

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Biologia de Fungos

ELVIRA MARIA BEZERRA DE ALENCAR

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, CAPACIDADE FERMENTATIVA E
VARIABILIDADE GENÉTICA DE CULTURAS DE *SACCHAROMYCES*
*CEREVISIAE***

RECIFE
2006

ELVIRA MARIA BEZERRA DE ALENCAR

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, CAPACIDADE FERMENTATIVA E
VARIABILIDADE GENÉTICA DE CULTURAS DE *SACCHAROMYCES*
*CEREVISIAE***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biologia de Fungos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lusinete Aciole de Queiroz

Departamento de Micologia/UFPE

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine Malosso

Departamento de Micologia/UFPE

RECIFE
2006

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Alencar, Elvira Maria Bezerra de

Caracterização morfofisiológica, capacidade fermentativa e variabilidade genética de culturas de *Saccharomyces cerevisiae* / Elvira Maria Bezerra de Alencar. – Recife, 2006.

63 f. : il.

Orientadoras: Lusinete Aciole de Queiroz, Elaine Malosso

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia de Fungos, Recife, 2006.

Inclui referências

1. Fungos 2. Levedura 3. Fermentação I. Queiroz, Lusinete Aciole de (orient.) II. Malosso, Elaine (coorient.) III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017- 537

ELVIRA MARIA BEZERRA DE ALENCAR

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, CAPACIDADE FERMENTATIVA E
VARIABILIDADE GENÉTICA DE CULTURAS DE *SACCHAROMYCES*
*CEREVISIAE***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 24/05/2006

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Lusinete Aciole de Queiroz (Departamento de Micologia/UFPE)

Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho (Departamento de Genética/UFAL)

Prof^a Dr^a Janete Magali de Araújo (Departamento de Antibiótico/UFPE)

Prof^a Dr^a Rejane Pereira Neves (Departamento de Micologia/UFPE)

Prof^a Dr^a Cristina Maria de Souza Motta (Departamento de Micologia/UFPE)

OFEREÇO

Aos meus queridos e amados pais Cácio e Waldeny, responsáveis pelo meu equilíbrio, força e alegria de viver, donos da minha existência e responsáveis pela minha vitória. Agradeço pelo amor incondicional, pelas palavras constantes de incentivo, pelos ensinamentos valiosos que enriqueceram meu caráter e que acompanharão toda a minha vida.

DEDICO

Aos meus queridos, amados e inesquecíveis irmãos Cácio Jr, Maria Luiza, Luiza Adriana e sobrinhos Cácia Lalume, Flávio Roberto, Carlos Vinícius, Diego e Lailla Maria, pelas palavras de incentivo e apoio dedicados a mim durante toda realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, maravilhoso, único e pleno, agradeço pela minha existência e por vossa presença marcante e fiel em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade oferecida para realização do Curso de Pós-graduação em Biologia de Fungos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e técnico científico.

À minha Orientadora, a Prof^a. Dr^a. Lusinete Aciole de Queiroz (*in memorian*), pessoa singular, amiga e inesquecível, à qual sempre admirei pelo seu profissionalismo, dedicação, sabedoria e exemplo de sensibilidade humana, a quem sempre serei grata pelos seus ensinamentos, os quais refletirão de forma marcante e definitiva na minha vida pessoal e profissional.

À minha Coorientadora, a Prof^a. Dr^a. Elaine Malosso, do Laboratório de Biologia Molecular, pelo apoio inesquecível, dedicação e paciência dispensados a mim durante os momentos mais difíceis, a quem sempre serei grata.

À Coordenação da Pós Graduação em Biologia de Fungos, nas pessoas da Prof^a. Dr^a. Leonor Costa Maia e Prof^a. Dr^a. Norma Gusmão pela atenção e disponibilidade constantes durante a realização deste trabalho.

À Chefia do Departamento de Micologia, Prof^a. Dr^a. Elza Áurea de Luna Alves pelo apoio e respeito recebidos durante a realização desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Neiva Tinti de Oliveira pela disponibilidade, apoio e boa vontade demonstrados constantemente em todas as vezes que foi solicitada, durante a execução desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti pela inesquecível oportunidade que me foi dada, inicialmente como estagiária no Laboratório de Micologia Médica, à qual admiro pela sua competência, disciplina, profissionalismo e dedicação.

Às Professoras Cristina Maria de Souza Motta, Rejane Pereira Neves e Oliane Maria Correia Magalhães pela demonstração constante de amizade, respeito, credibilidade e dedicação durante todos esses anos de convivência científica.

Às Professoras Laura Mesquita Paiva e Ângela Coimbra dos Santos pelos ensinamentos repassados, durante Estágio Docência, os quais foram de grande valia para meu exercício como docente.

À Prof^a. Dr^a. Olga Martins Marques, Departamento de Bioquímica, da Universidade Federal de Pernambuco, por disponibilizar seu laboratório para realização dos ensaios fermentativos.

À Destilaria São Pedro, nas pessoas de Terezinha Carneiro Leão, Ernesto Gonçalves Pereira Lima Neto, Margarete César Resende Pereira Lima, Rejane Maria Pessoa Santos e José Melício Pereira Lima pela permissão e total apoio oferecidos para realização deste trabalho.

À amiga Luciana Rezende pela intersessão junto à Destilaria São Pedro, para realização das coletas de caldo-de-cana e pelo seu apoio constante demonstrado durante a realização desse trabalho.

Aos amigos André Santiago e Elcione Carvalho pelas sugestões e inesquecível apoio para realização e organização das fotos.

A estes e a todos que direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho.

RESUMO

Culturas originais diplóides URM-4420, Fermento Itaiquara FIT, Fermento Lallemand FLA e Selvagem SEL foram analisadas quanto a morfofisiologia, capacidade fermentativa e variabilidade genética. Destas foram obtidas culturas monocelulares haplóides e realizados entrecruzamentos para a recuperação de diplóides. A caracterização morfofisiológica foi realizada em todas as culturas mencionadas, através dos sistemas clássicos. O ensaio fermentativo foi realizado em todas as culturas, utilizando-se mosto de cana-de-açúcar esterilizado. A análise molecular baseada em PCR através dos iniciadores ITS1 e ITS4 foi realizada com as culturas originais diplóides, monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados. As culturas originais diplóides, monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados apresentaram variações na coloração, margem, aspecto e superfície. As células variaram de oblongas a cilíndricas. As culturas originais URM-4420, FIT, FLA, monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados formaram pseudomicélio bem desenvolvido, entretanto, a Selvagem original, entretanto, as monocelulares haplóides e os diplóides recuperados não o formaram. Reprodução assexuada por brotação simples e sexuada pela produção de ascospores com 2 a 4 ascospores. Assimilação e fermentação positivas da glicose, galactose, sacarose, maltose e rafinose e negativa da lactose. Foram negativas a assimilação de nitrato, assim como a produção de urease. O percentual de etanol variou de 1,70% a 6,20%, a produtividade de 1,12 g.L⁻¹.h⁻¹ a 2,03 g.L⁻¹.h⁻¹ e o ARI de 0.45g/100 mL a 0.50g/100 mL. Culturas originais, monocelulares haplóides e com o diplóide recuperado podem expressar características morfofisiológicas diferente; amostras diferentes de culturas originais e de monocelulares podem produzir diferentes percentuais de etanol; não foi observado amplificação da região ITS das culturas de *S. cerevisiae* originais diplóides, monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados com nenhuma das enzimas utilizadas.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Morfofisiologia. Fermentação alcoólica. Variabilidade genética.

ABSTRACT

Original diploid cultures URM-4420, Itaquara Ferment FIT, Lallemand FLA and Selvagem SEL (wild ferment) were analyzed in order to assess the morphophysiology, fermenting capacity and genetic variability. The monocellular haploids were obtained from these cultures and the diploids were recovered by intercrossing. The morphophysiology of all mentioned cultures was assessed via classical methods. The fermentative trial with the sterilized sugar-cane molasses and the molecular analysis based on PCR using the primers ITS1 and ITS4 were made with the diploid and the monocellular haploid cultures. The original diploid cultures, the monocellular haploid and the recovered diploid showed coloring variation, border type, outer shell and surface. The cells ranged from oblong to cylindrical. The URM-4420, Itaquara Ferment, and the Lallemand Ferment original cultures formed well developed pseudomicelio whereas the original culture Selvagem SEL (wild ferment), the monocellular haploids and the recovered diploids did not; asexual reproduction by simple sprouting and sexual reproduction of ascos with 2 to 4 ascospores; positive assimilation and fermentation of glucose, galactose, sucrose, maltose, and raffinose and negative for lactose. The nitrate assimilation was also negative as well as the production of urease. Ethanol percentage ranged from 1.70% to 6.20%, productivity from 1.12 g.L⁻¹.h⁻¹ to 2.03 g.L⁻¹.h⁻¹ and ARI from 0.45g/100mL to 0.50g/100mL. Original cultures, monocellular haploids and the recovered diploids may express different morphophysiological characteristics; different samples of the original cultures and of the monocellular also produced different ethanol percentages; no was observed amplification of the ITS region of the original diploid cultures, monocellular haploids of *S. cerevisiae* and with the diploids recovered with none of the enzymes used.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. Morphophysiology. Alcoholic fermentation. Genetic variability.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Entrecruzamento entre culturas de <i>S. cerevisiae</i> monocelulares haplóides para recuperação do diplóide	27
TABELA 2 - Iniciadores usados para amplificar segmentos de DNA de amostras originais diplóides, monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados de <i>S. cerevisiae</i>	30
TABELA 3 - Caracterização morfofisiológica de culturas de <i>S. cerevisiae</i> originais diplóides	34
TABELA 4 - Caracterização morfofisiológica de culturas de <i>S. cerevisiae</i> monocelulares haplóides	42
TABELA 5 - Caracterização morfofisiológica de culturas de <i>S. cerevisiae</i> com os diplóides recuperados	50
TABELA 6 - Caracterização fermentativa de culturas de <i>S. cerevisiae</i> originais diplóides em mosto de cana-de-açúcar esterilizado	55
TABELA 7 - Caracterização fermentativa de culturas de <i>S. cerevisiae</i> monocelulares haplóides em mosto de cana-de-açúcar esterilizado	56

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	Colônia da cultura URM-4420 (OD) em ágar Gorodkowa, com 8 dias. A - Aspectos macroscópicos (160 X). B e C - Aspectos microscópicos (400 X): ascos e pseudomicélio, respectivamente ..	35
FIGURA 2 -	Colônia da cultura do Fermento Itaiquara (OD) em ágar Gorodkowa, com 8 dias. A - Aspectos macroscópicos (160 X). B e C - Aspectos microscópicos (400 X): ascos e pseudomicélio, respectivamente	36
FIGURA 3 -	Colônia da cultura do Fermento Lallemmand (OD) em ágar Gorodkowa, com 8 dias. A- Aspectos macroscópicos (160 X). B e C - Aspectos microscópicos (400 X): ascos e pseudomicélio, respectivamente	37
FIGURA 4 -	Colônia da cultura Selvagem (OD) em ágar Gorodkowa, com 8 dias. A - Aspectos macroscópicos (160 X). B e C – Aspectos microscópicos (400 X): brotação simples e ascos, respectivamente	38
FIGURA 5 -	Colônias da URM-4420 (MH) em ágar Gorodkowa, com 8 dias. A e B - Aspectos macroscópicos (160 X)	43
FIGURA 6 -	Colônias do Fermento Itaiquara (MH) em ágar Gorodkowa, com 8 dias. A, B, C e D - Aspectos macroscópicos (160 X)	44
FIGURA 7 -	Colônias do Fermento Lallemmand (MH) em ágar Gorodkowa, com 8 dias. A e B - Aspectos macroscópicos (160 X)	45
FIGURA 8 -	Colônia da cultura Selvagem (MH) em ágar Gorodkowa, com 8 dias. Aspectos macroscópicos (160 X)	46

- FIGURA 9 -** Colônias da URM-4420 (DR) em ágar Gorodkowa, com 25 dias. 51
A e C-Aspectos macroscópicos (160 X). B e D – Aspectos
microscópicos (400 X): ascos
- FIGURA 10 -** Colônias do Fermento Itaiquara (DR) em ágar Gorodkowa, com 52
10 dias. A e C- Aspectos macroscópicos (160 X). B e D –
Aspectos microscópicos (400 X): ascos
- FIGURA 11 -** Colônias do Fermento Lallemmand (DR) em ágar Gorodkowa, com 53
10 dias. A e B- Aspectos macroscópicos (160 X). C - Aspectos
microscópicos (400 X): ascos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Taxonomia clássica de leveduras	16
2.2 Interfertilidade em leveduras ascomicéticas como um critério taxonômico	17
2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.4 Amostras haplóides e diplóides de <i>S. cerevisiae</i>	19
2.5 Fermentação alcoólica	21
2.6 Marcador molecular utilizado na tipagem genética	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Meios de cultura	24
3.2 Culturas de <i>S. cerevisiae</i>	24
3.3 Obtenção de culturas monocelulares haplóides	25
3.4 Recuperação do diplóide	25
3.5 Confirmação taxonômica das culturas originais diplóides, monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados	28
3.6 Preparação do pré-inóculo e meio para ensaio fermentativo	28
3.7 Determinação do °Brix, açúcares redutores totais (ART) e açúcares redutores infermentescíveis (ARI)	28
3.8 Determinação da concentração de etanol	29
3.9 Extração e quantificação de DNA	29
3.10 Amplificação do DNA	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Caracterização morfofisiológica de culturas de <i>S. cerevisiae</i> originais diplóides (OD)	31
4.2 Caracterização morfofisiológica de culturas de <i>S. cerevisiae</i> monocelulares haplóides (MH)	39

4.3 Caracterização morfofisiológica de culturas de <i>S. cerevisiae</i> com os diplóides Recuperados (DR)	46
4.4 Ensaio fermentativo de culturas de <i>S. cerevisiae</i> originais diplóides (OD) em mosto de cana-de-açúcar esterilizado	54
4.5 Ensaio fermentativo de culturas de <i>S. cerevisiae</i> monocelulares haplóides (MH) em mosto de cana-de-açúcar esterilizado	55
4.6 Ensaio fermentativo de culturas de <i>S. cerevisiae</i> com os diplóides recuperados (DR) em mosto de cana-de-açúcar esterilizado	57
4.7 Caracterização molecular de culturas de <i>S. cerevisiae</i> originais diplóides (OD), monocelulares haplóides (MH) e com os diplóides recuperados (DR)	57
.	
5 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

As leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem predominantemente por brotação, havendo gêneros que se reproduzem por fissão ou fissão-brotação. O termo levedura deriva etimologicamente do latim que significa “levitare, fervere” (levedar, tornar lêvedo, fermentar), entretanto, nem todas as leveduras fermentam. A palavra fermentação deriva do vocábulo latino “fervere” que significa ebulição. Os agentes responsáveis por esta transformação foram chamados de fermento (FULMER, 1930; LODDER, 1970; KREGER-van RIJ, 1984; ROSE; HARRISON, 1987; BARNETT et al., 2000; SOUZA; QUEIROZ, 1995; ALENCAR, 2001).

Estão distribuídas em diferentes ambientes e substratos. Podem ser isoladas do solo, ar, água, vegetais, insetos, húmus, frutas, legumes, peixes; alimentos industrializados e equipamentos utilizados nas indústrias de alimentos (EVANGELISTA, 1989; PHAFF, 1990; MAGALHÃES; QUEIROZ, 1991; BECKENKAMP, 1997; RODRIGUES, 2003).

