Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Caracterização de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* quanto a
filamentação induzida por álcoois e deficiência de nutrientes**

PAULA CRISTINA DA SILVA

Dissertação apresentada, para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2006

PAULA CRISTINA DA SILVA

Engenheiro Agrônomo

**Caracterização de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* quanto a
filamentação induzida por álcoois e deficiência de nutrientes**

Orientador:

Prof. Dr. **JORGE HORII**

Dissertação apresentada, para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Silva, Paula Cristina da

Caracterização de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* quanto a
filamentação induzida por álcoois e deficiência de nutrientes / Paula Cristina da Silva.
- - Piracicaba, 2006.

62 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Deficiência de carbono 2. Etanol 3. Fermentação industrial 4. Levedura
5. Microbiologia I. Título

CDD 589.23

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À minha mãe Maria José (“in memoriam”),

Meu carinho e gratidão pelo apoio que sempre recebi

Dedico

À minha irmã Ana, pela amizade e auxílio

Dedico

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão:

- Em primeiro lugar à DEUS, pela orientação e coragem para enfrentar os momentos difíceis;
- ao Prof. Dr. Jorge Horii (ESALQ/USP) e a Prof Dr^a Sandra Regina Ceccato-Antonini (CCA/UFSCar-*Campus* de Araras), pelo exemplo de profissionalismo, amor e dedicação à pesquisa e principalmente pela paciência e a valiosa orientação;
- aos professores do Departamento Agroindústria, Alimentos e Nutrição (ESALQ/USP), que contribuíram para a minha formação profissional;
- ao Prof Dr.Norberto Antonio Lavorentti (CCA/UFSCar-*Campus* de Araras) pelo auxílio nas análises estatísticas
- à técnica Lucia Therezinha Picollo Silva (CCA/UFSCar-*Campus* de Araras), pela valiosa colaboração nos trabalhos laboratoriais;
- aos colegas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) , CCA/UFSCar-*Campus* Araras, onde este trabalho foi realizado, pela amizade e colaboração, em especial à Viviane Santos Miranda, Heloísa Gallera Brunetto e Emanuelle Paiva

SUMARIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Ciclo celular e dimorfismo.....	16
2.2 Indução de filamentação por álcoois superiores.....	19
2.3 Indução de filamentação por deficiência de nutrientes	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Material biológico.....	22
3.2 Meios de cultura e soluções.....	22
3.3 Influência de álcoois superiores.....	24
3.4 Influência da fonte e concentração de carbono.....	24
3.5 Influência da concentração de nitrogênio.....	25
3.6 Ensaios de fermentação.....	26
3.6.1 Propagação de células para obtenção de inóculo.....	26
3.6.2 Testes fermentativo.....	26
3.6.3 Análises.....	27
3.6.3.1 Viabilidade celular.....	27
3.6.3.2 Etanol.....	27

3.6.3.3 pH.....	27
3.6.3.4 Brix.....	27
3.6.3.5 Taxa de filamentação.....	27
3.6.3.6 Análise estatística.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Indução de filamentação por álcoois superiores.....	30
4.2 Indução de filamentação por deficiência de carbono.....	36
4.3 Indução de filamentação por deficiência de nitrogênio.....	46
4.4 Ensaios fermentativos.....	48
5 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
Figura 2 – Preparação da lâmina para observação de crescimento invasivo em corte transversal.....	25
Figura 3 - Morfologia das células das linhagens diplóides estudadas crescidas em meio YEPD.....	29
Figura 4 - Morfologia das células das linhagens haplóides estudadas crescidas em meio YEPD.....	30
Figura 5 - Linhagem CCA 012 cultivadas em placas com meio YEPD.....	35
Figura 6 - Linhagem CCA 022 cultivadas em placas com meio YEPD.....	35
Figura 7 - Linhagem CCA 083 cultivadas em placas com meio YEPD.....	36
Figura 8 - Linhagem CCA 151 cultivadas em placas com meio YEPD.....	36
Figura 9 - Linhagem CCA385 cultivadas em placas com meio YEPD.....	37
Figura 10 - Linhagem CCA 397 cultivadas em placas com meio YEPD.....	37
Figura 11 - Linhagem CCA 005 cultivadas em meio YEPD.após 5 dias a 30° C e 2 dias a temperatura ambiente.....	40
Figura 12 - Linhagem CCA 005 cultivadas em meio YEP + 2% manose.após 5 dias a 30°C e 2 dias a temperatura ambiente.....	41
Figura 13 - Linhagem CCA 007 cultivadas em meio YEPD.após 5 dias a 30° C e 2 dias a temperatura ambiente.....	42
Figura 14 - Linhagem CCA 007 cultivadas em meio YEP + 2% frutose.após 5 dias a 30° C e 2 dias a temperatura ambiente.....	43

Figura 15 - Linhagem CCA 007 cultivadas em meio YEP. + 2% manose após 5 dias a 30°C e 2 dias a temperatura ambiente.....	44
Figura 16 - Linhagem CCA 209 cultivadas em meio YEP + 2% manose.após 5 dias a 30°C e 2 dias a temperatura ambiente.....	45
Figura 17 - Linhagem CCA 209 cultivadas em meio YEP.+ 2% frutose após 5 dias a 30°C e 2 dias a temperatura ambiente.....	46
Figura 18 - Morfologia das células de linhagens diplóides em meio SLAD	47
Figura 19 - Viabilidade (%) da linhagem CCA 193 em meio de caldo de cana, 12° Brix , a 30°C, em sistema de reciclo celular sem e com adição de álcool isoamílico a 0,1%.	49
Figura 20 - Número de células viáveis da linhagem CCA 193 em meio de caldo de cana 12° Brix, a 30°C, em sistema de reciclo celular sem e com adição de álcool isoamílico a 0,1%.....	49
Figura 21 - pH do meio de caldo de cana, 12° Brix, a 30°C, em sistema de Reciclo celular sem e com adição de álcool isoamílico a 0,1%, inoculado com a linhagem CCA193.....	51
Figura 22 - Produção de etanol (g/100mL) da linhagem CCA193 em meio de caldo de cana, 12° Brix, a 30°C, em sistema de reciclo celular sem e com adição de álcool isoamílico a 0,1%.....	51
Figura 23- Brix da linhagem CCA 193 em meio de caldo de cana, 12° Brix, a 30°C, em sistema de reciclo celular sem e com adição de álcool isoamílico a 0,1%.....	52
Figura 24 - Taxa de filamentação (%) apresentada pela linhagem CCA 193 em meio de caldo de cana, 12° Brix, a 30°C, em sistema de reciclo celular sem e com adição de álcool isoamílico a 0,1%.....	52
Figura 25 - Células da linhagem CCA193 nos ensaios fermentativos A. na ausência de álcool isoamílico, B. na presença de 0,1% de álcool isoamílico.....	53
Figura 26 - Morfologia da linhagem CCA 193 em meio líquido YEPD, acrescido de álcool isoamílico (AIA), a 160 rpm, 30°C.....	54

RESUMO

Caracterização de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* quanto a filamentação induzida por álcoois e deficiência de nutrientes

O uso de microrganismos na biotecnologia tem grande importância e interesse econômico no Brasil. Entre esses microrganismos a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem grande destaque nos processos fermentativos para produção de pães, bebidas e álcool combustível. Dimorfismo em *S. cerevisiae* (alteração na morfologia celular de células brotantes para estruturas filamentosas) tem sido observado em condições de deficiência de nitrogênio, carbono e presença de álcoois superiores. Isso pode ser um tipo de defesa da levedura, que ao encontrar um meio prejudicial ao seu desenvolvimento, através da alongação das células, crescimento hifal e da invasão do meio, cria novos mecanismos para encontrar alimento para o seu desenvolvimento. Neste trabalho, dezessete linhagens (haplóides e diplóides) de *S. cerevisiae* isoladas do processo fermentativo industrial para produção de etanol foram caracterizadas quanto à filamentação induzida por deficiência de carbono (crescimento invasivo), nitrogênio e presença de álcoois superiores, em meio de cultura sólido. Objetivou-se também avaliar a indução da filamentação por álcool isoamílico em condições de fermentação e seus efeitos sobre os parâmetros fermentativos. A maioria das linhagens apresentou filamentação em resposta aos álcoois isoamílico, butanol e isobutanol, não respondendo ao metanol, sendo mais marcante em linhagens haplóides. O álcool isoamílico foi o indutor mais eficiente em meio (YEPD), linhagens diplóides apresentaram crescimento invasivo, embora esse tipo de filamentação seja mais comum em linhagens haplóides. Resultados semelhantes foram observados quando se utilizou frutose e manose em substituição à glicose no meio de cultura. As linhagens não filamentaram em meio de cultura deficiente em nitrogênio (SLAD). A linhagem CCA193 (PE-02), extensivamente utilizada nas destilarias da região, foi escolhida para a indução da filamentação por álcool isoamílico em condições de fermentação (meio de caldo de cana e sistema de reciclo celular). A adição de 0,1% desse álcool superior afetou significativamente os parâmetros fermentativos, induzindo filamentação após o terceiro ciclo fermentativo, coincidindo com a recuperação da viabilidade celular, número de células viáveis, produção de etanol e diminuição do Brix residual, embora não se comparando aos valores alcançados ao final do sexto ciclo no tratamento sem álcool

isoamílico. Os resultados obtidos indicaram que a filamentação induzida por álcoois superiores e deficiência de nutrientes (especialmente carbono) é um processo comum em linhagens industriais de *S. cerevisiae* e pode contribuir para a manutenção/sobrevivência das células em condições adversas.

