

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

Obtenção de levedura híbrida fluorescente e resistente a nistatina

Simone Cristina Braga Bertini

Dissertação apresentada, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2007**

Simone Cristina Braga Bertini
Bióloga

Obtenção de levedura híbrida fluorescente e resistente a nistatina

Orientador:
Prof. Dr. **FLAVIO CESAR ALMEIDA TAVARES**

Dissertação apresentada, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2007**

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

Bertini, Simone Cristina Braga

Obtenção de levedura híbrida fluorescente e resistente a nistatina / Simone Cristina
Braga Bertini. - - Piracicaba, 2007.
58 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Antifúngicos 2. Cana-de-açúcar 3. Fermentação alcoólica 4. Leveduras 5.
Melhoramento genético I. Título

CDD 633.61

DEDICATÓRIA

À minha amada mãe, **Deolina**.
Exemplo de dedicação, fé, luta e coragem.
Pelo amor incondicional que sempre dedicou aos filhos.
Estando eternamente presente em minha vida.

Ao meu amado pai, **Solimar**. Homem sábio, trabalhador, de visão que tanto nos orienta com
seus conselhos.
Muito obrigada por existir e estar presente na minha vida.

Ao meu querido irmão, **Sérgio**.
Pela amizade, estímulo, companheirismo, amor, união, dedicação,..
Por você realmente ser meu Irmão.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por cada dia, pelas oportunidades que a vida me reservou, pela minha família e pelos amigos que conquistei nesta caminhada;

À minha família que foi o suporte pra todas as minhas conquistas;

Ao Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares a minha gratidão pela orientação e facilidades concedidas no desenvolvimento do trabalho. Compartilhando seu conhecimento, experiência e convívio pessoal;

Ao Dr. Luiz Humberto Gomes pelo apoio, incentivo, ajuda, compreensão e amizade;

Ao Prof. Dr. Juan Argueso de Almeida pelas sugestões preciosas dadas ao longo deste trabalho;

Ao CNPq, pela bolsa e apoio financeiro para a realização deste trabalho;

À Coordenação do PPG Microbiologia Agrícola e à Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ-USP por me conceder a oportunidade de realizar este projeto;

Ao Prof. Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias pela atenção e ajuda nas análises estatísticas;

Aos funcionários, Giovana, Célia e Sarah e aos técnicos do laboratório Ana e Marcos pelo auxílio na parte prática do trabalho e pela dedicação e amizade durante todo o tempo;

Aos colegas de laboratório, Carmo, Luiz Romanholo, Daniele Del Rio, Rodrigo Setem, Alessandro Riffel, Gildemberg, Marina Gumiere e todos os estagiários;

Aos meus colegas de Curso de Pós-Graduação: Luana Botelho, Tathiana Lisboa, Pablo, Rodrigo Stuart, Gisele Lopes, Nívia, Denise Balani, Juliano Cury, Daniele Takahashi, Simão Lindoso, Soraya Kiriachek, Rafael Dutra, Karina Cenciani, Robinson Moresca pelos bons momentos compartilhados;

Aos meus amigos Vanessa Valadão, Thiago Augusto, Marcus Marcolino, Adelaide Siqueira e família que mesmo distantes estão sempre presentes em minha vida;

Ao Lucas, pelo seu apoio incondicional e dedicação, pela paciência e compreensão nos dias mais difíceis e chorosos, pela sua companhia em todas as horas e todos os incentivos;

A algumas pessoas especiais, cujos nomes não foram citados, mas gostaria de expressar toda a minha gratidão, admiração e respeito. Espero que de alguma forma possa retribuir ao menos um pouco o que fizeram e ainda fazem por mim, que certamente não será esquecido.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 DESENVOLVIMENTO	12
2.1 Revisão de literatura	12
2.1.1 Mutantes resistentes à nistatina	13
2.1.2 Antifúngico nistatina	15
2.1.3 Biosíntese do ergosterol.....	16
2.1.4 Uso da nistatina no processo fermentativo.....	17
2.1.5 Marcador de seleção para levedura GFP (<i>Green Fluorescent Protein</i>)	19
2.2 Material e métodos.....	22
2.2.1 Os microrganismos utilizados.....	22
2.2.2 Meios e soluções utilizadas.....	22
2.2.3 Isolamento de plasmídeo em <i>E. coli</i> – Mini prep	26
2.2.4 Transformação genética.....	26
2.2.5 Cruzamento entre as linhagens.....	27
2.2.6 Isolamento e contagem de esporos	28
2.2.7 Concentração de leveduras.....	29
2.2.8 Teste do nível de resistência ao antifúngico nistatina	29
2.2.9 Teste de estabilidade do plasmídeo pYGFP3	30
2.2.10 Avaliação da capacidade fermentativa.....	31
2.2.11 Determinação do teor alcoólico	31
2.2.12 Cálculo do rendimento fermentativo.....	32
2.2.13 Análise de açúcares redutores	32
2.2.14 Análises estatísticas.....	32
2.3 Resultados e discussão.....	34
2.3.1 Transformação	34
2.3.2 Esporulação	34
2.3.3 Resistência a nistatina.....	36

2.3.4 Determinação do nível de resistência dos híbridos	37
2.3.5 Expressão do gene GFP	42
2.3.6 Fermentação	46
3 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	51

RESUMO

Obtenção de levedura híbrida fluorescente e resistente à nistatina

A contaminação de dornas por leveduras selvagens pode prejudicar o rendimento e a produtividade da produção industrial de etanol, inexistindo métodos eficientes para o controle deste tipo de contaminação. Facilidade, rapidez e o baixo custo seriam características desejáveis para o controle de leveduras que eventualmente contaminam o processo de fermentação. Com este objetivo, TAVARES (1989) desenvolveu um processo de produção de etanol com o controle de leveduras contaminantes, que utiliza um híbrido M606 de *Saccharomyces cerevisiae* de alta produtividade e resistente a nistatina, um antifúngico de amplo espectro que pode ser usado para garantir a pureza genética do inóculo industrial. Para facilitar a identificação de leveduras GOMES et al. (2000), utilizaram a propriedade de fluorescência expressada pelo gene GFP “Green Fluorescent Protein” sob o controle do promotor da ADH2 em baixas concentrações de glicose. Associar estas duas propriedades em uma levedura industrial permitiria manter a pureza do inóculo e facilitaria a sua identificação. Com este objetivo, foram efetuados experimentos de transformação genética do híbrido M606 com o plasmídeo pYGFP3 construído por Gomes et al (2000), sem obter o sucesso desejado. Por isto, como passo inicial para obtenção de ambas propriedades em híbrido altamente produtivo, optou-se pela metodologia de cruzamentos entre uma linhagem segregante haplóide resistente a nistatina M606-2c(n) e a linhagem X2904-GFP3 portadora do plasmídeo pYGFP3. Alguns híbridos deste cruzamento natural foram selecionados, para posterior avaliação do nível de resistência à nistatina, da estabilidade do plasmídeo pYGFP3 e da capacidade fermentativa. Verificou-se que os híbridos selecionados (P16, P34 e P42) foram capazes de crescer numa concentração de 10mg.L⁻¹ de nistatina. Contudo, detectou-se instabilidade do plasmídeo pYGFP3 em todos os híbridos selecionados. Os híbridos P34 e P42 demonstraram uma capacidade fermentativa inferior às linhagens controle, o que pode ser explicado pela fragilidade do sistema de membranas decorrente da natureza da resistência à nistatina. O híbrido P16 não apresentou diferenças na capacidade de fermentação em relação as linhagens controle. Apesar de obter híbridos resistentes a nistatina expressando o gene GFP3, verifica-se que há necessidade de modificar o plasmídeo pYGFP3 tornando-o integrativo no genoma da levedura, para permitir a estabilidade do gene GFP3.

Palavras-chave: *Saccharomyces*; Transformação genética; Fermentação

ABSTRACT

Obtaining a fluorescent and resistant hybrid yeast to the nystatin

Vats contamination by wild yeasts can harm the efficiency and the productivity of ethanol industrial production and there are not efficient methods to control this type of contamination. Easiness, speed and the low cost would be desirable characteristics for the control of yeasts that eventually contaminate the fermentation process. With this aim, TAVARES (1989) developed an ethanol production process with the control of spoilage yeasts contaminants, that uses a *Saccharomyces cerevisiae* hybrid M606, of high productivity and resistant to the nystatin. It's a wide spectrum antifungal that can be used to guarantee the genetic purity of the industrial inoculum. To facilitate the yeasts identification, GOMES et al. (2000) used the fluorescence property expressed by the GFP gene "Green Fluorescent Protein", that is controlled by the promoter of ADH2 in a low glucose concentrations. The association of these two properties in an industrial yeast strain would allow to maintain the purity of the inoculum and it would facilitate its identification. With this aim, an assay of genetic transformation of hybrid M606 with pYGFP3 plasmid built by Gomes et al (2000) was made, but it had not success. Therefore, as initial step for obtaining of both properties in hybrid highly productive, It was opted for the methodology of crossings between a nystatin resistant haploid segregant strain M606-2c(n) and the strain X2904-GFP3(n) harboring of the plasmid pYGFP3. Some hybrids were selected of this natural crossing, with subsequent evaluation of nystatin resistance level, stability of the pYGFP3 plasmid and fermentative capacity. The selected hybrids (P16, P34 and P42) were capable to grow in a concentration of 10mg.nystatin L⁻¹. However, plasmidial instability of the pYGFP3 was detected in all the selected hybrids. The hybrids P34 and P42 showed a smaller fermentative capacity than control strain, which can be explained by the fragility of the membranes system due to the nature of the resistance to the nystatin. The hybrid P16 did not showed difference in the fermentative capacity to the strain control. In spite of obtaining resistant hybrid to the nystatin expressing the GFP3 gene, there is a need to modify the pYGFP3 plasmid, turning it integrative in the yeast genome to allow the gene stability GFP3.

Keywords: *Saccharomyces*; Genetic transformation; Fermentation

1 INTRODUÇÃO

As fermentações para a produção de etanol industrial no Brasil são feitas em condições não estéreis e frequentemente são utilizadas leveduras de panificação para início da safra produtiva. Nestes processos fermentativos as leveduras são recuperadas, como preconizado por Melle e Boinot, onde o mosto fermentado é centrifugado separando-se o fermento do vinho (LAGOMASINO, 1949). O vinho é conduzido à destilação e o material recuperado denominado pé-de-cuba, é tratado com ácido e água, em seguida reutilizado para um novo ciclo de fermentação (LAGOMASINO, 1949). A recirculação da levedura pode durar toda a safra, num período que compreende de 4 a 6 meses, o que favorece a contaminação por bactérias e leveduras selvagens que podem sobrenumerar quantitativamente a levedura utilizada como inóculo inicial, ainda no início da safra (TAVARES, 1989; WHEALS, 1999). Em alguns casos, relata-se que em poucos dias após o início da propagação do inóculo, já se observa o aumento expressivo da população contaminante na massa de levedura do processo fermentativo, afetando o rendimento da fermentação (TAVARES, 1989,1992a).

As leveduras selvagens devido a sua morfologia e propriedades fisiológicas similares dificilmente podem ser separadas das leveduras de interesse industrial, especialmente em grande escala. Vários métodos que preconizam a aplicação de agentes antifúngicos no controle de contaminantes podem afetar a biomassa de levedura industrial utilizada como inóculo inicial (TAVARES, 1992a, 1995). Agentes físicos também se revelam inadequados e por esse motivo Tavares (1989) desenvolveu o processo de produção de etanol com o controle de leveduras contaminantes, que utiliza uma levedura híbrida de alta capacidade de produção de etanol que foi geneticamente obtida para esta finalidade. Este processo pode ser aplicado a sistemas contínuos e descontínuos de produção de etanol. A levedura híbrida de alta produção de etanol sendo resistente à nistatina, permite que este antifúngico possa ser utilizado na sua propagação, para obtenção de inóculos industriais com efetivo controle de leveduras contaminantes presentes, ou posteriormente. A eficiência do emprego da nistatina neste processo se justifica por

dispensar o uso de equipamentos caros e mão-de-obra especializada, bem como outras medidas de assepsia praticadas em indústrias de fermentação mais sofisticadas. Em resumo, o híbrido portador do gene de resistência à nistatina, permite o uso deste antifúngico no controle de leveduras contaminantes, e devido às suas propriedades genéticas, garante níveis de rendimento e produtividade elevados na produção de etanol (TAVARES, 1989,1995).

Cogitar do emprego de leveduras portadoras de genes marcadores poderia facilitar a identificação e a distinção entre leveduras, uma situação que seria desejável antes de causarem problemas ao processo fermentativo. Contudo, nem sempre genes marcadores são rapidamente identificados, mas com esta finalidade Gomes et al. (2000) obtiveram leveduras cujas células se tornam fluorescentes quando expostas à luz ultravioleta, possibilitando a monitoração rápida e direta na identificação de possíveis contaminantes. Utilizaram o gene GFP "Green Fluorescent Protein" isolado do celenterado *Aequorea victoria* para a construção do plasmídeo pYGFP3, controlado pelo promotor da enzima desidrogenase alcoólica (ADH2) de *S. cerevisiae*, que apresenta repressão por glicose. Assim, a expressão do gene GFP3 acontece somente em baixas concentrações de glicose, conseqüentemente, sinalizando o final da fermentação.