Algumas podem causar enfermidades em plantas, animais e no homem (KREGER-van RIJ, 1984; ROSE; HARRISON, 1987; LACAZ et al., 2002). Outras são agentes biodeterioradores de produtos naturais ou industrializados, assim como envolvidas nos processos de biodegradação nas indústrias de alimentos, vinho, cerveja, etanol e pão; na indústria química, na produção de enzimas, pigmentos, acidulantes de alimentos e redutores químicos; na indústria farmacêutica, na produção de vacinas, probióticos, hormônios e fatores sanguíneos; na bioquímica, na elucidação da glicólise e natureza e função de enzimas; na citologia, na elucidação dos mecanismos de mitose e meiose, na biogênese de organelas e rotas secretoras de proteínas; na genética e biologia molecular, nos estudos de cruzamento celular, estruturas de genomas e ácidos nucleicos, mecanismos de recombinação, controle da expressão gênica, mapeamento e sequenciamento gênico, controle do ciclo celular e funções dos oncogenes; nos processos de despoluição de ambientes aquáticos, como indicadores de poluição; na suplementação de alimentos para o homem e animais (COOK, 1958; FRAZIER, 1976; ARORA et al., 1992; WALKER, 1998; RODRIGUES, 2003).

Do ponto de vista econômico, as leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa, sendo as espécies mais usadas na produção industrial de álcool e aguardentes *S. cerevisiae* e *S. uvarum* (LIMA et al. 1974).

O gênero *Saccharomyces* tem sido amplamente utilizado pelas indústrias de panificação; produção de ração animal; produtos lácteos e outros; indústria de fermentação, na

produção de vinhos, cerveja, etanol e aguardente (LIMA et al., 1985; SCRIBAN, 1985; RODRIGUES, 2003).

A fermentação alcoólica consiste na transformação de carboidratos em etanol e gás carbônico, através do metabolismo anaeróbico, entretanto outras substâncias são produzidas em menor quantidade, tais como glicerol e ácido acético (COOK, 1958; CONN; STUMPF, 1972; STUPIELLO; HORII, 1981; SCRIBAN, 1985; SOUZA; QUEIROZ, 1995).

O substrato utilizado para fermentação alcoólica é bastante variável e constituído por produtos açucarados, tais como: caldo de cana, beterraba, mel de abelha, melaço e frutas e amiláceos, como grãos de amido, raízes, tubérculos e outros (COOK, 1958; JONES et al., 1981; LIMA et al., 1985; SCRIBAN, 1985; SOUZA; QUEIROZ, 1995).

Os métodos tradicionalmente utilizados na identificação de leveduras baseiam-se em critérios morfológicos, reprodutivos, fisiológicos e bioquímicos adequados à identificação em nível de espécie, entretanto estão sendo utilizadas técnicas moleculares, para auxiliar à identificação tradicional e para estudar a filogenia de muitos fungos. Entre essas técnicas, a de amplificação das regiões ITS do rDNA (Internal Transcribed Spacer – ITS) permite a análise de variação de diferentes níveis taxonômicos, possibilitando discriminar espécies ou variedades de uma mesma espécie (KREGER-van RIJ, 1984; FUNGARO, 1995; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; SILVEIRA et al., 2006; SILVA-FILHO et al., 2005).

Para que seja viável utilizar culturas de *S. cerevisiae* originais, monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados em estudos taxonômicos; processos fermentativos de produção industrial de etanol e mecanismos de recombinação, características como diversidade morfológica, capacidade fermentativa diferente e variabilidade genética devem ser pré-requisitos no processo de seleção dessas culturas.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos obter culturas de *S. cerevisiae* monocelulares haplóides; realizar entrecruzamentos entre as culturas monocelulares haplóides, para a recuperação de diplóides; caracterizar culturas originais diplóides, monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados quanto a morfofisiologia, capacidade fermentativa e variabilidade genética.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Taxonomia clássica de leveduras

Para identificação e classificação de leveduras deve ser realizado um estudo das características morfológicas, sexuais e fisiológicas, sob condições padronizadas (KREGER-van RIJ, 1984; COSTA, 1999).

As características morfológicas de leveduras crescendo em meio sólido são muito diversas, com variações observadas em tamanho, forma e coloração. Células individuais de uma linhagem pura de uma mesma espécie pode apresentar heterogeneidade em relação a idade, o crescimento cinético, a morfologia e o metabolismo (WALKER, 1998).

Amostras diferentes de uma mesma espécie podem apresentar características morfológicas e/ou fisiológicas diferente. Dentre essas últimas podem ser mencionadas a capacidade de fermentação, tolerância ao etanol, ao dióxido de carbono e osmosensibilidade (JONES et al., 1981; KREGER-van RIJ, 1984).

A reprodução assexual ocorre em leveduras por brotação, fissão ou pela combinação desses dois processos. Quando a reprodução vegetativa ocorre exclusivamente por brotação o broto após algum tempo se separa da célula mãe ou podem aderir à mesma, resultando na formação de pseudomicélio. Se os brotos são formados exclusivamente em dois pólos distal da célula mãe, a brotação é chamada bipolar. Quando são formados em diferentes pontos da superfície da célula mãe, a brotação é chamada multipolar. A forma das células vegetativas podem ser oval, oblonga, elíptica, alongada, cilíndrica, ogival, limoniforme, piriforme, triangular, apiculada, em garrafa. Podem apresentar consistência mucóide, pastosa, friável, cremosa; superfície lisa ou rugosa; bordos regulares ou irregulares; aspecto brilhoso ou opaco (LODDER, 1970).

O crescimento de filamentos ocorre em numerosas espécies de leveduras e pode ser considerado como um modo alternativo de crescimento vegetativo por brotação ou fissão. A presença ou ausência de pseudomicélio e micélio verdadeiro têm sido descrita e discutida como critério taxonômico (KURTZMAN, 1998; WALKER, 1998).

A propriedade de assimilar vários açúcares tem sido usada para diferenciar espécies. Essa característica está estreitamente relacionada com a fermentação de açúcares. Todos os açúcares fermentescíveis são também assimilados, porém, o inverso não ocorre. Um açúcar pode ser assimilado oxidativamente, mas não fermentado. É um teste de grande valor

taxonômico, principalmente nos casos em que a fermentação é fraca ou ausente (LODDER, 1970; KREGER-van RIJ, 1984; NEDER, 1992).

Todas as leveduras são capazes de utilizar íons de amônio como fonte de nitrogênio. O íon amônio é o estado de oxidação do átomo de nitrogênio para qual todas as fontes de nitrogênio são convertidas. O comportamento de uma determinada levedura depende dos fatores, condições ambientais e constituição genética (ROSE; HARRISON, 1987).

A formação de película, em meio líquido ocorre em numerosos gêneros e tem sido freqüentemente usada em sistemática de levedura (LODDER, 1970; KREGER-van RIJ, 1984; NEDER, 1992).

Praticamente todas as leveduras podem utilizar uréia em baixas concentrações como única fonte de nitrogênio, entretanto diferem em sua habilidade para hidrolisar altas concentrações de uréia em meio completo contendo peptona como fonte de nitrogênio orgânico (LODDER, 1970; VAN der WALT; YARROW, 1984).

A maioria, se não todas as culturas de leveduras produzem traços de ácidos monovalentes e voláteis, entretanto quando o ácido acético é produzido em excesso, pode ser usado como um critério taxonômico. A partir da formação de outros ácidos monovalentes, como o ácido succínico e o láctico a produção não tem sido aplicada em taxonomia (LODDER, 1970).

2.2 Interfertilidade em leveduras ascomicéticas como um critério taxonômico

Estudos clássicos na área de genética de leveduras comprovaram que a troca de material genético entre espécies de *Saccharomyces* é possível quando obtem-se híbridos férteis. Numerosos trabalhos relataram a obtenção de híbridos férteis de espécies conhecidas como *Saccharomyces sensu stricto*, agora reconhecida como *S. cerevisiae*. Se duas linhagens interférteis produzem híbridos completamente férteis, então essas linhagens são da mesma espécie. Dois métodos para determinar interfertilidade entre leveduras ascomicéticas podem ser usados em trabalhos taxonômicos. O primeiro envolve micromanipulação e o pareamento de ascósporos. Esse método é preciso e permite a observação e comportamento individual das células. Se, entretanto o material é estabilizado na fase haplóide, trocas entre ascósporos podem ser utilizadas recorrendo a técnicas de acasalamento em que a progênie híbrida pode ser recuperada pelo isolamento de zigotos por micromanipulação ou por seleção através das diferenças morfológicas e fisiológicas básicas (LODDER, 1970).

2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Em agar malte, após 72 horas, à temperatura ambiente, a cultura de *S. cerevisiae* apresenta-se cremosa, raramente friável; coloração creme a creme acinzentada; superfície geralmente elevada, ocasionalmente plana, lisa, pulvinada a plicada, rugosa ou encrespada, ocasionalmente verrugosa ou com cavidades, um tanto setoriada, particularmente perto da margem; aspecto brilhoso a opaco; margem inteira a ondulada, ocasionalmente lobada ou serrilhada, raramente franjada com pseudomicélio. Entretanto, após um mês, nas mesmas condições de cultivo citadas, a cultura pode apresentar coloração variando de creme-acinzentada, creme-amarronzado a marron claro; superfície elevada a plana, restrita a difusa, lisa a pulvinada, um tanto estriada em setor, com cavidades, ocasionalmente encrespada a rugosa; aspecto brilhoso a opaco. A margem pode ser inteira, ondulada, serrilhada a lobada, raramente franjada com pseudomicélio (LODDER, 1970; KREGER-van RIJ, 1984; WALKER, 1998).

A levedura *S. cerevisiae* em meio líquido pode formar película tênue; as células variam de esféricas, ovais, elipsóides, cilíndricas à alongadas; pseudomicélio quando formado pode ser bem desenvolvido ou rudimentar; não forma micélio verdadeiro; reprodução assexuada por brotação multilateral, com células haplóides e diplóides, entretanto as células haplóides existem em dois mating types “a” e “ α ” e estas podem ajudar a formar células diplóides; reprodução sexuada expressada pela formação de ascos, usualmente com um a quatro ascosporos lisos, redondos ou ovais; fermenta açúcares; não assimila lactose nem nitrato; urease negativa (LODDER, 1970; KREGER-van RIJ, 1984; BARNETT et al., 2000).

Silva-Filho et al. (2005) estudou a dinâmica de populações de leveduras nativas em dornas de fermentação industrial, caracterizando morfologicamente linhagens de *S. cerevisiae* observando diferentes tipos de colônias, com relação ao diâmetro, superfície, bordo e textura, em leveduras presentes em amostras de mosto fermentado.

Segundo Antonini e Parazzi (2000) o dimorfismo em *S. cerevisiae*, com mudança da forma unicelular para pseudohifas é um fenômeno freqüente nessa espécie e pode ser induzido por “stress” do meio de cultura, causado por deficiência de nitrogênio ou presença do álcool isoamílico em altas concentrações.

A espécie *S. cerevisiae* que normalmente cresce com células brotantes em meio líquido, pode produzir pseudomicélio quando cresce em meio sólido. Os filamentos crescem freqüentemente na periferia da colônia, onde os filamentos penetram no ágar. Seu dimorfismo

colonial é devido a exaustão de glicose e oxigênio com um acúmulo de metabólitos tóxicos, como o etanol (WALKER, 1998).

Um software que processa automaticamente imagens de *S.cerevisiae*, têm recuperado 960.609 células de 52.988 micrografias de 2.531 mutantes, obtem micrografias das células, mostrando a mensuração das características morfológicas. O mesmo busca mutantes com traços morfológicos semelhantes. Esse sistema fornece dados quantitativos em relação a forma das células mãe e filha e localização do DNA nuclear (SAITO et al., 2004).

2.4 Amostras haplóides e diplóides de *S. cerevisiae*

A família *Saccharomycetaceae* pode ser homotática ou heterotática, podendo se estabilizar na fase haplóide ou diplóide ou ainda existir como uma mistura das duas fases. Leveduras homotáticas estabilizadas na fase haplóide se reproduzem exclusivamente por brotação, sem que cariogamia e diploidização levem a produção de ascos conjugados. Entretanto a diploidização pode ser afetada por dois caminhos, o primeiro envolve uma célula vegetativa uninucleada que sofre mitose e forma um broto e o segundo, núcleos haplóides se unem para uma fase diplóide transitória. Nas leveduras homotáticas estabilizadas na fase diplóide, os ascosporos são delimitados em ascos unconjugados, entretanto a diploidização pode ser afetada pela formação de zigotos gêmeos. A literatura relata que a formação de ascos unconjugados têm sido descrita como partenogênese (LODDER, 1970).

A levedura *S. cerevisiae* é um importante organismo experimental para o estudo da função gênica. O genoma de *S. cerevisiae* foi completamente sequenciado fornecendo informações a respeito da alta organização dos 17 cromossomos, permitindo esclarecimentos sobre a sua história evolutiva. O próximo passo, no estudo do genoma dessa levedura, é a determinação das funções biológicas de todos esses genes (OLIVER, 1996).

As células de *S. cerevisiae* podem ser encontradas na natureza nas formas haplóide ou diplóide. Na fase assexuada, ou vegetativa, as células se reproduzem através de divisões mitóticas por processos denominados brotamento multilateral. Na fase sexuada envolve ciclos mitóticos e meióticos, através da formação de 4 células haplóides denominadas ascosporos contidos no interior de uma estrutura conhecida como asco (NASMYTH; SHORE, 1982).

Em *S. cerevisiae* e outras leveduras as células haplóides podem ser “a” ou “ α ”. Em espécies selvagens as células haplóides “a” e “ α ” podem interconverter-se, ou seja, células “a” podem tornar-se “ α ” e células “ α ” podem tornar-se “a”. O fator que determina se uma célula

será de um tipo ou do outro reside no loco *MAT* (CASTILHO-VALAVICIUS et al., 1992; MELO, 2001).

Células filhas recém-nascidas de *S. cerevisiae* são normalmente de forma ovóide e menores que a célula-mãe. Durante a fase de brotação, rapidamente aumentam em volume para alcançar o tamanho da célula-mãe e assim permanecem até a divisão. A posição da cicatriz é visível por microscopia eletrônica de varredura. Em células haplóides a taxa de crescimento é rápida e o broto ocorre na posição polar próximo ao lado anterior da célula-mãe e subseqüentes brotações ocorrem adjacentes as anteriores. Em células diplóides a taxa de crescimento é mais lenta, o broto ocorre na região equatorial ou polar, sendo mais comum em pólos opostos. Antes de ocorrer a emergência do broto, o pólo longo da célula produz uma pequena estrutura satélite, que cresce duplicando toda a estrutura e separa os dois pólos da célula (ROSE; HARRISON, 1987; WALKER, 1998).

As células de *S. cerevisiae* são geralmente de forma elipsóide com um diâmetro variando de 5-10 μ . O volume para células haplóides e diplóides são 29 e 55 μm^3 , respectivamente. Linhagens de *S. cerevisiae* fermentando são geralmente maiores do que linhagens de laboratório, entretanto suas células também diminuem com a idade (WALKER, 1998).

Sebastiani et al. (2002) realizaram cruzamentos entre linhagens de *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. A cariotipagem e posterior eletroforese indicaram a obtenção de híbridos interespecíficos. As células híbridas formaram colônias “grande” e “pequena”. Diferente da colônia grande, a colônia pequena não esporulou e não fermentou maltose. Nos híbridos a dimensão varia entre 10 e 20%, somente raros ascos contém ascosporos viáveis. Clones de ascosporos viáveis esporularam e produziram ascos com ascosporos viáveis capazes de acasalar com esporos de ambos, derivados híbridos e espécie parental. Ascos férteis podem derivar de células tetraplóides geradas por eventos endomitóticos em células diplóides, um mecanismo que permite vencer barreiras entre as espécies *S. cerevisiae* e *S. bayanus*.

