões intersequência simples repetitiva (ISSR) e microssatélites (SSR), que já são usadas extensivamente no estudo de populações de leveduras durante o processo de fabricação do vinho (Querol *et al.*, 1994; Vaudano & Garcia-Moruno, 2008), vêm sendo utilizadas com sucesso por pesquisadores de Pernambuco para diferenciar leveduras ao longo do processo de fermentação do etanol combustível (Silva-Filho *et al.*, 2005a; Silva-Filho *et al.*, 2005b; Lucena *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2007). Resultados confirmaram que o uso de um único *primer* baseado em regiões microssatélites [(CA)_n, (CT)_n, (GT)_n, (GAC)_n, (GTG)_n, (GACA)_n, (GATA)_n, (TGTC)_n] em uma reação denominada reação de amplificação de simples *primer* (SPAR- *Single Primer Amplification Reaction*), demonstrou ser uma poderosa ferramenta, pois, além de rápida, possui um bom poder discriminatório para de linhagens.

O estudo morfológico das leveduras e colônias pode complementar informações importantes para um melhor conhecimento sobre estas células. O processo de formação das colônias e a interação entre as células é um fenômeno pouco conhecido, mas está relacionada com a capacidade da levedura em produzir matriz extracelular, ou mesmo através da interação entre as células em diferentes estágios do ciclo celular, e também outros fatores tais como *mating-type*, esporulação, brotamento ou formação de pseudo-hifas (Gimeno *et al.*, 1992; Radford *et al.*, 1994; Varon & Choder, 2000; Kuthan *et al.*, 2003; Vopálenská *et al.*, 2005). Diversos trabalhos têm utilizado a microscopia eletrônica de varredura na tentativa de esclarecer o comportamento das células na formação da colônia. O microscópio eletrônico de varredura é capaz de mostrar mudanças no padrão de organização celular, como por exemplo, o padrão de brotamento ou formação de pseudo-hifas (Radford *et al.*, 1994; Kuthan *et al.*, 2003), e as interações célula-célula durante o desenvolvimento da colônia, no qual conseguem interagir entre si produzindo matriz extracelular em resposta a sinais ambientais (Varon & Choder, 2000; Kuthan *et al.*, 2003). Além disso, seu alto poder de magnitude revela microestruturas presentes na superfície das colônias e células impossíveis de serem observadas em um microscópio óptico (Radford *et al.*, 1994).

Desta forma, percebem-se em estudos recentes que as técnicas moleculares, adicionado aos métodos fenotípicos, são poderosas ferramentas para o monitoramento industrial e também no estudo da dinâmica da população de leveduras durante a fermentação, merecendo assim ser exploradas com o objetivo de utilização na área industrial como uma ferramenta que corrobora na manutenção da alta produtividade de etanol.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Estudar comparativamente metodologias moleculares e morfológicas de identificação de leveduras contidas no creme de levedo de usinas para sua utilização no monitoramento de processos fermentativos de produção de etanol.

Objetivos específicos:

- Verificar a viabilidade e eficiência da técnica RFLP-mtDNA quanto à capacidade em distinguir linhagens comerciais e contaminantes.
- Estudar com mais detalhe a morfologia das colônias lisas e rugosas dos isolados obtidos a partir do creme de levedo de usinas por meio da microscopia eletrônica de varredura.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS UTILIZADAS NO ESTUDO

4.1.1 Coleta

As leveduras utilizadas neste estudo são provenientes de processos fermentativos de produção de etanol do Estado do Paraná e interior do Estado de São Paulo. Estas amostras foram fornecidas pela Empresa Biovale S.A, sendo coletadas diretamente da dorna de fermentação, em diferentes unidades produtoras e tempos de fermentação (Tabela 1). As amostras foram processadas e armazenadas no Laboratório de Genética de Microrganismos do CCB/BIO da Universidade Estadual de Londrina.

Para caracterização do fermento, as amostras foram diluídas e uma alíquota foi plaqueada em meio YPD-ágar (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose 2% Agar-agar), com o auxílio da alça de Drigalsky, para obtenção de colônias isoladas. Após o crescimento a 28-30°C por 48 horas, as diferentes linhagens foram caracterizadas previamente através da morfologia das colônias com o auxílio do microscópio estereoscópio.

4.1.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E SELEÇÃO DOS ISOLADOS

Com base em características morfológicas, foram diferenciados leveduras com dois tipos distintos de colônias presentes no fermento industrial: colônias lisas (L) e colônias rugosas (R), como mostram as figuras 4 A e 4 B. Colônias rugosas são típicas de leveduras contaminantes, por isso, dois isolados com este tipo de morfologia de cada unidade produtora foram selecionados para o estudo. Um isolado com aspecto liso de cada unidade também foi selecionado para observar se o perfil seria semelhante aos isolados rugosos (Tabela 2). Além destas, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* comerciais CAT-1, BG-1, PE-2 e SA-1 (fornecidas pela UNICAMP), de laboratório NCYC 738 e NCYC 1006, além da espécie *Saccharomyces boulardii*, foram utilizadas como padrões para comparação (Tabela 3).

Tabela 1 - Unidade e data da coleta do fermento industrial

<i>Unidade</i>	<i>Coleta</i>
Usina Londra-SP	Setembro/ Safra de 2006 Maio/ Safra de 2008
Usina Goioerê-PR	Setembro/ Safra de 2006 Abril/ Safra de 2007
Usina Pioneiros-SP	Outubro/ Safra de 2006 Junho/ Safra de 2007
Usina Vale do Ivaí-PR	Maio/ Safra de 2007 Agosto/ Safra de 2008
Usina Da Calda-PR	Outubro/ Safra de 2006 Outubro/ Safra de 2008
Usina Cooperval-PR	Novembro/ Safra de 2006 Julho/ Safra de 2008

Figura 4 - Aspecto morfológico das colônias de leveduras isoladas a partir do fermento industrial das usinas. **A.** Colônias lisas (morfologia característica de linhagens comerciais). **B.** Colônias rugosas (morfologia característica de leveduras contaminantes).

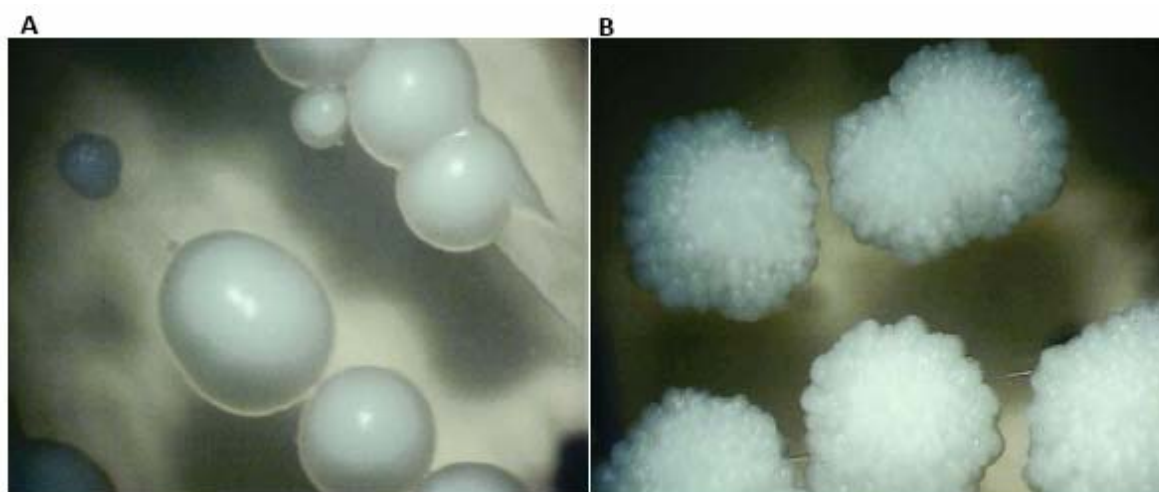


Tabela 2 - Isolados obtidos de Usinas de produção de etanol utilizadas no estudo

<i>Unidade</i>	<i>Isolado</i>	<i>Colônia</i>
Usina Londra Setembro/2006	1	Lisa
	2	Rugosa 1
	3	Rugosa 2
Usina Londra Maio/2008	4	Lisa
	5	Rugosa 1
	6	Rugosa 2
Usina Goioerê Setembro/2006	7	Lisa
	8	Rugosa 1
	9	Rugosa 2
Usina Goioerê Abril/2007	10	Lisa
	11	Rugosa 1
	12	Rugosa 2
Usina Pioneiros Outubro/2006	13	Lisa
	14	Rugosa 1
	15	Rugosa 2
Usina Pioneiros Junho/2007	16	Lisa
	17	Rugosa 1
	18	Rugosa 2
Usina Vale do Ivaí Maio/2007	19	Lisa
	20	Rugosa 1
	21	Rugosa 2
Usina Vale do Ivaí Agosto/2008	22	Lisa
	23	Rugosa 1
	24	Rugosa 2
Usina Da Calda Outubro/2006	25	Lisa
	26	Rugosa 1
	27	Rugosa 2
Usina Da Calda Outubro/2008	28	Lisa
	29	Rugosa 1
	30	Rugosa 2
Usina Cooperval Novembro/2006	31	Lisa
	32	Rugosa 1
	33	Rugosa 2
Usina Cooperval Julho/2008	34	Lisa
	35	Rugosa 1
	36	Rugosa 2

Tabela 3 Amostras padrões

<i>Linhagem</i>	<i>Espécie</i>
CAT-1 ^a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PE-2 ^a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
BG-1 ^a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SA-1 ^a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NCYC 738 ^b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NCYC 1006 ^b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
17 ^d	<i>Saccharomyces boulardii</i>

^a Leveduras comerciais, ^b Leveduras de laboratório, ^d Levedura probiótica

4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

4.2.1 Cariotipagem Eletroforética em Campo Pulsado (PFGE)

Para a Eletroforese em Campo Pulsado, a preparação do DNA cromossomal intacto das leveduras foi realizada conforme Schwartz & Cantor (1984), com algumas modificações. Após o crescimento *overnight*, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão TE (Tris 10 mM/ EDTA 50 mM pH 7,5), incluídas em *plugs* de *Agarose Low Melting* 1% + liticase (20 mg/mL em 10 mM de fosfato de sódio pH 7,5) e incubadas em tubos de centrifuga contendo tampão LET (Tris 10 mM/ EDTA 500 mM) a 37°C por 8 horas. Após esse período, o tampão foi trocado pelo NDS (Tris 10 mM/ EDTA 500 mM pH 9,5, N-Lauril-sarcosinato de sódio 1%, proteinase K fresca 2 mg/mL) e os tubos mantidos *overnight* sob agitação a 50°C. Os *plugs* foram lavados 4 vezes em TE pH 7,5 (intervalo de 1 hora em cada lavagem) e mantidos em TE pH 7,5 a 4°C. A análise dos cromossomos foi realizada pelo sistema Gene Navigator®, baseado no método CHEF, e a corrida do gel de agarose 1%, mantido em TBE 0,5x a 14°C, foi realizada a 6 Vcm⁻¹ por 15h com pulso de 70s e por 11h com pulso de 120s. Após a eletroforese, o gel foi revelado com brometo de etídio e fotografado.

