

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURA DO GÊNERO
Lachancea Kurtzman ISOLADA DE MOSTO DE ALAMBIQUE DA
ZONA DA MATA DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

LUCIANA FILGUEIRA PEREIRA

**Recife
2009**

LUCIANA FILGUEIRA PEREIRA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURA DO GÊNERO
Lachancea Kurtzman ISOLADA DE MOSTO DE ALAMBIQUE DA
ZONA DA MATA DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Júnior.
Departamento de Genética - UFPE

CO-ORIENTADORA:

Profa. Dra. Bereneuza T. R. Valente Brasileiro
CCBS - UNICAP

**Recife
2009**

Pereira, Luciana Filgueira

Identificação e caracterização de levedura do gênero *Lachancea Kurtzman* isolada de mosto de alambique da Zona da Mata do Estado de Pernambuco / Luciana Filgueira Pereira – Recife: O Autor, 2009.

82 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Departamento de Micologia, 2009.

Inclui bibliografia e apêndices.

1. Taxonomia tradicional 2. Taxonomia molecular 3. *Zygosaccharomyces* e *Lachancea* I. Título.

578.012 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB - 2009-191

LUCIANA FILGUEIRA PEREIRA

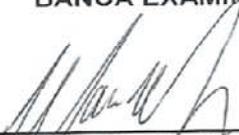
**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURA DO GÊNERO
Lachancea Kurtzman ISOLADA DE MOSTO DE ALAMBIQUE DA
ZONA DA MATA DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Júnior

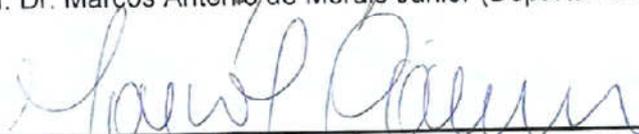
Co-orientadora: Profa. Dra. Bereneuza T.R. Valente Brasileiro

Dissertação apresentada e aprovada no dia 26 de fevereiro de 2009, pela Banca
Examinadora composta dos seguintes membros:

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Júnior (Departamento de Genética - UFPE)



Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (Departamento de Agronomia - UFRPE)



Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta (Departamento de Micologia - UFPE)

Ao Senhor Jesus Cristo que me fortaleceu, e ensinou a lidar com cada desafio a me proposto.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, através do departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas (CCB) pela oportunidade de realização desse Mestrado;

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Júnior, pela oportunidade e por cada desafio a mim imposto;

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Bereneuza Tavares Ramos Valente Brasileiro, pela amizade construída, paciência e disponibilidade;

Ao Professor Dr. Carlos Augusto Rosa, do Departamento de Ecologia e Biotecnologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelos conhecimentos passados e pela colaboração neste trabalho;

Aos professores do Departamento de Micologia: Dra. Cristina de Sousa Motta, Dra. Elaine Malosso e Dr. Gladstone Silva, por todos os conhecimentos passados e pelas valiosas sugestões prestadas;

À Genetech Bioprodutividade, em especial ao Biólogo João Assis Scavuzzi Menezes, pelo apoio dado aos primórdios desse trabalho;

A todos os colegas de turma da Pós-Graduação em Biologia de Fungos, em especial às amigas Glauciane Damasceno, Theomara Ottoni e a doutoranda Patrícia Tiago;

Aos professores da Banca examinadora, pelas opiniões valiosas prestadas;

Ao professor Valdir Balbino pelas valiosas contribuições de Bioinformática;

Ao amigo César Costa Júnior, pela contribuição dada a este trabalho;

A todos os colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética - UFPE, André Ribas, Carol Elsztein, Fernanda Bezerra, Rodrigo Mendonça, Meiriana Xavier e Will Barros;

À Cássia e Viviane do Centro de Pesquisa AGGEU Magalhães pelo seqüenciamento;

A minha família, por todo carinho e paciência nos momentos difíceis.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a identificação de um isolado de levedura coletado de um alambique no município de Paudalho-PE preliminarmente identificado como *Zygosaccharomyces* sp. Para elucidar o posicionamento taxonômico deste isolado foram utilizados os métodos taxonômicos convencionais e moleculares e feitas algumas inferências filogenéticas. Os ascos produzidos pelo isolado SPC2(7) assumiram a forma de halteres típica de espécies dos gêneros *Zygosaccharomyces* e *Lachancea*. Os ensaios de assimilação de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio e os testes de capacidade fermentativa mostraram que este isolado apresenta características fisiológicas distintas de todas as espécies pertencentes a ambos os gêneros. Já os padrões fenéticos obtidos com o uso de marcadores do tipo "DNA-fingerprinting", mostraram a similaridade do isolado SPC2(7) com as espécies *Lachancea cidri* e *Lachancea fermentati*. A seqüência de nucleotídeos da região D1/D2 do gene ribossomal 26S confirmou que o isolado SPC2(7) pertence ao gênero *Lachancea*, além de mostrar sua completa similaridade com a seqüência homóloga da linhagem IFO11066 isolada no Japão que foi parcialmente classificada como *Zygosaccharomyces* sp. As análises de agrupamento genético tanto da seqüência D1/D2 como ITS1-5.8s-ITS2 pelos métodos de Máxima Verossimilhança e "Neighbor-joining" definiram o isolado SPC2(7) como um ramo filogeneticamente distinto de *L. cidri* e *L. fermentati*. A partir destes resultados, pode-se sugerir que o isolado SPC2(7) corresponde a um representante de uma nova espécie de levedura denominada neste trabalho como *Lachancea mirantinus*.

Palavras chaves: Taxonomia tradicional, Taxonomia molecular, *Zygosaccharomyces* e *Lachancea*.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to provide the identification of an isolate of yeast, previously identified as *Zygosaccharomyces* sp. collected from a still located in the city of Paudalho-PE. In order to elucidate the taxonomic position of this isolate, it were used both taxonomic methods, and phylogenetic analysis. The ascus produced by the SPC2(7) isolate assumed the form of halteres, typically from species belonged to the *Zygosaccharomyces* and *Lachancea* genus. The assimilation essays of sources of carbon and nitrogen and the fermentative capacity tests demonstrated that this isolate presents physiologic characteristics differently from the species belonged to both of these genus. The phenetic standards obtained with the use of "DNA-fingerprint" markers confirmed the similarity among the SPC2 (7) isolate and the *Lachancea cidri* and *Lachancea fermentati* species. The D1/D2 region nucleotide sequence of the 26S ribosomal confirmed that the SPC2 (7) isolate belongs to the *Lachancea* genus, besides it presented its complete similarity to the homolog sequence of the IFO11066 lineage isolated in Japan which was partially classified as *Zygosaccharomyces* sp. The genetic group analysis of the D1/D2 and ITS1-5.8S-ITS2 sequences by the Maximum Verosimilarity and Neighbor-joining methods defined the SPC2(7) isolate as a branch phylogenetically different from the *L. cidri* and *L. fermentati*. Thus, it is concluded that the SPC2 (7) isolate corresponds to a representant of a new specie of yeast denominated in this study as *Lachancea mirantinus*.

Keywords: Traditional Taxonomy, Molecular Taxonomy, *Zygosaccharomyces* and *Lachancea*.

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Estruturas reprodutivas em <i>Zygosaccharomyces bailii</i> . Ascosporos (a) OM “halteres” (b), contendo cada um dois ascosporos (c).....	22
2. Agrupamento gênico do DNA ribossomal com a representação dos genes 18S (Subunidade Menor) e 26S (Subunidade Maior) da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) e da região IGS (IGS1-5S-IGS2). Além dos genes, estão indicados o espaçador transcrito externo (ETS) e espaçador não transcrito (NTS).....	29
3. Análise filogenética inferida de leveduras isoladas do mosto de fermentação para produção de cachaça artesanal a partir da seqüência de nucleotídeos da região variável D1/D2 do gene 26S usando o método de agrupamento do tipo Neighbor-Joining, com 1000 pseudo-réplicas. A seta indica a posição do isolado SPC2(7) identificado no presente trabalho.....	37
4. Replicador que permite determinar a capacidade de assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio de vinte e uma leveduras num único experimento.....	40
5. Isolado SPC2(7) em meio YM ágar a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) após 3 dias de crescimento (A) e análise microscópica das células mostrando as estruturas reprodutivas (B): ascosporos (a) ascosporos (b) e “halteres” (c) produzidos em meio YCB (acrescido de 0,01% de Sulfato de amônio) a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) após 3 dias de crescimento. 400x.....	48
6. Ensaio de capacidade fermentativa do isolado SPC2(7) em tubos de Durham. A seta mostra a presença de bolha de gás no interior dos tubos evidenciando a fermentação. Glicose (tubo 1), sacarose (tubo 2), maltose (tubo 3), rafinose (tubo 4) e galactose (tubo 5).....	51
7. Perfis de amplificação do locus ITS1-5.8S-ITS2 como os iniciadores ITS4 e ITS5 de <i>Lachancea fermentati</i> GBD 812 (pista 1), SPC2(7) (pista 2) e <i>Lachancea cidri</i> CBS 4575 (pista 3). Na pista M, marcador de peso molecular de 100 pb com indicação do tamanho de alguns fragmentos (à esquerda).....	52
8. Perfis de restrição dos fragmentos do locus ITS1-5.8S-ITS2 com as enzimas de restrição <i>EcoRI</i> , <i>DdeI</i> e <i>HinfI</i> . Nas pistas M, marcador de peso molecular de 100 pb com indicação do tamanho de alguns fragmentos (à esquerda). Encontram-se os DNAs de <i>Lachancea fermentati</i> GBD 812 (pista 1), SPC2(7) (pista 2) e <i>Lachancea cidri</i> CBS 4575 (pista 3).....	52

9. Análise de similaridade do isolado SPC2(7) com o iniciador (GTG)5. **A)** Perfil de amplificação das leveduras *L. fermentati* GBD 812 (pista 1), SPC2(7) (pista 2) e *L. cidri* CBS 4575 (pista 3) com fragmentos separados em gel de agarose a 1,3%. O marcador de peso molecular 100 bp foi utilizado (pista M). **B)** Análise de agrupamento dos perfis de amplificação utilizando o método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Simple Matching (SM)..... 53
10. Perfil de amplificação do DNA dos isolados industriais de *Zygosaccharomyces* sp. JPC2(8) (pista 1), JPC2(9) (pista 2), MC4(9) (pista 6), MC4(10) (pista 7), GC3(6) (pista 8) e GC3(7) (pista 9), da linhagem tipo de *Z. bailii* UFMG-L10 (pista 5) e dos isolados SPC2(7) (pista 3) e *L. fermentati* GBD 812 (pista 4) com os iniciadores (GTG)5 (painel C), (GACA)4 (painel D) e M13 (painel E) e a análise de agrupamento dos perfis de amplificação utilizando o método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Simple Matching (SM).(painel F)..... 54
11. Árvore filogenética de espécies de leveduras do gênero *Zygosaccharomyces* e *Lachancea* pelos métodos da Máxima Verossimilhança e Neighbor-Joining inferida a partir de seqüências de nucleotídeos do gene 26S (D1/D2) rDNA. Os Valores de “Bootstrap” >60% são mostrados na figura, originados a partir de 1000 pseudo-réplicas. Os valores acima de cada ramo são referentes ao método de Máxima verossimilhança e os abaixo, ao método de Neighbor-joining. A seqüência de nucleotídeos da região D1/D2 26S rDNA de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como outgroup..... 57
12. Árvore filogenética de espécies de leveduras do gênero *Zygosaccharomyces* e *Lachancea* originada pelos métodos da Máxima Verossimilhança e Neighbor-Joining inferida a partir de seqüências de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2 rDNA Os Valores de “Bootstrap” >60% são mostrados na figura, originados a partir de 1000 pseudo-réplicas. Os valores acima cada ramo são referentes ao método de Máxima verossimilhança e os abaixo, ao método de Neighbor-joining. A seqüência de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2 de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como outgroup..... 58
13. Árvore filogenética combinada de espécies de leveduras do gênero *Zygosaccharomyces* e *Lachancea* pelos métodos da Máxima Verossimilhança e Neighbor-Joining inferida a partir de seqüências de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2 e do gene 26S (D1/D2) rDNA. Valores de “Bootstrap” 60% são mostrados na figura, originados a partir de 1000 interações. Os valores acima de cada ramo são referentes ao método de Máxima Verossimilhança e os abaixo, ao método de Neighbor-Joining. As seqüências de nucleotídeos das regiões 26S (D1/D2 rDNA) e ITS1-5.8S-ITS2 de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como outgroup..... 59

LISTA DE TABELAS

Página

1. Espécies dos gêneros *Zygosaccharomyces* e *Lachancea* encontradas em diferentes tipos de alimentos..... 23
2. Iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de DNA das linhagens..... 43
3. Linhagens dos gêneros *Zygosaccharomyces* e *Lachancea* do banco de dados Genômico National Center for Biotechnology Information (NCBI) e os respectivos códigos de acesso para as seqüências dos genes..... 47
4. Características fisiológicas e bioquímicas do isolado SPC2(7) em comparação com espécies de *Lachancea* e *Zygosaccharomyces*..... 49
5. Fermentação de fontes de carbono pelo isolado e pelas espécies de *Zygosaccharomyces* e *Lachancea* 50
6. Alinhamento tipo Blastn das seqüências D1/D2 26S e ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA do isolado SPC2(7) com seqüências mais próximas depositadas no GenBank..... 55

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

CMA - Corn Meal Ágar-“Ágar Farinha de Milho”

D1/D2 26S rDNA - Domínios 1 e 2 dos Ácido Desoxirribonucléico Ribossômico
26S

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetraacético

ISSR - Seqüências Simples Inter-repetidas

MV- Máxima Verossimilhança

NaCl - Cloreto de Sódio

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NJ - Neighbor-Joining

PCR - Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase

TBE - Tampão Tris-Borato-EDTA

TRIS - Tris [Hidroximetil] Aminometano

UV- Ultravioleta

YCB - Carbono Levedura Base

YM - Extrato de Malte

YNB - Nitrogênio Levedura Base

YPED - Extrato de Levedura, Peptona e Dextrose (trealose)

SUMÁRIO

Página

INTRODUÇÃO.....	13
1 REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	15
1.1.1 Considerações sobre o uso das leveduras.....	15
1.1.2 Microbiologia da fermentação alcoólica.....	16
1.1.3 Produção de cachaça.....	16
1.2 HEMIASCOMYCETOS.....	19
1.2.1 Gênero <i>Zygosaccharomyces</i> Barker.....	21
1.2.2 Gênero <i>Lachancea</i> Kurtzman.....	24
1.3 TAXONOMIA CONVENCIONAL	25
1.4 TAXONOMIA MOLECULAR	26
1.4.1 Marcadores Moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR).....	27
1.4.1.1 Região ITS do DNA ribossomal	28
1.4.1.2 Região de microssatélites.....	30
1.4.1.3 Análise do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição do mtDNA.....	31
1.5 MÉTODOS DE RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA.....	32
1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
2.1 LEVEDURAS.....	38
2.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MACROSCÓPICAS	38
2.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS.....	39
2.3.1 Formação de ascosporos.....	39
2.4 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS.....	39
2.4.1 Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio.....	40
2.4.2. Teste de capacidade fermentativa.....	41
2.4.3 Crescimento em meios com 50% glicose e 10% de NaCl.....	41

2.4.4	Produção de ácido e tolerância a 1% de ácido acético.....	41
2.4.5	Resistência a ciclohexamida.....	42
2.4.6	Crescimento em diferentes temperaturas.....	42
2.5	PROCEDIMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	42
2.5.1	Extração de DNA nuclear.....	42
2.5.2	Amplificação do DNA nuclear.....	43
2.5.2.1	Amplificação de DNA da região ITS do rDNA.....	44
2.5.2.2	Amplificação com os iniciadores (GTG) ₅ , (GACA) ₄ e M13.....	44
2.5.2.3	Análises estatísticas.....	45
2.5.3	Seqüenciamento	45
2.5.4	Análise das Seqüências de DNA e reconstrução de árvores filogenéticas.....	46
3	RESULTADOS	48
3.1	ANÁLISE TAXONÔMICA CONVENCIONAL.....	48
3.2	ANÁLISE TAXONÔMICA MOLECULAR.....	51
3.2.1	Análise por ribotipagem.....	51
3.2.2	Tipagem molecular do isolado SPC2(7) com os marcadores de “fingerprinting”.....	53
3.2.3	Identificação molecular por seqüenciamento de DNA	55
4	DISCUSSÃO.....	60
5	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	APÊNDICES.....	78

INTRODUÇÃO

Contaminações de alimentos por leveduras estão associadas á alterações nas propriedades físicas e sensoriais. Entretanto, em certos casos essas contaminações não são facilmente definidas principalmente quando se trata de alimentos fermentados, os quais muitas vezes dependem da presença de diferentes microrganismos produzindo metabólitos importantes para o sabor e aroma final dos mesmos (LOUREIRO; QUEROL, 1999). Portanto, a definição de contaminação não é fácil e depende do contexto analisado. Por exemplo, até mesmo células de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen podem ser consideradas contaminantes quando encontradas em alimentos e produtos industrializados (LOUREIRO; MALFEITO-FERREIRA, 2003).

A fermentação alcoólica constitui-se em uma das mais antigas e importantes atividades biotecnológicas, e vários estudos têm mostrado a grande diversidade de bactérias e leveduras nesse processo. Pesquisadores do Laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal de Pernambuco já identificaram mais de trinta espécies de leveduras encontradas no mosto de fermentação para produção de álcool combustível, além de caldo de cana e melaço (BASÍLIO et al., 2008; DE SOUZA-LIBERAL et al., 2007; SILVA-FILHO et al., 2005). Recentemente, foram identificadas leveduras presentes em diferentes alambiques artesanais de produção de cachaça na zona da mata do Estado de Pernambuco; dentre as leveduras identificadas, pode-se destacadas espécies dos gêneros *Candida* Berkhout, *Pichia* Hansen e *Zygosaccharomyces* Barker. Alguns isolados não puderam ser classificados em nível de espécie e foram descritos como pertencentes a espécies ainda não descritas (VILA NOVA, 2008). Análises filogenéticas preliminares mostraram que um desses isolados era geneticamente muito próximo às espécies *Zygosaccharomyces cidri* (Legalis) Yarrow e *Zygosaccharomyces fermentati* Naganishi que foram recentemente reclassificadas no novo gênero *Lachancea* (*L. cidri* e *L. fermentati*).

Diante do exposto, o objetivo geral do presente estudo foi identificar e caracterizar o isolado *Zygosaccharomyces* sp. SPC2(7) quanto aos aspectos morfológicos, bioquímicos, fisiológicos e genéticos buscando definir, se este isolado corresponde a uma nova espécie de levedura, qual sua capacidade fermentativa,

grau de variação genética e posicionamento filogenético em relação a outras espécies de leveduras do gênero *Zygosaccharomyces* Barker.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

1.1.1 Considerações sobre o uso das leveduras

Fermentação alcoólica pode ser genericamente definida como a produção de etanol a partir da metabolização dos açúcares presentes no meio que ocorre principalmente em ambiente anaeróbio. Este processo pode ser realizado tanto por algumas espécies de bactérias como por algumas espécies de fungos do Filo Ascomycota (WALKER, 1998). As civilizações humanas têm se valido desta característica fisiológica para a produção de alimentos, fármacos, produtos industriais diversos e combustíveis. O melhor exemplo destes é a levedura *S. cerevisiae* utilizada empiricamente a dezenas de séculos para a produção de pães e bebidas. Evidências moleculares da presença desta espécie em fermentação de vinho foram obtidas em jarras escondidas no túmulo do rei Scorpion I, um dos primeiros reis do Egito, datando de 3150_{ac} (CAVALIERI et al., 2003). Recentemente, *S. cerevisiae*, modelo há anos para estudos genômicos, tem atraído interesse como modelo para estudos de ecologia e genética evolutiva (LANDRY et al., 2006).

As leveduras transformam os açúcares dos diferentes substratos em vários produtos de interesse comercial através do processo de fermentação. Este processo é utilizado na indústria de alimentos para produção de vinhos, cerveja, bioetanol e pão. Apresentam grande importância em vários setores e são extremamente interessantes do ponto de vista biotecnológico, sendo utilizadas também na indústria química na produção de enzimas, pigmentos, acidulantes de alimentos e redutores químicos. Na indústria farmacêutica, são responsáveis pela produção de vacinas, hormônios, probióticos e fatores sanguíneos. O interesse pelo uso de leveduras na tecnologia ambiental vem aumentando nos últimos anos, no controle, na biorremediação, utilização de subprodutos industriais, bioabsorção de metais, proporcionando vantagens econômicas e preservação do meio ambiente. Também são de grande importância, nas pesquisas biomédicas, como metabolismo de drogas, doenças genéticas humanas, câncer e síndrome da imunodeficiência adquirida

(SIDA), além das pesquisas fundamentais nas áreas de biologia celular, bioquímica, genética molecular e biologia molecular. As indústrias de bebida à base de fermentação alcoólica dependem da habilidade de leveduras como *S. cerevisiae* em converter os açúcares dos diferentes substratos, tais como maltose, sacarose ou amido em glicose, e este em dióxido de carbono e etanol (WALKER, 1998).