Palavras chave: *Saccharomyces cerevisiae*, Crescimento pseudohifal, Crescimento invasivo, Filamentação

ABSTRACT

Characterization of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* by filamentous growth induced by alcohol and nutrient deprivation

The use of microorganisms in biotechnology is an important and economical area of interest in Brazil. Among these, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is specially remarkable in baking industry and alcohol fermentation. Dimorphism in *S. cerevisiae* (cell morphology alterations from budding cells to filamentous structures) has been observed in conditions of nitrogen and carbon deprivation and presence of fusel alcohols. This can be a defense mechanism that allows the yeast to forage for nutrients through cell elongation, hyphal growth and medium invasiveness. In this work seventeen industrial strains of *S. cerevisiae* (haploid and diploid) isolated from the fermentative process for alcohol production were characterized for filamentation induced by carbon (invasive growth) and nitrogen deprivation and presence of fusel alcohol, in solid culture media. The induction of filamentation by isoamyl alcohol in fermentation condition was also aimed, evaluating its effects on the fermentative parameters. The majority presented filamentation induced by isoamyl alcohol, butanol and isobutanol, but not by methanol. The isoamyl alcohol was the most effective inducer in rich medium (YEPA), diploid strains showed invasive growth, although this kind of filamentous growth be common in haploid strains. Similar results were observed when fructose and mannose were utilized replacing glucose in the culture medium. In nitrogen-deficient medium (SLAD) the strains did not filament. The yeast strain CCA193 (PE-02), extensively used in the alcohol units, was chosen for filamentation induction by isoamyl alcohol in fermentation conditions (sugar cane juice medium and cell recycle system). The addition of 0.1% of this higher alcohol affected significantly the fermentative parameters, however filamentation was induced after the third fermentative cycle, coincident with the cell viability, viable cell number, ethanol production recuperation and residual Brix decrease, though the values were not comparable to the treatment without isoamyl alcohol by the sixth cycle. The results obtained indicate that the filamentation induced by higher alcohol and nutrient deprivation (specially carbon) is a common process in industrial strains of *S. cerevisiae* and can contribute for the cell maintenance/survival in adverse conditions.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Growth pseudohyphal, Growth invasive, Filamentation

1 INTRODUÇÃO

O uso de microrganismos na biotecnologia tem grande importância e interesse econômico no Brasil, tendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* grande destaque. Entre as suas utilizações pode-se destacar a produção de pães, bebidas e álcool.

As leveduras são fungos unicelulares, crescimento vegetativo por brotamento, diferenciando-se assim dos demais fungos que possuem crescimento filamentoso.

Existem fungos que possuem a capacidade de se desenvolver tanto na forma filamentosa como na forma de levedura, sendo então chamado de dimórficos. Entre esses fungos estão o fungo do milho *Ustilago maydis* e a levedura *Candida albicans*. Normalmente o estado dimórfico está relacionado com a invasão do tecido hospedeiro e sua patogenicidade (BANUETT, 1995).

No caso da levedura *S. cerevisiae*, tem sido observado dimorfismo em condições de falta de nitrogênio, carbono e presença de álcoois superiores. Isso pode ser um tipo de defesa da levedura que, ao encontrar um meio prejudicial ao seu desenvolvimento, através da alongação das células, crescimento hifal e da invasão do meio, cria novos mecanismos para encontrar alimento para o seu desenvolvimento.

A maneira de proliferação do organismo, se na forma agregada ou dispersa, é potencialmente um fator limitante na produção dos metabólitos desejados, utilização do meio de crescimento e/ou separação da massa celular do produto solúvel. O clássico exemplo do auto-clareamento das cervejas no final da fermentação pela floculação e decantação da levedura ‘ale’ mostra que o controle sobre a morfologia celular e/ou adesão célula/célula é uma característica altamente desejável em um microrganismo industrial.

Além disso, deve-se ter em mente que adesão e morfologia celular não são as únicas características que mudam durante a transição dimórfica. Muitos fungos mudam também seus padrões de conversão metabólica, expressão gênica e secreção de proteína. Células leveduriformes e filamentosas também diferem na expressão e acúmulo de constituintes celulares indesejáveis e na facilidade com a qual as células podem ser rompidas ou fracionadas (PALECEK et al., 2002).

Através do monitoramento microbiológico da fermentação etanólica em unidades industriais e safras diversas, já foram encontrados biótipos de levedura com células

dispostas em cadeias, alongadas, havendo relatos de perda de parte do mosto das dornas pelo extravasamento da mesma devido a uma espuma que se formava durante a fermentação (CECCATO-ANTONINI; PARAZZI, 2000).

Tendo em vista essa problemática na indústria da fermentação e o desenvolvimento relativamente recente desse assunto, há cerca de 14 anos, especialmente com *S. cerevisiae*, uma levedura largamente utilizada industrialmente, esse trabalho teve por objetivos:

- avaliar a filamentação apresentada por linhagens industriais de *S. cerevisiae* como resultado da deficiência de nitrogênio, carbono e presença de álcoois superiores, condições que ocorrem largamente durante o processo fermentativo para produção de etanol;
- avaliar se em condições de fermentação, leveduras industriais apresentam crescimento filamentoso.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Ciclo celular e dimorfismo

Leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem assexuadamente por brotamento. A célula-mãe apresenta uma pequena saliência na parede celular que aumenta gradualmente. Os citoplasmas da célula-mãe e célula-filha permanecem unidos por algum tempo até que a abertura de passagem do material intracelular entre elas se fecha, e a partir deste momento existem duas células fisiologicamente distintas, que na maioria das vezes se separam em seguida.

Existem três tipos de células de *S. cerevisiae*: **a**, **α** e **a/α**. Estes três tipos de células são capazes de diferenciação através de eventos extrínsecos e intrínsecos. No ciclo celular, células haplóides de *S. cerevisiae* secretam uma substância peptídica extracelular que controla o crescimento vegetativo. Cada tipo de célula secreta uma única substância (célula *a* secreta *a*-factor e célula *α* secreta *α*-factor), de forma que cada tipo de célula une-se com uma célula oposta, e com essa união tem início uma sequência de eventos – interrupção da divisão celular em G1, formação de projeções celulares, agregação das células opostas e fusão celular – e por último a fusão nuclear (LIU et al., 1993) conforme Figura 1.

O termo dimórfico tem sido usado para definir fungos que crescem vegetativamente tanto na forma de levedura como na forma filamentosa. Entre os fungos dimórficos pode ser citado o fungo *Ustilago maydis*, patógeno do milho (BANUETT, 1995) e a levedura *Candida albicans*, patógeno de diversas espécies (LO et al., 1997). O crescimento filamentoso é considerado uma importante adaptação dos microrganismos em resposta a meios com condições adversas (LEE; ELION, 1999). As células filamentosas conseguem aumentar a relação superfície/volume e portanto gastar menos energia à procura de nutrientes (PALECEK et al., 2002).

A levedura *S. cerevisiae* é dimórfica, capaz de crescer na forma de levedura ou na forma filamentosa. Uma variedade de condições promove crescimento pseudohifal, como condições limitantes de nitrogênio (GIMENO et al., 1992), meio com fonte pobre em carbono (LAMBRECHTS et al., 1996) ou outras condições de “stress” (LORENZ et al., 2000).

Figura 1 - Ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae* 1. Diagrama mostrando as fases do ciclo celular de uma célula haplóide em crescimento vegetativo (brotamento). 2. A fusão célula-célula e diploidização ocorrem através da formação de uma projeção, em seguida crescimento polarizado em direção ao 'mating type' oposto. 3. Os diplóides podem ter destinos diferentes dependendo das condições do meio de crescimento, N representando nitrogênio, C é fonte de carbono, letras minúsculas indicam deficiência e letras maiúsculas indicam abundância do nutriente. (Modificado de MARTINEZ-ANAYA, 2002).

