**COMPARAÇÃO DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS ATRAVÉS DE ELETROFORESE
DE PROTEÍNAS**

MÔNICA SOUBIHE

Bióloga

ORIENTADOR: Prof. Dr. FLAVIO CESAR ALMEIDA TAVARES

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia. Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Fevereiro - 1996

**COMPARAÇÃO DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS ATRAVÉS DE ELETROFORESE
DE PROTEÍNAS**

MÔNICA SOUBIHE

Aprovada em 15/08/96

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares ESALQ/USP

Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner ESALQ/USP

Prof. Dr. Ricardo Montalván Del Aguila Univ. Est. Londrina

Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

- Orientador -

Ao Cláudio,

com muito amor e carinho

DEDICO

Aos meus pais,

ROBERTO e YONE,

e irmãos,

PAULO, FÁBIO e DANIELA

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter-me concedido força e sabedoria para concluir este trabalho.

Ao Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares, pela orientação, incentivo e sobretudo pela compreensão e o carinho dispensados durante toda a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Rubens Zinsly, pelos ensinamentos e constante apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna, pela sua valiosa ajuda e pelos ensinamentos na execução deste trabalho.

A Janay Almeida dos Santos, de maneira especial, pelo apoio e grande amizade.

A Philomena Fioravante e Maria Aparecida Andrade Sampaio pela atenção e paciência em todos os momentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A Universidade de São Paulo e ao Departamento de Genética, pela oportunidade da realização do curso.

Aos docentes do Departamento de Genética, pelos ensinamentos.

Aos funcionários e colegas do laboratório de Genética de Leveduras, em especial a Ana Maria Brancalion Giacomelli, pela ajuda, apoio e pela sua grande amizade.

Aos funcionários do Departamento de Genética, com ênfase para Silvana, Aparecida Elisabeth, Oberdã, Fernando, Carmen e Vanderléia, por inúmeros favores.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação.

Aos demais amigos pelos bons momentos e incentivo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vii
SUMMARY.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Contaminações industriais e instabilidade do processo.....	4
2.2. Melhoramento genético de leveduras.....	8
2.3. Metodologias utilizadas na identificação e classificação sistemática de leveduras.....	9
2.3.1. Serologia	12
2.3.2. Conteúdo de bases nitrogenadas	13
2.3.3. Análise da parede celular por ressonância nuclear magnética	14
2.3.4. Análise do sistema de coenzima Q	15
2.3.5. Propriedades de ácidos graxos	15
2.3.6. Movimento de prótons e transporte de açúcares	16
2.3.7. Bioluminescência	17

	Página
2.3.8. Efeito inibitório de diferentes compostos .	18
2.3.9. Conteúdo de trealose	18
2.3.10. Propriedades genéticas modificáveis	19
2.4. Uso da eletroforese na identificação de leveduras	20
2.4.1. Metodologias	24
2.4.1.1. Fusão isoelétrica	24
2.4.1.2. Separação de cromossomos	24
2.4.1.3. Hibridização de DNA	28
2.4.1.4. Eletroforese de isoenzimas	30
2.4.1.5. Eletroforese de proteínas	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Linhagens	35
3.2. Meios de Cultura	35
3.2.1. Meio Completo	36
3.2.2. Meio de Fermentação	36
3.3. Soluções, Tampões e Reagentes	37
3.3.1. Solução de acrilamida/bis-acrilamida	37
3.3.2. Tampão do gel inferior	37
3.3.3. Tampão do gel superior	37
3.3.4. Solução SDS 10%	37
3.3.5. Solução de persulfato de amônio 10%	37
3.3.6. Tampão de corrida	38
3.3.7. Tampão de amostra	38

	Página
3.3.8. Tampão amostra desnaturante	38
3.3.9. Solução corante	38
3.3.10. Solução descorante	39
3.4. Procedimentos	39
3.4.1. Extração e preparo da proteína solúvel	39
3.4.2. Preparação da amostra desnaturada	40
3.4.3. Eletroforese SDS-PAGE	40
3.4.4. Leitura densitométrica dos géis	43
3.4.5. Análise estatística	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5. CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

COMPARAÇÃO DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS ATRAVÉS DE ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

Orientador: Flavio Cesar Almeida Tavares

Autor: Mônica Soubihe

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de comparar algumas linhagens de leveduras do gênero *Saccharomyces*, através de seus perfis proteicos. As semelhanças e as diferenças foram estudadas por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida.

Foram estudadas e comparadas 10 linhagens de leveduras, sendo cinco pertencentes as linhagens utilizadas na indústria alcooleira e cinco na indústria cervejeira. Estas fazem parte do estoque de linhagens do laboratório de microrganismos do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

A comparação foi feita através da análise de agrupamento das linhagens pelo método UPGMA, baseado no coeficiente de similaridade Simple Matching e Jaccard, resultando em um dendograma no qual visualiza-se a formação de três grupos distintos.

Com relação a indústria alcooleira, a linhagem M304-2C foi a que mais diferiu entre elas, apresentando um valor de similaridade na faixa de 93%, enquanto as outras

tiveram este valor estabelecido na faixa de 96%, para ambos índices de similaridade.

Na indústria cervejeira, as linhagens A e B, e C e E foram divididas em dois grupos, respectivamente, bastante semelhantes entre si. A linhagem D apresentou um valor de similaridade de 70% para ambos índices de similaridade, formando portanto um grupo distinto. Com base nestes resultados, foi possível comparar as linhagens industriais através da sua constituição proteica avaliada por meio da SDS-PAGE.

COMPARISON INDUSTRIAL YEASTS BY PROTEIN ELECTROPHORESIS

Orientador: Flavio Cesar Almeida Tavares

Autor: Mônica Soubihe

SUMMARY

This study aimed to compare some genus of yeast *Saccharomyces* by their proteic features. The differences and coincident patterns were resolved by poliacrylamide gel electrophoresis.

Among 10 strains that were studied and compared 5 belong to the alcohol industry and 5 to the brewery industry. They came from the Department of Genetics (ESALQ/USP) stocks.

The comparison was carried out by the grouping analysis using the UPGMA method, based on Simple Matching and Jaccard's similarity coefficient, which resulted in dendrogram that shows three distinct groups.

Related to the alcohol industry, the M304-2C strain show the most significant difference, with a similarity value of 93%, while the others showed values of 96%.

The brewery industrial strains were divided in two distinct groups, as (A, B) and (C,E), with a lot of similarities themselves. The strain D show a similarity value of 70%, which ended up making a isolated group. Under these results it was possible to compare the industrial strains by their proteic constitution.

1- INTRODUÇÃO

A contaminação dos inóculos por outras espécies microbianas nas indústrias alcooleira, cervejeira e mesmo na indústria vinícola é um problema indesejável e muitas vezes grave, pelo fato da multiplicação do organismo contaminante ser rápida, causando problemas desde o início do processo de fermentação.

Nas fermentações industriais é imprescindível manter a pureza dos inóculos para assegurar os níveis de produtividade e qualidade do produto. A identificação precoce de microrganismos contaminantes, em muitos casos, contribui para evitar perdas consideráveis.

O controle de bactérias em fermentações com fungos e leveduras é relativamente fácil. O controle torna-se difícil quando microrganismos contaminantes são filogeneticamente similares àqueles utilizados industrialmente. A contaminação por leveduras selvagens constitui-se, portanto, um problema para a produção de cervejas, vinhos e álcool combustível.

As várias metodologias empregadas atualmente para o estudo taxonômico de microrganismos são eficazes para a identificação de espécies contaminantes, contudo, em muitas situações, mais de um método se faz necessário para este fim, uma vez que os microrganismos dos processos fermentativos de produção de álcool são muito variados.

Com objetivos industriais de monitoração das populações contaminantes, ou do seu controle, tais metodologias por serem demoradas, impossibilitam a adoção de medidas em tempo de controlar surtos de contaminações. Na maioria dos casos, mesmo com a criteriosa avaliação dos inóculos de culturas puras, o trabalho de isolamento do organismo contaminante, etapa preliminar à identificação, torna-se pouco eficaz. No entanto, são de grande valia para as indústrias, uma vez que permite o conhecimento da flora microbiana ao longo das safras.

Estudos com o objetivo de conhecer a flora microbiana presente nas indústrias auxiliam na adoção de medidas preventivas, principalmente se for possível caracterizar o tipo de microrganismo, épocas e formas de contaminação. A análise da cultura pura com regularidade permite também avaliar a estabilidade genética ou a frequência de mutações espontâneas, contribuindo para melhor conhecer o microrganismo de interesse.

A análise de macromoléculas constitui-se em recurso atualmente imprescindível para o conhecimento das populações naturais. Entre estas, a análise de proteínas solúveis desnaturadas ou não, através da eletroforese em gel de poliacrilamida, evidencia padrões de polimorfismo proteico que permite distinguir organismos entre si e, em muitos casos, dentro da mesma espécie. O polimorfismo pode ser melhor caracterizado através das análises densitométricas dos perfis proteicos, o que confere maior precisão de análise. Por esta razão, e porque esta metodologia é relativamente rápida e de baixo custo, avaliamos neste trabalho sua aplicação na caracterização de leveduras isoladas do chope das principais indústrias cervejeira e de leveduras empregadas industrialmente para a produção de etanol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Contaminações industriais e instabilidade do processo

A fermentação etanólica é um processo bioquímico de produção de energia realizado por diferentes microrganismos, especialmente por leveduras do gênero *Saccharomyces*. As operações de fabricação de etanol estão sujeitas a vários problemas, incluindo aqueles de natureza microbiana. No Brasil, a indústria alcooleira utiliza o fermento de panificação como inóculo industrial, sendo frequente a ocorrência de microrganismos indesejáveis para o processo.

Em indústrias cervejeiras é prática comum o uso de leveduras selecionadas (STANBURY & WHITAKER, 1984), o que não impede a ocorrência de contaminantes e a degeneração de linhagens. Alterações fenotípicas comuns são a mudança no grau de floculação e capacidade de atenuação das leveduras.

Na indústria alcooleira, ao iniciar-se cada safra o levedo é submetido a um processo de multiplicação e revigoramento para se obter quantidades adequadas de massa celular, sendo portanto necessário o permanente monitoramento microbiológico para evitar contaminações (SILVA, 1994).

Conforme CAMPBELL (1987a), o inóculo isolado de equipamentos da indústria cervejeira e outras leveduras que aparecem no processo devido a chance de contaminação, podem não ser prejudiciais a fermentação.

Na linha de fermentação da usina de açúcar e álcool, procura-se manter as contaminações em níveis tais que sua influência seja desprezível na atividade fermentativa da levedura.

Diversos trabalhos tem sido realizados para se estudar as características e o comportamento das leveduras industriais, o qual pode ser influenciado por fatores genéticos e ambientais (HARRISON, 1971; FREDRICKSON, 1977).

Em geral, pode-se dizer que qualquer espécie de microrganismo pode vir a contaminar fermentações alcoólicas durante as operações de processamento, mas somente algumas espécies são capazes de nelas se desenvolverem (SHEHATA, 1960).

Segundo PHAFF *et al.* (1978), o desenvolvimento de microrganismos contaminantes de fermentação depende de vários fatores, como pH, falta de assepsia nos equipamentos, temperatura, etc.

Quanto as leveduras selvagens que contaminam no processo de fermentação alcoólica, TAVARES (1992) relata que inexistem medidas preventivas ou de controle desta contaminação e os métodos disponíveis, tais como, modificações de procedimentos operacionais e emprego de

antissépticos, são ineficazes para conter a proliferação das leveduras selvagens sem que seja afetado o fermento propagado.

FERRARI *et al.* (1980) compararam a eficiência industrial de diferentes leveduras utilizadas na produção de álcool no Brasil e concluíram que as leveduras selecionadas foram mais eficientes do que as leveduras selvagens.

Segundo VAN OEVELEN *et al.* (1977), os gêneros de leveduras que podem estar associados as selvagens nos processos de fermentação alcoólica são do gênero *Brettanomyces sp*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torulopsis* e *Dekkera*. BARNETT *et al.* (1983), incluem ainda os gêneros *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* e *Zigosaccharomyces*. Na vinicultura estudos recentes tem demonstrado que durante fermentações espontâneas, diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* estavam presentes e competiam umas com as outras, enquanto que, em fermentações induzidas somente a linhagem inoculada de *Saccharomyces cerevisiae* foi observada (SCHUTZ & GAFNER, 1993).

