ESTABILIDADE E PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM *Aspergillus niger*

RENATO BONATELLI JUNIOR
Instituto de Biologia
UNICAMP

Orientador : JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

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

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo
Maio - 1977

Aos meus pais, irmãos

e esposa

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para a realização desse trabalho, e, em especial:

- Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação recebida e, antes de tudo, pela sua amizade, atenção e estímulo,
- ao Prof. Dr. Ernesto Paterniani, pelas facilidades concedidas como Diretor do Instituto e Departamento de Genética da ESALQ/USP,
- ao Prof. Cláudio Luiz Messias, amigo e colega, pelo auxílio nas discussões,
- ao colega Cláudio Visockas Costa, pela criteriosa leitura dos originais e sugestões,
- ao Prof. Dr. Ivanhoé R. Baracho, pela imprescindível ajuda na análise estatística,
- ao CNPq, pela bolsa de estudos concedidas,
- e aos técnicos dos laboratórios do Instituto de Genética da ESALQ-USP e do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP.

ÍNDICE

Página

1. INTRODUÇÃO 01

2. REVISÃO DE LITERATURA. 04

2.1. Aspectos gerais de *Aspergillus niger*. 04

2.2. Instabilidade 09

2.2.1. Instabilidade em geral 09

2.2.2. Instabilidade em microrganismos indústriais 15

2.3. Produção. 21

2.3.1. Marcas genéticas e produção. 21

2.3.1.1. Marcas genéticas para Auxotrofia. 22

2.3.1.2. Marcas genéticas para coloração de conídios 28

2.3.1.3. Reversões 28

2.3.2. Melhoramento da produção. 29

3. MATERIAIS E MÉTODOS. 36

3.1. Linhagem utilizada. 36

3.2. Meios de cultura e soluções usadas. 36

3.2.1. Meio mínimo *(PONTECORVO e Col., 1953b)*. 36

3.2.2. Meio completo *(PONTECORVO e Col., 1953b)*. 37

3.2.3. Solução de vitaminas 37

3.2.4. Hidrolisado de ácido nucléico de leveduras. 38

3.2.5. Solução salina 38

3.2.6. Solução de tween 39

Página

3.2.7. Meio mínimo líquido com 2% de meio completo. 39

3.2.8. Meio de fermentação *(DOELGER e PRESCOTT, 1934)*. 39

3.2.9. Suplementos adicionados ao meio mínimo 40

3.2.10. Suplementos adicionados ao meio de fermentação. 40

3.2.11. Tampão tris-maleico 41

3.2.12. Solução estoque de ácido cítrico . . . 41

3.3. Esterilização e temperatura de incubação. . . 42

3.4. Obtenção de mutantes. 42

3.4.1. Curvas de sobrevivência. 42

3.4.1.1. Com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) 42

3.4.1.2. Com luz ultravioleta. 44

3.4.2. Isolamento de mutantes. 44

3.4.2.1. Mutantes auxotróficos 44

3.4.2.2. Mutantes morfológicos 46

3.5. Reversão das marcas auxotróficas 46

3.6. Observação da produção de setores 47

3.6.1. Por inoculação em meio mínimo e meio completo. 47

3.6.2. Por inoculação em meio mínimo suplementado com componentes do meio completo. 47

3.6.3. Por microcolônias. 48

3.6.3.1. Obtenção de microcolônias . . 48

3.7. Crescimento em meio mínimo, meio mínimo suplementado e meio completo. 49

3.8. Sobrevivência de conídios em meio mínimo, meio mínimo suplementado e meio completo 49

Página

3.9. Técnicas genéticas. 50

3.9.1. Obtenção de heterocários 50

3.9.1.1. Método descrito por *ROPER(1952)* 50

3.9.1.2. Método de mistura de conídios por estrias em meio completo. 51

3.9.2. Isolamento de diplóides. 51

3.10. Avaliação da produção de ácido cítrico pela linhagem 10V10 e seus mutantes. 53

3.10.1. Fermentação em meio de *DOELGER e PRESCOTT (1934)*. 53

3.10.2. Determinação de ácidos totais por titulação. 54

3.10.3. Determinação de ácido cítrico. 55

3.10.4. Estimativa da concentração de ácido por mililitro do meio de fermentação . . . 57

3.11. Determinação do peso seco do micélio. 57

3.12. Análises estatísticas. 58

3.12.1. Dos dados obtidos de crescimento da linhagem 10V10 de acordo com o ítem 3.7. 58

3.12.2. Dos dados obtidos de produção de ácido cítrico das linhagens de acordo com o ítem 3.10.4. 58

3.12.3. Correlação entre dados 58

4. RESULTADOS. 59

4.1. Números, porcentagens relativas e curvas de sobrevivência de conídios da linhagem 10V10 de *A. niger* após tratamentos com N-metil-N'--nitro-N-Nitrosoguanidina (NTG) e luz ultravioleta. 59

4.2. Mutantes auxotróficos e morfológicos obtidos após o tratamento de conídios da linhagem 10V10 de *A. niger* com mutagênicos. 64

Página

4.3. Determinação da frequência de reversão das deficiências nutricionais obtidas pelo tratamento de conídios da linhagem 10V10 de *A. niger* com mutagênicos. 64

4.4. Produção de setores e crescimento da linhagem 10V10 de *A. niger* desenvolvida a partir de inoculação ou de microcolônias em diversos meios de cultura. 66

4.5. Viabilidade de conídios da linhagem 10V10 de *A. niger* após semeadura em diversos meios de cultura. 72

4.6. Produção de ácido pela linhagem 10V10 de *A. niger* e seus mutantes em meio de fermentação de *DOELGER e PRESCOTT (1934)*. 72

4.6.1. Determinação da concentração de ácido cítrico. 72

4.6.2. Determinação da produção de ácido cítrico. 74

4.7. Correlações entre produção, peso seco e título das linhagens. 80

4.8. Tentativas de obtenção de diplóides com cruzamentos entre mutantes auxotróficos e morfológicos da linhagem 10V10 de *A. niger* 81

5. DISCUSSÃO. 85

5.1. Estabilidade. 85
5.2. Produção de ácido cítrico 89
5.3. Tentativas de obtenção de diplóides 95

6. RESUMO E CONCLUSÕES. 99

7. SUMMARY AND CONCLUSIONS. 101

8. BIBLIOGRAFIA. 103

APÊNDICE. 116

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
01	- Produção de aminoácidos e nucleotídeos por mutantes auxotróficos *(Apud DEMAIN, 1973)*. . . .	26
02	- Produção de metabólitos por tipos de auxotróficos não relacionados *(Apud DEMAIN, 1973)* . . .	27
03	- Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem 10V10 de *A. niger* ao tratamento com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina	60
04	- Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem 10V10 de *A. niger* ao tratamento com luz ultravioleta.	60
05	- Teste da frequência de reversão das deficiências nutricionais de mutantes obtidos após tratamento de conídios da linhagem 10V10 de *A. niger* com mutagênicos.	65
06	- Número e média de setores por placa observados após crescimento da linhagem 10V10 de *A. niger* por inoculação e microcolônias em diversos meios de cultura.	68
07	- Número e frequência relativa de colônias da linhagem 10V10 de *A. niger* com diferentes números de setores.	69
08	- Diâmetro em milímetros de colônias da linhagem 10V10 de *A. niger* após 72 hs de incubação em diferentes meios de cultura.	70
09	- Análise da variância dos dados da Tabela 8 . .	70
10	- Comparação das médias de diâmetro em milímetros das colônias em diversos meios de cultura pelo teste de Tukey.	71
11	- Número, média por placa, viabilidade e frequência relativa de conídios viáveis da linhagem 10V10 de *A. niger* em diversos meios de cultura . . .	73

Tabela *Página*

12 - Titulação de solução de ácido cítrico em água destilada. 74

13 - Relação entre concentração de ácido cítrico e log 1/T (logarítmo do inverso da transmitância). 75

14 - Produção de ácido cítrico da linhagem 10V10 de A. *niger* e seus mutantes expressa em miligramas por mililitro do meio de fermentação de *DOELGER e PRESCOTT (1934)*. 77

15 - Análise da variância da produção de ácido cítrico por linhagens de A. *niger* em meio de *DOELGER e PRESCOTT (1934)*. 78

16 - Médias comparadas pelo teste de Tukey e porcentagem em relação ao controle da produção de ácido cítrico por linhagens de A. *niger* 79

17 - Valores de correlação entre produção, peso seco e título das linhagens. 80

18 - Cruzamentos entre mutantes para obtenção de diplóides de acordo com a técnica de *ROPER (1952)*. . 82

19 - Cruzamentos entre mutantes para a obtenção de diplóides de acordo com o método de estrias. . 83

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
01 -	Curva de sobrevivência da linhagem 10V10 à NTG	61
02 -	Curva de sobrevivência da linhagem 10V10 à UV.	62
03 -	"Pedigree" dos mutantes auxotróficos e morfológicos obtidos após tratamento de conídios da linhagem 10V10 de *A. niger* com mutagênicos . .	63
04 -	Placa contendo meio mínimo com colônia evidenciando setores comparada com colônia desenvolvida em meio completo.	67
05 -	Colônias desenvolvidas em meio mínimo com diferentes números de setores.	67
06 -	Curva padrão e equação da reta de regressão da concentração de ácido cítrico.	76

1. INTRODUÇÃO

Diversos tipos de ácidos orgânicos são acumulados através da fermentação por bactérias e fungos. A produção por fermentação de ácido cítrico é conhecida desde que *WEHMER (1893, apud PERLMAN e SIH, 1960)* relatou a sua ocorrência em *Citromyces pfefferians* e *C. glaber*, fungos que são atualmente classificados no gênero *Penicillium (PERLMAN e SIH, 1960)*. Depois deste trabalho pioneiro, outros fungos, principalmente espécies do gênero *Aspergillus* foram relatados como acumuladores desse importante metabólito.

Atualmente linhagens selecionadas de *Aspergillus niger*, em condições apropriadas, são as responsáveis por quase toda a produção mundial de ácido cítrico, que é estimada em 90.000 toneladas anuais *(LOCKWOOD, 1975)*. A sua importân-

cia pode também ser evidenciada pela grande utilização nas indústrias de alimentos, refrigerantes e farmacêutica.

Para a utilização das linhagens em condições industriais, dois grandes problemas se apresentam, quais sejam: instabilidade na produção e obtenção de linhagens mais produtivas, como em muitas outras espécies utilizadas em indústria *(SERMONTI, 1969)*.

No caso da instabilidade, sua evidenciação pode ser observada por flutuações na produção *(GARDNER e Col., 1956; MILLIS e Col., 1963)* ou, pelo aparecimento de variantes com menor produção na população de esporos estocados *(SERMONTI, 1969; JOHNSTON, 1975)*. No caso da obtenção de linhagens mais produtivas, diversos métodos podem ser utilizados, que são enquadrados em dois grandes grupos: genéticos e ambientais *(DAS, 1972)*. Os dois grupos de métodos visam, evidentemente, o aumento da produção e/ou rendimento, sendo que os genéticos o fazem introduzindo, quer seja por indução de mutação, diploidização ou hibridização e recombinação, modificações no genoma da linhagem. O ambiental procura determinar quais as melhores condições de fermentação em que a linhagem possa expressar todo o seu potencial. O uso dos dois grupos de métodos simultaneamente, torna possível um melhor aproveitamento da capacidade de produção e/ou rendimento da linhagem.

O nosso trabalho visa o estudo de características em cultura de linhagem de *Aspergillus niger* utilizada em

indústria, tentando elucidar as causas da instabilidade na produção, pois esta apresenta flutuações no rendimento, que é medido pela relação da quantidade de ácido cítrico produzido sobre açúcar total disponível no meio de fermentação *(BONATELLI Jr., dados não publicados)*. Nesta tentativa será observado o comportamento da linhagem frente aos meios de cultura descritos por *PONTECORVO e Col. (1953)*, utilizados na análise genética de *Aspergillus nidulans*. Será também investigada a produção de ácido cítrico por mutantes auxotróficos e morfológicos induzidos por luz ultravioleta e N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina e a possibilidade de síntese de diplóides que poderiam ser utilizados como linhagens industriais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão, para cobrir os propósitos do presente trabalho, será dividida em 3 ítens: Aspectos Gerais de *Aspergillus niger*, Instabilidade e Produção.