1.1.2 Microbiologia da fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica pode ser considerada um ambiente complexo constituído por muitas espécies de leveduras e bactérias e é caracterizado por uma grande sucessão de linhagens e espécies ao longo do período de fermentação (SILVA-FILHO et al., 2005). Uma análise detalhada dos episódios de contaminação recorrentes por leveduras chamadas selvagens mostrou que a levedura *Dekkera bruxellensis* van der Walt constitui o principal contaminante da produção de álcool em destilarias de fermentação contínua que utilizam caldo de cana como substrato (DE SOUZA-LIBERAL et al., 2007). Esse quadro da composição da população de leveduras, talvez ainda, esteja longe de estar completo, que incluem além de *D. bruxellensis*, principalmente as espécies *Candida pararugosa* Nakase et al., *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice, *Candida tropicalis* (Castellani) Berkhout, *Hanseniaspora guilliermondii* Pijper, *Pichia galeiformis* Endo & Goto, *Pichia ohmeri* (Etchells & Bell) Kreger-van Rij, *Zygoascus hellenicus* Smith e *Lachancea fermentati* (H. Naganishi) Kurtzman, além de mais de quinze outras espécies (BASÍLIO et al., 2008).

1.1.3 Produção de cachaça

A cachaça é uma bebida produzida a partir da destilação do fermentado do caldo de cana de açúcar por células de leveduras. A produção de cachaça no Brasil data do início da colonização. Entretanto, as indústrias de cachaça até 1945 eram rurais e rudimentares, não havendo padrões de qualidade. A produção doméstica aumentou bastante e desde então o processo de produção vem sendo aperfeiçoado e

melhorado, o que tem acarretado melhorias no rendimento, produtividade e qualidade do produto final (PATARO et al., 2002). Atualmente, este setor industrial passa por um processo de modernização, o que seguramente deve considerar a qualidade da microbiota presente no processo, já que cada componente microbiano deve produzir um conjunto de substâncias que influenciam na qualidade sensorial da bebida. Este é um aspecto que diferencia a fermentação para a produção de cachaça daquela para a produção de etanol combustível. Na produção de álcool combustível o importante é a utilização de linhagens com alta capacidade de produção de etanol, e a presença de leveduras que produzam outros metabólitos podem ser consideradas contaminantes do processo (BASÍLIO et al., 2008). Por outro lado, é bem-vinda a presença, na fermentação de cachaça, de leveduras com menor capacidade fermentativa, mas com o potencial de produção de metabólitos que apresentam qualidades importantes na determinação de aromas e sabores (VILA NOVA, 2008). No entanto, certas espécies de levedura também produzem substâncias que interferem negativamente com a qualidade sensorial da bebida, as quais devem ser consideradas verdadeiros contaminantes do processo (LOUREIRO; MALFEITO-FERREIRA, 2003).

As leveduras utilizadas na fabricação de bebidas alcoólicas geralmente são linhagens de *S. cerevisiae*. Nas fermentações espontâneas, um grande número de espécies pode estar envolvido, com predominância de *S. cerevisiae* (PATARO et al., 2000). Existem os fermentos chamados "caipiras", selecionados e prensados. O fermento natural ou pé-de-cuba é usualmente preparado pelo método conhecido como fermento caipira, que consiste numa mistura de caldo de cana-de-açúcar não diluído, farelo de arroz (*Oryza sativa* L.), farinha de milho (*Zhea mays* L.) ou soja, entre outros cereais, com adição de suco de limão (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) ou laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) azeda para abaixar o pH. São feitas adições diárias de caldo de cana-de-açúcar no período de cinco a sete dias (RIBEIRO, 2002), quando as leveduras naturalmente presentes nos substratos estão se reproduzindo e o volume de massa celular está aumentado. Desta forma, o inóculo é obtido a partir da fermentação espontânea do caldo por microrganismos selvagens presentes no caldo da cana-de-açúcar, nos equipamentos e nas dornas de fermentação. O fermento prensado é um produto comercial contendo células de *S. cerevisiae* a mais específica para a fermentação da garapa, como por exemplo, Fermento Fleischmann, Itaquara, Mauri, etc.

Nas grandes destilarias brasileiras de álcool e mesmo em pequenas fábricas, já é comum o uso de fermentos selecionados no início da safra, mas ainda há um grande número de fábricas que trabalha com leveduras de panificação, prensadas, e com fermentos naturais. Ao longo dos ciclos de fermentação, que dura normalmente entre 20 a 24 horas, o caldo de cana-de-açúcar vai sendo lentamente “contaminado” pelas leveduras indígenas, que se sobrepõem e dominam o processo fermentativo. Isso ocorre em qualquer região do país, com predominância de microrganismos adaptados às condições locais (LIMA, 2001). Observa-se que de uma forma geral, *S. cerevisiae* prevalece nas fermentações, sejam espontâneas ou conduzidas (SCHWAN et al., 2001).

Pataro et al. (2000) mostraram uma sucessão de população de leveduras em diferentes períodos de fermentação da cachaça, em três alambiques no estado de Minas Gerais. As espécies *Sacharomyces servazzi* Capriotti, *Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman, *Saccharomyces unisporus* A. Jörg e *Torulaspota delbrueckii* (Lindner) Lindner, foram exclusivamente isoladas de fermentações iniciais, enquanto que, *Candida glabrata* (Anderson) Meyer & Yarrow, *Candida colliculosa* (Hartmann) Meyer & Yarrow e *Candida krusei* (Catellani) Berkout, foram isoladas nas fermentações medianas; e a maioria das linhagens de *Schizosaccharomyces pombe* Lindner e *S. cerevisiae* predominaram em todo período da fermentação.

Segundo Oliveira (2001), a fermentação artesanal da cachaça de cana caracteriza-se por ser conduzida por uma microbiota mista de leveduras, com predominância de linhagens de *S. cerevisiae*, leveduras apiculadas como *Kloeckera japonica* Saito & Otani e espécies de *Candida*, *Kluyveromyces* (Grootwassink & Hewitt) e *Pichia* são também freqüentemente isoladas. As leveduras presentes nessas fermentações estão em constante sucessão, devido à introdução de microrganismos que acompanham o caldo de cana, e também devido às condições de processo. Da mesma maneira, Schwan et al., (2001) mostraram a sucessão de leveduras e a dominância do processo fermentativo por células de *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison e *Candida maltosa* Komagata et al. em alambiques artesanais de Minas Gerais. Enquanto vários trabalhos têm sido realizados no estudo dos alambiques de Minas Gerais, apenas recentemente foram realizados estudos na identificação e caracterização de leveduras de alambiques no estado de Pernambuco. Nesse estudo, foi observado que *S. cerevisiae* predominou em todos os processos estudados, seguida das espécies *Candida milleri* Yarrow e *Pichia caribbica* Vaughan-

Mart. Kurtzman, S.A. Mey. & E.B. O'Neill. Entretanto, diferenças na composição de leveduras foram observadas em correlação com o nível tecnológico do processo. No alambique com menor nível tecnológico e sem qualquer controle microbiológico do processo, foram identificadas sete espécies de levedura que incluíam os gêneros *Candida*, *Pichia* e *Zygosaccharomyces* (VILA NOVA, 2008), dos quais quatro táxons não puderam ser identificados: *Candida* sp., *Candida drosophilae*-like, *Candida ubatubensis*-like e *Zygosaccharomyces* sp. sendo este último, denominado como isolado SPC2(7) e escolhido para a realização de um trabalho completo de identificação pelos métodos da taxonomia clássica e molecular (BARNETT; PAYNER; YARROW, 2000; KURTZMAN, 2003)

1.2 HEMIASCOMYCETES

Análises filogenéticas dos genes 18S e domínios D1/D2 26S rDNA mostraram que o Filo Ascomycota é constituído por três grupos maiores: a classe dos, Eufungi, por um grupo basal, os Archiascomycetes e os Hemiascomycetes (DÉAK, 2007) os quais estão bem definidos por sinapomorfias visíveis a nível ultraestrutural (SUH; KURTZMAN ; LACHANCE, 2006).

A classe Hemiascomycetes, possui 9 famílias e 51 gêneros (BARNETT; PAYNER; YARROW, 2000). Cerca de 1200 espécies são conhecidas (KURTZMAN; FELL, 1998; BOEKHOUT, 2005) e podem ser diferenciadas dos demais organismos do Filo Ascomycota por evidenciar reprodução assexuada por brotamento ou fissão e formação de estágio sexual não incluso em um corpo de frutificação neste caso, do Ascocarpo (KURTZMAN; FELL, 2006). Os ascos liberam os ascósporos por deliquescência ou quebra da parede. Além disso, nesta classe os organismos não apresentam em seu ciclo de vida uma fase dicariótica sendo assim, a cariogamia ocorre logo após a plasmogamia. A reprodução assexuada é por brotamento, produção de conídios ou fragmentação micelial. A parede celular é constituída dos polissacarídeos mananas e β -1-3 e β -1-6 glucanas. Essas Leveduras podem ser encontradas em exudatos de plantas, em simbiose com insetos, solo, água marinha, trato digestório de mamíferos ou vivendo como sapróbios (MIMS; BLACKWELL; ALEXOPOULOS, 1996). Algumas espécies são responsáveis por infecções

micóticas em humanos, e menos de dez são patógenos de plantas. Além disso, são responsáveis por importantes processos industriais e biotecnológicos, incluindo panificação, produção de cerveja, síntese de proteínas recombinantes e muitas linhagens como, por exemplo, de *S. cerevisiae* são utilizadas como modelos em pesquisas genéticas (SUH; KURTZMAN; LACHANCE, 2006) sendo o primeiro hemiascomycete seqüenciado, apresentando mais de 30% dos genes duplicados (DE HERTOOGH et al., 2006).

Kurtzman e Robnett (2003) apresentaram uma filogenia baseada em três multilocus nucleares ribossomais (18S, 26S e ITS), três genes que codificam proteínas (EF-1 α , ACT1, e RPB2), e genes mitocondriais (COX2). A combinação de seqüências destes genes permitiu o posicionamento taxonômico de 75 espécies do “*Saccharomyces* complexo”.

Dentre as várias famílias inclusas na classe Hemiascomycetes está a família Saccharomycetaceae. Esta inclui grupo de leveduras que apresentam as seguintes características: podem formar pseudomicélio, reprodução assexuada por brotamento multilateral e produção de ascosporos em ascos livres originado de um zigoto, ou partogeneticamente de uma célula somática (MIMS; BLACKWELL; ALEXOPOULOS, 1996). Segundo Barnett et al., (2000), estão inclusos nesta família os seguintes gêneros: *Arxiozyma* Van der Walt & Yarrow, *Citeromyces* Santa María, *Debaryomyces* löcker, *Dekkera* Van der Walt *Hansenula* Syd. & P. Syd, *Issatchenkia* Kudriavzev, *Kazachstania* Zubcova, *Kluyveromyces*, *Kodamaea* Y. Yamada, Tom. Suzuki, M. Matsuda & Mikata, *Lodderomyces* Van der Walt, *Pachysolen* Boidin & Adzet, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saturnispora* Z.W. Liu & Kurtzman, *Torulaspota* Lindner, *Williopsis* Zender e *Zygosaccharomyces*. Entretanto, análises filogenéticas recentes a partir de multigenes elucidaram o posicionamento de algumas espécies e gêneros o que, apresentou diferenças quando comparado as classificações atuais (KURTZMAN, 2003).

1.2.1 Gênero *Zygosaccharomyces* Barker

O gênero *Zygosaccharomyces* foi introduzido em 1901 por Barker (VAN DER WAT; JOHANNSEN, 1975) constituído de leveduras cujos ascos resultavam de um processo de conjugação de duas células individuais.

As leveduras do gênero *Zygosaccharomyces* caracterizam-se por apresentarem reprodução assexuada por brotação multilateral sobre uma base limitada. Suas células são esféricas, ovóides ou alongadas podendo ou não formar pseudomicélio. Os ascos podem mostrar ou não conjugação entre células independentes ou entre uma célula e ramo. Podem ser deliqüescentes ou persistentes e formar de 1-4 ascosporos esféricos (Figura 1). Fermentam glicose, mas não a galactose. Algumas espécies utilizam cadaverine, L-lisine e etilamina como fontes de nitrogênio. A coenzima Q-6 é produzida e a reação diazonium blue é negativa (KURTZMAN, 2003).

Este gênero é extremamente relacionado com o gênero *Saccharomyces* e por muitos anos suas espécies foram incluídas neste gênero (STEELS et al., 1999). Estudos taxonômicos recentes posicionaram *Zygosaccharomyces* como um gênero distinto de *Saccharomyces* (YARROW, 1984; BARNETT; PAYNER; YARROW, 1990).

Análises de seqüenciamento da subunidade menor do rDNA mostrou a estreita relação das espécies do gênero *Zygosaccharomyces* com espécies dos gêneros *Saccharomyces*, *kluveromyces* e *Torulaspota* (JAMES ; COLLINS; ROBERTS, 1994; CAI; ROBERTS; COLLINS, 1996). Kurtzman e Robnett (2003) após análises filogenéticas a partir de seqüências multigênicas de espécies pertencentes ao “complexo *Saccharomyces*” e de gêneros relacionados tais como: *Kluveromyces* e *Zygosaccharomyces* observaram que não havia correlação de alguns agrupamentos formados nas árvores com o posicionamento atual de algumas espécies classificadas apenas a partir de características fenotípicas. Dentre as espécies que apresentaram agrupamentos diferenciados estão às pertencentes ao gênero *Zygosaccharomyces* que, apresentaram-se distribuídas nas árvores em quatro clados. Um destes foi chamado de *Zygosaccharomyces* “sensu stricto” contendo as espécies: *Zygosaccharomyces rouxii* (Boutroux) Yarrow, *Zygosaccharomyces mellis* Fabian & Quinet, *Zygosaccharomyces bailii* (Lindner) Guilliermond, *Zygosaccharomyces bisporus* Naganishi, *Zygosaccharomyces Kombuchaensis* Kurtzman e

Zygosaccharomyces lentus Steels, C.J. Bond, M.D. Collins, I.N. Roberts, Stratford & S.A. James. Entretanto, *Zygosaccharomyces florentinus* Castelli ex Kudryavtsev, *Zygosaccharomyces mrakii* Shihata & Mrak, *Z. fermentati* e *Zygosaccharomyces cidri* (Legakis) Yarrow não foram agrupadas dentro do complexo.

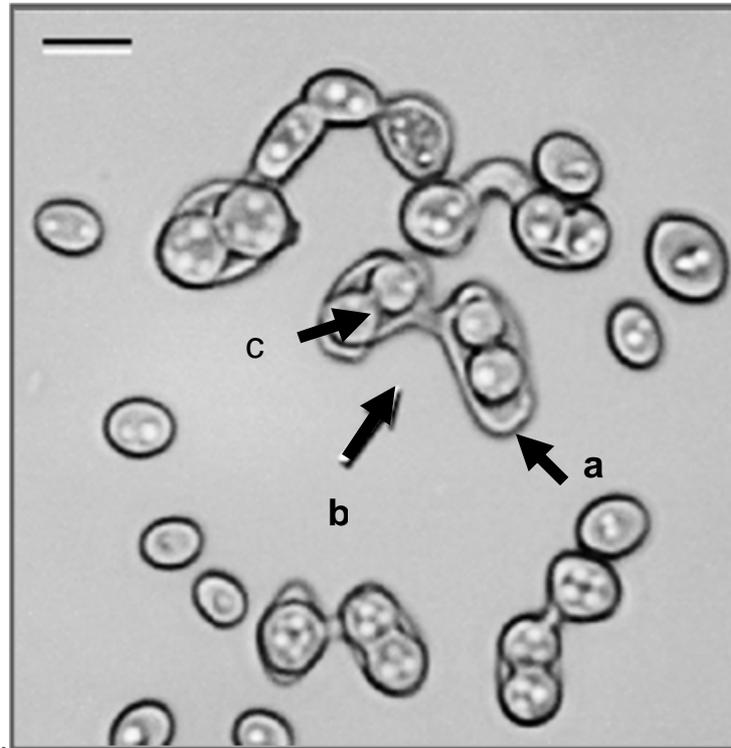


Figura 1. Estruturas reprodutivas em *Zygosaccharomyces bailii*. Ascus (a) com “halteres” (b), contendo cada um dois ascósporos (c).
Fonte: Kurtzman e James, 2006.

Leveduras do gênero *Zygosaccharomyces* são freqüentemente descritas como osmofílicas sugerindo um habitat com altas concentrações de solutos neste caso, de açúcares. São resistentes a conservantes, freqüentemente, usados em alimentos, inclusive em vinhos. Além disso, muitas linhagens apresentam extrema tolerância ao álcool (FUGELSANG, 1996).

Segundo James e Stratford (2003), a maior problemática de deteriorização de alimentos na indústria, tem sido causada por leveduras pertencentes ao gênero *Zygosaccharomyces*. Estas podem ser encontradas em diferentes alimentos (Tabela 1). São consideradas as principais contaminantes de alimentos como sucos de frutas, bebidas carbonatadas, molhos para saladas, ketchups dentre outros. Isto pode ser explicado pela habilidade que essas leveduras possuem em crescerem em ambientes com baixa atividade de água e com conservantes tais como: ácido sórbico, benzóico

e dióxido sulfúrico (ESTEVE-ZARZOSO et al., 2003). Por outro lado, algumas espécies do gênero *Zygosaccharomyces* podem está presentes durante os processos de fermentação espontânea para produção do vinho e assim, contribuir para suas propriedades organolépticas, como é o caso de linhagens de *Z. fermentati* e *Z. bailii* (ROMANO; SUZZI, 2003).

Tabela 1. Espécies dos gêneros *Zygosaccharomyces* e *Lachancea* encontradas em diferentes tipos de alimentos.

ESPÉCIES	ORIGEM
<i>Z. bailii</i>	Méis, maioneses, uvas, vinhos, suco de maçã.
<i>Z. bisporus</i>	Laranjadas.
<i>L. cidri</i>	Cidra.
<i>L. fermentati</i>	Bebidas de morango, laranja.
<i>Z. florentinus</i>	Limonadas, água com gás, laranjadas.
<i>Z. lentus</i>	Vinhos, ketchup, tomate.
<i>Z. mellis</i>	Méis.
<i>Z. rouxii</i>	Cana de açúcar, suco de frutas, chocolates, vinho, molhos de soja, geléias, melaços.
<i>Z. kombuchaensis</i>	Chá Kombucha.

Fonte: Adaptado de James e Stratford, 2003.

Zygosaccharomyces bailii, *Z. bisporus* e *Z. rouxii* são consideradas extremamente osmofílicas (KUTZMAN; JAMES, 2006), sendo esta última, a espécie mais osmotolerante do gênero, capaz de causar estragos em produtos com baixa atividade de água (a_w 0.8-0.85) podendo tolerar meios de cultura com até 22% de NaCl e 80% de glicose ou sacarose (HALOUAT ; DEBEVERE, 1996).

Zygosaccharomyces bailii é a espécie do gênero de maior destaque em eventos de deterioração na indústria alimentícia, devido à extrema habilidade em resistir a conservantes ácidos fracos tais como: ácido acético, benzóico, sórbicos e propiônicos os quais, são freqüentemente usados na conservação de alimentos. *Z. bailii* assim como, *S. cerevisiae*, podem fermentar vigorosamente glicose mesmo sob significativas pressões atmosféricas, mas, ao contrário de *S. cerevisiae*, *Z. bailii* pode continuar esse processo mesmo na presença de altos níveis de conservantes (JAMES; STRATFORD, 2003). A concentração de 600 mg/L dos ácidos sórbico e benzóico não inibe o crescimento desta levedura na presença de 10% (p/v) de glicose

a pH 3,5 (PITT, 1974). Além disso, *Z. bailii* é uma das poucas leveduras capaz de crescer na presença de 1% ácido acético (BARNETT; PAYNER; YARROW, 2000) e na concentração de 2% (v/v) de ácido acético, utilizada para a preservação de molho de tomate, não é suficiente para evitar a deterioração deste alimento por *Z. bailii* (PITT, 1974).

