ESTIRPES DE LEVEDURAS ASSIMILADORAS DE FONTES DE CARBONO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

YEAST STRAINS ASSIMILATING CARBON SOURCES TO PRODUCTION OF ETHANOL

Lidyane Aline de Freita[(1)],
Larissa Alves de Castro Jocarelli Rossini [(2)],
Elisângela Soares Gomes[(3)],
Gisele Rodrigues [(4)],
Érica Mendes Lopes [(5)],
Osania Emerenciano Ferreira [(6)],
Márcia Justino Rossini Mutton[(7)].

Resumo

[(1)] Doutoranda em Microbiologia Aplicada Universidade Estadual de Paulista, Ciências Agrárias e Veterinárias campus de Jaboticabal, Departamento de Tecnologia, Jaboticabal, SP. lidyane.freita@gmail.com

[(2)] Graduando em ciências Biológicas Universidade Estadual de Paulista, Ciências Agrárias e Veterinárias campus de Jaboticabal, Departamento de Tecnologia, Jaboticabal, SP. larialves_19@hotmail.com

[(3)] Doutoranda em Microbiologia Aplicada Universidade Estadual de Paulista, Ciências Agrárias e Veterinárias campus de Jaboticabal, Departamento de Tecnologia, Jaboticabal, SP. elybio@gmail.com

[(4)] Doutoranda em Microbiologia Aplicada Universidade Estadual de Paulista, Ciências Agrárias e Veterinárias campus de Jaboticabal, Departamento de Tecnologia, Jaboticabal, SP. gid_rodrigues@yahoo.com.br

[(5)] Doutoranda em Microbiologia Aplicada Universidade Estadual de Paulista, Ciências Agrárias e Veterinárias campus de Jaboticabal, Departamento de Tecnologia, Jaboticabal, SP. neucierica@hotmail.com

[(6)] Doutoranda em Microbiologia Aplicada Universidade Estadual de Paulista, Ciências Agrárias e Veterinárias campus de Jaboticabal, Departamento de Tecnologia, Jaboticabal, SP. osania.ferreira@hotmail.com

[(7)] Eng. Agrônomo. Professora Dra. Universidade Estadual de Paulista, Ciências Agrárias e Veterinárias campus de Jaboticabal, Departamento de Tecnologia, Jaboticabal, SP. marcia.mutton@gmail.com

Nas etapas fermentativas destinadas a produção de etanol, observa-se o desenvolvimento de diversos contaminantes, dentre elas as leveduras selvagens, que muitas vezes comprometem a produtividade e qualidade do produto final. Desta forma, o trabalho objetivou caracterizar, classificar e determinar marcadores genéticos-moleculares para 5 estirpes de leveduras (C69, C128, C271, CAT e *Saccharomyces cerevisiae)*. A avaliação envolveu a determinação da assimilação de fonte de carbono e técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Os resultados obtidos através dos testes de assimilação de fontes de carbono são importantes para diferenciação e caracterização de leveduras. Sendo as leveduras C69, C128 e C271 com habilidade para desdobrar xilose como fonte de carbono. A técnica de RAPD obteve dois primers sozinhos não sendo suficientes para a geração de 100 bandas polimórficas para a população, levando-se em conta os resultados do tratamento 2 de 50ng: que pelo polimorfismo gerado pode-se discriminar três grupos principais e distintos: a amostra três sozinha, porém que ocupa uma similaridade com o grupo formado pelo controle e a estirpe 4, e por último o grupo formado pelas amostras 1 e 2, separados do anterior.
Palavras-chave: Cepas. Bagaço. Atividade xilulolítica.

Abstract

In the steps for fermentative production of ethanol, we observe the development of several contaminants, among them the wild yeasts, which often compromise the productivity and product quality. Thus, the study aimed to characterize, classify and determine molecular genetic markers for five yeast strains (C69, C128, C271, CAT and Saccharomyces cerevisiae). The assessment involved the determination of the assimilation of carbon source and RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). The results obtained from tests of assimilation of carbon sources are important for differentiation and characterization of yeast. As the yeast C69, C128 and C271 with the ability to deploy xylose as carbon source. The RAPD primers obtained two alone is not sufficient to generate 100 polymorphic bands for the population, taking into account the results of treatment of 50ng 2: that generated by polymorphism can distinguish three main and distinct groups: the three sample alone, but it occupies a similarity with the group formed by the control strain and 4, and finally the group formed by samples 1 and 2, separated from the former.
***Keywords**: Strains. Bagasse. Xilulolítica activity.*

1 Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, contando com uma área de 8,37 milhões de hectares, sendo o estado de São Paulo responsável por 51% da produção brasileira. É o único país que integra totalmente a produção de açúcar e álcool na mesma planta. A produção nacional de cana-de-açúcar destinada à indústria sucroalcooleira foi de 571,5 milhões de toneladas na safra 2011/2012, sendo 287,6 milhões toneladas destinadas à produção de etanol, resultando em 154,3 milhões de toneladas de bagaço (CONAB, 2012).