O segundo ítem será subdividido nos sub-ítens: 1) Instabilidade em geral e 2) Instabilidade em microrganismos industriais. O terceiro ítem, por sua vez, será subdividido em: 1) Marcas genéticas e produção e 2) Melhoramento da produção em microrganismos industriais.

2.1. Aspectos Gerais de *Aspergillus niger*

STEINBERG (1939) estudou a influência de diver

sos compostos no crescimento de linhagem de *Aspergillus niger* em meio de cultura líquido, sendo o crescimento estimado por peso seco do micélio. Verificou que a adição de extrato de leveduras em meio com sacarose aumenta o crescimento, assim como, a adição de peptona em meio com glicerol. Atribuiu estes efeitos à presença de elementos contaminantes não identificados nos compostos adicionados.

PONTECORVO (1952) usando a técnica descrita por *ROPER (1952)*, constatou a ocorrência do ciclo parassexual nesta espécie, após o isolamento de diplóides heterozigotos e da segregação não ao acaso das marcas genéticas utilizadas.

PONTECORVO e Col.(1953a) descrevem detalhes do trabalho inicial de *PONTECORVO (1952)* e outros resultados, o que lhes permitiu concluir que a frequência de diplóides nesta espécie era bastante alta e, ainda mais, que o diâmetro dos conídios dos diplóides era aproximadamente 1,3 vezes o da linhagem paternal. Estudando a segregação de marcas devido à recombinação mitótica verificaram que a maioria dos setores eram diplóides, sendo que, em determinados casos não foi possível decidir quanto à ploidia utilizando o diâmetro de conídios. Discutem ainda a utilização do ciclo parassexual no melhoramento de linhagens industriais.

LHOAS (1961, 1967) estudando a mesma linhagem utilizada nos trabalhos de *PONTECORVO (1952)* *PONTECORVO e Col. (1953a)*, constatou que o emprego da *para*-fluorfenilalanina

na obtenção de haplóides era viável e estabeleceu a presença de possivelmente 6 grupos de ligação com o uso de marcas auxotróficas, morfológicas (coloração de conídios) e resistência à acriflavina. Destacou a possibilidade de serem separados setores haplóides de diplóides utilizando o diâmetro de conídios. Observou também, que a frequência de recombinação mitótica era bastante alta, não sendo aconselhável a estocagem de diplóides.

RAPER e FENNELL (1965) descrevem a espécie usada no presente trabalho como organismo tipo de um grupo bastante heterogêneo e que inclui os mais comuns fungos saprofíticos. Citam como características em meio de Czapek sólido:- 1) Esterigmas em duas séries, 2) Colônias (conídios) de coloração negro carvão a olho nu e 3) Conídios globosos com aspecto rugoso, sem equinulações verdadeiras e com menos de 5 a 5 µm de diâmetro na maturidade. Citam também, que não foi descrito ciclo sexual, sendo o *A. niger* portanto, um fungo imperfeito.

KALYANI e Col. (1969) sugerem a existência de fenômeno semelhante à transformação bacteriana nesta espécie, após observarem a reversão de deficiências nutricionais com o tratamento de conídios com DNA extraído da linhagem paternal prototrófica. Este fenômeno pode ser inibido pelo tratamento do DNA do doador por ultravioleta, calor e desoxiribonuclease.

PRASAD (1970) estudando mutantes morfológicos para coloração de conídios, em testes de heterocários, verificou complementação entre diferentes mutantes e inclusive, de alguns mutantes com a mesma alteração morfológica. Constatou também que alguns mutantes não formavam conidióforos com mistura de conídios de diferentes colorações, apesar de todos os mutantes terem sido obtidos da mesma linhagem paternal. Entre as hipóteses levantadas sugeriu: a) a incompatibilidade dos mutantes; b) uma rara fusão de hifas entre certos grupos de mutantes ou c) fusões frequentes, mas instáveis, não havendo portanto formação de heterocários estáveis.

CHANG e Col. (1974) estudaram efeitos de conídios heterocarióticos na seleção de diplóides, tendo em vista que trabalhavam com linhagem de conídios binucleados. Observaram que a frequência de conídios heterocarióticos era de cerca de 10^{-4} enquanto que a frequência de conídios diplóides estava em torno de 10^{-6}, o que dificultava a seleção de diplóides. Entre as técnicas sugeridas para isolamento de diplóides destacaram como bem sucedidas: a) estrias com conídios de diplóides davam crescimento homogêneo em sua extensão, ao contrário dos heterocários, cujo crescimento era apenas ocasional; b) a sobrevivência de conídios quando semeados em meio mínimo e, c) medidas de diâmetro de conídios, pois os diplóides eram cerca de 1,3 vezes maiores que os haplóides, confirmando os dados de *PONTECORVO e Col. (1953)*.

NGA e Col. (1975) estudaram linhagem isolada da Natureza. Constataram que a linhagem produzia setores espontaneamente em meio completo e com tratamento de *p*-fluorfenilalanina (*p*FA). No caso dos setores obtidos com *p*FA, haviam setores com diâmetro de conídios inferior (variando de 3,4 a 4,0 µm) ao da linhagem original (de 4,0 a 4,8 µm). Estes setores com conídios de menor diâmetro foram considerados como possíveis haplóides. Os mesmos, ensaiados para deficiências nutricionais, revelaram dois setores auxotróficos (deficientes para tiamina) em 20 setores analisados. Mutantes nutricionais puderam ser isolados dos possíveis haplóides, enquanto que, em 550 colônias examinadas após tratamento com luz ultravioleta da linhagem original não foi possível a evidenciação de mutante algum. Com a constatação destas características concluiram que a linhagem isolada era um diplóide heterozigoto.

BARACHO e Col. (1975) estudaram diversas linhagens de *Aspergilli* do grupo *niger* com relação à ocorrência de conídios binucleados. Constataram que a porcentagem de binucleados varia entre as diferentes linhagens, sendo que a linhagem *10V10* tem cerca de 60% de conídios binucleados.

2.2. Instabilidade

2.2.1. Instabilidade em geral

A instabilidade aqui referida será essencialmente a instabilidade mitótica cuja existência de muito é conhecida pelos geneticistas.

O primeiro autor a sugerir a existência de genes instáveis foi *EMERSON (1914)*, ao estudar as alterações de coloração no pericarpo de milho como consequência de frequente mutação do gene P^W para pericarpo incolor (P).

Diversos foram os organismos estudados assim como os mecanismos propostos para explicar a instabilidade, dos quais serão relatados apenas alguns exemplos.

A proposição de *DEMEREC (1937)* que verificou instabilidade em *Drosophila*, foi a existência de genes mutadores, sendo que o próprio *DEMEREC (1941)*, estudando *Drosophila virilis*, concluiu que a taxa elevada de mutação dos genes instáveis era uma propriedade autônoma e inerente do próprio gene.

Nesta mesma linha, os estudos com genes mutadores em *Escherichia coli* iniciaram-se com os trabalhos de *TREFFERS e Col. (1954)*, que registraram uma alta taxa de mutação para a resistência à estreptomicina. *GOLDSTEIN e SMOOT(1955)* descreveram, por sua vez, linhagem com taxa de mutação eleva-

da para auxotrofia, sendo que *SKAAR (1955)* identificou um fator mutador (Mut) ligado ao locus da leucina quando estudava as causas de uma alta taxa de mutação para estreptomicina. Mais recentemente, *COX e Col. (1972)*, ainda em *E. coli*, realizaram mapeamento dos genes mutadores, sugerindo que como causas das altas taxas de mutação estariam envolvidos os processos de replicação, recombinação e reparo do DNA.

Em leveduras, estudos de *von BORSTEL e Col. (1973)* identificaram genes mutadores em diversas linhagens, que como em *E. coli*, provocam alterações de bases, tais como transições, transversões, adições e deleções.

Considerando-se a presença de elementos controladores, *RHOADES (1941)*, descreve o caso de gene estável a_1 com baixa taxa de mutação, que torna-se altamente instável na presença de outro gene chamado "Dotted" (dt), que seria o controlador, situado em cromossomo diferente do gene a_1.

Estudos mais detalhados sobre este aspecto realizados por *McCLINTOCK (1951, 1953, 1956, 1965)* e *PETERSON (1960)*, verificaram que a alta mutabilidade em genes do milho era controlada por genes independentes, que não parecem ser responsáveis por fenótipo próprio, mas atuam em outro gene desencadeando o processo. O sistema de elementos controladores estudado foi o Ac-Ds (Ac = ativador; Ds = dissociador), sendo que Ac estando presente induz quebras cromossômicas em outro local (Ds), evidenciando gene recessivo. Estes elementos con

troladores têm capacidade de transposição de um local do cromossomo para outro, ou mesmo de um cromossomo para outro.

Em *Salmonella typhimurium*, estudos conduzidos por *SMITH-KEARY (1958)* e *DAWSON e SMITH-KEARY (1963)*, estudando elevada taxa de reversão de **leu⁻** (dependência de leucina) verificaram que a causa estava ligada ao locus supressor da leucina (**su leuA**), pois havia diminuição da instabilidade com a perda dos elementos controladores ou quando da sua integração, de modo estável, em outro sítio. Podiam também, após transposição para outros sítios, instabilizar outros loci e o locus original ficava estabilizado. Foi proposto o termo "epissomos controladores" a estes elementos, sendo bastante semelhantes aos descritos por *McCLINTOCK* em milho.

Instabilidade associada com aberrações cromossômicas também é frequente, sendo tanto com relação às numéricas quanto às estruturais.

No fungo *Aspergillus nidulans* existe grande número de estudos com relação às aberrações numéricas desde o trabalho de *ROPER (1952)*, que explicava o aparecimento de instabilidade em linhagens diplóides como resultado de permutas mitóticas e não-disjunção conduzindo à haploidização.

Trabalhos de *PONTECORVO e Col. (1954)*, levaram a que fossem propostos como mecanismos responsáveis pela instabilidade mitótica a distribuição irregular de cromossomos

na mitose e a permuta mitótica.

Evidências de recombinação mitótica foram acumuladas por *PONTECORVO e KÄFER (1958)* e *KÄFER (1958)*, sendo que *KÄFER (1960, 1961)* explicava o fenômeno de haploidização, onde por não-disjunção mitótica, havia perdas sucessivas de cromossomos até que se alcance o estado haplóide normal por aneuploidias sucessivas.

Estes mecanismos foram detectados por *PONTECORVO (1952)* e *PONTECORVO e Col. (1953a)* em *Aspergillus niger*, assim como em outros fungos que apresentam o ciclo parassexual *(AZEVEDO, 1976)*.

Com relação às aneuploidias, no caso de *A. nidulans*, onde existem estudos intensivos, os aneuplóides apresentam instabilidade com elevado grau de perdas espontâneas *(BALL e AZEVEDO, 1976)*. Em outro fungo, o *Saccharomyces cerevisiae*, *PARRY e COX (1970)* e *SHAFFER e Col. (1971)*, relatam tolerância à aneuploidia em linhagens com os grupos de ligação III, V, VIII, IX, XII e XIII em duplicata.

Quanto às aberrações estruturais, existem os trabalhos de *NEWMEYER (1965)* e *NEWMEYER e TAYLOR (1967)*, que descrevem casos de instabilidade associados com inversão pericêntrica em *Neurospora*. As linhagens, inicialmente com crescimento reduzido e fortemente pigmentadas, produziam setores cujo crescimento era semelhante ao tipo selvagem. Sugestão foi fei-

ta de que após ocorrência de permuta simples, dois produtos eram originados, um duplicado e outro deficiente para o mesmo segmento, sendo que o duplicado seria instável, dando setores de morfologia normal e o deficiente letal.

Um processo novo e espontâneo em *A. nidulans* que dava instabilidade, foi descrito por *BAINBRIDGE e ROPER (1966)* quando estudavam fatores genéticos que influenciavam a morfologia desse fungo. Seus estudos basearam-se num variante "crinkled" que originou-se de cruzamento de pais de morfologia normal e apresentava taxa de crescimento reduzida. Foi verificado que este variante era portador de duplicação cromossômica resultante de translocação não-recíproca presente numa das linhagens paternais. Apresentava ainda instabilidade vegetativa, produzindo setores, cujo crescimento e morfologia aproximavam-se de linhagem normal. A origem destes setores deveria ser, provavelmente, por perda do segmento em duplicata.