A produção de ascosporo em *S. cerevisiae* é realizada com alguma dificuldade. *S. cerevisiae* possui duas fases somáticas. Na primeira fase o ascosporo germina originando uma célula haplóide que por brotação produz uma colônia pequena e células haplóides redondas. Se duas linhagens haplóides compatíveis mating type “a” e “ α ” são misturadas ocorre a fusão de células originando células diplóides. Essas células são ovais, menores que as haplóides e podem continuar a brotação somaticamente produzindo colônias diplóides até que condições favoráveis para esporulação ocorra. Uma célula diplóide transforma-se diretamente em ascos,

geralmente com quatro ascósporos haplóides produzidos após a divisão meiótica (WALKER, 1998).

A espécie *S. cerevisiae* pode se reproduzir assexuadamente por brotação, com células haplóides e diplóides. As células haplóides existem em dois mating types “a” e “α” e elas podem ajudar a formar células diplóides. Células de mating types opostos secretam feromônios que amarram os receptores na superfície celular. Se faltar nitrogênio, as células diplóides esporulam produzindo quatro esporos haplóides 2a e 2α (WALKER, 1998).

Paquin e Adams (1983) analisando a resistência de amostras haplóides de *S. cerevisiae* à canavanina, cicloexamida e 5-fluorouracil e amostras diplóides a cicloexamida e 5-fluorouracil, verificaram uma oscilação da frequência de mutações adaptativas, onde nas células diplóides foi de 5.68×10^{-12} células e nas haplóides de 3.55×10^{-12} células. O teste mostrou uma diferença significativa de $P= 0.0002$. O mesmo teste foi aplicado para células haplóides mating types “a” e “α” e diplóides, onde as diferenças não foram significativas.

Adams (1977) examinando a coordenação do crescimento e divisão celular de linhagens haplóides e diplóides de *S. cerevisiae* verificou que o volume médio das células haplóides foi afetado por uma série de fatores ambientais e tempo de geração. O volume médio da célula diplóide está entre 1.52 e 1.83 do volume da célula haplóide. Ambas tiveram seu volume drasticamente reduzido quando cresceram em substrato limitado em glicose e a excentricidade das células não foram significativamente diferente dentro de todas as linhagens, em todos os ambientes.

2.5 Fermentação alcoólica

Silva-Filho et al. (2005) estudando a otimização do processo fermentativo em seis destilarias de álcool combustível, realizou ensaios fermentativos em laboratório com 14 linhagens de *S. cerevisiae*, sendo linhagens comerciais (Fleischmann, Itaiquara e Zani-floc), industrial (Lallemand Inc Canadá) e de Coleção de Cultura dos Departamentos de Antibiótico e Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. Foram analisados para cada isolado, o açúcar residual, produção de etanol, glicerol, rendimento, eficiência e tempo de fermentação. O tempo de fermentação variou de duas a quatro horas e o açúcar residual foi menor que 1g/L para todas as amostras, exceto as linhagens P21 e P22, que encerraram a fermentação com 50,3g/L e 46,3g/L, respectivamente. A maioria dos isolados apresentaram elevados rendimentos com eficiência de fermentação acima de 90%.

Gomes et al. (2004) estudaram a otimização do processo fermentativo em destilaria de cachaça, utilizando três linhagens de *S. cerevisiae*, sendo linhagens da Coleção de Leveduras do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras (UFMG-A 829, 905 e 1007). As linhagens foram avaliadas quanto aos parâmetros cinéticos da fermentação, como rendimento da fermentação; conversão do substrato em etanol, eficiência e produtividade; viabilidade celular; produção de ácidos e glicerol. Os resultados obtidos mostraram que tanto no início, meio e final do experimento, a linhagem UFMG-A 1007 apresentou os maiores valores em relação aos parâmetros estudados, entretanto a linhagem UFMG-A 905 apresentou os melhores resultados em relação aos parâmetros fermentativos.

Alencar (2001) estudando a microbiota do mosto de cana-de-açúcar, em destilaria de álcool carburante, analisou os açúcares redutores totais (ART), pH, temperatura, produção de etanol, detecção de floculação e unidades formadoras de colônias (UFC). O tempo de fermentação variou de zero a oito horas. *S. cerevisiae* produziu o maior percentual de etanol em 8 horas.

Ribeiro e Horrii (1999) estudaram três linhagens da espécie *S. cerevisiae* avaliando seus desempenhos sobre parâmetros cinéticos na fermentação do caldo de cana-de-açúcar. O acompanhamento da cinética fermentativa mostrou melhores resultados de eficiência de fermentação, fator de conversão de substrato em etanol e velocidade específica de crescimento pela linhagem floculante IZ-987, que foram de 89,9%, 0,46g.g⁻¹ e 0,0996h⁻¹, respectivamente. Esta linhagem foi também responsável pela maior produção de álcool superior, 185mg.L⁻¹. h⁻¹. A melhor produtividade de fermentação, de 3,40g.L⁻¹. h⁻¹, foi obtida pela linhagem floculante LF. A linhagem FP, não floculante, isolada a partir do fermento prensado, proporcionou os menores valores dos parâmetros cinéticos estudados.

Cleto e Mutton (1995) avaliaram o efeito da adição de fubá de milho, ácido sulfúrico e dois tipos de leveduras, ao caldo de cana-de-açúcar, visando analisar a dinâmica do processo fermentativo, o rendimento e a qualidade final da aguardente produzida. Nas condições experimentais adotadas, verificou-se diferença significativa na produção de etanol, quando se utilizou a levedura do engenho de aguardente. Houve aumento significativo para o álcool homólogo superior isobutanol, para as duas leveduras testadas. Também houve diferença significativa para todos os componentes secundários dos destilados analisados, com exceção do metanol e do furfural, quando comparados aos dois tipos de leveduras. A adição de ácido sulfúrico ao pé de cuba não promoveu diferença significativa na produção de etanol e componentes secundários analisados.

2.6 Marcador molecular utilizado para tipagem genética

Cappello et al. (2004) realizaram isolamento e caracterização de linhagens indígenas de *S. cerevisiae* de 12 variedades de uva crescendo em vinha experimental. Trinta a quarenta colônias foram obtidas de fermentação espontânea. Foram utilizados conjuntamente o método tradicional, baseado nas características morfológicas e fisiológicas e a análise molecular por PCR, analisando as regiões ITS1-5.8S-ITS2. A combinação desses dois métodos foi útil em discriminar linhagens de *S. cerevisiae*, onde a mesma foi dominante no mosto fermentado, mostrando importante potencialidade nas características enológicas.

Korabecna et al. (2003) analisaram o polimorfismo do fragmento de restrição do gene da região 5.8S do rRNA. O espaço transcrito ITS1 e ITS2 foi usado para investigação de isolados pertencentes a 19 espécies de leveduras. Foi observado considerável variabilidade com relação a restrição desses fragmentos em *Candida albicans*, *C. catenulada*, *C. colliculosa*, *C. glabrata*, *C. kefir*, *C. melinii*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilhermondii*, *C. solanii*, *C. tropicalis* e *S. cerevisiae*.

Regiões ITS são flanqueadas por segmentos conservados e por serem relativamente curtas (500 a 800 pb) aparecem em grande número de cópias no genoma, permitindo que sejam amplificadas e seqüenciadas com facilidade. A utilização de programas computacionais permitem definir regiões adequadas para a síntese de primers a serem usados na detecção de uma espécie de fungo (FUNGARO, 1997; SILVEIRA et al., 2006).

Dlauchy et al. (1999) analisaram 169 amostras de leveduras de 128 espécies, provenientes da indústria do vinho, cerveja e alimentos, através da restrição do produto de amplificação de gene 18S junto com a região ITS do rDNA utilizando as enzimas *HaeIII*, *MspI*, *AluI* e *RsaI*. As quatro enzimas geraram padrões distintos o suficiente para identificar a maioria das espécies.

Guillamón et al. (1998) analisando espécies de leveduras isoladas de fermentação espontânea de vinho com as enzimas *HinfI*, *CfoI* e *HaeIII*, utilizaram a técnica de análise de restrição do produto de PCR das região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do rDNA. Os padrões de restrição encontrados foram característicos das espécies.

Montrocher et al. (1998) realizaram estudos filogenéticos do grupo *Saccharomyces sensu stricto* baseados no polimorfismo do rDNA utilizando 10 enzimas de restrição, das quais quatro não revelaram polimorfismo entre as linhagens. A análise permitiu agrupar as leveduras em dois grupos, “o *cerevisiae*” que incluiu 16 isolados com nível de reassociação com o DNA genômico da espécie *S. cerevisiae* (CBS 1171) maior que 89% e o grupo

“*bayanus*” com nível de reassociação com o DNA nuclear de *S. bayanus* (CBS 380) superior a 72%.

A análise das regiões ITS do rDNA têm sido uma poderosa ferramenta para a identificação de espécies, em casos em que a taxonomia é controversa. Quando o objetivo é a caracterização em nível intraespecífico, a região IGS pode ser mais apropriada, uma vez que apresenta uma maior taxa de variabilidade (LEAL et al., 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura

Para observação das características macroscópicas foram utilizados os meios de cultura agar Sabouraud, adicionado de extrato de levedura (YE) e extrato de malte. Além destes, agar Dextrose Batata (BDA) + Bile de boi, agar Gorodkova e agar Acetato de Potássio foram utilizados para observação das características microscópicas. As características fisiológicas, foram verificadas através do zimograma, prova de fermentação para utilização de compostos de carbono; auxanograma, prova de assimilação pela utilização de compostos de carbono e nitrogênio; produção de urease e ácido acético de acordo com a metodologia preconizada por Lodder (1970); Kreger-van Rij (1984); Lacaz et al. (2002). Foram utilizados para preparação do inóculo, o meio YPD e para o ensaio fermentativo caldo de cana-de-açúcar, adicionado de água destilada esterilizada, na proporção 1:1. A esterilização foi realizada em autoclave, a 120°C, por 15 minutos.

3.2 Culturas de *S. cerevisiae*

Foram utilizadas as culturas originais diplóides URM-4420 (Coleção de Cultura da Micoteca-URM/UFPE/Brasil/Obtidas de mosto de cana-de-açúcar fermentado); Fermento Itaiquara FIT (Usina Itaiquara do Açúcar e do Alcool/Vitória de Santo Antão-PE/Obtidas de mosto de cana-de-açúcar fermentado); Fermento Lallemand FLA (Destilaria São Pedro/Danstil 493 EDV/Ribeirão/PE/Obtidas de melaço de cana-de-açúcar) e Selvagem SEL (Destilaria São Pedro/Ribeirão/PE/Obtidas de caldo de cana-de-açúcar).

3.3 Obtenção de culturas monocelulares haplóides

Após a confirmação da pureza das culturas originais de *S. cerevisiae* procedeu-se a obtenção de culturas monocelulares das mesmas.

Culturas originais diplóides de *S. cerevisiae* foram cultivadas em meio ágar Gorodkova para a produção de ascos. Das culturas que produziram ascos foram preparadas suspensões em 10 mL de água destilada esterilizada, tendo a concentração determinada em 4 da escala de MacFarland ($1,2 \times 10^9$ células/mL)(SOUZA; QUEIROZ, 1995). Após a homogeneização, com pipeta esterilizada de 1 mL, foram preparadas diluições sucessivas até uma concentração final de 1:100.000, o que corresponde a uma concentração de 10^{-5} células/mL (VERMELHO et al., 2006). Desta foi retirada uma alíquota, preparada lâmina e observada ao microscópio optico até a visualização de no máximo três células, sem brotação, por campo. Em seguida retirado 0,2 mL e semeados por espalhamento radial, em duplicata, com auxílio de alça de Drigalsky, na superfície do meio ágar Sabouraud, contido em placas, adicionado de extrato de levedura (YE). As culturas foram mantidas à temperatura ambiente ($28 \pm 1^\circ\text{C}$), por 72 horas e posteriormente transferidas para tubos de culturas (SILVEIRA et al., 2006).

Das 4 culturas originais diplóides foram obtidas 28 culturas monocelulares haplóides, sendo 7 da URM-4420 (MH), 7 do Fermento Itaiquara FIT-MH, 7 do Fermento Lallemand FLA-MH e 7 da Selvagem SEL-MH. As culturas monocelulares foram cultivadas em meio ágar Sabouraud, adicionado de extrato de levedura (YE) e mantidas à temperatura ambiente ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) por 48 horas. Em seguida transferidas para os meios ágar Gorodkova e ágar Acetato de Potássio, contidos em tubos de ensaio, para a produção de ascos e mantidas à temperatura ambiente ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) por até 30 dias. Foram selecionadas culturas monocelulares estabilizadas na fase haplóide, ou seja, culturas apresentando colônias pequenas, reprodução por brotação polar, taxa de crescimento rápido (em relação ao aumento do nº de células), volume e diâmetro das células de ($29 \mu\text{m}^3$) e ($5 \mu\text{m}^3$), respectivamente e forma das mesmas redonda (LODDER, 1970; ROSE; HARRISON, 1987; WALKER, 1998).

3.4 Recuperação do diplóide

Foram realizados 84 entrecruzamentos entre as 28 culturas monocelulares haplóides, sendo 21 da URM-4420 (MH), 21 do Fermento Itaiquara FIT-MH, 21 do Fermento Lallemand FLA-MH e 21 da Selvagem SEL-MH (Tabela 1).

As culturas monocelulares haplóides foram cultivadas em meio ágar Sabouraud, adicionado de extrato de levedura (YE) e mantidas à temperatura ambiente ($28\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 48 horas. Posteriormente foram misturadas em quantidades aproximadamente iguais de massa celular, no centro dos meios para esporulação ágar Gorodkova e ágar Aceteto de Potássio, contidos em tubos de ensaio, espalhadas por estria reta e em profundidade (LODDER, 1970). Foram mantidas à temperatura ambiente ($28\pm 1^{\circ}\text{C}$) por até 30 dias.

Tabela 1 - Entrecruzamentos entre culturas de *S. cerevisiae* monocelulares haplóides para recuperação do diplóide.