Dos resíduos gerados no setor apenas parte do bagaço de cana tem sido utilizado para geração de energia no próprio setor sucroalcooleiro, há ainda uma parte que pode ser utilizada para a produção de etanol. Os materiais lignocelulósicos são compostos por celulose,

hemicelulose e lignina, tais compostos são fontes potenciais para a produção de etanol a baixo custo (RODRIGUES, 2007). Estas diferentes unidades de açúcares são compostas por glicose, manose e galactose (hexoses), além da xilose (principal) e arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de vegetais.

Na fermentação ocorre o desdobramento pelas leveduras dos diversos açúcares em etanol, gás carbônico, glicerol, biomassa e componentes secundários (RAVANELI, 2010). Como nos materiais lignocelulósicos tem-se diferentes açúcares, para otimização do processo necessita de leveduras que fermentem pentoses (CHENG *et al*., 2008), entretanto o conhecimento sobre espécies com tais características bioquímicas é ainda limitado (HAHN-HARGERDAL et al., 1994). Para ir de frente com a necessidade, isolamento e melhoramento genéticos, tem sido realizados a fim de entender e buscarmos por estes microrganismos.

Nos processos de seleção de leveduras, várias metodologias de classificação taxonômica são utilizadas para a identificação, baseadas na descrição morfológica e fisiológica de espécies e gêneros. Embora estas metodologias forneçam valiosas informações na identificação das leveduras, elas apresentam a desvantagem de serem demoradas e nem sempre determinantes ou concludentes, em razão de que as características morfológicas e fisiológicas estão fortemente influenciadas pelas condições de cultivo. Estes são alguns dos motivos que permite erros na classificação taxonômica e originando o fenômeno de dualidade na nomenclatura (RATÓN, 2004).

Estas dificuldades vêm sendo solucionadas com a aplicação de técnicas moleculares baseadas nas análises de fragmentos de ácidos nucléicos, sendo as mais utilizadas a eletroforese de cariotipagem, as análises de microsatélites, o polimorfismo do DNA mitocondrial (mtDNA), o polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição do rDNA (RFLP), o polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (RAPD) e as análises de RNA de baixo peso molecular (LMW-RNA).

O presente estudo objetivou avaliação das características fisiológicas das estirpes de leveduras C69, C128, C271, CAT e *Saccharomyces cerevisiae* quando inoculadas em meios de cultura preparada com fontes diversas de carbono. Além da determinação de marcadores genéticos moleculares, através do uso da técnica do RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), visando às diferenciações das linhagens de leveduras, em termos de suas similaridades e distâncias genéticas.

2 Material e Métodos

2.1 Meio de Assimilação Preliminar para testes de Assimilação de Fontes de Carbono

O delineamento experimental foi realizado em duplicata, utilizando-se como fontes de carbono: trealose, xilose, rafinose, amido solúvel, arabinose, melibiose, glicose, sacarose e lactose.

As leveduras utilizadas nesse experimento constituem estirpes isoladas do ambiente de produção de etanol e foram codificadas como C69, C128, C271 e CAT. Após o isolamento foram mantidas através de replicagem periódica.

A seguir realizou-se a inoculação das leveduras em meio especifico para testes de assimilação de fontes de carbono, contendo a solução de 6,7g de "Yeast Nitrogen Base" (YNB) e 1g glicose, assim como a solução 6,7g de "Yeast Carbon Base" e 5g da fonte de carbono, foram esterilizadas por filtração em membrana Millipore (0,22µ) e estocadas sob refrigeração. Para sua posterior utilização foram diluídas alíquotas de 0,5 mL destes meios em 4,5mL de água destilada estéril.