4.2.2 Isolamento do DNA

As leveduras isoladas foram cultivadas em meio YPD líquido e incubadas *overnight* a 28°C em agitador orbital a 100 rpm. Após este período, as células foram lavadas com água destilada, centrifugadas e ressuspensas em 200 uL de tampão de lise (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM, Tris-HCl 1 mM pH 8), e submetidas à agitação com pérolas de vidro para quebra da parede celular (Ausubel *et al.*, 2003) na presença de 200 uL de fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:1). Em seguida, foi adicionado 200 uL de TE (Tris 50 mM/ EDTA 20 mM) pH 8 e, após centrifugação, a fase aquosa foi coletada. O DNA foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto, ressuspendido em 400 uL de TE + 10 uL de acetato de amônia (4 M) e novamente precipitado com etanol absoluto. O produto final foi eluído em 40 uL de água MilliQ e estocado a 4°C. Uma alíquota do DNA estoque foi utilizada para determinar a concentração.

4.2.3 Amplificação da região ITS pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os fragmentos de DNA ribossomal (ITS1 - 5,8S - ITS2) de todas as linhagens de leveduras foram amplificados buscando confirmar a posição taxonômica dos isolados. Para a reação de PCR foram utilizados os primers ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), conforme descrito por White e colaboradores (1990). A reação de PCR continha tampão 1 X da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 37,5 nmols de MgCl₂, 5 nmols do mix de dNTP, 12,5 nmols de cada primer, 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 10 ng de DNA da amostra em um volume final de 25 uL. A amplificação foi realizada em termociclador previamente programado para 35 ciclos após desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos. Cada ciclo de amplificação compreendia de 3 etapas: desnaturação (94°C por 1 min), pareamento (56°C por 1 min) e extensão (72°C por 1 min e 30 seg), com extensão final de 72°C por 5 min. 3 uL do produto final de amplificação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, corrido em tampão TBE 0,5X a 7,5 V/cm por 90 min, revelado em brometo de etídio e fotografado.

4.2.4 Perfil de Restrição do DNA Mitocondrial (RFLP-mtDNA)

O método baseado na análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial realizado é uma adaptação do descrito por Querol e colaboradores (1992). Nesta técnica, o DNA foi digerido com a enzima *Hinfl* (Invitrogen) e mantida a 37°C por no mínimo 5 horas. A reação continha 17,5 uL de DNA (1000 - 1700 ng), 0,5 uL da enzima (5 U) e 2,0 uL do tampão da enzima (1x concentrado). A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,3%, que foi revelado com brometo de etídio e fotografado.

4.2.5 Construção dos Dendogramas

As matrizes resultantes das análises de PFGE e RFLP-mtDNA foram utilizadas para calcular o Índice de Similaridade de Jaccard, e a relação entre os isolados e as amostras padrões foi estimada através da construção de dendogramas tendo como base o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using

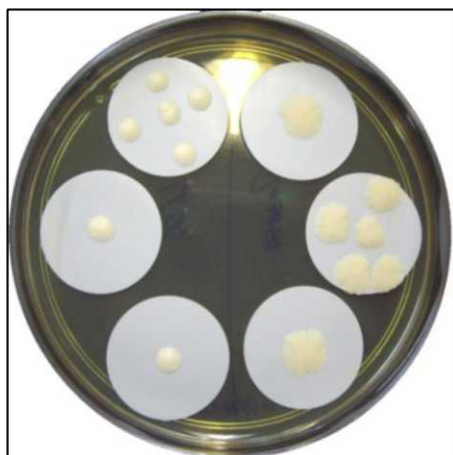
Arithmetic Averages). As análises foram realizadas com o programa NTSYS-pc versão 2.1 (Rohlf, 2001) e o teste de reamostragem (Bootstrap: 2000 replicações) foi realizado com programa WinBoot (Yap & Nelson, 1996).

4.3 ESTUDO DA MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS LISAS E RUGOSAS POR MEIO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

4.3.1 Preparação das Amostras em Meio Sólido

Alguns isolados de colônias lisas e rugosas foram escolhidos para um estudo mais detalhado de suas estruturas. Os protocolos utilizados foram feitos conforme Whittaker & Drucker (1970), modificando as etapas de desidratação com álcool etílico pela liofilização. Para que as colônias pudessem ser observadas intactas, neste protocolo não se usou glutaraldeído para fixação das células, pois ao ser adicionado, desmanchavam as colônias. As amostras foram, portanto, inoculadas sobre filtros de acetato de celulose com poros de 0,45 μm de diâmetro depositados na superfície de placas contendo meio YPD sólido, de modo que as colônias pudessem crescer absorvendo os nutrientes que passam pelos poros, mas sem entrar em contato com o ágar, pois resíduos de ágar sobre as colônias poderiam prejudicar a observação (Figura 5). As placas foram mantidas a 28-30°C por 48 horas, e após esse período, os filtros com as colônias crescidas foram retirados e levados para liofilização por cerca de uma hora a - 47°C a 0,0063 mBar.

Figura 5 - Isolados de colônias lisas e rugosas crescidos sobre filtros de acetato de celulose depositados na superfície de placas contendo meio YPD sólido.



4.3.2 Observação em Microscópio Eletrônico de Varredura

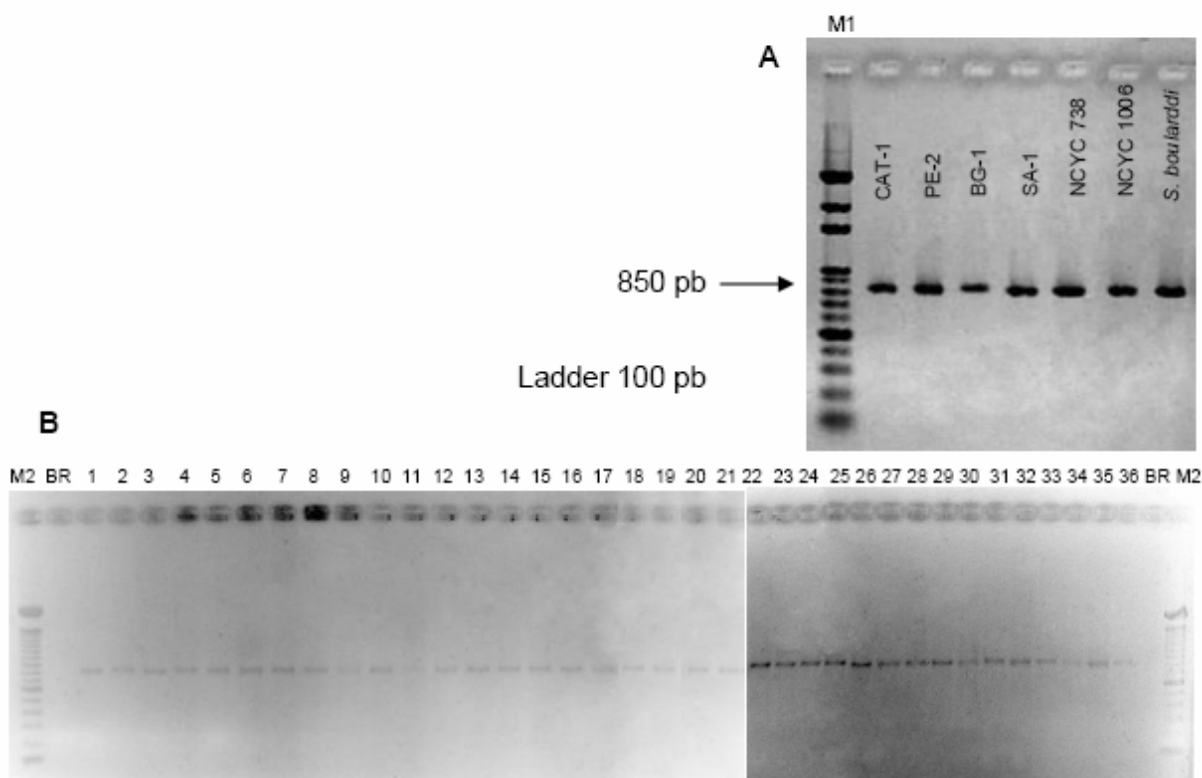
As colônias secas foram coladas com fita de carbono em *stubs* de alumínio e com uma camada de 20 nm de ouro coloidal. Os espécimes foram analisados em microscópio eletrônico de varredura (FEI, Quanta 200) a 20 KV e fotografadas em várias magnitudes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amplificação da Região ITS1 - 5,8S - ITS2

Todas as amostras testadas, inclusive as linhagens padrões, apresentaram um fragmento com o tamanho de 850 pb (Figura 6). Este fragmento é característico da espécie *S. cerevisiae*. Pôde-se, desta forma, confirmar que todas as amostras utilizadas durante o estudo, são pertencentes ao gênero *Saccharomyces*. Segundo Basílio e colaboradores (2008), as leveduras contaminantes mais comumente encontradas em processos de produção de etanol, apresentam fragmentos ITS de 400 pb (*Candida intermédia*) e *C. lusitâniae*), 450 (*C. pararugosa*), 480 (*C. xylopsoci*), 540 (*Pichia fermentans*), 650 pb (*P. anomola* e *P. caribbica*), e 850 pb (*S. cerevisiae*), tornando possível caracterização preliminar das leveduras, através desta técnica.