Associar as propriedades, de resistência à nistatina e fluorescência em uma levedura com alta produtividade de etanol industrial, permitiria manter a pureza do inóculo e facilitaria a sua identificação visual. Com este objetivo, pretendeu-se obter neste trabalho um híbrido reunindo estas propriedades, levando-se em consideração, contudo, que a legislação brasileira ainda proíbe a deposição de organismos geneticamente modificados no ambiente.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão de literatura

A escolha e a preparação do fermento exigem que algumas condições ótimas sejam mantidas durante o processo industrial para obter produtividade máxima de etanol a partir dos açúcares fermentescíveis. Existem algumas características das leveduras que podem ser consideradas ideais para a produção de etanol, como: tolerância ao etanol, temperatura e acidez, rapidez na fermentação, fácil propagação, redução de metabólitos (ácidos orgânicos, glicerol, álcoois superiores, ésteres, aldeído), alta viabilidade e vitalidade celular, tolerância a altas concentrações de açúcar, estabilidade genética, capacidade de flocular ou de não flocular, dependendo do processo requerido, entre outras. No entanto, como não existe uma única levedura que possua todas essas características, pesquisas estão sendo realizadas para associar a fisiologia e a biotecnologia de levedura ao aumento da produção de etanol (WALKER, 1998).

A fermentação da cana de açúcar é feita em condições não-estéreis no Brasil, o que favorece a contaminação por leveduras indesejáveis e bactérias, principalmente dos gêneros *Saccharomyces*, *Torula*, e *Pichia*; *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc*, respectivamente (ALTHERTUM, 1984).

As leveduras contaminantes do processo industrial de fermentação podem ser provenientes de diferentes locais, sejam desde o campo até as instalações industriais. As leveduras contaminantes podem até substituir as leveduras utilizadas como inóculo inicial, devido a sua agressividade na competição por nutrientes, maior velocidade de multiplicação, pressão de seleção favorável e, principalmente, proporção inicial significativa (TAVARES, 1992a). Dentre as bactérias contaminantes, as lácticas e esporuladas são as mais prejudiciais por poderem provocar a floculação e a perda do fermento, consumindo a sacarose e outros nutrientes do mosto essenciais para as leveduras (GALLO; CANHOS, 1991).

A deterioração do caldo por contaminantes, pode provocar a necessidade de uma maior quantidade de cal para a alcalinização, originar a formação de “goma”, que

aumenta a viscosidade e dificulta as operações de clarificação, evaporação, cozimento e cristalização do açúcar nas usinas e na fermentação, podendo causar o entupimento das centrífugas, tubulações, peneiras e trocadores de calor (GALLO; CANHOS, 1991). Assim, o monitoramento do processo fermentativo é importante para manter a produtividade do processo, adotando-se medidas para o controle da infecção bacteriana e de leveduras indesejáveis ao processo.

2.1.1 Mutantes resistentes à nistatina

Na década de 50, inúmeros trabalhos tentaram isolar fungos resistentes aos antifúngicos poliênicos. Gottlieb (1958) foi um dos primeiros a sugerir o modo de ação dos antibióticos poliênicos, observando que o esterol protegia contra os efeitos destes fungicidas. Hebeke e Solotorovsky (1965) isolaram linhagens de *Candida albicans* altamente resistentes a candidina e anfotericina, no entanto, relativamente pouco resistentes a nistatina.

Resnick e Mortimer (1966) referiram-se a uma classe de leveduras mutantes, denominados mutantes *ole2*, *ole3* e *ole4*, que para crescer necessitavam suplementação do meio com ácidos graxos ou ergosterol e que eram altamente resistentes a nistatina. A falta ou a redução na quantidade de ergosterol na membrana, ou a substituição do ergosterol por outro esterol, pode diminuir os sítios de ligação entre a membrana plasmática e a nistatina, ocasionando a resistência (WOODS, 1971).

Ahmed e Woods (1967) identificaram três genes de resistência a nistatina *nys1*, *nys2* e *nys3*, sendo que os mutantes com esses genes não sintetizavam ergosterol e outros acumulavam o esterol 24,28-dehidroergosterol, sugerindo que a resistência resultava da alteração na membrana plasmática. Análises dos mutantes *nys1* e *nys3* revelaram que o mutante *nys1* não sintetizava ergosterol, mas acumulava o esterol 24,28-dehidroergosterol, e que o mutante *nys3* também não produzia ergosterol, mas acumulava um outro esterol diferente do mutante *nys1*. Sugeriu-se que, provavelmente, o produto final da via biossintética do esterol em levedura seria o ergosterol e que os genes *nys1* e *nys3* representavam um bloqueio nesta via biossintética (WOODS, 1971).

Patel e Johnston (1968) obtiveram do cruzamento entre linhagens sensíveis e linhagens resistentes a nistatina de *C. albicans*, híbridos tolerantes a doses de nistatina 12 vezes superior àquelas apresentadas pelas linhagens originais. Somente 1 dos 12 mutantes foi suscetível à nistatina, 8 mutantes apresentaram uma resistência dominante e 3 mutantes mostraram um fenótipo intermediário com diferentes graus de resistência. Dessa forma, os autores sugeriram que a resistência a nistatina poderia ser dominante, uma vez que testes para alelismo ainda não tinham sido realizados e não se sabia se a resistência a nistatina envolvia um ou mais genes dominantes. Como os genes dominantes são expressos indiferentemente da ploidia e de outros alelos presentes, a existência de no mínimo um gene dominante para a nistatina seria muito importante para o tratamento de doenças provenientes de *C. albicans* (PATEL; JOHNSTON, 1968).

Pierce et al. (1978), isolaram quatro mutantes de *C. albicans* resistentes para nistatina e que também possuíam resistência cruzada para outros antibióticos poliênicos (anfotericina B, candicidina e lucensomicina). Destes quatro mutantes, os autores identificaram três que mostraram alterações no conteúdo de ergosterol e, além disso, mudanças na composição de ácidos graxos (PIERCE et al., 1978).

Joseph-Horne et al. (1990) isolaram dois mutantes do fungo *Ustilago maydis* (fitopatógeno) a partir da linhagem ATCC14826. A resistência a anfotericina B dos mutantes N1 e N7 foi cerca 5 a 7 vezes superior àquelas apresentadas pela linhagem parental ATCC14826. Os mutantes N1 e N7 resistentes a anfotericina B, apresentaram resistência cruzada para nistatina e suscetibilidade a triazóis e triadimenol. Dos esteróis encontrados, as concentrações de ergosterol foram de 55,6% linhagem parental ATCC14826, 30,9% mutante N1 e 41,8% mutante N7. Os mutantes N1 e N7 acumularam cinco diferentes esteróis intermediários que não foram encontrados na linhagem parental ATCC14826. Concluíram serem necessários estudos moleculares mais detalhados para o entendimento real do modo de ação dos antifúngicos poliênicos.

De acordo com Zhang et al. (2002), linhagens de *S. cerevisiae* foram tratadas com os antifúngicos nistatina e anfotericina B e avaliadas por meio de *Microarrays* quanto à expressão dos genes relacionados ao mecanismo de ação destes antifúngicos. Cerca de 75% dos genes que expressaram na presença de nistatina também se expressaram nos tratamentos com anfotericina B. Estes resultados

mostraram que a nistatina e anfotericina B induziram com alta similaridade o perfil de expressão gênica das células de levedura, deduzindo que a estrutura semelhante dos dois antifúngicos contribuiria para um mecanismo de ação parecido.

Entretanto, Hapala et al. (2005) isolaram alguns mutantes de *S. cerevisiae* com resistência seletiva para nistatina e outro com resistência a anfotericina B. Os mutantes resistentes a nistatina apresentaram mudanças na composição de ergosterol e os mutantes resistentes anfotericina tiveram a composição e estrutura parede celular alteradas. Os mutantes mostraram herança genética recessiva para resistência à nistatina e dominante para resistência à anfotericina B. O mutante resistente a nistatina acumulou o esterol 7,22-dien-3-ol característico de mutantes *erg3*, sendo sensíveis a anfotericina B e outros azóis. Geralmente, os mutantes *erg3* de várias outras espécies mostram resistência cruzada para azóis e anfotericina B, sugerindo que o mecanismo de ação seja significativamente diferente, apesar da similaridade estrutural da nistatina e anfotericina.

2.1.2 Antifúngico nistatina

A nistatina é um antibiótico comumente utilizado na área médica como agente antifúngico no tratamento de micoses externas, subcutâneas ou sistêmicas de animais e pessoas. Faz parte do grupo de agentes antifúngicos, denominados antibióticos macrolídeos poliênicos; é produzido por bactérias gram-positivas do gênero *Streptomyces* (HAZEN; BROWN, 1951). Tem a composição química $C_{47}H_{75}NO_{17}$ e um peso molecular de 926 Da (SNOW, 1966) e inibe o crescimento de vários fungos, especialmente leveduras (LAMPEN; MORGAN; SLOCUM, 1957).

Os antibióticos macrolídeos poliênicos interagem com o ergosterol presente na membrana plasmática causando danos e, conseqüentemente, a morte celular (LAMPEN et al., 1962; LEES et al., 1995). São caracterizados pela presença de 20-44 anéis de lactona (ésteres cíclicos) e de 3-8 duplas ligações conjugadas como se apresenta na figura abaixo (BOLARD, 1986; HOPWOOD, 1997).

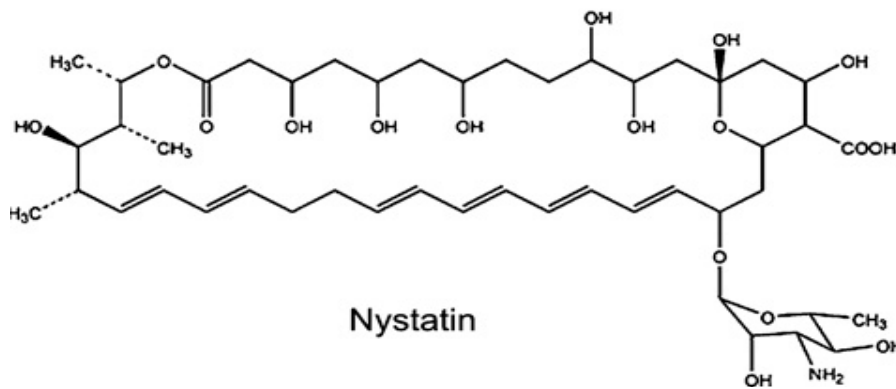


Figura 1 - Estrutura química do antibiótico macrolídeo poliênico nistatina (BOLARD, 1986; HOPWOOD, 1997).

A estrutura apresentada por este grupo de compostos provavelmente contribui para o seu modo de ação, permitindo sua fácil interação com o esterol presente na membrana plasmática (BOLARD, 1986). Estas interações formam um complexo polieno-esterol que é capaz de desorganizar a membrana originando canais transmembranares, resultando em alta permeabilidade a prótons e o extravasamento de componentes celulares, tais como proteínas e potássio, o que provoca a morte celular (ABU-SALAH, 1996; KONTOYIANNIS, 2002).

2.1.3 Biossíntese do ergosterol

Todas as células eucarióticas possuem o esterol como componente essencial da membrana plasmática. O esterol possui como função manter a estrutura da membrana, permeabilidade, fornecer rigidez, estabilidade e resistência a estresse físico. Nas células dos vertebrados o principal esterol é o colesterol enquanto que nos fungos é o ergosterol (BROWN; TRUMPOWER, 1986).

A nistatina teve a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como principal modelo biológico na elucidação da via biossintética do ergosterol e onde foi possível a identificação dos genes responsáveis pelas enzimas envolvidas no metabolismo do ergosterol. O ergosterol é o principal esterol da membrana plasmática de *S. cerevisiae* e apresenta a capacidade de interferir nas propriedades de fluidez, permeabilidade, atividades de proteínas intrínsecas e desarranjo da dupla camada fosfolipídica (VAN

DER REST et al., 1995; STANGARLIN; SCHWAN-ESTRADA; DI PIERO, 2000).

Experimentos demonstraram que leveduras incapazes de completar a síntese de ergosterol eram resistentes à nistatina, pois não tinham ergosterol suficiente para permitir a ação desse antibiótico e, portanto, para ocorrer a morte celular os antibióticos do grupo dos poliênicos, ao qual pertence a nistatina, interagem com o ergosterol presente na membrana plasmática formando canais pelos quais extravasam os componentes do citoplasma (LAMPEN et al., 1962; LEES et al., 1995).

A via biossintética do ergosterol inicia no esqualeno e depende de uma seqüência de 15 reações enzimáticas, cujos genes foram clonados e identificados (GACHOTTE et al., 1998; GACHOTTE et al., 1999). Esta via biossintética compreende a transformação do esqualeno em lanosterol, que é posteriormente convertido em zimosterol, o qual é transportado para dentro da mitocôndria, onde é metilado e origina o fecosterol. O fecosterol é, então, transportado para o retículo endoplasmático, onde é convertido em ergosterol (BULL; BUSHELL, 1976).