Trabalhos posteriores conduzidos por *NGA e ROPER (1968, 1969)* estudando linhagens mais apropriadas que eram portadoras de duplicação de segmento do grupo de ligação I translocado para o grupo de ligação II, com três marcadores genéticos, verificaram que havia produção de variantes de morfologia e crescimento semelhantes à linhagem normal (setores melhorados) e de variantes com morfologia alterada (setores deteriorados). Os setores melhorados, de acordo com análise genética, provaram serem originados por perdas prefe-

renciais do segmento translocado e, que as perdas podiam ser intersticiais. Os setores deteriorados, que são normalmente muito instáveis, provavelmente originaram-se de novas duplicações em tandem. Estas perdas e aparentes ganhos ocorrem possivelmente, devido a processo intracromossômico, sendo explicados por permuta desigual entre cromatídeos irmãos ou permuta em alça intracromossômica.

Com o estudo de linhagens haplóides e diplóides, com e sem translocação, concluíram que a instabilidade era provocada pelo desequilíbrio cromossômico, propondo o termo "não-conformidade mitótica" para este fenômeno de instabilidade.

O aparecimento de variantes melhorados e deteriorados em linhagens duplicadas foi melhor estudado por *AZEVEDO (1970, 1971)* e *AZEVEDO e ROPER (1970)* que concluíram que a instabilidade das linhagens é variável, a deterioração morfológica pode ser atribuída a novas duplicações em tandem e que a transposição do material genético em duplicata para outras regiões do genoma resulta em maior estabilidade. A transposição postulada para os determinantes de morfologia alterada assemelha-se com os elementos controladores propostos por *McCLINTOCK* em milho.

Outros autores, como é o caso de *JINKS (1966)*, explicam certos tipos de instabilidade como devidos a fatores citoplasmáticos.

2.2.2. Instabilidade em Microrganismos Indústriais

A instabilidade neste caso, pode ser separada em dois tipos. No primeiro a instabilidade ocorreria devido a variações na produção de uma mesma linhagem quando são feitas diversas fermentações, sendo caracterizada por flutuações na produção. No segundo tipo, seria devido ao aparecimento, em determinada linhagem, de derivativos com produção alterada, frequentemente com diminuição acentuada da produção.

No primeiro tipo, há possibilidade de que a flutuação seja devida à presença nos inóculos, de diferentes porcentagens de células da linhagem "normal" de alta produção com relação às células que determinam produção alterada que podem surgir espontaneamente. Outra alternativa, é a homeostasia da linhagem com relação às diferenças, mesmo que pequenas, na composição química do meio de fermentação ou de cultura ou ainda, por diferenças nas condições das repetições como presença de substâncias contaminantes, variações de temperatura, pH, etc., que possam afetar a acumulação do produto desejado.

Com relação ao primeiro tipo de instabilidade poderiam ser citados:

GARDNER e Col. (1956) que estudando linhagens de *A. niger* tolerantes a metais que interferem no acúmulo de ácido cítrico, ressaltam a dificuldade encontrada em se obter constantes produções elevadas, especialmente em meios com açú

car de cana não purificado. Os resultados indicaram grandes variações para uma mesma linhagem, tanto utilizando meios de cultura com diferentes concentrações de metais como em relação ao mesmo meio que tinha aproximadamente a mesma concentração de metais.

PERLMAN e SIH (1960) em excelente revisão sobre produção de ácido cítrico por fungos, mencionam que um dos problemas enfrentados desde o início da exploração comercial deste tipo de fermentação vem a ser a variação nos ciclos de fermentações. Citam o trabalho de *SHU e JOHNSON (1947)*, que reportam que 0,1 ppm de manganês no meio de cultura utilizado para a multiplicação da linhagem de *A. niger* promove redução na produção de ácido nas fermentações seguintes. No caso de outros elementos metálicos como o ferro, o zinco e o cobre, relatam que, dependendo do processo e da linhagem, os efeitos podem ser benéficos ou maléficos.

MILLIS e Col. (1963) em estudo sobre os efeitos de lipídeos sobre a produção de ácido cítrico por *A. niger*, verificaram que não há diminuição da variabilidade da produção entre os diferentes ciclos de fermentação. Ressaltam porém, que as menores produções obtidas com lipídeos no meio de fermentação são maiores que as obtidas na ausência de lipídeos. Sugerem então, que a presença de lipídeos tornaria a linhagem menos susceptível com relação às variações entre as diferentes partidas de meio de fermentação.

BALL (1973) observou variação na produção de diversos mutantes de *Penicillium chrysogenum* com alta produção de penicilina, obtidos após tratamento com mutagênicos. Esta variação foi grande ou pequena, independendo da produção média da linhagem, havendo porém, linhagens bastante estáveis. Os testes foram realizados no período de um ano revelando influência das diversas partidas de meio de fermentação e, possivelmente também devido à mutação associada com a estocagem segundo o autor. Ressaltou ainda a falta de dados na literatura com respeito à ocorrência dessas variações.

LOCKWOOD (1975) em outra excelente revisão sobre produção de ácido cítrico por *A. niger*, discutindo os relatos na literatura sobre as influências de fatores de ambiente na produção do metabólito salientou: a) a necessidade de eliminação, na maior intensidade possível, dos metais presentes em concentrações elevadas e b) o cuidado em se evitar a elevação do pH inicial para 3,5 durante a fermentação,pois há favorecimento do acúmulo de outros ácidos, como o oxálico e o glucônico.

MERRICK (1975b) estudando a aplicação de métodos de hibridização-seleção na obtenção de linhagens de *A. nidulans* com alta produção de penicilina, observou um aumento na variância entre as repetições com o aumento na capacidade de produção. Isto poderia estar evidenciando uma possível instabilidade das linhagens, mas, também poderia ser interpretado como efeito do método de medição da produção.

BONATELLI Jr. e AZEVEDO (dados não publicados) constataram, em trabalho para melhoramento da produção de ácido cítrico em *A. niger*, que a melhor linhagem obtida apresenta menor variação no rendimento entre as diferentes câmaras de fermentação. Esta, pelo menos em parte, pode ser a causa do melhor rendimento da linhagem.

Quanto ao segundo tipo, diversas causas podem ser indicadas, como pode se notar nos trabalhos citados a seguir:

YUILL (1953) observou o aparecimento de dois tipos de mutantes em linhagem de *A. niger*. A linhagem original com conídios pretos deu origem aos mutantes T, com conídios marrom-claro e B, com conídios marrom-escuro. O mutante T não se diferenciava da linhagem original com relação ao crescimento e produção de ácido, enquanto que o B tinha taxa de crescimento e produção de ácido menores, tendo ainda a capacidade de produzir setores pretos semelhantes à colônia original em todos os aspectos e setores semelhantes em morfologia e produção de ácido a si próprio.

PERLMAN e Col. (1954) estudando linhagem de *Streptomyces griseus* que dá origem a derivativos de baixa produção após transferência em série, verificaram que estes derivativos não se diferenciavam da linhagem original em taxa de crescimento, utilização de glicose, liberação de amônia e produção de vitamina B12. Contudo colônias sem esporos são mais

frequentes nestes derivativos após semeadura de esporos em ágar-infusão de soja.

HAAS e Col. (1956) observaram que linhagem de *Penicillium chrysogenum* com produção elevada de penicilina dava origem a colônias verdes (G), brancas (W) e colônias verdes (S) com setores brancos durante transferência em série em meio de lactose e licor de milho (LCS), o que não ocorria em meio de Czapek-Dox (CD) e em meio *honey-peptone* ágar(HPA). As colônias S eram instáveis, pois produziam os três tipos de colônias, sendo que o tipo S aproximadamente 75% do total, enquanto as colônias G ou W produziam sempre o seu tipo de colônia sendo portanto estáveis. Heterocários sintetizados entre os tipos W e G permanecendo balanceados não alteravam a produção de penicilina do tipo G porém, não balanceados, causavam grande diminuição do crescimento e da produção do tipo G. Sugerem como explicação a heterocariose inclusive para casos observados por outros autores em *Streptomyces* e *Penicillium*.

REUSSER e Col. (1961) estudaram linhagem de *Streptomyces niveus* produtora de novobiocina, constatando que a produção decrescia drasticamente quando a cultura era transferida em intervalos regulares tanto por conídios como por micélio. A diminuição estava relacionada com perda gradual na capacidade de esporulação em meio sólido inclinado. Sugerem como possível causa a heterocariose, tendo em vista que a perda é menos acentuada com a propagação da linhagem através de micélio.

PERLMAN e SIH (1960) citam casos da literatura relativos à perda da capacidade de produção de ácido cítrico por linhagens de *A. niger* sem mudanças aparentes na taxa de crescimento e morfologia das linhagens e que não foi possível reisolar as linhagens "normais" mesmo após isolamento de colônias monospóricas.

MacDONALD (1968) constatou o aparecimento de colônias de baixa produção de penicilina em linhagens de *Penicillium chrysogenum* com elevada produção após estocagem e transferências em série. Estudos realizados através da formação de heterocários permitiram concluir que a causa da baixa produção era nuclear. O mesmo autor *(MAcDONALD, 1972)* sugeriu que o aparecimento de derivativos com menor produção poderia ser evitado com estocagem à temperatura do nitrogênio - líquido.

MAYNE e Col. (1971) estudaram linhagem de *Aspergillus parasiticus* produtora de aflatoxina que, após transferências em série, exibia atenuação na capacidade de produzir aflatoxina. Após terem reisolado derivativos com alta produção da linhagem atenuada usando a técnica de colônias monospóricas, sugeriram a presença de fator citoplasmático que esteja presente no micélio e não nos esporos como causa da instabilidade.

BALL (1971) estudando linhagem de *Penicillium chrysogenum* descreve instabilidade associada com fator cromos

sômico. Sugere que seja similar à observada por *BAINBRIDGE e ROPER (1966)* e *NGA e ROPER (1968)*. Isolamento de derivativo estável foi conseguido por seleção de colônias sem setores após semeadura.

BONATELLI Jr. e AZEVEDO (1974) sugerem como possível causa da instabilidade da linhagem 10V10 de *A. niger* a heterocariose, tendo em vista a produção de setores por colônias desenvolvidas em meio mínimo e a não produção de setores em meio completo.

BALL e AZEVEDO (1976) discutem diversas causas de instabilidade em fungos com ciclos parassexual. Citam que em fungos industriais a instabilidade tanto pode ser indesejável, quando produz variantes de baixa produção, quanto desejável, quando utilizada na recombinação de características desejáveis. Destacam a grande instabilidade característica de aneuplóides e de linhagens com duplicações parciais do genoma. Encerram sugerindo diversas maneiras de estabilização de linhagens instáveis, que podem ser por fatores genéticos ou por fatores de ambiente.

2.3. Produção

2.3.1. Marcas genéticas e produção

Neste sub-ítem serão incluídos principalmente, estudos com relação ao efeito de marcas genéticas para auxotrofia, com algumas referências à coloração de conídios e à supressão.

2.3.1.1. Marcas genéticas para auxotrofia

BONNER (1947) conduziu estudos em *Penicillium notatum* tentando elucidar aspectos da biossíntese da penicilina usando mutantes com capacidade reduzida de síntese e mutantes auxotróficos. No caso dos auxotróficos, os mutantes deficientes para lisina em 25% dos casos foram os que mostraram síntese defectiva de penicilina.

ALIKHANIAN e Col. (1959) relatam trabalho conduzido em *Streptomyces rimosus* utilizado na produção de terramicina. Mutantes requerendo adição de aminoácidos reduzem acentuadamente a produção. Deficiências para metionina e nicotinamida reduzem a produção apenas se os compostos forem adicionados em baixas concentrações no meio de fermentação. Uma alta concentração destas substâncias é requerida tanto para produção como para o crescimento, medido em peso seco. No caso da linhagem deficiente para nicotinamida, a redução é de oito a 28% em relação à linhagem paternal, sendo que, com a adição de excesso de vitamina no meio de fermentação, a produção é aumentada para 93 - 144%.

FANTINI e OLIVE (1960) e *FANTINI (1961)* estudaram *Emericellopsis salmosynnemata*, verificando que as deficiências nutricionais obtidas reduziram acentuadamente a produção de cefalosporina N (penicilina N).