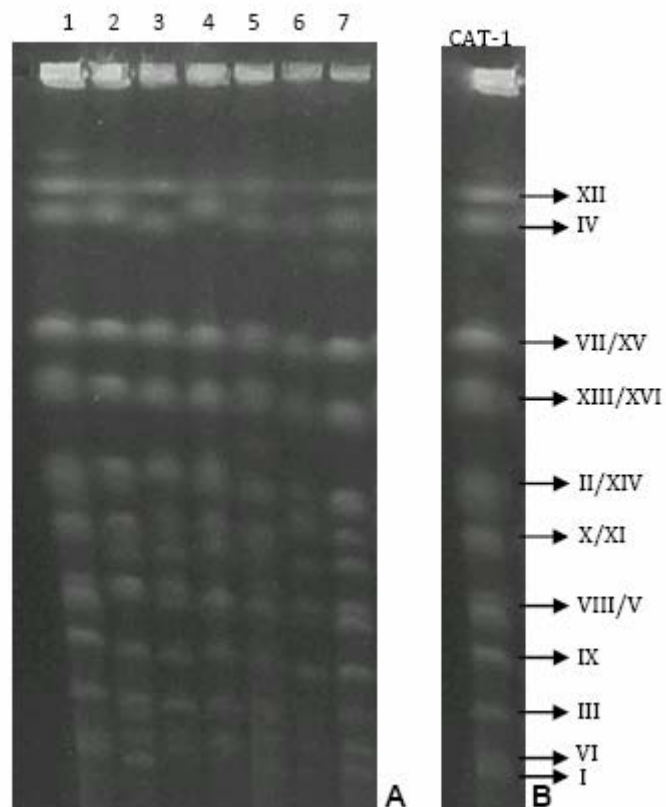
Figura 6 - Fragmento amplificado da região ITS1-5,8S-ITS2 das amostras padrões (A) e dos isolados das usinas (B). M1=Marcador molecular Ladder 100 pb (500), M2=Marcador molecular Ladder 100 pb (600)



5.2 ANÁLISE DO PERFIL DE BANDAS DO PFGE

Conforme descrito na literatura, os resultados demonstram que a técnica de PFGE possibilita a identificação de linhagens de uma mesma espécie, através da distribuição dos cromossomos. A Figura 6 mostra os cariótipos eletroforéticos das linhagens utilizadas em Usinas de produção de etanol CAT-1, PE-2, BG-1 e SA-1, além de linhagens padrão de laboratório, todas *S. cerevisiae*. Houve polimorfismo entre todas as amostras testadas e pôde-se, através desta técnica, visualizar os cromossomos e sua distribuição conforme os respectivos pesos moleculares.

Figura 7 - Cariótipo Molecular das linhagens padrões em detalhe. **A.** Linhas 1 (CA-1), 2 (PE-2), 3 (BG-1), 4 (SA-1), 5 (NCYC 738), 6 (NCYC 1006), 7 (*S. boulardii*). **B.** Detalhe dos cromossomos da linhagem CAT-1, estimados através da similaridade entre o padrão de bandas do marcador molecular **S288C**



Os resultados obtidos a partir do PFGE mostram alto polimorfismo entre as linhagens lisas e rugosas das usinas, formando 19 grupos a 80% de similaridade, baseado no índice de Jaccard (Figura 8). Dos 36 isolados testados, 17 puderam ser incluídos em grupos das linhagens comerciais encontradas (**1** da Usina Londra 2006, **13, 14 e 15** da Usina Pioneiros 2006, **19, 20 e 21** da Usina Vale do Ivaí 2007 - CAT-1; **10 e 11** da Usina Goioerê 2007, **28** da Usina Da Calda 2008 e **31 e 32** da Usina Cooperval 2006 - PE-2; **16, 17 e 18** da Usina Pioneiros e **22 e 24** da Usina Vale do Ivaí 2008 - SA-1). Os isolados restantes das usinas citadas acima (2 e 3; 12; 29 e 30; 33; e 23, respectivamente) e todos os isolados das usinas Londra 2008 (4, 5 e 6), Goioerê 2006 (7, 8 e 9), Da Calda 2006 (25, 26 e 27) e Cooperval 2008 (34, 35 e 36) apresentaram perfis inespecíficos (PI) e não foram incluídos a nenhum grupo das linhagens padrões (Figura 9).

Figura 8 - Dendograma UPGMA das amostras padrões e dos isolados das usinas a partir do PFGE. Os valores sobre os ramos indicam os valores de bootstrap (2000 replicações)

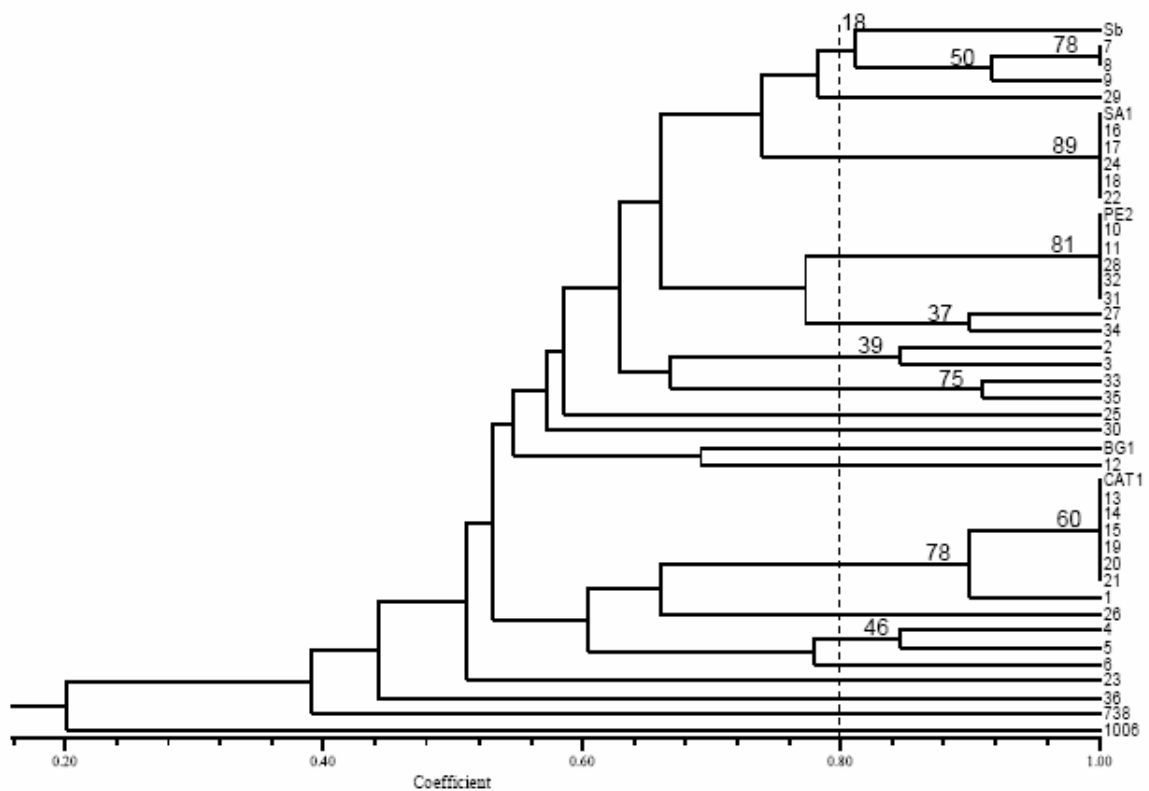
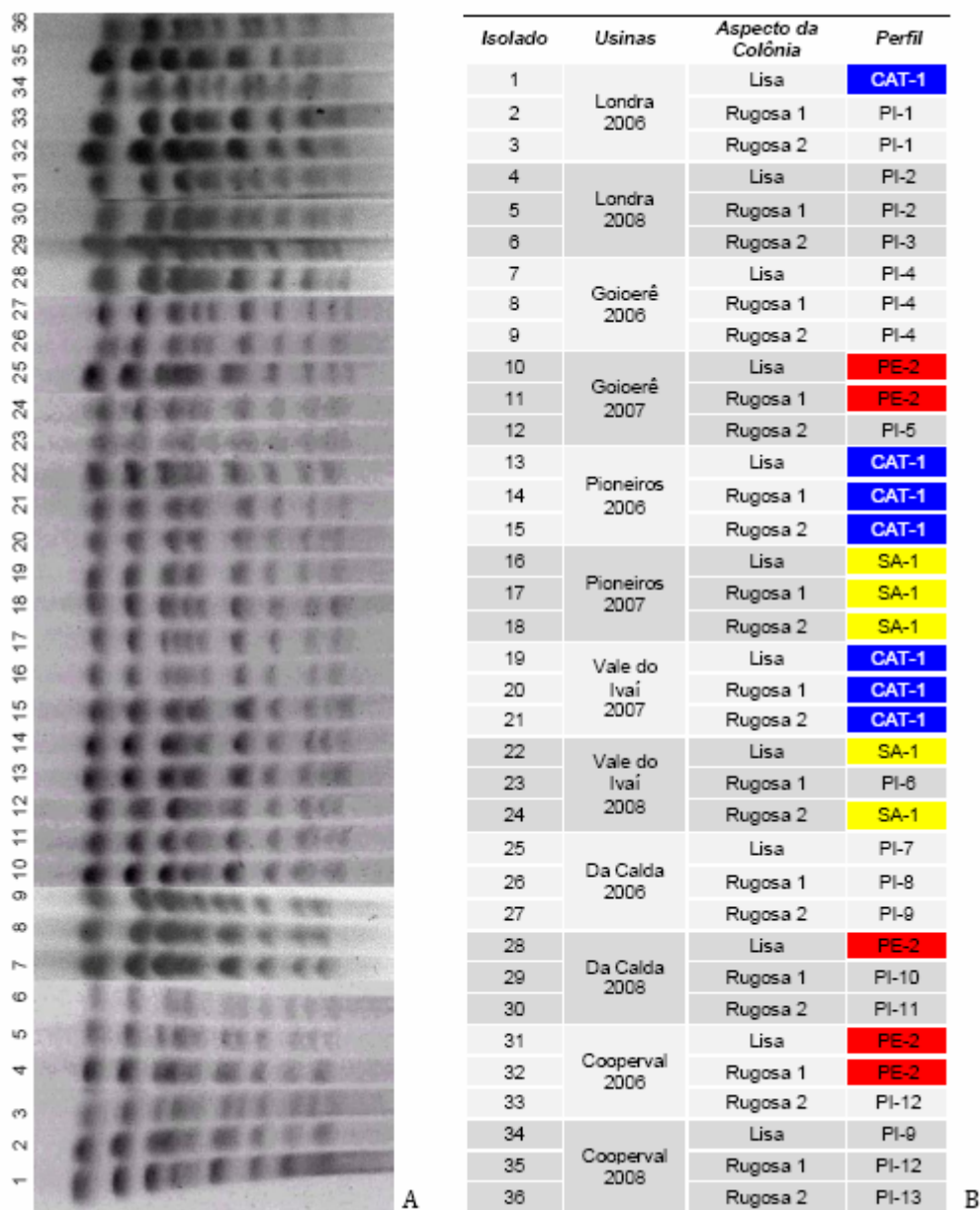