Dessa maneira, a estrutura e a função da membrana plasmática têm sido amplamente estudadas com o intuito de melhor conhecer e desenvolver novas agentes antifúngicos necessários ao controle de fungos não-patogênicos e patogênicos. O conhecimento da via biossintética permite identificar facilmente passos que são essenciais na síntese do ergosterol e, dessa forma, melhorar a ação dos antifúngicos (LEES, 1995; SHOBAYASHI et al., 2005).

2.1.4 Uso da nistatina no processo fermentativo

A contaminação por leveduras indesejáveis é uma constante na indústria alcooleira onde não se trabalha em condições assépticas. Em poucos dias, ou ainda no início da safra, há informações de que as leveduras selvagens contaminam os inóculos industriais em variadas proporções e podem até sobrenumerar o fermento de panificação utilizado como pé-de-cuba (TAVARES, 1992a). As leveduras selvagens são altamente competitivas dentro das condições existentes, podendo ser dominantes e permanentes no processo de fermentação industrial (AMORIM, 1996). A ocorrência de leveduras contaminantes esta relacionada com o surgimento de sérios problemas que

afetam a produtividade, com queda no rendimento fermentativo, maior tempo de fermentação, formação de espumas, entupimento das centrífugas, os quais podem até parar o processo (TAVARES, 1995).

Tavares (1989) desenvolveu o processo patenteado em nome da Universidade de São Paulo como “Processo de produção de etanol com o controle de leveduras contaminantes” sob o nº PI 8903744-8 – INPI/RJ 27/07/89 a fim de obter um controle de leveduras contaminantes do processo de fermentação que não interferisse de forma prejudicial ao rendimento e produtividade alcoólicos. Com este objetivo, obteve-se uma linhagem híbrida de *S. cerevisiae* (M606) portadora de resistência ao antifúngico nistatina (NYS), que permite o emprego da nistatina como um eficiente método seletivo para o controle de leveduras indesejáveis, garantindo a pureza genética dos inóculos e da biomassa durante os ciclos do processo fermentativo, preservando esta levedura híbrida de alto potencial fermentativo durante a safra (TAVARES, 1989). Com isto, se garante níveis de produtividade e rendimentos elevados, dispensando mão-de-obra altamente especializada e equipamentos caros necessários aos cuidados de assepsia convencionalmente praticados (TAVARES, 1989). Esta levedura industrial resistente ao antifúngico nistatina foi obtida com metodologias de genética clássica, envolvendo a mutagênese, cruzamentos naturais, cruzamentos raros e retrocruzamentos, o que permitiu associar neste híbrido o alto potencial de produção de álcool e resistência à nistatina adequada ao controle de contaminantes no processo de fermentação (TAVARES, 1989). Neste trabalho, algumas substâncias inibidoras do crescimento de leveduras foram estudadas, como a toxina “killer”, fungicidas, herbicidas de uso agrícola e antissépticos de uso médico, no entanto o antifúngico nistatina foi selecionado por apresentar amplo espectro de ação letal sobre as leveduras, eficácia em baixas concentrações, por ser operacionalmente seguro e não tóxico (TAVARES, 1992).

Uma característica importante no processo industrial de fermentação esta relacionada à tolerância ao etanol, o que foi amplamente estudada no híbrido M606 de *S. cerevisiae*, comprovando-se sua alta tolerância ao etanol, quando comparado a linhagens controle em meio suplementado com etanol (TAVARES, 1995). As leveduras com massa celular de 1%, 5% e 10% tiveram a produção de etanol semelhante na ausência de nistatina, no entanto quando se adicionou 5mgL^{-1} do antifúngico somente a

levedura M606 manteve os mesmos níveis de etanol, enquanto as outras linhagens controle tiveram uma significativa queda (TAVARES, 1995). No entanto, observou que as linhagens controle não foram totalmente sensíveis à ação do antifúngico continuando a fermentação, confirmando que o efeito fungicida acontece sob as células em divisão (MARINI; ARNOW; LAMPEN, 1961).

2.1.5 Marcador de seleção para levedura GFP (*Green Fluorescent Protein*)

O gene GFP (*Green Fluorescent Protein*) vem sendo utilizado intensivamente em estudos de expressão gênica e desenvolvimento celular (LORANG et al., 2001). Este gene foi isolado de um celenterado marinho do Pacífico, *Aequorea victoria*, que codifica uma proteína que possui 238 aminoácidos com um peso molecular de aproximadamente 27kDa, o qual apresenta uma absorção máxima de luz na faixa do espectro de 395 e 475 nm e emite uma luz máxima de 508 nm. Requer para fluorescência somente oxigênio e luz negra ou luz ultravioleta, diferentemente de outros genes repórter como β -glucoronidase, acetiltransferase e luciferase, que necessitam de cofatores ou substratos para sua atividade (WARD, 1998; CUBITT et al., 1995). A expressão do gene GFP *in vivo* pode ser realizada em células individuais, em populações de células, em organismos interagindo em total simbiose ou no meio ambiente em tempo real (LORANG et al., 2001).

O GFP pode ser utilizado para quantificar a expressão de genes de células individuais dentro de um mesmo organismo, avaliar a dispersão ou a biomassa de um organismo no meio ambiente, em biofilmes, em fermentadores, na superfície de folhas ou no solo e por permitir a identificação visual de células e componentes celulares, o gene GFP tem sido utilizado como marcador biológico e na transformação de vários organismos, incluindo leveduras (MORIM; HASTING, 1971; KAHANA; SILVER, 1996; KARREMAN, 2005).

Em muitos fungos o gene GFP pode não expressar a fluorescência, principalmente por não ser eficientemente traduzido e por este motivo algumas modificações foram feitas no gene GFP, como otimizações no códon utilizado para *C. albicans* e *S. cerevisiae* (CORMACK et al., 1997) e para expressar ou melhorar o nível

de expressão do gene em células transformadas de mamíferos, plantas, *Aspergillus nidulans* (SUELMANN; SIEVERS; FISCHER, 1997), *Ustilago maydis* (SPELLIG; BOTTIN; KAHMANN, 1996) e *Aureobasidium pullulans* (VANDEN WYMELENBERG et al., 1997).

Alguns trabalhos utilizam promotores de expressão encontrados no próprio fungo, onde essas seqüências são fusionadas ao gene GFP, sendo útil para medir a transcrição em fungos (CORMACK, 1998; LIU, 1999). Os promotores que controlam a expressão do GFP são capazes de ativar o gene em condições definidas, permitindo mostrar o microambiente dos fungos durante o crescimento da planta. Assim, o promotor da enzima isocitrato liase (ICL) de *Neurospora crassa*, enzima importante no metabolismo do carbono, foi fusionado ao gene GFP para monitorar o metabolismo do carbono durante a infecção do trigo com o fungo fitopatogênico *Tapesia yallundae*. A regulação do promotor ICL de *T. yallundae* é igual para *N. crassa*, induzindo glicogênese e reprimindo glicólise (MIZOTE et al., 1998). Bowyer, Mueller e Lucas (2000) demonstraram que as linhagens transformadas com o pICL-GFP1 expressaram o GFP somente na superfície das folhas, onde há o controle constitutivo do promotor que mostra uma expressão uniforme associada ao processo de infecção.

Recentemente, Karreman et al. (2005) construíram um plasmídio contendo o gene GFP2 com as seqüências do gene HSP12 e o promotor HSP12. Sabe-se que o gene HSP12 é transcrito somente em condições de estresse em levedura, incluindo alta osmolaridade, presença de etanol, falta de nutrientes no meio de crescimento e temperaturas elevadas. A fluorescência não foi observada quando a levedura estava na fase exponencial de crescimento, mas foi detectada a fluorescência em culturas onde o crescimento estava na fase estacionária ou nos meios que foram suplementados com manitol, etanol, ou onde ocorreu uma mudança brusca de temperatura durante a fase exponencial de crescimento. Segundo os autores a utilização deste método permitiu monitorar e quantificar a resposta de *S. cerevisiae* aos diferentes formas de estresse comumente encontradas nos processos industriais.

Em 1997, Cormack et al., para obterem uma melhor expressão e eficiência do gene repórter GFP, substituíram o códon serina (CTG) pelo códon leucina (TTG) e também aumentaram a quantidade de códons de glicina (GGT) e alanina (GCT),

denominando-se GFP₃. Os códons de glicina no tipo selvagem passaram de sete para vinte e três no mutante, já os códons de alanina passaram de três para sete em relação ao selvagem. As linhagens de *S. cerevisiae* e *C. albicans* transformadas com o vetor originário de pUC19 portador do gene GFP modificado, controlado pelo promotor ADH1 (ADH1-yEGFP3), tiveram a fluorescência aumentada quando comparada ao mesmo vetor com o gene GFP selvagem. A maior fluorescência da proteína GFP em *S. cerevisiae* e *C. albicans* pode ser devido ao aumento do número de cópias do plasmídeo ou a otimização dos códons pode ter influenciado em aumentar estabilidade do mRNA.

O gene ADH2 encontrado em *S. cerevisiae* sintetiza a enzima álcool desidrogenase II e o seu promotor (P_{ADH2}) que possui 573 pb é fortemente reprimido na presença de glicose está localizado no cromossomo XIII (PRICE et al., 1990). O mecanismo de regulação da expressão do gene ADH2 vem sendo amplamente estudado. Uma proteína reguladora da álcool desidrogenase proveniente da transcrição do gene ADR1 foi identificada por YU et al. (1989) e verificou-se que o gene ADR1 codifica um ativador transcricional que se liga a um sítio de ativação “upstream” ao promotor ADH2 (DI MAURO et al., 2000). Dessa forma, com baixas concentrações de glicose, há um aumento nos níveis da proteína Adr1 e o regulador se liga ao promotor de ADH2 iniciando a transcrição (DI MAURO et al., 2000). A vantagem apresentada pelo promotor da ADH2 em relação aos outros promotores comumente utilizados é que não necessita de nenhum indutor, além disso, a expressão é desligada na fase estacionária de crescimento quando a biomassa é alta, sendo considerado um tipo de regulação ideal para aplicação em processos de fermentação industrial.

Gomes (2000) obteve uma linhagem de levedura *S. cerevisiae* transformada com o plasmídeo pYGFP3 que expressa o gene GFP3 sob controle do promotor da desidrogenase alcoólica (ADH2), que torna as leveduras fluorescentes quando o teor de açúcar durante a fermentação é inferior a 0,1%. Esta propriedade permite a identificação desta linhagem com facilidade, observando-se que o final da fermentação é determinado biologicamente por meio da expressão do gene GFP3, pela emissão de fluorescência. Uma levedura com esta propriedade e com alta capacidade fermentativa poderia dispensar grande parte das análises químicas que são feitas dorna a dorna, reduzindo os custos laboratoriais e obtendo-se resultados rápidos.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Os microrganismos utilizados

Várias linhagens e híbridos de *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizados neste trabalho, como se segue:

Híbrido M606 (MATa/α) obtido por TAVARES (1989) foi utilizado para a transformação e como controle em ensaio de fermentação;

Linhagens M606-2c (MATα) e X2904-GFP3 (MATa, met1, ura3, pYGFP3), foram utilizadas para a obtenção dos híbridos com as marcas de seleção resistência ao antifúngico nistatina e expressão do gene GFP;

Linhagens AH22 (MATa, leu2, his4, can1), X2180-1b (MATα, suc2, gal2, cup1, mal, mel), foram utilizadas como testadora de *mating type*;

Híbrido Fleishmann (MATa/α) e linhagens M304-2c (MATa), M606-2c (MATα) e X2904-GFP3 (MATa, met1, ura3, pYGFP3) foram utilizadas como controle no ensaio de fermentação.

Plasmídeo pYGFP3 utilizado (CORMACK et al., 1997; GOMES et al., 2000)

Estas leveduras fazem parte da coleção de culturas do laboratório de Genética de Leveduras ESALQ-USP.

2.2.2 Meios e soluções utilizados

- **Meio completo para *S. cerevisiae* (YEPD)**

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Dextrose 2% (p/v)

Para meio sólido acrescentou-se ágar 2% (p/v)

Esterilizado em autoclave a 1 atmosfera de pressão por 20 minutos.

- **Meio para *Escherichia coli* Luria e Bertani (LB)**

NaCl	1% (p/v)
Triptona	1% (p/v)
Extrato de Levedura	0,5% (p/v)
Para meio sólido acrescentou-se ágar	2% (p/v)

Esterilizado em autoclave a 1 atmosfera de pressão por 20 minutos.

- **Meio de fermentação para *S. cerevisiae***

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Sacarose	15%(p/v)

Esterilizado em autoclave a 1 atmosfera de pressão por 20 minutos.

- **Meio de esporulação**

2,2 g rafinose

30g acetato de potássio

Completar para um volume final de 100ml.

Usar 1 ml da solução estoque para 100ml de meio.

Esterilizado em autoclave a 1 atmosfera de pressão por 20 minutos.