Após a inoculação e incubação das estirpes de leveduras a 25ºC por 48 horas nestes meios, fez-se uma contagem em câmara de Neubauer segundo Lee et. al. (1981). A concentração ideal deste pré-inóculo, deve estar entre 10^5 e 10^6 UFC/mL.

O meio basal de carbono para os testes de assimilação de fontes de carbono, uma vez preparados, foram esterilizados por filtração em membrana Millipore (0,22µ) e estocados sob refrigeração. Para uso, alíquotas de 0,5mL destes meios concentrados foram pipetados assepticamente em 4,5mL de água destilada estéril.

Em seguida, estes tubos de ensaio contendo o meio basal de carbono, com suas respectivas fontes de carbono, receberam uma alíquota de 0,1mL do pré-inóculo com a concentração já ajustada conforme especificado anteriormente. A seguir procedeu-se a incubação a temperatura de 25ºC por 21 dias e avaliou-se o crescimento de acordo com a visibilidade de 3 traços de diferentes espessuras contidos em um cartão colocado atrás dos tubos, sendo consideradas: (-) negativo: 3 traços visíveis; (w+) positivo fraco: 2 traços (mais fortes e intermediário) são visíveis; (+) positivo: nenhum traço visível ou somente o traço mais forte é visível.

2.2 Isolamento das leveduras

As leveduras utilizadas nesta pesquisa pertencem ao banco de dados do laboratório da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal –SP. Após o isolamento foram mantidas através de replicagem periódica em tubos inclinados contendo YM ágar e armazenadas a 8ºC. Para reativação e crescimento da levedura foi utilizado meio YM – yeastmedium.

2.3 Genética Molecular

2.4 Extração de DNA Genômico de Leveduras

As estirpes de leveduras foram reativadas no meio G.Y.M.P (LODDER,1970). Após a reativação as mesmas foram inoculadas em 200 ml do meio YEPD, incubados a 30°C em uma incubadora com a agitação de 2000 rpm. Logo após o material foi centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos, a 6°C. Posteriormente iniciou-se o processo de extração de DNA genômico de leveduras pelo método de Hoffman and Winston, 1987.

2.5 Quantificação de ácidos nucléicos

Após a extração do DNA das leveduras iniciou-se a quantificação dos mesmos. Para esta avaliação ressuspenderam em TE (Tris Cl 1M pH 8,0 e EDTA 0,5M pH 8,0). Logo após foi realizada a leitura em absorbância a 260 a 280 nm, em um espectofotômero DU640, para as análises de ácidos nucléicos e proteínas, visando saber o grau de pureza.

O DNA é considerado de boa qualidade e boa pureza se os resultados estiverem entre 1,7 a 2,0 µL, embora alguns autores consideram desnecessários esta quantificação para a utilização da técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

2.6 Reação de PCR RAPD

A reação de PCR RAPD foi realizada utilizando-se 25 e 50 ng/µl de DNA genômico de leveduras em uma reação contendo: 1,6 µL de $MgCl_2$; 0,4 µL de dNTPs;1U da enzima

Taq polimerase; 2L de tampão de reação [10x]; 5pmol de cada oligonucleotídeo iniciador F1 e I1.

As condições da PCR consistiram de: 1) 94°C por 2 min; 2) 44 ciclos de 94°C por 1min (desnaturação das fitas de DNA), 35°C por 1min (pareamento) e 72°C por 1min (extensão). A reação foi conduzida em um termociclador, e ao término as amostras foram analisadas em gel de agarose 1%.

2.7 Condição de Amplificação

O termociclador foi programado para realizar o PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), na qual ocorreu: Eletroforese em Gel de Agarose.

2.8 Eletroforese em Gel de Agarose

A separação da fragmentação de DNA foi realizada segundo o método descrito por Sambrook et al., 1989, apresentado na Tabela 1.

3 Resultados e Discussões

3.1 Teste de Diferentes Fontes de Carbono

Os resultados obtidos na assimilação das diferentes fontes de carbono estão apresentados na Tabela 02. Da sua análise verifica-se que as estirpes C69 e C128 apresentam praticamente os mesmos resultados, diferindo apenas na assimilação da rafinose, sendo que a C69 assimilou rafinose e a C128 não assimilou esta fonte de carbono.