Figura 9 - Cariótipo molecular por PFGE dos isolados das usinas. Linhas 1, 13-15 e 19-21 (CAT-1); 10, 11, 28, 31, 32 (PE-2); 16-18, 22 e 24 (SA-1); 2-9, 12, 23, 25-27, 29, 30, 33-36 (Inespecífico - 13 perfis diferentes que não foram incluídos nos grupos das linhagens comerciais) **B**. Identificação das amostras de cada usina baseado no dendograma construído a partir da análise dos cariótipos. PI=perfil inespecífico.

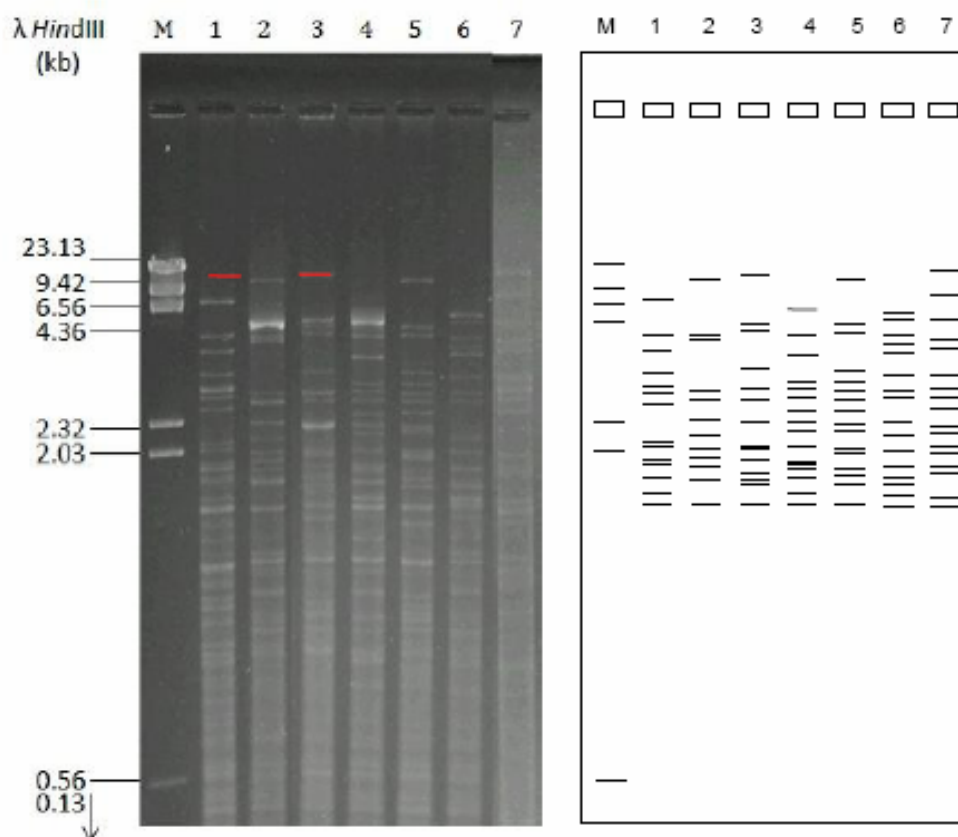


Um fato intrigante obtido com a técnica foi que amostras lisas e rugosas apresentaram perfis semelhantes entre si, principalmente quando observados dentro de uma mesma usina (ver Figura 9). A identificação de leveduras através da morfologia da colônia é utilizada como rotina no monitoramento do processo de fermentação, devido à capacidade das leveduras selvagens em formar colônias com aspecto diferente das linhagens de laboratório e das linhagens comerciais ("domesticadas"). Neste estudo, as leveduras que se organizaram em colônias rugosas foram caracterizadas previamente como selvagens. No entanto, os resultados obtidos a partir do PFGE sugerem que o comportamento dessas leveduras estaria sendo influenciado por condições ambientais. O processo de fermentação do etanol é um ambiente estressante para as leveduras, visto que estão submetidas a altas temperaturas e concentração de etanol, pH ácido, estresse osmótico, falta de nutrientes, contaminação por bactérias e outras leveduras selvagens, além de serem constantemente recicladas durante o todo o período da safra. Depois de expostas a estes diferentes tipos de estresse, as leveduras precisam construir uma resposta celular rápida que visa proteger os componentes celulares contra danos (Silva-Filho, 2005a), que pode acarretar em mudanças na expressão de diferentes genes que muitas vezes resulta em mudanças na morfologia. Foi relatado na literatura que genes que codificam elementos *Ty* e vários genes presentes em regiões subtelméricas são induzidos por sinais ambientais (estresse, por exemplo), interferindo na diferenciação da morfologia da colônia em leveduras (Kuthan *et al.*, 2003).

5.3 ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DE RFLP-MTDNA

A digestão do DNA mitocondrial com a enzima *Hinf* I possibilitou a diferenciação de variedades dentro de uma mesma espécie. A técnica de RFLP-mtDNA revela padrões definidos para cada uma das linhagens *S.cerevisiae* comumente utilizadas em usinas da região sul e sudeste do Brasil. Outras técnicas moleculares descritas na literatura, não conseguem distinguí-las. A Figura 10 mostra claramente que as linhagens comerciais CAT-1, PE-2, SA-1 e BG-1, as linhagens de laboratório NCYC 738 e NCYC 1006, e a linhagem de *S. boulardii* possuem perfis diferentes frente a esta metodologia.

Figura 10 - Perfil eletroforético do DNAm_t das amostras padrões digerido com a enzima *Hinf*I. M=marcador molecular λ *Hind*III. Linhas 1-6 *Saccharomyces cerevisiae* (1. NCYC 738, 2. NCYC 1006, 3. BG-1, 4. CAT-1, 5. PE-2, 6. SA-1); 7 *Saccharomyces boulardii*. As linhas vermelhas representam resto de DNA total não digerido.



Através dessa técnica, foi possível observar 13 grupos a 80% de similaridade, baseado no índice de Jaccard (Figura 11). Dos 36 isolados, 22 foram incluídos em grupos das linhagens comerciais encontradas (**1** e **2** da Usina Londra 2006, **13**, **14** e **15** da Usina Pioneiros 2006, **19**, **20** e **21** da Usina Vale do Ivaí 2007 e **27** da Usina Da Calda 2006 – CAT-1; **10** e **11** da Usina Goioerê 2007, **28** e **30** da Usina Da Calda 2008, **31** e **32** da Usina Cooperval 2006 e **34** da Usina Cooperval 2008 – PE-2; **16**, **17** e **18** da Usina Pioneiros, **22**, **23** e **24** da Usina Vale do Ivaí 2008 – SA-1) e o restante foi incluído em grupos com perfis inespecíficos. Até o fim deste estudo, não foi possível obter um perfil confiável dos isolados **25** e **26**, da usina Da Calda 2006, e do isolado 36 da Usina Cooperval 2008. Também foram observadas linhagens lisas e rugosas com mesmo perfil de restrição, confirmando mais uma vez que a diferença na morfologia de colônia estaria sendo influenciada pelo ambiente (Figura 12).