- **Digestão da parede de ascos e separação de ascósporos**

5µl zimoliase

4µl β-mercaptoetanol

400µl tampão da solução hidrolítica

- **Tampão de solução hidrolítica**

5mL sorbitol 2M
0,1mL Tris 1M (pH 7,5)
0,2 NaPO₄ 0,5M
0,2mL EDTA 0,5M (pH8,0)
4,5mL H₂O

- **Solução de ampicilina**

Ampicilina sódica 100 mg.mL⁻¹
Esterilizado por filtração em filtro 0.22µm e estocado a -20°C.

- **Solução de nistatina**

100 mg de nistatina
10 mL de etanol
Armazenar em geladeira a 4°C.

- **Soluções Salina (0,85%)**

NaCl	8,5g
Água destilada	1000mL

A solução foi acondicionada em tubo com 9ml, esterilizado em autoclave a 1 atmosfera de pressão por 20 minutos e utilizada para suspensões celulares.

- **Soluções para isolamento de plasmídio**

Solução I

25mM Tris-HCl

10mM EDTA (pH 8,0)

Esterilizado em autoclave a 1 atmosfera de pressão por 20 minutos.

Solução II

10% SDS

4 N NaOH

As soluções estoque são feitas separadamente e autoclavadas a 1 atmosfera de pressão por 20 minutos. Para uso é preparada uma solução com 0,5mL de NaOH, 0,5mL de SDS e 9 mL de água estéril.

Solução III

3M Acetato de potássio

10% Ácido acético

A solução de acetato de potássio é feita separadamente e esterilizado em autoclave a 1 atmosfera de pressão por 20 minutos. Após a autoclavagem acrescenta-se o ácido acético.

- **Soluções para transformação de leveduras**

Solução I (lavagem e congelamento)

1M de sorbitol

10 mM Bicine-NaOH (pH 8,35)

3% Etileno glicol

5% DMSO

Esterilizado em autoclave a 1 atmosfera de pressão por 20 minutos e estocado a -4°C.

Solução II (Incubação)

40% PEG 1000

0,2 M Bicine-NaOH (pH 8,35)

Esterilizado por filtração em filtro 0.22µm e estocado a -20°C.

Solução III (lavagem e espalhamento)

0,15 M NaCl

10 mM Bicine-NaOH (pH 8,35)

Esterilizado em autoclave a 1 atmosfera de pressão por 20 minutos e estocado a -4°C.

2.2.3 Isolamento de plasmídeo de *E. coli* – Mini prep (Adaptado de Sambrook et al., 1989)

As bactérias foram cultivadas em 2 mL de meio de cultura LB com 2µL de ampicilina “overnight”. Foram transferidos 1,5 mL da cultura para microtubos, estes foram centrifugados a 13000rpm por 1 minuto, sendo o sobrenadante descartado. As células foram ressuspendidas em 100µL de solução I. Adicionou-se 200µL de solução II, misturando lentamente. Acrescentou-se 150µL da solução III sendo posteriormente colocados no gelo por 5 minutos, durante este período observou-se a formação de precipitado. Sendo posteriormente centrifugados a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e transferido para um novo microtubo. O DNA plasmidial foi precipitado com 800 µL de etanol 100% e armazenado a -20°C por 10 minutos. Após este período, novamente foi centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos. Lavou-se o pellet formado no fundo do microtubo com 500 µL de etanol 70%., sendo centrifugado a 13000 rpm por 1 minuto. O etanol 70% foi descartado, deixando secar o pellet à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de água estéril.

2.2.4 Transformação genética

As células competentes para transformação genética da linhagem M606 foram preparadas de acordo com Dohmen et al. (1991). Inicialmente, a linhagem M606 foi

inoculada em 10 mL de YEPD e crescidas durante uma noite em câmaras B.O.D. a 30 °C e, em seguida, 5 mL desta cultura foram transferidos para um frasco de 100 mL com 50 mL de YEPD e crescidas em câmara incubadora MA-830 MARCONI com agitação de 200 rpm a 30°C. A linhagem foi crescida nesse meio até que a densidade ótica (D.O) em comprimento de onda de 600 nm atingisse valores de 0,6 a 1,0. Centrifugou-se essa cultura a 3000g por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se, então 10mL da solução I e ressuspendeu-se as células com a ajuda do agitador tipo Vortex. Novamente, centrifugou-se a suspensão de células a 3000g por 5 minutos, sendo descartado o sobrenadante. Essas células foram ressuspendidas em 1mL de solução I, adicionando-se igual volume de solução de glicerol 30%. Aliquotaram-se 100 µL desta suspensão em microtubos, sendo posteriormente armazenados a – 80°C até o seu uso na transformação com o plasmídio pYGFP3.

Após a preparação das células competentes, a transformação das células foi feita seguindo os passos abaixo:

Acrescentou-se à alíquota de 100 µL de células congeladas 15 µL do plasmídio pYGFP3. Manteve-se sob agitação vigorosa por 5 minutos, depois fizeram-se 5 ciclos de incubação em banho-maria (30°C) por 1 minuto e agitação por 1 minuto. Adicionaram-se 1,2 mL de solução II sendo os microtubos incubados a 30°C por 60 minutos. Os microtubos foram centrifugados a 3000g por 1minuto. As células foram ressuspendidas em 1 mL de solução III e centrifugadas a 3000 g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e as células foram novamente ressuspendidas em 1 mL de solução III e centrifugadas a 3000 g por 1 minuto. Após a centrifugação as células foram ressuspendidas em 1 mL de solução III. Esta suspensão foi semeada em meio YEPD com nistatina 10 mg. L⁻¹, com o auxílio de alça Drigalski, e incubados 30°C por 24horas.

2.2.5 Cruzamento entre as linhagens

As linhagens X2904-GFP3 (MAT α , met1,ura3) e M606-2c (MAT α) foram estriadas em placas e, após crescimento da massa celular, foram colhidas com ponta de palito esterilizado pequena quantidade de células de cada linhagem e misturadas uniformemente na superfície de meio YEPD em caixa de Petri e em seguida incubadas

por 4 horas a 30°C. Desta mistura de células, coletou-se pequena quantidade da biomassa em ponta de palito que foi estriada adequadamente em meio YEPD em caixa de Petri que foi colocada em suporte especial acoplado ao charriot do microscópio óptico OLYMPUS. A separação dos prováveis zigotos foi feita por meio de micromanipulação direta utilizando micromanipulador construído por Tavares (1977), acoplado ao microscópio óptico com ocular especial e objetiva que permite o aumento de 150X. Os prováveis zigotos assim separados foram dispostos em locais separados da caixa de Petri e incubados por 24 horas a 30°C. As colônias isoladas que cresceram foram transferidas para meio YEPD sólido e incubadas por 24 horas a 30°C e, posteriormente, estriadas em meio de esporulação. Após 4-6 dias, amostras destas colônias estriadas foram observadas ao microscópio óptico e quando detectada a formação de ascos e ascósporos típicos considerou-se preliminarmente tratar de diplóides e da sua natureza híbrida.

2.2.6 Isolamento e contagem de esporos

Os híbridos P16, P34 e P42, selecionados para a continuação dos experimentos, foram colocados em meio líquido de esporulação por 4 a 6 dias a 30°C. Após este período, colocou-se 20 µL dessa cultura em esporulação em microtubos e acrescentaram-se 400 µL de tampão de dissecação, agitando em agitador tipo Vortex por 5 segundos e, logo após, foram acrescentados 4 µL β-mercaptoetanol e 5µL enzima zimoliase, agitando em agitador tipo Vortex por mais 5 segundos. A mistura foi incubada por 10 minutos em banho-maria a 30°C e a reação hidrolítica foi inativada colocando o microtubo em gelo. Essa cultura, assim tratada, foi gentilmente estriada na superfície de uma caixa de Petri com meio YEPD sólido. Os quatro esporos de um asco foram separados no micromanipulador. Após a separação dos esporos as placas foram incubadas a 30°C por 48 horas, permitindo a germinação e a formação de colônias no meio completo.

As colônias que cresceram foram cruzadas com duas linhagens testadoras, AH22 (*MATa*) e X2180-1b (*MATα*), de tipo de reação sexual conhecidas para confirmar a haploidia e determinar a reação sexual dos isolados haplóides. As células haplóides

foram testadas em relação à resistência a nistatina e os esporos contados em Câmara de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 400X.

2.2.7 Concentração de leveduras

A determinação da concentração de leveduras nos meios foi realizada por meio de turbidez comparada à escala de MacFarland segundo Silva et al., (1997), que corresponde a uma série de 10 tubos contendo uma solução de cloreto de bário (BaCl_2) a 1% e ácido sulfúrico (H_2SO_4) de 0,1 a 1% , apresentando assim, graus de turvação distintos.

2.2.8 Teste do nível de resistência ao antifúngico nistatina

As linhagens M606-2c, X2904-GFP3 e os híbridos selecionados foram crescidos em YEPD por 24h a 30°C, sendo em seguida feita uma suspensão de células de levedura em solução salina contendo $2,1 \times 10^9$ células por mL de acordo com a comparação à escala de McFarland (SILVA et al., 1997) e, posteriormente, inoculados em YEPD com nistatina nas concentrações de 0, 5, 10, 20, 30 e 40 mg.L^{-1} . Os experimentos foram realizados com três repetições, na presença das linhagens parentais M606-2c e X2904-GFP3 utilizadas como testadoras. A determinação do crescimento da biomassa foi feita de 2 em 2 horas durante 24 horas, com determinação da densidade ótica em comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro Beckman DU 6408.

Os requisitos necessários para um bom crescimento de microrganismo numa cultura são viabilidade do inóculo, fonte de energia, nutrientes essenciais, ausência de compostos inibidores que impedem o crescimento e condições físico-químicas adequadas (PIRT, 1985). Se as condições nutricionais e físico-químicas do meio não se afastam das condições iniciais, ao ponto de afetar o crescimento a uma taxa constante, então durante um intervalo de tempo (dt), em que essas condições de crescimento forem satisfeitas, o aumento do número de microrganismos (dx) é proporcional ao número de células (X) presentes no início do intervalo considerado eq. (1), ou seja:

(1)

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

O valor de crescimento específico (μ) varia entre o crescimento zero na fase lag e crescimento máximo específico que acontece na fase exponencial (μ_{\max}).

Foram realizadas curvas de crescimento na ausência e presença de nistatina. As comparações entre as leveduras foram efetuadas a partir de dados correspondentes à fase exponencial de crescimento determinado pelos coeficientes lineares da equação da reta (b), por meio da eq. (2).

(2)

$$Y = A + bX$$

Como se sabe, este valor corresponde ao mesmo valor da taxa de crescimento (μ) conforme determinado por Monod (1949)

2.2.9 Teste de estabilidade do plasmídio pYGFP3.

Foram selecionados visualmente os híbridos resistentes à nistatina quanto à presença ou ausência de colônias fluorescentes e estes analisados em seguida quanto à estabilidade do plasmídio proveniente da linhagem X2904-GFP3. Os híbridos selecionados foram crescidos em YEPD líquido por 24 horas a 30°C e por meio de diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}), em seguida foram semeadas as diluições 10^{-4} e 10^{-5} com auxílio da Alça Drigalski em YEPD sólido e incubadas a 30°C durante 24 horas.

Utilizou-se neste trabalho a linhagem X2904-GFP3 de *S. cerevisiae* que é proveniente da transformação de X2904-3C com o plasmídio pYGFP3 por Gomes et al.,(2000). O plasmídio pYGFP3 é um “shuttle vectors” e possui as seqüências de

replicação autônoma em levedura 2 μ m, o gene de seleção para o aminoácido triptofano (TRP1), o gene GFP e o promotor da ADH2 (Álcool desidrogenase II) (GOMES et al., 2000).

2.2.10 Avaliação da capacidade fermentativa

Avaliaram-se os híbridos em relação à capacidade fermentativa, tendo como controle as linhagens Fleishmann, M304-2c, M606, M606-2c e X2904-GFP3. Estas leveduras foram crescidas em meio YEPD por 48 horas a 30°C e as respectivas culturas foram centrifugadas a 6000 g por 5 minutos até obter a biomassa necessária, em seguida foram transferidas para tubos de centrifuga de 50mL, com tampas de alumínio autoclavados a 1 atmosfera durante 20 minutos. Os experimentos de fermentação utilizaram estes tubos de centrifuga por facilidade de manuseio e padronização, onde adicionaram-se 36 mL de meio de fermentação e 4,1 g de biomassa celular. O tempo de fermentação foi de 15 horas a 30°C, sem agitação. Completada a fermentação, as células de leveduras foram separadas por meio de centrifugação a 6000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado para determinação do teor alcoólico. As células separadas por meio de centrifugação foram posteriormente ressuspensas em meio de fermentação e, assim, recicladas por cinco ciclos fermentativos.

O experimento de fermentação foi conduzido com 3 repetições verdadeiras para cada levedura avaliada e 5 ciclos de fermentação.

2.2.11 Determinação do teor alcoólico

Para se determinar o teor alcoólico em amostras de vinho, utilizou-se um destilador de álcool MARCONI, onde foram destilados 25 ml das amostras num tempo de aproximadamente 13,5 minutos. Em seguida 10 ml destes destilados foram transferidos para determinação da densidade em Densímetro Digital AP PAAR DMA-46, com precisão de quatro casas decimais e após 2 minutos, tempo utilizado para a estabilização da temperatura a 20°C, foram registrados os valores da densidade sendo

posteriormente convertidos por tabela padrão em percentagem etanol em gramas (g etanol.100mL⁻¹).