A eletroforese de DNA de alto peso molecular permite separar o DNA cromossômico de leveduras, sendo utilizada na caracterização de *Saccharomyces cerevisiae*.

Todavia, estas análises são insuficientes para descrever o comportamento das populações de leveduras do

vinho durante a fermentação e como interferem no processo de vinificação (SCHUTZ & GAFNER, 1994).

Como mostram os dados da literatura sobre o assunto (RODINI, 1985), uma variada microbiota bacteriana encontra-se normalmente presente no mosto, utilizado como matéria-prima para a produção de açúcar e álcool. Fatores como variações nas formas de colheita, terrenos muito variados, diferentes variedades de cana, condições climáticas muito oscilantes, pragas e doenças, tipo de transporte, armazenamento, tempo decorrido entre o corte da cana e o seu processamento na usina, estado da matéria-prima ao dar entrada na usina (limpa, suja, molhada, seca, queimada, nova, velha, deteriorada, com raízes, perfurada por insetos, etc.) contribuem significativamente no número de microrganismos na cana-de-açúcar.

As bactérias participam ativamente na deterioração da cana colhida, introduzem no processo produtos de metabolismo indesejáveis, provocam a floculação e perda do fermento nas centrífugas, consomem a sacarose e outros nutrientes do mosto destinados as leveduras, entre outros inconvenientes, que somados podem levar a perdas no rendimento alcoólico da fermentação (GALLO, 1992).

Segundo AMORIM & OLIVEIRA (1982), os gêneros das bactérias contaminantes mais atuantes na fermentação alcoólica são *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*.

Pode ocorrer também a formação de uma película superficial, devido a contaminação por *Pichia* e *Candida*, alterações no sabor e aroma, devido a produção de ácidos, particularmente por *Brettanomyces* (OLIVEIRA, 1987).

Existem disponíveis no mercado antimicrobianos potencialmente redutores da flora característica do processo de fermentação alcoólica. Entretanto poucos trabalhos tem sido feitos no sentido de avaliar esses produtos (ANDRIETTA *et al.*, 1995).

Segundo TAVARES (1985), o problema da contaminação microbiana pode ser minimizado através da utilização de leveduras especiais, geneticamente melhoradas. Uma possibilidade interessante é obter leveduras de alto potencial fermentativo, portadoras do caráter "killer" produtora de uma toxina que elimina leveduras sensíveis.

2.2. Melhoramento genético de leveduras

A levedura como os demais seres vivos, pode ser trabalhada geneticamente para melhorar sua produtividade, rendimento e outras particularidades. Segundo MENEZES (1989), os passos iniciais para o controle e aperfeiçoamento consciente dos agentes de bioconversão foram dados há pouco mais de cem anos, quando fungos e bactérias foram isolados e desenvolvidos em culturas puras,

tornando possível selecionar linhagens úteis a uma finalidade desejada.

2.3. Metodologias utilizadas na identificação e classificação sistemática de leveduras

Segundo KREGER-VAN-RIJ (1987) as metodologias aplicadas a identificação de leveduras envolvem procedimentos como o isolamento do ambiente, determinação de propriedades morfológicas e fisiológicas, descrição e comparação com organismos padrão e ocasionalmente, avaliação de propriedades tecnológicas. O conjunto de dados obtidos, obedecendo rigorosamente a protocolos padronizados, resulta na identificação e posicionamento taxonômico da levedura.

Devido as limitações metodológicas, multiplicaram-se os sistemas de identificação, nenhum ideal, onde os métodos compreendem desde simples observações visuais e testes bioquímicos padrão (EGUCHI *et al.*, 1991), até o uso de técnicas sofisticadas.

As leveduras utilizadas industrialmente pertencem, em geral, a *Saccharomyces cerevisiae* ou espécies relacionadas, o que limita as possibilidades de utilização dos sistemas tradicionais de identificação de leveduras baseadas em padrões morfológicos ou capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

Técnicas de análise serológica, eletroforeses proteicas e polimorfismos de DNA tem sido utilizadas com sucesso na identificação e caracterização de leveduras industriais aplicadas à produção de vinhos, cervejas, panificação e destilados.

As análises proteicas e isoenzimáticas apresentam um grande potencial para a identificação de genótipos de *Saccharomyces*, possibilitando o acompanhamento das linhagens durante o processo, estimativa da estabilidade genética das linhagens e outros parâmetros. É fundamental manter condições constantes nas avaliações por serem caracteres fenotípicos e, portanto, influenciados pelo ambiente (TAVARES et al., 1992).

Conforme o número e tipos de enzimas estudados, pode-se determinar com precisão resultados sobre a composição genética do material estudado, o que é raramente possível através da análise de caracteres morfológicos.

Uma outra vantagem significativa é que comparações são feitas com enzimas que geralmente estão sempre presentes (com exceção daquelas seletivamente extraídas ou desviadas durante o desenvolvimento) e são pouco influenciadas por fatores ambientais.

Um problema difícil para a sistemática é que, mesmo para aquelas enzimas examinadas, grandes alterações na composição de aminoácidos são necessárias para causar mudanças na mobilidade eletroforética (SHAW, 1970). Também

verifica-se que aloenzimas com mobilidades eletroforéticas idênticas podem não apresentar sequências idênticas de aminoácidos. De fato, estudos recentes utilizando sequenciamento de aminoácidos (BOYER et al., 1972), desnaturação térmica (BERNSTEIN et al., 1973; SINGH et al., 1974) e variação no tamanho do poro do gel (JOHNSON, 1976) sugere que uma única classe de mobilidade no gel pode, algumas vezes, conter mais que uma enzima. Isto significa que mais peso é dado para evidenciar diferenças eletroforéticas do que evidências de similaridade. De qualquer maneira, testes bioquímicos adicionais estão disponíveis para determinar se aloenzimas com a mesma mobilidade tem diferentes sequências de aminoácidos.

BARNETT (1992) revisou a taxonomia do gênero *Saccharomyces*. Utilizando o critério de reassociação de DNA nuclear de diferentes linhagens, considerou aqueles com cerca de 80 a 100% de sequências de base em comum como pertencentes à mesma espécie. Todavia, embora o alto grau de homologia do DNA de duas linhagens possa indicar um estreito relacionamento ancestral, valores baixos para esta homologia são provavelmente mais difíceis de interpretar. Baseados em dados de hibridização de DNA entre 24 linhagens associadas com vinho e cerveja, VAUGHAN-MARTINI & KURTZMAN (1988), propuseram que estas poderiam ser divididas em 3 grupos distintos, os quais designaram *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus* e *S. pastorianus*, nesta última

espécie incluindo-se *S. carlsbergensis*. Os resultados dos estudos de reassociação de DNA tem dado suporte para considerar como espécies separadas *Saccharomyces castellii*, *S. dairensis*, *S. exiguus*, *S. servazzii* e *S. unisporus*.

A escolha de um método como uma medida de controle de qualidade dentro da indústria cervejeira dependerá dos requerimentos específicos de uso. Em circunstâncias onde apenas umas poucas linhagens necessitam ser diferenciadas, o uso de, pelo menos, um dos métodos pode ser bastante benéfico (MEADEN, 1990).

Segundo SIMPSON et al. (1992) para as muitas aplicações rotineiras, são mais apropriados métodos simples, os quais podem ser utilizados em todos os laboratórios.

2.3.1. Serologia

Os microrganismos são fáceis de se distinguir com base apenas nas propriedades morfológicas e suas características antigênicas são usadas como um critério adicional as propriedades morfológicas e bioquímicas (TSUCHIYA et al., 1965).

YUKAMA & OHTA (1928 e 1929), BENHAM (1931) e vários outros pesquisadores indicaram as características serológicas como critério na diferenciação de várias espécies de leveduras. Entretanto, estas informações foram

tomadas apenas como complemento para a diferenciação de leveduras e não usadas satisfatoriamente para a classificação, principalmente pelas informações incompletas das análises antigênicas de todas as leveduras conhecidas.

TSUCHIYA *et al.* (1961, 1965), CAMPBELL & ALLAN (1964) e CAMPBELL & BRUDZYNSKI (1966) demonstraram muitas diferenças serológicas entre espécies de *Saccharomyces*.

2.3.2. Conteúdo de bases nitrogenadas

NAKASE & KOMAGATA (1971) determinaram a composição de base do DNA (conteúdo GC) de 84 culturas de *Saccharomyces* e leveduras relacionadas. Esta característica foi considerada como uma das muitas características utilizadas para esclarecer relações taxonômicas e filogenéticas entre microrganismos.

O uso do conteúdo de guanina e citosina (G+C) foi quase que imediatamente difundido para a determinação da sequência complementar do DNA nuclear usando um dos diversos métodos de reassociação do DNA (KURTZMAN *et al.*, 1983). Isto, muitas vezes, conduz à rejeição de espécies as quais tem sido separadas por taxonomia convencional com base nos poucos caracteres fenotípicos (VAUGHAN-MARTINI *et al.*, 1993).

VAUGHAN-MARTINI *et al.* (1993) descreveram o estudo comparativo de macromoléculas celulares como sendo de grande impacto na sistemática de leveduras.

ROSINI *et al.* (1982) classificaram linhagens pertencentes a cinco espécies do gênero *Saccharomyces* associadas a indústria vinícola através da composição de base do DNA e reassociação DNA-DNA. Entre os resultados obtidos neste trabalho, nove espécies de *Saccharomyces cerevisiae* eram anteriormente denominadas *Saccharomyces bayanus*.

Segundo os autores, as principais causas de variação nas leveduras utilizadas eram a avaliação errônea de caracteres taxonômicos e variações nos padrões fermentativos.

2.3.3. Análise da parede celular por ressonância nuclear magnética

GORIN *et al.* (1968) utilizaram primeiramente esta técnica da análise da parede celular por ressonância nuclear magnética para distinguir as estruturas químicas de leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados dos diversos experimentos indicaram que a estrutura dos polissacarídeos contendo manose da parede celular da levedura não são realmente susceptíveis a mudanças.

As similaridades nas estruturas químicas podem significar, do ponto de vista filogenético, que as leveduras analisadas estão relacionadas (GORIN & SPENCER, 1970).

Os autores concluíram que esta análise pode ser utilizada como um auxílio na classificação de espécies que produzem polissacarídeos contendo manose.

2.3.4. Análise do sistema de coenzima Q

YAMADA *et al.* (1976) analisaram através do sistema de coenzima Q 131 culturas dos gêneros *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Endomycopsis* e *Saccharomycopsis*. O gênero *Debaryomyces* foi dividido em dois grupos, o gênero *Endomycopsis* representou três tipos de sistema de coenzima Q e os gêneros restantes também foram agrupados e divididos segundo discussões feitas sob o ponto de vista taxonômico, especialmente nas leveduras e fungos possuindo o mesmo sistema de coenzima Q encontrado nos gêneros *Hansenula* e *Pichia*.

2.3.5. Propriedades de ácidos graxos

Com base na classificação de microrganismos dentro de gênero e espécie, ABEL *et al.* (1963) propuseram a determinação da composição de ácidos graxos por

cromatografia gasosa-líquida, devido ser um método que consome menos tempo em relação aos testes realizados em laboratórios convencionais.

KOCH *et al.* (1986) recomendaram a estimativa dos perfis de ácidos graxos como uma alternativa rápida e segura, com o objetivo de distinguir espécies de *Saccharomyces* em cultura sob condições padrão, para diferenciar entre várias espécies e linhagens (TREDoux *et al.*, 1987; AUGUSTYN & KOCH, 1989; AUGUSTYN *et al.*, 1990).

BENDOvÁ *et al.* (1991) determinaram a composição de ácidos graxos de 20 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo estas linhagens de laboratório e industriais (leveduras de cervejaria, de destilaria e de vinho), e concluíram que grupos de linhagens individuais diferiram em seus perfis de ácidos graxos.

2.3.6. Movimento de prótons e transporte de açúcares

KILIAN *et al.* (1991) analisaram 21 linhagens de leveduras representando as espécies do gênero *Kluyveromyces* através do movimento de prótons para o transporte de glucose, galactose, frutose, rafinose e sucrose. O movimento simultâneo de prótons para um ou mais açúcares ocorreu em 57% das linhagens.

Este mecanismo não tem sido analisado como um possível auxílio nos estudos taxonômicos, embora a habilidade em se utilizar diversas formas de açúcares seja considerada parte integral na classificação e taxonomia de leveduras (VAN DER WALT & YARROW, 1984).