Todas essas características tornam os representantes dos gêneros *Zygosaccharomyces* e *Lachancea* importantes espécies no contexto da indústria alimentícia, incluindo a produção de bebidas fermentadas.

1.2.2 Gênero *Lachancea* Kurtzman

Kurtzman (2003) através de análises filogenéticas de multigenes inferiu mudanças na taxonomia de leveduras do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” e uma dessas foi à inclusão de cinco novos gêneros à família Saccharomycetaceae, estes foram: *Lachancea Kurtzman*, *Nakaseomyces Kurtzman*, *Naumovia Kurtzman*, *Vanderwaltozyma Kurtzman* e *Zygotoruspora Kurtzman*. O gênero *Lachancea* inclui as espécies: *Lachancea cidri* (Legakis) Kurtzman, *Lachancea fermentati* (H. Naganishi), *Lachancea Kluyveri* (Phaff, M.W. Miller & Shifrine) Kurtzman, *Lachancea thermotolerans* (Filippov) Kurtzman e *Lachancea Waltii* (K. Kodama) Kurtzman.

Leveduras de *Lachancea* evidenciam reprodução assexuada por brotação multilateral ou sobre uma base limitada. Possuem células esféricas, ovóides ou alongadas podendo ou não formar pseudomicélio. Os ascos podem mostrar conjugação entre células independentes ou entre uma célula e ramo, podendo ser deliquescentes ou persistentes, formando de 1-4 ascosporos esféricos. Fermentam glicose, mas não galactose. Algumas espécies utilizam cadaverine, L-lisine e etilamina como fontes de nitrogênio. A coenzima Q-6 é produzida e a reação diazonium blue é negativa.

1.3 TAXONOMIA CONVENCIONAL

A taxonomia procura, pelo conhecimento do maior número de caracteres, ordenar as espécies dentro de um sistema de maneira a evidenciar, não só suas afinidades naturais e relações de parentesco, como também a ordem filogenética das mesmas, possibilitando a classificação das espécies. A identificação de fungos por métodos convencionais está baseada em uma série de testes bioquímico-fisiológicos e por várias características morfológicas. Em muitos casos existem dificuldades dos taxonomistas em determinar quais características seriam realmente importantes para definirem espécies ou até mesmo gêneros (GUARRO; GENE; STCHIGEL, 1999).

Dentre os testes bioquímicos e fisiológicos utilizados para a identificação de leveduras estão: a análise da capacidade de assimilação de diferentes fontes de carbono, tais como, glicose, maltose, sacarose, rafinose e galactose e de nitrogênio, tais como nitrato e aminas); fermentação de diferentes carboidratos; hidrólise da uréia; resistência ao antibiótico ciclohexamida (0,1% e 0,01%); tolerância a 1% de ácido acético; crescimento em diferentes temperaturas; reação de Diazonum Blue B color; crescimento em meio com deficiência em vitaminas; verificação de produção de ácidos, dentre outros (YARROW, 1998).

Como aspectos morfológicos da reprodução vegetativa têm-se a filamentação, morfologia e tamanho das células, formação de clamidosporos, blastosporos e endosporos. Os clamidosporos são hifas que se diferenciam tomando uma forma arredondada, pelo espessamento da parede celular e adensamento do citoplasma e, logo após, separa-se da célula mãe, comportando-se como esporo de resistência, germinando em condições favoráveis. Nas leveduras, em espécies como *Candida albicans* (Robin) Berkhout e *Candida dubliniensis* Sullivan et al. os blastosporos são elementos vegetativos de propagação formados pela gemação ou brotação de células somáticas em que há uma evaginação da membrana da célula mãe, originando o broto. Os endosporos são encontrados em gêneros específicos tais como: *Trichosporon Behrend*, *Cryptococcus Kütz*, *Cystofilobasidium Oberw* e *Leucosporidium Fell*, Statzell, I.L. Hunter & Phaff (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; YARROW, 1998).

Para a taxonomia de leveduras do Filo Ascomycota, são importantes características como: a forma como os ascos são formados, os quais podem ser

originados de uma célula vegetativa, da conjugação de duas células, ou de uma célula mãe que já tenha sido conjugada em seu broto. Outras características importantes são o número e forma (paredes lisas ou ásperas) dos ascosporos em cada asco, aspectos estes, que são utilizados para separar gêneros e até mesmo espécies (BARNETT; PAYNE; YARROW, 2000).

A distinção entre espécies de leveduras apenas por métodos convencionais é problemática para alguns gêneros. O gênero *Zygosaccharomyces*, por exemplo, apresenta as espécies *Z. bailii*, *Z. bisporus* e *Z. rouxii* que são de difícil discriminação. A distinção entre as espécies de *Z. rouxii* e *Z. mellis* é confiada apenas nas diferenças de tolerância ao NaCl (JAMES et al., 2005). A dificuldade de identificação de espécies do gênero *Zygosaccharomyces*, pode estar relacionada à característica que espécies deste gênero têm de assimilarem e fermentarem poucas das várias fontes de carbono utilizadas tipicamente nos testes de identificação (KURTZMAN, 1990).

1.4 TAXONOMIA MOLECULAR

Estudos de identificação de espécies de leveduras baseados apenas em técnicas convencionais com descrição morfológica e fisiológica têm, em muitos casos, levado a problemas de sinonímia na nomenclatura e até mesmo de identificação incorreta dos táxons (RATÓN, 2004).

Um dos métodos clássicos de identificação baseados em DNA que marcou a transição entre a identificação fenotípica e a molecular foi o de determinação do conteúdo de G+C genômico. Estas análises mostraram que táxons do Filo Ascomycota possuíam um conteúdo genômico de G+C de aproximadamente 28 a 50% enquanto que, táxons do Filo Basidiomycota de 50 a 70% (KURTZMAN; FELL, 2006). Alguns autores sugerem que uma diferença de 1 a 2% entre linhagens indica que essas pertencem a espécies diferentes (KURTZMAN, 1994).

Dentre os vários métodos amplamente utilizados na taxonomia de leveduras estão: reconstruções filogenéticas a partir de seqüências de genes ribossomais (STEELS et al., 1999; KURTZMAN; ROBNETT, 2003; KURTZMAN, 2003; KURTZMAN et al., 2005) e mitocondriais (QUEROL et al., 2003), cariotipagem

eletroforética (IVANNIKOVA et al., 2007), restrição do locus ITS1-5.8S-ITS2 rDNA (ESTEVE-ZARZOSO et al., 1999; ESTEVE-ZARZOSO et al., 2003; HIERRO et al., 2006; ÁLVAREZ-MARTIN et al., 2007), polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) do mtDNA (QUEROL et al., 1992; GUILLAMÓN et al., 1998; ESTEVE-ZARZOSO et al., 2003) e PCR - eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (MANZANO et al., 2004).

1.4.1 Marcadores moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica que pode amplificar pequenas regiões do genoma de um organismo qualquer a partir do uso de pequenas moléculas iniciadoras de replicação chamadas de iniciadores de replicação. Na última década, tornou-se a técnica genética mais utilizada em diagnóstico microbiológico (GANDRA; MELLO; GODÓI, 2008).

Para a realização da PCR, utiliza-se uma enzima termoestável, a DNA polimerase, que na presença de oligonucleotídeos iniciadores e dos nucleotídeos que compõem a molécula de DNA, amplifica a região de interesse a partir de uma pequena quantidade de DNA. Esta amplificação ocorre durante repetidos ciclos de temperatura, a saber: 94°C para desnaturação do DNA, 45°C a 70°C para hibridização dos oligonucleotídeos às seqüências-alvo e 72°C para a síntese do DNA. O DNA amplificado pode, então, ser separado e visualizado em géis de agarose ou poli-acrilamida e utilizado para diversos fins (WHITE et al., 1990).

Vários tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados atualmente para a taxonomia molecular e o grande desafio é exatamente o estabelecimento de critérios seguros a escolha que possam refletir corretamente a relação biológica entre os diferentes táxons.

1.4.1.1 Região ITS do DNA ribossomal

Uma região genômica muito utilizada na identificação de leveduras são as regiões do DNA que codificam para o RNA ribossômico. Estas regiões apresentam-se como um agrupamento gênico que contém os genes 18S, 5.8S, 26S e de duas regiões espaçadoras internas transcritas (Internal Transcribed Spacer - ITS) e regiões espaçadoras intergênicas (Intergenic Spacer - IGS) (Figura 2). Cada seqüência ITS repetida é subclassificada em ITS1 e ITS2, com a região flanqueada correspondente a subunidade 5.8S, localizada entre o terminal 3' do gene 18S e o terminal 5' do gene 26S. Esta seqüência ITS1-5.8S-ITS2 pode ser amplificada por PCR pelos iniciadores universais ITS4 e ITS5. As regiões IGSs são subclassificadas em IGS1 e IGS2 separadas pelo gene que codifica a subunidade 5S. Esta seqüência pode ser amplificada por PCR pelos iniciadores universais JV51 e JV52 (WHITE et al., 1990). O fato das regiões ITS serem curtas (500-800 pb), flanqueadas por segmentos conservados (18S e 26S), e por aparecerem em grande número de cópias no genoma, permitem que sejam seqüenciadas e amplificadas com facilidade. A região 18S é a mais conservada e por isso, é quase sempre utilizada para comparações de organismos de níveis taxonômicos superiores, por exemplo, gêneros e famílias. A porção D1/D2 26S rDNA é mais variável, sendo apropriada para comparação em nível de gênero e espécie (FUNGARO, 2000).

A análise do polimorfismo de restrição do locus ITS1-5.8S-ITS2 rDNA tem permitido a identificação de várias espécies de leveduras. Guillamón et al. (1998) através da restrição do produto da PCR do locus com as enzimas *HaeIII*, *CfoI* e *HinfI* identificou 33 espécies de leveduras isoladas da fermentação espontânea do vinho. Utilizando esta mesma técnica e grupo de enzimas. Esteve-Zarzoso et al. (1999) identificou 132 espécies de leveduras pertencentes a vinte e cinco gêneros diferentes incluindo formas anamórficas e teleomórficas. A análise de restrição desse locus serve para a identificação preliminar das espécies de ascomicetos e foi utilizada recentemente para identificação de leveduras da fermentação alcoólica (BASÍLIO et al., 2008) e fermentação de cachaça (VILA NOVA, 2008).

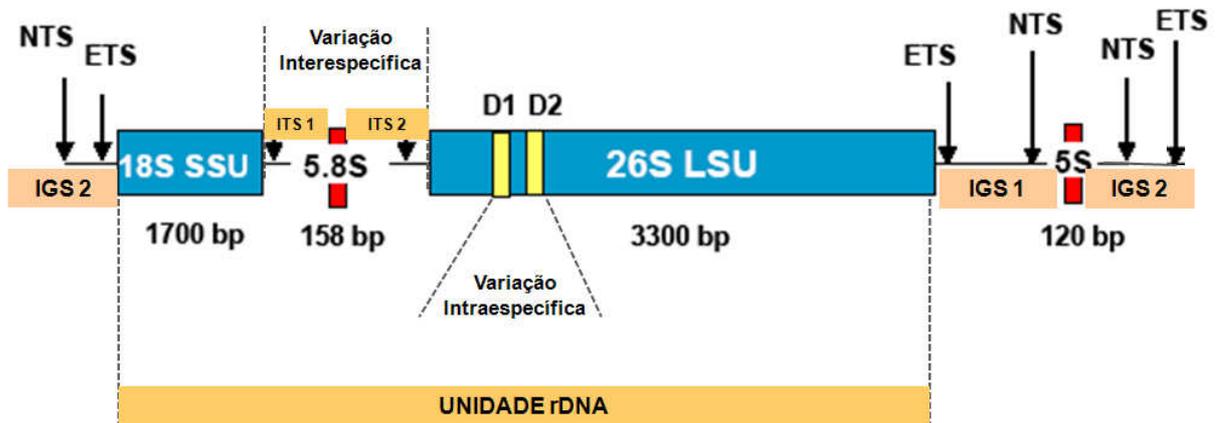


Figura 2. Agrupamento gênico do DNA ribossomal com a representação dos genes 18S (Subunidade Menor) e 26S (Subunidade Maior) da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) e da região IGS (IGS1-5S-IGS2). Além dos genes, estão indicados o espaçador transcrito externo (ETS) e espaçador não transcrito (NTS). Fonte: http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UV/AVAILABLE/TDX-0521107-135145//martorell.pdf

Análises das seqüências de genes ribossomais são freqüentemente utilizadas na identificação de leveduras. Através de análises filogenéticas de seqüências do gene 18S e das regiões ITS1 e ITS2 de espécies de leveduras dos gêneros *Zygosaccharomyces* e *Torulasporea* foi possível a distinção de espécies relacionadas de ambos os gêneros (JAMES; COLLINS; ROBERTS, 1996).

Peterson e Kurtzman (1991) determinaram que o domínio 2 da subunidade maior 26S do rDNA ribossomal, por apresentar alta taxa de variabilidade, seria suficiente para a identificação de espécies. Em continuidade ao trabalho, Kurtzman e Robnett (1998), após análises do seqüenciamento dos domínios D1/D2 (600 pb) de 500 espécies de leveduras do Filo Ascomycota estabeleceu um limite genético para distinção e separação entre espécies considerando diferenças de 1% de nucleotídeos ou mais, nas seqüências destes domínios. Esse critério favoreceu a identificação de várias espécies de leveduras na literatura (KURTZMAN; FELL, 1998). Entretanto, existem algumas exceções para esse critério como é o caso de linhagens de *Clavidospora lusitanaiae* que apresentam altas taxas de polimorfismos nestes domínios (LACHANCE et al., 2003). Reconstruções filogenéticas a partir de seqüências desses domínios são constantemente utilizadas para a identificação de espécies de leveduras do Filo Ascomycota (KURTZMAN, 1994). Inclusive na descrição de espécies novas de leveduras (KURTZMAN; ROBNETT; BASEHOAR-POWERS, 2001; ROSA; LACHANCE, 2005). Kurtzman e Robnett (2003) elucidaram o posicionamento de 75 espécies de leveduras do Filo Ascomycota do complexo

Saccharomyces que inclui os gêneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Tetrapisispora*, *Torulaspota*, e *Zygosaccharomyces*, através de análises filogenéticas a partir de seqüências de multigenes (18S, 26S, ITS, fator de alongação 1 α , actin-1, RNA polimerase e citocromo oxidase II). Foram formados 14 cladogramas suportados por fortes valores de “bootstrap” e, cujo posicionamento de muitos membros não correspondia aos da classificação atual.

1.4.1.2 Região de microssatélites

As regiões de microssatélites ou seqüências simples repetidas (Single Sequence Repeats - SSR) consistem de pequenas seqüências com 1 a 6 pares de base (pb) de comprimento que se repetem em “tandem” no genoma dos eucariotos (TÓTH ; GÁSPAÁRI ; JURKA, 2000). As principais características do uso dessas seqüências como marcadores de genéticos são: a alta freqüência e ampla dispersão no genoma, as altas taxas de mutações a que estão sujeitas, resultando conseqüentemente em grande variabilidade, co-dominância e por apresentar segregação mendeliana (JARNE; LAGODA, 1996). Os iniciadores de microssatélites com motivos de (AT)_n, (CA)_n, (CT)_n, (GT)_n, (TG)_n, (ACA)_n, (ACC)_n, (ACG)_n, (ACT)_n, (AGC)_n, (AGG)_n, (AGT)_n, (ATC)_n, (GAC)_n, (GTG)_n, (GACA)_n, (GATA)_n e (TGTC)_n são usualmente utilizados para amplificação de inter-regiões repetidas. Esta ferramenta produz padrão de amplificação que revela o possível polimorfismo de DNA na seqüência de nucleotídeos entre os dois sítios de microssatélites no genoma de fungos, gerando o que é denominado de perfil ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) (GUPTA et al., 1994).

Baleiras-Couto et al. (1996) investigaram 126 linhagens de leveduras presentes na cadeia de produção de maionese e temperos de saladas por um período de 14 meses. Apenas as espécies *Z. bailii* e *Z. bisporus* foram detectadas no produto final e a discriminação entre elas só foi possível através da técnica da PCR “fingerprinting”. Martorell et al. (2005) ao isolar leveduras durante o processo de fabricação de frutas cristalizadas e de doces do tipo “nougats” obtiveram com o iniciador (GTG)₅ quatro perfis diferentes para as 13 linhagens de *Z. bailii* como também para as 21 linhagens de *Z. rouxii*. Outros trabalhos na diferenciação de

linhagens dessas espécies com os iniciadores (GTG)₅ e (GAC)₅ geraram ampliações com padrões de 5 a 7 fragmentos, com tamanhos variando entre 0,25 e 1,7 Kb. O iniciador (GTG)₅, mostrou 4 padrões diferentes nas 13 linhagens de *Z. bailii* em torno de 30% variabilidade e 4 padrões distintos nas 21 cepas de *Z. rouxii* com cerca de 19% variabilidade entre elas. O iniciador (GAC)₅, foi o que apresentou menor variabilidade, com apenas 3 padrões diferentes na *Z. bailii* e 1 padrão em *Z. rouxii* (GUEROLA, 2006).

O método de PCR “fingerprinting” com o iniciador (GTG)₅ também demonstrou sua eficiência na caracterização da dinâmica de população de leveduras de destilarias de álcool combustível do nordeste do Brasil (SILVA-FILHO et al., 2005). E em trabalhos posteriores na diferenciação de 29 padrões distintos para leveduras contaminantes do processo (BASÍLIO et al., 2008). Vila Nova (2008) utilizaram os iniciadores (GTG)₅, (GACA)₄ e M13 para caracterização de espécies de *Saccharomyces cerevisiae* do mosto fermentado de alambiques artesanais e obtiveram também um melhor perfil de diferenciação com o iniciador (GTG)₅.

Outros grupos de fungos além das leveduras podem ser distinguidos a partir dos métodos baseados em “fingerprinting”. A utilização dos iniciadores (CT)₈, (CA)₈, (TGTC)₄, permitiu a diferenciação de fungos micorrízicos mostrando serem ferramentas confiáveis e tecnicamente simples para avaliar a variabilidade genética nesses fungos (LONGATO ; BONFANTE,1997).

1.4.1.3 Análise do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição do mtDNA

O DNA mitocondrial é umas das moléculas mais usadas em estudos de sistemática, caracterização de espécies, estudos de população e análises filogenéticas. Uma das características do mtDNA é uma mistura de regiões conservadas com outras que apresentam uma alta taxa de substituição (FRANCISCO; SILVESTRE; ARIAS, 2001).

Querol et al. (1992) desenvolveram a técnica de restrição do mtDNA em estudos com espécies de *Saccharomyces* que se baseia nas diferenças existentes entre o conteúdo de C+G do DNA nuclear (40%) e do DNA mitocondrial (20%). Isto

permite que a digestão do DNA total com enzimas de restrição ricas em C+G tais como, *SacII* e *SstII* produza vários fragmentos de tamanhos muito pequenos de DNA nuclear restando apenas, os fragmentos de mtDNA apresentando assim, o perfil da espécie. Guillamón et al. (1994) caracterizaram várias cepas de quatro espécies do gênero *Saccharomyces* (*S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, e *S. pastorianus*) a partir dos padrões obtidos pelas endonucleases *AluI*, *DdeI*, *HinfI* e *RsaI*. Este método também foi aplicado na discriminação de espécies do gênero *Zygosaccharomyces* (GUILLAMÓN; SÁNCHEZ; HUERTA, 1997). A análise de restrição do mtDNA de linhagens tipo de *Z. bailii* e *Z. rouxii* com as enzimas *DdeI*, *EcoRV*, *HinfI*, e *RsaI* TaqI mostrou alta variabilidade destas espécies principalmente de *Z. rouxii*. Foram identificados, nove padrões diferentes nas 13 cepas de *Z. bailii* com cerca de 69% de variabilidade e 9 padrões nas 21 cepas de *Z. rouxii* analisados em torno de 43% (GUEROLA, 2006).

1.5 MÉTODOS DE RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA

Desde os tempos remotos na história da humanidade, já existia uma preocupação de descrever e classificar a diversidade biológica. Contudo, somente na segunda do século XX foi proposto um sistema de classificação biológica, baseado na premissa de que os organismos constituem sistemas contínuos e modificados. Willi Hennig, um entomólogo alemão, fundava uma nova corrente de classificação dos seres vivos, a Cladística ou Sistemática Filogenética (HENNIG, 1950). A sistemática estuda a diversidade dos organismos e compreende a descoberta, descrição e interpretação da diversidade biológica bem como a síntese da informação sobre a diversidade. A Sistemática Filogenética é utilizada para identificar características de genes ou fragmentos de DNA similares entre os organismos e assim definir, uma relação evolucionária ou histórica, podendo ser construída a partir de técnicas moleculares que apresentam grandes vantagens por serem mais sensíveis às diferenças genéticas entre os organismos do que os métodos clássicos de caracterização morfológica (BUSO, 2005).