A melibiose foi assimilada pelas estirpes C69 e C128, sendo caracterizada como de fraca atividade e/ou lenta, enquanto a C271, de coloração rosa não assimilou. Algumas fontes de carbono foram assimiladas por todas estirpes, tais como trealose, amido solúvel, glicose, sacarose e lactose. A xilose de grande interesse neste trabalho não foi assimilada apenas pelas estirpes *S. cerevisae* e CAT.

A *S. cerevisiae* e a CAT apresentaram as mesmas assimilações sendo que dentre as fontes as únicas que as mesmas não assimilaram foram xilose, amido solúvel, arabinose e lactose.

3.2 Extração de DNA genômico

O perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose apresentou um DNA genômico de espécies diferentes de leveduras, íntegro sem degradação, além de não apresentar contaminação por RNA. Além da quantificação em gel de agarose as amostras foram quantificas em nano-drop.

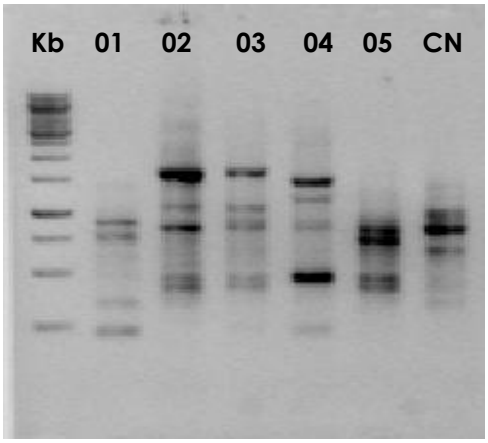
3.3 RAPD

Para analisar o grau de parentescos dentre as linhagens, bem como para verificar variações parafiléticas dos isolados estudados em relação a linhagem industrial padrão (*Sacharomyces cerevisae*) foi empregado um ensaio de RAPD, empregando dois primers escolhido do kit operon de primers RAPD: F2 e I2.

As reações foram conduzidas empregando duas concentrações de DNA genômico, uma com 25 ng e outra com 50 ng, para um total de cinco amostras, incluindo o controle positivo. Nas figuras abaixo, tem-se o perfil eletroforético das amostras para cada uma das reações (Figura 1-4).

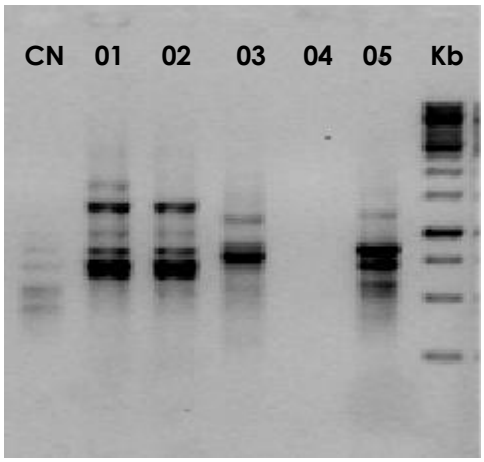
As reações de RAPD-PCR vêm sendo utilizadas como técnica de identificação de leveduras (RATÓN, 2004). Neste trabalho o ensaio de RAPD-PCR foi utilizado para estudar variações ao nível de DNA entre as leveduras selecionadas.

Figura 01 – Perfil de PCR utilizando 25ng de DNA e empregando o primer F2



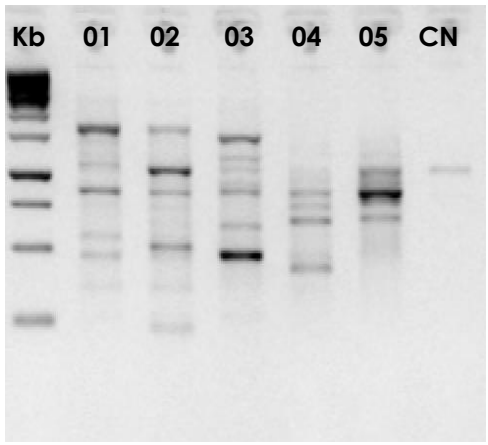
Fotografia de gel de agarose 0,8% com produtos de RAPD-PCR realizado com DNA genômico das leveduras selecionadas. Linha 01: marcador de tamanho molecular 100 pb DNA *ladder*, (Invitrogen). Linhas 02 – 06: leveduras selecionadas 01,02,03,04 e 0,5. Linha 07: controle negativo