KILIAN *et al.* (1991) demonstraram que foi possível a distinção das linhagens de *Kluyveromyces* entre subgrupos taxonômicos do mesmo gênero, contudo outras investigações poderiam ser feitas como a padronização das condições de cultivo, preparo da célula e detecção da alcalinização. Assim, outras linhagens e outros açúcares poderiam ser analisados para se estabelecer uma aplicabilidade geral desta técnica.

2.3.7. Bioluminescência

MILLER & GALSTON (1989) utilizaram a bioluminescência como um método de detecção de organismos contaminantes em cervejas enlatadas, necessitando de dois a três dias no caso das leveduras e cinco a sete dias para lactobacilos. Testes simples e baratos de esterilidade baseados na bioluminescência tem sido desenvolvidos para detectar em um dia, em meios líquidos, um pequeno número de leveduras e três dias lactobacilos em condições normais e de estresse pelo calor.

A bioluminescência não dá informação quanto ao tipo de organismo detectado, e o método encontra outras limitações devido a falta de reagentes e altos custos. Contudo, os problemas tem sido superados atualmente com o barateamento dos custos, sendo considerado amplo o potencial de aplicação dentro da indústria cervejeira.

2.3.8. Efeito inibitório de diferentes compostos

A sensibilidade de diferentes linhagens de leveduras a efeitos de coloração e antibióticos foi explorada por SOBZAK (1985) com o propósito de diferenciar leveduras importantes na medicina.

Na diferenciação de leveduras de cervejaria foi utilizado o teste de difusão em disco, que é um método simples e seguro. Entretanto, diversas linhagens não cervejeiras também tem sido examinadas por este método (SIMPSON *et al.*, 1992). Para tanto, se basearam em dois critérios: a aparência e o tamanho das zonas de inibição ao redor das várias substâncias antimicrobiais (cicloheximida, brometo de etídio, verde Janus, entre outras).

2.3.9. Conteúdo de trealose

Trealose é um importante carboidrato de reserva das células vegetativas e esporos de fungos e parece estar

associada com períodos de reduzida taxa de crescimento (THEVELEIN, 1984).

É conhecida a importância da trealose para a manutenção da viabilidade das leveduras (SUOMALAINEN & PFAFFLI, 1961), sendo demonstrado por LILLIE & PRINGLE (1980) que durante prolongado jejum, a sobrevivência da célula da levedura depende do nível de trealose.

GUTTIERREZ (1990) comparou os efeitos de diversos fatores como temperatura, pH, concentração de sacarose, 2,4-dinitrofenol e fontes de nitrogênio sobre a produção de trealose em *Saccharomyces uvarum* (IZ-1904) e *Saccharomyces cerevisiae* (M-300-A e de panificação) durante a fermentação alcoólica.

2.3.10. Propriedades genéticas modificáveis

Segundo THORNTON & BUNKER (1989), as culturas puras de leveduras de vinho são taxonomicamente classificadas como pertencentes a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, mas elas diferem significativamente nas suas propriedades de fabricação de vinho. As características das leveduras, as quais podem afetar a fabricação do vinho incluem produção de ácido sulfídrico, floculação, resistência ao cobre, produção de aromas fenólicos e capacidade "killer" (linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que produzem uma proteína tóxica letal para as linhagens sensíveis). Estas

causam prejuízo na qualidade do vinho e demora para o início da fermentação, sendo que o uso de leveduras “killer” na fabricação de vinho está ainda sujeito a controvérsia. Entre 48 linhagens concluíram que apenas duas não apresentaram estas características.

2.4. Uso da eletroforese na identificação de leveduras

A eletroforese é uma técnica utilizada para separar quantitativamente os componentes de uma mistura de várias espécies iônicas. Em um campo elétrico unidirecional cada íon migra isoladamente em direção ao polo de sinal de carga oposto sem modificação de sua estrutura e de suas propriedades (HOXTER, 1988).

A separação de diferentes espécies iônicas se processa dentro de um líquido tamponado com pH constante. Deste modo, a eletroforese serve para caracterizar uma substância pela comparação de sua mobilidade eletroforética em relação a um padrão, verificar a pureza de um produto pela ausência de contaminantes iônicos de mobilidades diferentes e também para determinar as concentrações relativas dos componentes iônicos de uma mistura.

SMITHIES (1955) introduziu o amido como suporte para eletroforese. Um novo progresso nas técnicas de separação foi a introdução da eletroforese em gel de

poliacrilamida, desenvolvida independentemente por RAYMOND & WEINTRAUB (1959) e por ORNSTEIN & DAVIS (1964).

Segundo BALDINI (1981), os primeiros usaram placas de gel de acrilamida e técnicas semelhantes ao procedimento em gel de amido, enquanto ORNSTEIN & DAVIS desenvolveram a eletroforese de disco.

Em contraste com o gel de amido e ágar, o gel de poliacrilamida é quimicamente inerte, não iônico, termoestável, transparente, resistente, variável quanto à porosidade e não reage com agentes colorimétricos. A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) tem alta resolução, economia e pode ser alterada e adaptada aos problemas particulares de cada separação. Portanto, o gel de poliacrilamida é mais versátil do que o gel de amido por sua capacidade de produzir tamanhos de poros necessários para separação de diversas substâncias biológicas (CASTRO, 1988).

A preparação dos géis de acrilamida é feita em água ou em solução tamponada pela dissolução de monômeros de acrilamida e um agente polimerizante, N, N'-metileno-bis-acrilamida (Bis), sob a ação iniciadora catalítica do íon persulfato de amônio, ativado pela amina terciária N-N-N'-N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) que visa à aceleração química do processo de formação do gel. O polímero de acrilamida forma longas moléculas lineares, mas a incorporação em intervalos regulares da bis-acrilamida,

introduz ligações cruzadas entre os polímeros. As distâncias entre essas ligações cruzadas são determinadas pela concentração da bis-acrilamida em relação ao total de monômeros, também chamadas de concentração do gel. O azul de bromofenol é usado opcionalmente como corante indicador da corrida eletroforética e migra livremente à frente das bandas de proteínas (MONTALVÁN del AGUILA, 1990).

Eletroforeses em géis de poliacrilamida de proteínas celulares são usadas amplamente para a classificação e identificação de microrganismos (KERSTERS & DE LEY, 1975), sendo o uso do dissociante sódio duodecil sulfato (SDS) em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) ocupa um lugar relevante nesses trabalhos de caracterização (MONTALVÁN del AGUILA, 1990).

SHAPIRO *et al.* (1967) relataram que a separação de proteínas em gel de poliacrilamida na presença do detergente iônico SDS é dependente do peso molecular de suas cadeias polipeptídicas; isto resulta na utilização desse detergente associado à eletroforese com bastante eficácia nos estudos de uma grande variedade de proteínas.

Esse detergente permite uma maior resolução das bandas, tornando possível a avaliação qualitativa (ausência/presença) e quantitativa (diferenças de concentração) dos polipeptídeos existentes numa amostra (CARRARO, 1990).

Usualmente, os padrões de bandamento proteico são comparados visualmente. SOKAL & SNEATH (1963) sugeriram que padrões proteicos podem ser apropriados por análises numéricas quantitativas. Uma análise computadorizada desenvolvida por WHITNEY *et al.* (1968) consistiu na identificação de bandas homólogas e cálculo em porcentagem de valores similares.

Métodos mais aperfeiçoados para identificação e agrupamento de bactérias por eletroforeses em géis de poliacrilamida foram descritos por KERSTERS & DE LEY (1975). Alguns dos fatores afetando a reprodutibilidade de dados foram as condições de crescimento, tempo e velocidade de centrifugação dos extratos e condições eletroforéticas. Padrões proteicos foram comparados por coeficientes de correlação de perfis densitométricos normalizados e os agrupamentos de linhagens, pelo método não ponderado de médias de grupos pareados. Como modelo, foram usadas as bactérias *Agrobacterium* e *Zymomonas* devido as grandes diferenças entre elas. A concordância com os resultados dos agrupamentos de ambos testes fenotípicos ou hibridização DNA:DNA foram excelentes.

KERSTERS & DE LEY (1980) usaram com sucesso o padrão eletroforético proteico para distinguir linhagens dentro de mesmas espécies bacterianas.

2.4.1. Metodologias

2.4.1.1. Fusão isoelétrica

Segundo DRAWERT & BEDNAR (1983), a fusão isoelétrica em géis cilíndricos de poliacrilamida foi usada para determinar as proteínas solúveis em água de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. bayanus*, *S. rouxii*, *S. acetii* e sete linhagens de espécies de *S. cerevisiae* Hansen. Os resultados indicaram íntimas relações entre algumas espécies (*S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. bayanus*) tal como as diferenças entre *S. rouxii* e *S. acetii*, e entre as sete linhagens de espécies de *S. cerevisiae* Hansen não houve diferenças significativas.

Dissimilaridades de padrões proteicos entre células de procariotos e eucariotos tem sido mostrados com o uso de fusão isoelétrica e portanto útil nas identificações taxonômicas (DRAWERT & BEDNAR, 1979).

As investigações com vários gêneros de leveduras mostraram que a sistemática de linhagens intimamente relacionadas apresenta padrões proteicos similares.

2.4.1.2. Separação de cromossomos

A determinação do tamanho e do número de cromossomos por separação eletroforética de DNA

cromossômico em gel de agarose denomina-se de cariótipo eletroforético (SCHWARTZ & CANTOR, 1984; CARLE & OLSEN, 1985).

As várias técnicas aplicadas para a separação de macromoléculas, conhecidas como PFGE ("pulsed field gel electrophoresis") tem sido comum em muitos laboratórios.

Diferentes equipamentos estão sendo usados, utilizando orientações variáveis no campo elétrico pulsado, sendo alguns dos mais conhecidos como OFAGE ("orthogonal field alternation gel electrophoresis"), FIGE ("field inversion gel electrophoresis"), CHEF ("contour-clamped homogeneous electric fields electrophoresis") e TAFE ("transverse alternating field electrophoresis").

RANK & CASEY (1988) evidenciaram a utilidade do cariótipo eletroforético para identificação e controle de qualidade de leveduras industriais. Foi aplicada o método CHEF, com separação satisfatória dos cromossomos de leveduras industriais. Os autores concluíram que a CHEF pode ser usada para produzir árvores genealógicas, determinação da estabilidade da linhagem e possibilidade de ajudar a localizar mudanças cromossômicas relacionadas a um fenótipo em particular. O método foi considerado importante no controle de qualidade e o melhoramento das leveduras de cervejaria. Contudo, os autores tem aceito melhor as separações por TAFE, para rápida identificação de

diferentes tipos de leveduras *Saccharomyces*, e também, de linhagens dentro de espécies de leveduras.

SHEEHAN & WEISS (1991) afirmaram que para se examinar a estabilidade das leveduras de cervejaria, identificar e distinguir diferentes linhagens, tem sido demonstrada a eficácia do estudo dos perfis cromossômicos. A estabilidade e a pureza das linhagens de leveduras é de particular importância para a indústria cervejeira, pois suas características afetam, além do sabor e aroma da cerveja, o tempo necessário a fermentação e floculação. Dentro da cervejaria, variação nos estoques de levedura podem acarretar na variação da fermentação e problemas na reprodutibilidade do sabor.

NAUMOV et al. (1992) citam as várias formas de eletroforeses em gel de campo pulsado para estudo de DNA cromossômico intacto de microrganismos eucariotos como um meio importante na elucidação da organização, evolução e sistemática de genomas eucariotos.

O cariótipo tem sido extensivamente aplicado para diferenciação de leveduras de cervejaria e de fermentação industrial (PEDERSEN, 1986; JOHNSTON & MORTIMER, 1986), embora a interpretação clara dos dados tenha sido difícil devido a qualidade inferior dos equipamentos e os métodos de extração inicialmente usados.

Com o aperfeiçoamento dos equipamentos e melhor preparação de amostras de DNA conclui-se que, o cariótipo

eletroforético representa um método relativamente simples para o "fingerprinting" de linhagens específicas de *Saccharomyces cerevisiae* usadas em fermentações industriais (VAUGHAN-MARTINI *et al.*, 1993).