Figura 11- Dendograma UPGMA das amostras padrões e dos isolados das usinas a partir do RFLP-mtDNA. Os valores sobre os ramos indicam os valores de bootstrap (2000 replicações)

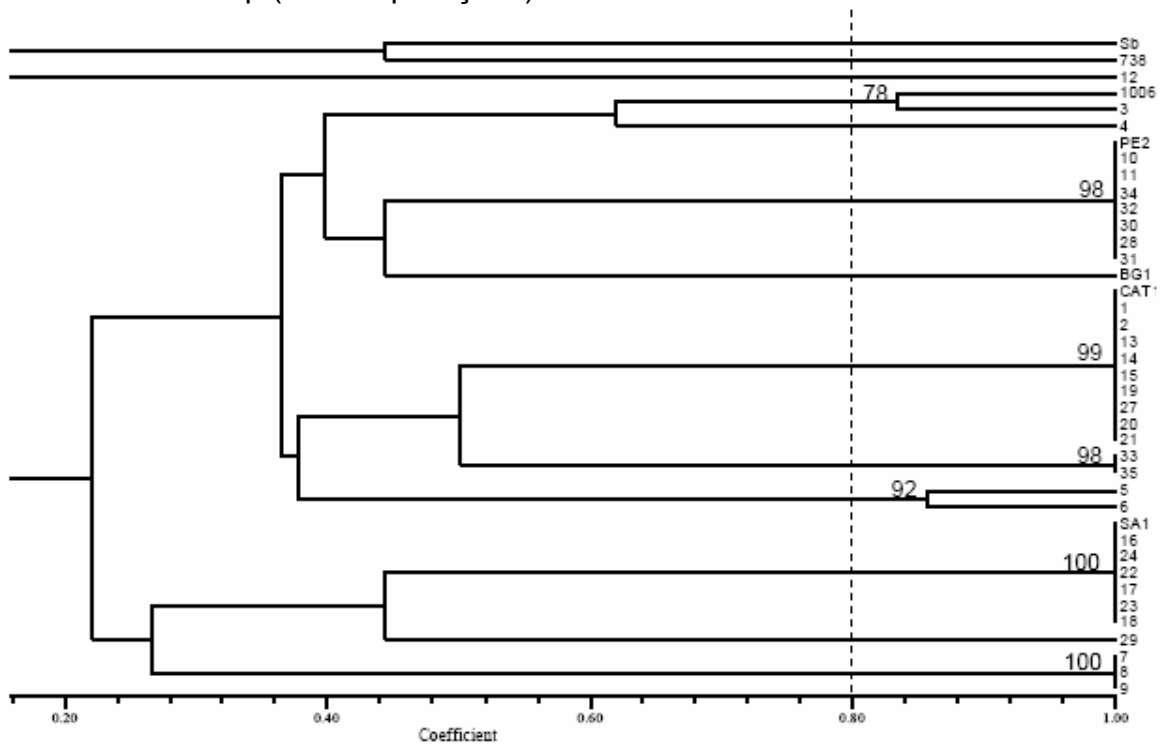
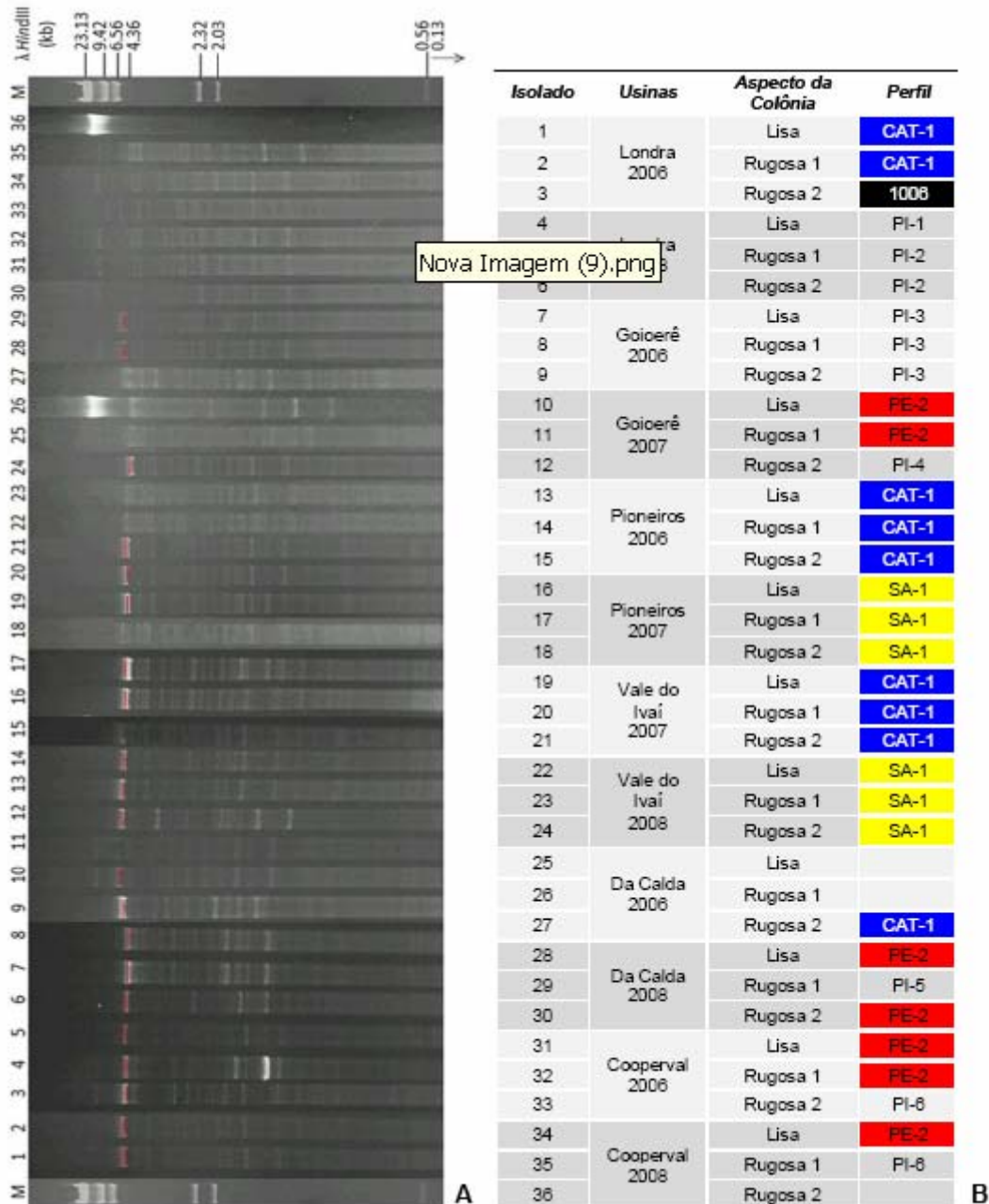


Figura 12 A - Perfil eletroforético do DNAm_t digerido com a enzima *Hind*III dos isolados das usinas. M=marcador molecular A *Hind*III. Linhas 1, 2, 13-15, 19-21 e 27 (CAT-1); 10, 11, 28, 30-32 e 34 (PE-2); 16-18, 22-24 (SA-1); 3 (NCYC 1006); 4-9, 12, 29, 33 e 35 (Inespecífico - 6 perfis diferentes que não foram incluídos nos grupos das linhagens padrões); 25, 26 e 36 não obtiveram perfis. As linhas vermelhas representam resto de DNA total não digerido. **B.** Identificação dos isolados de cada usina baseado no dendograma construído a partir da análise dos perfis de restrição. PI=perfil inespecífico.



Diferente do que ocorreu com a técnica PFGE, no RFLP-mtDNA os isolados **2** da Usina Londra 2006 e **27** da Usina Da Calda 2006 foram incluídos no grupo da linhagem CAT-1, o **23** da Usina Vale do Ivaí foi incluído no grupo da linhagem SA-1 e o isolado **30** da Usina Da Calda 2008 foi incluído no grupo da linhagem PE-2 (Figura 12). Além disso, incluiu os isolados com perfis inespecíficos **5** e **6** da Usina Londra 2008 no mesmo grupo (92% de similaridade) e o isolado **3** da Usina Londra 2006 ao da linhagem **NCYC 1006** (78% de similaridade), sendo que na PFGE, esses isolados tinham sido separados. Este resultado acarretou da técnica RFLP-mtDNA ter diferenciado menos perfis que PFGE (13 contra 19, respectivamente), mesmo tendo separado os isolados **4** e **5** da Usina Londra 2008 que tinham sido incluídos no mesmo grupo no PFGE (46% de similaridade). Além do isolado **27** da Usina Da Calda 2006 não ter sido incluído no grupo da linhagem CAT-1 na PFGE, esta técnica incluiu-o no mesmo grupo do isolado **34** (37% de similaridade), que foi considerado PE-2 na RFLP-mtDNA.

Ao comparar os resultados obtidos com a técnica RFLP-mtDNA aos da PFGE, já que esta técnica é bastante sensível quando se deseja diferenciar linhagens dentro de uma mesma espécie (Schuller *et al.*, 2004), pode-se concluir que a identificação de linhagens com o mesmo padrão ou pode indicar a sua origem clonal, mesmo sendo de diferentes áreas geográficas, ou pode ser indicativo de uma capacidade de limitação de um determinado método em discriminar as linhagens individuais (Argueso *et al.*, 2009). No entanto, o alto nível de polimorfismos encontrado em linhagens comerciais pode gerar falsas interpretações que leva ao erro na diferenciação das linhagens (Silva-Filho *et al.*, 2005b).

A técnica PFGE é muito utilizada para verificar rearranjos cromossomais. Por meio desta, Lopes (2000) e Lopes e colaboradores (2002) isolaram 273 variantes da linhagem PE-2 com rearranjos no cromossomo em 12 destilarias que usavam esta levedura como inóculo inicial (apud Basso *et al.*, 2008). Estudos relacionados com leveduras usadas na fermentação relatam que rearranjos nos cromossomos podem ser um dos fatores envolvidos na adaptação destas células ao ambiente industrial (Pretorius, 2000; Lucena *et al.*, 2007; Schuller *et al.*, 2007; Argueso *et al.*, 2009; Blondin *et al.*, 2009). De acordo com o modelo "Renovação do Genoma", as linhagens comerciais tendem a ser homozigotas para a maioria dos genes, pois são diplóides derivados de células com ciclo de vida do tipo homotático. Neste tipo de ciclo, imediatamente após a meiose, o esporos haplóides

alteram seu mating-type de **a** para **a** e vice-versa, seguido de auto-cruzamento para restaurar seu estado diplóide. Este processo poderia fornecer as populações de leveduras um mecanismo pelo qual as células que carregam mutações recessivas deletérias poderiam ser eliminadas do genoma, permitindo que estas se adaptem a mudanças no ambiente (Pretorius, 2000). Mortmer (2000) propôs este modelo para explicar a adaptação das leveduras do vinho ao ambiente estressante (apud Schuller *et al.*, 2007; Blondin *et al.*, 2009) e está servindo como base para outros pesquisadores (Lucena *et al.*, 2007; Basso *et al.*, 2008; Argueso *et al.*, 2009), incluindo este trabalho, para explicar a existência de variantes das linhagens produtoras de etanol combustível no processo fermentativo.