CULTURA ORIGINAL DIPLÓIDE	CULTURA MONOCELULAR HAPLÓIDE	ENTRECruzAMENTO PARA RECUPERAÇÃO DO DIPLÓIDE
URM-4420	URM-MH1 URM-MH2 URM-MH3 URM-MH4 URM-MH5 URM-MH6 URM-MH7	URM-MH1 x URM-MH2; URM-MH1 x URM-MH3 URM-MH1 x URM-MH4; URM-MH1 x URM-MH5 URM-MH1 x URM-MH6; URM-MH1 x URM-MH7 URM-MH2 x URM-MH3; URM-MH2 x URM-MH4 URM-MH2 x URM-MH5; URM-MH2 x URM-MH6 URM-MH2 x URM-MH7; URM-MH3 x URM-MH4 URM-MH3 x URM-MH5; URM-MH3 x URM-MH6 URM-MH3 x URM-MH7; URM-MH4 x URM-MH5 URM-MH4 x URM-MH6; URM-MH4 x URM-MH7 URM-MH5 x URM-MH6; URM-MH5 x URM-MH7 URM-MH6 x URM-MH7
FERMENTO ITAIQUARA FIT	FIT-MH1 FIT-MH2 FIT-MH3 FIT-MH4 FIT-MH5 FIT-MH6 FIT-MH7	FIT-MH1 x FIT-MH2; FIT-MH1 x FIT-MH3 FIT-MH1 x FIT-MH4; FIT-MH1 x FIT-MH5 FIT-MH1 x FIT-MH6; FIT-MH1 x FIT-MH7 FIT-MH2 x FIT-MH3; FIT-MH2 x FIT-MH4 FIT-MH2 x FIT-MH5; FIT-MH2 x FIT-MH6 FIT-MH2 x FIT-MH7; FIT-MH3 x FIT-MH4 FIT-MH3 x FIT-MH5; FIT-MH3 x FIT-MH6 FIT-MH3 x FIT-MH7; FIT-MH4 x FIT-MH5 FIT-MH4 x FIT-MH6; FIT-MH4 x FIT-MH7 FIT-MH5 x FIT-MH6; FIT-MH5 x FIT-MH7 FIT-MH6 x FIT-MH7
FERMENTO LALLEMAND FLA	FLA-MH1 FLA-MH2 FLA-MH3 FLA-MH4 FLA-MH5 FLA-MH6 FLA-MH7	FLA-MH1 x FLA-MH2; FLA-MH1 x FLA-MH3 FLA-MH1 x FLA-MH4; FLA-MH1 x FLA-MH5 FLA-MH1 x FLA-MH6; FLA-MH1 x FLA-MH7 FLA-MH2 x FLA-MH3; FLA-MH2 x FLA-MH4 FLA-MH2 x FLA-MH5; FLA-MH2 x FLA-MH6 FLA-MH2 x FLA-MH7; FLA-MH3 x FLA-MH4 FLA-MH3 x FLA-MH5; FLA-MH3 x FLA-MH6 FLA-MH3 x FLA-MH7; FLA-MH4 x FLA-MH5 FLA-MH4 x FLA-MH6; FLA-MH4 x FLA-MH7 FLA-MH5 x FLA-MH6; FLA-MH5 x FLA-MH7 FLA-MH6 x FLA-MH7
SELVAGEM SEL	SEL-MH1 SEL-MH2 SEL-MH3 SEL-MH4 SEL-MH5 SEL-MH6 SEL-MH7	SEL-MH1 x SEL-MH2; SEL-MH1 x SEL-MH3 SEL-MH1 x SEL-MH4; SEL-MH1 x SEL-MH5 SEL-MH1 x SEL-MH6; SEL-MH1 x SEL-MH7 SEL-MH2 x SEL-MH3; SEL-MH2 x SEL-MH4 SEL-MH2 x SEL-MH5; SEL-MH2 x SEL-MH6 SEL-MH2 x SEL-MH7; SEL-MH3 x SEL-MH4 SEL-MH3 x SEL-MH5; SEL-MH3 x SEL-MH6 SEL-MH3 x SEL-MH7; SEL-MH4 x SEL-MH5 SEL-MH4 x SEL-MH6; SEL-MH4 x SEL-MH7 SEL-MH5 x SEL-MH6; SEL-MH5 x SEL-MH7 SEL-MH6 x SEL-MH7
TOTAL	28	84

Fonte: A Autora (2006). URM = Universidade do Recife Micologia; FIT = Fermento Itaiquara; FLA = Fermento Lallemmand; SEL = Selvagem; MH = Monocelular Haplóide

3.5 Confirmação taxonômica das culturas originais diplóides, monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados

Todas as culturas foram confirmadas segundo os critérios adotados por Lodder (1970); KREGER-van RIJ (1984); KURTZMAN (1998); BARNETT et al. (2000).

3.6 Preparação do pré-inóculo e meio para ensaio fermentativo

As culturas de *S. cerevisiae* originais diplóides, monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados foram semeadas em ágar Sabouraud, adicionado de extrato de levedura (YE) e mantidas à temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por 48 horas. Em seguida foram preparadas suspensões em 100 mL de água destilada esterilizada, tendo a concentração determinada em 4 da Escala de MacFarland ($1,2 \times 10^9$ células/mL). Para o ensaio fermentativo foi preparado o meio de cultura em 150 mL de água destilada esterilizada e caldo de cana, onde a concentração final foi de 1:1. O referido meio foi autoclavado a 120°C , por 15 minutos. De cada suspensão de leveduras foram inoculados 50 mL em 150 mL do meio de mosto de cana-de-açúcar e mantidas à temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), por 24 horas (SOUZA; QUEIROZ, 1995).

3.7 Determinação do °Brix, açúcares redutores totais (ART) e açúcares redutores infermentescíveis (ARI)

A determinação do ° Brix foi realizada utilizando-se o refratômetro. Para a determinação dos ART e ARI, 1mL do sobrenadante foi hidrolisado com ácido clorídrico 1:2 (v/v) a 60°C por 20 minutos em balão volumétrico adequado. Após o resfriamento à T. A. ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) o hidrolisado foi neutralizado com solução aquosa a 40% de NaOH, sendo usado como indicador duas gotas da solução alcoólica a 1% de fenolftaleína. O volume do conteúdo foi ajustado com água destilada de acordo com a capacidade do balão volumétrico e 1mL foi transferido para tubos de Folin-Wu. A este volume, foi adicionado 1mL do reagente DNSA (MULLER, 1959), procedendo-se em seguida ao banho-maria em ebulição por 15 minutos O resfriamento foi realizado em banho de gelo e o volume ajustado com água destilada para 12,5

mL. Após homogeneização, foi realizada a leitura pela absorvância em espectrofotômetro (Spectronic 20 D- Milton Roy Company) à 540nm (SOUZA; QUEIROZ, 1995).

3.8 Determinação da concentração de etanol

A concentração de etanol nas amostras de mosto fermentado foram determinadas por ebulliometria, através de ebuliômetro marca Dujardin – Salleron 359, previamente aferido. As leituras foram realizadas com 0, 12 e 24 horas de fermentação.

3.9 Extração e quantificação de DNA

As amostras foram inoculados em meio YPD líquido e incubadas a 30°C por 16 horas a 150rpm. Alíquotas de 1,0 mL de cada cultura foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugados por 3 minutos a 5.900 g a 24°C. O sobrenadante foi descartado e 600µL de tampão de extração foram adicionados, seguido de incubação a 65°C por 30 minutos com agitação por inversão a cada cinco minutos. Igual volume de fenol/clorofórmio (1:1) foi adicionado e as suspensões foram centrifugadas por 15 minutos a 15.400g. Foram transferidos 500µL do sobrenadante para novos microtubos de 1,5 mL e 500µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foram adicionados. As amostras foram centrifugadas uma vez por 15 minutos a 15.400g e 400µL do sobrenadante foram transferidos para microtubos novos de 1,5 mL. A estes foram adicionados 800µL de etanol absoluto gelado, permanecendo por duas horas a – 20°C para precipitação do DNA. O DNA foi coletado por centrifugação por 15 minutos a 15.400g, lavado em etanol a 70% por duas vezes, secando em estufa a 37°C por 30 minutos e em seguida ressuspendido em água Milli-Q, mantido a – 20°C (RAEDER; BRODA, 1985 modificado por SILVA-FILHO et al., 2005). A quantificação foi realizada por espectrofotometria utilizando-se comprimento de onda de 260nm após diluição das amostras de 1: 200. Para o cálculo da concentração de DNA, utilizou-se a relação 1 DO = 50µg/mL (SAMBROOK et al., 1989).

3.10. Amplificação do DNA

As amostras de DNA foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Iniciadores usados para amplificar segmentos de DNA de amostras originais diplóides, monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados de *S. cerevisiae*.

INICIADOR	SEQUÊNCIA	MARCADOR MOLECULAR	REFERÊNCIA
ITS1	TCCTCCGCTTATTGATATGC	rDNA	WHITE et al., (1990)
ITS4	GGAAGTAAAAAGTCGTAACAA	rDNA	WHITE et al., (1990)

Fonte: A Autora (2006).

As reações de amplificação da região ITS do DNA ribossomal foram realizadas para um volume final de 25µL nas seguintes condições: tampão (Tris-HCl 20 mM pH 8.4; KCl 50 mM), MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 200 mM, 0.5 pmols/µL do primer, Taq DNA polimerase 1U/µL (Operon Technologies CA) e 0,05 ng/µL de DNA. A amplificação foi programada para um ciclo de desnaturação inicial de 3 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos para desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos, com extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos de amplificação do locus ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% submetidos a 3,5 volts/cm em tampão de corrida Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X, corados em solução de Brometo de Etídeo - TAE-1X/EtBr 0,5 µg/mL, durante 30 minutos, visualizados em transiluminador ultravioleta e fotografados usando câmera digital (SAMBROOK et al., 1989).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfofisiológica de culturas de *S. cerevisiae* originais diplóides (OD)

Foram testadas 4 culturas originais diplóides de *S. cerevisiae*, sendo: URM-4420 (OD), Fermento Itaiquara FIT-OD, Fermento Lallemand FLA-OD e Selvagem SEL-OD (Tabela 3).

As mesmas apresentaram colônias grandes, com células de diâmetro $10\ \mu\text{m}^3$ e volume $55\ \mu\text{m}^3$ e crescimento lento em relação ao aumento do número de células e unidades formadoras de colônias. As mesmas apresentaram as seguintes características morfofisiológicas:

A) Características Macroscópicas

URM-4420 (OD)

A cultura apresentou colônias com coloração creme; margens regulares; aspecto brilhoso; textura cremosa e superfície lisa, elevada no centro e restrita (Tabela 3, Figura 1).

Fermento Itaiquara FIT-OD

A cultura apresentou colônias com coloração creme claro; margens regulares sulcadas; aspecto opaco; textura cremosa e superfície lisa, elevada no centro e restrita (Tabela 3, Figura 2).

Fermento Lallemand FLA-OD

A cultura apresentou colônias com coloração branca; margens regulares; aspecto brilhoso; textura cremosa e superfície lisa, elevada no centro e restrita (Tabela 3, Figura 3).

Selvagem SEL-OD

A cultura apresentou colônias com coloração creme; margens regulares; aspecto brilhoso; textura cremosa e superfície lisa, elevada no centro e restrita (Tabela 3, Figura 4).

Esses resultados estão de acordo com os citados em Walker (1998) onde as características morfológicas de leveduras crescendo em meio sólido são muito diversas, com variações observadas em coloração, textura e forma. Esses resultados estão corroborados pelo trabalho de Silva-Filho et al. (2005) que caracterizou morfolologicamente linhagens de *S. cerevisiae* observando diferentes tipos de colônias, com relação ao diâmetro, superfície, margem e textura. Relatos de que diferentes espécies e mesmo amostras diferentes de uma mesma espécie podem apresentar características morfológicas diferentes estão descritos em

Barnett et al. (2000); Jones et al. (1981); Kreger-van Rij (1984); Lodder (1970); Souza; Queiroz (1995).

B) Características Microscópicas

URM-4420 (OD)

A cultura apresentou células variando de oblongas, ovais, elípticas a cilíndricas; brotação simples; formação de pseudomicélio bem desenvolvido e mais de 10 ascos com 2 a 4 ascosporos por campo (Tabela 3, Figura 1).

Fermento Itaiquara FIT-OD

A cultura apresentou células variando de oblongas, ovais, elípticas a cilíndricas; brotação simples; formação de pseudomicélio bem desenvolvido e mais de 10 ascos com 2 a 4 ascosporos por campo (Tabela 3, Figura 2).

Fermento Lallemand FLA-OD

A cultura apresentou células variando de oblongas, ovais, elípticas a cilíndricas; brotação simples; formação de pseudomicélio bem desenvolvido e mais de 10 ascos com 2 a 4 ascosporos por campo (Tabela 3, Figura 3).

Selvagem SEL-OD

A cultura apresentou células variando de oblongas, ovais, elípticas a cilíndricas; brotação simples; ausência de pseudomicélio; formação de 10 ascos com 2 a 4 ascosporos por campo (Tabela 3, Figura 4)

Das 4 culturas originais diplóides, a Selvagem (OD) foi a que não formou pseudomicélio.

A análise dos resultados sugere que a cultura Selvagem não formou pseudomicélio devido está melhor adaptada às situações adversas do meio de cultura, provavelmente, por ter sido isolada de caldo de cana bruto, onde a competição por nutrientes é constante com outras amostras de *S. cerevisiae*, outras espécies de leveduras e bactérias, além da produção de metabólitos tóxicos.

Esses resultados estão de acordo com Barnett et al. (2000); Kreger-van Rij (1984); Lodder (1970), onde *S. cerevisiae* pode apresentar células variando de esféricas, ovais, elípticas, cilíndricas a alongadas; reprodução assexuada por brotação simples e multilateral;

ausência ou presença de pseudomicélio; não formam micélio verdadeiro; em meio líquido pode ocorrer a formação de película tênue; reprodução sexuada pela produção de ascos persistentes, normalmente com 1 a 4 ascosporos lisos, redondos ou ovais. Relatos de que a mudança da forma unicelular para pseudomicélio é um fenômeno freqüente em *S. cerevisiae* e pode ser induzido por deficiência de nitrogênio ou presença de álcool isoamílico em altas concentrações no meio são descritos por Antonini e Parazzi (2000). Entretanto, Walker (1998) relata que o dimorfismo de *S. cerevisiae*, que normalmente cresce com células brotantes em meio líquido, é devido a exaustão de glicose e oxigênio, com acúmulo de metabólitos tóxicos, como o etanol.

C) Características Fermentativas

URM-4420 (OD) e Fermento Itaiquara FIT-OD

As culturas apresentaram assimilação e fermentação positiva da glicose, sacarose, maltose e rafinose, em 24 horas e galactose, em 72 horas e negativa da lactose. Assimilação de nitrato negativa e urease negativa (Tabela 3).

Fermento Lallemend FLA-OD

A cultura apresentou assimilação e fermentação positiva da glicose, sacarose, maltose e rafinose, em 24 horas e galactose, em 120 horas e negativa da lactose. Assimilação de nitrato negativa e urease negativa (Tabela 3).

Selvagem SEL-OD

A cultura apresentou assimilação e fermentação positiva da glicose, galactose, sacarose, maltose e rafinose, em 48 horas e negativa da lactose. Assimilação de nitrato negativa e urease negativa (Tabela 3).

As 4 culturas originais diplóides (OD) apresentaram diferenças entre si, em relação ao tempo de fermentação dos açúcares.

Estão descritos em Barnett et al. (2000); Jones et al. (1981); Kreger-van Rij (1984); Lodder (1970); Souza; Queiroz (1995) que a espécie *S. cerevisiae* fermenta açúcares; não assimila lactose nem nitrato e que diferentes espécies e mesmo amostras diferentes de uma mesma espécie podem apresentar características fisiológicas diferente, dentre elas, a capacidade de fermentação.