2.2.12 Cálculo do rendimento fermentativo

O rendimento fermentativo foi calculado com base na estequiometria proporcionada pela fermentação alcoólica considerando como 100% de rendimento quando ocorre a formação de 51,11g de etanol ou 64,75mL a 20^oC, a partir de 100 g de açúcares redutores totais.

2.2.13 Análise de açúcares redutores

Para a determinação de açúcares redutores, utilizou-se o método de determinação colorimétrica proposto por Somogyi (1952). Em 5mL de amostra do vinho acrescentou-se 10mL de HCl 0,75N a 65°C por 30 minutos, logo após acrescentou-se 10mL de NaOH 0,75N, completando o volume para 250mL de água. Retirou-se 5mL desta diluição completando o volume para 200mL de água destilada. A partir disso, 1mL de cada amostra diluída foram distribuídas em tubos e, logo após, adicionou-se 1mL de reativo de Somogyi, seguido de fervura por 15 minutos e após de resfriadas, adicionou-se 1mL do reativo de Nelson e 7mL de água destilada. A leitura foi feita em espectrofotômetro Beckman DU 6408, em comprimento de onda de 520 nm.

2.2.14 Análises estatísticas

No experimento para o teste de resistência à nistatina, cada linhagem foi avaliada nas concentrações de 0, 5, 10, 20, 30 e 40 mgL⁻¹ de nistatina e sendo feitas três repetições para cada tratamento. Foram obtidas curvas de crescimento na ausência e presença de nistatina, as comparações entre as leveduras foram efetuadas a partir de dados correspondentes à fase exponencial de crescimento determinado pelos coeficientes lineares da equação da reta (b), por meio da equação $Y=A+ bX$. Como se sabe, este valor corresponde ao mesmo valor da taxa de crescimento (μ) conforme determinado por Monod (1949). A média de três repetições para cada linhagem foi utilizada para as comparações dos coeficientes lineares por análise de variância

(ANAVA) com aplicação do teste F ao nível de 5% de significância e teste de Tukey a 5% de significância, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.6. (2003)

As análises estatísticas do desempenho fermentativo das linhagens, isto é, produção de etanol e rendimento alcoólico, foram realizadas por meio da análise de variância (ANAVA), utilizando o delineamento no esquema parcelas subdivididas no tempo, com aplicação do teste F ao nível de 5% de significância. Sendo as linhagens consideradas como parcelas e os ciclos fermentativos como sub-parcelas. As comparações de médias de produção de etanol foram feitas pelo teste de Tukey a 5% de significância e, para estas análises estatísticas, utilizou-se o programa SAS (1999).

3 Resultados e discussão

2.3.1 Transformação

Os primeiros experimentos para a obtenção da linhagem diplóide resistente a nistatina e portadora do gene GFP3 foram realizados por meio de transformação do híbrido M606 utilizando-se o plasmídeo pYEGFP3, seguindo-se o protocolo de Dohmen et al. (1991). Vários experimentos de transformação foram realizados, mas não foram observadas colônias fluorescentes nas placas, indicadoras de transformação efetiva.

A eficiência da transformação de leveduras em qualquer procedimento depende das propriedades da linhagem utilizada, da densidade celular ótima e das condições do DNA (BECKER; LUNDBLAD, 1993). O resultado negativo obtido pode ser devido à baixa eficiência de transformação do híbrido M606 o que se especula como devido à resistência à nistatina e modificação de suas propriedades de membranas, tanto em relação à composição de esteróis como de permeabilidade. Como esta linhagem não possui marcas (genes) auxotróficas a seleção da célula transformada somente poderia ser feita visualmente com a expressão do gene GFP3, o que fica dificultado porque todas as células transformadas ou não transformadas podem crescer no meio e diminuir as chances de visualização das colônias transformadas dentre as não transformadas.

Existem diferentes marcadores de seleção necessários para identificar o clone transformado que são empregados em leveduras, a maioria são genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos (ZHANG; MOO-YOUNG; CHISTI, 1996), o que torna as linhagens que possuem essas marcas auxotróficas, incapazes de crescer no meio de cultura não suplementado adequadamente.

2.3.2 Esporulação

Para se obter um híbrido com as características de resistência ao antifúngico nistatina e expressão do gene GFP, realizaram-se alguns cruzamentos entre as linhagens haplóides M606-2c (MAT α) e X2904-GFP₃ (MAT α). Foram isolados por

micromanipulação 188 possíveis zigotos e, a partir desses, somente 125 colônias cresceram em meio YEPD.

As linhagens provenientes do cruzamento foram investigadas quanto à esporulação, pois é esperado que somente linhagens diplóides de leveduras sejam capazes de esporular em condições de estresse e formem ascos com quatro esporos haplóides (LINDEGREN; LINDEGREN, 1942). Assim, dos 125 isolados que foram colocados em meio de esporulação somente 74 foram capazes de apresentar ascos com variado número de ascósporos. O fato dos demais isolados não produzirem esporos, pode ter sido ocasionado pelo isolamento de células haplóides ou células diplóides portadoras de anomalias que as impede de esporular.

A esporulação é compreendida por duas divisões meióticas originando núcleos haplóides sendo uma condição essencial para a sobrevivência da espécie em condições de estresse, mantendo a viabilidade da espécie por meio de células haplóides reprodutivas (MILLER, 1989).

Códon, Gasent-Ramírez e Benítez (1995) verificaram nas leveduras de panificação e de laboratório que a percentagem de esporulação estava relacionada com as fases de crescimento exponencial e estacionária. As células dependem da presença de nutrientes no meio para completar o ciclo mitótico, no entanto, caso ocorra a limitação de nutrientes no momento em que as células estão na fase G1 do ciclo celular, estas células saem da fase G1 e entram na fase G0 chamado de não proliferativo. Portanto, não realizam a divisão mitótica, conseqüentemente não entram no ciclo meiótico, e assim revelam uma baixa freqüência de esporulação (CODÓN; GASENT-RAMÍREZ; BENÍTEZ, 1995). Nos experimentos preliminares realizados por Codón, Gasent-Ramírez e Benítez (1995), onde testaram algumas linhagens de laboratório e panificação de acordo com o método proposto por Sherman (1986), encontraram uma baixa freqüência de formação de ascos cerca de 20 a 60% e a formação de ascos com quatro esporos foi de 1 a 4%. Quando se levou em consideração a fase exponencial de crescimento, se obteve uma freqüência de ascos superior a 97% e de formação de ascos com quatro esporos foram maiores que 60%.

Dos híbridos provenientes do cruzamento das linhagens X2904-GFP3 e M606-2c foram escolhidos três híbridos denominados P16, P34 e P42, que apresentaram uma

baixa frequência de esporulação que variou de 4% a 35% de ascos e dos ascos formados cerca de 1 a 6% possuíam quatro esporos. Vários são os fatores ambientais e hereditários que influenciam na frequência de ascos e também no número de esporos por asco (BECKERICH et al., 1984). Linhagens de leveduras industriais que exibem uma frequência reduzida na formação de ascos, geralmente apresentam a formação de ascos incompletos, com dois ou três esporos com uma viabilidade baixa (BECKERICH et al., 1984).

2.3.3 Resistência a nistatina

Após a seleção dos 74 híbridos, 63 linhagens diplóides apresentaram a expressão da proteína fluorescente GFP visualizada por meio de luz ultravioleta. Essas 63 linhagens foram testadas frente ao antifúngico nistatina e, dessas, somente 10 híbridos (13,5%) se mostraram resistentes ao antifúngico numa concentração de 5mg.L^{-1} . Devido à reduzida frequência de esporulação e à baixa formação de ascos com quatro esporos, somente 5 tétrades isoladas foram viáveis. Foi observada uma proporção na segregação de 2 esporos resistentes e 2 esporos suscetíveis à nistatina, indicando que o alelo de resistência possa estar em um único gene.

No caso em que a herança genética é monofatorial, linhagens diplóides resultantes de cruzamento entre linhagem selvagem (B) e mutante (b) originam ascos com esporos na proporção de 2B:2b. Esta proporção indica que o fenótipo está sob o controle de um único alelo numa meiose normal. Ocasionalmente, uma distribuição na segregação de 4B:0b, 3B:1b e 2B:2b, pode ser indicação de poliploidia, polissomia ou segregação de um gene supressor (PRESCOTT, 1975). Cruzamentos adicionais são necessários para melhor distinguir entre estas alternativas. Quando se tem um fenótipo sob o controle de um alelo único, predominando a proporção de 2B:2b na segregação, pode-se também observar uma baixa frequência de segregantes na proporção de 3B:1b e 1B:3b como consequência de conversão gênica (MORTIMER; HAWTHORNE, 1975).

Pelo fato das leveduras possuírem ascos com quatro esporos provenientes de um evento meiótico, por meio de análises genéticas é possível determinar se a mutação é uma alteração em um único locus ou se é uma característica que esta ligada ao

centrômero ou outro marcador, construir linhagens com novos arranjos de marcadores e investigar a interação dos genes (SHERMAN, 1998)

Alguns trabalhos têm investigado a dominância ou recessividade da resistência à nistatina. Ahmed; Woods (1967) conseguiram identificar mutantes resistentes a nistatina que possuíam três genes recessivos (*nys-1*, *nys-2* e *nys-3*) e a presença de dois outros genes dominantes modificadores (M^{nys-1} e M^{nys-2}) que agiam aumentando resistência desses mutantes. Patel e Johnston (1968) isolaram mutantes de *C. albicans* resistentes a nistatina, não sabendo se a resistência era proveniente de um ou mais genes, afirmaram que no mínimo um gene dominante estava envolvido na resistência. Em 1972, Bard analisou geneticamente alguns fenótipos de linhagens de *S. cerevisiae* resistentes a nistatina, com necessidade de suplementação com lipídios e deficiência respiratória, e constatou que essas características segregavam juntas e eram recessivas.

Para a realização de seu trabalho, Hapala et al. (2005) isolaram mutantes de *S. cerevisiae* resistentes a nistatina e anfotericina e, a análise genética revelou que as mutações podem ter ocorrido em um único alelo, indicando que a herança genética se deu de modo diferente no cruzamento, sendo um alelo recessivo para resistência nistatina e alelo dominante para a resistência anfotericina.

2.3.4 Determinação do nível de resistência dos híbridos

Neste trabalho, na ausência de nistatina foram obtidas curvas de crescimento, determinando-se que a fase exponencial de crescimento variou de 6 a 10 horas. Por este motivo, utilizaram-se os tempos 6, 8 e 10h para calcular os coeficientes lineares da equação da reta (b) que é equivalente ao valor de μ , conforme descrito nos itens 2.2.8 e 2.2.14. Os dados experimentais permitiram determinar adequadamente que os valores da velocidade de crescimento apresentaram diferenças entre as linhagens, entre as concentrações de nistatina e na interação linhagem e concentrações de nistatina com significância de 5%. A partir disso, aplicou-se o teste de Tukey a 5% de significância, verificando-se por análise das médias de μ_{max} as diferenças entre linhagens dentro de cada concentração de nistatina (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparações das velocidades máximas de crescimento (μ_{\max}) das linhagens em relação às concentrações de nistatina, para verificar o nível de resistência ao antifúngico.

Linhagem	Concentração Nistatina (mgL^{-1})					
	0	5	10	20	30	40
M606-2c	0,2199ABa	0,2610Aa	0,1137BCa	0,0649Ca	0,0095Ca	0,0052Ca
X2904-GFP3	0,3154Aa	0,0007Bb	0,0027Bb	0,0024Ba	0,0022Ba	-0,0026Ba
P16	0,2899Aa	0,2677Aa	0,0944Bab	0,0386Ba	0,0126Ba	0,0076Ba
P34	0,2670Aa	0,2735Aa	0,1120Ba	0,0789Ba	0,0092Ba	0,0044Ba
P42	0,2870Aa	0,1687Aa	0,0900Bab	0,0501Ba	0,0195Ba	0,0050Ba

Valores μ_{\max} (h^{-1}) seguidas pela letras maiúscula (nas linhas) e minúscula (nas colunas), pelo teste de Tukey a 5% de significância.

As linhagens que foram cultivadas na ausência de nistatina (0mg. L^{-1}) não apresentaram diferenças entre si.

Verifica-se que a linhagem X2904-GFP3 utilizada como controle negativo no tratamento, teve seu crescimento inibido com 5mgL^{-1} de nistatina, apresentando o valor de μ_{\max} igual a 0,0007. Já as demais linhagens tiveram o valor μ_{\max} iguais entre si, apenas diferindo o valor de μ_{\max} da linhagem X2904-GFP3.

Com 10mg.L^{-1} de nistatina o valor de μ_{\max} das linhagens M606-2c e P34 não diferiram entre si sendo os valores de μ_{\max} respectivamente de 0,1137 e 0,1120. No entanto, os valores de μ_{\max} referentes às essas duas linhagens M606-2c e P34 diferiram do μ_{\max} obtida pela linhagem X2904-GFP3 de 0,0027.