SCHUTZ & GAFNER (1994) demonstraram que há uma sucessão de diferentes linhagens na população de leveduras no mosto de uvas brancas e vermelhas nas safras de vinho de 1991 e 1992, através de testes fisiológicos e cariótipo eletroforético, ao longo do processo de fermentação. Com o aumento da concentração de etanol causado pelas leveduras com alta atividade fermentativa, as espécies *Saccharomyces cerevisiae* começam a predominar.

Atualmente, este procedimento vem sendo aplicado em espécies de diferentes gêneros de leveduras, onde foi observado variação na posição e número de bandas cromossômicas entre espécies, além dos polimorfismos presentes entre linhagens da mesma espécie (DE JONGE *et al.*, 1987; JOHNSTON *et al.*, 1988, 1989; MILLER *et al.*, 1989; KANEKO *et al.*, 1989).

VAUGHAN-MARTINI & MARTINI (1992) analisaram o valor do bandamento cromossômico como um método taxonômico para a separação de espécies do gênero *Saccharomyces* Meyen ex Hansen, onde todas as linhagens estudadas tem sido definidas por comparações de complementariedades da sequência de DNA. Concluiu-se que, em vista dos resultados obtidos, parece evidente que o cariótipo nunca substituirá

comparações da sequência de base do DNA em taxonomia de leveduras, embora o cariótipo incontestavelmente seja um atributo importante.

É esperado que a integração do cariótipo, genética, sistemática e experimentos de hibridização de DNA contribua para um melhor entendimento dos mecanismos de diversificação cromossômica e dos processos de especiação (TÖRÖK & KING, 1992).

2.4.1.3. Hibridização de DNA

Os microbiologistas das indústrias cervejeiras são constantemente obrigados a identificar leveduras (SIMPSON *et al.*, 1992). Há necessidade de se diferenciar linhagens na cervejaria ou pode ser um meio para identificar uma fonte recorrente de contaminação de levedura selvagem.

Uma recente aplicação da biologia molecular tem sido o desenvolvimento de técnicas de DNA "fingerprinting". Na indústria cervejeira, este método propõe uma nova abordagem para o problema de diferenciação de linhagens de cervejaria com propriedades similares (MEADEN, 1990).

Métodos tradicionais para distinguir linhagens de leveduras de cervejaria tem se baseado em critérios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos.

Culturas de leveduras utilizadas nas indústrias de bebidas alcóolicas são normalmente caracterizadas por

morfologia da célula e da colônia, testes fisiológicos e habilidade para flocular ou formar película (KUNKEE & AMERINE, 1970).

Estes procedimentos taxonômicos permitem a distinção entre espécies, mas não são universalmente adaptados para diferenciação entre linhagens da mesma espécie, sendo pouco confiáveis e também ultrapassados. Além disso, fica claro que muitas das características fisiológicas e bioquímicas utilizadas para identificação são codificadas por uma porção pequena do genoma (VAN DER WESTHUIZEN & PRETORIUS, 1992).

Neste caso, o termo DNA "fingerprinting" é utilizado para descrever algum método de análise de DNA que diferencie duas ou mais linhagens de leveduras, fornecendo um perfil único do DNA de um dado organismo. A clonagem ao acaso de fragmentos de DNA de diferentes linhagens de cervejaria e o uso destas sequências como sondas podem auxiliar neste método (MEADEN, 1990).

SEEHAUS *et al.* (1985) sugeriram o uso de sondas de genes específicos como métodos na taxonomia de leveduras.

VAN VUUREN & VAN DER MEER (1987) trabalharam com proteínas celulares totais solúveis de 27 linhagens de *Saccharomyces* utilizadas para produção comercial de vinho e 2 linhagens para fermentações de cerveja. As linhagens foram submetidas a eletroforeses em géis de poliacrilamida e o padrão de bandamento proteico foi utilizado para o

"fingerprinting" das linhagens. Diferentes grupos genéticos de *Saccharomyces cerevisiae* foram distinguidos. Os padrões proteicos das linhagens dentro de cada grupo foram idênticos, confirmando que linhagens de *S. bayanus*, *S. uvarum* e *S. carlsbergensis* são "sinônimos" de *S. cerevisiae*.

Com os métodos tradicionais de fermentação de vinho não há muita necessidade em manipular as linhagens de leveduras. Todavia, novas tendências no mercado de bebida demandam a modificação das linhagens tradicionais de leveduras de vinho e o desenvolvimento de práticas mais eficazes.

Neste sentido, VAN DER WESTHUIZEN & PRETORIUS (1992) utilizaram padrões de bandamento eletroforético de proteínas celulares totais solúveis, fragmentos de restrição de DNA e DNA cromossômico para caracterizar 10 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* usadas para produção comercial de vinho.

2.4.1.4. Eletroforese de isoenzimas

A análise de uma única eletroforese pode simultaneamente detectar um número de enzimas catalizando a mesma reação. Uma grande parte da metodologia tem sido desenvolvida para estudar diferenças entre populações, onde

as aplicações do método tem mudado profundamente a visão a respeito da estrutura genética de populações (NEI, 1975).

A eletroforese também tem sido usada na identificação das diferenças qualitativas na constituição da enzima entre condições aeróbicas e anaeróbicas em plantas e certos fungos (SCANDALIOS, 1974). Os métodos se mostraram promissores no estudo das leveduras, tanto por fornecerem muita informação na constituição da enzima de crescimento como para diferentes intensidades de aeração, concentração de alimento e concentração alcóolica.

O método também pode ter aplicações como um suporte para determinações de enzimas qualitativas ou no controle de qualidade industrial (SAURA *et al.*, 1979).

Os autores propõem ser a eletroforese de isoenzimas um método promissor na obtenção rápida de informações sobre muitas enzimas de leveduras de um grande número de amostras. Outros métodos de análise eletroforética tem encontrado ampla aplicação na taxonomia, na caracterização de linhagens de leveduras selvagens.

Segundo SUBDEN *et al.* (1982), a análise eletroforética de 3 isoenzimas desidrogenases e 2 redutases foram caracterizadas em 18 linhagens de leveduras. O polimorfismo gênico foi notado nas cinco atividades isoenzimáticas. Baseado na homologia de padrões de bandamento, dois grupos principais de linhagens de

leveduras foram identificados. Nenhuma das duas linhagens de leveduras tinham padrões de bandamento idênticos.

YAMAZAKI, *et al.* (1983) estudaram as relações taxonômicas entre 36 linhagens de 17 espécies de *Saccharomyces* comparando eletroforeticamente 10 isoenzimas. Os autores constataram que a comparação eletroforética de enzimas foi uma poderosa ferramenta para esclarecer relações taxonômicas entre leveduras de vinho e outras relacionadas.

TAVARES *et al.* (1992) analisaram as leveduras importantes industrialmente na produção de álcool no Brasil através de padrões eletroforéticos de isoenzimas, proteínas totais e proteínas totais desnaturadas, e observaram variável polimorfismo.

2.4.1.5. Eletroforese de proteínas

Segundo AIKEN & GARDINER (1991), SDS-PAGE pode ser usada para caracterizar os perfis de bandamento proteico de sementes de várias espécies e cultivares de *Festuca*. Pode-se também comparar cultivares que crescem em diferentes partes do mundo e os resultados são relativamente independentes das condições de crescimento, sendo as diferenças mais quantitativas do que qualitativas.

Os problemas taxonômicos tem sido elucidados em vários gêneros de gramíneas através de padrões de

bandamento eletroforético de proteínas de semente, tendo funções enzimáticas ou de estocagem (LADIZINSKY & HYMOWITZ, 1979; VILLAMIL *et al.*, 1982; VAUGHAN, 1983; BULINSKA-RADOMSKA & LESTER, 1985, 1986). As populações nativas são mais difíceis de se trabalhar do que as comerciais, devido talvez as diferenças na maturação da semente.

Embora o método tenha sido amplamente utilizado para identificação de cultivares (COOKE, 1984), o mesmo vem sendo muito pouco utilizado na taxonomia.

Segundo ECHEVERRIGARAY *et al.* (1993), métodos convencionais usados para identificar diferentes cultivares de plantas e para avaliar a relação genética entre genótipos são baseados em caracteres morfológicos, os quais podem muitas vezes ser influenciados pelo ambiente nos quais a planta está crescendo. Nos últimos 25 anos estes métodos tradicionais tem sido enriquecidos pela utilização de caracteres fisiológicos e bioquímicos.

A comparação e análise de perfis eletroforéticos de proteínas de semente estocada e proteína total tem sido usada para inferir o relacionamento entre espécies (BOULTER *et al.*, 1970; DERBYSHIRE *et al.*, 1976; CRAWFORD, 1990) e entre genótipos dentro de espécies em importantes culturas, tais como arroz (SIDDIQ *et al.*, 1972; SARKAR & BOSE, 1984), milho (SMITH & LESTER, 1980), ervilha (LADIZINSKY & WAINES, 1982), sorgo (SHECHTER & DE WET, 1975), lentilha (LADIZINSKY, 1979) e mandioca (GRATTAPAGLIA *et al.*, 1987).

TAVARES *et al.* (1992) procuraram selecionar técnicas que garantissem a identificação adequada de leveduras aos objetivos da indústria alcooleira e concluíram que a eletroforese de proteínas totais e proteínas totais desnaturadas em gel de poliacrilamida foram eficazes na identificação.

EL-SHARKAWY & HUISINGH (1971) utilizaram SDS-PAGE na diferenciação entre espécies de *Xanthomonas* as quais até então tinham sido identificadas apenas por sua patogenicidade específica.

VAN ZYL & STEYN (1990) utilizaram SDS-PAGE para diferenciar espécies de *Pseudomonas* e *Xanthomonas*.

Segundo VAUTERIN *et al.* (1991) SDS-PAGE de proteína se mostrou como sendo um método valioso na identificação de *Xanthomonas* desconhecidas e, mais tarde, permitiu a diferenciação entre as espécies existentes.

Nos experimentos relatados, muitas espécies mostraram múltiplas formas de enzimas e os padrões eletroforéticos proteicos foram, em geral, idênticos para todos os isolados de mesma espécie, mas desiguais para espécies diferentes.

Padrões proteicos mostraram-se vantajosos para a diferenciação de vários fungos (DURBIN, 1966; CLARE *et al.*, 1968; HALL *et al.*, 1969), de actinomicetos (GOTTLIEB & HEPDEN, 1966), de nematóides (BENTON & MYERS, 1966; DICKSON *et al.*, 1967) e de bactéria (CANN & WILLOX, 1965; LUND, 1965; ROBINSON, 1966).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens

No presente trabalho foram analisadas algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* empregadas industrialmente na produção de álcool no Brasil, as leveduras da panificação Fleischmann e Itaiquara, a levedura IZ-1904 fornecida pelo Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da ESALQ, e as leveduras M304-2C e M300A obtidas no Departamento de Genética da ESALQ. Analisaram-se também algumas leveduras de cervejaria, isoladas do produto comercial no Laboratório de Genética de Leveduras, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-USP, denominadas A, B, C, D e E.

3.2. Meios de Cultura

Os meios abaixo relacionados foram utilizados neste trabalho para a manutenção da cultura e multiplicação das células, preparo de inóculo nos ensaios de fermentação, crescimento, caracterização de linhagens para análises e eletroforese.

3.2.1. Meio Completo (YEPD)

Extrato de levedura.....1%
Peptona.....2%
Dextrose.....2%
Ágar(para meio sólido).....2%
Água destilada

Este meio foi utilizado para manutenção de cultura, multiplicação das células, preparo do inóculo nos ensaios de fermentação e crescimento. O pH não necessita de correção, ficando na faixa de 6,5 a 6,8.

3.2.2. Meio de Fermentação

Extrato de levedura.....1%
Peptona.....1%
Dextrose.....2%
Água destilada

Este meio foi utilizado nos ensaios de fermentação com as respectivas linhagens e o seu pH não necessita de correção.

3.3. Soluções, Tampões e Reagentes

3.3.1. Solução de acrilamida/bis-acrilamida

Acrilamida.....30g

Bis-acrilamida.....0,8g

Completar para 100ml de água destilada e deionizada.

3.3.2. Tampão do gel inferior

Solução Trisma 2,5M, ajustado o valor de pH para 8,8 com ácido clorídrico.

3.3.3. Tampão do gel superior

Solução Trisma 0,5M, ajustado o valor de pH para 6,8 com ácido clorídrico.

3.3.4. Solução SDS 10% (sódio duodecil sulfato)

1,0g de SDS; ajustar para 10ml de água.