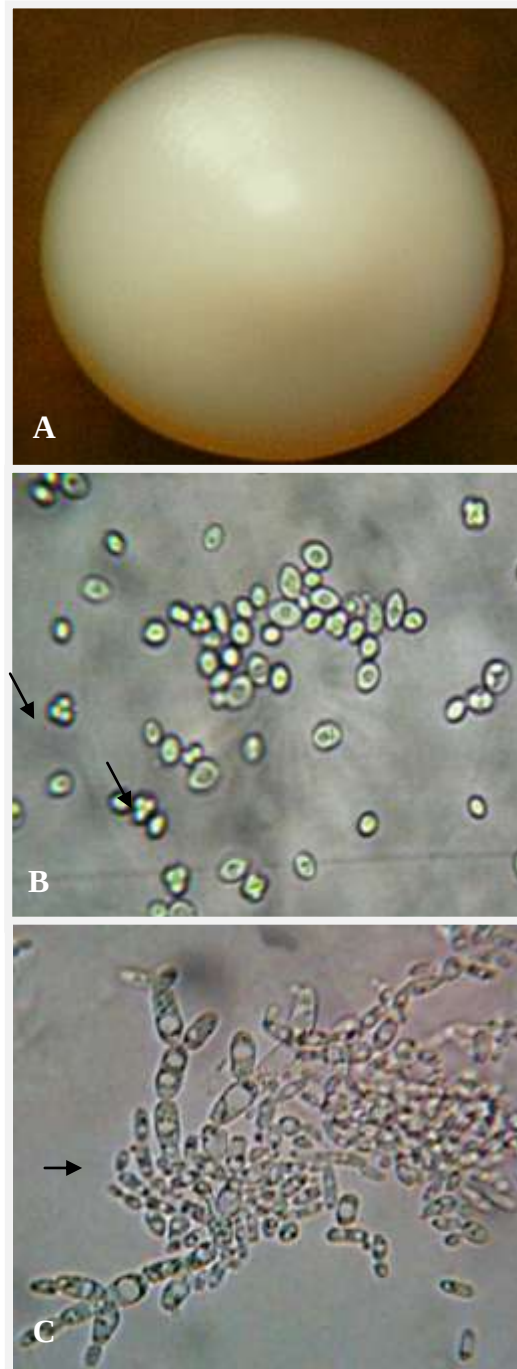
Tabela 3 - Caracterização morfofisiológica de culturas de *S. cerevisiae* originais diplóides.

CARACTERÍSTICA MORFOFISIOLÓGICA	URM-4420 (OD)	FERMENTO ITAIQUARA (OD)	FERMENTO LALLEMAND (OD)	SELVAGEM (OD)
MACROSCÓPICA				
Coloração	Creme	Creme claro	Branca	Creme
Margem	Regular	Regular sulcada	Regular	Regular
Aspecto	Brilhoso	Opaco	Brilhoso	Brilhoso
Textura	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
Superfície	Lisa, elevada no centro e restrita	Lisa, elevada no centro e restrita	Lisa, elevada no centro e restrita	Lisa, elevada no centro e restrita
MICROSCÓPICA				
Forma das células	Oblongas, ovais, elípticas a cilíndricas	Oblongas, ovais elípticas a cilíndricas	Oblongas, ovais, elípticas a cilíndricas	Oblongas, ovais, elípticas a cilíndricas
Tipo de brotação	Simples	Simples	Simples	Simples
Formação de pseudomicélio	Bem desenvolvido	Bem desenvolvido	Bem desenvolvido	Ausente
Formação de ascos	+ de 10 por campo	+ de 10 por campo	+ de 10 por campo	+ de 10 por campo
FERMENTATIVA				
Glicose	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas
Galactose	72 horas	72 horas	120 horas	48 horas
Sacarose	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas
Maltose	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas
Rafinose	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas
Lactose	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Assimilação de nitrato	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Produção de urease	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa

Fonte: A Autora (2006).

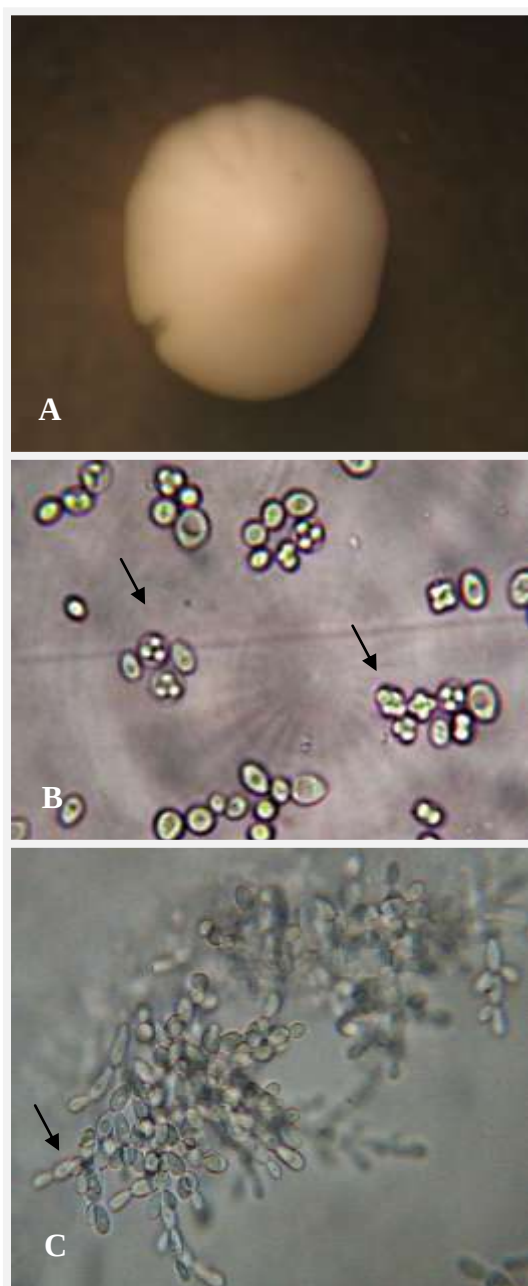
URM = Universidade do Recife Micologia; OD = Original Diplóide

Figura 1 - Colônia da cultura URM-4420 (OD) em ágar Gorodkowa, com 8 dias. A - Aspectos macroscópicos (160 X). B e C - Aspectos microscópicos (400 X): ascos e pseudomicélio, respectivamente.



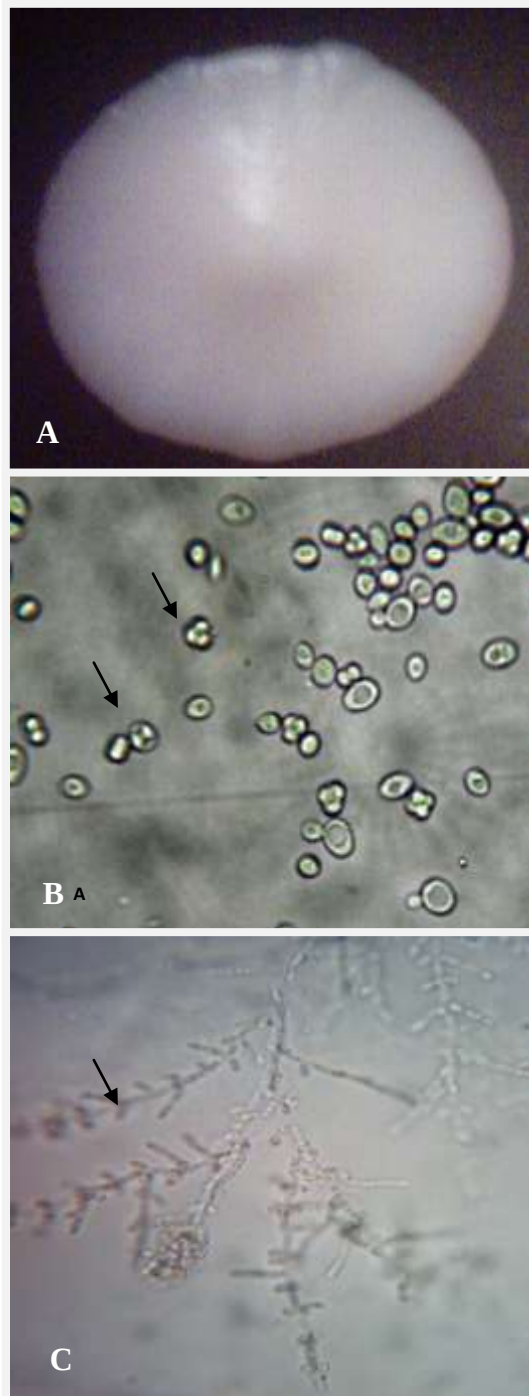
Fonte: A Autora (2006).

Figura 2 - Colônia da cultura do Fermento Itaiquara (OD) em agar Gorodkowa, com 8 dias. A - Aspectos macroscópicos (160 X). B e C - Aspectos microscópicos (400 X): ascos e pseudomicélio, respectivamente.



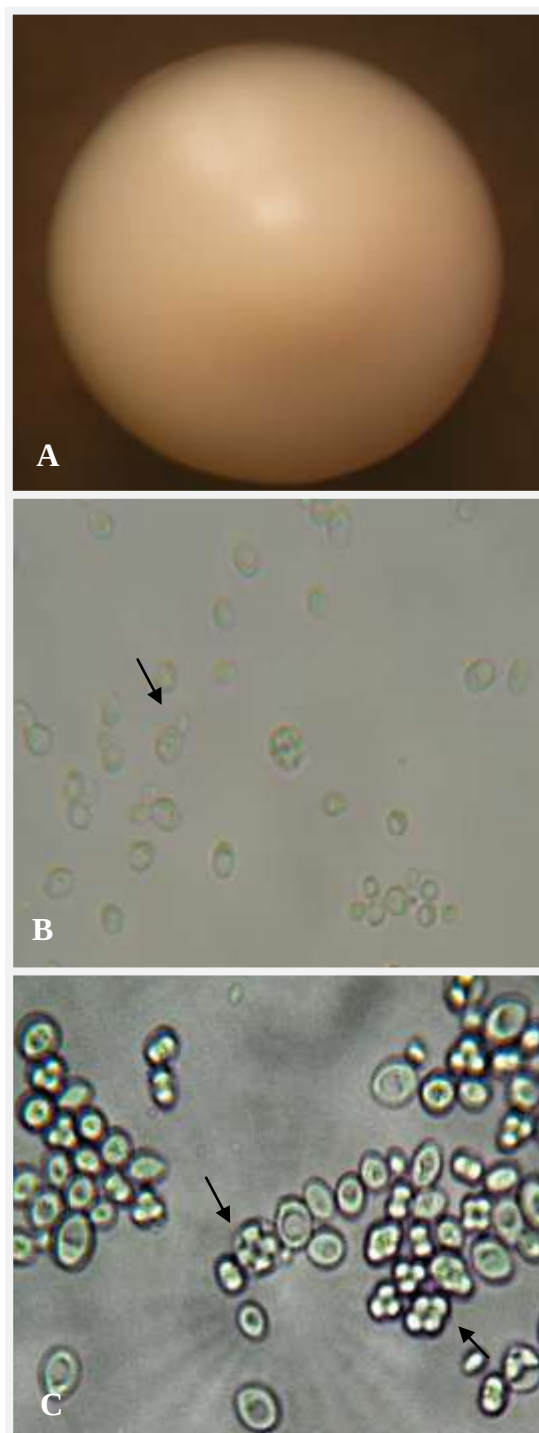
Fonte: A Autora (2006).

Figura 3 - Colônia da cultura do Fermento Lallemmand (OD) em agar Gorodkowa, com 8 dias. A - Aspectos macroscópicos (160 X). B e C – Aspectos microscópicos (400 X): ascos e pseudomicélio, respectivamente.



Fonte: A Autora (2006).

Figura 4 - Colônia da cultura Selvagem (OD) em agar Gorodkowa, com 8 dias. A – Aspectos macroscópicos (160 X). B e C – Aspectos microscópicos (400 X): brotação simples e ascos, respectivamente.



Fonte: A Autora (2006).

4.2 Caracterização morfofisiológica de culturas de *S. cerevisiae* monocelulares haplóides (MH)

Foram obtidas 28 culturas monocelulares haplóides de suas respectivas culturas originais diplóides, sendo: 7 da URM-4420 (MH); 7 do Fermento Itaiquara FIT-MH; 7 do Fermento Lallemand FLA-MH e 7 da Selvagem SEL-MH (Tabela 4).

As mesmas apresentaram colônias pequenas, com células medindo (2.0-5.0) x (3.0-9.0-15.0) μ e crescimento rápido em relação ao aumento do número de células e unidades formadoras de colônias. As mesmas apresentaram as seguintes características morfofisiológicas:

A) Características Macroscópicas

URM-4420 (MH): Biotipo A (6 culturas) e Biotipo B (1 cultura)

- Biotipo A: As culturas apresentaram colônias com coloração creme; margem regular; aspecto brilhoso; textura cremosa e superfície lisa, elevada no centro e restrita (Tabela 4, Figura 5).

- Biotipo B: A cultura apresentou colônias com coloração creme; margem regular; aspecto opaco; textura cremosa e superfície lisa, plana e restrita (Tabela 4, Figura 5).

Fermento Itaiquara FIT-MH: Biotipo A (1 cultura), Biotipo B (4 culturas), Biotipo C (1 cultura) e Biotipo D (1 cultura).

- Biotipo A: A cultura apresentou colônias com coloração creme claro; margem regular sulcada; aspecto opaco; textura cremosa e superfície lisa, elevada no centro e restrita (Tabela 4, Figura 6).

- Biotipo B: As culturas apresentaram colônias com coloração creme; margem regular; aspecto brilhoso; textura cremosa e superfície lisa, plana e restrita (Tabela 4, Figura 6).

- Biotipo C: A cultura apresentou colônias com coloração creme; margem regular ligeiramente sulcada; aspecto pouco brilhoso; textura cremosa e superfície lisa, plana e restrita (Tabela 4, Figura 6).

- Biotipo D: A cultura apresentou colônias com coloração creme; margem irregular; aspecto opaco; textura cremosa e superfície lisa, conversa e restrita (Tabela 4, Figura 6).

Fermento Lallemand FLA-MH: Biotipo A (5 culturas) e Biotipo B (2 culturas)

- Biotipo A: As culturas obtidas apresentaram colônias com coloração branca; margem regular; aspecto brilhoso; textura cremosa e superfície lisa, elevada no centro e restrita (Tabela 4, Figura 7).

- Biotipo B: As culturas obtidas apresentaram colônias com coloração branca; margem regular; aspecto opaco; textura cremosa e superfície lisa, com depressão central e difusa (Tabela 4, Figura 7).

Selvagem SEL-MH: Biotipo A (7 culturas)

- Biotipo A: As culturas obtidas apresentaram colônias com coloração creme; margem regular; aspecto brilhoso; textura cremosa e superfície lisa, elevada no centro e restrita (Tabela 4, Figura 8).

As 28 culturas monocelulares haplóides (MH) apresentaram diferenças entre si, em relação à coloração, margem, aspecto e à superfície da colônia. Todas apresentaram textura cremosa.

B) Características Microscópicas

Todas as culturas monocelulares haplóides apresentaram células variando de oblongas a ovais; brotação simples; não formaram pseudomicélio e nem produziram ascas (Tabela 4).

As 28 culturas monocelulares haplóides (MH) não expressaram diferenças nas características microscópicas.

C) Características Fermentativas

URM-4420 (MH): Foram obtidas 6 culturas apresentando assimilação e fermentação positiva da glicose, sacarose e rafinose em 24 horas e maltose e galactose, em 48 horas e negativa da lactose. Assimilação de nitrato e urease negativa (Tabela 4).

URM-4420 (MH): Foi obtida 1 cultura apresentando assimilação e fermentação positiva da glicose, sacarose, maltose e rafinose, em 24 horas e galactose, em 72 horas e negativa da lactose. Assimilação de nitrato e urease negativa (Tabela 4).

Fermento Itaiquara FIT-MH: Foi obtida 1 cultura apresentando assimilação e fermentação positiva da glicose, sacarose, maltose e rafinose, em 24 horas e galactose, em 72 horas e negativa da lactose. Assimilação de nitrato e urease negativa (Tabela 4).

Fermento Itaiquara FIT-MH: Foram obtidas 4 culturas apresentando assimilação e fermentação positiva da glicose, sacarose, maltose, galactose e rafinose, em 24 horas e galactose, em 48 horas e negativa da lactose. Assimilação de nitrato e urease negativa (Tabela 4).