ALIKHANIAN e BORISOVA (1961) estudando recom-

binação em *Streptomyces aureofaciens* observaram a produção de diversos mutantes auxotróficos obtidos. A maioria dos mutantes isolados era deficiente para arginina e, usualmente não acumulavam tetraciclina, enquanto que um mutante deficiente para isoleucina-valina produzia cerca de 1/10 da tetraciclina acumulada pela linhagem paternal. Alguns mutantes para cisteína, metionina e arginina produzindo 5 - 10% em relação à linhagem paternal foram também obtidos em trabalho posterior conduzido por *JÁRAI (1961, apud SERMONTI, 1969).*

POLSINELLI e Col. (1963) estudando a relação entre as mutações para auxotrofia com relação à síntese de actinomicina em *Streptomyces antibioticus* verificaram uma interessante relação. A produção dos mutantes cuja deficiência não incluia aminoácidos presentes na molécula do antibiótico em meio mínimo suplementado com o requerimento não diferem significativamente do tipo selvagem. Diferente foi a constatação em mutantes cuja deficiência incluia aminoácidos presentes na molécula do antibiótico que exibiram em meio mínimo suplementado uma diminuição drástica na produção, mesmo com suplementação da substância requerida aumentada em 10 vezes. Concluíram que apenas mutações afetando vias biossintéticas cujos produtos são necessários para a síntese de actinomicina, diminuem a sua produção, interpretando estes resultados como uma utilização diferente dos "pools" de aminoácidos exógenos e endógenos pela célula.

ELANDER (1966, apud SERMONTI, 1969) relata que linhagem de *Streptomyces erythreus*, deficiente para arginina, foi introduzida na produção comercial de eritromicina.

SERMONTI (1969) utilizando seus dados e os de *MAcDONALD e Col. (1963)* agrupa os resultados obtidos com relação à produção de penicilina por mutantes auxotróficos de *Penicillium chrysogenum*. Concluiu que como regra há uma diminuição na produção, havendo mutantes que não evidenciam efeitos e outros que exibem um pequeno aumento na produção. Neste raciocínio, os deficientes para adenina são quase completamente bloqueados, sendo que os deficientes para vitaminas quase não afetam e algumas vezes aumentam e, os deficientes para aminoácidos situam-se num grupo intermediário com relação à produção.

MUSÍLKOVÁ e FENCL (1969) isolaram diversos mutantes auxotróficos, em estudos sobre a ação do metanosulfonato de etila (EMS) em linhagem de *Aspergillus niger* produtora de ácido cítrico, ensaiando posteriormente a produção de ácidos dos mesmos. Verificaram que mutante para arginina produzia cerca de 14% a mais que a linhagem paternal. Os demais produziram ou igual (deficientes para vitaminas) ou menos que a linhagem paternal (aminoácidos e bases nitrogenadas). Observaram ainda que havia relação entre a menor produção de ácidos com o menor do crescimento das linhagens. Tentativas para melhorar o crescimento das linhagens aumentando a quantidade da substância requerida pela linhagem (inicialmente 2 µg/ml

para vitaminas e 50 µg/ml para aminoácidos e bases nitrogenadas) não foram bem sucedidos em todos os casos. No caso de mutantes deficientes para citosina houve aumento no crescimento e na produção com adição de quantidade maior de citosina no meio. O acúmulo de ácidos em porcentagem foi de 101,2 a 81,0 (porcentagem do controle) para os deficientes para ácido nicotínico e de 22,4 - 99,4 para os deficientes para ácido *para*-aminobenzóico, enquanto que para os deficientes em adenina os valores encontrados foram de 6,7 - 59,2.

ILCZUK (1971) relatando influência de mutações para deficiência em niacina, piridoxina, tiamina e ácido fólico em linhagem de *A. niger* produtora de ácido cítrico informa que em todos os casos houve diminuição acentuada na produção.

DEMAIN (1973) apresenta dados indicando a utilização de mutantes auxotróficos na indústria devido ao acúmulo de produtos intermediários do seu metabolismo ((Tabela 1). Este acúmulo ocorreria em grandes quantidades devido também à manutenção da substância requerida em níveis baixos.

Tabela 1 - Produção de aminoácidos e nucleotídeos por mutantes auxotróficos *(apud DEMAIN, 1973)*.

Produto	Deficiência nutricional	Organismo	Acúmulo (g/l)
Citrulina	Arginina	*Bacillus subtilis*	16
Ornitina	Arginina	*Corynebacterium glutamicum*	26
Lisina	Homoserina ou treonina metionina	*C. glutamicum*	42
Valina	Isoleucina	*C. glutamicum*	11
Inosina 5'-monofosfato	Adenina	*C. glutamicum* *B. ammoniagenes*	13
Xantina 5'-monofosfato	Guanina	*B. ammoniagenes*	6

Relata também na Tabela 2, o acúmulo de substâncias aparentemente não relacionadas em biossíntese, sugerindo a possibilidade de regulação tipo vias metabólicas cruzadas (*cross-pathway*) ou de mutações duplas.

Tabela 2 - Produção de metabólitos por tipos de auxotróficos não relacionados *(apud DEMAIN, 1973)*.

Produto	Deficiência nutricional	O r g a n i s m o s
Alanina	Leucina	*Ustilago maydis*
Alanina	Metionina	*U. maydis*
Alanina	Ácido nicotínico	*U. maydis*
Prolina	Histidina	*Brevibacterium sp.*
Prolina	Isoleucina	*B. flavum*
Prolina	Serina	*Kurthia catenaforma*
Inosina	Histidina, Tirosina	*Bacillus subtillis*

São incluídos, na sua extensa relação, auxotróficos com alta produção encontrados em organismos produtores de tetraciclina, clortetraciclina, estreptomicina, actinomicina, cefalosporina C, ácido kójico e ácido fusárico, cuja explicação pode estar relacionada com o sugerido para os compostos relacionados na Tabela 2.

CHANG e TERRY (1973) em estudo sobre a produção de diplóides e heterocários em linhagem de *A. niger* produtora de ácido cítrico, relatam que todos os mutantes auxotróficos, exceto dois deficientes para metionina e histidina, produziram menos que a linhagem paternal em meio de fermentação suplementado com 250 µg/ml da substância requerida. Neste estudo apenas mutantes deficientes para aminoácidos foram incluídos.

2.3.1.2. Marcas genéticas para coloração de conídios

SERMONTI (1969) relata que mutações para coloração branca de conídios reduzem, enquanto que coloração amarela não afeta produção de penicilina em *P. chrysogenum*.

ILCZUK (1968) em *A. niger* constatou que seleção de mutantes para coloração de conídios provou ser valiosa no aumento da produção de ácido cítrico, sendo que *LOCKWOOD (1975)* cita que na prática estão sendo utilizados mutantes com conídios marrom-claros.

2.3.1.3. Reversões

MAcDONALD e Col. (1963) verificaram, estudando a influência de mutantes auxotróficos na produção de penicilina de *P. chrysogenum*, que mutante deficiente para tiossulfato (ths) acumulava cerca de 1/4 do total da penicilina produzida pelo parente prototrófico. Estudos com 11 revertentes obtidos revelaram que seis tinham produção igual ao deficiente e cinco igual à linhagem parental. Sugeriram que os primeiros seriam reversões devidas a genes supressores e os últimos reversões verdadeiras.

DULANEY e DULANEY (1967, apud DEMAIN, 1973) verificaram que reversões de deficiência para metionina em

Streptomyces viridifaciens resultou num aumento de três vezes na síntese de clortetraciclina em relação à linhagem paternal.

DEMAIN (1973) relata que reversão do gene responsável pela enzima inosina monofosfato desidrogenase em *Corynebacterium glutamicum* promove superprodução de guanosina 5'-monofosfato.

2.3.2. Melhoramento da produção

No melhoramento genético, o emprego da mutação é o responsável pelo progresso atual da indústria de fermentações *(DEMAIN, 1973)*. O uso com grande intensidade do esquema de mutação e seleção pode ser constatado à partir da obtenção da linhagem X-1612 de *Penicillium chrysogenum* em 1945, cuja produção era o dobro da linhagem original *(SERMONTI, 1969)*. Existem porém, relatos citados por *DAS (1972)* de que *KRESLING e STERN (1935)* obtiveram mutantes com aumento na capacidade de produção de ácido cítrico em *A. niger* com o uso de luz ultravioleta e radium como mutagênicos.

A quantidade de trabalhos relacionados com o uso de mutagênicos é enorme, sendo que apenas alguns exemplos serão citados.

Um dos mais extensos e completos trabalhos nesse sentido foi o desenvolvido por *BACKUS e STAUFFER (1955)* do

qual foram originados praticamente todas as linhagens utilizadas na produção industrial de penicilina. A primeira linhagem obtida foi a Q-176 que produzia o dobro da quantidade de penicilina da linhagem X-1612, sendo que, com a utilização de diferentes mutagênicos (luz ultravioleta e nitrogênio mostarda) e seleção de mutantes espontâneos teve sua capacidade de produção bastante aumentada. A linha derivada com tratamento de nitrogênio mostarda produziu os melhores mutantes comparada com a obtida com luz ultravioleta. A seleção de mutantes espontâneos após o isolamento de linhagens com maior produção após o tratamento com mutagênicos mostrou ser novamente eficiente, o que aconteceu no início do trabalho com linhagens menos produtivas mas, o aumento conseguido não ultrapassou determinado nível.

JAMES e Col. (1956) na seleção de mutantes de *A. niger* com aumento na produção de ácido cítrico, concluíram que os mutantes mais produtivos são os selecionados após diversos passos de indução de mutação e uso de diferentes mutagênicos. Os mutantes obtidos foram do tipo compacto e formavam menor quantidade de micélio no meio de fermentação quando comparados com a linhagem paternal. Relatam o uso do meio de *FOSTER e DAVIS (1949)* na seleção de mutantes com resultados promissores.

DAS (1972) revisando os métodos empregados no melhoramento genético de linhagens de *A. niger* para produção de ácido cítrico, destaca que não foram encontradas correla-

ções entre características morfológicas específicas e aumento de produção.

DAS e NANDI (1972) estudaram os efeitos dos mutagênicos radiação gama (fonte de cobalto 60), luz ultravioleta (UV), nitrogênio mostarda (NM) e colchicina na indução de linhagens de *A. niger* com aumento na produção de ácido cítrico. Verificaram que o mutagênico mais eficiente foi a radiação gama, seguido pela UV e o NM. A colchicina não parece ser indicada na obtenção deste tipo de mutante.

HANNAN (1972) utilizando radiação gama de fonte de cobalto 60 e analisando as variantes de linhagem de *A. niger* induzidas verificou que uma destas linhagens produzia duas a três vezes mais ácido cítrico que a linhagem paternal, não tendo observado correlação entre tipo morfológico e aumento da produção.

SILVA (1972) também utilizando radiação gama de fonte de cobalto 60 em *A. niger* estudou a relação entre o índice medido no meio de *FOSTER e DAVIS (1949)* e produção de ácidos em meios de fermentação. Não foi encontrada correlação que indicasse o uso irrestrito do meio de *FOSTER e DAVIS (1949)* como método de seleção de linhagens mais produtivas.

Em trabalhos utilizando o método de mutação e seleção não há possibilidade de conhecer quais as modificações sofridas pela linhagem mutante do ponto de vista genético *(DEMAIN, 1973)*. Estudos que tentaram elucidar aspectos ge-

néticos e utilizar os conhecimentos obtidos no melhoramento estão sendo conduzidos há muito tempo, como é o caso dos trabalhos em *P. chrysogenum* desde a constatação da ocorrência do ciclo parassexual neste fungo por *PONTECORVO e SERMONTI (1953)*. Estes trabalhos sumariados em *SERMONTI (1969)*, descrevem a predominância nuclear na produção e a existência, em alguns diplóides, de heterose que foi atribuída à existência de divergência nas mutações obtidas relacionadas com o aumento da produção.

Outros trabalhos podem ser citados, como se segue:

CIEGLER e RAPER (1957) em estudo conduzido para verificar a possibilidade da aplicação de heterocários em fermentações comerciais, utilizando *A. fonsecaeus*, produtor de ácido glucônico e *A. niger*, produtor de ácido cítrico, observaram que os heterocários produzem quantidades intermediárias ou menores quando comparados com as linhagens paternais. Constataram também grande segregação dos componentes e, portanto, dificuldades na estabilização dos heterocários. Concluem que esta instabilidade pode ser um entrave na utilização comercial de heterocários.

FANTINI (1962) estudou a produção de sinematina por duas espécies do gênero *Emericellopsis*. A produção de heterocários e de um possível diplóide foram semelhantes à da linhagem original. Recombinantes obtidos por via sexual pro-

duziram quantidades variáveis. No caso de *E. terricola*, recombinantes prototróficos mostraram aumento de até 50% em relação à linhagem paternal, sendo que em *E. salmosynnemata* nenhum recombinante foi superior à linhagem paternal.