Como o DNA mitocondrial não segue os padrões mendelianos de segregação, ou seja, o DNA mitocondrial não sofre recombinação como ocorre entre os cromossomos homólogos do DNA nuclear, sua base genética é altamente conservada e as variações entre espécies e linhagens dependem da quantidade de introns localizados entre os genes. As recombinações que podem existir entre os introns do mtDNA permitem que estudos genéticos e evolutivos de populações relacionadas sejam realizados através do RFLP (Arias & Malachias, 2004). Este é mais um indicativo de que os diferentes resultados observados entre os perfis dos isolados nas técnicas comparadas, no PFGE correspondem às variantes das linhagens comerciais que sofreram recombinações, uma vez que, a RFLP-mtDNA mostram que as referidas amostras estão correlacionadas, pois os valores de bootstrap obtidos com a técnica são altos (78-100% contra 18-89% do PFGE). Portanto, pode-se concluir que a técnica RFLP-mtDNA é eficiente em discriminar linhagens, mas não é capaz de revelar variabilidade genética.

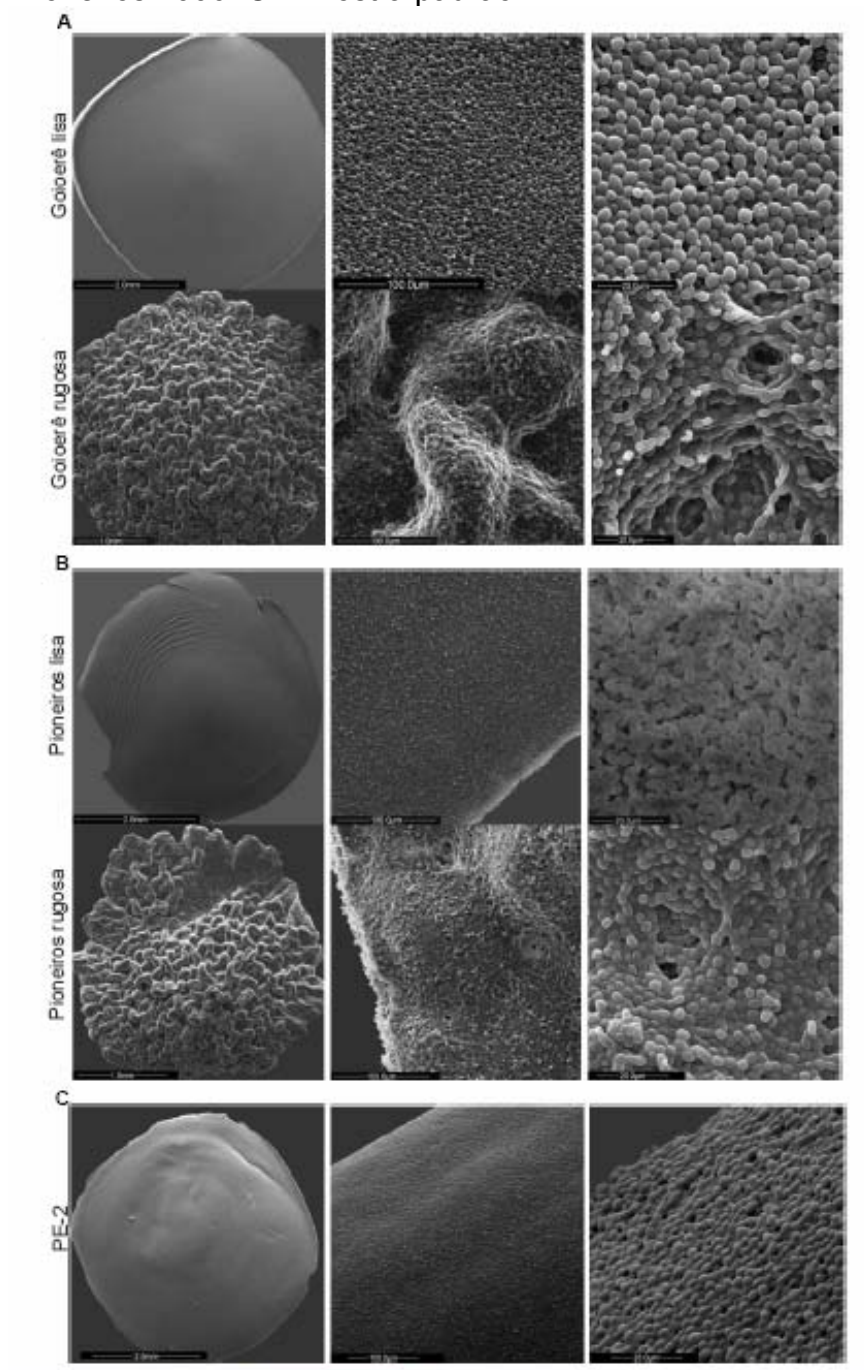
5.4 MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DAS LEVEDURAS:

5.4.1 Colônias Lisas e Rugosas

No fermento industrial foram encontrados dois tipos distintos de colônias, as lisas e as rugosas. O PFGE confirmou que os isolados 10 e 11 da Usina Goioerê 2007, com colônias lisas e rugosas respectivamente, são próximos geneticamente. O mesmo ocorreu com os isolados da Usina Pioneiros 2006 13 e 14 com colônias lisas e rugosas, respectivamente. Estes isolados foram submetidas à

microscopia eletrônica de varredura para uma visualização mais detalhada da morfologia das colônias. Assim como as visualizadas em placas com o auxílio de estereoscópio, as colônias lisas das duas unidades foram bem distintas das colônias rugosas (Figura 13 A e B). A linhagem padrão PE-2 também foi observada em MEV e usada como referência (Figura 13 C).

Figura 13 - Morfologia das colônias lisas e rugosas por microscopia eletrônica de varredura. **A.** Isolados da usina Goioerê 2007. **B.** Isolados da usina Pioneiros 2006. **C.** Amostra padrão PE-2.



5.4.2 Organização das Células nas Colônias

Os resultados obtidos com a MEV mostraram que a organização das células nos dois tipos de colônias era distinta, tanto nos isolados Goioerê quanto nos isolados Pioneiros. Nas colônias lisas, as células parecem estar individualizadas, com exceção de pequenos brotos ligados a célula-mãe, exibindo modos de brotamento aleatório, axial (o novo broto surge adjacente a cicatriz) e polar, isto é, o novo broto surge do lado oposto ao da primeira cicatriz (bipolar) ou do lado oposto ao nascimento (monopolar) (Figura 14 A e C). Dessa forma, as células permaneciam igualmente distribuídas por toda colônia e sem espaços, dando a esta um aspecto liso (Figura 15 A e B). Já nas colônias rugosas, a morfologia com estruturas que deixa a superfície com aspecto rugoso parece estar ligada a formação de aglomerados de células interconectadas e que se organizam em agregados maiores (Figura 15 C e D). A formação desses agregados parece estar ligada ao modo como as células presentes nesse tipo de colônia brotam. Ao contrário das células presentes nas colônias lisas, as células **Cs** colônias rugosa**D** parecem exibir um padrão polarizados de brotamento, formando extensões de células conectadas semelhantes a hifas (Figura 14 B e D). Alta produção de matriz extracelular também pode estar envolvida na formação de colônias rugosas, pois permitem que as células fiquem separadas, porém conectam os grupos individuais dentro dos agregados maiores (Figura 15 C e D). Nos isolados observados e nas linhagens padrões também foi observada a presença de uma matriz cobrindo a superfície das colônias lisas e rugosas, mas não com diferenças significativas entre as duas. É possível que o protocolo de fixação utilizado neste estudo não tenha preservado a matriz extracelular.

Figura 14- Padrão de brotamento das células de colônias lisas e rugosas. No brotamento polarizado, as células permanecem conectadas (setas). **A.** Células da colônia lisa do isolado da usina Goioerê com brotamento aleatório. **B.** Células da colônia rugosa do isolado da usina Goioerê com brotamento polarizado. **C.** Células da colônia lisa do isolado da usina Pioneiros com brotamento aleatório. **D.** Células da colônia rugosa do isolado da usina Pioneiros com brotamento polarizado.