As reconstruções filogenéticas consistem em estimar as relações de ancestralidade para um determinado grupo de táxons. Por sua vez, os táxons podem ser espécies, gêneros, famílias, populações ou qualquer nível taxonômico cuja

história evolutiva se quer determinar. Comumente são chamados de unidades taxonômicas operacionais ou simplesmente OTUs, do inglês "operational taxonomic unit". Árvores filogenéticas são representações gráficas destas relações taxonômicas, e contêm ramos, nós internos e terminais. Os nós terminais representam as OTUs estudadas, as quais são unidas por ramos cujo nó interno representa o ancestral destes táxons. Em outras palavras, podemos definir uma árvore como a topologia entre as OTUs e comprimento dos seus ramos, que por sua vez são uma representação quantitativa do número de mudanças evolutivas ocorridas ao longo daquela linhagem (PEREIRA, 2000).

A representação da árvore filogenética pode ocorrer de forma enraizada ou não (AVISE, 2004). Aquelas que não apresentam raiz indicam apenas a topologia entre as diversas OTUs (MYIAKI, 2001), refletindo meramente as distâncias entre as unidades, sem que seja expressa a noção de ancestralidade (WEIR, 1996). Contudo, árvores enraizadas nos dão a noção de ordenamento temporal entre as unidades taxonômicas e informação acerca do ancestral comum do grupo (LOPES, 2006).

As árvores filogenéticas podem ser feitas por dois tipos de métodos: os cladísticos e os fenéticos. Para ambos, existem dois algoritmos que auxiliam na busca da melhor árvore, são eles: busca exaustiva, que verifica todas as topologias de árvores, e a busca heurística em que apenas um subconjunto de árvores probabilisticamente mais prováveis é examinado (FERNANDES - MATILOLI, 2001).

Os métodos cladísticos têm como essência agrupar os organismos de acordo com sinapormofias, ou seja, caracteres derivados compartilhados que são herdados e reconhecem grupos monofiléticos ou naturais. Árvores são calculadas para cada caráter e assim, indicam aquela que requer um menor número de mudanças evolutivas para explicar um determinado conjunto de dados (Parcimônia) ou a mais provável estatisticamente (Máxima Verossimilhança). (SPATAFORA; BLACKWEL, 1994; BUSO, 2005). Já os métodos fenéticos, utilizam medidas de distância que consolidam estatisticamente as diferenças entre os caracteres em uma só variável gerando assim uma matriz (BUSO, 2005). Existem diversos modelos, desde extremamente simples até muito complexos para estimar a distância entre duas seqüências. Entre os modelos de substituição nucleotídica mais simples estão: distância p e a distância de Kimura 2-parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980). A distância "p" é meramente a proporção de posições em que duas seqüências diferem. Já a distância k2P leva em considerações dois parâmetros a mais: 1) a possibilidade de

ocorrerem substituições múltiplas e 2) a razão entre as transições e transversões. Outros modelos de substituição de nucleotídios são: Jukes e Cantor, Modelo de dois parâmetros (K80), Modelo proporcional (F81), Modelo HKY85 e F84, Modelo de TN93, Modelo Geral de Reversão ao Longo do Tempo (PEREIRA, 2000).

Após a obtenção das distâncias entre as seqüências comparadas, utiliza-se um algoritmo para a construção da árvore filogenética. Existem diferentes algoritmos que podem ser utilizados para a construção de uma matriz de distância (NEI; KUMAR 2000; MATIOLI, 2001) sendo os algoritmos mais utilizados Neighbor-Joining (NJ) e o UPGMA (FERNANDES- MATIOLI, 2001).

O método de Neighbor-Joining faz parte do grupo de métodos de evolução mínima, o qual busca uma árvore com a menor soma dos ramos. Esse processo consiste inicialmente na construção de uma árvore em estrela e a partir disto uma matriz de distância é calculada. O par de táxons que apresentar a menor soma dos comprimentos dos ramos é escolhido para representar um nó interno da árvore e a distância deles a este nó interno é calculada. A seguir outra matriz é calculada considerando este par de táxons como uma única OTU. Novamente o par que minimizar a soma dos ramos é escolhido e será considerado uma única OTU no passo seguinte. Este procedimento se repete até que a árvore em estrela tenha sido resolvida de maneira a minimizar a soma dos comprimentos dos ramos (PEREIRA, 2000).

O UPGMA é similar ao Neighbor-Joining, porém impõe que as distâncias sejam ultramétricas, e, portanto os táxons evoluem a um taxa semelhante, e não recalcula as distâncias a cada vez que um táxon é adicionado à árvore. Emprega um algoritmo seqüencial de agrupamento no qual as relações são identificadas em ordem de similaridades (BUSO, 2005; PEREIRA, 2000).

Dentre os métodos cladísticos, está o da Máxima Parcimônia. Este é relativamente simples em sua concepção, e em seu princípio envolve a identificação de uma topologia que requer o menor número de mudanças evolutivas como as substituições de nucleotídeos para explicar as diferenças observadas entre os táxons estudados. Esse método utiliza apenas os sítios variáveis informativos em suas análises, pois os sítios invariáveis não acrescentam nenhuma mudança na árvore e os sítios variáveis não informativos acrescentam o mesmo número de mudanças em todas as possíveis árvores (GRAUR; LI, 2000; NEI; KUMAR, 2000; MYIAKI; RUSSO; PEREIRA, 2001). A vantagem desse método em relação aos outros, é o seu conceito

simples e, em geral, computacionalmente é mais rápido que os demais. No entanto, é necessário ter cuidado com homoplasias, substituições múltiplas e desvio de composição de bases, que não são corrigidos por esse método (MYIAKI; RUSSO; PEREIRA, 2001). Dentre os vários algoritmos para as reconstruções filogenéticas pela parcimônia os mais utilizados são: a busca exaustiva se o número de táxons for pequeno, até 10 ou a busca heurística se houver um grande número de táxons. A busca exaustiva analisa todas as possíveis árvores bifurcadas para um grupo de táxons. A busca heurística une inicialmente todos os táxons em um único nó interno, formando uma árvore totalmente politômica e em seguida avalia todas as possíveis árvores (GRAUR; LI 2000; NEI; KUMAR, 2000).

Outro método cladístico é o da Máxima Verossimilhança que é um método de inferência filogenética que requer o uso de um modelo evolutivo e, portanto, pode levar em consideração parâmetros como taxas de substituição de nucleotídeos em uma seqüência de DNA e freqüência de bases, entre outros. Os parâmetros podem ser estimados diretamente dos dados e usados no cálculo da probabilidade de um estado de caráter ser substituído por outro, de acordo com o modelo evolutivo escolhido. O objetivo desse método é encontrar a árvore, entre todas as possíveis, com o maior valor de probabilidade, chamada de mais verossímil. A probabilidade de uma árvore filogenética nada mais é que, a probabilidade de observar as seqüências de nucleotídeos dados uma determinada árvore e um modelo específico de substituições de DNA (GRAUR; LI, 2000). A seleção do melhor modelo evolutivo para um grupo de dados pode ser realizada pelo programa MODELTEST 3.6 (POSADA; CRANDALL, 1998). Esse programa compara hierarquicamente a verossimilhança de 56 modelos evolutivos, desde o mais simples, que considera apenas um parâmetro, como o modelo de Jukes e Cantor (1969), até modelos mais complexos, e realiza um teste de razão de verossimilhança entre os mesmos, penalizando os que possuem parâmetros desnecessários. O método de Máxima Verossimilhança, ao contrário do método de máxima parcimônia, utiliza todos os sítios em suas análises. Além disso, simulações mostram que é menos suscetível a erros nas construções se o modelo evolutivo escolhido for adequado. Sua desvantagem é ser um método bastante demorado computacionalmente, embora computadores mais avançados possam minimizar esse problema (PEREIRA, 2000)

O teste de confiabilidade de topologias tanto em árvores de distância quanto de Máxima parcimônia é o “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985). É uma técnica

computacional que testa a confiabilidade das árvores filogenéticas inferidas e consiste em uma simples reamostragem com reposição pseudoaleatória dos dados. A cada reamostragem, uma árvore réplica é construída e no final a quantidade de vezes em que cada agrupamento ocorreu pode ser expressa em porcentagem (MATIOLI, 2001). De acordo com Graur e Li (2000) e Russo et al. (2001), os valores de “bootstrap” são interpretados como sendo os níveis de confiança para cada clado, ou seja, eles revelam a consistência interna de dados, se a topologia modifica muito conforme a reamostragem de dados. Portanto, quanto menores forem os valores de “bootstrap”, menor será a confiabilidade de uma árvore filogenética.

1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em trabalho recente realizado por Vila Nova (2008) na identificação e caracterização de leveduras presentes em mosto de fermentação de alambiques no estado de Pernambuco, foi observada a predominância da espécie *S. cerevisiae* em todos os processos estudados, seguida das espécies *Candida milleri* e *Pichia caribbica*. Entretanto, diferenças na composição de leveduras foram observadas em co-relação com o nível tecnológico do processo. No alambique com menor nível tecnológico, e sem qualquer controle microbiológico do processo, foram identificadas sete espécies de leveduras que incluíam os gêneros *Candida*, *Pichia* e *Zygosaccharomyces*, dos quais quatro táxons não puderam ser identificados: *Candida* sp., *C. drosophilae*-like, *C. ubatubensis*-like e *Zygosaccharomyces* sp., este último representado pelo isolado SPC2(7). Uma avaliação preliminar através da análise filogenética a partir da seqüência de nucleotídeos da região variável D1/D2 do gene ribossomal 26S mostrou que esse isolado apresentou 100% de identidade com uma seqüência de nucleotídeos depositada no National Center for Biotechnology Information (NCBI) como pertencente a uma levedura isolada no Japão durante a produção de sakê pela fermentação do arroz e identificada parcialmente como *Zygosaccharomyces* sp. (Figura 3). A posição filogenética deste isolado SPC2(7) foi indefinida, ao contrário de outros isolados do processo que puderam ser identificados como *Z. fermentati* (*Lachancea fermentati*) (Figura 3). Além disso, a análise de agrupamento posicionou o isolado SPC2(7) dentro do clado formado pelas espécies

L. fermentati e *L. cidri*, mas em ramo independente. A partir daqueles resultados foram formuladas três hipóteses: i) esse isolado representa um híbrido interespecífico dentro do clado ii) representa uma nova espécie do gênero ou iii) esta variação está dentro do nível de variação esperado para outras espécies.

A partir dessas observações, o presente trabalho teve como objetivo a identificação de um isolado de levedura preliminarmente identificado como *Zygosaccharomyces* sp. coletado de um alambique localizado no município de Paudalho-PE, a partir do uso dos métodos de taxonomia convencional baseado em caracteres morfológicos e fisiológicos e em taxonomia molecular usando métodos de fenética e cladística.

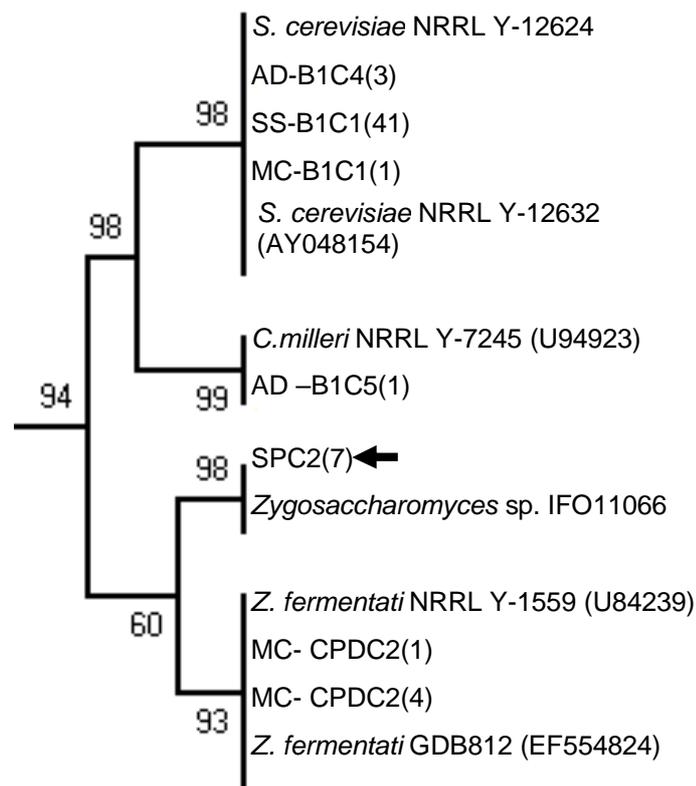


Figura 3. Análise filogenética inferida de leveduras isoladas de mosto de fermentação para produção de cachaça artesanal inferida a partir da seqüência de nucleotídeos da região variável D1/D2 do gene 26S usando o método de agrupamento do tipo Neighbor-Joining, com 1000 pseudo-réplicas. A seta indica a posição do isolado SPC2(7) identificado no presente trabalho. Fonte: Vila Nova (2008). (Tese de doutorado em Ciências Biológicas, UFPE).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LEVEDURAS

Foram utilizadas neste trabalho o isolado *Zygosaccharomyces* sp: SPC2(7) coletado do mosto de fermentação alcoólica para produção de cachaça no alambique “Mirante da Cachaça”, localizado no município de Paudalho, na zona da mata norte do estado de Pernambuco. Os isolados de *L. fermentati* GBD 812 e *Zygosaccharomyces* sp. JPC2(8), JPC2(9), MC4(9), MC4(10), GC3(6) e GC3(7) foram coletados de destilarias de álcool combustível nos estados de Pernambuco, Paraíba e provenientes da coleção de cultura da empresa Genetech Ltda. As linhagens de *Z. bailii* UFMG-L10 fornecida pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais e *L. cidri* CBS 4575 da coleção do CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) da Holanda. As leveduras foram mantidas em meio sólido YM (Extrato de Malte).

2.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MACROSCÓPICAS

Foram observadas características das colônias do isolado SPC2(7) como cor, brilho, forma, margem e superfície (BARNETT; PAYNE; YARROW, 2000, YARROW, 1998). Para a descrição do aspecto das colônias, as células foram previamente inoculadas em meio de cultura YM Ágar por 48h e posteriormente, suspensas em água destilada esterelizada. Foi realizada a contagem das células em câmara de Neübauer e em seguida, diluições seriadas até 10^3 células/mL. Em seguida, 100 μ L dessa suspensão foram semeados em meio YM ágar e incubado por 3 dias, a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$).

2.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS

Para observação do tamanho das células, tipo de reprodução (assexuada e sexuada) e tipo de brotamento as células foram cultivadas em YM ágar e incubadas por um período de 3 dias a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). As células também foram cultivadas em Meio de cultura CMA (Corn Meal Ágar / Farinha de Milho Ágar) pH 6.5 por um período de 14 dias, para observação da presença ou ausência de pseudomicélio

2.3.1 Formação de ascósporos

A observação da produção de ascósporos do isolado SPC2(7) foi realizada em meio Carbono levedura base (YCB) acrescido de 0,01% de sulfato de amônio (ROSA; LACHANCE, 2005). A cepa foi metabolicamente ativada em meio YM ágar por um período de 48h. Em seguida, foram preparadas suspensões de células em 2mL de água destilada autoclavada e desta suspensão foram semeados em pontos eqüidistantes na superfície do referido meio YCB contido em placas e incubados temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) por 7-15 dias. Posteriormente, foram preparadas lâminas e observada quanto à forma e número dos ascósporos por asco em microscopia de luz.

2.4 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

As análises fisiológicas foram realizadas segundo procedimentos padrões (YARROW, 1998). Este inclui uma série de testes como de assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio, fermentação de carboidratos, habilidade de crescimento em meios com altas pressões osmóticas (10% NaCl e 50% de glicose), análise de resistência a ciclohexamida, verificação de produção e tolerância a ácidos (1% ácido acético) e crescimento em diferentes temperaturas.

2.4.1 Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio

A capacidade de assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio pela levedura foi testada utilizando-se as seguintes fontes de nitrogênio: nitrato, nitrito e lisina e as fontes de carbono: glicose, galactose, L-sorbose, maltose, sacarose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melizitose, inulina, amido solúvel, D-xylose, L- arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-ramnose, etanol, glicerol, eritritol, ribitol, galactitol, D-manitol, D-glucitol, salicina, DL-lactato, succinato, citrato de sódio, M. inositol, metanol, hexadecano, glucosamina, xylitol, acetona, isopropanol, gluconato e N- acetilglucosamina. As análises foram feitas em meio sólido utilizando o método de réplica em placas. A cepa foi metabolicamente ativada em meio YM ágar por um período de 48h e inoculada em tubos contendo 2mL de água destilada esterelizada dessa suspensão (10^3 células/ mL) cerca de 5 gotas foram transferidas para cada um dos 21 poços do replicador (Figura 4), instrumento que permite o teste de vinte e uma leveduras num único experimento. O meio sólido utilizado para assimilação das fontes de carbono foi o Nitrogênio levedura base (YNB) acrescido de 10mL de uma solução dos respectivos açúcares (0,05%) por placa. Enquanto que, para as fontes de nitrogênio foi utilizado o meio YCB acrescido das respectivas fontes de nitrogênio nas seguintes concentrações 0,026% de nitrito, 0,078% de nitrato de potássio e 0,076% de lisina. Foram feitas placas de YNB e YCB como controle negativo e uma placa de YNB com glicose para controle positivo.

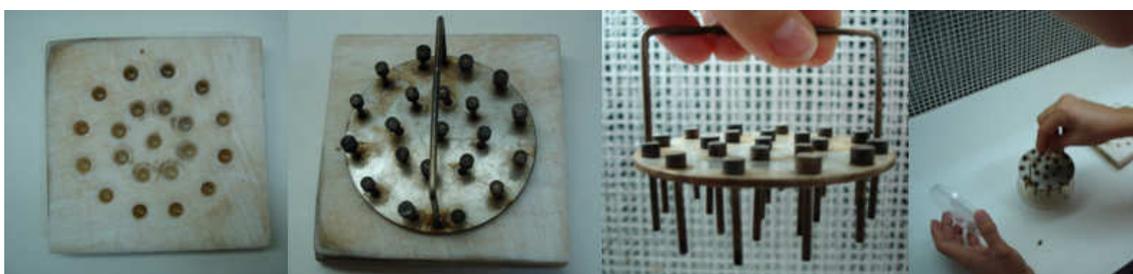


Figura 4. Replicador que permite determinar a capacidade de assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio de vinte e uma leveduras num único experimento. Fonte: o autor (2009).

2.4.2. Teste de capacidade fermentativa

Para testar a capacidade da levedura em fermentar açúcares, foram preparadas suspensões de células (10^3 células/mL) em 2mL de água destilada esterelizada e transferidas para tubos de ensaio contendo 2mL de meio mínimo de fermentação (solução de açúcares a 2%, exceto rafinose que foi utilizado 4%) contendo um tubo de Durham invertido. Após a inoculação, foi realizada a leitura regularmente com 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21 e 28 dias e a produção de gás foi observada pelo seu acúmulo nos tubos de Durham.

2.4.3 Crescimento em meios com 50% glicose e 10% de NaCl

As capacidade de crescimento em meios com altas pressões osmóticas neste caso, de açúcares e sais foi testada em meios YEPD (Extrato de levedura, Peptona e Dextrose) acrescido de 10% de NaCl e o outro com 50% de glicose.

2.4.4 Produção de ácido e tolerância a 1% de ácido acético

A habilidade da levedura em produzir ácido foi verificada pelo meio de cultura com carbonato de Cálcio. A presença de um halo transparente ao redor da colônia evidencia a produção de ácido. Enquanto que a tolerância a 1% de ácido acético foi verificada pela ausência ou presença de crescimento da levedura em placa.

As placas dos respectivos meios de culturas citados anteriormente, foram carimbadas obedecendo à seguinte ordem: YNB, placas com todos os açúcares exceto (glicose), glicose, YCB, Nitrato, Nitrito, Lisina, YNB sem aminoácido, ácido acético, 10% de NaCl, 50% glicose, meio com carbonato de Cálcio e meio com 0,01% de ciclohexamida. Em seguida, as placas foram colocadas semi-abertas em fluxo laminar para secagem e posteriormente mantidas por 14 dias a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). As leituras foram realizadas no 7º e 14º dia conforme o crescimento das leveduras em placa.