Fermento Itaiquara FIT-MH: Foram obtidas 2 culturas apresentando assimilação e fermentação positiva da glicose, sacarose, maltose, galactose e rafinose, em 24 horas e negativa da lactose. Assimilação de nitrato e urease negativa (Tabela 4).

Fermento Lallemand FLA-MH: Foram obtidas 5 culturas apresentando assimilação e fermentação positiva da glicose, sacarose e maltose, em 48 horas e galactose e rafinose, em 72 horas e negativa da lactose. Assimilação de nitrato e urease negativa (Tabela 4).

Fermento Lallemand FLA-MH: Foram obtidas 2 culturas apresentando assimilação e fermentação positiva da glicose, sacarose e maltose, em 24 horas e galactose e rafinose, em 72 horas e negativa da lactose. Assimilação de nitrato e urease negativa (Tabela 4).

Selvagem SEL-MH: Foram obtidas 7 culturas apresentando assimilação e fermentação positiva da glicose, sacarose, maltose, galactose e rafinose, em 48 horas e negativa da lactose. Assimilação de nitrato e urease negativa (Tabela 4).

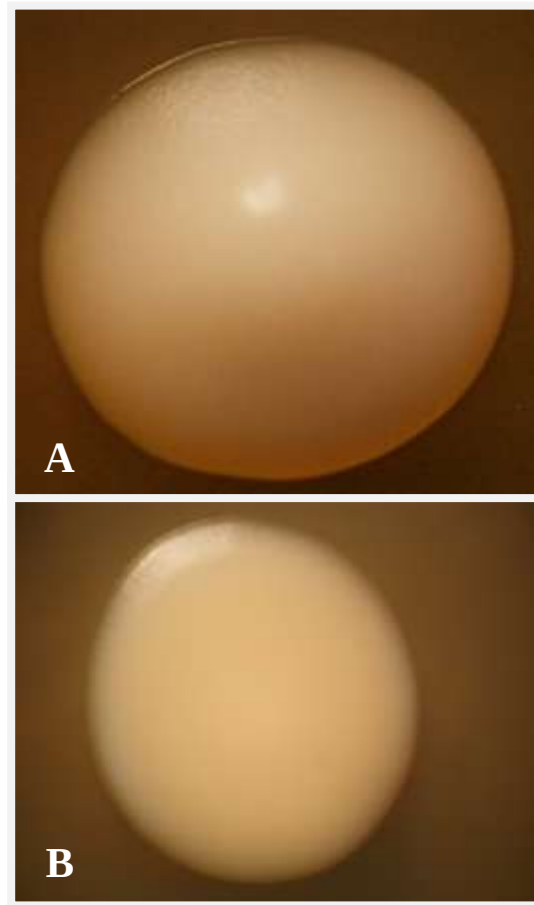
As 28 culturas monocelulares haplóides (MH) apresentaram diferenças entre si, em relação ao tempo de fermentação dos açúcares.

Tabela 4 - Caracterização morfofisiológica de culturas de *S. cerevisiae* monocelulares haplóides.

CARACTERÍSTICA MORFOFISIOLÓGICA	URM- 4420 (MH)		FERMENTO ITAIQUARA (MH)				FERMENTO LALLEMAND (MH)		SELVAGEM (MH)
MACROSCÓPICA	Nº de Culturas		Nº de Culturas				Nº de Culturas		Nº de Culturas
	BT-A (6)	BT-B (1)	BT-A (1)	BT-B (4)	BT- C (1)	BT-D (1)	BT-A (5)	BT-B (2)	BT-A (7)
Coloração	Creme	Creme	Creme claro	Creme	Creme	Creme	Branca	Branca	Creme
Margem	Regular	Regular	Regular sulcada	Regular	Regular ligeiramente sulcada	Irregular	Regular	Regular	Regular
Aspecto	Brilhoso	Opaco	Opaco	Brilhoso	Pouco brilhoso	Opaco	Brilhoso	Opaco	Brilhoso
Textura	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
Superfície	Lisa, elevada no centro e restrita	Lisa, plana e restrita	Lisa, elevada no centro e restrita	Lisa, plana e restrita	Lisa, plana e restrita	Lisa, convexa e restrita	Lisa, elevada no centro e restrita	Lisa, com depressão central e difusa	Lisa, elevada no centro e restrita
MICROSCÓPICA									
Forma das células	Oblongas a ovais	Oblongas a ovais	Oblongas a ovais	Oblongas a ovais	Oblongas a ovais	Oblongas a ovais	Oblongas a ovais	Oblongas a ovais	Oblongas a ovais
Tipo de brotação	Simples	Simples	Simples	Simples	Simples	Simples	Simples	Simples	Simples
Formação de Pseudomicélio	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Formação de ascos	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
FERMENTATIVA									
Glicose	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
Galactose	48 horas	72 horas	72 horas	48 horas	24 horas	24 horas	72 horas	72 horas	48 horas
Sacarose	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
Maltose	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
Rafinose	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	72 horas	72 horas	48 horas
Lactose	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Assimilação de nitrato	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Produção de urease	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa

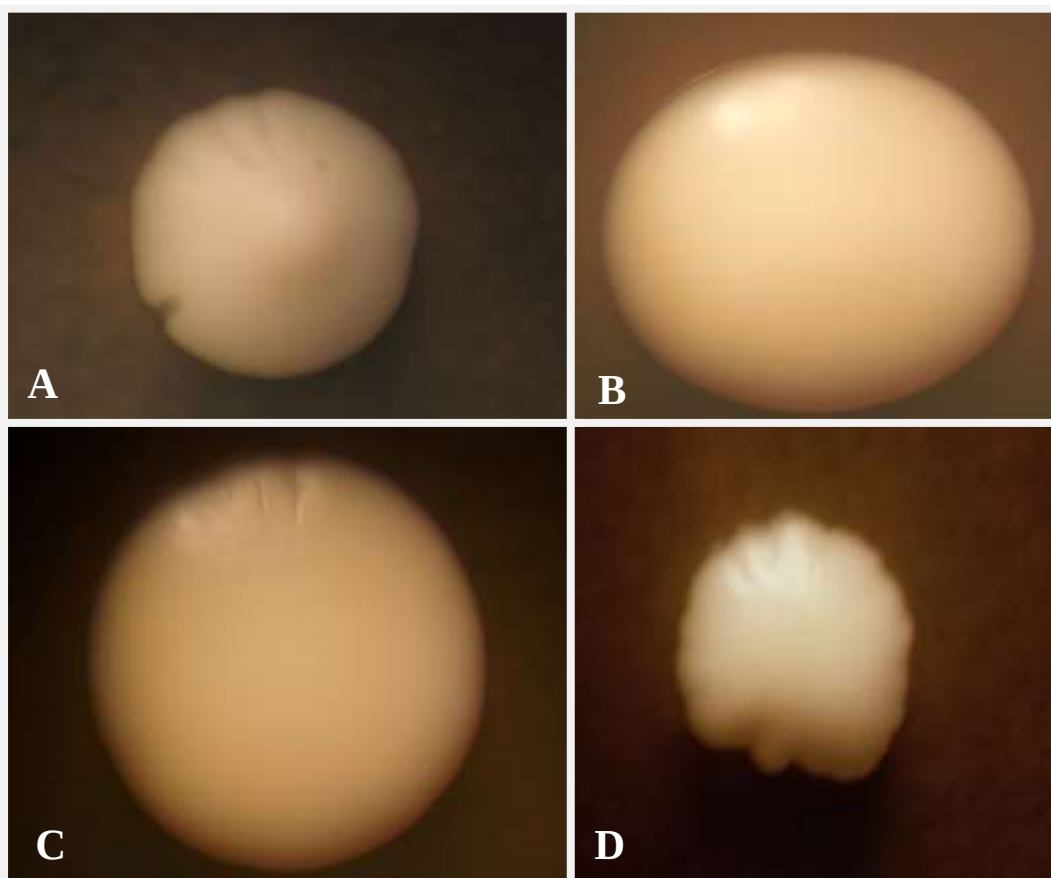
Fonte: A Autora (2006). URM = Universidade do Recife Micologia; MH = Monocelular Haplóide; BT = Biotipo

Figura 5 - Colônias da URM-4420 (MH) em ágar Gorodkova, com 8 dias. A e B – Aspectos macroscópicos (160 X).



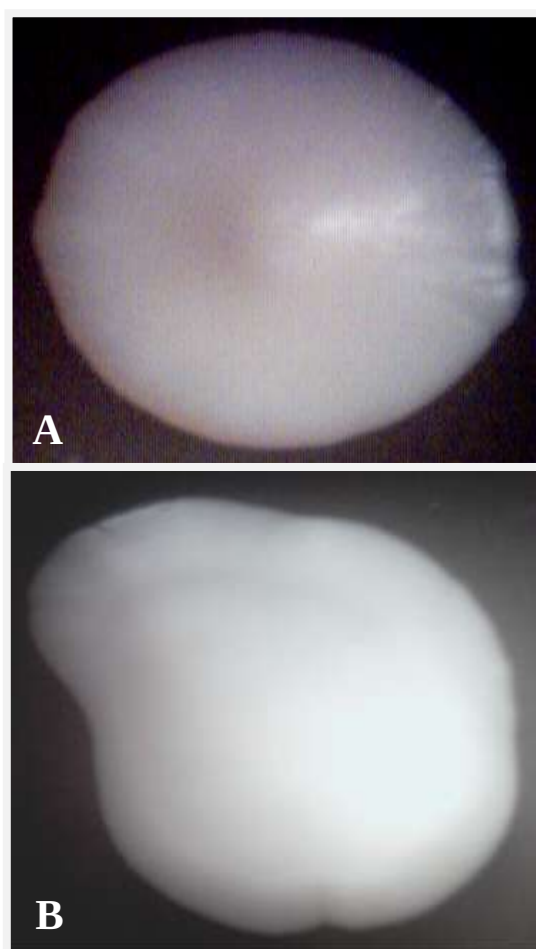
Fonte: A Autora (2006).

Figura 6 - Colônias do Fermento Itaiquara (MH) em agar Gorodkowa, com 8 dias. A, B, C e D - Aspectos macroscópicos (160 X).



Fonte: A Autora (2006).

Figura 7 - Colônias do Fermento Lallemmand (MH) em ágar Gorodkowa, com 8 dias. A e B - Aspectos macroscópicos (160 X).



Fonte: A Autora (2006).

Figura 8 - Colônia da cultura Selvagem (MH) em ágar Gorodkowa, com 8 dias. Aspectos macroscópicos (160 X).



Fonte: A Autora (2006).

4.3 Caracterização morfofisiológica de culturas de *S. cerevisiae* com os diplóides recuperados (DR)

Foram realizados 84 entrecruzamentos entre culturas monocelulares haplóides, sendo 21 entre a cultura URM-4420 (DR); 21 entre o Fermento Itaiquara FIT-DR; 21 entre o Fermento Lallemand FLA-DR e 21 entre a Selvagem SEL-DR. Destes, foram recuperados 14 diplóides em até 30 dias.

Os mesmos apresentaram colônias grandes com crescimento lento em relação ao aumento do número de células e unidades formadoras de colônias.

A) Características Macroscópicas

URM-4420 (DR): Foram recuperadas 4 culturas diplóides, em 25 dias de cultivo.

Biotipo A: As 4 culturas com os diplóides recuperados apresentaram colônias com coloração creme; margem regular; aspecto brilhoso; textura cremosa e superfície lisa, elevada no centro e restrita (Tabela 5, Figura 9).

Fermento Itaiquara FIT-DR: Foram recuperadas 5 culturas diplóides, em 10 dias de cultivo.

Biotipo A: As 4 culturas com os diplóides recuperados apresentaram colônias com coloração creme; margem regular; aspecto brilhoso; textura cremosa e superfície lisa, elevada no centro e restrita (Tabela 5, Figura 9).

Biotipo B: A cultura com o diplóide recuperado apresentou colônias com coloração creme claro; margem regular; aspecto opaco; textura cremosa; superfície lisa, plana e restrita (Tabela 5, Figura 9).

Fermento Lallemand FLA-DR: Foram recuperadas 5 culturas diplóides, em 10 dias de cultivo.

Biotipo A: As 4 culturas com os diplóides recuperados apresentaram colônias com coloração branca; margem regular; aspecto brilhoso; textura cremosa e superfície lisa, elevada no centro e restrita (Tabela 5, Figura 9).

Biotipo B: A cultura com o diplóide recuperado apresentou colônias com coloração creme; margem regular; aspecto pouco brilhoso; textura cremosa e superfície lisa, elevada no centro e difusa (Tabela 5, Figura 9).

Selvagem SEL-DR: Não foi detectada a recuperação de culturas diplóides em até 30 dias de cultivo.

As 14 culturas com os diplóides recuperados (DR) apresentaram diferenças entre si, em relação à coloração, o aspecto e a superfície da colônia. Todas apresentaram textura cremosa.

Relatos de que no ciclo sexual típico de *S. cerevisiae*, linhagens haplóides existem em dois mating types “a” e “α” e elas, quando misturadas e compatíveis, podem ajudar a formar células diplóides estão descritos em Walker (1998), Azevedo (1998) e Serafini (2001). Lodder (1970) relata que há possibilidade de se obter mating types no meio de leveduras selvagens quando se testa um grande número de amostras. Silveira et al. (2006) relata que a depender da característica fisiológica dos biotipos, seja como cultura monocelular ou não monocelular, os resultados podem variar.

B) Características Microscópicas

URM-4420 (DR)

Biotipo A: As 4 culturas com os diplóides recuperados apresentaram células variando de oblongas a ovais; brotação simples; ausência de pseudomicélio; produção de 1 a 3 ascos com 2 a 4 ascosporos visualizados por campo (Tabela 5, Figura 9).

Biotipo B: A cultura com o diplóide recuperado apresentou células variando de oblongas a ovais; brotação simples; ausência de pseudomicélio; produção de 1 a 5 ascos com 2 a 4 ascosporos, por campo (Tabela 5, Figura 9).

Fermento Itaiquara FIT-DR

Biotipo A: As 4 culturas com os diplóides recuperados apresentaram células variando de oblongas a ovais; brotação simples; ausência de pseudomicélio; produção de 1 a 3 ascos com 2 a 4 ascosporos visualizados por campo (Tabela 5, Figura 10).

Biotipo B: A cultura com o diplóide recuperado apresentou células variando de oblongas a ovais; brotação simples; ausência de pseudomicélio; produção de 1 a 5 ascos com 2 a 4 ascosporos visualizados por campo (Tabela 5, Figura 10).

Fermento Lallemand FLA-DR:

Biotipo A: As 5 culturas com os diplóides recuperados apresentaram células variando de oblongas a ovais; brotação simples; ausência de pseudomicélio; produção de mais de 10 ascos com 2 a 4 ascosporos visualizados por campo (Tabela 5, Figura 11).

Selvagem SEL-DR: Não foi detectada a recuperação de culturas diplóides em até 30 dias de cultivo.

As 14 culturas com os diplóides recuperados (DR) apresentaram diferenças entre si, em relação ao número de ascos formados por campo.

C) Características Fermentativas

URM-4420 (DR): As 4 culturas com os diplóides recuperados apresentaram assimilação e fermentação positivas da glicose, sacarose, maltose e rafinose, em 24 horas e

galactose, em 72 horas e negativa da lactose. Assimilação de nitrato negativa e urease negativa (Tabela 5).