MAcDONALD e Col. (1963) estudaram a produção de penicilina de diplóides heterozigotos de *P. chrysogenum*. Observaram que a produção era semelhante à linhagem paternal. Considerando que os mutantes usados foram selecionados independentemente para aumento da produção, concluíram que as mutações induzidas possivelmente eram recessivas.

BALL (1973) analisando produção de penicilina de diplóides heterozigotos e segregantes haplóides de *P. chrysogenum*, verificou que os diversos mutantes com produção aumentada obtidos quando cruzados entre si podem dar origem a diplóides com produção superior às linhagens haplóides paternais. Em um dos cruzamentos foi conseguido segregante que produzia quantidade de penicilina significativamente maior que a das linhagens paternais. Estudos genéticos posteriores verificaram que o segregante era portador de duas mutações independentes que afetavam a produção de penicilina.

MAcDONALD (1973) e *DITCHBURN e Col. (1976)* estudando o *A. nidulans* como organismo modelo para estudos genéticos da produção de penicilina, verificaram que: 1) a produção está predominantemente sob controle nuclear; 2) as mutações induzidas relacionadas com o aumento da produção podem

ser recessivas, dominantes e semi-dominantes; 3) diplóides heterozigotos sintetizados entre os mutantes obtidos evidenciaram não aditividade entre os genes determinantes do aumento de produção, e 4) segregantes destes diplóides e portadores de dois genes não-alelos para aumento da produção não mostram aumento significativo na produção.

CHANG e TERRY (1973) estudaram a utilização de heterocários e diplóides na produção em escala industrial de glicoamilase em *A. foetidus* e de ácido cítrico em *A. niger*. Em ambos os casos, com o uso do teste de heterocário, verificaram que a produção está predominantemente sob controle de genes nucleares. Não constataram ganho de produção, em relação às linhagens paternais, quando foram sintetizados diplóides ou heterocários. Concluíram que o aumento na dosagem do(s) gene(s) envolvidos na síntese desses compostos não resultaram em aumento da produção.

MERRICK (1975a, 1975b) utilizando a metodologia de hibridização e seleção com recombinantes obtidos via ciclo sexual em *A. nidulans*, verificou que houve o aparecimento de linhagens com alta produção de penicilina em quatro linhas independentes de seleção. Os aumentos na produção após 4 a 5 gerações de seleção resultaram entre 60 a 160% em cada linha e com a variabilidade genética ficando consideravelmente reduzida. A ação gênica foi predominantemente do tipo aditivo. Em cruzamentos entre as diferentes linhas de seleção foi verificado que, em cada linha foram fixadas diferentes com

binações gênicas e/ou alélicas, sendo também indicação de que muitos genes estão envolvidos na produção de penicilina. Concluiu o autor que estes trabalhos demonstram a possibilidade de obter melhoramento significativo na produção de penicilina em programas de hibridização e seleção.

TAVARES (1975) estudou produção de massa celular em diversas linhagens de *Saccharomyces uvarum*. Concluiu que as variações observadas entre e dentro de linhagens indicam possibilidade de progresso em programa de recombinação e seleção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagem utilizada

A linhagem de *Aspergillus niger* do presente trabalho é utilizada em indústria para a produção de ácido cítrico pelo método de fermentação em superfície, e recebe a denominação de 10V10. Foi gentilmente cedida pelo Dr. Enrique Duprat, diretor da FERMENTA S.A., que pertence ao grupo Matarazzo.

3.2. Meios de cultura e soluções usadas

3.2.1. Meio mínimo *(PONTECORVO e Col., 1953b)*

Nitrato de Sódio	6 gramas
Fosfato dihidrogenado de potássio . .	1,5 gramas
Cloreto de Potássio.	0,5 gramas
Sulfato de Magnésio . $7H_2O$ . . .	0,5 gramas

Sulfato de Ferro e Sulfato de Zinco	traços
Glicose	10 gramas
Água destilada	1 litro

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1N; quando desejado sólido foram adicionadas 15 gramas de ágar por litro.

3.2.2. Meio completo *(PONTECORVO e Col., 1953b)*

Foi adicionado a 1 litro de meio mínimo:

Peptona	2,0 gramas
Caseína hidrolizada	1,5 "
Extrato de leveduras	0,5 "
Solução de vitaminas	1,0 ml
Ácido nucléico de vitaminas	2,5 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1N; quando sólido foram adicionadas 15 gramas de ágar por litro.

3.2.3. Solução de vitaminas

Biotina	0,2 mg
Ácido *p*-aminobenzóico	10,0 mg
Aneurina ou Tiamina	50,0 mg
Piridoxina	50,0 mg
Ácido nicotínico	100,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Água destilada estéril	100 mililitros

A solução foi esterilizada em vapor fluente por 3 dias consecutivos e guardada em frasco escuro, sob clorofórmio, no refrigerador.

3.2.4. Hidrolisado de ácido nucléico de leveduras

Foram colocadas 2 g de ácido nucléico de leveduras em 15 ml de solução 1N de NaOH e 2 g de ácido nucléico de leveduras em 15 ml de solução 1N de HCl. As soluções foram aquecidas por 20 minutos a 100°C, misturadas, e o pH foi ajustado para 6,0. A mistura foi filtrada em seguida, sendo o volume completado para 40 ml e a preparação foi guardada em refrigerador sob clorofórmio.

3.2.5. Solução salina

Cloreto de sódio. . . . 8,5 gramas

Água destilada. . . . . 1 litro

Foram preparados frascos com 9 ml desta solução e autoclavados.

3.2.6. Solução de Tween

Foi adicionado tween 80 à água destilada numa concentração de 0,1% (v/v). Foram colocados 2,5 ml em tubos de ensaio, autoclavados e conservados em refrigerador.

3.2.7. Meio mínimo líquido com 2% de meio completo

Foi adicionado ao meio mínimo comum 2% de meio completo. A solução resultante foi distribuída em tubos com 2,5 ml autoclavada e conservada no refrigerador.

3.2.8. Meio de fermentação *(DOELGER e PRESCOTT, 1934)*

Sacarose.	140,0 gramas
Nitrato de amônio . .	2,23 "
Fosfato monohidrogenado de potássio. . . .	1,00 "
Sulfato de Mg . $7H_2O$..	0,23 "
Água deionizada . . .	suficiente para completar volume para 1 litro.

O pH foi ajustado para 2,0 com HCl 1N. Foram distribuídos 50 ml do meio em erlenmeyers de 250 ml. O meio foi esterilizado com pressão de 1/2 atmosfera e temperatura de 111°C por 30 minutos.

3.2.9. Suplementos adicionados ao meio mínimo

Solução estoque (em 100 ml de água)		Quantidade adicionada a 20 ml de meio de cultura	Concentração final no meio
Arginina	1 g	0,1 ml	50 µg/ml
Piridoxina	1 mg	0,1 ml	0,05 µg/ml
Adenina	1,4 g	0,1 ml	70 µg/ml
Ácido nicotínico	1 mg	0,1 ml	0,05 µg/ml
Ácido *p*-aminobenzóico	14 mg	0,1 ml	0,7 µg/ml
Aneurina ou Tiamina	1 mg	0,1 ml	0,05 µg/ml
Peptona	4,0 g	1,0 ml	2 mg/ml
Extrato de leveduras	1,0 g	1,0 ml	0,5 mg/ml
Caseína hidrolisada	3,0 g	1,0 ml	1,5 mg/ml
Solução de vitaminas	1,0 ml	1,0 ml	0,001 (v/v)
Ácido nucléico de leveduras	5,0 ml	1,0 ml	0,0025 (v/v)

3.2.10. Suplementos adicionados ao meio de fermentação

Foram feitas soluções estoque com 1 g por 100ml de água destilada esterilizada das seguintes substâncias: arginina, piridoxina, adenina, ácido nicotínico, ácido *p*-aminobenzóico e tiamina, das quais foram adicionados 1 ml a 50 ml

de meio de fermentação, sendo a concentração final cerca de 200 µg/ml.

3.2.11. Tampão tris-maleico

Preparado de acordo com o procedimento descrito por *ADELBERG e Col. (1965)*, para substituir os sais de fosfato do meio mínimo quando é feita a incubação com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

Foram adicionados a 1 litro de água destilada todos os componentes necessários para a preparação de meio mínimo líquido (ver ítem 3.2.1.), exceto fosfato dihidrogenado de potássio, que é substituído por 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol (TRIS) e ácido maleico, ambos na concentração de 1/20M. O pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 1N, sendo o meio autoclavado em seguida.

3.2.12. Solução estoque de ácido cítrico

Utilizada na confecção de curvas padrão nos experimentos de determinação da quantidade de ácido cítrico no meio de fermentação.

Foi pesada 1 g de ácido cítrico e colocada em 250 ml de água destilada. A solução resultante foi agitada

bem, e, conservada em refrigerador a $4^{o}C$.

3.3. Esterilização e temperatura de incubação

Todos os meios de cultura e soluções utilizadas no presente trabalho (a menos que esteja especificado no ítem de maneira diversa) foram esterilizados em autoclave à temperatura de $120^{o}C$ e à pressão de 1 atmosfera por 15 minutos.

Em todos os experimentos a temperatura de incubação foi de $28^{o}C$.

3.4. Obtenção de mutantes

3.4.1. Curvas de sobrevivência

3.4.1.1. Com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG)

Suspensões de conídios, obtidos de colônias incubadas 8 dias em placas de Petri contendo meio completo, foram preparadas em solução de tween, com cerca de 10^{6} - 10^{7} conídios por mililitro. Ao mesmo tempo foram pesadas 6 mg de NTG que foram adicionadas a 10 ml de tampão tris-maleico (TM) preparado de acordo com o ítem 3.2.11. Um mililitro da suspensão de conídios foi misturada com 1 ml de TM, sendo poste-

riormente colocada em frasco contendo a solução de NTG. A mistura foi incubada a 28°C por 10, 20 e 30 minutos. O controle foi feito com 1 ml da mesma suspensão de conídios misturada com 11 ml de tampão TM que foi incubada à mesma temperatura.

Amostras de 2 ml foram retiradas da suspensão controle e do tratamento nos tempos indicados, colocadas em tubos de centrífuga esterilizados e submetidas à centrifugação de 2000 rpm por 5 minutos. Foi desprezado o sobrenadante e os conídios foram ressuspensos em 2 ml de água esterilizada e novamente centrifugados à mesma rotação e mesmo tempo. Outra vez foi desprezado o sobrenadante e os conídios ressuspensos em 2 ml de água destilada esterilizada. Esta suspensão foi transferida para frasco de salina com 8 ml. Diluições convenientes foram feitas e foram semeadas, no mínimo, 3 placas de Petri contendo meio completo por tratamento.

Depois de incubação por 3 - 4 dias, foi feita contagem das colônias. A porcentagem de sobrevivência foi determinada considerando as diluições e como 100% de sobrevivência o número de conídios viáveis estimado na amostra sem tratamento.

Esta metodologia é semelhante à descrita por *CLUTTERBUCK e SINHA (1966)* para *Aspergillus nidulans*.

3.4.1.2. Com luz ultravioleta

Suspensões de conídios preparadas com o descrito no ítem 3.4.1.1., foram diluídas de 1:10 em solução salina, colocadas em placas de Petri esterilizadas e, irradiadas nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos com luz ultravioleta de ondas curtas (2537 Å). Antes do início da irradiação foram retiradas alíquotas de 1 ml das suspensões, sendo convenientemente diluídas em salina e feita semeadura em meio completo. Após a irradiação de 5, 10, 20 e 30 minutos o processo foi repetido, sendo que, foram semeadas no mínimo 3 placas por tratamento.

Após 3 - 4 dias de incubação foram feitas contagens das colônias desenvolvidas nas placas semeadas. A determinação da porcentagem de sobrevivência nos tempos de irradiação foi feita tomando como 100% o número de conídios viáveis estimado na amostra sem irradiação.

3.4.2. Isolamento de mutantes

3.4.2.1. Mutantes auxotróficos

Suspensões de conídios preparadas de acordo com o descrito no ítem 3.4.1.1., foram submetidas a tratamento com mutagênicos (luz ultravioleta e NTG) o tempo necessário para a obtenção de 1 a 5% de sobrevivência. Alíquotas de 1 ml das suspensões de esporos tratadas eram convenientemente di-

luídas em salina e semeadas em 15 - 20 placas contendo meio completo que foram incubadas por 3 - 4 dias.