3.3.5. Solução de persulfato de amônio 10% (PSA)

0,1g de PSA; ajustar para 1ml de água. Essa solução não deve ser estocada, devendo renová-la a cada eletroforese.

3.3.6. Tampão de corrida (solução estoque)

Trisma.....12g

Glicina.....57,6g

Ajustar para 1 litro de água destilada e deionizada. O valor de pH da solução é próximo a 8,3 (não é necessário corrigí-lo).

3.3.7. Tampão de amostra

1,25ml da solução 3.3.4

2,0ml de glicerol

Completar para 6,0ml de água destilada e deionizada.

3.3.8. Tampão amostra desnaturante

0,5ml de 2-mercaptoetanol

0,25ml de azul de bromofenol 0,1%

4,0ml da solução 3.3.5

5,3ml da solução 3.3.8

3.3.9. Solução corante

0,05% de COOMASSIE BRILLIANT BLUE R-250, em solução metanol: ácido acético: água na proporção de 30:7:63 (v:v:v).

3.3.10. Solução descorante

Metanol:ácido acético:água na proporção 30:7:63 (v:v:v).

3.4. Procedimentos

3.4.1. Extração e preparo da proteína solúvel

As diferentes leveduras foram multiplicadas em meio líquido (meio completo-YEPD) conforme o objetivo do ensaio. Aliquotas de 50ml de meio foram distribuídas em frascos erlenmeyer de 125ml e autoclavadas a 1 atm, por 20 minutos. Para cada frasco, inoculou-se a quantidade de leveduras equivalente a uma ponta de palito retirada das placas de Petri crescidas por 2 dias. Após inoculação (cerca de 15 horas) sob agitação a 30°C, os frascos foram retirados e seu conteúdo submetidos a centrifugação a 2500G por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a massa celular separada para esmagamento.

Os extratos proteicos necessários para as separações eletroforéticas de proteínas foram obtidos por esmagamento em cadinho e pistilo, com células congeladas com nitrogênio líquido e foram ressuspensas em 0,5ml de água destilada e deionizada. O extrato foi centrifugado a 2500G por 5 minutos. Os extratos proteicos foram

padronizados quantitativamente, utilizados imediatamente ou conservados a -20°C .

3.4.2. Preparação da amostra desnaturada

As amostras foram preparadas colocando-se 50 μl de amostra de proteína solúvel para 50 μl de tampão de amostra desnaturante. As misturas foram submetidas a temperatura de 100°C por cinco minutos, prévio à eletroforese.

3.4.3. Eletroforese SDS-PAGE

As amostras de proteínas solúveis totais de leveduras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS em sistema descontínuo-desnaturante, segundo a metodologia de LAEMMLI (1970). Esta metodologia consiste em um sistema bifásico de gel de poliacrilamida, caracterizado pela utilização de um gel superior (espaçador) com baixa concentração de acrilamida (3,0%) e pH 6,8, com a função básica de concentrar as proteínas; e um gel inferior (separador) com alta concentração de acrilamida (10,0%) e pH 8,8, no qual os polipeptídeos são separados de acordo com seu peso molecular.

Foram utilizados géis com 11,0 x 13,0cm e 1mm de espessura, sendo 8,5cm de gel separador e 2,5cm de gel espaçador. Para a formação dos géis, as placas foram

seladas com solução de ágar 1,0% e o preparo dos mesmos foi a partir de soluções estoques descritas na Tabela 1.

Antes da sua utilização, o tampão de corrida (3.3.7) foi diluído em água na proporção de 1:4 (v:v) e ajustado para 0,1% de SDS, acrescentando-se 10 ml de SDS 10% por litro.

Para a corrida eletroforética, 50 μ l de extrato proteico foi aplicado em cada canaleta do gel, sendo as corridas desenvolvidas a 80 volts até o corante atingir o gel separador e 150 volts até o final do gel.

Após a corrida, os géis foram corados e fixados com a solução corante (3.3.10) durante uma noite e descorados com sucessivos banhos desta solução livre do corante (3.3.11).

Para estimativa dos pesos moleculares aproximados das bandas eletroforéticas, na canaleta lateral de cada gel utilizou-se uma amostra padrão de pesos moleculares (Pharmacia) com polipeptídeos de: 94,0; 67,0; 43,0; 30,0; 20,1 e 14,4 kD.

Tabela 1. Soluções estoques da eletroforese SDS-PAGE

COMPONENTES	GEL INFERIOR	GEL SUPERIOR
	10% acrilamida	3% acrilamida
Tampão superior (3.3.4)	-	5,0 ml
Tampão inferior (3.3.3)	15,0 ml	-
Solução acrilamida-bis (3.3.2)	9,9 ml	1,0 ml
Água deionizada	4,0 ml	3,5 ml
Solução SDS 10% (3.3.5)	500 μ l	300 μ l
Solução PSA 10% (3.3.6)	500 μ l	300 μ l
Temed	20 μ l	20 μ l

3.4.4. Leitura densitométrica dos géis

A análise quantitativa dos perfis eletroforéticos foi realizada em densitômetro Hoëfer Scientific Instruments GS300, San Francisco, com auxílio computacional. A concentração de cada banda foi obtida considerando-se a altura dos picos, o coeficiente de migração de bandas (R_f) e sua presença e ausência. A determinação dos valores de R_f para as proteínas totais foi obtido pela divisão da distância migrada por uma molécula de proteína pela distância migrada pelo frente de azul de bromofenol no gel separador.

3.4.5. Análise estatística

A análise de similaridade foi conduzida no programa de computador "Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System" (NTSYS-pc) versão 1.7 (ROHLF, 1992) com a utilização dos coeficientes SIMPLE MATCHING e JACCARD. O primeiro, obtido pela fórmula $SM = (a+d)/N$, baseia-se tanto na presença de coincidências positivas (a: número de bandas presente) quanto na presença de coincidências negativas (d: número de ausências de bandas) onde N representa o total de bandas obtidas. O coeficiente de Jaccard não considera a coincidência negativa,

representada por d , sendo portanto enquadrado nos coeficientes de concordâncias positivas, derivados do conceito de Distância euclideana média. Desta forma, para valores baixos próximos de zero, tem-se uma distância maior entre os materiais analisados e para valores próximos a um, maior similaridade (CONSOLI, 1995). Os dendrogramas foram construídos através de análise de agrupamento, utilizando-se o método das médias não ponderadas das distâncias ou UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages). Este é um processo hierárquico e em cada passo diminui uma dimensão da matriz de parecença pela reunião de pares mais semelhantes, até reunir todos os pontos em um único grupo (BUSSAB *et al.*, 1990).

Para a análise de agrupamento, foi construída uma matriz, a partir da leitura dos géis, atribuindo-se valor igual a um para presença da banda e valor zero para ausência da mesma.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisados os perfis eletroforéticos de proteínas de leveduras do gênero *Saccharomyces*, em géis de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Conforme CHRAMBACH & ROEBARD (1971), esta metodologia permite explorar diferenças no tamanho e carga elétrica da molécula, o que resulta numa maior resolução das bandas (SHAPIRO *et al.*, 1967).

Segundo DOWHANICK (1995), a PAGE de proteínas tem sido utilizada nos últimos anos como um método de classificação e identificação de leveduras e outros microrganismos. As proteínas são extraídas e separadas eletroforeticamente. Esta separação pode ser baseada nas diferenças de tamanho entre as proteínas utilizando a SDS-PAGE ou nas diferenças de carga iônica com fusão isoelétrica. Separações podem ser feitas também combinando tamanho e carga iônica no gel. Os padrões obtidos podem ser analisados por suas diferenças ou similaridades com outras linhagens e baseado nestas informações o microrganismo pode ser determinado.

Este método tem sido utilizado em muitas cervejarias por ser uma maneira rápida de caracterização de leveduras puras e linhagens de bactérias.

As figuras 1 e 2 mostram a análise dos perfis eletroforéticos de cinco linhagens de leveduras da indústria alcooleira e cinco da cervejeira, respectivamente. Na faixa correspondente aos padrões de pesos moleculares de 94,0 à 14,4kD foram consideradas apenas 30 bandas de proteínas indicadas nas figuras 1 e 2.

As figuras 3 e 4 mostram a análise densitométrica dos perfis eletroforéticos proteicos de cada uma das linhagens demonstradas nas figuras 1 e 2, onde foi possível a determinação dos picos correspondentes às bandas de proteínas. Cada pico corresponde a uma banda, onde foi possível a determinação do movimento relativo (Rf) de cada banda ao migrar ao longo dos géis (Tabelas 2 e 3). Também ficam evidentes as diferenças ou ausência de bandas. As frações proteicas que formaram uma banda, em alguns casos, podem ter sido formadas por mais de uma banda, não tendo sido diferenciadas pelo densitômetro por estarem muito próximas.

Na linhagem Fermento Fleischmann(1) da figura 1 observou-se a presença de 28 bandas e ausência de duas delas, sendo estas, a 12 e 13, situadas na faixa entre 30 à 43kD. As linhagens M300A, IZ1904 e Fermento Itaiquara também apresentaram a ausência destas mesmas bandas. Já a

linhagem M304-2C revelou a presença de 29 bandas, estando ausente apenas a banda 12. Nota-se, portanto, que estas linhagens são muito similares entre si e que a única a apresentar diferença foi a M304-2C.

Além da presença e ausência de bandas, podemos observar diferenças nas bandas no gel que variam como bandas finas, grossas, menos ou mais coradas. As bandas mais coradas devem concentrar maior quantidade de uma única proteína de alta expressão ou várias proteínas com peso molecular aproximado, enquanto que as mais claras apresentam uma menor quantidade ou uma única proteína de baixa expressão.

Pode-se observar no gel da figura 1 as linhagens Fermento Fleischmann e M300A e as linhagens M304-2C e IZ1904 como sendo as que mais se assemelham. Porém, com relação a presença e ausência de bandas, as linhagens que mostraram maior semelhança foram as linhagens Fermento Fleischmann, M300A, IZ1904 e Fermento Itaiquara para ambos os índices, por apresentarem ausência das mesmas bandas (bandas 12 e 13).

Na linhagem A da figura 2 observou-se a presença de 30 bandas assim como na linhagem B da mesma figura.

A linhagem C mostra presente 26 bandas, estando 4 ausentes, as bandas 15, 16, 22 e 26. A linhagem E também apresenta este mesmo perfil eletroforético, tornando-as muito semelhantes.

Figura 1. Gel SDS-PAGE com os padrões eletroforéticos de cinco linhagens de leveduras industriais, sendo os números 1, 2, 3, 4 e 5 correspondentes respectivamente a Fermento Fleischmann, M300A, M304-2C, IZ1904 e Fermento Itaiquara. A direção de migração é de cima para baixo com a primeira coluna da esquerda correspondente ao padrão de pesos moleculares em kiloDaltons (kD).

Figura 2. Gel SDS-PAGE com os padrões eletroforéticos de cinco linhagens de leveduras de cervejaria, correspondentes respectivamente as letras A, B, C, D e E. A direção de migração é de cima para baixo com a primeira coluna da esquerda correspondente ao padrão de pesos moleculares em kiloDaltons (kD).

Figura 3. Densitograma das proteínas das leveduras industriais. 1) Fermento Fleischmann; 2) M300A; 3) M304-2C; 4) IZ1904; 5) Fermento Itaiquara.

Figura 4. Densitograma das proteínas das leveduras de cervejaria. a) Cerveja A; b) Cerveja B; c) Cerveja C; d) Cerveja D; e) Cerveja E.

Tabela 2. Representação da ausência () e presença (---) de bandas das cinco linhagens de leveduras da indústria alcooleira (1, 2, 3, 4, 5).

BANDAS	LINHAGENS					Rf
	1	2	3	4	5	
1	---	---	---	---	---	0,088
2	---	---	---	---	---	0,108
3	---	---	---	---	---	0,126
4	---	---	---	---	---	0,166
5	---	---	---	---	---	0,180
6	---	---	---	---	---	0,222
7	---	---	---	---	---	0,242
8	---	---	---	---	---	0,258
9	---	---	---	---	---	0,288
10	---	---	---	---	---	0,316
11	---	---	---	---	---	0,336
12						0
13			---			0,380
14	---	---	---	---	---	0,394
15	---	---	---	---	---	0,416
16	---	---	---	---	---	0,430
17	---	---	---	---	---	0,476
18	---	---	---	---	---	0,496
19	---	---	---	---	---	0,526
20	---	---	---	---	---	0,546
21	---	---	---	---	---	0,584
22	---	---	---	---	---	0,618
23	---	---	---	---	---	0,640
24	---	---	---	---	---	0,668
25	---	---	---	---	---	0,700
26	---	---	---	---	---	0,728
27	---	---	---	---	---	0,770
28	---	---	---	---	---	0,792
29	---	---	---	---	---	0,834
30	---	---	---	---	---	0,874

Tabela 3. Representação da ausência () e presença (---) de bandas das cinco linhagens de leveduras da indústria cervejeira (A, B, C, D, E).