2.4.5 Resistência a ciclohexamida

A sensibilidade da levedura ao antibiótico Ciclohexamida foi testada em meio YNB ágar com uma concentração final de 0,01% da droga.

2.4.6 Crescimento em diferentes temperaturas

O crescimento da levedura nas temperaturas de 37°C e 40°C foi observado em tubos de ensaio contendo 2mL de cada dos meios líquidos Caldo Sabouraud e YM. Nestes, foram inoculados cerca de 5 gotas da suspensão de crescimento celular e incubados em banho-maria por um período de 48h nas diferentes temperaturas de teste.

2.5 PROCEDIMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

2.5.1 Extração de DNA nuclear

As células do isolado SPC2(7) e das linhagens de *Z. bailii* UFMG-L10 e *L. cidri* CBS 4575 foram inoculadas em tubos falcon de 50mL contendo 10mL do meio YPED caldo (1% extrato de levedura, 2% peptona bacteriológica e 2% glicose) e incubados a 30°C por 48 horas a 140rpm. Amostras de 1,0mL de cada cultura foram transferidas para microtubos de 1,5mL e centrifugadas por três minutos a 15.400g. O sobrenadante foi descartado e 600µL de tampão de extração (Tris-HCl 200mM pH 8.0; NaCl 250mM; EDTA 25Mm; Dodecil Sulfato de Sódio 10%) foram adicionados, seguido de incubação a 65°C por 30 minutos com agitação por inversão a cada dez minutos. Em seguida, foi adicionado 600µL de uma solução de fenol/clorofórmio (24:1) seguido de agitação no vórtex, e centrifugação a 15.400g a 24°C por 10 minutos. Após a centrifugação, foram transferidos 500µL do sobrenadante para

microtubos novos de 1,5mL e a estes foram adicionados 500µL de uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (1:1). As amostras foram centrifugadas mais uma vez por igual período e rotação, e em seguida, retirado 400µL do sobrenadante e transferidos para microtubos novos de 1,5mL. A estes tubos foram adicionados 800µL de etanol absoluto gelado e deixados a -20°C para precipitação do DNA. Após a precipitação, o DNA foi coletado por centrifugação a 15.400g por 10 minutos a 24°, lavado em 300µL de etanol a 70% e em seguida secado em estufa a 37°C por 30 minutos. Este precipitado foi ressuscendido em 100µL de água milli-Q estéril e mantido -20°C. 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, foi utilizada a relação 1 DO = 50µg/mL (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989).

2.5.2 Amplificação do DNA nuclear

O DNA do isolado SPC2(7) e das linhagens de *Z. bailii* UFMG-L10 e *L. cidri* CBS 4575 foram amplificadas por PCR utilizando-se um termociclador HAIBAIID PXE e iniciadores descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de DNA das linhagens.

Iniciador	Seqüência (5' → 3')	Marcador Molecular	Referência
(GTG) ₅	GTGGTGGTGGTGGTG	ISSR	Lieckfeldt et al. (1993)
(GACA) ₄	GACAGACAGACAGACA	ISSR	Meyer e Mitchel (1995)
M13	GTAAAACGACGGCCAGT	ISSR	Lieckfeldt et al. (1993)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS1-5.8S-ITS2 rDNA	White et al. (1990)
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAA	ITS1-5.8S-ITS2 rDNA	White et al. (1990)
NL-1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	D1/D2 26S rDNA	O'Donnel (1993)
NL-4	GGT3.3.2 CCGTGTTTCAAGACGG	D1/D2 26S rDNA	O'Donnel (1993)

Fonte: o autor (2009).

2.5.2.1 Amplificação de DNA da região ITS do rDNA

Para a amplificação do DNA das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foram utilizados os iniciadores ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3') e ITS5 (5' - GCA AGT AAA AGT CGT AAC AA - 3'), como descrito por White et al. (1990) e um volume final de reação de 25 µL. A amplificação foi programada para realizar uma desnaturação inicial de 6 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos para desnaturação a 94°C por 20 segundos, pareamento a 55°C por 20 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos e finalmente, 5 minutos a 72° C para extensão final. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1.3% a 7,5 volts/cm por 90 minutos em tampão TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA) utilizando-se o marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen Life Technologies), corados em brometo de etídio (TBE 1X/EtBr 0,5 µg/mL), visualizados em transiluminador de luz U.V e fotografados em sistema de fotodocumentação Vilber-Loumart (França).

A digestão enzimática do locus ITS1-5.8S-ITS2 foi realizada pela mistura de 4µL da solução dos produtos de amplificação com 16µL do mix de restrição, contendo 0,2U das enzimas de restrições: *EcoRI*, *Hinfl* e *Ddel* (New England). Após incubação por 2 horas a 37°C, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1,3% a 10,0 volts/cm por 60 minutos em tampão TBE 0,5X utilizando-se o marcador de peso molecular de 100 bp (Promega). Os fragmentos de restrição foram corados em brometo de etídio, visualizados em transiluminador de luz UV e fotografados em sistema de fotodocumentação Vilber-Loumart (França). (VILA NOVA, 2008).

2.5.2.2 Amplificação com os iniciadores (GTG)₅, (GACA)₄ e M13

Para a amplificação do DNA da região ISSR com os iniciadores (GTG)₅, (GACA)₄ e M13, o volume final de reação foi de 25 µL. A amplificação para (GTG)₅ foi programada para um ciclo de desnaturação de 5 minutos a 94°C seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos e finalmente, 6 minutos a 72°C para extensão final.

Para o iniciador (GACA)₄ foi utilizado a mesma programação alterando a temperatura de anelamento para 45°C e para o iniciador M13 para 50°C.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,3% a 7,5 volts/cm por 2 horas e 30 minutos em tampão TBE 0,5X, utilizando o marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen Life Technologies). Os fragmentos foram corados em brometo de etídio, visualizados em transiluminador de luz UV e fotografados em sistema de fotodocumentação Vilber-Loumart (França). (VILA NOVA, 2008)

2.5.2.3 Análises estatísticas

Os dados obtidos das amplificações de ISSR com o iniciador (GTG)₅, (GACA)₄ e M13 foram analisados pelo programa Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs – NTSYS-PC 2.1 (BUSSAB; MIAZAKI; ANDRADE, 1990; ROHLF, 2002). Os dados foram introduzidos na forma de variáveis binárias, nas quais o número 1 (um) significa a presença do fragmento e o número 0 (zero) a ausência do mesmo. A partir dos fragmentos no gel, o programa gera uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente similaridade Simple Matching (SM) calculado de acordo com a fórmula:

$$SM = \frac{(a + d)}{(a+b+c+d)}$$

Onde:

a = número coincidências positivas

b e c = número de não-coincidências

d = número coincidências negativas

A partir da matriz de similaridade foi gerado um dendrograma pelo método da média aritmética não ponderada para agrupamento aos pares método de agrupamento (UPGMA) (ADAMS et al., 2002).

2.5.3 Seqüenciamento

Para a amplificação de DNA dos domínios divergentes D1/D2 26S do rDNA foram preparados um volume final de reação de 25µL. A amplificação foi programada

para um ciclo de desnaturação inicial a 94°C durante cinco minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, com um ciclo de extensão final a 72°C durante cinco minutos.

A eletroforese dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose a 1,3% em tampão TBE 0,5X, durante 40 minutos. O produto da amplificação foi purificado com o Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System (Promega). Os produtos purificados foram separados por eletroforese juntamente com o marcador λ DNA/*Hind*III, em gel de agarose a 1,3% com TBE 0,5X por 30 minutos, corados em brometo de etídio (TBE 1X/EtBr 0,5 μ g/mL), visualizados em transiluminador de luz U.V e fotografados em sistema de fotodocumentação Vilber-Loumart (França).

Os domínios D1/D2 da região 26S de rDNA e da região ITS1-5.8S-ITS2 de rDNA das leveduras foram seqüenciados no Laboratório do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Universidade Federal de Pernambuco, utilizando o BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). (VILA NOVA, 2008)

2.5.4 Análise das seqüências de DNA e reconstrução de árvores filogenéticas

Para a identificação de cada isolado seqüenciado foram realizadas análises de alinhamento local utilizando a ferramenta BLASTn, nucleotídeo a nucleotídeo, no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). As seqüências dos domínios D1/D2 do gene 26S rDNA e da região ITS rDNA destas leveduras foram comparadas com as seqüências destes genes em outros fungos disponíveis no banco de dados Genbank (Tabela 3). As seqüências foram alinhadas pelo ClustalW no programa Bioedit versão 7.05 e as regiões homólogas foram utilizadas na construção de árvores filogenéticas moleculares. Foi analisada a porcentagem de sinal filogenético pelo programa Tree-puzzle versão 5.2.

As árvores moleculares foram construídas pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987) utilizando como modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980) e pelo método da Máxima Verossimilhança (YANG; NIELSEN, 2000). O programa de filogenia utilizado foi o PAUP 4.0

(SWOFFORD, 2002) que utilizou o modelo evolutivo adequado após resultado das análises do programa Modelteste 3.7 (POSADA; CRANDALL, 1998). O teste de confiabilidade das topologias filogenéticas foi realizado pela análise de “bootstrap” a partir de 1000 pseudo-réplicas (FELSENSTEIN, 1985). Para avaliar a incongruência entre as partições (D1/D2 26S e ITS1-5.8S-ITS2) foi feito o teste de partição de homogeneidade (FARRIS et al. 1994) implementado no programa PAUP 4.0 (SWOFFORD, 2002).

Tabela 3. Linhagens dos gêneros *Zygosaccharomyces*, *Lachancea*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* e *Zygototulaspora* do banco de dados Genômico National Center for Biotechnology Information (NCBI) e os respectivos códigos de acesso para as seqüências dos genes.

Espécies	Linhagem	Nº de acesso Gene 26s rDNA	Nº de acesso ITS1-5.8S-ITS2
<i>Zygosaccharomyces</i> sp.	IFO 11066	(AB 087398)	—
<i>Lachancea fermentati</i>	NRRL Y-1559	(U84239)	(AY046206)
<i>L. cidri</i>	NRRL Y-12634	(U84236)	(AY046205)
<i>Z. Kombuchaensis</i>	NRRL YB-4811	(AF339904)	(AY046193)
<i>Z. bisporus</i>	NRRL Y-12626	(U72162)	(AY046192)
<i>Z. baillii</i>	MB508	(DQ872869)	(DQ 872858)
<i>Z. rouxii</i>	ZR14	(AB363047)	(AB363061)
<i>Z. lentus</i>	NRRL Y- 27276	(AF339888)	(AY046194)
<i>L. kluyveri</i>	NRRL Y-12651	(U68552)	(AY046209)
<i>L. waltii</i>	NRRL Y-8285	(U69582)	(AY046208)
<i>Z. mellis</i>	NBRC 1732	(AB302838)	(AB302842)
<i>L. thermotolerans</i>	NRRL Y-8284	(U69581)	(AY046207)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 11758	(AJ 544254)	(AJ 544247)
<i>Torulaspora franciscae</i>	NRRL Y-17532	(U73604)	(AY046186)
<i>T. delbrueckii</i>	NRRL Y-866	(U72156)	(AY046187)
<i>T. pretoriensis</i>	NRRL Y-17251	(U72157)	(AY046188)
<i>T. globosa</i>	NRRL Y- 12650	(U72166)	(AY046184)
<i>T. microellipsóides</i>	NRRL Y-1549	(U72160)	(AY046185)
<i>Kluyveromyces nonfermentans</i>	NRRL Y-27343	(AF398490)	(AY046211)
<i>K. lactis</i>	NRRL Y-8279	(U94922)	(AY046213)
<i>K. wickerhamii</i>	NRRL Y-8286	(U69577)	(AY046212)
<i>K. dobzhanskii</i>	NRRL Y-1974	(U69575)	(AY046215)
<i>K. aestuarii</i>	NRRL YB-4510	(U69579)	(AY046210)
<i>K. marxianus</i>	NRRL Y-8281	(U94924)	(AY046214)
<i>Zygototulaspora florentinus</i>	NRRL Y-1560	(U72165)	(AY046168)
<i>Zyg. Mrakii</i>	NRRL Y-12654	(U72159)	(AY046169)

Fonte: O Autor (2009).

3 RESULTADOS

3.1. ANÁLISE TAXONÔMICA CONVENCIONAL

A Figura 5A mostra aspectos macroscópicos do isolado SPC2(7) que apresentou colônias de cor branca, superfície lisa e opaca, levemente convexas, com bordos lisos e diâmetro variando entre 2 a 5 mm com cinco dias de crescimento. Quanto aos aspectos microscópicos, não foi observada a formação de pseudomicélio em meio de cultura CMA durante um período de 14 dias, a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). As células cultivadas em caldo YM apresentaram-se ovóides á elipsóides com diâmetro variando de 2 a 4 μm ou 3 a 5 μm . A reprodução assexuada ocorreu por brotamento simples e a sexuada foi evidenciada pela presença dos ascos com cerca de 1 a 4 ascosporos esféricos. Os ascos são conjugados apresentando uma estrutura denominada “halteres” (Figura 5b). 400x.

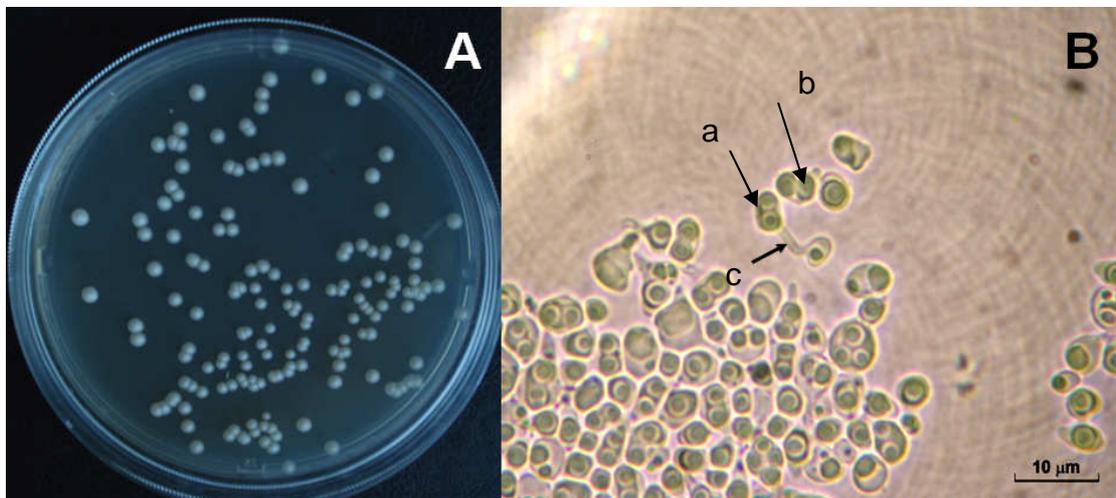


Figura 5. Isolado SPC2(7) em meio YM ágar a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) após 3 dias de crescimento **(A)** e análise microscópica das células mostrando as estruturas reprodutivas **(B)** : ascos (a) ascosporos (b) e “halteres” (c) produzidos em meio YCB (acrescido de 0,01% de Sulfato de amônio) a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) após 3 dias de crescimento. 400x. Fonte: o autor (2009).

Os resultados dos testes bioquímicos (Tabelas 4, 5 e Figura 6) mostram o perfil bioquímico e fisiológico do isolado SPC2(7) em relação às inclusas em *Lanchacea* e *Zygosaccharomyces*.

Tabela 4. Características fisiológicas e bioquímicas do isolado SPC2(7) em comparação com espécies de *Lanchacea* e *Zygosaccharomyces*.

Indicador	SPC2(7)	<i>L. fermentati</i>	<i>L. cidri</i>	<i>Z. bailii</i>	<i>Z. rouxii</i>	<i>Z. bisporus</i>	<i>Z. mellis</i>
YNB	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+/D	+	+/D
Galactose	+	+	+	+/-	-	D/-	+/-
L-Sorbose	-	+/-	+/D	+/-	-	+/-	-
Maltose	+	+/-	+	-	+/-	-	+/-
Sacarose	+	+	+	+/-	D/-	-	D/-
Cellobiose	-	+/-	-	D/-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+/-	D	-	+/-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	+/-	+	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+/-	-	-	-
Melizitose	-	+/-	-	-	-	-	-
Inulina	+	+/-	D/-	-	-	-	-
Amido solúvel	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	-	+/-	+/D	-	-	D/-	-
L-arabinose	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-
D-ribose	-	-	-	-	-	-	-
L-ramnose	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	-	+	+	+/-	+/-	+	+/-
Glicerol	+	+/-	+/D	+/-	+/-	+/D	+/-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	D/-
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-
D-manitol	+	+/-	+	+/D	+/-	+/-	+/-
D-glucitol	-	+/D	-	+/D	+/-	+/-	+/-

Continuação da Tabela 4...

Indicador	SPC2(7)	<i>L. fermentati</i>	<i>L. cidri</i>	<i>Z. bailii</i>	<i>Z. rouxii</i>	<i>Z. bisporus</i>	<i>Z. mellis</i>
Salicina	+	+/-	-	-	-	-	-
DL-lactato	+	+/D	+/D	-	-	-	-
Succinato	-	+/-	+/D	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-
M-inositol	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-
Hexadecano	-	-	-	-	-	-	-
Glucosamina	+	+/D	-	+/-	+/-	+/-	D/-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-
Acetona	F	-	-	-	-	-	-
Isopropanol	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	F/-	-	-
N-acetilglucosamina	+	+	+/-	+	+	+	+/-
Sem aminoácidos	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
YCB	-	-	-	-	+/-	-	-
Nitrato	-	+	+/D	+	+	+/D	+
Nitrito	-	+	+/-	-	-	+	-
Lisina	-	+	-	+/-	+/-	-	+/-
10% NaCl	-	+/-	-	-	+/-	-	-
Ácido acético	-	-	-	-	+/-	-	-
50%glicose	-	+	+/D	+	+	+/D	+
0,01% ciclohexamida	-	+	+/-	-	-	+	-
37°C	-	+	-	+/-	+/-	-	+/-
40°C	-	+/-	-	-	+/-	-	-

Indicador de crescimento celular: + (positivo); - (negativo); F (fraco); D (deficiente). Nota: os perfis fisiológicos das espécies de *Zygosaccharomyces* e *Lachancea* foram obtidos por Barnett et al. (2000). Fonte: o autor (2009).

Tabela 5. Fermentação de fontes de carbono pelo isolado SPC2(7) e pelas espécies de *Zygosaccharomyces* e *Lachancea*.

Espécies	Glicose	Galactose	Maltose	Sacarose	Rafinose
SPC2(7)	+	-	+	+	+
<i>L. fermentati</i>	+	+,D	+/-	+	+
<i>L. cidri</i>	+	+	+,D	+	+
<i>Z. bailii</i>	+	-	-	+/-	+/-
<i>Z. rouxii</i>	+,D	-	+/-	D,-	-
<i>Z. bisporus</i>	+	-	-	-	-
<i>Z. mellis</i>	+,D	-	+,D	-	-

Indicador de fermentação de açúcares: + (positivo); - (negativo); D (deficiente). Nota: os perfis fisiológicos das espécies do gênero *Zygosaccharomyces* e *Lachancea* foram obtidos de Barnett et al. (2000). Fonte: o autor (2009).

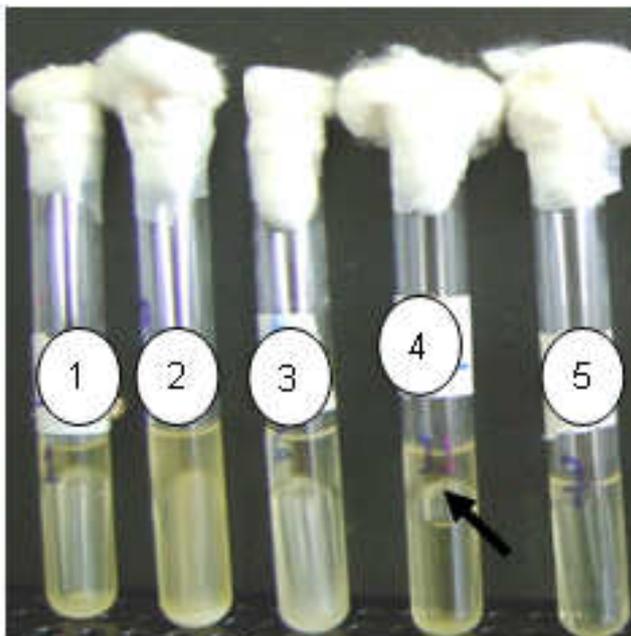


Figura 6. Ensaio de capacidade fermentativa do isolado SPC2(7) em tubos de Durhan. A seta mostra a presença de bolha de gás no interior do tubo evidenciando a fermentação. Glicose (tubo 1), sacarose (tubo 2), maltose (tubo 3), rafinose (tubo 4) e galactose (tubo 5). Fonte: o autor (2009).