A diferenciação em pseudohifas é complexa e envolve o caminho MAPK quinase e um receptor/G proteína/ cAMP interconectados (LIU et al., 1993; LORENZ et al., 2000). Os eventos de sinalização ainda não são bem entendidos, mas a exigência de duas proteínas na superfície celular, a amônio permease MEP2 e a G proteína que é receptor GPR1, implica na existência de um sinal extracelular (LORENZ; HEITMAN, 1998; LORENZ et al., 2000). A proteína Mep2 permease é um receptor de alta afinidade de amônio e as células a usam para descobrir combinações de nitrogênio. Linhagens deficientes nesta proteína Mep2 podem adquirir amônio e crescer a taxas normais, mas não formam filamentos em resposta a limitação de amônio. Estes resultados sugerem que a proteína Mep2 em condições de escassez de nitrogênio produz um sinal que conduz à diferenciação filamentosa.

O genoma da levedura *S. cerevisiae* contém uma família de proteínas da parede celular que são relatadas como adesivas em fungos patogênicos. Esse processo é chamado de floculação, processo assexual reversível, onde as células aderem –se umas às outras resultando na formação de agregados (BONY et al., 1997) As proteínas Flo1, Flo5, Flo9, e Flo10 são chamadas de floculantes (CARO et al., 1997) porque promovem a adesão célula-célula, sendo dependentes da concentração de açúcar no meio (TEUNISSEN; STEENSMA, 1995).

Cunha et al. (2006) em estudo sobre floculação, transformou linhagens de leveduras que não eram floculantes com o gene *FLO5*, o qual é expressado somente em condições limitantes de glicose. As leveduras com o gene *FLO5* só se agregavam quando o açúcar já havia sido consumido integralmente.

O segundo grupo da família Flo incluem três proteínas Flo11p, Fig2p, e Aga1p. Para o dimorfismo, a mais importante é a Flo11p requerida para desenvolvimento pseudohifal em linhagens diplóides e crescimento invasivo em haplóides (LAMBRECHTS et al., 1996; LO e DRANGINIS, 1998). No crescimento invasivo em haplóides, as células aderem à superfície do ágar, não sendo removidas pela lavagem (ROBERTS; FINK, 1994). No crescimento pseudohifal, as células aderem umas às outras após a divisão celular formando longas cadeias de filamentos (GIMENO et al., 1992).

Após um extensivo trabalho, Gimeno et al. em 1992, mostraram que uma linhagem diplóide *a/α* de *S. cerevisiae* sempre desenvolvia pseudohifas bem definidas, dentro de um curto período de tempo, quando crescidas em placas com meios de baixa concentração de nitrogênio. O dimorfismo foi relatado somente em culturas em placas. Considerava-se que só as células diplóides produziam pseudohifas, porém mais tarde foi mostrado que as células haplóides produziam pseudohifas sob certas condições (WRIGHT et al., 1993). Em geral, as pseudohifas haplóides demoram mais para se formar, são menos vigorosas, mais ramificadas e mais curtas que as pseudohifas diplóides. Para a linhagem haplóide houve necessidade de oxigênio para a mudança morfológica ocorrer e se manter.

Kuriyama e Slaughter (1995) demonstraram que a limitação do crescimento pela fonte de nitrogênio ou oxigênio durante o cultivo contínuo resultou na formação de pseudohifas truncadas, ocasionalmente ramificadas, e com até cinco células de extensão.

Ceccato-Antonini e Sudbery (2004) revisaram as tre formas de crescimento filamentoso (por deficiência de nitrogênio, invasividade do ágar e induzida por álcoois) e também

os caminhos envolvidos na percepção, sinalização e transdução do sinal durante o crescimento filamentoso em *S. cerevisiae*.

2.2 Indução de filamentação por álcoois

Dickinson (1996) observou que o cultivo de *S. cerevisiae* em meio mínimo, com etanol como fonte de carbono e leucina como fonte de nitrogênio resultou na formação das chamadas pseudohifas grandes, que o autor julgou mais apropriado denominar de “extensões semelhantes a hifas”. Mostrou ainda que os álcoois fusel induziram a formação de pseudohifas em *S. cerevisiae*, sendo o n-amil tão eficiente quanto o isoamílico.

Álcoois fusel ou superiores se referem à mistura de compostos remanescentes após a remoção do etanol por destilação, sendo obtido na fração de ponto de ebulição entre 90 e 150°C da destilação de um meio fermentado, sendo composto principalmente pelos álcoois: isoamílico (3 metil butanol-1), amílico opticamente ativo (2 metil butanol 1), que juntos correspondem a mais de 50% do total de álcoois superiores; isobutílico (2 metil propanol-1 e n-propílico). Esses compostos se caracterizam pelo maior número de átomos de carbono e ponto de ebulição mais elevado que o etanol.

Webb e Ingraham (1963) relataram que Erlich, já em 1907, observou que os álcoois superiores são formados a partir dos aminoácidos, pois constatou que a adição de leucina durante a fermentação alcoólica estimulou a produção de álcool isoamílico. Contudo, o fornecimento de fonte de nitrogênio inorgânico inibiu a produção do óleo fusel (OUCHI et al., 1980).

Estudo mais recente confirmou que os álcoois isoamílico e isobutanol são produzidos a partir do catabolismo de leucina e valina. As leveduras não podem utilizar cadeias de aminoácidos como fonte de carbono mas podem utilizá-los como fonte de nitrogênio em condições limitantes, com produção de álcoois fusel (DICKINSON, 1996). Sabe-se que a produção de álcoois superiores ocorre através da descarboxilação dos cetoácidos, reação catalisada pela enzima piruvato descarboxilase, intermediários na biossíntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina, gerando aldeídos. Em seguida, esses são reduzidos pela ação da desidrogenase alcoólica até álcoois, independentemente dos aminoácidos presentes no meio de fermentação (AYARAPAA, 1967 *apud* CHERUBIN, 1998).

Fatores como temperatura, pH, crescimento celular e produção de etanol podem influir na formação de álcoois superiores (RANKINE, 1967; AYRAPAA, 1970; GUTIERREZ, 1994).

Diversas linhagens de leveduras são suscetíveis à presença de álcoois superiores apresentando crescimento filamentoso na presença deles.

Observações feitas por Ceccato-Antonini e Parazzi (2000) no monitoramento microbiológico da fermentação etanólica, em unidades industriais e safras diversas, indicaram a presença de um biótipo de levedura com células dispostas em cadeias, apresentando colônias opacas, superfície crespada, pertencendo à espécie *S. cerevisiae*. Esse biótipo apresentou alto crescimento, permanecendo na superfície das dornas, formando uma espécie de espuma grossa, pegajosa, causando extravasamento de mosto das dornas e conseqüentemente perda de açúcar e álcool. As células das cadeias apresentavam-se alongadas, como pseudohifas, e a visualização dessas estruturas só foi possível através do exame microscópico direto das amostras, e não através do plaqueamento das mesmas.

Dando continuidade ao trabalho sobre a influência de fatores como álcoois superiores e nitrogênio sobre o dimorfismo em leveduras foram testadas diversas linhagens industriais em ensaios *in vitro*. Estes ensaios mostraram que o álcool isoamílico nas concentrações de 0,3 a 0,9% (v/v) induziu alterações morfológicas em duas linhagens industriais, CCA037 e CCA567, levando à formação de pseudohifas e agrupamentos celulares em forma de cachos, respectivamente (CECCATO-ANTONINI ; SILVA, 2002).

2.3 Indução de filamentação por deficiência de nutrientes

Estudando a influência do carbono em células de leveduras, Cullen e Sprague Jr (2000) obtiveram evidências que a carência de glicose ou outro açúcar fermentável causava crescimento invasivo em linhagens haplóides. O crescimento invasivo é caracterizado por um discreto alongamento das células, passando de um modelo axial para um modelo bipolar de brotamento. Em diplóides, no crescimento pseudohifal em condições de estresse de nitrogênio, a transição é mais dramática, havendo mudanças na forma das células, separação celular, ciclo de vida e invasão do ágar (KRON; GOW, 1995). A mais notável mudança é na morfologia da célula que se apresenta altamente alongada (GIMENO et al., 1992; KRON et al., 1994), e os brotos

permanecendo unidos após o fim do ciclo celular completo, mostrando incompleta separação celular. As cadeias de células alongadas são capazes de invadir o ágar. A observação macroscópica dessa mudança é uma colônia de células com múltiplas projeções irradiando-se da massa celular (GIMENO, et al., 1992).

No trabalho de Cullen e Sprague Jr (2000), foram utilizadas linhagens selvagens, que exibiam crescimento invasivo em meio rico, quando a glicose era suprimida. Em meio sintético sem glicose, as células adotaram morfologia alongada, o modelo de brotamento unipolar e invasão do ágar. No estudo da influência da glicose na formação de células invasivas, foi observado que a glicose tem controle sobre as proteínas Snf1 e Sip4. O crescimento invasivo em relação à fonte de carbono requer o gene repressor *Snf1* (GANCEDO, 1998; CARLSON, 1999). Esse Snf1 é exigido para a expressão do gene glicose–repressor responsável pelo crescimento invasivo na ausência de glicose, via transcrição do fator Sip 4.