BANDAS	LINHAGENS					Rf
	A	B	C	D	E	
1	---	---	---	---	---	0,076
2	---	---	---	---	---	0,100
3	---	---	---	---	---	0,112
4	---	---	---	---	---	0,152
5	---	---	---	---	---	0,174
6	---	---	---	---	---	0,196
7	---	---	---		---	0,225
8	---	---	---	---	---	0,244
9	---	---	---	---	---	0,268
10	---	---	---	---	---	0,286
11	---	---	---	---	---	0,312
12	---	---	---	---	---	0,334
13	---	---	---	---	---	0,354
14	---	---	---		---	0,390
15	---	---		---		0,410
16	---	---				0,430
17	---	---	---		---	0,463
18	---	---	---	---	---	0,486
19	---	---	---		---	0,502
20	---	---	---	---	---	0,540
21	---	---	---	---	---	0,582
22	---	---				0,600
23	---	---	---	---	---	0,632
24	---	---	---	---	---	0,668
25	---	---	---		---	0,695
26	---	---		---		0,710
27	---	---	---		---	0,752
28	---	---	---	---	---	0,772
29	---	---	---	---	---	0,814
30	---	---	---	---	---	0,850

A linhagem D mostrou ter um perfil eletroforético bem diferente das outras, onde estavam presentes 22 bandas e ausentes 8, a 7, 14, 16, 17, 19, 22, 25 e a 27.

Em comparação com as linhagens C e E, nota-se que na D estão ausentes as bandas 16 e 22.

Comparando-se visualmente as linhagens do gel da figura 2, observa-se que as linhagens A e B e C e E formam dois grupos muito semelhantes. Nota-se claramente que a linhagem D apresenta um perfil eletroforético muito diferente das demais, também confirmado através da análise de presença e ausência de bandas e análise densitométrica.

Ainda com relação a análise densitométrica das linhagens comparadas (figura 3 e 4), pode-se observar que, de uma maneira geral, as leveduras da indústria alcooleira mostraram ter um comportamento mais semelhante e uniforme.

Entre os métodos de agrupamento, os mais importantes são, segundo MANLY (1986), os métodos hierárquicos, nos quais os indivíduos são reunidos em grupos, com o processo repetindo-se em vários níveis até a formação de um dendrograma; e, os métodos de otimização, nos quais os grupos são formados pela otimização de algum critério de agrupamento.

Nos métodos hierárquicos, o interesse maior é com o dendrograma resultante, não sendo motivo de preocupação o número de grupos formados. Estes métodos, que são divididos em aglomerativos e divisivos, apresentam mais vantagens do que os demais, especialmente quando o número de variáveis é elevado, por serem mais facilmente manipuláveis em nível

computacional (CRUZ, 1987). Já os métodos de otimização apesar de demandarem maior esforço computacional, são bastante utilizados pelas suas peculiaridades no melhoramento.

O uso de técnicas de agrupamento objetiva a reunião de entidades em grupos homogêneos de forma tal que seja minimizada a variação dentro e maximizada a variância entre grupos (GOLDER & YEOMANS, 1973).

As técnicas de agrupamento permitem, a partir de algum critério pré-estabelecido de similaridade ou dissimilaridade, dividir um grupo de observações em diversos outros grupos menores e mais homogêneos (CRUZ, 1990). Em diversas situações, a estratificação além de facilitar o processamento dos dados é, em muitos casos, convincente até por praticidade de planejamento e execução de determinadas atividades (GOLDER & YEOMANS, 1973).

Para a análise de similaridade através do programa NTSYS, foram utilizando os coeficientes Simple Matching e Jaccard, sendo que as linhagens com maior similaridade formaram grupos distintos.

A análise de agrupamento foi realizada pelo método de UPGMA (item 3.4.5.), do qual resultaram os dendrogramas da figura 5. Observa-se que, para ambos coeficientes de similaridade, não houve alterações na análise de agrupamento.

Os dendrogramas da figura 5 mostraram que grupos de linhagens foram formados, sendo que o grupo da linhagem C e

E apresentou uma similaridade na faixa de 83% e que se liga a um outro grupo formado pelas quatro linhagens Fermento Fleischmann, M300A, IZ1904 e Fermento Itaiquara, com similaridade na faixa de 94%. Este se liga ao grupo formado pelas linhagens A e B que mostraram este valor na faixa de 97%, portanto, bastante semelhantes e que está ligado a um grupo formado por uma única linhagem, a M304-2C.

A linhagem D apresentou este valor de similaridade na faixa de 70%, aparecendo isolada, constituindo um grupo distinto. No entanto, a mesma se liga ao grupo formado pelas quatro linhagens com 83% de similaridade.

A linhagem M304-2C apresentou maior similaridade em relação as linhagens A e B da indústria cervejeira do que nas utilizadas na indústria alcooleira.

Em relação a presença e ausência de bandas, de um modo geral, as linhagens A e B da indústria cervejeira foram únicas em não apresentarem ausência de nenhuma das 30 bandas analisadas. Já as linhagens Fermento Fleischmann, M300A, IZ1904 e Fermento Itaiquara apresentaram ausência de duas bandas, sendo estas as bandas 12 e 13. A linhagem M304-2C, que faz parte das linhagens de leveduras da indústria alcooleira, assim como as anteriores, diferiu destas somente pela presença da banda 13. Conclui-se, portanto, que embora as linhagens de leveduras da indústria alcooleira sejam altamente semelhantes entre si, foi possível distingui-las e compará-las.

Figura 5. Dendrogramas construídos pelo método de UPGMA. A) coeficiente Simple Matching, e B) coeficiente Jaccard. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem a Fermento Fleischmann, M300A, M304-2C, IZ1904 e Fermento Itaiquara; e 6, 7, 8, 9 e 10 correspondem às cervejas A, B, C, D e E, respectivamente.

5, 6, 7, 8, 9 e 10 correspondem às cervejas A, B, C, D e E, respectivamente.

As linhagens C e E apresentaram ausentes quatro bandas, conforme mencionado anteriormente e, quando comparadas todas as linhagens analisadas, a linhagem D foi a que mais se diferenciou, constituindo um grupo único e distinto das demais.

Pode-se concluir também que, tanto as linhagens de leveduras da indústria alcooleira como da indústria cervejeira apresentaram uma alta similaridade entre si, podendo reuni-las em três grupos, conforme mostram os dendrogramas da figura 5. Todos os grupos estão ligados entre si com 70% de similaridade.

Segundo DEGRÉ *et al.* (1989), a identificação de linhagens de leveduras é pouco avançada em relação a identificação de bactérias. O avanço da biologia molecular tem promovido o desenvolvimento de novas técnicas genéticas, as quais foram mais tarde usadas para a identificação microbiana.

A SDS-PAGE foi usada com sucesso no agrupamento e identificação rápida de bactérias heterotróficas da água mineral engarrafada, uma vez que os métodos de identificação rápida em bactérias tem sido mais utilizados na identificação de espécies patogênicas (FERREIRA *et al.*, 1996).

Segundo LEMOS & MORAES (1992), a eletroforese em disco de poliacrilamida foi utilizada na identificação de peixes de água doce da Família *Pimelodidae*, sujeitos à fraude por substituição de espécies na comercialização. O método baseou-se na especificidade dos padrões eletroforéticos das proteínas do músculo submetidas à eletroforese e mostrou-se viável para a identificação das espécies de peixes desprovidas de suas características externas, podendo ser aplicado sempre que houver suspeita de substituição. Os perfis são igualmente específicos de cada espécie e os autores confirmaram a eletroforese como sendo um meio eficiente para identificação de peixes do mesmo gênero.

LINDNER *et al.* (1981) caracterizaram diferentes proteínas de origem animal e vegetal através da PAGE e puderam acompanhar as mudanças na quantidade de proteínas solúveis em vegetais durante estocagem.

Através dos dendrogramas da figura 5, foi possível distinguir as leveduras da indústria alcooleira, apesar de apresentarem-se altamente similares, das da indústria cervejeira, não havendo diferenças entre os coeficientes de similaridade Simple Matching e Jaccard analisados.

As linhagens de leveduras Fermento Fleischmann, M300A, IZ1904 e Fermento Itaiquara da indústria alcooleira apresentaram similaridade na faixa de 94%, sendo que a M304-2C apresentou este valor na faixa de 97% , não havendo

diferenças significativas entre elas, portanto pertencentes a mesma espécie.

Entre as linhagens de leveduras cervejeiras, A e B apresentaram 97% de similaridade, provavelmente pertencentes a mesma espécie, assim como C e E que apresentaram este valor na faixa de 83%, sendo que a linhagem D apresentou um padrão bem diferente das demais.

A utilização da SDS-PAGE neste trabalho mostrou a variação entre e dentro de leveduras da mesma espécie. Esta variação pode ser equiparada com diferenças genéticas.

As leveduras da indústria cervejeira apresentaram maior variabilidade em relação as da indústria alcooleira, onde segundo VAN VURREN & VAN DER MEER (1988), na indústria cervejeira as condições de fermentação são muito mais amenas causando um menor estresse nas leveduras, podendo-se optar por leveduras de várias espécies.

Entre muitos métodos existentes, a PAGE permitiu uma caracterização rápida e segura das linhagens de leveduras em questão, revelando o polimorfismo proteico, sendo que grupos pouco ou muito similares foram formados.

Podemos concluir que a SDS-PAGE permite, portanto, a caracterização de microrganismos dos processos fermentativos de grande importância para as indústrias, tanto para o conhecimento da flora microbiana como na identificação de espécies contaminantes.

5- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho, utilizando o método de SDS-PAGE e suas interpretações permitem concluir que:

- O método SDS-PAGE é eficiente em distinguir as diferenças entre e dentro das linhagens analisadas.
- O método é importante porque permite identificar linhagens de leveduras da mesma espécie, complementando aqueles que apenas permitem identificar leveduras de espécies diferentes, abrindo a possibilidade de se distinguir variações do próprio fermento ou aquelas devido a contaminações, além de ser rápido, seguro e de baixo custo.
- Os perfis eletroforéticos das linhagens de leveduras da indústria alcooleira mostraram ser muito similares entre si, mas foi possível identificar diferenças entre elas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, K.; SCHMERTZING, H.; PETERSON, J.I. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. I. Feasibility of utilizing gas chromatography. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, **85**: 1039-44, 1963.
- ANDRIETTA, M.G.S.; OLIVEIRA, A.J.; STUPIELLO, J.P. Determinação de M.I.C. (Concentração Inibitória Mínima) para cinco antimicrobianos sobre bactérias G⁺ isoladas da indústria brasileira de fermentação alcoólica. **STAB: Açúcar, Alcool e Subprodutos**, Piracicaba, **13**(6): 42-3, jul./ago. 1995.
- AIKEN, S.G. & GARDINER S.E. SDS-PAGE of seed proteins in *Festuca* (Poaceae): taxonomic implications. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **69**: 1425-32, 1991.
- AMORIM, H.V. & OLIVEIRA, A.J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Açúcar e Alcool**, São Paulo, **5**: 12-8, 1982.
- AUGUSTYN, O.P.H. & KOCK, J.L.F. Differentiation of yeast species and strains within a species by cellular fatty acid analysis. 1. Application of an adapted technique to differentiate between strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, **10**: 9-23, 1989.

- AUGUSTYN, O.P.H.; KOCK, J.L.F.; FERREIRA, D.
Differentiation between yeast species and strains within species by cellular fatty analysis. 3. *Saccharomyces* sensu lato, *Arxiozyma* and *Pachytispora*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, **13**: 44-55, 1990.
- BALDINI, V.L.S. Eletroforese: conceitos teóricos e sua aplicação na pesquisa de proteínas. **Boletim ITAL**, Campinas, **18**(2): 145-54, abr./jun. 1981.
- BARNETT, J.A. The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess: a short review for non-taxonomists. **Yeast**, Chichester, **8**: 1-23, 1992.
- BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeast**: characteristics and identification. Cambridge, University Press, 1983. 811p.
- BENDOÁ, O.; RICHTER, V.; JANDEROVÁ, B.; HÄUSLER, J. Identification of industrial yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* by fatty acid profiles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, **35**: 810-2, 1991.
- BENHAM, R.W. Certain monilias parasitic on man: their identification by morphology and by agglutination. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, **49**: 183-215, 1931.