Figura 02 – Perfil de PCR utilizando 25ng de DNA e empregando o primer I2



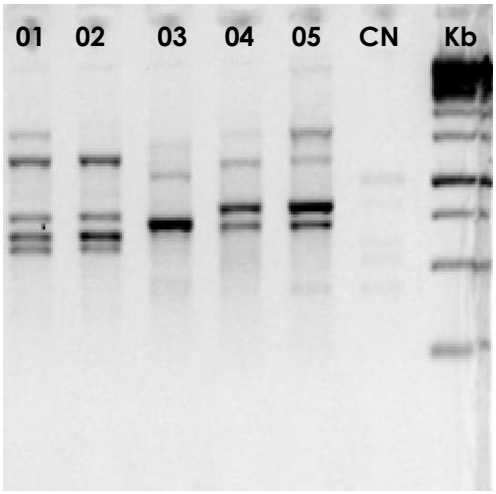
Fotografia de gel de agarose 0,8% com produtos de RAPD-PCR realizado com DNA genômico das leveduras selecionadas. Linha 01: marcador de tamanho molecular 100 pb DNA *ladder*, (Invitrogen). Linhas 02 – 06: leveduras selecionadas 01,02,03,04 e 0,5. Linha 07:controle negativo

Figura 03 – Perfil de PCR utilizando 50ng de DNA e empregando o primer F2



Fotografia de gel de agarose 0,8% com produtos de RAPD-PCR realizado com DNA genômico das leveduras selecionadas. Linha 01: marcador de tamanho molecular 100 pb DNA *ladder*, (Invitrogen). Linhas 02 – 06: leveduras selecionadas 01,02,03,04 e 0,5. Linha 07: controle negativo

Figura 04 – Perfil de PCR utilizando 50ng de DNA e empregando o *primer* I2



Fotografia de gel de agarose 0,8% com produtos de RAPD-PCR realizado com DNA genômico das leveduras selecionadas. Linha 01: marcador de tamanho molecular 100 pb DNA *ladder*, (Invitrogen). Linhas 02 – 06: leveduras selecionadas 01,02,03,04 e 0,5. Linha 07: controle negativo.

Conforme pode ser observado para os resultados de CN (Controle Negativo) para todas as quatro últimas figuras, ressaltando a Figura 01 e 02, teve-se um problema com contaminação das amostras durante o manuseio da reação ou no preparo dos materiais. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1996), esse é um dos grandes problemas da técnica, a universalidade dos primers de RAPD. Essa natureza dos primers por um lado permite o seu emprego para estudo dos mais diversos materiais, conhecidos ou não, mas por contrapartida os faz bastante sensíveis a pequenas amostras de contaminantes, podendo amplificar microrganismos veiculados por aerossóis e partículas de poeira. No entanto, percebe-se que aparentemente a reação de maior concentração de DNA relativizou um pouco esta contaminação, de forma que se obteve uma discreta amplificação de uma banda para o primer F2, e uma amplificação de baixo número de cópias para o último CN (Figura 04).

Comparando os dois tratamentos que diferem na quantidade de DNA, observamos que no tratamento com emprego de 25ng de DNA, sendo então que resultados mais realísticos puderam ser obtidos com o tratamento de 50ng, permitindo comparar os resultados dos dois tratamentos.

Para cada uma das amostras nos dois tratamentos de concentração de DNA, os perfis eletroforéticos em gel de agarose das amostras amplificadas foram submetidos ao programa de análise de fingerprints para compor filogenia: BIONUMERICS. As amostras foram submetidas a recorte das canaletas, verificação de índices de background e curtt-of para a exclusão manual de artefatos, normalização de alturas de banda, avaliação do tamanho molecular das amostras (expresso em pares de bases nucleotídicas de DNA) e cálculos de distância estatística para construção de matriz binária de caracteres pelo método estatístico DICE, otimizando em 0,5% (parâmetros padrões para análise de banda em gel, segundo

instruções do fabricante). Para efeito de filogenia a testemunha (CN) e o padrão molecular nunca são incluídos nas análises, apenas no cálculo e atribuição de bandas.

Para a situação do tratamento 1, em que 25ng foram utilizados para amplificar em reações separadas empregando o primer F2 e o I2, tem-se as situações expressas nas três figuras abaixo.