A fonte de carbono também pode influir no crescimento das leveduras, e a amilopectina, por exemplo, induziu crescimento de filamentos (LAMBRECHTS et al., 1996) e a depleção de glicose em presença de butanol permitiu o crescimento filamentoso (LORENZ et al., 2000).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Foram utilizadas culturas pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), CCA/UFSCar, isoladas de processos fermentativos, conforme Tabela 1.

A caracterização da ploidia das linhagens foi feita incubando-se as linhagens em meio acetato de potássio, por 3-5 dias, a 30°C. Após esse período, através de observações microscópicas, avaliou-se a presença de ascos e ascósporos, indicativo de linhagens diplóides (ou poliplóides). Além disso, a morfologia da colônia (colônias diplóides são mais mucosas e mais brancas que as colônias haplóides) e a forma das células (células diplóides são maiores, ovais, dispersas, enquanto as haplóides são menores, mais arredondadas e podem formar agrupamentos) também foram avaliadas.

As linhagens foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* através de testes fisiológicos, bioquímicos e moleculares (TOSTA, 2004)

As linhagens foram reativadas em placas de Petri e mantidas em tubos com meio YEPD à 4° C.

3.2- Meios de cultura e soluções

- meio YEPD - manutenção, reativação, preparo dos inóculos de multiplicação e ensaios sobre crescimento invasivo e efeitos dos álcoois - 1% extrato de levedura, 2% peptona; 2% glicose; 2% ágar,

- meio acetato de potássio - indução de esporulação -1% acetato de potássio; 0,1% extrato de levedura; 0,05% glicose; 2% ágar.

- meio SLAD (MANEESRI et al., 2003) - ensaio sobre crescimento filamentoso em meio com nitrogênio limitante: 0,17% 'yeast nitrogen base' sem aminoácidos, 6,6 mg/L sulfato de amônio, esterilizado por filtração; 2% agar e 2% de glicose;

- meios para os testes fermentativos: inicialmente o caldo de cana (obtido junto à Usina Santa Lúcia, Araras, SP) foi clarificado utilizando-se a técnica de Falcão de Moraes et al. (1993), que consistiu em adicionar uma clara de ovo batida em ponto de neve para cada litro de caldo a ser clarificado, colocando a mistura em recipiente de alumínio, em autoclave com água

em ebulição, e com a tampa semi-aberta (vapor fluente). Após 20 minutos, procedeu-se o resfriamento e as diluições necessárias assim como a adição de nutrientes, após determinação do Brix (°) em refratômetro digital.

Os meios de caldo de cana foram diluídos nas concentrações desejadas com água destilada e acrescidos de solução de sais: 50g/L de sulfato de amônio, 20g/L de fosfato monobásico de potássio, 10g/L de sulfato de magnésio, 1g/L de sulfato de zinco e 1g/L de sulfato de manganês.

Para o meio de multiplicação utilizou-se caldo de cana clarificado 4° Brix com 10 mL de solução de sais por litro de meio com pH ajustado para 5,5-6,0.

Para o meio de fermentação foi utilizado caldo de cana clarificado 12° Brix, com 10 mL de solução de sais por litro de meio com pH ajustado a 4,3.

Todos os meios foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 120°C e 1 atm.

Tabela 1 - Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas nos testes de indução de filamentação

Sigla ¹	Isolamento/Característica	Local de obtenção
CCA005	Destilaria	Usina Delta
CCA 007	Fermentação saké	Desconhecida
CCA 008	Desconhecida	YGSC-EUA ²
CCA 012	Fermentação	Usina Santa Lúcia
CCA 022 ³	Vinho	Usina São Marino
CCA 023	Vinho	Usina São Marino
CCA 027 ⁴	Vinho	Usina São Marino
CCA 035	Vinho	Usina São Marino
CCA 037 ⁵	Vinho	Usina São Marino
CCA 083	Fermento	Destilaria Álcoazul
CCA 151	Vinho	Usina São Marino
CCA 182	Σ1278b mat a	Universidade de Sheffield- UK
CCA 190	Levedura de panificação	-
CCA 193 ⁶	Vinho	Usina da Pedra
CCA 209	Vinho	Usina Diamante
CCA 385	Vinho	Usina Diamante
CCA 397	Fermento	Usina Santa Lúcia

¹ – CCA é a sigla para Centro de Ciências Agrárias

² – YGSC significa Yeast Genetics Stock Cultures

^{3,4,5} – NCYC3237, NCYC3231 e NCYC 3232, respectivamente

⁶ – Cedida pela Fermentec – Piracicaba. SP (também denominada PE-02, NCYC3233)

3.3 Influência dos álcoois superiores

A Tabela 2 mostra os álcoois testados e as concentrações utilizadas, tendo sido adicionados ao meio YEPD após autoclavagem e resfriamento a 56°C, sendo a seguir vertido em placas. Pela grande volatilidade do butanol, as placas foram embrulhadas com papel filme para não contaminar as outras placas.

As linhagens haplóides e diplóides foram inicialmente inoculadas em YEPD e incubadas por 2 dias a 30°C, sendo a seguir inoculadas nos meios contendo os diferentes álcoois e incubadas a 30°C. A seguir a análise da morfologia celular foi realizada em microscópio óptico, em lâminas montadas em água destilada. Foi utilizada uma câmara fotográfica digital marca Sony Cyber (5.1 megapixels) para registro das imagens ao microscópio na lente objetiva de 40X.

Tabela 2 - Alcoóis utilizados e respectivas concentrações nos ensaios sobre a indução de filamentação.

Álcool	Concentrações utilizadas (%)			
Isoamilico	0,08	0,32	0,5	1
Isopropanol	0,08	0,32	0,5	1
Isobutanol	0,08	0,32	0,5	1
Metanol	0,08	0,32	0,5	1
Butanol	0,75	1,0	1,25	1,5
Propanol	0,75	1	1,5	2

3.4 Influência da fonte e concentração de carbono

O meio YEPD foi utilizado para avaliar a influência que carboidratos fermentáveis têm na formação de hifas invasivas do meio de crescimento. Foram utilizados manose (2%), frutose (2%) e amido (1%) em substituição à glicose (2%) do meio de cultura. Foi também avaliada a invasão em meio rico, isto é, em meio YEPD (com glicose). As linhagens foram inoculadas nos meios de cultura e as placas foram incubadas por 3 dias a 30°C, e 2 dias à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas com água estéril, e com os dedos protegidos por luvas, as células foram retiradas da superfície da placa. Se a linhagem possui crescimento invasivo as colônias deixam ‘marcas’ no ágar.

Foram então realizados cortes transversais do meio de cultura após lavagem das células, conforme Figura 2

Figura 2 - Preparação da lâmina para observação de crescimento invasivo após lavagem das células do meio de cultivo. 1. retirada de um pedaço do meio, 2. corte transversal fino, 3. Lâmina para observação em microscópio.

A análise da morfologia celular das colônias e dos cortes do meio de cultura foram realizadas em microscópio óptico, Foi utilizada uma câmara fotográfica digital marca Sony Cyber (5.1 megapixels) para registro das imagens ao microscópio na lente objetiva de 40X.

3.5 Influência da concentração de nitrogênio

Para avaliação do crescimento filamentosos induzido por deficiência de nitrogênio, foi utilizado o meio SLAD. Depois da solidificado o meio, a linhagem foi inoculada através de “replica – plating”. Para isso as linhagens a serem testadas foram inicialmente inoculadas em YEPD e crescidas por dois dias à 30°C constituindo a placa mestre. Pedacos de veludo esterilizados foram utilizados para a transferência das colônias para o meio SLAD. As placas foram incubadas a 30°C por um período de 7 dias. A análise da morfologia celular foi realizada em microscópio óptico, em lâminas montadas em água destilada. Foi utilizada uma câmara fotográfica digital marca Sony Cyber (5.1 megapixels) para registro das imagens ao microscópio na lente objetiva de 40X.

3.6 Ensaios de fermentação

3.6.1. Propagação de células para obtenção de inóculo

O inóculo de multiplicação foi preparado em duas fases de cultivos sucessivos. Na primeira fase, a de pré-inóculo, transferiu-se a levedura para uma placa de Petri com meio de reativação YEPD e posteriormente essa foi incubada a 30°C por 48 horas.

Na segunda fase, para obtenção do inóculo, foram transferidas duas alçadas de células da placa de Petri para um tubo de ensaio contendo 20 mL de solução salina 0,85% (0,85g de NaCl/100mL de água destilada). Após homogeneização, transferiu-se 1 mL dessa suspensão para um erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL do meio de multiplicação, depois mantido em incubadora a 30°C, sob agitação de 160 rpm, por 24 horas. A massa celular obtida foi separada por centrifugação, a uma rotação de 4000 rpm, durante 5 minutos. As células oriundas da centrifugação foram incubadas novamente no mesmo meio e submetidas às mesmas condições de crescimento.