Fermento Itaiquara FIT-DR

Biotipo A: As 4 culturas com os diplóides recuperados apresentaram assimilação e fermentação positivas da glicose, sacarose, maltose e rafinose, em 24 horas e galactose, em 72 horas e negativa da lactose. Assimilação de nitrato negativa e urease negativa (Tabela 5).

Biotipo B: A cultura com o diplóide recuperado apresentou assimilação e fermentação positivas da glicose, sacarose, maltose e rafinose, em 24 horas e galactose, em 48 horas e negativa da lactose. Assimilação de nitrato negativa e urease negativa (Tabela 5).

Fermento Lallemmand FLA-DR: As 5 culturas com os diplóides recuperados apresentaram assimilação e fermentação positivas da glicose, sacarose, maltose e rafinose, em 24 horas e galactose, em 72 horas e negativa da lactose. Assimilação de nitrato negativa e urease negativa (Tabela 5).

Selvagem SEL-DR: Não foi detectada a recuperação de culturas diplóides em até 30 dias de cultivo.

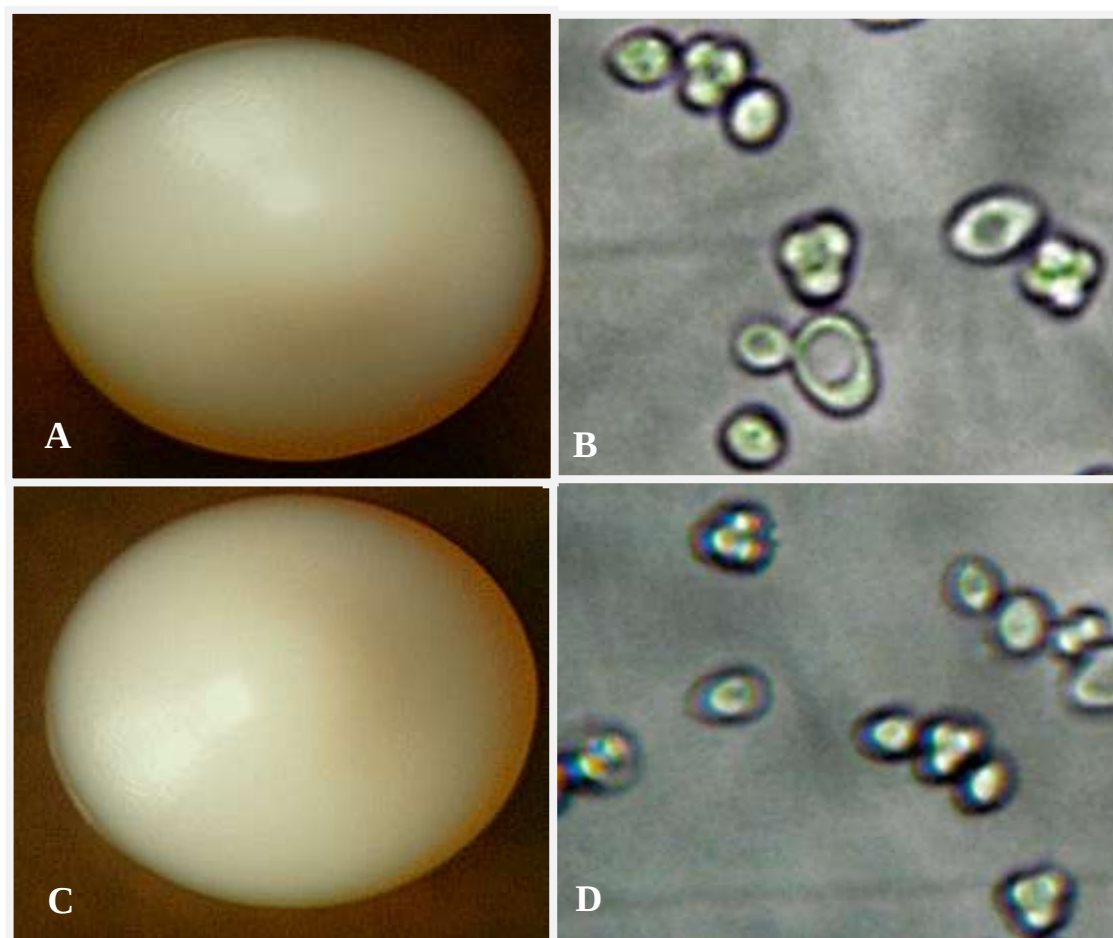
As 14 culturas com os diplóides recuperados (DR) apresentaram diferenças entre si, em relação ao tempo de fermentação dos açúcares.

Tabela 5 - Caracterização morfofisiológica de culturas de *S. cerevisiae* com os diplóides recuperados.

CARACTERÍSTICA MORFOFISIOLÓGICA	URM-4420 (DR)		FERMENTO ITAIQUARA (DR)		FERMENTO LALLEMAND (DR)	
MACROSCÓPICA	Nº de culturas com o diplóide recuperado		Nº de culturas com o diplóide recuperado		Nº de culturas com o diplóide recuperado	
	BT-A (3)	BT-B (1)	BT-A (4)	BT-B (1)	BT-A (4)	BT-B (1)
Coloração	Creme	Creme	Creme	Creme claro	Branca	Creme
Margem	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular
Aspecto	Brilhoso	Brilhoso	Brilhoso	Opaco	Brilhoso	Pouco brilhoso
Textura	Cremente	Cremente	Cremente	Cremente	Cremente	Cremente
Superfície	Lisa, elevada no centro e restrita	Lisa, elevada no centro e restrita	Lisa, elevada no centro e restrita	Lisa, plana e restrita	Lisa, elevada no centro e restrita	Lisa, elevada no centro e difusa
MICROSCÓPICA						
Forma das células	Oblongas a ovais	Oblongas a ovais	Oblongas a ovais	Oblongas a ovais	Oblongas a ovais	Oblongas a ovais
Tipo de brotação	Simples	Simples	Simples	Simples	Simples	Simples
Formação de pseudomicélio	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Formação de ascas	1 a 3 por campo	1 a 5 por campo	1 a 3 por campo	1 a 5 por campo	+ de 10 por campo	+ de 10 por campo
FERMENTATIVA						
Glicose	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas
Galactose	72 horas	72 horas	72 horas	48 horas	72 horas	72 horas
Sacarose	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas
Maltose	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas
Rafinose	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas
Lactose	Negativa	Negativa	Negativa	24 horas	Negativa	Negativa
Assimilação de nitrato	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Produção de urease	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa

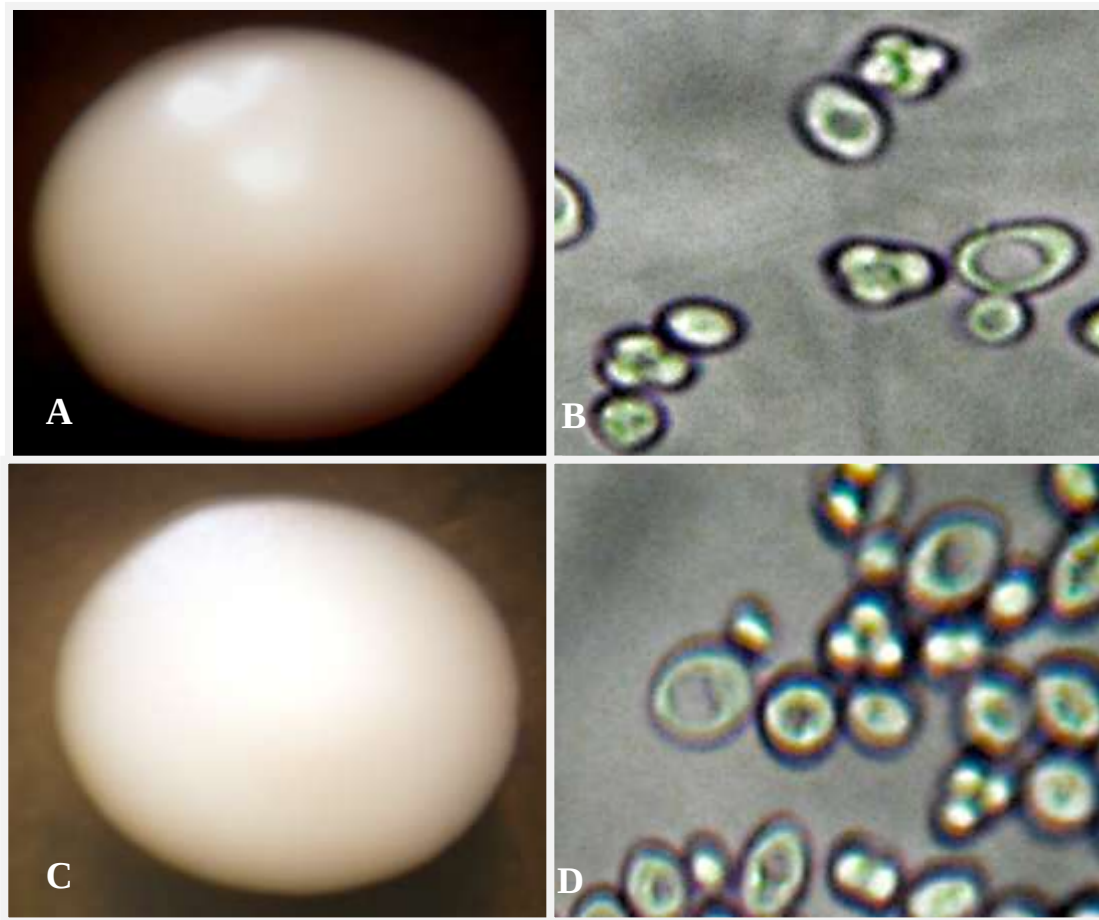
Fonte: A Autora (2006). URM = Universidade do Recife Micologia; DR = Diplóide Recuperado; BT = Biotipo

Figura 9 - Colônias da URM-4420 (DR) em ágar Gorodkowa, com 25 dias. A e C-Aspectos macroscópicos (160 X). B e D – Aspectos microscópicos (400 X): ascos.



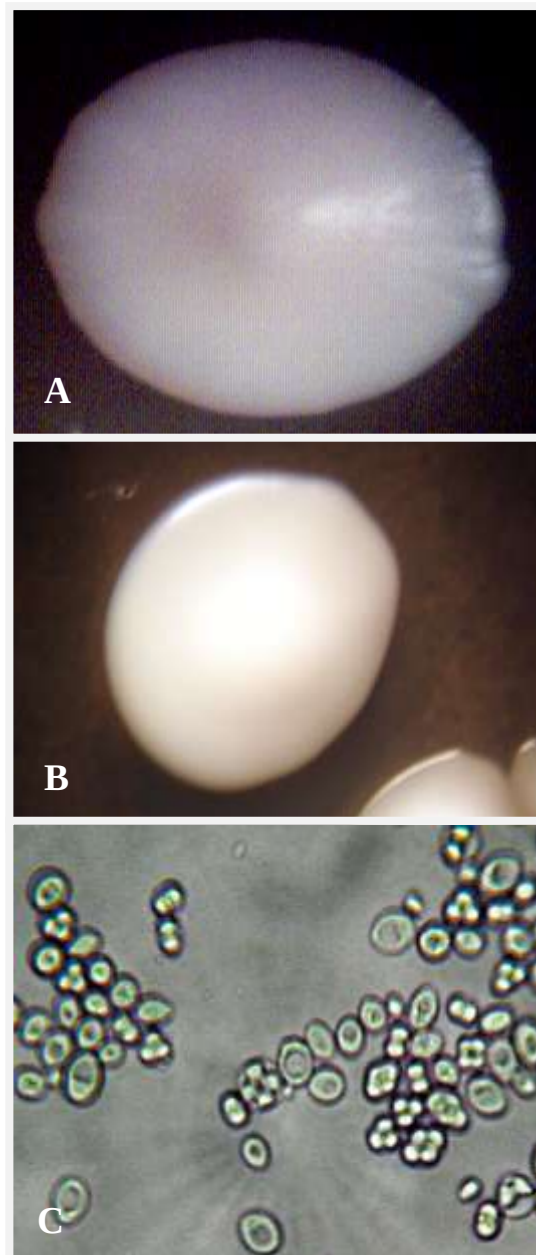
Fonte: A Autora (2006).

Figura 10 - Colônias do Fermento Itaiquara (DR) em ágar Gorodkova, com 10 dias. A e C – Aspectos macroscópicos (160 X). B e D – Aspectos microscópicos (400 X); ascos.



Fonte: A Autora (2006).

Figura 11 - Colônias do Fermento Lallemmand (DR) em ágar Gorodkowa, com 10 dias. A e B – Aspectos macroscópicos (160 X). C - Aspectos microscópicos (400 X): ascos.



Fonte: A Autora (2006).

Em uma análise geral os resultados obtidos indicam que, em diferentes amostras de cultura pura de *S. cerevisiae* original, podem ser evidenciados diferentes biotipos, os quais são detectados apenas na condição monocelular, enquanto culturas na condição de diplóides recuperados, os biotipos podem expressar características morfofisiológicas das culturas monocelulares e originais. Portanto, as características morfofisiológicas detectadas na condição de cultura original diplóide, quanto na condição monocelular haplóide ou com o diplóide recuperado podem auxiliar na identificação da espécie e na caracterização de linhagens.

Este é o primeiro relato de caracterização morfofisiológica de culturas de *S. cerevisiae* monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados.

4.4 Ensaio fermentativo de culturas de *S. cerevisiae* originais diplóides (OD) em mosto de cana-de-açúcar esterilizado

Os ensaios fermentativos com as 4 culturas originais diplóides de *S. cerevisiae* URM-4420 (OD), Fermento Itaiquara FIT-OD, Fermento Lallemmand FLA-OD e Selvagem SEL-OD, foram realizados em mosto de cana-de-açúcar esterilizado, em três intervalos do processo fermentativo: 0, 12 e 24 horas de fermentação (Tabela 6).

O percentual de etanol produzido variou, em 12 horas, de 1,70% a 4,20% e em 24 horas, de 5,00% a 6,00%. O ARI variou de 0,47g/100mL a 0,50g/100mL de caldo de cana (Tabela 6).

Das culturas originais URM-4420, Fermento Itaiquara FIT, Fermento Lallemmand FLA e Selvagem SEL, as que produziram, em 12 horas, o menor percentual de etanol (1,70%), foram a URM-4420, Fermento Lallemmand e a Selvagem e em 24 horas (5,00%), a URM-4420, entretanto, o maior percentual de etanol (4,20%), em 12 horas, foi produzido pelo Fermento Itaiquara e em 24 horas (6,00%), pela cultura Selvagem, correspondendo a valores de produtividade 2,76 g.L⁻¹.h⁻¹ e 1,97 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente. O menor valor de ARI (0,47g/100m) foi observado na Selvagem e o maior valor (0,50g/100mL), na URM-4420 e no Fermento Lallemmand (Tabela 6).

Relatos de que amostras diferentes de uma mesma espécie podem apresentar características fisiológicas diferentes, dentre elas a capacidade de fermentação, estão descritos em Jones et al. (1981); Kreger-van Rij (1984); Souza; Queiroz, 1995. Esses resultados estão corroborados pelos trabalhos de Cletto; Mutton (1995); Ribeiro; Horii (1999); Gomes et al. (2004) e Silva-Filho et al. (2005).

Tabela 6 - Caracterização fermentativa de culturas de *S. cerevisiae* originais diplóides em mosto de cana-de-açúcar esterilizado.