Nas concentrações de 20, 30 e 40mgL^{-1} de nistatina as linhagens não apresentaram diferenças significativas entre si, mostrando que a ação fungicida do antifúngico nistatina, nestas concentrações, inibe o crescimento das linhagens e conseqüentemente, diminuem a taxa máxima de crescimento.

Quando se considera o crescimento de cada linhagem nas diferentes concentrações de nistatina, observa-se que a linhagem M606-2c apresentou a maior velocidade de crescimento (μ_{\max} 0,2610) na concentração 5mgL⁻¹ de nistatina. Dessa forma, o μ_{\max} da linhagem M606-2c nessa concentração de nistatina foi superior ao μ_{\max} nas concentrações de 20, 30 e 40 mgL⁻¹ de nistatina, onde se observou pouco ou nenhum crescimento.

A linhagem X2904-GFP3 somente apresentou um μ_{\max} maior na ausência de nistatina, apresentando o μ_{\max} inferior na presença de nistatina. Desse modo, percebe-se que a concentração mínima de 5mgL⁻¹ do antifúngico é suficiente para ocasionar morte celular da linhagem susceptível.

Alguns estudos mostram que a concentração mínima inibitória de nistatina é capaz de impedir a proliferação de diferentes microrganismos. Segundo Brown e Hazen (1957), as concentrações de nistatina de 1,5-13 mg.L⁻¹ podem ser utilizadas para impedir o crescimento de uma variedade de fungos susceptíveis. Cook (1974) isolou mutantes da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* que eram resistentes a concentrações de até 4mg.L⁻¹ de nistatina.

Os híbridos selecionados P16, P34 e P42 tiveram o μ_{\max} superior nas concentrações de 0 e 5mgL⁻¹ de nistatina e não apresentaram diferenças significativas entre si. Mas verifica-se que os μ_{\max} das linhagens P16, P34 e P42 nas duas concentrações de 0 e 5mgL⁻¹ foram superiores em relação aos μ_{\max} dessas linhagens nas concentrações de 10, 20, 30 e 40mgL⁻¹ de nistatina.

O grau de resistência à nistatina apresentada pelos mutantes pode ser variável, como observado por Grunwald-Raij; Margalith (1990), que isolaram cinco mutantes de *S. cerevisiae* haplóides e poliplóides que variaram no grau de resistência a nistatina de 60 a 120U/ml. A análise de esterol mostrou um acúmulo maior de esterol, provavelmente o colestatetraenol e zimosterol, nos mutantes *nys2*, *nys3*, *nys9* e *nys11* e o mutante *nys6* acumulou ergosterol e tetraenol.

De acordo com Harman; Masterson (1957), a nistatina possui o efeito máximo de letalidade nas células quando as culturas são bem aeradas e na fase exponencial de crescimento. Segundo Patel; Johnston (1971), o efeito da nistatina nas curvas de crescimento obtidas, para algumas linhagens de *S. cerevisiae*, se deu no início da fase

exponencial de crescimento em quase todos os casos. Verificaram que a utilização de baixas concentrações de nistatina permitia a sobrevivência de um número suficiente de células, mostrando uma subsequente fase de crescimento, tendo como resultado a recuperação do crescimento da cultura. Aplicando altas concentrações de nistatina, observaram a existência de um período de pequena recuperação do crescimento que logo era seguido pela morte da maioria das células. Assim, a sobrevivência das células ao antifúngico nistatina dependerá, principalmente da linhagem, além da concentração de nistatina e do tempo de exposição ao antifúngico (PATEL; JOHNSTON, 1971). Nos experimentos realizados constatou-se, como em trabalhos anteriores, que a nistatina agiu principalmente na fase exponencial de crescimento. Observou-se que à medida que a concentração de nistatina foi aumentada à fase exponencial foi diminuída (Figura 2).

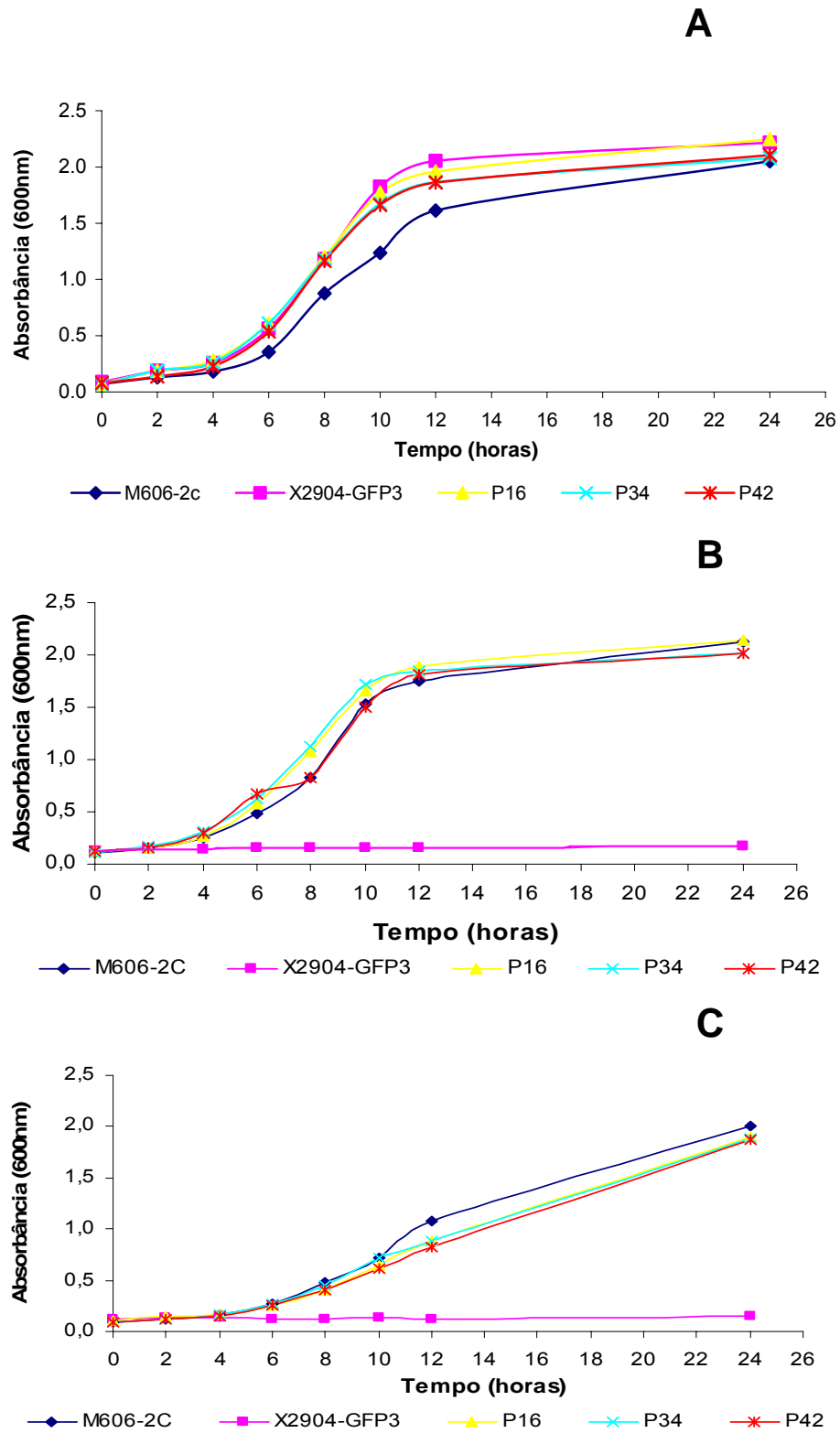


Figura 2 – Efeito das diferentes concentrações de nistatina na fase exponencial de crescimento das linhagens X2904-GFP3 (susceptível) e M606-2c, P16, P34 e P42 (resistentes). A, 0mg.L⁻¹ de nistatina. B, 5mg.L⁻¹ de nistatina. C, 10mg.L⁻¹ nistatina.

2.3.5 Expressão do gene GFP3

Os híbridos selecionados P16; P34 e P42 foram plaqueados em YEPD sólido para obter colônias isoladas e verificar a estabilidade do plasmídio aferida pela contagem de colônias fluorescentes em relação às normais. Constatou-se que havia nas placas colônias fluorescentes que possuíam expressão do gene GFP3, colônias não-fluorescentes com setores fluorescentes e colônias inteiramente não-fluorescentes como se apresenta na Figura 3.

O aparecimento de colônias não-fluorescentes ou colônias com setores não-fluorescentes decorre da segregação do plasmídio na divisão celular, com distribuição assimétrica dos plasmídios nas células filhas, o que é reconhecido como instabilidade plasmidial, tendo como consequência o aparecimento de células sem o plasmídio pYGFP3 e com o pYGFP3 numa mesma colônia ou colônias formadas somente por células sem o plasmídio pYGFP3. Este resultado está em conformidade com o observado por Romanos et al (1992), cabendo observar que a instabilidade plasmidial ocorre quando algumas células após a transformação deixam de expressar o gene clonado, podendo ser provenientes de mudanças no plasmídio ou perda destes. Assim, numa mesma cultura poderemos ter células expressando o gene clonado e outras não (PRIMROSE et al., 1981).

A linhagem X2904-GFP3 que foi empregada nesse estudo possui o plasmídio pYGFP3 que é considerado epissomal por ter uma seqüência de replicação autônoma 2 μ m necessária à replicação desse no citoplasma das células transformadas. Os plasmídios baseados na seqüência 2 μ m são amplamente utilizados em sistemas recombinantes de *S. cerevisiae*, pela eficiência de transformação e por serem capazes de produzir um alto número de cópias, no entanto, apresentam como principal problema a instabilidade plasmídica (ROMANOS *et al.* 1992). Assim, de acordo com o observado, o aparecimento de regiões não fluorescentes nas colônias pode ser um indicativo da instabilidade plasmidial decorrente da presença da seqüência de replicação autônoma 2 μ m. Os plasmídios epissomais necessitam de pressão seletiva para a sua manutenção e podem, ainda assim, ser instáveis mesmo com elevados níveis de expressão e sob condições seletivas (ROMANOS et al. 1992). Uma explicação para as perdas de

plasmídio, mesmo as células possuindo um alto número de cópias plasmidiais, é que em 30 a 60% das divisões celulares, os plasmídios produzidos nas células tendem a permanecer na célula-mãe, os quais não são segregados para a célula-filha (MURRAY, 1983).

Nos transformantes analisados encontraram-se colônias que apresentaram uma fluorescência homogênea com diferenças no grau de expressão do gene GFP3, sugerindo que possa haver uma alta e baixa síntese da proteína GFP (Figura 3A e 3C). Resultados semelhantes foram obtidos por Hegemann et al., (1999). Esses autores relataram a expressão do gene GFP em linhagens de *S. cerevisiae* transformadas com plasmídios constituídos com seqüências de replicação autônoma, onde obtiveram uma população de células nas quais a maioria apresentou uma forte fluorescência, enquanto que uma minoria de células mostrou-se com um baixo nível de fluorescência. As células que mostraram uma alta ou baixa expressão do gene GFP foram analisadas por citometria, e encontrou-se que as células com uma baixa fluorescência perdiam o plasmídio durante a divisão celular, enquanto que as células com alta fluorescência retinham o plasmídio.