3.6.2 Testes fermentativos

Os testes fermentativos foram realizados em erlenmeyers de 500 mL com 150 mL do meio de fermentação, 20% inóculo vol/vol em triplicata, mantidos em estufa a 30°C durante 6 ciclos de 12 horas. O caldo fermentado (vinho) remanescente foi centrifugado e a biomassa ressuspensa em novo meio de fermentação, em erlenmeyer correspondente, iniciando-se assim o segundo ciclo fermentativo, e sucessivamente até o sexto ciclo. Ao final de cada ciclo, retirou-se um volume equivalente a 5% (7,5 mL) de cada amostra, assim como 40 mL do centrifugado para análises, conforme Ceccato-Antonini et al. (2004).

Ao meio de fermentação no início de cada ciclo, adicionou-se álcool isoamílico nas concentrações de 0,1% para avaliar a influência deste no processo fermentativo e na morfologia da levedura.

3.6.3 Análises

3.6.3.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada através de contagem ao microscópio em câmara de Neubauer (LEE et al, 1981) , utilizando-se solução de azul de metileno com citrato de sódio (0,01 g de azul de metileno e 2,0 g de citrato de sódio em 100 mL de água destilada), como corante. A viabilidade foi obtida pela relação (em porcentagem) entre células viáveis e número total de células (vivas e mortas).

3.6.3.3 Etanol

Para determinação de etanol procedeu-se inicialmente à destilação da amostra de vinho (centrifugado) em microdestilador e posteriormente, determinou-se o teor alcoólico através da densidade alcoólica obtida em densímetro digital Anton Paar (DMA-45).

3.6.3.3 pH

O pH foi obtido com auxílio de potenciômetro digital Tecnal.

3.6.3.4 Brix

Os sólidos solúveis (sacarose) foram determinados pelo processo refratométrico, expressos em graus Brix, utilizando-se refratômetro digital.

3.6.3.5 Taxa de filamentação

Ao final de cada ciclo fermentativo, foram contadas ao microscópio 100 células, discriminando-as pela presença de células sem filamentação e células filamentosas, sendo também realizada a contagem do número total de células em cada tratamento.

3.6.3.6 Análise estatística

Foi utilizado o teste “T” para avaliar a ocorrência de diferença significativa entre os tratamentos (com 0,1% de álcool isoamílico e sem álcool) quanto aos parâmetros fermentativos: viabilidade celular, pH, Brix residual e produção de etanol. A análise estatística foi realizada no software Microsoft Excel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 3 e 4 mostram a morfologia das células das linhagens estudadas crescidas em meio YEPD, a 30°C, não submetidas à indução de filamentação.

Figura 3 - Morfologia das células das linhagens diplóides crescidas em meio YEPD

Figura 4 - Morfologia das células das linhagens haplóides crescidas em meio YEPD.

4.1 Indução de filamentação por álcoois

Seis tipos de álcoois superiores (isoamílico, butanol, propanol, metanol, isopropanol e isobutanol) em diferentes concentrações foram testados para verificar a indução de filamentação em linhagens industriais de *S. cerevisiae*. As concentrações dos álcoois foram definidas em testes prévios.

Com as linhagens diplóides de *S. cerevisiae*, os álcoois isoamílico, butanol, isopropanol e isobutanol induziram filamentação em 50% das linhagens; o isoamílico foi o mais eficaz. As linhagens CCA008, CCA023, CCA193 e CCA397 foram as que mais se destacaram (Tabela 3).

O metanol não induziu filamentação nas concentrações de 0,08 a 1%. Com propanol, somente CCA005 apresentou filamentação a 2% de álcool (Tabela 3).

Já com as linhagens haplóides, a indução da filamentação por álcoois foi bem mais significativa. Somente uma linhagem, CCA027, não apresentou crescimento filamentoso e

novamente o metanol não induziu filamentação em quaisquer das linhagens. O álcool isoamílico e o isobutanol foram os mais eficientes indutores (Tabela 4).

A linhagem CCA182 (Σ 1278b, mat a) é extensivamente utilizada nos trabalhos sobre filamentação por responder rapidamente aos estímulos externos como presença de álcoois, produzindo pseudohifas (MARTINEZ-ANAYA et al, 2003). Neste trabalho, somente filamentou em resposta ao álcool isoamílico e isopropanol. As linhagens industriais tiveram filamentação mais marcante e extensiva que esta linhagem de laboratório mostrando que esse processo é bem difundido em linhagens industriais e o seu papel ainda não está bem esclarecido. O controle ativo do crescimento dimórfico pode tirar vantagem destes circuitos para aumentar a tomada de reagentes (pelo aumento da relação superfície/volume) ou secreção de produtos em aplicações industriais ou para fornecer novas estratégias para combater a colonização ou invasão pelos fundos dimórficos (CECCATO-ANTONINI; SUDBERY, 2004). No caso da fermentação etanólica é interessante investigar se essa transição dimórfica (desencadeada por estímulos potencialmente presentes no meio de fermentação, como álcoois superiores e deficiência de nutriente) é prejudicial ou benéfica ao processo.

Observou-se uma variabilidade de resposta dependente da linhagem, do tipo e concentração do álcool utilizada. Nenhuma das linhagens filamentou na presença de todos os álcoois tampouco um álcool conseguiu induzir filamentação em todas as linhagens. A única unanimidade foi a linhagem CCA027, que não filamentou com qualquer dos álcoois. Essa linhagem foi caracterizada anteriormente através de testes moleculares e das respostas ao estresse do meio e poderia se constituir num excelente modelo para se estudar a resistência à filamentação nos seus aspectos genéticos.(CECCATO-ANTONINI et al., 2005).

Tabela 3 - Indução de filamentação por álcoois em linhagens diplóides de *Saccharomyces cerevisiae*

Linhagem	Isoamilico (%)				Butanol (%)				Propanol (%)				Metanol (%)				Isopropanol (%)				Isobutanol (%)			
	0,08	0,32	0,5	1,0	0,75	1,0	1,25	1,5	0,75	1,0	1,5	2,0	0,08	0,32	0,5	1,0	0,08	0,32	0,5	1,0	0,08	0,32	0,5	1,0
CCA005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
CCA007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCA008	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CCA 012	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCA 023	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CCA 190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCA 193	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CCA 209	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCA 397	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda:

+ presença de estruturas filamentosas

- ausência de estruturas filamentosas

Tabela 4 - Indução de filamentação por álcoois em linhagens haplóides de *Saccharomyces cerevisiae*

Linhagem	Isoamilico (%)				Butanol (%)				Propanol (%)				Metanol (%)				Isopropanol (%)				Isobutanol (%)			
	0,08	0,32	0,5	1,0	0,75	1,0	1,25	1,5	0,75	1,0	1,5	2,0	0,08	0,32	0,5	1,0	0,08	0,32	0,5	1,0	0,08	0,32	0,5	1,0
CCA 022	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CCA 027	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCA 035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CCA 037	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
CCA 083	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
CCA 151	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
CCA182	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
CCA 385	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+

Legenda:

+ presença de estruturas filamentosas

- ausência de estruturas filamentosa

As figuras 5 a 10 mostram a morfologia das células crescidas na presença de álcoois. Observou-se que para as linhagens haplóides, a filamentação expressou-se através da alongação das células e/ou agrupamentos das células, como para as linhagens CCA151, CCA022, CCA083 e CCA385. Essa última apresentou um crescimento filamentosso muito marcante, com intenso agrupamento das células e extensiva alongação celular na presença de isobutanol e butanol.

Nas diplóides, predominou a alongação celular, como observado para as linhagens CCA012 e CCA397.

Os resultados observados neste trabalho se assemelham com aqueles obtidos por Lorenz et al. (2000) que demonstraram o papel de vários álcoois no crescimento celular e na morfologia celular de *S. cerevisiae*. Os álcoois etanol, metanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol, isoamilico e álcool n-amil estimularam a diferenciação de células haplóides em filamentos, similarmente á filamentação induzida por deficiência de nitrogênio em diplóides, desenvolvendo pseudohifas.

Observações feitas por Martinez-Anaya et al. (2003) mostraram que o álcool isoamílico causa uma rápida formação de cadeias lineares de brotos anucleados, induzindo o “checkpoint” morfogenético dependente do gene *SWE1* e assim o fenótipo pseudohifal resultante surge de uma forma inteiramente diferente da formação de pseudohifas induzidas por deficiência de nitrogênio.

Casalone et al. (2005) caracterizaram a morfologia celular e aspecto das colônias de populações naturais de *S. cerevisiae* em condições de deficiência de nitrogênio e da adição de álcoois, encontrando grande distribuição de linhagens que apresentavam dimorfismo. O álcool etanol e o isoamilico foram bons indutores de filamentação e também de crescimento invasivo para a maioria das linhagens estudadas.

Foram realizados testes com etanol em várias concentrações, porém não houve qualquer alteração na morfologia celular das linhagens, somente com os álcoois superiores.