Figura 05 - Clado gerado para a população de bandas da PCR com 25ng+primer

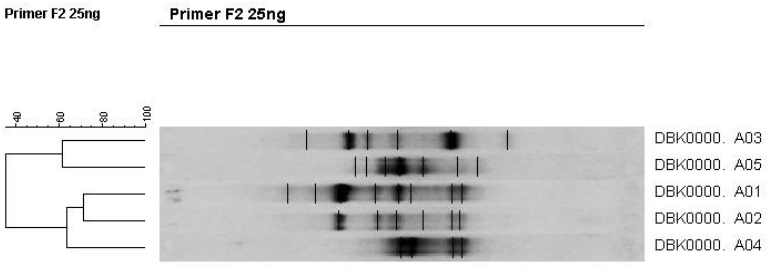


Figura 06 – Clado gerado para a população de bandas da PCR com 25ng+primer

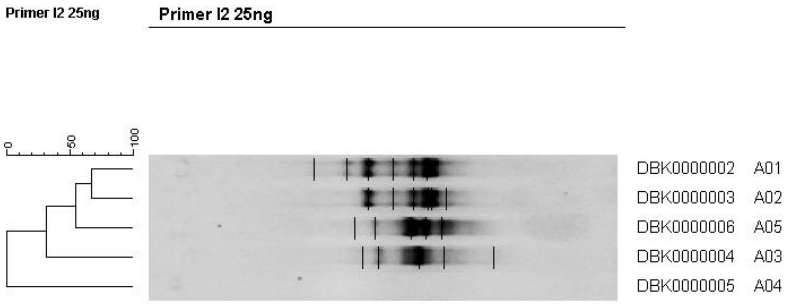
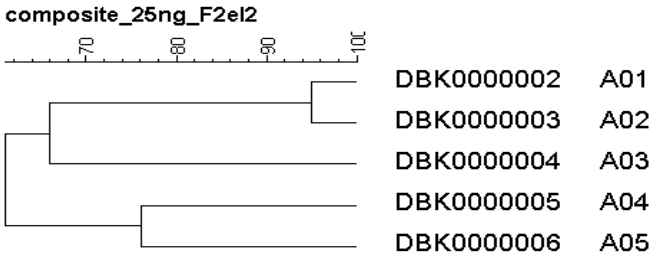


Figura 07 – Composta entre resultados para 25ng+F2+I2



Pelos resultados, percebe-se que não existe um consenso entre os dois cladogramas para uma avaliação da distribuição das amostras, uma vez que o problema na amostra 4 da figura 06 a coloca fora do clado, como uma raiz out-line. Se levarmos em conta apenas a

figura 07, os dados apontariam que a estirpe mais próxima do controle (amostra 5) é a amostra 4, e que as outras duas formariam um grupo separado, no qual as amostras 1 e dois estariam mais intimamente relacionadas, e a amostra 3 seria a mais diferente entre estas.

Levando-se em conta o tratamento 2 (50 ng), em que os dados são mais confiáveis uma vez que não houve uma amplificação expressiva de contaminantes, e todas as amostras foram incluídas nas análises, tivemos os seguintes resultados (Figura 08 e 09):

Figura 08 – Clado gerado para a população de bandas da PCR com 50ng+primer

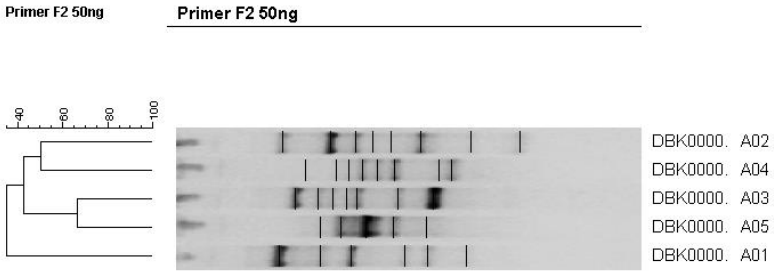
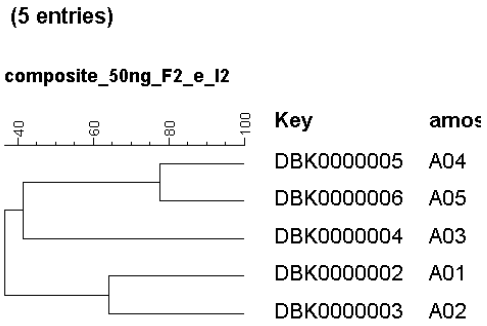


Figura 09 – Composta entre resultados para 25ng+ F2+I2



Pelos dados observa-se que as bandas polimórficas para ambos os primers não ditam um consenso entre os resultados entre si, o que é natural uma vez que a amplificação ao acaso de ambos podem privilegiar uma ampla cobertura do genoma, o que significa que podem atuar em locais mais ou menos conservados dependendo para cada um dos pares de amostras. É premissa de uma boa filogenia baseada em RAPD que se empregam quantos primers necessários para que resulte em um conjunto total de no mínimo 100 bandas polimórficas diferentes entre si no tamanho molecular dentro do conjunto relativo a um mesmo primer, e independentes entre si para primers diferentes ainda que possuam o mesmo tamanho molecular.