3.2. ANÁLISE TAXONÔMICA MOLECULAR

3.2.1. Análise por ribotipagem

O segmento ITS1-5.8S-ITS2 do locus de rDNA foi amplificado do genoma do isolado SPC2(7) e das espécies *L. fermentati* GBD 812 e *L. cidri* CBS 4575 com os iniciadores ITS4 e ITS5, gerando um fragmento de aproximadamente de 700 pb (Figura 7). A enzima *EcoRI* não foi capaz de produzir fragmentos de restrição nas três leveduras enquanto que, a digestão com a enzima *HinfI* produziu dois, um de cerca de 330 pb e outro de 370 pb. Entretanto, a digestão do fragmento das três leveduras com a enzima *DdeI* produziu fragmentos de cerca de 520 pb e 180 pb para o isolado SPC2(7) e de 440 pb, 140 pb e 60 pb para as linhagens *L. fermentati* GBD 812 e *L. cidri* CBS 4575 (Figura 8).

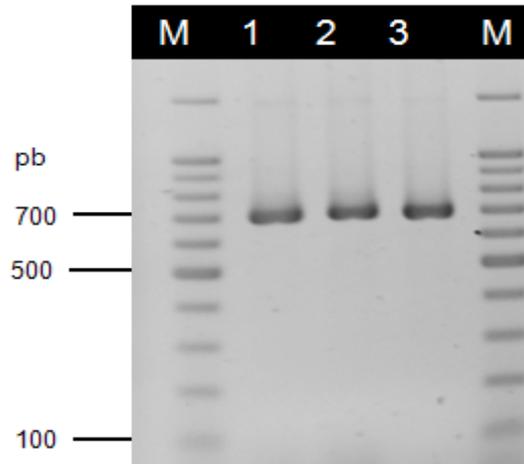


Figura 7. Perfis de amplificação do locus ITS1-5.8S-ITS2 como os iniciadores ITS4 e ITS5 de *Lachancea fermentati* GBD 812 (pista 1), SPC2(7) (pista 2) e *Lachancea cidri* CBS 4575 (pista 3). Na pista M, marcador de peso molecular de 100 pb com indicação do tamanho de alguns fragmentos (à esquerda). Fonte: o autor (2009).

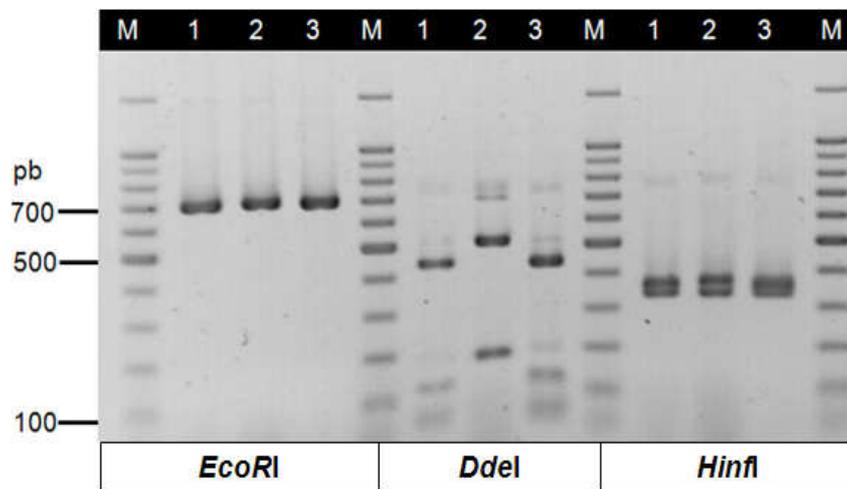


Figura 8. Perfis de restrição dos fragmentos do locus ITS1-5.8S-ITS2 com as enzimas de restrição *EcoRI*, *Ddel* e *HinfI*. Nas pistas M, marcador de peso molecular de 100 pb com indicação do tamanho de alguns fragmentos (à esquerda). Encontram-se os DNAs de *Lachancea fermentati* GBD 812 (pista 1), SPC2(7) (pista 2) e *Lachancea cidri* CBS 4575 (pista 3). Fonte: o autor (2009).

3.2.2 Tipagem molecular do isolado SPC2(7) com os marcadores de “fingerprinting”

O isolado foi submetido à tipagem molecular utilizando iniciadores únicos (GTG)₅, (GACA)₄ e M13 em comparação com representantes dos gêneros *Zygosaccharomyces* e *Lachancea*. O isolado SPC2(7) apresentou perfil de amplificação com o iniciador (GTG)₅ completamente diferente das espécies *L. fermentati* GBD 812 e *L. cidri* CBS 4575 com menos de 50% de índice de similaridade (Figura 9).

Para confirmar o poder discriminatório dos marcadores de iniciadores únicos na tipagem e identificação das leveduras, o DNA de isolados de levedura preliminarmente identificados como *Zygosaccharomyces* sp., um isolado de *Z. bailii* UFMG-L10 e um isolado de *L. fermentati* GBD 812 foi submetido a amplificação com os iniciadores (GTG)₅, (GACA)₄ e M13 (Figura 10). Os resultados mostraram que isolados geneticamente semelhantes produziram perfis de amplificação semelhantes e foram agrupados com índice de similaridade de 80% a 100%, como foi o caso dos isolados JPC2(8) e JPC2(9), MC4(9), MC4(10), GC3(6) e GC3(7). Da mesma maneira, leveduras geneticamente diferentes apresentaram perfis de amplificação diferentes e formaram grupos fenéticos independentes, com índice de similaridade menor do que 50%.

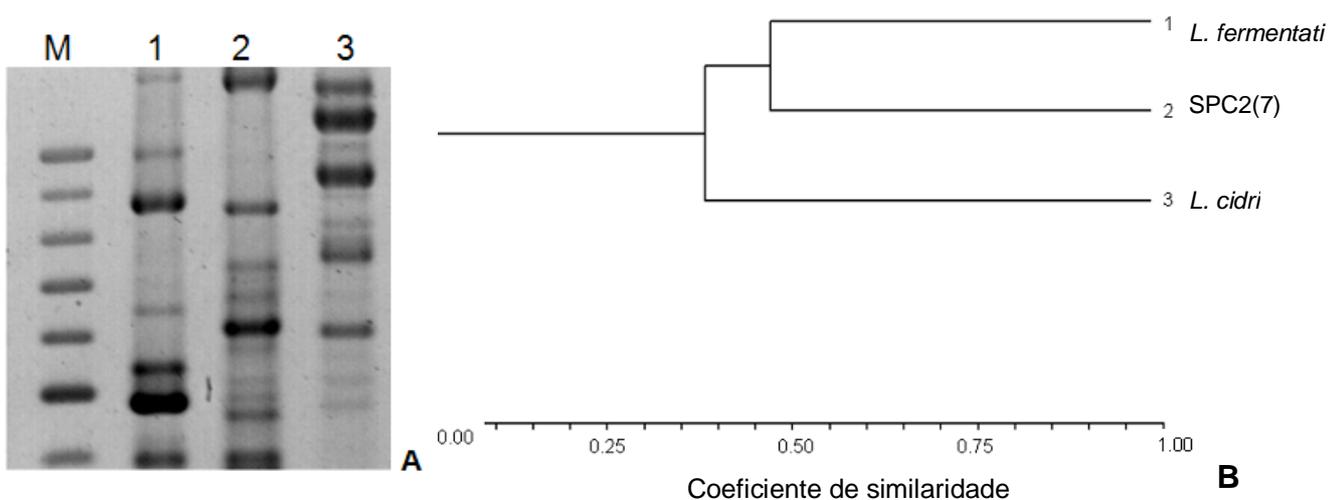


Figura 9. Análise de similaridade do isolado SPC2(7) com o iniciador (GTG)₅. **A)** Perfil de amplificação das leveduras *L. fermentati* GBD 812 (pista 1), SPC2(7) (pista 2) e *L. cidri* CBS 4575 (pista 3) com fragmentos separados em gel de agarose a 1,3%. O marcador de peso molecular 100 bp foi utilizado (pista M). **B)** Análise de agrupamento dos perfis de amplificação utilizando o método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Simple Matching (SM). Fonte: o autor (2009).

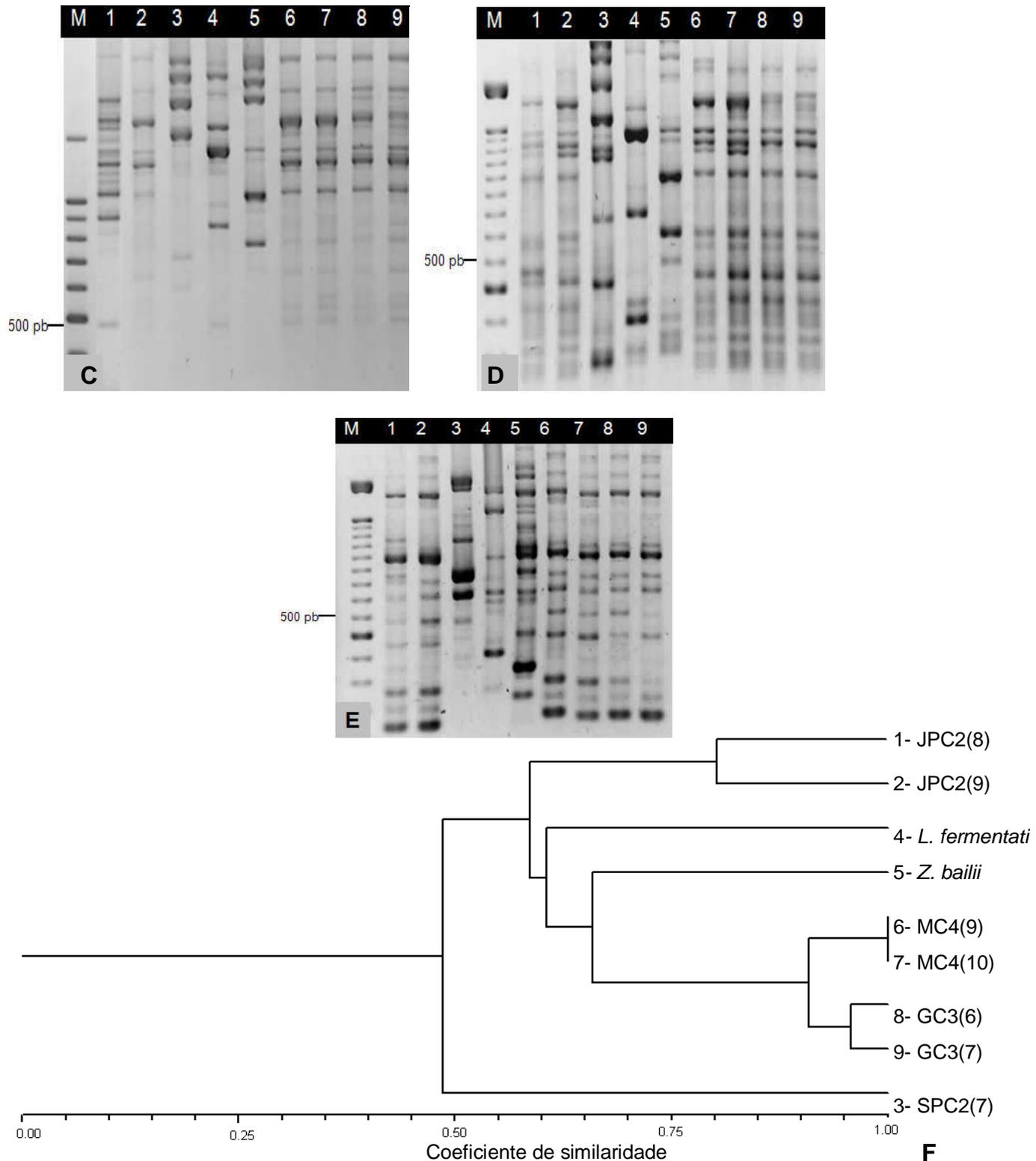


Figura 10. Perfil de amplificação do DNA dos isolados industriais de *Zygosaccharomyces* sp. JPC2(8) (pista 1), JPC2(9) (pista 2), MC4(9) (pista 6), MC4(10) (pista 7), GC3(6) (pista 8) e GC3(7) (pista 9), da linhagem tipo de *Z. bailii* UFMG-L10 (pista 5) e dos isolados SPC2(7) (pista 3) e *L. fermentati* GBD 812 (pista 4) com os iniciadores (GTG)5 (painel C), (GACA)4 (painel D) e M13 (painel E) e a análise de agrupamento dos perfis de amplificação utilizando o método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Simple Matching (SM). (painel F). Fonte: o autor (2009).

3.2.3 Identificação molecular por seqüenciamento de DNA

O isolado SPC2(7) foi analisado quanto à seqüência de nucleotídeos das regiões do DNA ribossomal ITS1-5.8S-ITS2 e D1/D2 interna ao gene altamente conservado que codifica o RNA ribossomal 26S ou simplesmente D1/D2. As seqüências obtidas, foram submetidas à análise de alinhamento local tipo BLASTn disponível no Genbank (Tabela 6). Para a região D1/D2 26S rDNA, a seqüência de nucleotídeos do isolado SPC2(7) apresentou 100% de identidade com a seqüência do isolado *Zygosaccharomyces* sp. IFO11066 depositado na coleção Japonesa IFO (The Institute for Fermentation, Osaka). A outra seqüência mais próxima correspondeu a um isolado de *Lachancea* sp. com índice de identidade de 96% (Tabela 6). O alinhamento da seqüência da região ITS1-5.8S-ITS2 (Tabela 6) mostrou o isolado SPC2(7) apresentando índices de identidade de 88% com a espécie *Lachancea meyersii* Fell, Statzell e Kurtzman.

Tabela 6. Alinhamento tipo Blastn das seqüências D1/D2 26S e ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA do isolado SPC2(7) com seqüências mais próximas depositadas no GenBank.

Seqüência	Linhagem	Tamanho (pb)	Gaps	Identidade
D1/D2 26S	<i>Zygosaccharomyces</i> sp. IFO11066	570	0/493 (0%)	493/493 (100%)
	<i>Lachancea</i> sp. ES12S06	546	4/495 (0,8%)	479/495 (96%)
ITS1-5.8S-ITS2	<i>Lachancea meyersii</i> NRRL Y-27411	673	30/663 (4%)	587/663 (88%)
	<i>Lachancea meyersii</i> 9924	673	30/663 (4%)	587/663 (88%)

Fonte: o autor (2009).

O conjunto de seqüências de espécies dos gêneros *Lachancea* e *Zygosaccharomyces* mais similar ao isolado SPC2(7) para os dois lócus foi coletado, submetido a alinhamento múltiplo com a ferramenta ClustalW e agrupados pelos métodos de Neighbor-Joining (SAITOU ; NEI, 1987) e Máxima Verossimilhança (YANG; NIELSEN, 2000). Após o alinhamento, garantindo uma homologia de posição, obteve-se seqüências de tamanhos uniformes de 508 pb e 470 pb para os locús D1/D2 26S e ITS-5.8S-ITS2 rDNA respectivamente. Três conjuntos de dados foram gerados, um para cada marcador e outro com os marcadores combinados a partir de seqüências de nucleotídios de espécies dos gêneros *Lachancea*,

Zygosaccharomyces, *Torulaspota*, *Zygotorulaspota* e *Kluyveromyces*. Depois de alinhados, os conjuntos de dados foram submetidos ao teste do sinal filogenético através do programa Tree-puzzle 5.2 (SCHMIDT et al., 2002). O resultado desta análise mostrou sinais filogenéticos de 95,8% e 94,7% para o conjunto dos loci D1/D2 26S ITS1-5.8S-ITS2 rDNA, respectivamente. Para as inferências filogenéticas a partir da combinação dos loci citados anteriormente, o teste de partição de homogeneidade foi de $P=0.22$.

Os modelos evolutivos mais adequados aos conjuntos de dados segundo análise do programa Modeltest foram: Modelo geral de tempo-reverso (GTR+I+G) e o Transversional (TMV+G) para os marcadores ITS1-5.8S-ITS2 e 26S D1/D2 rDNA respectivamente.

Foram obtidas três árvores métricas (Figuras 11, 12 e 13), uma para cada conjunto de dados, evidenciando a distância genética entre as espécies. Nestas árvores, uma linhagem de *S. cerevisiae* foi utilizada como grupo externo.

A topologia das árvores obtidas foi similar para os marcadores ITS1-5.8S-ITS2 e 26S D1/D2 rDNA isolados ou combinados, independente do método de reconstrução filogenética empregado (Máxima Verossimilhança e Neighbor-joining). A topologia de árvore para a seqüência D1/D2 26S rDNA (Figura 11) mostrou o isolado SPC2(7) formando clado com a linhagem *Zygosaccharomyces* sp. IFO11066, mostrando apenas diferenças nos valores de “bootstrap” para a MV (87%) e NJ (100%).

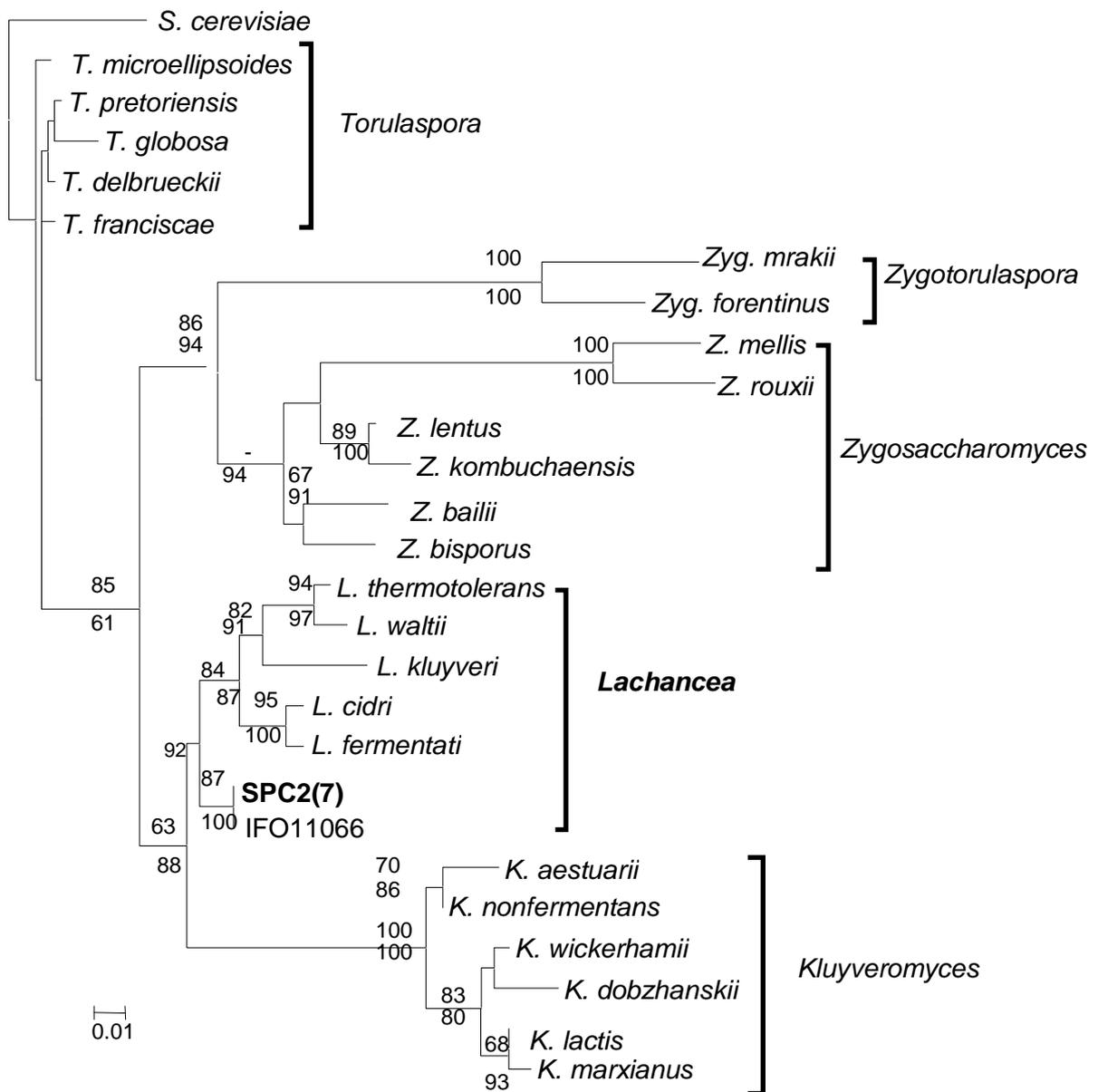


Figura 11. Árvore filogenética de espécies de leveduras dos gêneros *Zygosaccharomyces*, *Lachancea*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* e *Zygorulasporea* inferida pelos métodos da Máxima Verossimilhança e Neighbor-Joining a partir de seqüências de nucleotídeos do gene 26S (D1/D2) rDNA. Os Valores de “Bootstrap” >60% são mostrados na figura, originados a partir de 1000 pseudo-réplicas. Os valores acima de cada ramo são referentes ao método de Máxima Verossimilhança e os abaixo, ao método de Neighbor-joining. A seqüência de nucleotídeos da região D1/D2 26S rDNA de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como outgroup. Fonte: o autor.