As colônias sobreviventes eram então transferidas uma a uma para placas de Petri contendo meio mínimo sólido com 26 pontos marcados no fundo da placa na disposição 5 x 5 + 1 e, incubadas por 24 horas. Decorrido esse tempo as inoculações que não cresceram ou com crescimento reduzido eram transferidas em bloco de ágar com cerca de 2 mm de diâmetro para meio completo. Após 5 dias de incubação eram feitas suspensões de conídios em tween e, uma alíquota de 0,2 ml desta suspensão era misturada em meio mínimo mantido fundido em banho maria a 50°C em uma placa de Petri esterilizada que era deixada solidificar e secar por 2 - 3 horas em estufa a 28°C. Posteriormente eram adicionadas com auxílio de micropipetas esterilizadas, gotas dos compostos exclusivos do meio completo (ver ítem 3.2.2.) em 5 pontos equidistantes marcados no fundo da placa. Novamente incubadas por 24 horas as colônias que apresentaram crescimento restrito a uma ou mais substâncias, o que é evidenciado por halo de crescimento em redor do ponto aonde foram colocadas as substâncias em estudo, eram purificadas por microcolônias e estocadas em meio completo inclinado.

Após o crescimento em determinado composto, as colônias foram ensaiadas para cada um dos componentes do mesmo, determinando, portanto, a deficiência nutricional específica.

Este método, descrito por *PONTECORVO e Col. (1953b)*, é denominado de isolamento total.

3.4.2.2. Mutantes morfológicos

Após tratamento com mutagênico e a semeadura em placa, como descrito nc ítem anterior, as colônias sobreviventes eram examinadas para verificar possível alteração com relação à coloração de conídios. Estas colônias foram isoladas por meio de estrias em placas contendo meio completo, purificadas por microcolônias e estocadas em meio completo inclinado.

3.5. Reversão das marcas auxotróficas

Conídios de colônias incubadas por 8 dias em meio completo foram preparados em suspensão de acordo com o ítem 3.4.1.1. O número de conídios foi estimado em lâmina hematimétrica e a concentração ajustada para semear cerca de 1×10^5 conídios por placa contendo meio mínimo sólido.

Diluições apropriadas foram feitas em salina para semeadura em meio completo sólido visando a determinação do número de conídios viáveis na suspensão.

As placas semeadas foram incubadas da seguinte

maneira: as contendo meio completo por 3 - 4 dias, sendo então contadas as colônias formadas; e, as contendo meio mínimo por 7 dias, dando oportunidade para a evidenciação das possíveis colônias formadas por conídios com reversão da(s) marca(s) considerada(s).

Foram preparadas 8 placas contendo meio mínimo e 2 contendo meio completo para cada linhagem.

3.6. Observação da produção de setores

3.6.1. Por inoculação em meio mínimo e meio completo

Inoculações foram feitas no centro de placas de Petri contendo de 20 - 25 ml de meio de cultura com esporos provenientes de colônia com 7 - 8 dias de incubação.

Após 10 dias de incubação o número de setores foi estimado.

3.6.2. Por inoculação em meio mínimo suplementado com componentes do meio completo

Placas foram preparadas contendo meio mínimo mantido fundido em banho-maria a 50°C, ao qual foi adicionado, nas concentrações descritas no ítem 3.2.9., os componentes exclusivos do meio completo. O controle foi feito com placas con-

tendo meio mínimo sem suplementação e meio completo.

O número de placas preparado foi de 10 para cada tratamento. A inoculação de esporos foi feita no centro das placas. Após 10 dias de incubação foi feita a observação da presença ou não de setores.

3.6.2. Por microcolônias

3.6.3.1. Obtenção de microcolônias

Uma alça de platina previamente esterilizada e molhada em salina esterilizada foi passada na superfície de colônia com 8 - 9 dias de incubação. Os conídios coletados foram transferidos para solução de tween. Este, foi agitado para desagregar as cadeias de conídios. Em seguida, foram feitas diluições de 1:10 e 1:100 em salina, sendo semeado em cada diluição uma alíquota de 0,1 ml em placas de Petri contendo meio completo. Estas foram incubadas por 24 horas, sendo então, examinadas com auxílio de microscópio estereoscópico para localização das microcolônias, que foram coletadas ao acaso de um dos quadrantes da placa que as tinha isoladas. As microcolônias foram removidas com auxílio de fio de platina esterilizado num bloco de ágar de cerca de 2 mm. Foram colocadas no centro de placas contendo meio mínimo e meio completo. Os setores produzidos foram contados após 10 dias de incubação.

3.7. Crescimento em meio mínimo, meio mínimo suplementado e meio completo

Este ensaio visou determinar a influência dos componentes do meio completo no crescimento da linhagem em meio mínimo sólido, como tentativa para elucidar a causa da produção de setores.

Foram utilizadas placas de Petri padronizadas (9 cm de diâmetro) contendo 20 ml de meio de cultura. As placas continham meio completo, meio mínimo e meio mínimo suplementado, respectivamente com solução de vitaminas, extrato de leveduras, peptona, caseína hidrolisada e ácido nucléico de leveduras, os quais foram adicionados de acordo com o ítem 3.2.9., sendo que para cada tratamento foram feitas 3 placas.

A incubação foi de 72 horas, sendo o diâmetro das colônias determinado em milímetros.

3.8. Sobrevivência de conídios em meio mínimo, meio mínimo suplementado e meio completo

Suspensão com cerca de 10^6 conídios por mililitro foi preparada em solução de tween de acordo com o ítem 3.4.1.1. Diluições convenientes foram feitas ajustando a suspensão de modo que 0,1 ml semeado por placa contivesse cerca de 200 conídios.

Foram semeadas placas de meio completo, meio mínimo e meio mínimo suplementado respectivamente com caseína hidrolisada, peptona, extrato de levedura, solução de vitaminas e ácido nucléico de leveduras que foram adicionados de acordo com o ítem 3.2.9. O número de placas semeadas foi de 3 por tratamento e a incubação foi de 5 dias.

O número de colônias foi contado e a sobrevivência calculada considerando como 100% o número de conídios viáveis estimado pela contagem de colônias crescidas em meio completo.

3.9. Técnicas genéticas

As tentativas de isolamento de diplóides foram feitas de acordo com as técnicas descritas abaixo.

3.9.1. Obtenção de heterocários

Foram ensaiados dois métodos:

3.9.1.1. Método descrito por *ROPER (1952)*

Esta técnica foi desenvolvida para *Aspergillus nidulans* e é utilizada com sucesso tanto para fungos com conídios uni como multinucleados. Foi usada com sucesso para *A. niger* por *PONTECORVO e Col.(1953a)* e *LHOAS (1961, 1967)*.

Conídios de 2 linhagens com diferentes deficiências nutricionais foram coletados com alça de platina esterilizada e misturados em meio mínimo mais 2% de meio completo (ver ítem 3.2.7.) que permite germinação de conídios. Depois de 3-5 dias de incubação a película desenvolvida na superfície do meio foi cortada em 4 pedaços com auxílio de alça de platina esterilizada, que foram então transferidos para placas de meio mínimo sólido, onde existe a evidenciação de micélio heterocariótico em forma de setores de crescimento vigoroso.

3.9.1.2. Método de mistura de conídios por estrias em meio completo

Esta técnica consiste na mistura de conídios de 2 linhagens com diferentes requerimentos nutricionais na superfície de meio completo sólido, com auxílio de alça de platina esterilizada, por meio de estrias. Após 3 - 5 dias de incubação, blocos de meio de cultura aonde ocorreu sobreposição das estrias são transferidos para placas de meio mínimo sólido, que permite a evidenciação do micélio heterocariótico na forma de setores de crescimento vigoroso.

3.9.2. Isolamento de diplóides

Suspensão de conídios formados por heterocá-

rios foi preparada em solução de tween e semeada em placas com meio mínimo sólido sem suplementação. As concentrações utilizadas foram de 10^6 conídios por placa, sendo o número de conídios estimado em lâmina hematimétrica. O número de placas utilizadas para cada experimento foi entre 8 - 10.

Este procedimento permitiria a seleção dos conídios com núcleos diplóides prototróficos que foram originados da fusão de núcleos haplóides auxotróficos de linhagens com diferentes deficiências nutricionais.

Como a linhagem utilizada em nosso trabalho forma grande porcentagem de conídios binucleados *(BARACHO e Col., 1975)* existe a possibilidade da formação de conídios heterocarióticos que podem germinar em meio mínimo. Sendo assim, foi adotado o esquema descrito a seguir para separação de diplóides de heterocários.

1) Formação de conidióforos de coloração diferente da esperada para diplóides (negro carvão à olho nú), devido à complementação dos genes envolvidos na formação do pigmento, evidencia um heterocário. Este procedimento foi levado em conta no caso do cruzamento de linhagens que diferissem na coloração de conídios.

2) Sobrevivência dos esporos em meio mínimo. Das colônias isoladas que cresciam em meio mínimo após a semeadura de conídios provindos de heterocários foram preparadas suspensões de conídios em solução tween de acordo com o

procedimento do ítem 3.4.1.1. Diluições foram feitas para a semeadura de cerca de 100 colônias por placa, sendo utilizadas 2 placas de meio completo e 2 de meio mínimo. Após 3 - 4 dias de incubação o número de colônias formadas foi contado. A sobrevivência das linhagens diplóides deve estar situada em valores iguais ou bem próximos de 100% no meio mínimo em relação ao meio completo. No caso de colônias heterocarióticas este valor deve ser consideravelmente menor, o que permite a separação entre os dois tipos de colônias. Este aspecto foi considerado principalmente em cruzamentos que não envolveram mutantes com diferentes colorações de conídios.

3.10. Avaliação da produção de ácido cítrico pela linhagem 10V10 e seus mutantes

3.10.1. Fermentação em meio de *DOELGER e PRESCOTT(1934)*

Para a determinação da produção de ácido cítrico das linhagens ensaiadas foi preparada suspensão de conídios em tween, de acordo com o ítem 3.4.1.1., de colônias incubadas em meio completo por 9 dias. O número de conídios destas suspensões foi ajustado por diluição, em solução de salina esterilizada, a cerca de 1×10^6 por mililitro. Das suspensões ajustadas foi retirado 1 mililitro que foi adicionado a erlenmeyers contendo 50 ml de meio de fermentação (preparado de acordo com o ítem 3.2.8.). Com os mutantes auxotróficos foi necessário a adição da substância requerida, preparada e

adicionada de acordo com o ítem 3.2.10. No caso da linhagem prototrófica (10V10) foi adicionado 1 ml de água destilada esterilizada para contrabalançar a diluição do meio. Para cada linhagem foram preparados 5 frascos (repetições).

O período de fermentação foi de 7 dias a 28°C. O meio de fermentação foi então filtrado em papel de filtro quantitativo e separada uma amostra de 20 ml que foi guardada em frasco com tampa de baquelite a -16°C (congelador) por período não superior a 2 semanas.

3.10.2. Determinação de ácidos totais por titulação o

Da amostra do meio de fermentação filtrado foi retirado 1 ml que após receber 2 gotas de solução de fenolftaleína 1%, foi titulado com NaOH 0,1N.

A quantidade de NaOH 0,1N utilizada para a neutralização serve como referência para a quantidade aproximada de ácido cítrico da amostra devido à grande correlação existente na linhagem 10V10 entre titulação do meio de cultura e o rendimento em ácido cítrico *(BONATELLI Jr. e AZEVEDO, dadps não publicados)*.

Sendo assim, foi feita uma curva padrão com concentrações conhecidas de ácido cítrico iniciando com 84,000 mg/ml de água destilada, que foi sucessivamente reduzida à metade por diluição até que se atingisse a concentração de

0,656 mg/ml. O método para neutralização foi o mesmo descrito no primeiro parágrafo deste ítem. A concentração utilizada está de acordo com informação pessoal do Dr. Enrique Duprat, de que o rendimento da linhagem 10V10 em relação ao açúcar total disponível no meio de cultura é de cerca de 60%.

Tendo em conta os dados obtidos na curva padrão foram feitas diluições apropriadas para a obtenção de concentrações de ácido cítrico que o método descrito no ítem 3.9.3. pode medir.