Assim, para efeito de análise, os dois primers geraram um total de 35 bandas somadas (22 + 13 para F2+I2, respectivamente). Para o tratamento de 25 ng, tem-se uma correspondência de proximidade entre as amostras 4 e 5 (controle positivo) e uma similaridade entre as estirpes 1 e 2. A amostra 3, embora enraizada conjuntamente com as amostras 4 e 5 demonstra-se diferente dessas em sua origem, que se localiza a 40% ao passo que os grupos 4 e 5 compartilham uma proximidade em 80% de distância filogenética. O grupo formado pelo 1 e 2 tem uma proximidade de 60% por sua vez.

4 Conclusão

As leveduras C69, C128 e C271 são aptas para serem utilizadas para produção de etanol de segunda geração, por estas conseguirem degradar xilose.

5 Referências

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento.** Acessado no dia 25 de março de 2012 www.conab.gov.br.

CHENG, K.K.; CAI, B.Y.; ZHANG, J.A.; LING, H.Z.; ZHOU, Y.J.; GE, J.P.; XU, J.M. Sugarcane bagasse hemicelulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v.38, p.105-109, 2008.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise enética. **Brasília: EMBRAPA,** 220 p. 1996.

GUIDI, R.H; Caracterização, classificação e determinação de marcadores genético moleculares para estirpes de leveduras contaminantes da fermentação etanólica. 99f. 2000. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2000.

HAHN-HAGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 933-943, 1994.

HOFFMAN AND F. WINSTON , Ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene***57** (1987), pp. 267–272.

LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.; WONG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, n.11, 1981.

LODDER, J. *The yeasts:* A taxonomic study. London, Amsterdam: North Holland Pub. Co., 1970.1385p.

RATÓN, T.O. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interes biotecnológico. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 21, p. 15-19, 2004.

RAVANELI, G. C. **Qualidade da matéria-prima, microbiota fermentativa e produção de etanol sob ataque de *Mahanarvafimbriolata*em cana-de-açúcar.** Tese (Doutorado em Microbiologia agropecuária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2010.

RODRIGUES, F. A. **Avaliação da Tecnologia de Hidrólise Ácida de Bagaço de Cana.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SAMBROOK, J. et al. *Molecularm Cloning: a Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor, 1989.

TABELAS

Tabela 1 – Programa dos ciclos efetuados para as amplificações dos DNA genômicos das estirpes de leveduras.

CICLO	N° de vezes	Passos	Temperatura (C °)	Tempo (min)
1°ciclo	1	1°passo	94°C	2
		2°passo	35°C	1
		3°passo	72°C	1
2°ciclo	44	4°passo	94°C	1
		5°passo	35°C	1
		6°passo	72°C	1
3°ciclo		7°passo	94°C	1
		8°passo	35°C	1
		9°passo	72°C	2
4°ciclo		10°passo	4°C	Ilimitado

Tabela 2 – Assimilação das diferentes fontes de carbono (trealose (Tr), xilose (X), rafinose (Ra), amido solúvel (St), arabinose (Ar), melibiose (Mb), glicose (G), sacarose (Su) e lactose (La)).

Estirpes	**Tr**	**X**	**Ra**	**St**	**Ar**	**Mb**	**G**	**Su**	**La**
C69	+	+	+	+	+	+W	+	+	+
C128	+	+	-	+	+	+W	+	+	+
C271	+	+	+W	+	-	-	+	+	+
S. cerevisiae	+	-	+	-	-	+	+	+	-
CAT	+	-	+	-	-	+	+	+	-

NOTA:
+ (assimila fortemente a fonte de carbono testada)
+w (assimila fracamente a fonte de carbono testada)
- (não assimila a fonte de carbono testada)
(GUIDI, 2000).