Figura 5 - Linhagem CCA012 cultivada em placas com meio YEPD. A. sem álcool; B. com 1,25% butanol .

Figura 6 - Linhagem CCA022 cultivada em placas com meio YEPD. A. sem álcool; B com 0,5% butanol; C. com 1% isobutanol; D. com 0,5% álcool isoamilico .

Figura 7 - Linhagem CCA083 cultivada em placas com meio YEPD. A. sem álcool; B. com 0,5% butanol; C. com 1% butanol .

Figura 8 - Linhagem CCA151 cultivada em placas com meio YEPD. A. sem álcool; B com 0,32% isobutanol; C. com 1,25% butanol; D.com 0,32% álcool isoamimico

Figura 9 - Linhagem CCA385 cultivada em placas com meio YEPD. A. sem álcool. B. com 0,5% isoamilico; C. com 1% isobutanol; D. com 1,0% butanol .

Figura 10 - Linhagem CCA397 cultivada em placas com meio YEPD. A. sem álcool; B. com 0,32% álcool isoamílico; C. com 0,5% álcool isoamílico; D. com 1,25% butanol.

4.2 Indução de filamentação por deficiência de carbono

As leveduras utilizadas neste trabalho foram avaliadas quanto a ocorrência de crescimento invasivo em meio sólido (YEPD) com quatro fontes diferentes de carbono: glicose, manose, frutose e amido. A Tabela 5 mostra os resultados obtidos com somente 3 linhagens, as quais foram as únicas a apresentarem esse tipo de filamentação de forma mais marcante. Com amido como fonte de carbono houve redução drástica no crescimento das leveduras.

Tabela 5 - Crescimento invasivo em meio YEPD, YEP com acréscimo de manose, frutose e amido em linhagens industriais de *S. cerevisiae*.

Levedura	YEPD	Manose 2%	Frutose 2%
CCA005	+	+	-
CCA007	+	+	+
CCA209	-	+	+

Legenda: + presença de marcas deixadas no agar após a lavagem das células
 - ausência de marcas deixadas no agar após a lavagem das células

Em resposta a longos períodos de incubação em meio rico (YEPD) e com a diminuição da concentração de glicose ou outra fonte de carboidrato fermentável, as células das linhagens haplóides de *S. cerevisiae* se alongam e invadem o ágar, (ROBERTS; FINK., 1994), durante o fim da fase exponencial ou na fase estacionária do crescimento (BONY et al., 1997).

A limitação nutricional que ocorre no meio de cultura estimula o crescimento invasivo nas células haplóides. As hifas das leveduras invadem o ágar à procura de nutrientes deixando marcas no ágar que podem ser visualizadas após a retirada das células da superfície do meio.

A remoção de outro nutriente do meio como a peptona e o extrato de levedura não provoca crescimento invasivo como constatado por Cullen e Sprague Jr (2000).

Entretanto, os resultados aqui obtidos não apontaram o crescimento invasivo como exclusivo de linhagens haplóides, pois as leveduras diplóides também apresentaram esse tipo de filamentação. Gancedo (2001) já havia observado que tanto diplóides quanto haplóides crescem invasivamente; em diplóides, os filamentos se estendem além da colônia, enquanto que em haplóides os filamentos não se estendem significativamente. Além disso, observou também

que as células diplóides invadiam o ágar mais vigorosamente que as haplóides, seus filamentos resistindo à lavagem vigorosa das células da superfície do ágar, enquanto que as haplóides não suportavam a vigorosa lavagem .

Foi retirado um pedaço do ágar onde as células das leveduras haviam crescido invasivamente e através de corte transversal do ágar obteve-se uma fina camada sendo possível visualizar no microscópio a morfologia das células. As Figuras 11 a 17 mostram as placas após lavagem do meio de cultura para retirada das células, mostrando as “marcas” características do crescimento invasivo e a morfologia das células visualizadas em microscópio. As linhagens CCA005, CCA007 e CCA209 não apresentaram indução de filamentação por álcoois, com exceção do isopropanol para CCA005, sugerindo caminhos diferentes para a indução de filamentação por álcoois e deficiência de carbono.

Em *S. cerevisiae*, a proteína Snf1 quinase altamente conservada tem função adaptativa em condições de limitação de glicose, mas possui também outras implicações em resposta a outros tipos de estresse (GANCEDO, 1998, CARLSON, 1999). Investigações mais recentes mostraram que a proteína Snf1 é requerida no crescimento invasivo em linhagens haplóides e diplóides (CULLEN; SPRAGUE JR, 2000).

Outra linha para a explicação do crescimento invasivo em linhagens haplóides é que o crescimento é controlado pelos hormônios sexuais . No ambiente natural existem células de leveduras diplóides e haplóides, sendo porém o estado haplóide do ciclo de vida essencialmente curto na natureza. Em baixas concentrações de hormônios sexuais, ocorre crescimento invasivo, sugerindo que esse crescimento pode ser um mecanismo pelo qual as células das leveduras possam localizar outra célula sexual distante, e é sabido que células de leveduras respondem a gradiente de hormônios sexuais (ROBERTS et al, 2000) .

Uma abordagem interessante para o dimorfismo em *S. cerevisiae* está na questão do fator de virulência característico das leveduras patogênicas, cuja habilidade de formas pseudomicélio é essencial para a penetração das barreiras do organismo hospedeiro. Apesar dessa espécie ser considerada relativamente não patogênica em indivíduos saudáveis, a sua proliferação em humanos podem não requerer qualquer modificação especial das linhagens encontradas no ambiente, segundo Casalone et al. (2005)

A habilidade de penetração no ágar pode também estar relacionado ao habitat natural das leveduras dessa espécie, as quais colonizam uvas e colmos de cana-de-açúcar.

Figura 11 - Linhagem CCA005 cultivada em meio YEPD após 5 dias a 30° C e 2 dias a temperatura ambiente. A. aspecto da placa antes da lavagem; B aspecto da placa após a lavagem onde se evidência as “marcas” no ágar característico do crescimento invasivo; C. corte transversal do meio mostrando células crescendo para dentro do ágar, sob microscopia óptica em aumento de 100X; D. detalhe das células em lâminas sob microscopia óptica a aumento de 400X

Figura 12 - Linhagem CCA005 cultivada em meio YEP + 2% manose após 5 dias a 30° C e 2 dias a temperatura ambiente. A. aspecto da placa antes da lavagem, B. aspecto da placa após a lavagem onde se evidência as “marcas” no ágar característico do crescimento invasivo ; C. corte transversal do meio mostrando células crescendo para dentro do ágar, sob microscopia óptica em aumento de 100X; D. detalhe das células em lâminas sob microscopia óptica a aumento de 400X .

Figura 13 - Linhagem CCA007 cultivada em meio YEPD após 5 dias em incubadora a 30° C e 2 dias a temperatura ambiente. A placa após período de incubação. B placa após a retirada das células mostrando marcas do ágar característica de crescimento invasivo. C corte transversal do meio onde células cresceram para dentro do ágar. D detalhe das hifas

Figura 14 - Linhagem CCA007 cultivada em meio YEPD + 2% frutose após 5 dias a 30° C e 2 dias a temperatura ambiente. A. aspecto da placa antes da lavagem; B. aspecto da placa após a lavagem onde se evidência as “marcas” no ágar característico do crescimento invasivo; C. corte transversal do meio mostrando células crescendo para dentro do ágar, sob microscopia óptica em aumento de 100X; D. detalhe das células em lâminas sob microscopia óptica a aumento de 400X

Figura 15 - Linhagem CCA007 cultivada em meio YEP + 2% manose após 5 dias a 30° C e 2 dias a temperatura ambiente. A. aspecto da placa antes da lavagem; B. aspecto da placa após a lavagem onde se evidência as “marcas” no ágar característico do crescimento invasivo; C. corte transversal do meio mostrando células crescendo para dentro do ágar, sob microscopia óptica em aumento de 100X; D. detalhe das células em lâminas sob microscopia óptica a aumento de 400X

Figura 16 - Linhagem CCA209 cultivada em meio YEP + 2% manose após 5 dias a 30° C e 2 dias a temperatura ambiente. A. aspecto da placa antes da lavagem; B. aspecto da placa após a lavagem onde se evidência as “marcas” no agar característico do crescimento invasivo; C. corte transversal do meio mostrando células crescendo para dentro do agar, sob microscopia óptica em aumento de 100X; D. detalhe das células em lâminas sob microscopia óptica a aumento de 400X

Figura 17 - Linhagem CCA209 cultivada em meio YEPD + 2% frutose após 5 dias a 30° C e 2 dias a temperatura ambiente. A. aspecto da placa antes da lavagem; B. aspecto da placa após a lavagem onde se evidencia as “marcas” no ágar característico do crescimento invasivo; C. corte transversal do meio mostrando células crescendo para dentro do ágar, sob microscopia óptica em aumento de 100X; D. detalhe das células em lâminas sob microscopia óptica a aumento de 400X.