- BENTON, A.W. & MYERS, R.F. Esterases, phosphatases and protein patterns of *Ditylenchus triformis* and *Panagrellus redivivus*. **Nematologica**, Leiden, **12**: 495-600, 1966.
- BERNSTEIN, S.C.; THROCKMORTON, L.H.; HUBBY, J.L. Still more genetic variability in natural populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, **70**: 3928-31, 1973.
- BOULTER, D.; DERBYSHIRE, E.; FRAHM-LELIVELD, J.A.; POLHILL, R.M. Observations on the cytology and seed proteins of various African species of *Crotalaria*. **New Phytologist**, London, **69**: 117-31, 1970.
- BOYER, S.H.; NOYES, A.N.; TIMMONS, C.F.; YOUNG, R.A. Primate hemoglobins: polymorphisms and evolutionary patterns. **Journal Human Evolution**, **1**: 515-43, 1972.
- BULINSKA-RADOMSKA, Z. & LESTER, R.N. Relationships between three species of *Festuca* sect. *Bovinae* (Poaceae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, **149**: 135-40, 1985.
- BULINSKA-RADOMSKA, Z. & LESTER, R.N. Phylogeny of chromosome races of *Festuca arundinacea* and *F. mairei* (Poaceae) as indicated by seed protein electrophoresis. **Plant Systematics and Evolution**, New York, **152**: 153-66, 1986.

- BUSSAB, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. **Introdução a análise de agrupamento.** Associação Brasileira de Estatística. ABE Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística, 9., 1990. 155p.
- CAMPBELL, I. Microbiology of brewing: beer and lager. In: NORRIS, J.R. & PETTIPHER, G.L., ed. **Essays in agricultural and food microbiology.** New York, Chichester, 1987a.
- CAMPBELL, I. & ALLAN, A.M. Antigenic analysis of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **70**: 316, 1964.
- CAMPBELL, I. & BRUDZYNSKI, A. Serological studies on brewing yeasts. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **72**: 556, 1966.
- CANN, D.C. & WILLOX, M.E. Analysis of multimolecular enzymes as an aid to the identification of certain rapidly growing mycobacteria, using starch-gel electrophoresis. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, **28**: 165-73, 1965.
- CARLE, G.F. & OLSEN, M.V. An electrophoretic karyotype for yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, **82**: 3756-60, 1985.

- CARRARO, D.M. Variação e herança dos padrões eletroforéticos em órgãos e estágios de desenvolvimento em milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, 1990. 121p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- CASTRO, T.A.M.G. Eletroforese em gel de acrilamida. **Curso Teórico-Prático de Eletroforese**, Nova odessa, 4: 43-5, 1988.
- CHRAMBACH, A. & RODBARD, D. Polyacrylamide gel electrophoresis. **Science**, Washington, **172**: 440-51, 1971.
- CLARE, B.G.; FLENTJE, N.T.; ATKINSON, M.R. Electrophoretic patterns of oxidoreductases and other proteins as criteria in fungal taxonomy. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, **21**: 275-95, 1968.
- CONSOLI, L. Análise genética e molecular da variação somaclonal em *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. (LEGUMINOSAE). Piracicaba, 1995. 108p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- COOKE, R.J. The characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, **5**: 59-72, 1984.
- CRAWFORD, D.J. **Plant molecular systematics**: macromolecular approaches. New York, John Wiley & Sons, 1990. p.30-50.

CRUZ, C.D. Algumas técnicas de análise multivariada no melhoramento de plantas. Piracicaba, ESALQ-Departamento de Genética, 1987. 75p.

CRUZ, C.D. Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas. Piracicaba, 1990. 188p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. I. Method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, **121**: 404-27, 1964.

DEGRÉ, R.; THOMAS, D.Y.; ASH, J.; MAILHIOT, K.; MORIN, A.; DUBORD, C. Wine yeasts strain identification. **American Journal Enology and Viticulture**, Davis, **40**(4): 309-14, 1989.

DE JONGE, P.; DE JONGH, P.C.M.; MEIJERS, R.; STEENSMA, H.Y.; SCHEFFERS, W.A. Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis banding patterns of DNA from yeasts. **Yeast**, Chichester, **2**: 193-204, 1987.

DERBYSHIRE, E.; YARWOOD, J.N.; NEAT, E.; BOULTER, D. Seed proteins of *Phaseolus* and *Vigna*. **New Phytologist**, London, **76**: 283-8, 1976.

DICKSON, D.W.; HUISINGH, D.; SASSER, J.N. A comparison of the electrophoretic protein profiles of *Meloidogyne* and *Heterodera*. **Phytopathology**, Lancaster, **57**: 468, 1967.

DOWHANICK, T.M. Advances in yeast and contaminant determination: the future of the so called "rapid" methods. **Cerevisia**, Bruxelas, **4**: 40-50, 1995.

DRAWERT, F. & BEDNAR, J. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, **27**: 3, 1979.

DRAWERT, F. & BEDNAR, J. On the electrophoretical differentiation and classification of proteins. 12. Comparative investigation of yeast proteins of different *Saccharomyces* species and various strains belonging to the species *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, by means of isoelectric focusing in polyacrylamide gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, **31**: 848-51, 1983.

DURBIN, R.D. Comparative gel-electrophoretic investigation of the protein patterns of *Septoria* species. **Nature**, London, **210**: 1186-7, 1966.

ECHEVERRIGARAY, S.; CARVALHO, M.T.V.; POMPEU, A.S.; DERBYSHIRE, E. Affinity grouping of closely related lines of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) through comparative electrophoresis of seed proteins. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, **16**(3): 759-71, 1993.

- EGUCHI, S.Y.; CASTRO, M.M.S.; MECATE, G.M. **Manual de identificação de leveduras.** Fundação Tropical de Pesquisas "André Tosello", Campinas, 1991. 32p.
- EL-SHARKAWY, T.A. & HUISINGH, D. Differentiation among *Xanthomonas* species by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins. **Journal of General Microbiology**, London, **68**: 155-65, 1971.
- FERRARI, S.E.; LOPES, J.J.C.; LEME, J.R.A.; OLIVEIRA, E.R. Industrial efficiency of alcohol fermentation: a comparative study. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE TECNOLOGIA DOS ÁLCOOIS COMO COMBUSTÍVEL, 4., Guarujá, 1980. **Anais.** São Paulo, IPT, 1980. p.139-41.
- FERREIRA, A.C.; MORAIS, P.V.; GOMES, C.; COSTA, M.S. Computer-aided comparison of protein electrophoretic patterns for grouping and identification of heterotrophic bacteria from mineral water. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, **80**: 479-86, 1996.
- FREDRICKSON, A.G. Behaviour of mixed cultures of microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, **31**: 63-87, 1977.
- GALLO, C.R. Identificação de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **STAB: Açúcar, Alcool e Subprodutos**, Piracicaba, **10**(5): 30-4, maio/jun. 1992.

- GOLDER, R.A. & YEOMANS, K.A. The use of cluster analysis for stratification. **Applied Statistics**, London, **22**(2): 213-9, 1973.
- GORIN, P.A.J. & SPENCER, J.F.T. Proton magnetic resonance spectroscopy - an aid in identification and chemotaxonomy of yeasts. **Advances in Applied Microbiology**, New York, **13**: 25-89, 1970.
- GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M.; SPENCER, J.F.T. **Canadian Journal Chemistry** **46**: 2305, 1968.
- GOTTLIEB, L.D. & HEPDEN, M.P. The electrophoretic movement of proteins from various *Streptomyces* species as a taxonomic criterion. **Journal of General Microbiology**, London, **44**: 95-104, 1966.
- GRATTAPAGLIA, D.; NASSAR, N.M.A.; DIANESE, J.C. Biosistemática de espécies brasileiras do gênero *Manihot* baseada em padrões de proteína de semente. **Ciência e Cultura**, São Paulo, **39**: 294-300, 1987.
- GUTTIERREZ, L.E. Acúmulo de trealose em linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, **47**(2): 597-608, 1990.

- HALL, R.; ZENTMYER, G.A.; ERWIN, D.C. Approach to taxonomy of *Phytophthora* through acylamide-gel electrophoresis of proteins. **Phytopathology**, Lancaster, **59**: 770-4, 1969.
- HARRISON, J.S. Yeasts in baking: factors affecting changes in behaviour. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, **34**: 173-9, 1971.
- HOXTER, G. Eletroforese. **Curso Teórico-Prático de Eletroforese**, Nova Odessa, **4**: 1-14, 1988.
- JOHNSON, G.B. Hidden alleles at the alpha-glycerophosphate dehydrogenase locus in *Colias* butterflies. **Genetics**, Chapel Hill, **83**: 149-67, 1976.
- JOHNSTON, J.R. & MORTIMER, R.K. Electrophoretic karyotyping of laboratory and commercial strains of *Saccharomyces* and other yeasts. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, **36**: 569-72, 1986.
- JOHNSTON, J.R.; CONTOPOULOU, C.R.; MORTIMER, R.K. Karyotyping of yeast strains of several genera by field inversion gel electrophoresis. **Yeast**, Chichester, **4**: 191-8, 1988.
- JOHNSTON, J.R.; CURRAN, J.R.; CONTOPOULOU, C.R.; MORTIMER, R.K. Electrophoretic karyotyping of commercial brewing and distilling strains of *Saccharomyces* and other yeast. **Yeast**, Chichester, **5**: 255-60, 1989.

KANEKO, Y.; MIKATA, K.; BANNO, I. Karyotyping of *Saccharomyces exiguus* by pulsed-field gel electrophoresis. **IFO Research Communication**, **14**: 111-7, 1989.

KERSTERS, K. & DE LEY, J. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. **Journal of General Microbiology**, London, **87**: 333-42, 1975.

KERSTERS, K. & DE LEY, J. Classification and identification of bacteria by electrophoresis of their proteins. In: GOODFELLOW, M. & BOARD, R.G., ed. **Microbial Classification and Identification**. London, Academic Press, 1980. p.273-94.

KILIAN, S.G.; VAN DEEMTER, A.; KOCK, J.L.F.; DU PREEZ, J.C. Occurrence and taxonomic aspects of proton movements coupled to sugar transport in the yeast genus *Kluyveromyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, **59**(3): 199-206, 1991.

KOCK, J.L.F.; COTTRELL, M.; LATEGAN, P.M. A rapid method to differentiate between five species of the genus *Saccharomyces*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, **23**: 499-501, 1986.

- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. Classification of yeasts. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S., ed. **The yeasts**. London, Academic Press, 1987. v.1, p.5-61.
- KUNKEE, R.E. & AMERINE, M.A. Yeast in wine-making. In: HARRISON, J.S. & ROSE, A.H., ed. **The yeast**. New York, Academic Press, 1970. v.3, p.5-57.
- KURTZMAN, C.P.; PHAFF, H.J.; MEYER, S.A. Nucleic acid relatedness among yeasts. In: SPENCER, J.F.T.; SPENCER, D.M.; SMITH, A.R.W., eds. **Yeast genetics fundamental and applied aspects**. New York, Springer-Verlag, 1983. p.139-66.
- LADIZINSKY, G. Species relationships in the genus *Lens* as indicated by seed proteins electrophoresis. **Botanical Gazette**, Chicago, **140**: 449-51, 1979.
- LADIZINSKY, G. & HYMOWITZ, T. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **54**: 145-51, 1979.
- LADIZINSKY, G. & WAINES, G. Seed protein polymorphism in *Vicia sativa* agg. (Fabaceae). **Plant Systematic and Evolution**, New York, **141**: 1-5, 1982.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, **227**: 680-5, 1970.