Na árvore construída com o lócus ITS1-5.8S-ITS2 o isolado SPC2(7) apresentou-se em um ramo separado, mas filogeneticamente relacionado com as espécies *L. thermotolerans* e *L. kluyveri* (Figura 12) suportado por “bootstraps” de 87% (MV) e 90% (NJ).

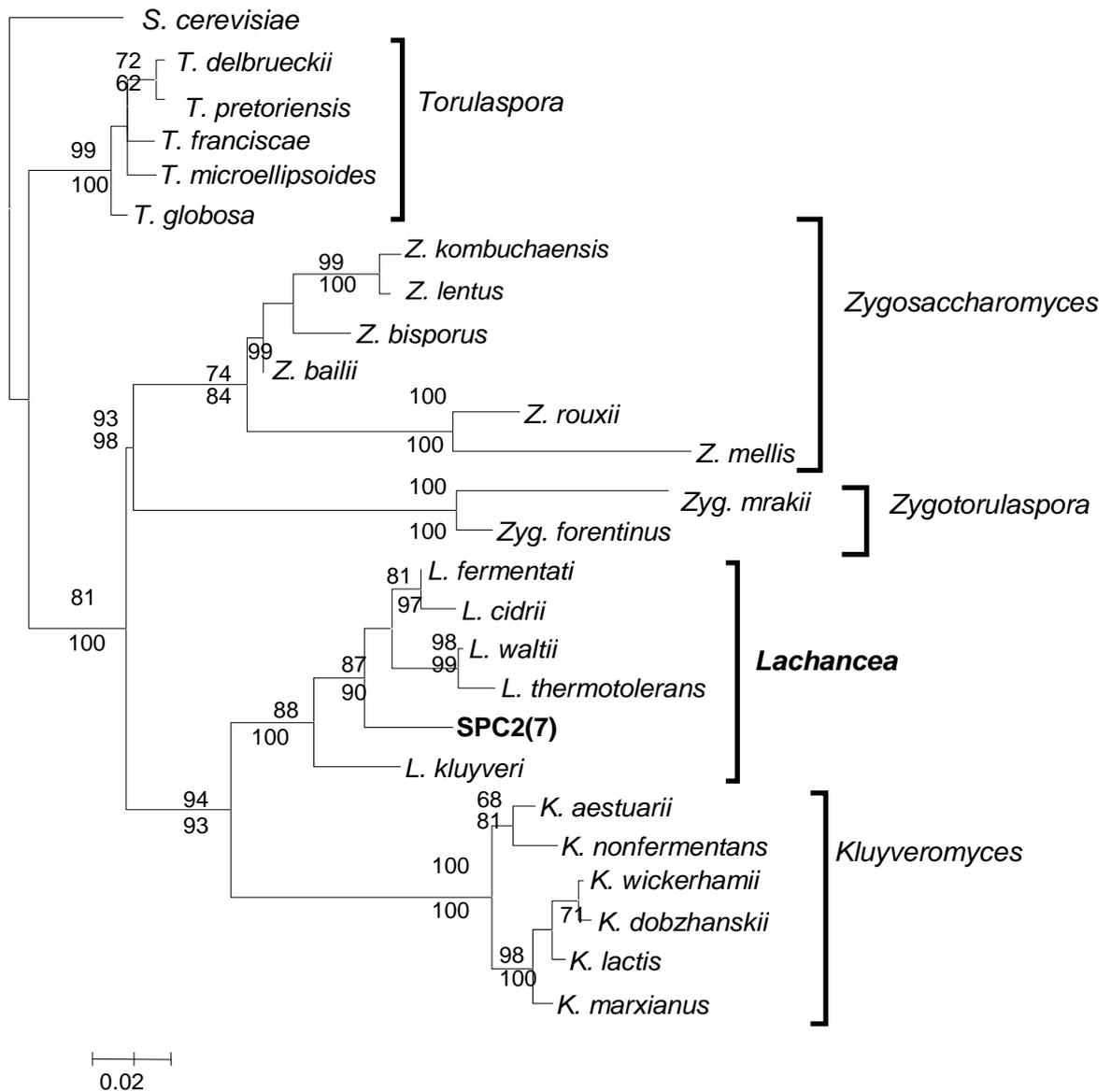


Figura 12. Árvore filogenética de espécies de leveduras dos gêneros *Zygosaccharomyces*, *Lachancea*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* e *Zygorulasporea* inferida pelos métodos da Máxima Verossimilhança e Neighbor-Joining a partir de seqüências de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2 rDNA. Os Valores de Bootstrap >60% são mostrados na figura, originados a partir de 1000 pseudo-réplicas. Os valores acima de cada ramo são referentes ao método de Máxima Verossimilhança e os abaixo, ao método de Neighbor-joining. A seqüência de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2 de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como outgroup. Fonte: o autor (2009).

A topologia de árvore resultante da combinação dos lócus ITS1-5.8S-ITS2 e D1/D2 26s rDNA foi similar às inferidas com cada lócus isoladamente e mostrou, o isolado SPC2(7) novamente relacionado com espécies do gênero *Lachancea* (Figura 13) mas, em ramo isolado.

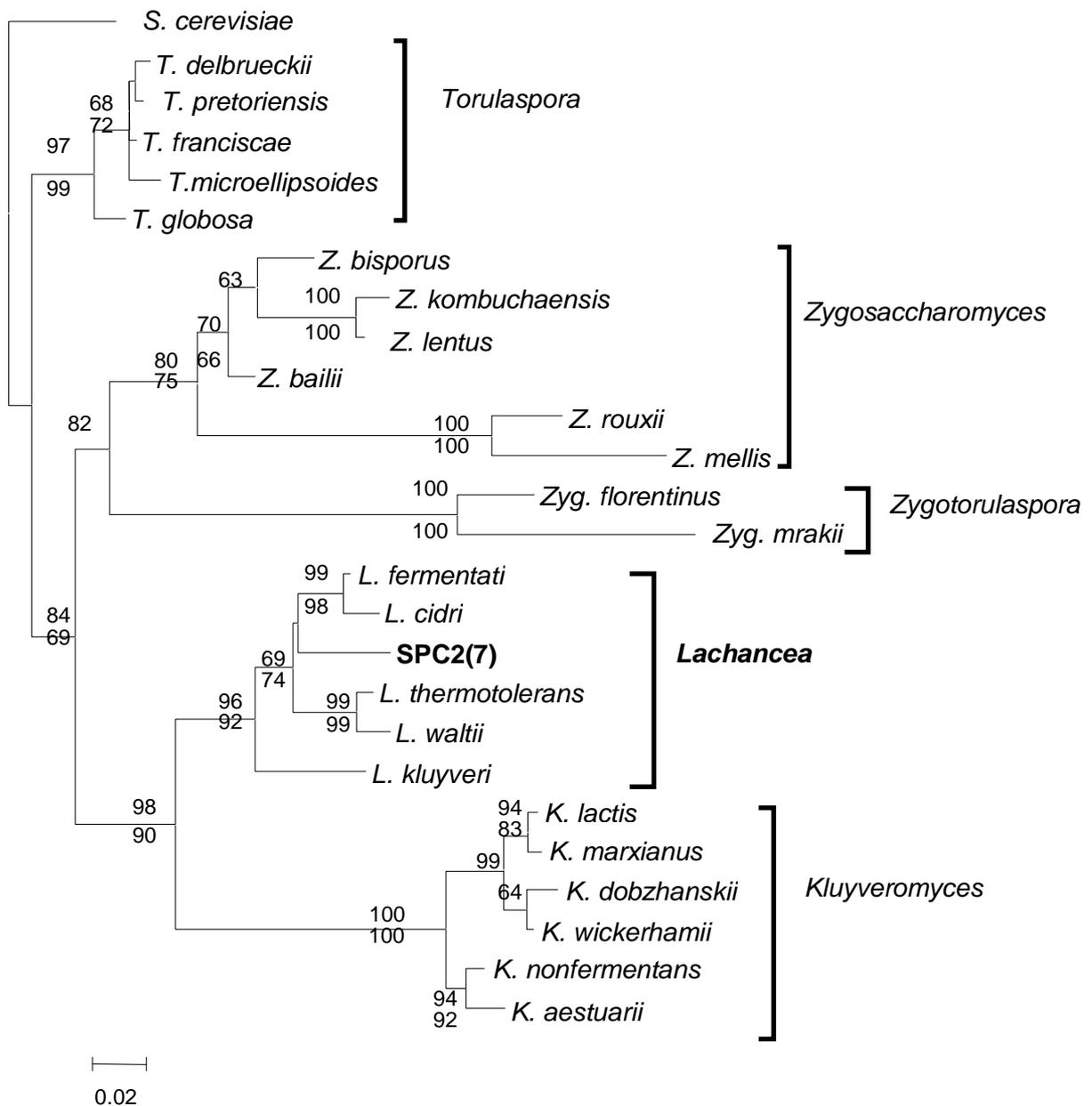


Figura 13. Árvore filogenética de espécies de leveduras dos gêneros *Zygosaccharomyces*, *Lachancea*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* e *Zygorulaspota* inferida pelos métodos da Máxima Verossimilhança e Neighbor-Joining a partir de seqüências de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2 e do gene 26S (D1/D2) rDNA. Valores de Bootstrap >60% são mostrados na figura, originados a partir de 1000 interações. Os valores acima de cada ramo são referentes ao método de Máxima Verossimilhança e os abaixo, ao método de Neighbor-Joining. As seqüências de nucleotídeos das regiões 26S (D1/D2 rDNA) e ITS1-5.8S-ITS2 de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como outgroup. Fonte: o autor (2009).

4 DISCUSSÃO

A fermentação alcoólica industrial para produção de álcool combustível é um processo microbiológico altamente complexo, cujo resultado final depende de variáveis como temperatura, pH, qualidade da água e em especial, das leveduras que dominam o procedimento. A presença de leveduras contaminantes no processo de fermentação tem causado prejuízo às destilarias e a detecção, quantificação e identificação de tais leveduras constituem importantes passos para o adequado controle do processo (BASÍLIO et al., 2005).

Basílio et al. (2008) realizando um trabalho de monitoramento, identificaram várias espécies contaminantes de destilarias de álcool combustível, dentre estas, encontraram *Z. fermentati* e *Candida* sp. Esta provavelmente podendo ser uma espécie nova. Da mesma forma Vila Nova (2008) identificou no processo de fermentação alcoólica de alambiques artesanais espécies de leveduras apenas parcialmente identificadas como *Candida* sp. e *Zygosaccharomyces* sp.

Apesar de muitas leveduras já terem sido descritas, isoladas de diferentes substratos (KURTZMAN; ROBNETT; BASEHOAR-POWERS, 2001; ROSA; LACHANCE, 2005) ainda há muitas espécies desconhecidas. Atualmente há 1,500 espécies de leveduras reconhecidas, distribuídas no Filo Ascomycota e Basidiomycota. Entretanto, poucas dessas já foram submetidas a extensivas análises genéticas (KURTZMAN; PISKUR, 2005).

Por vários anos, os estudos de identificação de diferentes espécies de leveduras, bem como de linhagens, tem sido baseado numa série de testes bioquímicos, fisiológicos e em características morfológicas. Entretanto, estes métodos tornam-se limitados na identificação de algumas espécies como é o caso das pertencentes ao complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” e do gênero *Zygosaccharomyces*, que fermentam e assimilam poucas das várias fontes de carbono utilizadas nos testes de identificação convencional (KURTZMAN, 1994). Além disso, em ambos os gêneros é freqüente a ocorrência de formação de híbridos naturais (JAMES et al., 2005).

A taxonomia do gênero *Zygosacchomyces* tem sofrido modificações ao longo dos anos, sendo a recente, a que resultou de análises filogenéticas de multigenes e

assim incluiu as espécies *Z. fermentati* e *Z. cidri* em um novo gênero, denominado *Lachancea* (KURTZMAN, 2003).

O isolado SPC2(7) procedente de amostra de alambique artesanal de cachaça isolado por Vila Nova (2008) foi preliminarmente identificado como *Zygosaccharomyces* sp. devido a alta similaridade com o isolado *Zygosaccharomyces* IFO11066 e com proximidade genética com espécies do gênero. No presente trabalho este isolado foi caracterizado quanto aos aspectos morfológicos como podendo pertencer aos gêneros *Lachancea* ou *Zygosaccharomyces*, segundo características que definem os mesmos, tais como, forma dos ascos (YARROW, 1998). Os resultados dos testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio mostraram o isolado com perfil similar aos de espécies dos gêneros citados anteriormene, entretanto, distinguindo-se por não apresentar osmotolerância e não crescer na presença de Nitrato.

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular tem permitido na última década o emprego de marcadores moleculares, gerando grande número de estudos sobre tipagem, identificação, classificação e ecologia de microrganismos, aumentando a resolução taxonômica, principalmente em nível de linhagem (GUILLAMÓN et al., 1998). A análise do comprimento do produto de amplificação que corresponde ao locús ITS1-5.8S-ITS2 tem permitido a identificação rápida de diferentes tipos de leveduras. Entretanto, várias espécies apresentam produtos de amplificação com o mesmo tamanho. Este problema pode ser resolvido a partir da digestão desses fragmentos com diferentes enzimas de restrição (ESTEVE-ZARZOSO et al., 1999). Em alguns casos, essa ferramenta permitiu apenas uma identificação parcial, como é o caso de espécies de leveduras dos gêneros *Zygosaccharomyces* (*L. fermentati* e *L. cidri*) e *Saccharomyces* que apresentam padrão de restrição de tamanhos de fragmentos idênticos (ESTEVE-ZARZOSO et al., 2003; PULVIRENTI et al., 2005).

Já os marcadores microsatélites tem sido amplamente utilizados na diferenciação de linhagens de fungos. Dos Santos et al. (2007) utilizando os oligonucleotídios (GTG)₅, (GACA)₄ e M13 e intron podem distinguir espécies de leveduras do complexo *Saccharomyces* "sensu stricto". Dentre os marcadores de PCR "fingerprinting", o (GTG)₅ mostrou ter alto grau de discriminação de leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica (SILVA-FILHO et al., 2005). Baleiras-Couto et al. (1996), ao investigar linhagens de leveduras presentes na

cadeia de produção de maionese e temperos de saladas encontrou várias espécies de leveduras. Entretanto, a discriminação das espécies *Z. bailii* e *Z. bisporus* só foi possível através da técnica da PCR “fingerprinting” com os iniciadores (GTG)₅ e (GAC)₄. A tipagem do isolado SPC2(7) mostrou padrão de bandas distinto das espécies *L. fermentati* GBD 812 e *L. cidri* CBS 4575 o que nos aponta que o isolado é uma unidade taxonômica distinta e não um híbrido interespecífico já que, eventos de hibridização já foram relatados entre espécies do gênero *Zygosaccharomyces* (JAMES et al., 2005).

Outros métodos atualmente utilizados na identificação de leveduras são os baseados no seqüenciamento de genes do DNA ribossomal (KURTZMAN, 2003), genes mitocondriais (BELOCCH et al., 2000) e fator de alongação (KURTZMAN; ROBNETT, 2003). Através do seqüenciamento dos diferentes marcadores foi possível a identificação de leveduras do complexo “sensu stricto” (PULVIRENTI et al., 2005), contaminantes de amostras do álcool combustível (BASÍLIO et al. 2008), alambiques de cachaça (VILA NOVA, 2008) e de espécies do gênero *Zygosaccharomyces* (ROSA; LACHANCE, 2005; KURTZMAN et al., 2001), inclusive de híbridos interespecíficos dentro deste gênero (JAMES et al., 2005).

Para identificação do isolado SPC2(7) foram seqüenciadas a região variável D1/D2 26S e ITS1-5.8S-ITS2 rDNA. A seqüência de nucleotídeos da região D1/D2 do gene ribossomal 26S mostrou o isolado SPC2(7) como pertencente ao gênero *Lachancea*. A busca de similaridade por alinhamento local da seqüência D1/D2 26S rDNA deste isolado confirmou o resultado anterior apresentado por Vila Nova (2008) que o apresentou como idêntico a linhagem *Zygosaccharomyces* IFO11066 isolada no Japão. A outra seqüência mais próxima ao isolado correspondeu a um representante *Lachancea* sp. o que coincidem com os resultados anteriores que sugerem o isolado SPC2(7) como um novo representante do gênero *Lachancea*. Além disso, o Blastn da seqüência ITS1-5.8S-ITS2 também mostrou o isolado SPC2(7) relacionado com espécies do gênero *Lachancea*.

As árvores inferidas de agrupamento filogenético mostradas nas figuras 8, 9 e 10 coincidem com os estudos de Kurtzman e Robnett (2003) que mostram através do método da Máxima Parcimônia que o complexo *Saccharomyces* é constituído de mais de dez gêneros e dentre estes, estão os gêneros *Zygosaccharomyces* e *Lachancea*. As inferências filogenéticas posicionaram o isolado SPC2(7) no gênero

Lachancea com um suporte estatístico (> 80%) superior ao encontrado no trabalho de Kurtzman e Robnett (2003).

A filogenia inferida a partir do locus D1/D2 26S mostrou o isolado SPC2(7) como um representante idêntico ao depositado pela pesquisadora Japonesa Ueda-Nishimura no NCBI como *Zygosaccharomyces* sp. IFO11066. Além disso, as inferências da região ITS1-5.8S-ITS2 mostrou o isolado em ramo distinto, mas relacionado com espécies do gênero *Lachancea* tais como, *L. fermentati* e *L. cidri*. Como o teste de partição de homogeneidade não foi significativo ($P > 0,05$) (FARRIS et al., 1994) foi possível a reconstrução de uma topologia a partir da combinação dos locus, e esta, coincidiu com as topologias anteriores que posicionam o isolado SPC2(7) no gênero *Lachancea* entretando, em um ramo distinto.

Estes resultados finalizam a identificação molecular do isolado SPC2(7) como um possível representante de uma nova espécie de levedura do gênero *Lachancea*, para o qual foi sugerida a denominação de *Lachancea mirantinus*, pelo fato de ter sido isolada do alambique Mirante da Cachaça, no município de Paudalho, na zona da mata norte do Estado de Pernambuco, sugerimos o isolado SPC2(7) como sua linhagem-tipo e o isolado *Zygosaccharomyces* IFO11066 como segundo representante.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir dos métodos de taxonomia convencional e molecular apresentados no presente trabalho serviram de base para completar a taxonomia do isolado SPC2(7) e assim, suportam sua posição não como um híbrido interespecífico do gênero *Lachancea*, mas, como uma unidade taxonômica distinta provavelmente uma espécie nova de levedura sugerida como *Lachancea mirantinus*.

REFERÊNCIAS

ADAMS, D. et al. **NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, versão 2.10z** © by Applied Biostatistics, Inc., 2002.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Micology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 869.

ÁLVAREZ-MARTIN, P.; FLOREZ, A. B.; LOPEZ-DIAZ, T. M.; MAYO, B. Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese, **International Dairy Journal**, v. 17, n. 8, p. 961-967, August. 2007.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. 2. ed. Approach Blackwell Science Ltda, 2004. p.541.

BALEIRAS-COUTO, M. M.; HARTOG, B. J.; HUIS IN'T VELD, J. H. J.; HOFSTRA, H.; VAN DER VOSSSEN, J. M. B. M. Identification of spoilage yeasts in a food-production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting. **Food Microbiology**, v.13, n.1, p. 59-67, February.1996.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**, 2. ed. Cambridge: University Press, 1990. p.1002.