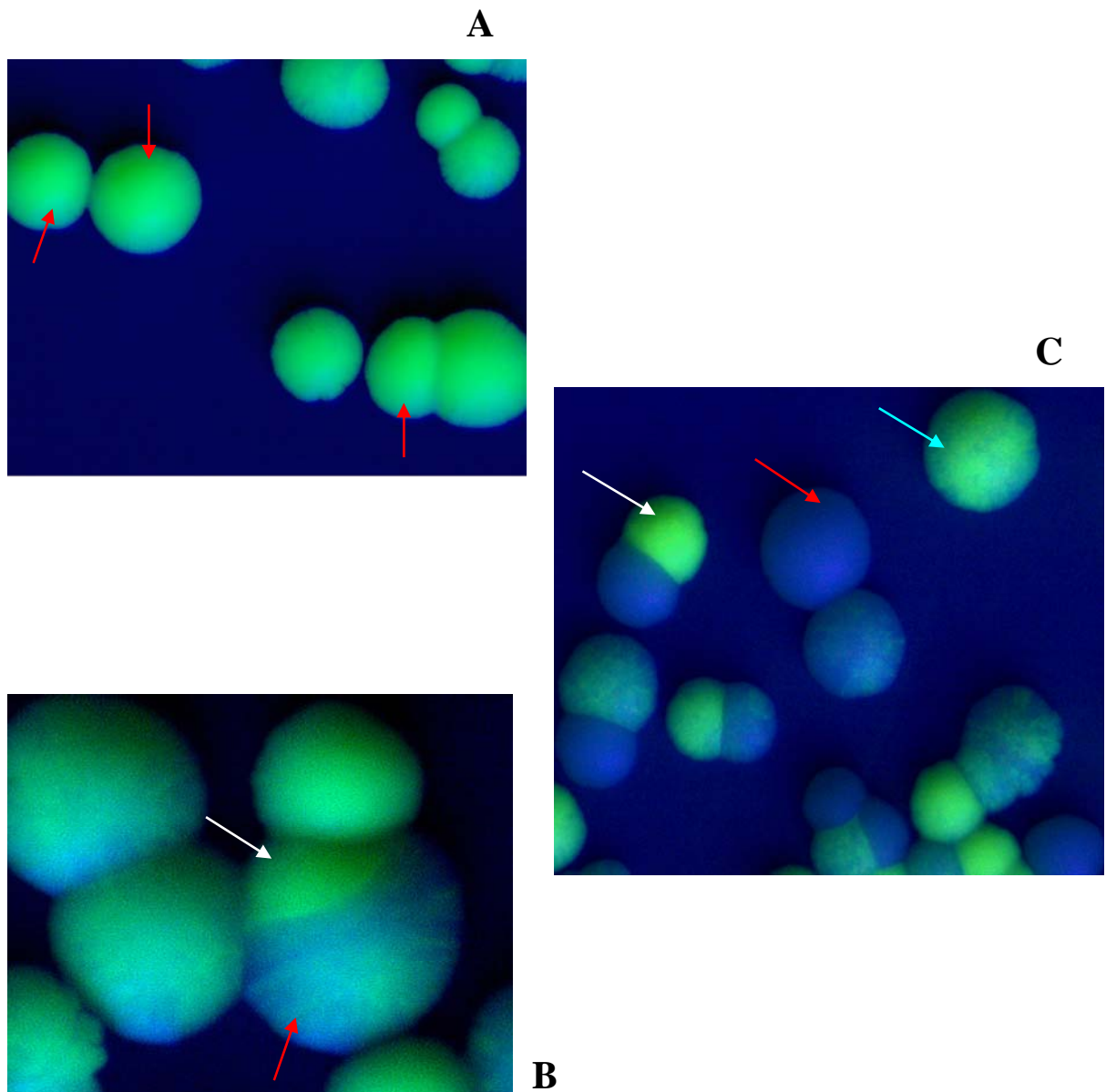


Figura 3 - Variação na expressão do gene GFP3 em colônias de *S. cerevisiae*. A, colônias fluorescentes que não apresentaram perda do plasmídeo pYGFP3. B, colônias apresentando regiões fluorescentes (seta branca) e não-fluorescentes ocasionadas pela perda do plasmídeo pYGFP3 (seta vermelha). C, colônias fluorescentes (seta branca), colônias não-fluorescentes (seta vermelha) e colônias com uma baixa expressão do GFP3 (seta azul).

As colônias não-fluorescentes com regiões fluorescentes mostraram-se diferentes entre si, algumas possuíam as regiões fluorescentes maiores e mais evidentes do que as regiões não-fluorescentes (Figura 3B) e em outras colônias as regiões não-fluorescentes eram maiores e mais evidentes do que as fluorescentes (Figura 3C). Do mesmo modo, Koshland et al (1985) verificou visualmente em linhagens de *S. cerevisiae*, mutantes para adenina (*ade3* e *ade2*), a instabilidade plasmídica de células transformadas com plasmídio contendo o gene *ADE3*. Os mutantes não transformados para *ade2* formam colônias vermelhas e os mutantes para *ade3* e *ade2ade3* formam colônias brancas. As células *ade2ade3* transformadas com o plasmídio originam colônias vermelhas. No entanto, foram identificadas visualmente, além das colônias vermelhas, colônias brancas e colônias vermelhas contendo regiões brancas, indicando uma provável perda plasmídica.

O híbrido P42, dentre todas as linhagens analisadas, foi o que apresentou maior percentagem de colônias fluorescentes (40,25%). Observou-se que o híbrido P16 foi o que formou uma maior percentagem de colônias não-fluorescentes com regiões fluorescentes (70,42%) e a linhagem X2904-GFP3 foi a que mostrou maior perda do plasmídio (48,66%), como se observa na Tabela 2. A percentagem de colônias fluorescentes com regiões não fluorescentes nos híbridos e linhagem estudadas variou de 35,07% a 70,42%, indicando perda plasmídica durante a divisão mitótica das células. Da mesma forma, Koshland et al. (1985) obtiveram uma percentagem alta de colônias vermelhas com regiões brancas (93,2%), indicando a perda de plasmídio por algumas células. Apenas 2 % das colônias formadas eram vermelhas e 4,5% eram brancas, demonstrando respectivamente a presença e ausência do plasmídio (KOSHLAND et al., 1985).

Tabela 2 - Percentagem de colônias fluorescentes, não-fluorescentes e não-fluorescentes/ fluorescentes formadas para cada híbrido selecionado

Linha- gem	% de colônias			Total de colônias
	Fluorescentes	Não-fluorescentes	<u>Não-fluorescentes</u> Fluorescentes (1)	
X2904- GFP3	4,86	48,66	46,48	824
P16	3,38	26,19	70,42	710
P34	27,23	22,09	50,66	896
P42	40,25	24,67	35,07	770

(1) Não-fluorescentes/fluorescentes correspondem a colônias fluorescentes com regiões não fluorescentes

A instabilidade plasmidial verificada nos híbridos não garante uma identificação segura destes. Uma solução eficiente para resolver a instabilidade plasmidial, seria a integração direta do gene marcador no genoma da célula hospedeira (CHUNG et al., 2002). Isto permitiria que a instabilidade segregacional pudesse ser eliminada e o numero de cópias do plasmídeo mantido em nível ótimo (LEE; DA SILVA, 1997).

2.3.6 Fermentação

No experimento de fermentação, as leveduras Fleishmann, M304-2c, M606, M606-2c e X2904-GFP3 foram utilizadas como controle na avaliação da capacidade fermentativa dos híbridos P16, P34 e P42.

A análise de variância mostrou diferenças significativas entre linhagens e entre ciclos, de acordo com a Tabela 3. No entanto, as diferenças das médias referentes à interação linhagem*ciclo e linhagem*repetição não foram significativas a 5% de significância. Mesmo não apresentando significância na interação linhagem*ciclo, foi

realizado o teste de Tukey, o qual também não mostrou diferenças a 5% de significância.

Tabela 3 - Análise de variância de 8 linhagens de leveduras em 6 ciclos fermentativos, utilizando o delineamento de parcelas subdivididas no tempo.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	P>F
Linhagem	7	17,17	2,45	10,93	<0,0001
Linhagem*Repetição	16	6,27	0,39	1,75	0,0596
Ciclo	4	7,52	1,88	8,38	<0,0001
Linhagem*Ciclo	28	9,81	0,35	1,56	0,0720
Erro	64	14,35	0,22		
Total	119	55,14			

Em relação ao desempenho fermentativo das linhagens nos ciclos, as linhagens M304-2c e X2904-GFP3 não apresentaram diferenças significativas entre si e tiveram um rendimento alcoólico superior às linhagens P42 e P34 que foram iguais (Tabela 4).

Tabela 4 – Médias da produção de álcool (°GL) e rendimento alcoólico (%) das linhagens dentro dos ciclos, analisados pelo teste de Tukey a 5%

Linhagem	Média de álcool produzido (°GL)	Rendimento alcoólico (%)
M304-2c	8,78 A	92,91
X2904-GFP3	8,76 A	92,69
M606	8,69 AB	91,95
M606-2c	8,36 ABC	88,46
Fleishmann	8,05 ABC	85,18
P16	7,99 ABC	84,55
P42	7,92 BC	83,80
P34	7,81 C	82,64

Alguns autores relatam que os mutantes resistentes a nistatina, por não formarem ergosterol, possuem um menor rendimento alcoólico, baixa tolerância a etanol e menor viabilidade celular em altas concentrações de açúcar quando comparados às linhagens parentais não resistentes (GRUNWALD-RAIJ; MARGALITH, 1990). Sugere-se que a substituição do ergosterol por outros esteróis pode diminuir o rendimento alcoólico e causar uma menor tolerância ao etanol (GRUNWALD-RAIJ; MARGALITH, 1990; LEES et al., 1980). Entretanto, verifica-se que o híbrido M606 resistente a nistatina apresentou um alto rendimento alcoólico (91,92%) sendo contrário ao verificado por Grunwald-Raij e Margalith (1990). Da mesma forma, foi observado que as linhagens resistentes a nistatina M606-2c, P16 juntamente com o híbrido M606 não apresentaram diferenças quando comparadas às linhagens suscetíveis M304-2c e X2904-GFP3. Assim, sugere-se que somente a diferença de esteróis na membrana não seja suficiente para explicar o baixo rendimento alcoólico encontrado por Grunwald-Raij e Margalith (1990).

De acordo com a análise de variância, quanto à produção de álcool nos ciclos, constata-se que o quarto e quinto ciclos foram iguais e superiores na produção de etanol e diferentes do primeiro ciclo (Tabela 6), ao contrário do que foi constatado por Marques e Serra (2004), onde as fermentações com reutilização do fermento, permaneceram constantes em todos os ciclos. Estes autores verificaram também que quando se utiliza uma concentração maior de açúcar no meio observa-se que os rendimentos de etanol são maiores nas primeiras fermentações, no entanto, com o passar das reciclagens diminui-se, podendo chegar na oitava reciclagem com valores bem inferiores.

Tabelas 6 – Médias da produção de álcool (°GL) para ciclos, analisados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Ciclos	Médias da produção de álcool (°GL)
1	7.96 c
2	8.18 bc
3	8.26 bc
4	8.37 ab
5	8.72 a

3 CONCLUSÕES

Foram obtidos os híbridos P16, P34 e P42 resistentes a nistatina e que associam esta resistência a fluorescência proveniente da expressão do gene GFP3. Embora seja possível obter inóculos industriais destes híbridos livres de leveduras contaminantes com a utilização da nistatina, estes apresentaram rendimentos de alcoólicos inferiores ao da linhagem de panificação comumente utilizada nas destilarias. Portanto, necessita-se que a capacidade fermentativa destes híbridos seja melhorada por meio de novos cruzamentos.

Além disso, apesar de os híbridos apresentarem a expressão do gene GFP3, constatou-se a instabilidade do plasmídeo, com conseqüente aparecimento de colônias fluorescentes e não-fluorescentes. Tal fato poderia prejudicar a identificação destes híbridos quando na presença de um contaminante selvagem. Uma solução para a instabilidade seria integrar o gene GFP3 ao genoma da linhagem, o que poderia garantir a todas as células o recebimento de uma cópia deste gene, tornando a identificação visual eficiente.

REFERÊNCIAS

ABU-SALAH, K.M. Amphotericin B: an update. **British Journal of Biomedical Science**, London, v. 53, n. 2, p. 122-133, 1996.

AHMED, K.A.; WOODS, R.A. A genetic analysis of resistance to nystatin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetical Research**, London, v. 9, n. 2, p. 179-193, apr. 1967.

ALTHERTUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, P.M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 3, n.1, p. 42-49, 1984.

AMORIM, H. V. **Processos de produção de álcool**: controle e monitoramento. 2.ed. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996.103p.

BARD, M. Biochemical and genetic aspects of nystatin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Whashington, v. 11, n. 3, p. 649-657, 1972.

BECKER, D.M.; LUNDBLAD, V. Introduction of DNA into yeast cells. In: AUSUBEL, F.A.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHI, K. (Ed.) **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley and Sons, 1994. p. 13.7.1-13.7.10., 1994.

BECKERICH, J. M.; FOURNIER, P; GAILLARDIN, C.; HESLOT, H.; ROCHET, M.; TRETON, B. Yeasts. In: Ball, C. (Ed.). **Genetics and breeding of industrial microorganisms**. Boca Raton: CRC Press, 1984. p. 115–145.

BOLARD, J. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 864, n. 3-4, p. 257-304, dec. 1986.

BOWYER, P.; MUELLER, E.; LUCAS, J. Use of an isocitrate lyase promoter–GFP fusion to monitor carbon metabolism of the plant pathogen *Tapesia yallundae* during infection of wheat. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 1, n. 4, p. 253–262, 2000.

BROWN, M.S.; TRUMPOWER, B.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, Washington, v. 232, n. 4746, p. 34-47, 1986.

BROWN, R.; HAZEN, E. L. Present knowledge of nystatin, an antifungal antibiotic. **Transactions of the New York Academy of Science**. New York, v. 19, n. 5, p.447-456, 1957.

BULL, A.T.; BUSHELL, M.E. Environmental control of fungal growth. In: Smith, J. E.; Berry, D. R. (Ed) **The filamentous fungi**. New York: Wiley, 1976, v. 2, p1-31.

CHUNG, Y.S.; KIM, M.D.; LEE, W.J.; RYU, Y.W.; KIM, J.H.; SEO, J.H. Stable expression of xylose reductase gene enhances xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme And Microbial Technology**, New York, v. 30, n. 6, p. 809-816, 2002.

CODÓN, A. C.; GASENT-RAMÍREZ, N. J. M.; BENÍTEZ, T. Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 2, p. 630–638, 1995.

COOK, K. A. Regulation of aromatic metabolism in fungi: Selection of mutants of the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* with nystatin. **Journal of general microbiology**, London, v. 85, p. 29-36, 1974.