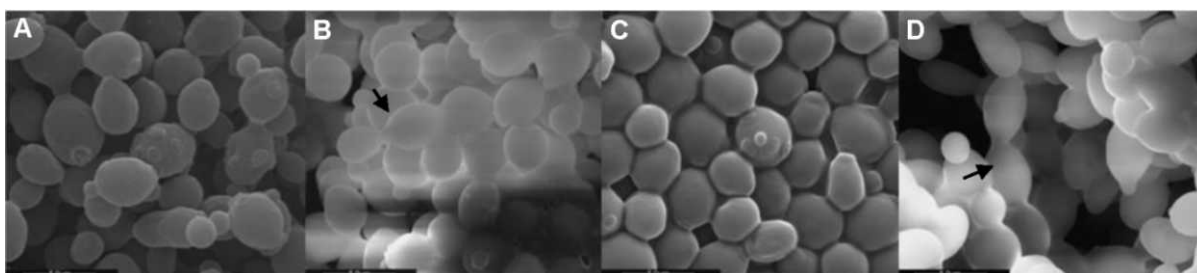
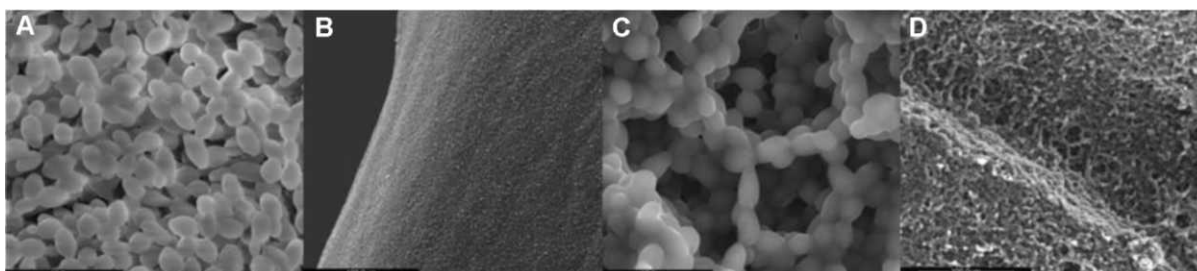


Figura 15 - Organização das células nas colônias lisas e rugosas. **A.** Células de colônia lisa distribuídas uniformemente. **B.** Aspecto da superfície da colônia lisa. **C.** Células de colônia rugosa interconectadas formando aglomerados. **D.** Aspecto da superfície da colônia rugosa



Apesar de pouco conhecido, diversos autores relacionam o processo de formação de colônias lisas ou rugosas, entre outras, com a capacidade das células em produzir matriz extracelular e/ou com seu padrão de brotamento ou formação de pseudo-hifas (Gimeno *et al.*, 1992; Varon & Choder, 2000; Kuthan *et al.*, 2003; Vopálenská *et al.*, 2005).

Em *S. cerevisiae* a divisão celular polarizada é controlada geneticamente (Drubin, 1991; Sherman, 1998). Em cultura líquida, células haplóides (a ou a) brotam exclusivamente de maneira axial, enquanto células diplóides (a/a) brotam polarizadas, de modo que o brotamento pode ser somente ao pólo oposto ao seu nascimento, (padrão monopolar - pseudohifas) ou em ambos os pólos (padrão bipolar) (Vopálenská *et al.*, 2005). Os genes *RSR1/BUD1*, *BUD2*, e *BUD5* convertem o modo de brotamento aleatório para polarizado, enquanto os genes *BUD3* e *BUD4* mudam de polar para axial. Em células a/a, a presença de um repressor a1a2 inibe a

ação dos genes *BUD3* e *BUD4*, de modo que as células permanecem com o padrão de polarizado (Gimeno *et al.*, 1992). No entanto, Vopálenská *et al.* (2005) mostraram que em cultura sólida, o padrão de brotamento das células na colônia não é uniforme. Em colônias com linhagens haplóides, que em cultura líquida cresceria exclusivamente de forma axial, foram observadas células brotando de maneira bipolar e aleatória. O mesmo ocorreu em colônias com linhagens diplóides, onde grande número de células que brotariam somente de maneira polarizada em meio líquido, estavam também brotando de forma aleatória. Esse tipo de comportamento, na verdade, reflete as condições nutricionais presentes no meio, pois algumas áreas da colônia pode conter poucos nutrientes no qual afeta o padrão de brotamento das células (Vopálenská *et al.*, 2005). Trabalhos mostraram que o cultivo em meios carentes de nitrogênio induz a formação de pseudohifas em leveduras (Kuriyama & Slaughter, 1995; Cavalieri *et al.*, 2000; Vopálenská *et al.*, 2005). Em estudos sobre "domesticação" de linhagens de *S. cerevisiae* selvagens, células com alteração da morfologia da colônia que foram cultivadas em meio rico não sofreram mudanças, conservando seu estado original. Como as boas condições do laboratório persistiram, após certo período de tempo, as células aos poucos começaram a mudar sua morfologia para lisa, tornando-se indistinguíveis das linhagens de laboratório (Kuthan, *et al.*, 2003). O mesmo comportamento foi observado em nosso laboratório, onde colônias antes visivelmente rugosas começaram a apresentar morfologia quase lisa, sendo distinguidas apenas com a ajuda do estereoscópio. Colônias lisas com setores rugosos também foram observadas, reforçando a idéia de Kuthan *et al.* (2003), de que aos poucos, as células se adaptam ao novo ambiente que exige menos consumo de energia. A função dos genes *BUD* seria, portanto, permitir às células procurar nutrientes e substratos distantes do seu sítio de colonização inicial (Gimeno *et al.*, 1992).

Além da importância na migração celular, o padrão polarizado de brotamento pode ser auxiliar na secreção de matriz extracelular, devido ao tráfego de membrana plasmática também estar polarizado (Gimeno *et al.*, 1992). A produção de matriz extracelular também pode estar envolvida na morfologia da colônia. Ainda utilizando o trabalho de Kuthan *et al.* (2003) como exemplo, foi observado através de imagens de microscopia eletrônica de varredura a perda de matriz extracelular conforme a transição da morfologia da colônia. Os resultados obtidos em nosso trabalho com a microscopia eletrônica de varredura revelou a

presença de matriz cobrindo a superfície das colônias. Apesar de estar presente em leveduras com alteração na morfologia da colônia, a matriz extracelular não está relacionada com a carência de nutrientes, e sim como forma de proteção a condições adversas do ambiente (Kuthan *et al.*, 2003). A matriz permite que as células se mantenham distantes umas das outras, porém conectadas, promovendo a proteção da colônia como um todo (Kuthan *et al.*, 2003).

6 CONCLUSÕES

- Os resultados demonstram que a técnica RFLP-mtDNA é eficiente na identificação de linhagens de leveduras do processo de produção de etanol, além de permitir que estudos genéticos e evolutivos de populações relacionadas sejam realizados.
- As análises estatísticas comprovaram que alguns isolados das usinas identificados por PFGE como leveduras com perfis inespecíficos, seriam na verdade variantes das linhagens comerciais, pois foram incluídos nos grupos dessas linhagens quando testados pela RFLP-mtDNA.
- Atualmente, a cariotipagem eletroforética por PFGE vem sendo utilizada para verificar rearranjos sofridos pelos cromossomos, o que explicaria os perfis inespecíficos dos isolados que na RFLP-mtDNA foram correlacionados com linhagens comerciais.
- Caracterizar leveduras selvagens através de características morfológicas é insuficiente, pois os resultados obtidos com as técnicas moleculares e com as eletromicrografias de varredura sugerem que isolados com genótipos semelhantes, mas com fenótipos distintos, estariam sendo influenciados por condições ambientais (estresse) que afetam seu comportamento (colônias rugosas).

REFERENCIAS

- AGNOLUCCI, M.; SCARANO, S.; SANTORO, S.; SASSANO, C.; TOFFANIN, A.; NUTI, M. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous *Saccharomyces spp.* strains associated to natural fermentation of 'Malvasia delle Lipari'. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.657-662, 2007.
- ANDRIETTA, M.G.S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S.R. Bioetanol - Brasil, 30 anos na vanguarda. **Multiciência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp**, n.7, p.1-16, out. 2006.
- ARGUESO, J. L.; CARAZZOLE, M. F.; PIORT, A.; MIECZKOWSKI, P. A.; DUARTE, F. M.; NETTO, O. V. C.; MISSAWA, S. K.; GALZERANI, F.; COSTA, G. G. L.; VIDAL, R. O.; NORONHA, M. F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; CUNHA, A. F.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. A.; ALCARDE, A. R.; DIETRICH, F. S.; McCUSKER, J. H.; PETES, T. D.; PEREIRA, G. A. G. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research.**, v.19, p.2258-2270, 2009.
- ARIAS, M. C.; MALACHIAS, M. E. O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, S. R. (Ed.) **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2004, p.143-152, cap.14.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Eds.) **Current Protocols in Molecular Biology**. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2003.
- AZEREDO, L. A. I.; GOMES E.A.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A.L. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. **International Microbiology**, v.1, p.205-208, 1998.
- AZEVEDO, J. L. **Genética de Microrganismos**. Goiânia: Editora Universidade de Goiás, 1998. v.1. 478p.
- BASÍLIO, A.C.M; ARAÚJO, P.R.L.; MORAIES, J.O.F.; SILVA FILHO, E.A. MORAIS JR, M.A.; SIMÕES, D.A. Detection and Identification of Wild Yeast Contaminants of the Industrial Fuel Ethanol Fermentation Process. **Current Microbiology.**, v.56, p.322-326, 2008.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v.8, p.1155-1163, 2008.
- BLANCO, P.; RAMILO, A.; CERDEIRA, M.; ORRIOLS, I. Genetic diversity of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains in an experimental winery from Galicia (NW Spain). **Antonie van Leeuwenhoek**, v.89, p.351-357, 2006.
- BLONDIN, B.; DEQUIM, S.; QUEROL, A.; LEGRAS, J. L. Genome of *Saccharomyces cerevisiae* and Related Yeasts. In: KONIG, H.; FROHLICH, G. U. J. (Eds.). **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and Wine**. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2009. p.361-378, cap.20.

CAI J.; ROBERTS I. N.; COLLINS M.D. Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera* and *Kluyveromyces* deduced by small subunit rRNA gene sequences. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.46, p.542-549, 1996.

CAPECE, A.; SALZANO, G.; ROMANO, P. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p.33-39, 2003.

CARDAZZO, B.; MINUZZO, S.; SARTORI, G.; GRAPPUTO, A.; CARIGNANI, G. Evolution of mitochondrial DNA in yeast: gene order and structural organization of the mitochondrial genome of *Saccharomyces uvarum*. **Current Genetics**, v.33, p.52-59, 1998.

CARDAZZO, B.; RINALDI, T.?.; FRONTALI, L.?.; CARIGNANI, G.; PALLESCHI, C. Evolution of Mitochondrial Genomes in Yeast: A Study of Mitochondrial Divergence in Two Closely Related Species, *Saccharomyces douglasii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology and Evolution**, v.14, n.2, p.200-203, 1997.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1° Parte - As Leveduras. **Revista Analytica**, n.25, p. 36-42, nov.2006.