BARNETT, J.A.; PAYNER, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3. ed. Cambridge: University Press, 2000. p.1150.

BASÍLIO, A. C. M.; PINHEIRO, W.; MORAIS JR, M. A.; SIMÕES, D. A. Utilização do padrão de amplificação com o marcador (GTG)5 para identificação rotineira de leveduras contaminantes da fermentação alcoólica industrial. In_____.: **XV Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 15. , 2005, Recife. Anais....

BASÍLIO, A. C. M.; DE ARAÚJO, P. R. L.; DE MORAIS, J. O. F.; SILVA FILHO E. A.; DE MORAIS M. A. JR.; SIMÕES D. A. Detection and Identification of Wild Yeast Contaminants of the Industrial Fuel Ethanol Fermentation Process. **Current Microbiology**, v. 56, n.4, p. 322-326, April. 2008.

BELLOCH, C.; QUEROL, A.; GARCIA, M. D.; BARRIO, E. Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 405-416. 2000.

BOEKHOUT, T. Biodiversity gut feeling for yeasts. **Nature**, v. 434, p.449-451, March. 2005.

BUSO, G. S. C. **Marcadores moleculares e análises filogenéticas**. ed. Embrapa recursos genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 22.

BUSSAB, W. O.; MIAZAKI, E. S.; ANDRADE, D. F. **Introdução a análise de agrupamentos**. São Paulo: Associação Brasileira de estatística, 1990.

CAVALIERI, D; MCGOVERN, P. E.; HARTL, D. L.; MORTIMER, R.; POLSINELI, M. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. **Journal of Molecular Evolution**, v. 57, p. 266-232, August. 2003.

CAI, J.; ROBERTS, I. N.; COLLINS, M. D. Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 542-549, April. 1996.

DE HERTOIGH, B.; HANCY, F.; GOFFEAU, A.; BARET, P. V. Emergence of Species Specific Transporters During Evolution of the Hemiascomycete Phylum. **Genetics**, v. 172, p. 771-781, February. 2006.

DÉAK, T. Classification of Yeasts. In_____. **Handbook of food spoilage yeast.** London: Taylor & Francis Group, 2007. p. 13-36.

DE SOUZA-LIBERAL, A. T.; BASÍLIO, A. C. M.; BRASILEIRO, B. T. R. V.; SILVA-FILHO, E.A.; SIMÕES, D.A.; DE MORAIS JR M.A. Identification of the yeast *Dekkera bruxellensis* as major contaminant in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 538-547, February. 2007.

DOS SANTOS, S. K. B.; BASÍLIO, A. C. M.; BRASILEIRO, B.T. R. V.; SIMÕES, D.A.; SILVA-FILHO, E.A.; DE MORAIS JR, M. A. Identification of yeasts within *Saccharomyces sensu stricto* complex by PCR- fingerprinting. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1613-1620, November. 2007.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, p. 329-337, January. 1999.

ESTEVE-ZARZOSO, B., ZORMAN, T., BELLOCH, C.; QUEROL, A. Molecular characterization of the Species of the Genus *Zygosaccharomyces*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.26, p. 404-411. September. 2003.

FARRIS, J. S.; KALLERSJO, M.; KLUGE, A. G.; BULT, C. Testing Significance of Incongruence. **Cladistic**, v. 10, p. 315-319. 1994.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791.1985.

FERNANDES- MATIOLI, F. M. C. Noções de Filogenética Molecular. **Biológico**, v. 63, p. 37-38. 2001.

FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D.; ARIAS, M. C. Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps. **Apidologie**, v. 32, p. 323-332, March. 2001.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 14, p. 1-4. Maio/junho. 2000.

GANDRA, T. K. V.; MELLO, W. S.; GODÓI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimento Técnicas alimentos. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 30, n.1, p. 109-118, January. 2008.

GRAUR, D.; LI, W. **Fundamentals of Molecular Evolution**. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2000. p. 439.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n.13, p. 454–500, July. 1999.

GUILLAMÓN, J. M.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; QUEROL, A. Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, n.4, p.708-714. October. 1994

GUILLAMÓN, J. M.; SÁNCHEZ, I.; HUERTA, T. Rapid characterization of wild and collection strains of the genus *Zygosaccharomyces* according to mitochondrial DNA patterns. **FEMS Microbiology Letters**, v. 147, p 267- 272, February. 1997.

GUILLAMÓN, J. M.; SABATE, J.; BARRIO, E.; CANO, J.; QUEROL, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal ITS region. **Archives of Microbiology**, v. 169, n. 5, p. 387-392, April. 1998.

GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, n.7- 8, p. 998-1006, December, 1994.

HALOUAT, A. E. L.; DEBEVERE, J. M. Influence of modified atmosphere and preservatives on the growth of *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from dried fruits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 219-229, December, 1996.

HENNIG, W. "Grundzuge einer Theorie der phylogenetischen Systematik". Berlin: Deutscher Zentralverlag. 1950.

HIERRO, A.; GONZÁLEZ, A.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. Diversity and evolution of non-Saccharomyces yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 102-111, January. 2006.

IVANNIKOVA, YU. V.; NAUMOVA, E. S.; MARTYNYENKO, N. N.; NAUMOV, I. Characterization of the Genome of *Saccharomyces* Yeasts from Red Berry Wines. **Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 194-204, March/April. 2007.

JAMES, S. A.; COLLINS, M. D.; ROBERTS, I. N. Genetic interrelationship among species of the genus *Zygosaccharomyces* as revealed by small-subunit rRNA genes sequences. **Yeast**, v. 10, p. 871-881, July. 1994.

JAMES, S. A.; BOND, C. J.; STRATFORD, M.; ROBERTS, I.N. Molecular evidence for the existence of natural hybrids in the genus *Zygosaccharomyces*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n.8, p. 747-755, May 2005.

JAMES, S. A.; COLLINS, M. D.; ROBERTS, I. N. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspota*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 46, n.1, p. 189-194, January. 1996.

JAMES, S. A.; STRATFORD, M. Spoilage with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces* Beneficial and detrimental aspects. In_____.**Yeasts in Food**. Hamburg: Behr's Verlag, 2003. p.71-187.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, n. 10, p. 424-429. October, 1996.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In_____.
Munro, H. M. (ed). Mammalian Protein Metabolism. San Diego: Academic Press,
 1969. p. 21-132.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n.2, p.111-120, June. 1980.

Kurtzman, C. P.; James, S. A. *Zygosaccharomyces* and related genera. In_____.
Food spoilage Microorganisms, England: Woodhead Publishing Limited. p.294-305, 2006.

KURTZMAN, C. P. Molecular taxonomy of the yeasts. **Yeast**, v. 10, p. 1727-1740. December. 1994.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p.1074.

KURTZMAN, C. P.; Fell, J. W. Yeast Systematic and Phylogeny -Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology. In_____. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg, 2006. p. 11-30.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J.; WARD, J. M.; BRAYTON, C.; GORELICK, P.; WALSH, T. J. Multigene Phylogenetic Analysis of Pathogenic *Candida* Species in the *Kazachstania (Arxiozyma) telluris* Complex and Description of Their Ascosporic States as *Kazachstania bovina* sp. nov., *K. heterogenica* sp. nov., *K. pintolopesii* sp. nov., and *K. slooffiae* sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 101-111. January, 2005.

KURTZMAN, C. P. DNA relatedness among species of the genus *Zygosaccharomyces*. **Yeast**, v. 6, p. 213-219. 1990.

KURTZMAN, C. P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwatozyma* and *Zygotorulaspota*. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 233-245, December. 2003.

KURTZMAN, C. P.; PISKUR, J. Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts. In _____. **Comparative Genomics**. Berlina: Springer-Verlag Heidelberg, 2005. p. 29-46.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit 26S ribosomal DNA partial sequences. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 331-371, May. 1998.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J.; BASEHOAR-POWERS, E. *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, a new ascosporegenous yeast from Kombucha tea. **FEMS Yeast Research**, v. 1, n. 2, p. 133- 138, July. 2001.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 417- 432, June. 2003.

LACHANCE, M. A.; DANIEL, H. M.; MEYER, W.; PRASAD, G. S.; GAUTAM, S. P.; BOUNDY-MILLS, K. The D1/D2 domain of the large-subunit rDNA of the yeast species *Clavispora lusitaniae* is unusually polymorphic. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 253-258, December. 2003.

LANDRY, C. R.; TONWSEND, J. P.; HARTL, D. L.; CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 3, p. 575-591, March. 2006.

LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BORNER, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. **Journal of Basic Microbiology**, v. 33, p. 413-426. 1993.

LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Blucher Ltda, 2001. p. 616.

LONGATO, S.; BONFANTE, A. P. Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. **Mycological Research**, v. 101, p. 425-432.1997.

LOUREIRO, V.; QUEROL, A. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. **Trends Food Science Technol**, v.10, n.11,p.356-365, November.1999.

LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry **International Journal of Food Microbiology**, v.86, n. 1, p. 23-50, September. 2003.

LOPES, D. P. Filogenia molecular de Tunicata com ênfase em Ascidiacea. 2006. 133.f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

MANZANO, M.; COCOLIN, L.; LONGO, B.; COMI, G. PCR–DGGE differentiation of strains of *Saccharomyces sensu stricto*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 85, n.1, p. 23-27, January. 2004.

MARTORELL, P.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; QUEROL, A. Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, p. 293 -302, June. 2005

MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001.

MEYER, W.; MITCHELL, T. G. Polimerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. **Electrophoresis**, v. 16, p. 1648-1656, September. 1995.

MYIAKI, C. Y. Reconstrução filogenética. Introdução e o método de máxima parcimônia. In_____. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 97-107.

MYIAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. M.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In_____. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 97-107.

NEI, M.; KUMAR, S. Molecular evolution and phylogenetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000. p. 692.

O'DONNELL, K. Fusarium and its near relatives. In_____ **The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics**, Wallingford: CAB International, 1993. p. 225-233.

OLIVEIRA, E. S. Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da cachaça obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais. 2001.Tese. 135f. (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

PATARO, C.; GOMES, F. C. O.; ARAÚJO, R. A. C.; ROSA, C. A.; SCHWAN, R. F.; CAMPOS, C. R.; CLARET, A. S.; CASTRO, H. A. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, v. 23, p. 37-43, June. 2002.

PATARO, C.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L.; MANDONÇA-HAGLER, L.C.; LINARDI, V.R.; ROSA, C. A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. p. 89, n. 1, p. 1-9, July. 2000.

PEREIRA, S. L. Filogenia Molecular e Evolução em Cracidae (Aves). 2000. 74 f.Tese. (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo. 2000, São Paulo, 2000.

PETERSON, S. W.; KURTZMAN, C. P. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. **Systematic and Applied Microbiology**, v.14, p.124-129.1991.

PITT, J. I. Resistance of some food spoilage yeasts to preservatives. **Food Technology**, v. 6, p. 238-240. 1974.

POSADA, D.; CRANDALL, A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-818.1998.

PULVIRENTI, A.; SOLIERI, L.; DE VERO, L.; GIUDICI, P. Limitations on the use of polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism analysis of the rDNA NTS2 region for the taxonomic classification of the species *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 759 -764, September. 2005.

QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RAMÓN. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2948-2953. September, 1992.

QUEROL, A.; BELLOCH, C.; FERNADÉZ-ESPINAR, M. T.; BARRIO, E. Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. **International Microbiology**, v. 6, p. 201- 205, September. 2003.

RATÓN T. O. Métodos Moleculares de Identificación De Levaduras De Interés Biotecnológico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 21, p. 15-19. 2004.

RIBEIRO, J. C. G. M. Fabricação Artesanal de Cachaça Mineira. In_____.**O Lutador**. 2. ed. Belo Horizonte, 2002. p. 223.

ROHLF, F. J. **NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.0**. Nova York: Exeter Software, 2002.

ROMANO, P.; SUZZI, G. Higher alcohol and acetoin production by *Zygosaccharomyces* wine yeast. **Journal of Applied Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 541-545. 2003.

ROSA, C. A.; LACHANCE, M. A. *Zygosaccharomyces machadoi* sp. n., a yeast species isolated from a nest of the stingless bee *Tetragonisca angustula*. **Lundiana**, v. 6, p. 27-29. 2005.

RUSSO, C. A. M.; MIYAKI, C. Y.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética: métodos geométricos. In _____ **Biologia Molecular e Evolução**. Brasil: Holos, 2001. p. 108-129.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbour joining method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, July.1987.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F.; MANIATS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2. ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor.1989.

SCHMIDT, H. A.; STRIMMER, K.; VINGRON, M.; VON HAESLER, A. Tree- Puzzle: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. **Bioinformatics**, v. 18, p. 502-504. 2002.

SCHWAN, R. F.; MENDONÇA, A. T.; DA SILVA JR, J. J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A.E. Microbiology and physiology of Cachaca (Aguardente) fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 79, n.1, p. 89-96, January. 2001.

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 processes assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 88, n. 2, p. 13-23, August. 2005.

SPATAFORA, J. W.; BLACKWELL, M. cladistic analysis of partial *ssrDNA* sequences among unitunicate perithecial ascomycetes and its implications on the evolution of centrum development. **Series A, Life sciences**, v. 269, p. 233-242.1994.

STEELS, H.; BOND, C. J.; COLLINS, M. D.; ROBERTS, I.N.; STRATFORD, M.; JAMES, S. A. *Zygosaccharomyces lentus* sp. nov. a new member of the genus *Zygosaccharomyces* Barker. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, p. 319-327, January. 1999.

SUH, S. O.; KURTZMAN, C. P.; LACHANCE, M. A. Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. **Mycologia**, v. 98, p. 1006-1017. December, 2006.

SWOFFORD, D. PAUP* 4.0b8. **Phylogenetic Analysis Using Parsimony**. Sunderland: Sinauer, 2002.

TÓTH, G.; GÁSPAÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v. 10, p. 967-981. 2000.

VAN DER WALT, J. P.; JOHANNSEN, E. The genus *Torulaspota* Lindner. **CSIR Res Rep**, v. 325, p. 1-23. 1975.

VILA NOVA, M. X. Análise das leveduras da fermentação alcoólica em três alambiques com diferentes níveis de qualidade de produção de cachaça em Pernambuco. 2008. Tese. 118f. (Doutorado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

WALKER, G. M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. London: John Wiley and Sons Publishers, 1998. p. 250.

WEIR, B. S. *Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data*. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. p. 430.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In_____. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. London: Academic press, 1990. p. 315-322.

YANG, Z.; NIELSEN, R. Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 32 - 43, January. 2000.

YARROW, D. *Zygosaccharomyces* Barker. In_____. **The Yeasts - a Taxonomic Study**, 3 ed. Amsterdam: Elsevier, 1984. p.449- 465.

YARROW, D. Methods for the isolation and identification of yeasts. In _____.**The Yeasts, a Taxonomic Study**. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 77-100.

Sítios eletrônicos citados

BECH, A. L. Development of molecular probes for the identification yeasts in winemaking. **Food Science and Technology**. 2002. Disponível em: <http://www.gwrdc.com.au/Downloads/reports/2003%5CAFF%2001-01%20Ai%20Lin%20Beh.pdf>. Acesso em 10 de Dezembro de 2008.

FUGELSANG, K. C. *Zygosaccharomyces*: A Spoilage Yeast Isolated from Wine.1996. Disponível em: <http://cati.csufresno.edu/verc/rese/96/960804/index.html>. Acesso em 20 de novembro de 2008.

GUEROLA, P. M. Desarrollo Y Aplicación De Sistemas Rápidos Para La Detección, Identificación Y Caracterización De Levaduras Alterantes De Alimentos. 2006. Universitat De Valencia. **Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC)**. Disponível em: http://www.tesisexarxa.net/TESIS_UV/AVAILABLE/TDX-0521107-135145//martorell.pdf. Acesso em 10 de Dezembro de 2008.

APÊNDICES

MEIOS DE CULTURA (BARNETT; PAYNER; YARROW, 2000; ROSA; LACHANCE, 2005)

Extrato de Levedura, Peptona e Dextrose (YEPD)

Extrato de levedura1,0g
Peptona 2,0g
Glicose2,0g
Ágar.....2,0g
Água destilada.....100mL

O pH foi ajustado para 6.58.

Sabouraud

Glicose.....2,0g
Peptona.....1,0g
Extrato de levedura.....0,5g
Água destilada.....100mL

Yeast Nitrogen Base (YNB)

Yeast Nitrogen Base.....0,67g
Ágar.....2,0g
Água destilada.....100mL

Yeast Carbono Base (YCB)

Yeast Carbono Base.....1,17g
Ágar.....2,0g
Água destilada.....100mL

10% de NaCl

Glicose.....	5,0g
NaCl.....	10,0g
Peptona.....	1,0g
Extrato de levedura.....	0,5g
Água destilada.....	100mL

50% de glicose

Glicose.....	50,0g
Extrato de levedura.....	0,1g
Ágar.....	1,3g
Água destilada.....	50mL

Sem aminoácido e com ciclohexamida

Ciclohexamida	0,01g
Nitrogênio Levedura Base.....	0,67g
Glicose.....	10mL
Ágar.....	2,0g
Água destilada.....	90mL

1% Ácido acético

Glicose	10,0g
Peptona	1,0g
Extrato de levedura	1,0g
Ácido acético.....	1mL
Ágar	2,0g

Carbonato de Cálcio

Glicose.....	5,0g
Extrato de levedura.....	0,5g
Carbonato de Cálcio.....	0,5g
Água destilada.....	100mL

Meio mínimo de fermentação

Peptona.....	0,75g
Extrato de levedura.....	0,95g
Glicose.....	2,0g
Água destilada.....	100mL

Corn meal ágar (Ágar Farinha de Milho)

Fubá.....	12,5g
Ágar.....	3,80g
Água destilada.....	300mL

SOLUÇÕES E TAMPÕES**Solução Estoque de Tris 1M (Tris [Hidroximetil] Aminometano)**

Trizma base	24,2g
Água destilada	200mL

O pH foi ajustado para 8.0, a solução foi esterelizada e mantida a 4°C.

Solução de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio)

SDS	5,0g
Água destilada esterelizada	50,0mL

A solução foi mantida a temperatura ambiente.

Solução de NaCl 0,5M (Cloroeto de Sódio)

NaCl (..... 29,25g
Água destilada 100mL

A solução foi esterelizada e mantida a 4°C.

Solução Estoque de EDTA 0,5 M (Ácido Etileno Diamino Tetraacético)

EDTA 37,22g
Água destilada 200mL

O pH foi ajustado para 8.0, a solução foi esterelizada e mantida a 4°C.

Tampão Tris/EDTA (TE) pH 8,0

Tris-HCl 1M pH 8,0 1,0mL
EDTA 0,5 M pH 8,0 0,2mL
Água destilada 100mL

O tampão foi esterelizado e mantido a 4 °C.

Tampão Tris-Borato (TBE) 5X (p/ 1L)

Trizma base54,0g
Ácido bórico 27,5g
EDTA 0,5 M 20,0mL
Água destilada 1000mL

O pH foi ajustado para 8.0, o volume foi completado com água destilada para 1000mL e estocado a 4°C. No momento de uso, 100mL do tampão foi diluído em água deionizada esterilizada para obter uma concentração de 0,5X.

Tampão de Extração de DNA

Tris-HCl 1M pH 8,0 2,0mL
 EDTA 0,5M pH 8,0 0,5mL
 SDS 10% 1,0mL
 NaCl 5 M 0,5mL
 Água destilada esterelizada..... 6,0mL

O tampão foi preparado somente no momento de uso.

SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO VARIÁVEL D1/D2 DO GENE 26S DO ISOLADO SPC2(7)

GCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAG
 AAGCAACTTTGGGGCTGGTCCTTGTCTATGTTCTTGGAACAGGACGTCATGGA
 GGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGATCCCAGTTCTTTGTAAAGTGCTTTTCGACG
 AGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGC
 TAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAA
 GAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGGACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCAT
 TTGATCAGACATGGTGTGTTTGGCGACCCTCGCTCCTTGTGGGTGGGGATCTCGCA
 GTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGCGGCAGGATAAATCTTTGGGAATGTAGC
 TTTGCTTCGGGAAAGTGTTATAGCCAGGGGAATACTGCCAGCCGGGACTGAG
 GATTGCG

SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DO GENE 5.8S DO ISOLADO SPC2(7)

GCCCGAAGGTTACAAACACAAACAATTATTGTATTTTTATTTTAGTCAAGAATTTTT
 CGATTTTGAAAAAATATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATC
 GATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAAT
 CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTG
 TTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACTCTCGGGTTTGGTAGTGGGTGATACTCTTT
 CTGGGTAACTTGAAAATGCTGGCCATATGGCT