CORMACK, B. Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. **Current Opinion Microbiology**, Tokyo, v. 1, p. 406–410, 1998.

CORMACK, B.P.; BERTRAM, G.; EGETON, M.; GOW, N.A.R.; FALKOW, S.; BROWN, A.J.P. Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. **Microbiology**, Reading, v.143, p.303-311, 1997.

CUBITT, A.B.; HEIM, R.; ADAMS, S.R.; BOYD, A.E.; GROSS, L.A.; TSIEN, R.Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 20, p. 448–455, 1995.

DI MAURO, E.; KENDREW, S.; CASERTA, M. Two distinct nucleosome alterations characterize chromatin remodeling at the *Saccharomyces cerevisiae* ADH2 promoter. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, p. 7612–7618, 2000.

DOHMEN, R.J.; STRASSER, A.W.M.; HONER, C.B.; HOLLENBERG, C.P. An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. **Yeast**, Chichester, v. 7, p. 691-692, 1991.

GACHOTTE, D.; BARBUCH, R.; GAYLOR, J.; NICKEL, E.; BARD, M. Genetics characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ERG26 gene encoding the C-3 sterol dehydrogenase (C-4 decarboxylase) involved in sterol biosynthesis (fungiycarboxylic acid sterol). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, Washington, v. 95, p. 13794–13799, 1998.

GACHOTTE, D.; SEN, S.E.; ECKSTEIN, J.; BARBUCH, R.; KRIEGER, M.; RAY, B.D.; BARD, M. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ERG27 gene encoding the 3-keto reductase involved in C-4 sterol demethylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, Washington, v. 96, n. 22, p.12655–12660, 1999.

GALLO, C.R.; CANHOS, V.P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica – revisão. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 9 , n. 4-5, p. 35-40, 1991.

GOMES, L. H.; DUARTE, K. M. R.; ANDRINO, F. G.; GIACOMELLI, A. M. B.; TAVARES, F. C. A. A vector carrying the GFP gene (Green fluorescent protein) as a yeast marker for fermentation processes. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.57, n.4, p.713-716, 2000.

GOTTLIEB, D.; CARTER, H.F.; SLONEKER, J.H.; AMMANN, A. Protection of fungi against polyene antibiotics by sterols. **Science**, Ireland, v. 128, p. 361, 1958.

GRUNWALD-RAIJ, H.; MARGALITH, P. Ethanol fermentation by nystatin-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 68, n.3, p. 247-52, 1990.

HAPALA, I.; KLOBUCNIKOVA, V.; MAZANOVA, K.; KOHUT, P. Two mutants selectively resistant to polyenes reveal distinct mechanisms of antifungal activity by nystatin and amphotericin B. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 33, n. 5, 2005.

HARMAN, J.W.; MASTERSON, J.G. The mechanism of nystatin action. **Irish Journal of Medical Science**. Dublin, v. 378, p. 249-253, 1957.

HAZEN, E.L.; BROWN, R. Fungicidin, an antibiotic produced by soil actinomycete. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v.76, p. 93-97, 1951.

HEBEKA, E.K.; SOLOTOROVSKY, M. Development of resistance to polyene antibiotics in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 89, p. 1533-1539, 1965.

HEGEMANN, J.H.; KLEIN, S.; HECK, S.; GULDENER, U.; NIEDENTHAL, R.K.; FLEIG, U. A fast method to diagnose chromosome and plasmid loss in *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Yeast**, Davis, v. 15, n. 108, p. 1009-1019, 1999.

HICKS, J.; HERSKOWITZ, I. Interconversion of mating types in yeast: direct observation of the action of the homothallism (HO) gene. **Genetics**, Austin, v. 83, p. 245-248, 1976.

HOPWOOD, D.A. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. **Chemical Reviews**, Washington, v. 97, p. 2465-2497, 1997.

JOSEPH-HORNE, T.; MANNING, N.; HOLOMAN, D.; KELLY, S. Nonsterol related resistance in *Ustilago maydis* to the polyene antifungals amphotericin B and nystatin. **Phytochemistry**, New York, v. 42, n. 3, p. 637-639, 1996

KAHANA, J.; SILVER, P. **Current protocols in molecular biology**, New York: John Wiley and Sons, 1996. p. 9.7.22–9.7.28, 1996.

KARREMAN, R. J.; LINDSEY, G. G. A rapid method to determine the stress status of *Saccharomyces cerevisiae* by monitoring the expression of a Hsp12: Green Fluorescent Protein (GFP) construct under the control of the Hsp12 promoter. **Journal of Biomolecular Screening**, London, v. 10, n. 3, p. 253-259, 2005.

KONTOYIANNIS, D.P.; LEWIS, R.E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **The Lancet**, London, v. 359, n. 30, p. 1135–1144, 2002.

KOSHLAND, D.; KENT, J.C; HARTWELL, L.H. Genetic analysis of the mitotic transmission of minichromosomes, **Cell**, Cambridge, v. 40, p. 393-403, 1985.

LAGOMASINO, J. M. The Mellé-Boinot alcoholic fermentation method. **International Sugar Journal**, London, v. 51, p. 338, 1949.

LAMPEN, J. O.; MORGAN, E. R.; SLOCUM, A. C. Effect of nystatin on the utilization of substrates by yeast and other fungi. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 74, p. 297, 1957.

LAMPEN, J.O.; ARNOW, P.M.; BOROWSKA, Z.; LASKIN, A.I. Location and role of sterol at nystatin binding sites. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 78, p. 1152, 1962.

LEE, F.W.F.; DA SILVA, N.A. Improved efficiency and stability of multiple cloned gene insertions at the δ sequences of *Saccharomyces cerevisiae*, **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 48, p. 339-345, 1997.

LEES, N.D.; LOFTON, S.L.; WOODS, R.A.; BARD, M. The effects of varied energy source and detergent on the growth of sterol mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, London, v.118, p. 209-214, 1980.

LEES, N.D.; SKAGGS, B.; KIRSCH, D.R.; BARD, M. Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* – a review. **Lipids**, Champaign, v. 30, p. 221-226, 1995.

LINDEGREN, C.C.; LINDEGREN, G. Locally specific patterns of chromatid and chromatid and chromosome interference in *Neurospora*. **Genetics**, Austin, v.27, n.1, 1942

LIU, Z.M.; KOLATTUKUDY, P.E. Early expression of the calmodulin gene, which precedes appressorium formation in *Magnaporthe grisea*, is inhibited by self-inhibitors and requires surface attachment. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 181, p. 3571–3577, 1999.

LORANG, J.M.; TUORI, R.P.; MARTINEZ, J.P.; SAWYER, T.L.; REDMAN, R.S.; ROLLINS, J.A.; WOLPERT, T.J.; JOHNSON, K.B.; RODRIGUEZ, R.J.; DICKMAN, M.B.; CIUFFETTI, L.M. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Applied and environmental microbiology*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 1987–1994, 2001.

MARINI, F.; ARNOW, P.; LAMPEN, J.O. The effect of monovalent cations on the inhibition of yeast metabolism by nystatin. **Journal General Microbiology**, Reading, v. 24, p. 51-62, 1961.

MARQUES, T.A.; SERRA, G.E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.4, p. 532-535, 2004.

MILLER, J.J. Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*, In: Rose, A. H.; Harrison, J. S. (Ed.) **The Yeasts**. New York: Academic Press, 1989. v. 3, p. 489–541.

MIZOTE, T.; GAINEY, L.D.S.; SHEFFIELD, P.J.; BIBBINS, M.; CONNERTON, I.F. Promoter analysis of the acetate-inducible isocitrate lyase gene (*acu-3*) from *Neurospora crassa*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1442, p. 320–325, 1998.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Review of microbiology**, Palo Alto, v. 3, p. 371, 1949.

MORIN, J.; HASTING, J. Energy transfer in a bioluminescent system. **Journal of Cell Physiology**, Hoboken, v. 77, p. 313-318, 1971.

MORTIMER, R.K.; HAWTHORNE, D.C. Genetic mapping in yeast. **Methods in Cell Biology**. New York, v.11, p. 221-33, 1975.

MURRAY, A.W.; SZOSTAK, J.W. Pedigree analysis of plasmid segregation in yeast. **Cell**, Cambridge, v. 34, p. 961-970, 1983.

PATEL, P.V.; JOHNSTON, J. R. Dominant mutation for nystatin resistance in yeast **Applied Microbiology**, Washington, v. 16, n. 1, p. 164-165, 1968,

PATEL, P.V.; JOHNSTON, J.R. Kinetics of action of nystatin on yeast. The **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 449-458, 1971.

PIERCE, A.M.; PIERCE, JR.H.D; UNRAU, A.M.; OEHLISCHLAGER, A.C. Lipid composition and polyene antibiotic resistance of *Candida albicans* mutants. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v. 56, n. 135-142, 1978.

PIRT, S. J. **Principles of microbe and cell cultivation**. 2thed. Oxford: Blackwell Scientific, 1985. 274 p.

PRESCOTT, D.M. **Methods in cell physiology**. 1.ed. New York:Academic Press, 1975. 405 p.

PRICE, V.; TAYLOR, W.; CLEVENGER, W.; WORTHINGTON, M.; YOUNG, E. Expression of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae* using the ADH2 promoter. **Methods Enzymology**, New York, v. 185, p. 308–318, 1990.

PRIMROSE, S.B.; EHRLICH, S.D. Isolation of plasmid deletion mutants and study of their instability, **Plasmid**, New York, v. 6, p.193-201, 1981.

RESNICK, M.A.; MORTIMER, R.K. Unsaturated fatty acid mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 92, p. 597-600,1966.

ROMANOS, M.A.; SCORER, C.A.; CLARE, J.J. Foreign gene expression in yeast: a review, **Yeast**, Davis,v. 8, p 423-488, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2thed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, v. 3.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT User's Guide Version 8.0**. Cary, 1999.

SHERMAN, F. An introduction to the genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Meyers, R.A. (Ed.) **The encyclopedia of molecular biology and molecular medicine**. Weinheim: VCH Publisher, 1998. v. 6, p. 302-325.

SHERMAN, F.; FINK, G. R.; HICKS, J. B. **Laboratory course manual for methods in yeast genetics**, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986. 186 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.; SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos. São Paulo: Ed. Varela, 1997. p.236.

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

SISVAR. **FERREIRA, D. F.; Sisvar . Versão 4. 6.** (Build 61) Software.; Lavras,: DEX/UFLA, 2003 Disponível em: < <http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>>. Acesso em: 1 novembro 2006.

SNOW, R. An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic nystatin, **Nature**, London, v. 211, p. 206-207, 1966.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 195 , p. 19-23, 1952.

SPELLIG, T.; BOTTIN, A.; KAHMANN, R. 1996. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 252, p. 503–509, 1996.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R. F.; DI PIERO, R.M. Quitina e ergosterol como medida da biomassa fúngica em tecidos vegetais. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 8, p. 139-183, 2000.

SUELMANN, R.; SIEVERS, N.; FISCHER, R. 1997. Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 25, p. 757–769, 1997.

TAVARES, F. C. A. Processo de controle seletivo de leveduras contaminantes. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 10, p. 45-49, 1992a.

TAVARES, F. C. A. **Recombinação envolvendo o locus arg e regiões intergênicas adjacentes em *Saccharomyces cerevisiae***. 1977. 71 p. Tese (Livre-Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1977.

TAVARES, F.C.A. Control spoilage yeasts in fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 17, n. 1121-1126, 1995.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (Piracicaba). Tavares, F. C. A. Processo de produção de etanol com o controle de leveduras contaminantes. n.PI Patente nº 8.903.744, 1989.

VAN DER REST, M.E.; KAMMINGA, H.; NAKANO, B.; ANRAKU, Y.; POOLMAN, B.; KONINGS, W.N. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 59, p. 304-322, 1995.

VANDEN WYMELENBERG, A.J.; CULLEN, D; SPEAR, R.N.; SCHOENIKE, B.; ANDREWS, J.H. Expression of green fluorescent protein in *Aureobasidium pullulans* and quantification of the fungus on leaf surfaces. **Biotechniques**, Natick, v. 23, p. 686–690, 1997.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John Wiley and Sons, 1998. 350 p.

WARD, W. Biochemical and physical properties of green fluorescent protein. In: Chalfie, M; Kain, S. (Ed.) **Green fluorescent protein: properties, applications, and protocols**, New York: Wiley-Liss Inc., 1998, p. 45–75.

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

WOODS, R.A. Nystatin-resistant mutant of yeast: alterations in sterol content. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.108, p. 69-73,1971.

YU, J.; DONOVIEL, M.S.; YOUNG, E.T. Adjacent upstream activation sequence elements synergistically regulate transcription of ADH2 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 9, n. 1, p.34-42, 1989.

ZHANG, L.; ZHANG, Y.; ZHOU, Y.; AN, S.; ZHOU, Y.; CHENG, J. Response of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* to amphotericin B and nystatin measured by microarrays. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 49, p. 905-915, 2002.

ZHANG, Z.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Plasmid stability in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Advances**. New York. v. 14, n. 4, p. 401-35, 1996.