4.3 Indução de filamentação por deficiência de nitrogênio

Para o bom desenvolvimento das leveduras, o meio deve conter uma fonte de nitrogênio além de uma fonte de carbono. As células de levedura podem utilizar uma ampla variedade de compostos nitrogenados como fonte de nitrogênio como amônio, aminoácidos e peptídeos (STEWART; RUSSELL, 1998).

Em meios onde ocorre limitação de nitrogênio, porém na presença de carbono, as células de *S.cerevisiae* podem apresentar dimorfismo (filamentação), como observado no trabalho pioneiro de Gimeno et al. em 1992.

A utilização de uma molécula nutriente pela célula tem que ser precedida pelo seu transporte através da membrana plasmática. Para o nitrogênio, existem três permeases para o íon amônio, codificadas respectivamente, pelos genes *MEP1*, *MEP2* e *MEP3*. Os transportadores

Mep 1p, Mep2p e Mep3p são importantes reguladores do crescimento pseudohifal em condições limitantes de nitrogênio (MARINI et al. , 1997).

Nos ensaios realizados em meio SLAD (deficiente em nitrogênio), nenhuma das linhagens estudadas apresentou alteração em sua morfologia. A Figura 18 mostra a morfologia das células crescendo em SLAD após 2 dias de incubação a 30°C. Duas linhagens não cresceram no meio SLAD, CCA182 e CCA190. A primeira é um a linhagem *ura⁻* e ao meio utilizado não foi adicionado uracil, portanto, a ausência de crescimento era esperada. Quanto à segunda linhagem (fermento de panificação), não se conhece a sua constituição genética.

Figura 18 - Morfologia das células de linhagens diplóides em meio SLAD

4.4 Ensaios fermentativos

A linhagem CCA193 (PE-02) foi escolhida para avaliar a indução da filamentação por álcool isoamílico em condições de fermentação. Essa levedura foi isolada da Usina da Pedra e tem sido extensivamente utilizada em destilarias para produção de etanol. Trabalhos realizados tem mostrado que essa levedura filamenta em resposta ao butanol (BRUNETTO, 2006); tem bom desempenho fermentativo (DORTA et al, 2006); esporula em condições de fermentação, como demonstrado pelos perfis de cariotipagem eletroforética (LOPES et al, 2002); e tem um rendimento em etanol ligeiramente inferior quando esporula (VANCETTO et al, 2006). Nos ensaios fermentativos, avaliou-se a viabilidade celular, produção de etanol, Brix residual, pH e taxa de filamentação da linhagem CCA193, com e sem adição de 0,1% de álcool isoamílico. Essa concentração foi escolhida devido a testes anteriores terem mostrado que 0,5% de álcool isoamílico inibia significativamente a fermentação, apesar de induzir filamentação em meio de crescimento (MIRANDA¹, informe verbal). Vale ressaltar que a concentração de 0,1% de álcool isoamílico ainda é superior àquela normalmente encontrada no óleo fusel, porém, em concentrações inferiores não foi possível induzir filamentação experimentalmente.

A partir do 3º ciclo pode-se observar alteração no número de células viáveis e viabilidade celular, na presença do álcool isoamílico, com decaimento no quarto ciclo e ligeira recuperação até o 6º. ciclo, conforme Figuras 19 e 20.

As figuras 21 a 23 mostram os resultados para pH do meio de fermentação, produção de etanol e Brix residual do meio fermentativo com a linhagem CCA193, onde observa-se o efeito negativo do álcool isoamílico sobre os parâmetros fermentativos.

¹Miranda, V.S. Universidade Federal de São Carlos – *Campus Araras*

Figura 19 - Viabilidade celular (%) da linhagem CCA 193 em meio de caldo de cana, 12° Brix , a 30°C, em sistema de reciclo celular sem e com adição de álcool isoamílico a 0,1%

Figura 20 - Número de células viáveis da linhagem CCA 193 em meio de caldo de cana, 12° Brix, a 30°C, em sistema de reciclo celular sem e com adição de álcool isoamílico a 0,1%

A análise estatística revelou que o álcool isoamílico possui efeito tóxico para as células das leveduras, pois afetou não somente o número de células viáveis e a viabilidade celular como também o pH, e produção de etanol, e Brix residual conforme Tabela 6. Houve diferença

estatística significativa entre os tratamentos, com e sem adição de 0,1% de AIA, para todos os parâmetros analisados.

Tabela 6 - Médias dos tratamentos (sem álcool isoamílico e com 0,1% álcool isoamílico e teste “t” realizado para os parâmetros viabilidade celular, pH , Brix residual e produção de etanol.

Variáveis analisadas	Médias		[Teste t]	Nível de significância (%)
	sem álcool isoamílico	com álcool isoamílico		
Viabilidade celular	99,55	84,50	4,75281**	0,0184
pH	3,70	3,44	4,933734**	0,00209
Brix residual	5,6	7,26	3,723405**	0,0732
Produção de etanol (g/100mL)	4,51	3,45	3,228092**	0,276

Legenda: ** significativo a 5 e 1%

O efeito cumulativo do álcool é verificado com maior intensidade a partir do 3º ciclo, a partir do qual também se verifica que as células filamentam com maior intensidade, permitindo uma ligeira recuperação da viabilidade celular (Figura 24). Isso pode significar que em condições adversas as células apresentam filamentação e conseguem se manter viáveis. A partir do 6º ciclo, as células no tratamento com álcool isoamílico apresentam recuperação nos parâmetros observados , sendo assim seria interessante observar se as células dessa linhagem de *S. cerevisiae* conseguem recuperar o potencial fermentativo (produção de etanol comparável ao tratamento sem álcool isoamílico) em ciclos sucessivos, devido principalmente ao fato de entrarem em processo de filamentação. Isso poderia demonstrar a utilidade desse processo na fermentação alcoólica, permitindo à levedura a sua manutenção/sobrevivência quando em condições adversas.

Figura 21 - pH do meio de caldo de cana, 12° Brix, a 30°C, em sistema de reciclo celular sem e com adição de álcool isoamílico a 0,1% , inoculado com a linhagem CCA193.

Figura 22 - Produção de etanol (g/100mL) da linhagem CCA193 em meio de caldo de cana, 12° Brix, a 30°C, em sistema de reciclo celular sem e com adição de álcool isoamílico a 0,1% .

Figura 23 - Brix residual do meio de caldo de cana, 12° Brix , a 30°C, em sistema de reciclo celular sem e com adição de álcool isoamílico a 0,1%, inoculado com a linhagem CCA193.

Figura 24 - Taxa de filamentação (%) apresentada pela linhagem CCA 193 em meio de caldo de cana, 12° Brix, a 30°C, em sistema de reciclo sem e com adição de álcool isoamílico a 0,1%.

As alterações morfológicas que ocorrem são de células brotantes que não se separam, formando cadeias celulares, conforme Figura 25. A morfologia é bem semelhante ao que ocorre com esta linhagem em YEPD líquido, nesta concentração de álcool isoamílico, embora algumas células já se apresentem alongadas, sendo mais marcante na concentração de 0,5% desse álcool (CECCATO-ANTONINI² dados não publicados). A figura 26 ilustra essas alterações.

Figura 25 - Células da linhagem CCA193 nos ensaios fermentativos A. na ausência de álcool isoamílico, B. na presença de 0,1% de álcool isoamílico

²Ceccato-Antonini, S.R. Universidade Federal de São Carlos – *Campus Araras*

Figura 26 - Morfologia da linhagem CCA 193 em meio líquido YEPD, acrescido de álcool isoamílico (AIA), a 160 rpm, 30°C (CECCATO-ANTONINI³, dados não publicado).