CAVALIERI, D.; TOWNSEND, J.P., HARTL, D. L. Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. n.22, v.97, p.12369-12374, 2000.

COMBINA, M.; DAGUERRE, C.; MASSERA, A.; MERCADO, L.; STURM, M. E.; GANGA, A.; MARTINEZ, C. Yeast identification in grape juice concentrates from Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, v.46, p.192-197, 2008.

DMYTRUK, K. V.; SIBIRNY, A. A. Molecular Mechanisms of Insertional Mutagenesis in Yeasts and Mycelium Fungi. **Russian Journal of Genetics**, v.43, p.835-845,2007.

DRUBIN, D. G. Development of Cell Polarity in Budding Yeast. **Cell**, v.65, p.1093-1096, 1991.

FLORES-BERRIOS, E. P.; GONZALEZ, A.; ARRIZON-GALVINO, J. P.; ROMANO, P.; CAPECE, A.; GSCHAEDLER-MATHIS, A. The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeasts isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. **Letters in Applied Microbiology**, v.41, p. 147-152, 2005.

GIMENO, C. J.; LJUNGDAHL, P. O.; STYLES, C. A.; FINK, G. R. Unipolar Cell Divisions in the Yeast *S. cerevisiae* Lead to Filamentous Growth: Regulation by Starvation and RAS. **Cell**, v.66, p.1077-1090, 1992.

GOFFEAU, A.; BARREL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN H, GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER S.G. Life with 6000 genes. **Science**, v.274, p.546-563, 2000.

GOMES, F. C. O.; SILVA, C. L. C.; MARINI, M. M.; OLIVEIRA, E. S. ROSA, C.A. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.2438- 2447, 2007.

GRANCHI, L.; BOSCO, M.; MESSINI, A.; VINCENZINI, M. Rapid detection and quantification of yeasts species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.949-956, 1999.

HOWELL, K. S.; BARTOWSKY, E. J.; FLEET, G. H.; HENSCHKE, P. A. Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, p. 315-320, 2004.

JAMES, S. A., COLLINS, M. D.; Roberts, I. N. Use of na rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.46, p.189-194, 1996.

KABACK, D. B. Yeast Genome Structure. In: WHEALS, A. E.; ROSE, A. H. (Eds); HARRISON, J. S. **The Yeasts**. 2.ed. London, San Diego, New York, Boston, Sidney, Tokyo, Toronto: Academic Press, 1995. v.6, p.179-222.

KURIYAMA, H.; SLAUGHTER, J. C. Control of cell morphology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by nutrient limitation in continuous culture. **Letters in Applied Microbiology**, v.20, p.37-40, 1995.

KURTZMAN, C. P. rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships among yeasts. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.42, p.1-6, 1992.

KURTZMAN, C. P. Systematics of the ascomycetous yeasts assessed from ribosomal RNA sequence divergence. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.63, p.165- 174, 1993.

KUTHAN, M.; DEVAUX, F., JANDEROVÁ, B.; SLANINOVÁ, I.; JACQ, C.; PALKOVÁ, Z. Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. **Molecular Microbiology**, v.3, n.47, p.745-754, 2003.

LIMA, C. L.; COSTA, L. F. G. Considerações sobre o setor sucroalcooleiro no Brasil e na Bahia. **Revista Desenbahia**, Salvador, v.4, n.6, p.101-121, mar. 2007.

LOPANDIC, K.; GANGL, H.; WALLNER, E.; TSCHEIK, G.; LEITNER, G.; QUEROL, A.; BORTH, N.; BREITENBACH, M.; PRILLINGER, H.; TIEFENBRUNNER, W. Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. **FEMS Yeast Research**, v.7, p.953-965, 2007.

LOPES, M. L. **Estudo do polimorfismo cromossômico em *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem PE-2) utilizada no processo industrial de produção de etanol.** 2000. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências de Rio Claro - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Rio Claro.

LOPES, M. L.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Chromosomal polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae* (strain PE-2) used in the industrial fermentation for ethanol production. In: YEAST GENETICS & MOLECULAR BIOLOGY MEETING, 2002. Madison. **Resumos.** Bethesda: The Genetics Society of America, p. 159, abstract 348.

LÓPEZ, V.; QUEROL, A.; RAMÓN, D. FERNANDEZ-ESPINAR, T.M. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v.68, p.75-81, 2001.

LUCENA, B. T. L.; SILVA-FILHO, E. A.; COIMBRA, M. R. M.; MORAIS, J. O. F.; SIMÕES, D. A.; MORAIS-JR, M. A. Chromosome instability in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* batch cultivated under laboratory conditions. **Genetics and Molecular Research**, v.6, n.4, p.1072-1084, 2007.

MANZANO, M.; COCOLIN, L.; LONGO, B.; COMI, G. PCR-DGGE differentiation of strains of *Saccharomyces sensu strict.* **Antonie van Leeuwenhoek.**, v.85, p.23-27, 2004.

MARQUES-MARÇAL, V. V. M. **Isolamento e caracterização morfo genética de leveduras com fenótipo killer e seu potencial no antagonismo de fitopatógenos.** 2005. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MATIENZO, P. A. **Re-identificação e caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares.** 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

McCULLOUGH, M. J.; CLEMONS, K. C.; McCUSKER, J. H.; STEVENS, D. A. Species identification and virulence attributes of *Saccharomyces boulardii* (nom. inval.). **Journal of clinical microbiology**, v.36, p.2613-2617, 1998.

MORTIMER, R. K. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. **Genome Research**, v.10, p.403-409, 2000.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v.16, p.675-729, 2000.

QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RAMON, D. Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.9, p.2948-2953, 1992.

QUEROL, A.; BARRIO, E.; RAMON, D. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.21, p.315-323, 1994.

RADFORD, D. R.; CHALLACOMBE, S. J.; WALTER, J. D. A scanning electronmicroscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida-albicans*. **Journal of Medical Microbiology**, v.40, p.416-423, 1994.

RATÓN, T. O. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.21, p.15-19, 2004.

REDZEPOVIC, S.; ORLIC, S.; SIKORA, S.; MAJDAK, A.; PRETORIUS, S. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, p.305-310, 2002.

ROHLF, F. J. **NTSYSpc**: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1. Setauket, New York: Exeter Software, 2001.

SANTOS, S. K. B.; BASÍLIO, A. C. M.; BRASILEIRO, B. T. R. V. MORAIS-JR, M. Identification of yeasts within *Saccharomyces sensu strict* complex by PCR-fingerprinting. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.23, p.1613-1620, 2007.

SCHULLER, D.; PEREIRA, L.; ALVES, H.; CAMBON, B.; DEQUIN, S.; CASAL, M. Genetic characterization of commercial *Saccharomyces cerevisiae* isolates recovered from vineyard environments. **Yeast**, v.24, p.625-636, 2007.

SCHULLER, D.; VALERO, E. DEQUIN, S. CASAL, M. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. **FEMS Microbiology Letters**, v.231, p.19-26, 2004.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v.37, n.1, p.67-75, 1984.

SHERMAN, F. An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Modificado de: SHERMAN, F. Yeast genetics. In: MEYERS, R. A. (Ed.) **The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine**. Weinheim, Germany: VCH Pub, 1998, p.302-325, vol.6.

SILVA-FILHO, E. A.; MELO, H. F.; ANTUNES, D. F.; SANTOS, S. K. B.; RESENDE, A. M.; SIMÕES, D. A.; MORAIS-JR, M. A. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.32, p.481-486, 2005a.

SILVA-FILHO, E. A.; SANTOS, S. K. B.; RESENDE, A. M.; de MORAIS, J. O. F.; de MORAIS Jr, M. A.; SIMÕES, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.88, p.13-23, 2005b.

SOUZA LIBERAL, A. T.; da SILVA FILHO, E. A.; de MORAIS, J. O. F.; SIMÕES, D. A.; de MORAIS Jr, M. A. Contamination yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v.40, p.19-23, 2005.

VARON, M.; CHODER, M. Organization and cell-cell interaction in starved *Saccharomyces cerevisiae* colonies. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.13, p.3877-3880, 2000.

VAUDANO, E.; GARCIA-MORUNO, E. Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. **Food Microbiology**, v.25, p.56-64, 2008.

VEZINHET, F.; BLONDIN, B.; HALLET, J.-N. Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.32, p.568-571, 1990.

VOPALENSKA, I.; HULKOVA, M.; JANDEROVA, B.; PALKOVA, Z. The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* colonies is affected by cell adhesion and the budding pattern. **Research in Microbiology**, v.156, p.921-931, 2005.

WALCZAK, E.; CZAPLINSKA, A.; BARSZCZEWSKI, W.; WILGOSZ, M.; WOJTATOWICZ, M.; ROBAK, M. RAPD with microsatellite as a tool for differentiation of *Candida* genus yeasts isolated in brewing. **Food Microbiology**, v.24, p.305-312, 2007.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v.17, p.482-487, 1999.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, L.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.L. (Eds.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, 1990. p.315-322.

WHITTAKER, D. K.; DRUCKER, D. B. Scanning electron microscopy of intact colonies of microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v.104, n.2, p.902-909, 1970.

WICKNER, R. B. Non-Mendelian Genetic Elements in *Saccharomyces cerevisiae*. RNA Viruses, 2 Mm DNA, ϕ , [URE3], 20S RNA and Other Wonders of Nature. In: WHEALS, A. E.; ROSE, A. H. (Eds); HARRISON, J. S. **The Yeasts**. 2.ed. London, San Diego, New York, Boston, Sidney, Tokyo, Toronto: Academic Press, 1995. v.6, p.309-356.

YAP, I.; NELSON, R. J. **Winboot**: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendograms. Philippines: International Rice Research Institute, 1996.

ZAMAROCZY, M.; BERNARDI G. The GC clusters of the mitochondrial genome of yeast and their evolutionary origin. **Gene**, v.41, n.1, p.1-22, 1986.

ZARZOSO, B. E.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S gene the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.329-337, 1999.