CULTURA ORIGINAL DIPLÓIDE	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	ETANOL (%)	PRODUTIVIDADE $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$	ARI (g/100 mL)
URM-4420 (OD)	0	0	0	0,50
	12	1,70	1,12	
	24	5,00	1,64	
FERMENTO ITAIQUARA (OD)	0	0	0	0,48
	12	4,20	2,76	
	24	5,20	1,71	
FERMENTO LALLEMAND (OD)	0	0	0	0,50
	12	1,70	1,12	
	24	5,40	1,77	
SELVAGEM (OD)	0	0	0	0,47
	12	1,70	1,12	
	24	6,00	1,97	

Fonte: A Autora (2006).

ARI = Açúcares Redutores Infermentescíveis; OD = Original Diplóide

4.5 Ensaio fermentativo de culturas de *S. cerevisiae* monocelulares haplóides (MH) em mosto de cana-de-açúcar esterilizado

Os ensaios fermentativos com as 12 culturas monocelulares haplóides de *S. cerevisiae* foram realizados em mosto de cana-de-açúcar esterilizado, em três intervalos do processo fermentativo: 0, 12 e 24 horas de fermentação (Tabela 7).

O percentual de etanol produzido variou, em 12 horas, de 1,70% a 4,80% e em 24 horas, de 5,10% a 6,20%. O ARI variou de 0,45g/100mL a 0,49g/100mL de caldo de cana (Tabela 7).

Das culturas monocelulares haplóides a que produziu, em 12 horas, o menor percentual de etanol (1,70%) foi a URM-MH1 e em 24 horas (5,10%), a FIT-MH2, entretanto, o maior percentual de etanol (4,80%), em 12 horas, foi produzido pela URM-MH3 e em 24 horas (6,20%), pela SEL-MH1, correspondendo a valores de produtividade $3,15 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $2,03 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente. Os menores valores de ARI (0,45g/100mL) foram observados na FLA-MH2 e SEL-MH1 e o maior valor (0,49g/100m), na FIT-MH2 (Tabela 7).

Estão descritos em Walker (1998) que células individuais de uma linhagem pura de uma mesma espécie podem apresentar heterogeneidade em relação à idade, o crescimento cinético, a morfologia e o metabolismo.

Tabela 7 - Caracterização fermentativa de culturas de *S. cerevisiae* monocelulares haplóides em mosto de cana-de-açúcar esterilizado.

CULTURA MONOCELULAR	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	ETANOL (%)	PRODUTIVIDADE $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$	ARI (g/100 mL)
URM-4420 (URM-MH1)	0	0	0	0,48
	12	1,70	1,12	
	24	5,80	1,90	
URM-4420 (URM-MH2)	0	0	0	0,47
	12	3,90	2,56	
	24	5,60	1,83	
URM-4420 (URM-MH3)	0	0	0	0,46
	12	4,80	3,15	
	24	5,80	1,90	
FERMENTO ITAIQUARA (FIT-MH1)	0	0	0	0,46
	12	2,40	1,57	
	24	5,40	1,77	
FERMENTO ITAIQUARA (FIT-MH2)	0	0	0	0,49
	12	2,60	1,71	
	24	5,10	1,67	
FERMENTO ITAIQUARA (FIT-MH3)	0	0	0	0,47
	12	3,00	1,97	
	24	5,20	1,71	
FERMENTO LALLEMAND (FLA-MH1)	0	0	0	0,48
	12	3,70	2,42	
	24	5,40	1,77	
FERMENTO LALLEMAND (FLA-MH2)	0	0	0	0,45
	12	4,70	3,09	
	24	5,40	1,77	
FERMENTO LALLEMAND (FLA-MH3)	0	0	0	0,46
	12	4,30	2,82	
	24	5,60	1,83	
SELVAGEM (SEL-MH1)	0	0	0	0,45
	12	4,30	2,82	
	24	6,20	2,03	
SELVAGEM (SEL-MH2)	0	0	0	0,48
	12	3,80	2,50	
	24	5,60	1,83	
SELVAGEM (SEL-MH3)	0	0	0	0,48
	12	3,70	2,42	
	24	5,80	1,90	

Fonte: A Autora (2006).

ARI = Açúcares Redutores Infermentescíveis; MH = Monocelular Haplóide

4.6 Ensaio fermentativo de culturas de *S. cerevisiae* com os diplóides recuperados (DR) em mosto de cana-de-açúcar esterilizado

Os ensaios fermentativos das 14 culturas com os diplóides recuperados de *S. cerevisiae* foram realizados em mosto de cana-de-açúcar esterilizado, em três intervalos do processo fermentativo: 0,12 e 24 horas de fermentação.

Até 24 horas os diplóides recuperados não apresentaram teores de etanol detectáveis pelo método utilizado.

Na literatura consultada não foram encontrados trabalhos envolvendo culturas de *S. cerevisiae* monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados em processos fermentativos.

De um modo geral, a indústria do álcool não leva em consideração o estado fisiológico em que a levedura se encontra trabalhando no mosto de cana ou melaço, dando prioridade à produtividade do processo de fermentação.

Conforme demonstrado neste trabalho, a forma diplóide ou monocelular haplóide de *S. cerevisiae* afetou os valores de produtividade de etanol e, provavelmente, as oscilações obtidas nos valores deste parâmetro, seja em pequena ou grande escala, devido às condições fisiológicas em que a levedura foi encontrada.

4.7 Caracterização molecular de culturas de *S. cerevisiae* originais diplóides (OD), monocelulares haplóides (MH) e com os diplóides recuperados (DR)

Mediante três repetições, não foi observado amplificação da região ITS do DNA ribossomal das culturas de *S. cerevisiae* originais diplóides, monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados com as enzimas de restrição, *HaeIII*, *MspI* e *DraI*, por isso não foi possível resultados subsequentes.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho, com culturas de *S. cerevisiae*, permitem inferir que:

- Culturas originais diplóides, monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados podem expressar características morfofisiológicas diferente;
- Culturas monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados podem expressar características morfofisiológicas semelhante ou diferente da cultura original;
- Culturas originais diplóides, monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados podem apresentar diferentes biotipos;
- Culturas originais diplóides, monocelulares haplóides e com os diplóides recuperados podem expressar diferenças no tempo de fermentação;
- Culturas monocelulares podem ser selecionadas quanto a melhor expressão fermentativa;
- Não houve relação entre a capacidade de fermentação das culturas e os substratos dos quais as mesmas foram isoladas;
- Culturas originais diplóides e monocelulares haplóides, caracterizadas quanto a morfofisiologia, devem ser depositadas em Coleções de Cultura;
- Culturas originais diplóides e monocelulares haplóides podem produzir diferentes percentuais de etanol;
- Culturas monocelulares haplóides podem produzir melhores percentuais de etanol do que culturas originais;

- A depender do fermento, as culturas originais diplóides e monocelulares haplóides podem ser mais eficientes na capacidade de fermentação;
- Não houve relação entre as diferentes características morfológicas das culturas e a capacidade de fermentação.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. **The interrelationship of cell growth and division in haploid and diploid cells of *Saccharomyces cerevisiae***. Experimental Cells Research, 106: 267-275, 1977.
- ALENCAR, E. M. B. **Leveduras isoladas de mosto de cana-de-açúcar usado para produção de álcool carburante**. Recife, 78p. (Dissertação. Centro de Ciências Biológicas. UFPE). 2001.
- ANTONINI, S. R. C.; PARAZZI, C. Monitoramento microbiológico da fermentação Etanólica. **Jornal Cana**. Araras, p. 25-26, 2000.
- ARORA, D. K.; ELANDER, R. P.; MUKERYI, K. G. **Handbook of Applied Mycology: Fungal Biotechnology**. v.4, 1992.
- AZEVEDO, J. L. **Genética de Microrganismos**. Goiânia. Editora URG, 1998, 478p.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeast: Characteristics and Identification**. 2ª edição, 2000, 1002p.
- BECKENKAMP, L. W. **Leveduras isoladas de polpas de frutas industrializadas**. Recife. 63p. (Dissertação. Centro de Ciências Biológicas. UFPE). 1997.
- CASTILHO-VALAVICIUS, B. A.; TAKITA, M. A.; THOMPSON, G. M.; PIESTUN, U. S. The molecular genetics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, 44 (5): 301-309, 1992.
- CAPELLO, M. S.; BLEVE, G.; GRIECO, F.; DELLAGLIO, F.; ZACHEO, G. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. **Journal Applied Microbiology**. 97 (6): 1274-1280, 2004.
- CONN, E. E.; STUMPF, P. K. **Manual de Bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 1972, 420p.
- COSTA, A. B. L. **Amostras de *Cryptococcus neoformans* estocadas na micoteca URM: Revisão taxonômica, detecção de características de patogenicidade e determinação do grau de similaridade genética pela técnica de RAPD**. Recife, 85p. (Dissertação. Centro de Ciências Biológicas. UFPE). 1999.
- CLETO, F. V. G.; MUTTON, M. J. R. Influência de dois tipos de leveduras, do tratamento ácido e da adição de fubá de milho sobre o desenvolvimento do processo fermentativo e qualidade final do destilado. **STAB**. Açúcar, álcool e subprodutos. Piracicaba, v.13, n.3, 1995.
- COOK, A. H. **The Chemistry and Biology of Yeasts**. New York: Academic press, 1958, 763p.

DLAUCHY, D.; TORNAL-LEHOCZKI, J.; PETER, G. Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. **Systematic Applied of Microbiology**. 22: 445-453, 1999.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. Rio de Janeiro. Livraria Atheneu, 1989, 652p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998, p.220.

FULMER, E. I. **The chemical approach to problems of fermentation Industrial and engineering chemistry**, v. 22. n. 11, 1930, p. 148-150.

FUNGARO, M. H. P. **Aplicações de PCR em diagnóstico molecular e análise genética de microrganismos**. UEL. Paraná, 1997.

FRAZIER, W. C. **Microbiologia de alimentos**. 2 ed. Acribia: Zaragoza, 1976, 552p.

GOMES, F. C. O.; SILVA, C. L. C.; MENDES, M. M.; OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A. **Utilização de linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* para produção da cachaça artesanal: Estudos dos parâmetros que influenciaram a qualidade do produto**. IV Congresso Brasileiro de Micologia, Ouro Preto-MG, 2004, p.90.

GUILLAMÓN, J. M.; SABATE, J.; BARRIO, E.; CANO, J.; QUEROL, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP, analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives of Microbiology**. v. 169, p. 387-392, 1998.

JONES, R. P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, D.P.F. **Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables**. Process Biochemistry, p. 42-49, 1981, 552p.

KORABECNA, M.; LISKA, V.; FAJFRLIK, K. Primers ITS1, ITS2 e ITS4 detect the intraspecies variability the internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene region clinical isolates of fungi. **Folia Microbiol** (Praha), 48(2): 233-238, 2003.

KREGER-van RIJ, N. J. W. **The Yeast: A taxonomic study**. 3ª edição. Amsterdam: Elsevier, 1984, 1091p.

KURTZMAN, C. P. **Yeast systematics – from phenotype to genotype**. Food Technology and Biotechnology, 3, n.4, 1998, p.261-266.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica: fungos, actinomycetes e algas de interesse médico**. 9º ed., São Paulo: EDUSP, 2002, 695p.

LEAL, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; BUTT, T. M.; PEBERDY, J. F. Detection and characterization of *Metarhizium anisopliae* using molecular markers. **Microbiology**. v. 23, p. 104-112, 1998.

LIMA, N. A. Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de cana de açúcar. **Brasil Açucareiro**, n.4, p337-343, 1974.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia: tecnologia das fermentações**. v.1. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1985, 85p.

LODDER, J. **The Yeast: A taxonomic study**. Oxford: North Holland Publishing Company, 1970, 1385p.

MAGALHÃES, O. M. C.; QUEIROZ L. A. Levaduras aisladas de diversos tipos de alimentos. **Boletín Micológico**, 6 (1-2): p.49-54, 1991.

MELO, H. F. **Ausência de termotolerância induzida por choque térmico na levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus***. Recife, 40p. (Dissertação. Centro de Ciências Biológicas. UFPE). 2001.

MULLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. ANALYTICAL CHEMISTRY, v. 31, n.3, 1959, p. 426-428.

MONTROCHER, R.; VERNER, M. C.; BRIOLAY, J.; GAUTIER, C.; MARMEISSE, R. Phylogenetic analysis of the *Sccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 48: 295-303, 1998.

NASMYTH, K.; SHORE, D. Transcriptional regulation in the yeast life cycle. **Science**, 237: 1162-1170, 1982.

NEDER, R. N. **Microbiologia: Manual de Laboratório**. São Paulo: Nobel, 1992, p. 81-98.

OLIVER, S. G. From DNA sequense to biological function. **Nature**, 379: 596-600, 1996.

PAQUIN, C.; ADAMS, J. Frequency of fixation of adaptative mutations is higher in Evolving diploid than haploid yeast populations. **Nature**, 302: 495-500, 1983.

PHAFF, H. J. **Isolation de yeast from natural source**. In: Isolation of biotechnological organisms from nature. Labeda (ed), US Mc-Graw-Hill Inc, 1990, p. 53-59.

PRESCOTT, S. C.; DUNN, C. G. **Industrial Microbiology**. New York: McGraw. Hill Book, 1959, 945p.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA filamentous fungi. Letters in **Appllied Microbiology**, v. 1, p. 17-20, 1985.

RIBEIRO, C. A.; HORRII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agrícola**, v. 56, n.2, p.255-263, 1999.

ROSE, H. A.; HARRISON, J. S. **The Yeast**. 2ª edição. USA: Academic Press. Volume I, 1987, 423p.

RODRIGUES, V. S. **Produção de álcool desidrogenase por células de *Kluyveromyces marxianus***. Recife. 31p. Monografia (Instituto de Ciências Biológicas. UPE). 2003.

SAITO, T. L.; OHTANI, M.; SAWAI, H.; SANO, F.; SAKA, A.; WATANABE, D.; YUKAWA, M.; OHYA, Y.; MORISHITA, S. ***Saccharomyces cerevisiae* Morphological Database**. Nucleic Acids Research, 2004, 32: 319-322.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2 Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor: New York, 1989, 368p.

SCRIBAN, R. **Biotecnologia**. São Paulo: Manole, 1985, 488p.

STUPIELLO, J. P.; HORRIL, J. **Condução da fermentação alcoólica**. Departamento de Tecnologia Rural-ESALQ, v.4, n.17, 1981.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. Azevedo, J. L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001, 463 p.

SEBASTIANI, F.; BARBERIO, C.; CASALONE, E.; CAVALIERI, D.; POLSINELLI, M. Crosses between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* generate fertile hybrids. **Res Microbiol**. 153 (1): 53-58, 2002.

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

SILVEIRA, A. C. B.; OLIVEIRA, N. T.; NEVES, R. P.; MAGALHÃES, O. M, C.; QUEIROZ, L. A. Caracterização fisiológica de culturas não monocelulares e monocelulares de espécies de *Malassezia*. **RBAC**, v. 38 (4): 213-216, 2006.

SOUZA, C. M.; QUEIROZ, L. A. Flocculation and fermentation capacity of strains of *Saccharomyces* stored at mycotheca –URM I. **Boletim Micológico**, v. 10 (1-2): 89-95, 1995.

VAN der WALT, J. P. V. D.; YARROW, D. **Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts**. In: KREGER-van RIJ, N. J. W. *The Yeast: A taxonomic study*. 3ª edição. Amsterdam: Elsevier, 1984, 1091p.

VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de microbiologia**. Guanabara Koogan, 2006, p. 138.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: INNS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (ED), *PCR Protocols, a guide to methods and applications*. New York. Academic Press, 1990, p. 315-322.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. Jonh Wiley and Sons Ltd. England, 1998, 350 p.