³Ceccato-Antonini, S.R. Universidade Federal de São Carlos – *Campus Araras*

5 CONCLUSÕES

- As álcoois isoamílico, butanol e isobutanol induziram filamentação na maioria das linhagens haplóide e diplóides de *S. cerevisiae*, em meio sólido, sendo o isoamílico o indutor mais eficiente.
- O tipo de filamentação apresentado pelas linhagens haplóides foi diferente do padrão apresentado pelas linhagens diplóides, quando em indução por álcoois
 - As linhagens estudadas não filamentaram em meio deficiente de nitrogênio
 - Tre linhagens diplóides apresentaram crescimento invasivo marcante em meio rico e com manose e frutose como fontes de carbomo.
- Em condições de fermentação, a linhagem industrial CCA193 (PE-02) apresentou filamentação na presença de 0,1% de álcool isoamílico com tendência à recuperação da viabilidade celular após o quarto ciclo fermentativo, porém com significativa diminuição nos seus parâmetros fermentativos
- A filamentação induzida por álcoois superiores e deficiência de nutrientes (especialmente carbono) parece ser um processo comum em linhagens industriais de *S. cerevisiae*, podendo contribuir para a manutenção/sobrevivência das células em condições adversas, inclusive durante o processo fermentativo

REFERÊNCIAS

- AYRAPAA, T. Effect of temperature on the formation of higher alcohols by culture yeast. **Chemical Abstracts**, Washington, n.73, p.2653,1970.
- BANUETT, F. Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 29, n. 1 , p.179-208, 1995.
- BONY, M. ; BARRE, P.; BLONDIN, B. Distribution of the flocculation protein, Flop, at the cell surface during yeast growth: the availability of Flop determines the flocculation level. **Yeast**, Chichester, v. 14, n. 1, p. 25-35, 1997.
- BRUNETTO, H.G. **Avaliação em linhagens haplóides e diplóides de *Saccharomyces cerevisiae***. Araras: [s.n.], 2006. 30 p (Relatório de Iniciação Científica).
- CARLSON, M. Glucose repression in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, n. 2, p.202-207, 1999.
- CARO, L. H. ; TETTELIN, H. ; VOSSEN, J. H. ; RAM, A. F. ; ENDE, H. van den; KLIS, F. M. In silicio identification of glucosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, v.13, n. 15, p.1477-1489, 1997.
- CASALONE, E.; BARBEIRO, C.; CAPPELLINI, L. POLSINELLI, M. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* natural populations for pseudohyphal growth and colony morphology. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v.156, p.191-200, 2005.
- CECCATO-ANTONINI, S. R.; PARAZZI, C. Monitoramento microbiológico da fermentação etanólica: uma experiência. **Jornal Cana**, Ribeirão Preto, p. 25-26, 01 jan. 2000.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; SILVA, P.C. Hyphal-like extension and pseudohyphal formation in industrial strains of yeasts induced by isoamyl alcohol. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 211-214, 2002.

CECCATO-ANTONINI, S. R. ; SUDBERY, P. E.; WIGHTMAN, R. Filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, p.173-181, 2004

CECCATO-ANTONINI, S. R. ; SUDBERY, P. E.; WIGHTMAN, R. . Molecular characterization of three haploid industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* and their responses to medium stress. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 15., Recife, 2005. Anais...Rio de Janeiro: UFRJ, 2005, 354p.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; TOSTA, C.D.; SILVA, A.C. Determination of yeast killer activity in fermenting sugarcane juice using selected ethanol-making strains. **Brazilian Archives of Biology an Technology**, Curitiba, v. 47, n.1, p.13-23, 2004.

CHERUBIN, R.A. Efeitos da adição de benzoato de sódio na fermentação alcoólica para produção de aguardente de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). 1998. 156p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

CULLEN, P.J.; SPRAGUE JR., G.F. Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 25, p.13619-13624, 2000.

CUNHA, A.F.; MISSAWA, S.K.; GOMES, L.H.; REIS, S.F.; PEREIRA, G.A.G. Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.6, p. 280–287, 2006

DICKINSON, J.R. ‘Fusel’ alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts. **Microbiology**, Washington, v.142, p.1391-1397, 1996.

DORTA, C., OLIVA NETO, P.; ABREU NETO, M.S; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMS, A.I Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 e M-26). **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, v.22, p.177-182, 2006

FALCÃO DE MORAIES, J.O.; ARAÚJO, J.M.; RIOS, E.M.; MELLO, B.R. Isolamentos de *Zymomonas mobilis* em mostos de caldo de cana na fermentação alcoólica industrial. **Revista Microbiologia**, São Paulo, v.14, n.11, p.6-10, 1993

GANCEDO, J.M. Yeast carbon metabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, p.334-361, 1998.

GANCEDO, J.M. Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 25, p.107-123, 2001.

GIMENO, C.J.; LJUNGDAHL, P.O.; STYLES, C.A.; FINK, G.R. Unipolar cell divisions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. **Cell**, Cambridge, v.68, p.1077-1090, 1992.

GUTIERREZ, L.E. **Estudo comparativo da fermentação alcoólica por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum***. 1994. 235p. Tese (Livres Docência) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

KRON, S.J.; GOW, N.A. Budding yeast morphogenesis: signalling, cytoskeleton and cell cycle. **Current Opinion Cell Biology**, Philadelphia, v.7, p. 845-855, 1995

KRON, S. J.; STYLES, C. A.; FINK, G. R. Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 5, 1003-1022, 1994

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

LAMBRECHTS, M.G.; BAUER, F.F.; MARMUR, J.; PRETORIUS, L.S. Muc1, a mucin-like protein which is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington v. 93, p. 8419-8424, 1996.

LEE, B.N.; ELION, E.A. The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signalling components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p.12679-12684, 1999.

LEE, S.S.; ROBISON, F.M.; WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.11, p. 641-649, 1981.

LIU, H.; STYLES, C.A.; FINK, G.R. Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. **Science**, Washington, v. 262, p. 1741-1744, 1993.

LO, W. S.; DRANGINIS, A. M. The cell surface flocculin Flo 11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 9, n.1, p. 161-171, Jan.1998.

LO, H.J.; KOHLER, J.R.; DIDOMENICO, B.; LOEBENBERG, D.; CACCIAPUOTI, A.; FINK, G.R. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. **Cell**, Cambridge, v. 90, p. 939-949, 1997.

LOPES, M. L.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. **Chromosomal polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae* (strain PE-2) used in the industrial fermentation for ethanol production.** YEAST GENETICS AND BIOLOGY, 2002, Madison. Abstracts... Disponível em: <http://www.yeastgenome.org/community/meetings/yeast02/abshtml/348.html>. Acesso em: 25 Feb. 2006.

LORENZ, M.C.; CUTLER, N.S.; HEITMAN, J. Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v.11, p.183-199, 2000.

LORENZ, M.C.; HEITMAN, J. The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal**, Oxford, v.17, p. 1236-1247, 1998.

MANEESRI, J. ; AZUMA, M.; TORII, S.; IGARASHI, K.; OOSHIMA, H. Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* with pseudohyphae and cloning of a gene complementing the mutation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 3, n.67, p. 517-524, 2003.

MARINI, A.M.; SOUSSI-BOUDEKOU, S.; VISSERS, S.; ANDRÉ, B. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 17, n. 8, p. 4282-93, 1997.

MARTINEZ-ANAYA, C. **Isoamyl alcohol induces filamentous growth by decoupling budding from nuclear cycle in *Saccharomyces cerevisiae***. 2002. 137p. Theses (PhD) - University of Sheffield, Sheffield, 2002.

MARTINEZ ANAYA, C.; DICKINSON, R.J.; SUDBERY, P.E. In yeast, the pseudohyphal phenotype induced by isoamyl alcohol results from the operation of the morphogenesis checkpoint. **Journal of Cell Science**, London, v.116, n.16, p. 3423-3431, 2003.

OUCHI, K.; YAMAMOTO, Y.; TAKAGISHI, M.; ADIYAMA, H. Regulation of isoamyl alcohol formation via Erlich pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v.58, n. 4, p. 301-309, 1980.

PALECEK, S.P.; PARIH, A.S.; KRON, S.J. Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. **Microbiology**, Washington, v.14, p. 893-907, 2002.

RANKINE, B.C. Formation of higher alcohols by wine yeasts and relationship to taste thresholds. **Journal of the Science Food Agriculture**, London, v.18, p. 583-589, 1967.

ROBERTS, C. J.; NELSON, B.; MARTON, M. J.; STOUGHTON, R.; MEYER, M. R.; BENNETT, H. A.; HE, Y. D.; DAI, H.; WALKER, W. L.; HUGHES, T. R.; TYERS, M; BOONE, C.; FRIEND, S. H.. Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. **Science**, London, v. 287, p. 873-880, 2000.

ROBERTS, R. L.; FINK, G.R. Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 8, p. 2974-2985, 1994.

STEWART, G.G.; RUSSELL, I. **An introduction to brewing science & technology: brewer's yeast**. London: The Institute of Brewing, 1998. 108p.

TEUNISSEN, A. W.; STEENSMA, H. Y. Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. **Yeast**, Chichester, v. 11, p. 1001-1013, 1995.

TOSTA, C.D. **Biotipagem de leveduras industriais através do sistema Killer**. 2004. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

VANCETTO, G.T., BRUNETTO, H.G., MIRANDA, V.S., PAIVA, E., CECCATO-ANTONINI, S.R. Meiotic segregation of alcohol induced filamentation and fermentation trait in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* used for ethanol production. In: REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 25, São Pedro, 2006. Resumos...São Pedro: Fealq, 2006, p.195.

WEBB, A.D.; INGRAHAM, J.L. Fusel oil. **Advances in Applied Microbiology**. New York, v.5, p. 317-353, 1963.

WRIGHT, R.R.M.; REPINE, T.; REPINE, J.E. Reversible pseudohyphal growth in haploid *Saccharomyces cerevisiae* is an aerobic process. **Current Genetics**, New York, v. 23, p. 388-91, 1993.