3.10.3. Determinação de ácido cítrico

O método utilizado foi o descrito por *SAFFRAN e DENSTEDT (1948)*.

Alíquotas de 1 ml do meio de fermentação, diluído ou não, de acordo com o resultado obtido com o método descrito no ítem anterior, foram adicionadas a 1 ml de solução de ácido tricloroacético 10%. Após agitação desta mistura foi retirado 1 ml e colocado em tubo de ensaio ao qual foi adicionado 8 ml de anidrido acético, sendo então o tubo fechado com rolha de borracha. Foi então incubado em banho-maria sem agitação regulado a 60 ± 1°C por 10 minutos. Decorrido o tempo, foi adicionado 1 ml de piridina e o tubo fechado mais rapidamente possível com rolha de borracha e incubado em banho-maria regulado a 60 ± 1°C por mais 45 minutos. A reação foi ter

minada com a imersão dos tubos com a mistura em banho de gelo-água por 5 minutos.

Um tubo com 1 ml de água destilada com ácido tricloroacético 5% passou por todos os passos e serviu para ajustar o colorímetro em 100% de transmitância.

A curva padrão foi confeccionada com diluição de solução estoque de ácido cítrico preparada de acordo com o ítem 3.2.12., colocando 0,5 ml em 9,5 ml de água destilada obtendo após a adição de 1 ml de ácido tricloroacético 10 %, uma concentração de 100 µg/ml. Para as duas outras concentrações de ácido cítrico utilizadas, 200 µg/ml e 400 µg/ml, respectivamente 1 ml para 9 ml e 2 ml para 8 ml de água destilada.

Após todos os passos da reação a mistura desenvolve coloração amarelo pálida a acastanhada. A leitura foi feita em colorímetro FUJI EP-412 com filtro de 472 nm.

Os valores de transmitância obtidos foram transformados em log 1/T (logarítmo do inverso da transmitância). Os dados assim transformados correspondentes às diluições da solução estoque de ácido cítrico foram utilizados para a confecção da curva padrão. Os dados correspondentes às amostras dos meios de fermentação das diversas linhagens foram transformados e utilizados para a determinação da quantidade de ácido cítrico através do uso da equação de regressão calculada com dados obtidos na curva padrão.

3.10.4. Estimativa da concentração de ácido cítrico por mililitro do meio de fermentação

A quantidade de ácido cítrico estimada de acordo com o ítem anterior serviu como referência para o cálculo da concentração de ácido cítrico no meio de fermentação. A concentração determinada, de acordo com a curva padrão, é multiplicada por dois, devido à diluição feita com ácido tricloroacético 10% (1:2) e, pela diluição anteriormente feita (se foi o caso) com água destilada. O valor obtido expressa a quantidade de ácido cítrico em microgramas por mililitro do meio de fermentação. Os dados foram utilizados como miligramas por mililitro na análise estatística.

3.11. Determinação do peso seco do micélio

O objetivo no caso, foi tentar observar a existência de correlação entre o peso seco do micélio formado pelas linhagens durante o período de fermentação, com os dados de produção de ácido cítrico das mesmas e com a titulação do meio de fermentação.

O micélio separado após filtração do meio de fermentação foi colocado em placas de Petri previamente secas por 24 horas em estufa regulada à temperatura de 80°C e pesadas. Feito isto as placas de Petri foram colocadas novamente em estufa a 80°C e deixadas por 48 horas, sendo então pesadas.

O peso seco foi estimado em miligramas, pela diferença entre o peso da placa de Petri vazia e com o micélio após a secagem.

3.12. Análises estatísticas

3.12.1. Dos dados obtidos de crescimento da linhagem 10V10 de acordo com o ítem 3.7.

A análise da variância dos dados foi efetuada tendo em vista o delineamento de blocos inteiramente casualizados utilizado, sendo que a comparação das médias foi feita segundo o teste de Tukey *(GOMES, 1970)*

3.12.2. Dos dados obtidos de produção de ácido cítrico das linhagens de acordo com o ítem 3.10.4.

A análise da variância foi efetuada tendo em vista o delineamento de blocos ao acaso e a comparação de médias foi feita segundo o teste de Tukey *(GOMES, 1970)*.

3.12.3. Correlação entre dados

Foi realizada para verificar as possíveis correlações existentes entre:

1) Peso seco do micélio e título de ácidos totais.
2) Peso seco do micélio e produção de ácido cítrico.
3) Título de ácidos totais e produção de ácido cítrico.

4. RESULTADOS

4.1. Números, porcentagens relativas e curvas de sobrevivências de conídios da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger* após tratamentos com N-metil-N'-nitro-N-nitroso guanidina (NTG) e luz ultravioleta (UV)

Os tratamentos com os mutagênicos **NTG** e **UV** foram realizados de acordo com os procedimentos descritos nos ítens 3.4.1.1. e 3.4.1.2., respectivamente.

Os resultados dos números e porcentagens relativas dos conídios sobreviventes estão sumariados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. As Figuras 1 e 2 mostram, respectivamente, as curvas de sobrevivência à **NTG** e **UV**.

Tabela 3 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger* ao tratamento com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobrevivência	
	1ª Repetição	2ª Repetição	1ª Repetição	2ª Repetição
0	$7,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	100,00	100,00
10	$7,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	10,41	15,00
20	$2,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	3,42	2,00
30	$3,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^2$	4,11	0,70

Tabela 4 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger* ao tratamento com luz ultravioleta.

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobrevivência	
	1ª Repetição	2ª Repetição	1ª Repetição	2ª Repetição
0	$2,2 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$	100,00	100,00
5	$1,4 \times 10^6$	$2,6 \times 10^5$	63,60	65,00
10	$7,5 \times 10^5$	$1,52 \times 10^5$	34,10	38,00
20	$8,8 \times 10^4$	$1,52 \times 10^4$	4,00	3,80
30	$2,2 \times 10^4$	$6,4 \times 10^3$	1,00	1,60

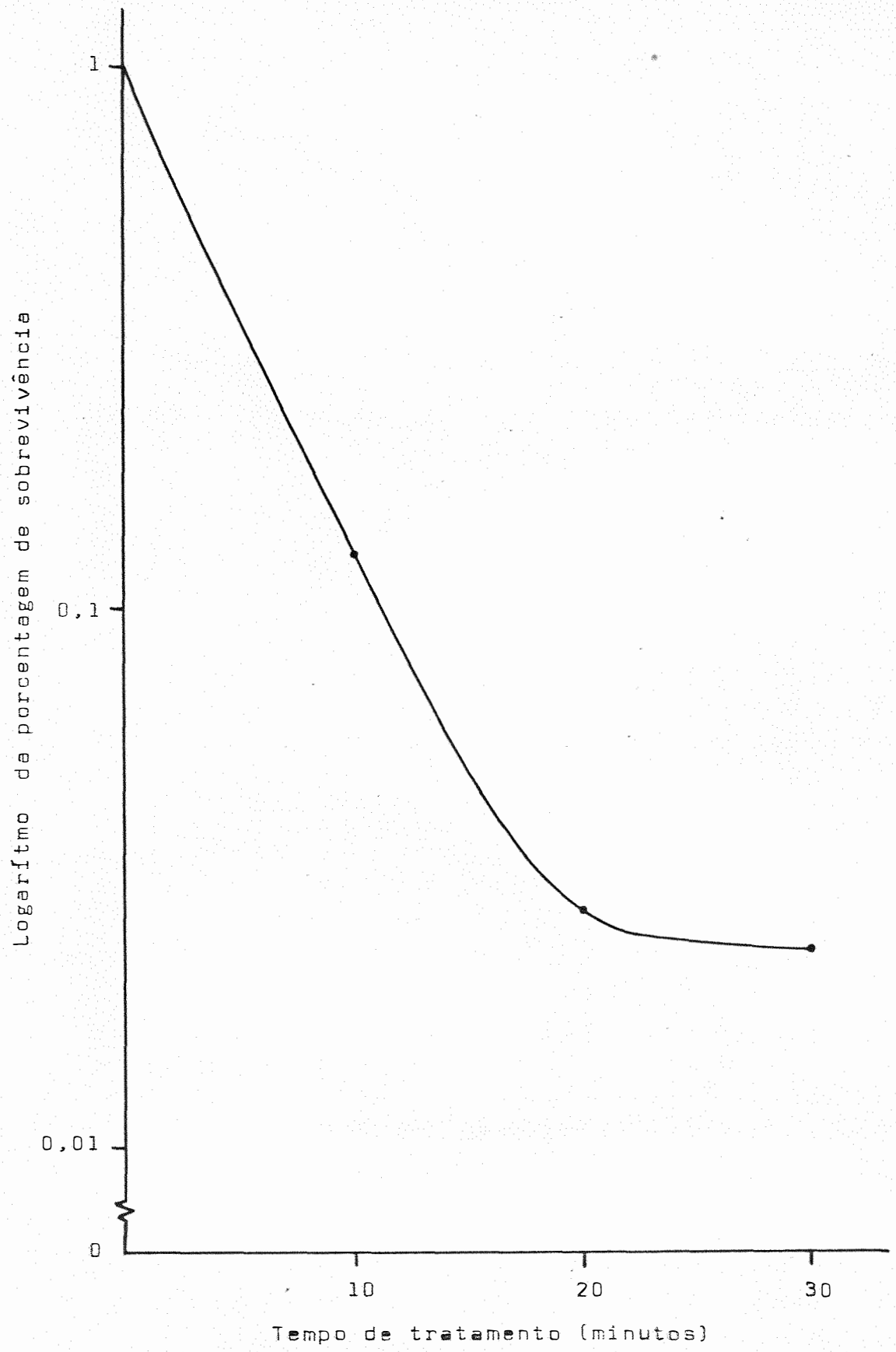


Figura 1 - Curva de sobrevivência da linhagem **10V10** à N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