- LEMOS, A.L.S.C. & MORAES, M.A.C. Identificação eletroforética de peixes de água doce (Família *Pimelodidae*) de valor comercial. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, **4**: 57-63, 1992.
- LILLIE, S.H. & PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: response to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, **143**: 1384-94, 1980.
- LINDNER, K.; HAJDÚ, I.; KÁDAS, L. Characterization of certain proteins of animal and plant origin by polyacrylamide gel electrophoresis. **Acta Alimentaria**, Budapest, **10**(4): 301-21, 1981.
- LUND, B. A comparison by the use of gel electrophoresis of soluble protein components and esterase enzymes of some group D streptococci. **Journal of General Microbiology**, London, **40**: 413-9, 1965.
- MANLY, B.F.J.P. **Multivariate statistical methods**. London, Chapman and Hall, 1986. 159p.
- MEADEN, P. DNA fingerprinting of brewer's yeast: current perspectives. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **96**: 195-200, Jul./Aug. 1990.

- MENEZES, T.J.B. Como a genética microbiana pode auxiliar a indústria de fermentação. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, **19**(1): 1-11, 1989.
- MILLER, M.; KOCK, J.L.F.; PRETORIUS, G.H.J.; COETZEE, D.J. The value of orthogonal-field-alternation gel electrophoresis and other criteria in the taxonomy of the genus *Pichia* Hansen emend Kurtzman. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, **12**: 191-202, 1989.
- MILLER, R. & GALSTON, G. Rapid methods for the detection of yeast and *Lactobacillus* by ATP bioluminescence. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **95**(5): 317-9, 1989.
- MONTALVÁN del AGUILA, R. Determinação de divergência genética em germoplasmas de arroz (*Oryza sativa* L.) através de análises eletroforéticas de proteínas de grão. Piracicaba, 1990. 80p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- NAKASE, T. & KOMAGATA, K. Significance of DNA base composition in the classification of yeast genus *Saccharomyces*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, **17**: 227-38, 1971.
- NAUMOV, G.I.; NAUMOVA, E.S.; LANTTO, R.A.; LOUIS, E.J.; KORHOLA, M. Genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S. paradoxus* and *S. bayanus*: electrophoretic karyotypes. **Yeast**, Chichester, **8**: 599-612, 1992.

NEI, M. **Molecular population genetics and evolution.**
Amsterdam, North-Holland, 1975. 288p.

OLIVEIRA, M.C.F.L. Leveduras contaminantes da fermentação etanólica. In: **Microbiologia da Fermentação Etanólica.** Rio Claro, UNESP/Depto Bioquímica, 1987. p.92-104.

ORNSTEIN, L. & DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, **121**: 321-49, 1964.

PEDERSEN, M.B. DNA sequence polymorphisms in the genus *Saccharomyces* III. Restriction endonuclease fragment patterns of chromosomal regions in brewing and other yeast strains. **Carlsberg Research Communications**, Copenhagen, **51**: 163-83, 1986.

PHAFF, H.J.; MILLER, M.W.; MRAK, E.M. Yeast spoilage of foods and fermentation processes. In:_____. **The life of yeasts.** Cambridge, Harvard University Press, 1978. 341p.

RANK, G.H. & CASEY, G.P. Electrophoretic karyotyping by transverse alternating pulsed field electrophoresis (TAFE). **Journal of the Institute of Brewing**, London, **94**: 232, 1988.

- RAYMOND, S. & WEINTRAUB, L. Acrylamide gel as supporting medium for zone electrophoresis. **Science**, Washington, **130**: 711, 1959.
- ROBINSON, K. An examination of *Corynebacterium* spp. by gel electrophoresis. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, **29**: 179-84, 1966.
- RODINI, M.A.T. Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol. Piracicaba, 1985. 92p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc - Numerical Taxonomy and Multivariate analysis system**. Version 1.70. Stony Brook, New York. 1992.
- ROSINI, G.; FEDERICI, F.; VAUGHAN, A.E.; MARTINI, A. Systematics of the species of the yeast genus *Saccharomyces* associated with the fermentation industry. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, **15**(3): 188-93, 1982.
- SARKAR, R. & BOSE, S. Electrophoretic characterization of rice varieties using single seed (salt soluble) proteins. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **68**: 415-9, 1984.

- SAURA, A.; LOKKI, J.; OURA, E.; SUOMALAINEN, H.
Qualitative yeast enzyme analysis by electrophoresis.
European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, New York, **7**: 355-64, 1979.
- SCANDALIOS, J.G. Isozymes in development and differentiation. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, **25**: 225-58, 1974.
- SCHÜTZ, M. & GAFNER, J. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, **75**: 551-8, 1993.
- SCHÜTZ, M. & GAFNER, J. Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, **19**: 253-7, 1994.
- SCHWARTZ, D.C. & CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, Cambridge, **37**: 67-75, 1984.
- SEEHAUS, T.; RODICIO, R.; HEINISCH, J.; AQUILERA, A.; SCHMITT, H.D.; ZIMMERMANN, F.K. Specific gene probes as tools in yeast taxonomy. **Current Genetics**, New York, **10**: 103-10, 1985.

- SHAPIRO, A.L.; VIÑUELA, E.; MAIZEL, J.V. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, **28**: 815, 1967.
- SHAW, C.R. How many genes evolve? **Biochemical Genetics**, New York, **4**: 275-83, 1970.
- SHECHTER, Y. & DE WET, J.M.J. Comparative electrophoresis and isozyme analysis of seed proteins from cultivated races of *Shorgum*. **Americal Journal of Botany**, New York, **62**: 254-61, 1975.
- SHEEHAN, C.A. & WEISS, A.S. Brewing yeast identification and chromosome analysis using high resolution CHEF gel electrophoresis. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **97**(3): 163-7, May/Jun. 1991.
- SHEHATA, A.M.E. Yeast isolated from sugar cane and its juice during the production of aguardente de cana. **Applied Microbiology**, Berlin, **8**: 73-5, 1960.
- SIDDIQ, E.A.; NERKAR, Y.S.; MEHTA, S.L. Intra and intersubspecific variation in soluble proteins of *Oryza sativa* L. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **42**: 351-6, 1972.

- SILVA, M.E. Avaliação do desenvolvimento de leveduras contaminantes de processos de produção de etanol por parâmetros não convencionais. Piracicaba, 1994. 70p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- SIMPSON, W.J.; FERNANDEZ, J.L.; HAMMOND, J.R.M. Differentiation of brewery yeasts using a disc-diffusion test. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **98**: 33-6, Jan./Feb. 1992.
- SINGH, R.S.; HUBBY, J.L.; LEWONTIN, R.C. Molecular heterosis for heat-sensitive enzyme alleles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, **71**: 1808-10, 1974.
- SMITH, J.S.C. & LESTER, R.N. Biochemical systematics and evaluation of *Zea*, *Tripsacum* and related genera. **Economic Botany**, New York, **34**: 201-18, 1980.
- SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. **Biochemical Journal**, London, **61**: 629-35, 1955.
- SOBZAK, H. **Journal of Medical Microbiology**, Scotland, **20**: 307, 1985.
- SOKAL, R.R. & SNEATH, P.H.A. **Principles of numerical taxonomy**. San Francisco, W.H. Freeman, 1963. 359p.

STANBURY, P.F. & WHITAKER, A. **Principles of fermentation technology**. Oxford, Pergamon Press, 1984. 255p.

SUBDEN, R.E.; IRWIN, D.; CUNNINGHAM, J.D.; MEIERING, A.G. Wine yeast isozymes. I. Genetic differences in 18 stock cultures. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, **28**: 1047-50, 1982.

SUOMALAINEN, H. & PFAFFLI, S. Changes in the carbohydrate reserves of baker's yeast during growth and on stading. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **67**: 249-54, 1961.

TAVARES, F.C.A. A levedura e processo de produção de álcool. In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA "JAYME ROCHA DE ALMEIDA", 4., Piracicaba, 1985. **Anais**. Piracicaba, ESALQ/STAB, 1985. P.29-35.

TAVARES, F.C.A. Control of spoilage yeasts in fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**, Kew, **17**(10): 1121-6, 1995.

TAVARES, F.C.A. Processo de controle seletivo de leveduras contaminantes. **STAB: Açúcar, Álcool e subprodutos**, Piracicaba, **10**(5): 45-9, 1992.

TAVARES, F.C.A.; ECHEVERRIGARAY, S.; GOMES, L.H.; SOUBIHE, M. Identificação molecular de leveduras da fermentação alcoólica. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, **10**(4): 34-9, mar./abr. 1992.

THEVELEIN, J.M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiological Reviews**, Washington, **48**(1): 42-59, 1984.

THORNTON, R.J. & BUNKER, A. Characterization of wine yeasts for genetically modifiable properties. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **95**(3): 181-4, May/Jun. 1989.

TÖRÖK, T. & KING, A.D. Use of electrophoretic karyotyping and DNA-DNA hybridization probes for the identification of yeasts. In: International Symposium of Yeasts, Atlanta, 1992. p.48.

TREDOUX, H.G.; KOCK, J.L.F.; LATEGAN, P.M. The use of cellular long chain fatty acid composition in the identification of some yeasts associated with wine industry. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, **9**: 299-306, 1987.

TSUCHIYA, T.; FUKAZAWA, Y.; KAWAKITA, S. Serological classification of the genus *Saccharomyces* (II). **Japanese Journal of Microbiology**, Tokyo, **5**: 417-29, 1961.

- TSUCHIYA, T.; FUKAZAWA, Y.; KAWAKITA, S. Significance of serological studies on yeasts. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, Den Haag, **26**(1): 1-15, 1965.
- VAN DER WALT, J.P. & YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W., ed. **The yeasts: a taxonomic study**. Elsevier, Amsterdam, 1984. p.45-104.
- VAN DER WESTHUIZEN, T.J. & PRETORIUS, I.S. The value of electrophoretic fingerprinting and karyotyping in wine yeast breeding programmes. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, **61**: 249-57, 1992.
- VAN OEVELEN, D.; SPAEPEN, M.; TIMMERMANS, P.; VERACHTERT, H. Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and guenze. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **83**: 356-60, Nov./Dec. 1977.
- VAN VUUREN, H.J.J. & VAN DER MEER, L. Fingerprinting of yeasts by protein electrophoresis. **American Journal Enology and Viticulture**, Davis, **38**(1): 49-53, 1987.
- VAN VUUREN, H.J.J. & VAN DER MEER, L. Characterization of brewing yeast strains by numerical analysis of total soluble cell proteins patterns. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **94**: 245-8, 1988.

- VAN ZYL, E. & STEYN, P.L. Differentiation of phytopathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomonas* species and pathovars by numerical taxonomy and protein gel electrophoregrams. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, **13**: 60-71, 1990.
- VAUGHAN, J. The use of the seed proteins in taxonomy and phylogeny. In: DAUSSANT, J.; MOSEE, J.; VAUGHAN, J., ed. **Seed proteins**. London, Academic Press, 1983. p.141-53.
- VAUGHAN-MARTINI, A. & KURTZMAN, C.P. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of *Saccharomyces sensu lato*. **Mycologia**, Lancaster, **80**: 241-3, 1988.
- VAUGHAN-MARTINI, A. & MARTINI, A. A taxonomic key to the genus *Saccharomyces*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, **15**: , 1992.
- VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A.; CARDINALI, G. Electrophoretic karyotyping as a taxonomic tool in the genus *Saccharomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, **63**: 145-56, 1993.
- VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. **Journal of General Microbiology**, London, **137**: 1677-87, 1991.

- VILLAMIL, C.B.; DUELL, R.W.; FAIRBROTHERS, D.E.; SADOWSKI, J. Isoelectric focusing of esterases for fine fescue identification. **Crop Science**, Madison, **22**: 786-93, 1982.
- WHITNEY, P.J.; VAUGHAN, J.G.; HEALE, J.B. A disc electrophoretic study of the proteins of *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* with reference to their taxonomy. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, **19**: 415-26, 1968.
- YAMADA, Y.; NOJIRI, M.; MATSUYAMA, M.; KONDO, K. Coenzyme Q system in the classification of the ascosporeogenous yeast genera *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Endomycopsis*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, **22**: 325-37, 1976.
- YAMAZAKI, M.; GOTO, S.; KOMAGATA, K. An electrophoretic comparison of the enzymes of *Saccharomyces* yeasts. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, **29**: 305-18, 1983.
- YUKAMA, M. & OHTA, M. Serological identification of yeasts (I & II). **Gakugei Zasshi**, Kyushu Imperial University, **3**: 187-216, 1928.
- YUKAMA, M. & OHTA, M. Serological identification of yeasts. **Bulletin de L Institut Pasteur**, Paris, **27**: 542-44, 1929.