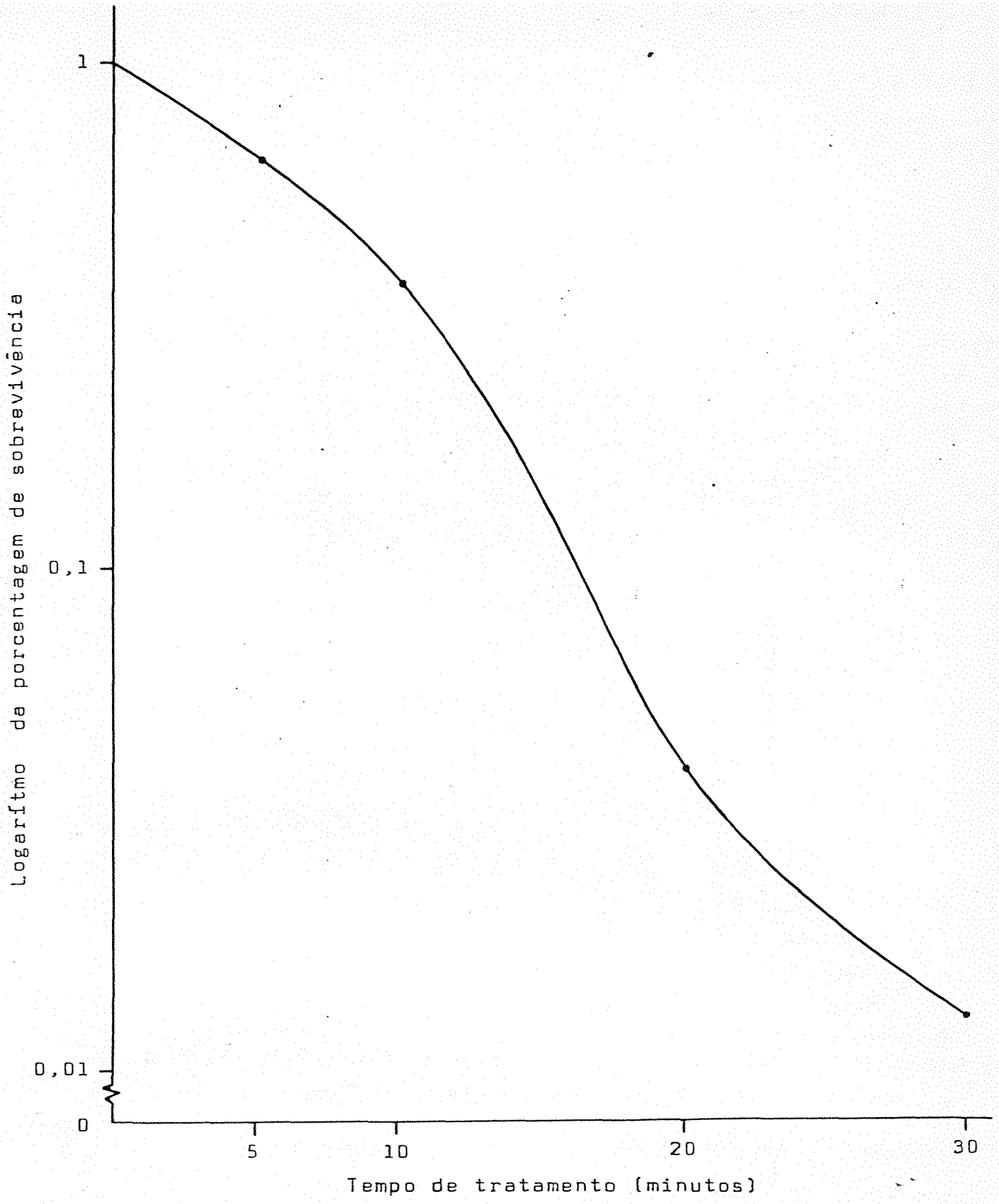
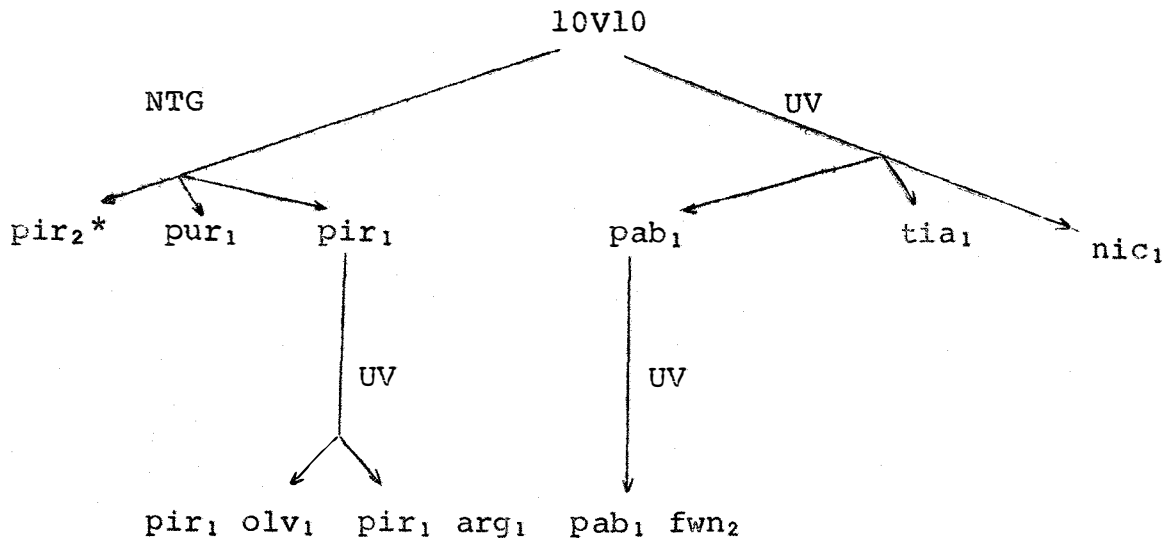


Figura 2 - Curva de sobrevivência da linhagem 10V10 à luz ultravioleta.

Figura 3 - "Pedigree" dos mutantes auxotróficos e morfológicos obtidos após tratamento de conídios da linhagem **10V10** de *Aspergillus niger* com mutagênicos.



***Os símbolos usados para os mutantes indicam:**

pir - deficiência para síntese de piridoxina.

pab - deficiência para síntese de ácido *p*-aminobenzóico.

tia - deficiência para síntese de tiamina.

nic - deficiência para síntese de ácido nicotínico.

arg - deficiência para síntese de arginina.

pur - deficiência respondendo para guanina ou adenina (purinas).

fwn - conídios de coloração marrom-claro.

olv - conídios de coloração oliva.

4.2. Mutantes auxotróficos e morfológicos obtidos após o tratamento de conídios da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger* com mutagênicos

A Figura 3 resume, em forma de "pedigree", os mutantes auxotróficos e morfológicos obtidos segundo os procedimentos dos ítens 3.4.2.1. e 3.4.2.2.

Ao lado da **seta** que indica o mutante está colocado o mutagênico utilizado (**NTG** - N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina e **UV** - luz ultravioleta). As setas partindo dos mutantes indicam tratamento com mutagênico para a obtenção de mutantes duplos. Nesse caso o mutagênico usado foi a luz ultravioleta.

4.3. Determinação da frequência de reversão das deficiências nutricionais obtidas pelo tratamento de conídios da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger* com mutagênicos.

A Tabela 5 sumariza os resultados obtidos, de acordo com o método descrito no ítem 3.5.

Tabela 5 - Teste da frequência de reversão das deficiências nutricionais de mutantes obtidos após tratamento de conídios da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger* com mutagênicos.

Mutantes	Reversão marca	Conídios por placa	Total de conídios ensaiados	Frequência de reversão
pab_1*	$pab^- \rightarrow pab^+$	$7,80 \times 10^4$	$6,24 \times 10^5$	0
pir_1 arg_1	$pir^- \rightarrow pir^+$	$6,60 \times 10^4$	$5,28 \times 10^5$	0
	$arg^- \rightarrow arg^+$	$6,60 \times 10^4$	$5,28 \times 10^5$	0
pir_2	$pir^- \rightarrow pir^+$	$7,80 \times 10^4$	$6,24 \times 10^5$	0
tia_1	$tia^- \rightarrow tia^+$	$5,75 \times 10^4$	$4,60 \times 10^5$	0
pur_1	$pur^- \rightarrow pur^+$	$7,10 \times 10^4$	$5,68 \times 10^5$	0
pir_1	$pir^- \rightarrow pir^+$	$1,90 \times 10^5$	$1,52 \times 10^6$	0

*Para os símbolos das mutantes ver Figura 3.

Como pode ser observado, dentro das condições dos experimentos, não houve reversão das marcas consideradas.

4.4. Produção de setores e crescimento da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger* desenvolvida a partir de inoculação ou de microcolônias em diversos meios de cultura

Nas Figuras 4 e 5 podem ser observados tipos e quantidade de setores desenvolvidos em meio mínimo (MM) e a ausência dos mesmos em meio completo (MC).

De acordo com os ítens 3.6.1., 3.6.2. e 3.6.3., foi feita a contagem do número de setores produzidos que está sumariada na Tabela 6. Nas Tabelas A_1 e A_2 do Apêndice estão as observações detalhadas da produção de setores.

A ocorrência de setores, como pode ser visualizado, é característica do meio mínimo, mesmo quando suplementado com caseína hidrolisada (MCH), solução de vitaminas (MSV) ou com hidrolisado de ácido nucléico de leveduras (MAN). Por outro lado, não são evidenciados em meio completo e meio mínimo suplementado com extrato de leveduras (MEL) ou peptona (MPEP). O único setor encontrado em MC (meio completo) foi do tipo aconidial (sem conídios), tipo que não foi encontrado em meio mínimo.

A Tabela 7 resume os dados obtidos em meio mínimo agrupados considerando o número de setores produzidos por placa.

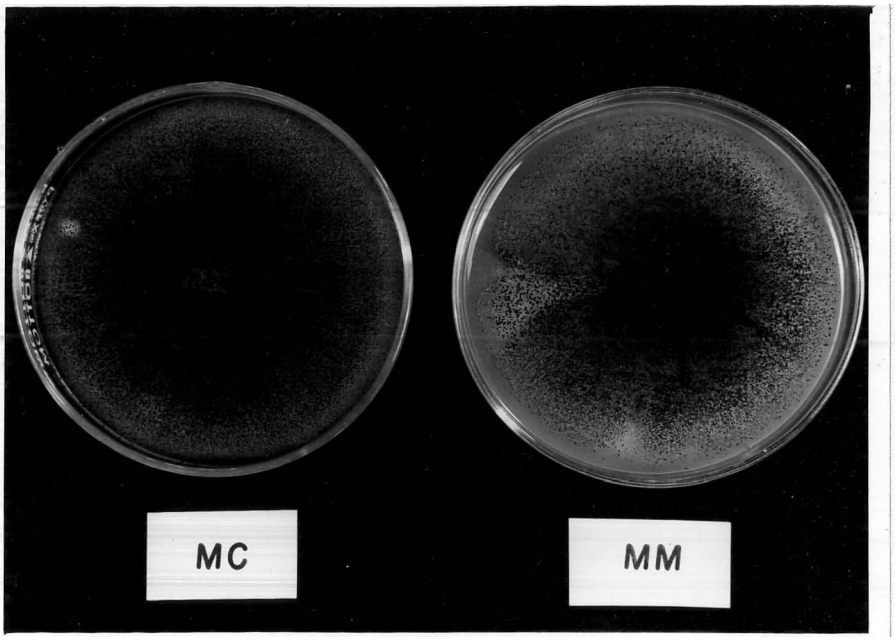


Figura 4 - Placa contendo meio mínimo com colônia evidenciando setores comparada com colônia desenvolvida em meio completo.

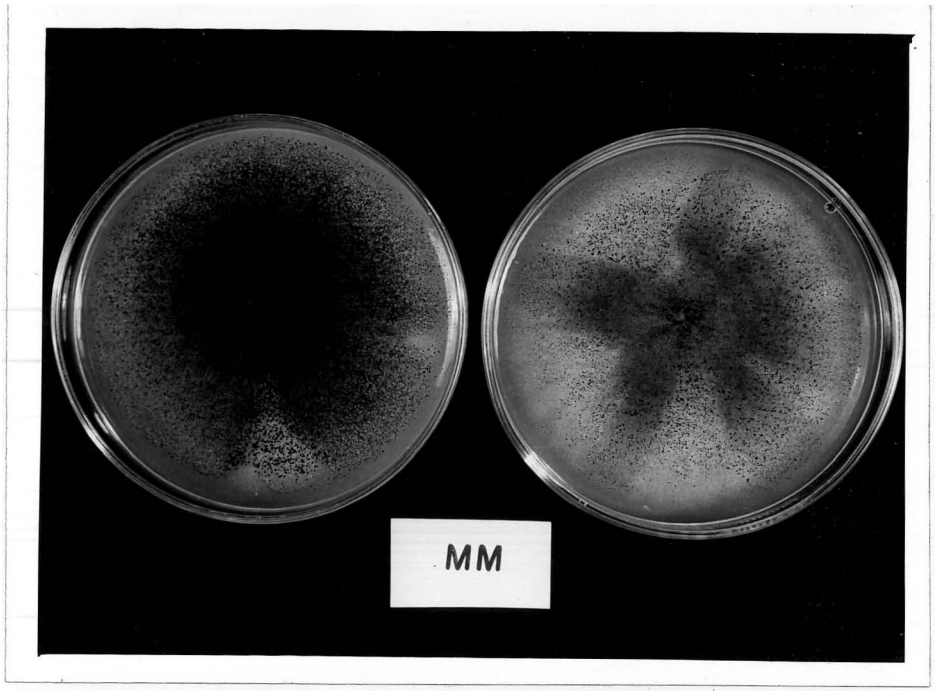


Figura 5 - Colônias desenvolvidas em meio mínimo com diferentes números de setores.

Tabela 6 - Número e média de setores por placa observados após crescimento da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger* por inoculação e microcolônias em diversos meios de cultura.

Método	Meios de cultura	Número de setores	Setores (média/placa)
Inoculação	MC*	1 (160)**	0,006
	MM	300 (160)	1,875
	MCH	+ (10)***	
	MPEP	- (10)	
	MEL	- (10)	
	MSV	+ (10)	
	MAN	+ (10)	
Microcolônias	MC	0 (39)	0,0
	MM	83 (39)	2,128

*Símbolos referentes ao meio de cultura usado, sendo:- MC - Meio Completo, MM - Meio Mínimo e, MCH, MPEP, MEL, MSV, MAN - Meio Mínimo Suplementado respectivamente com, caseína hidrolizada, peptona, extrato de leveduras, solução de vitaminas e hidrolizado de ácido nucléico de leveduras.

**O número entre parênteses foi o número de placas utilizadas em cada experimento.

***Neste caso foi observado apenas a presença (+) ou ausência (-) de setores.

Tabela 7 - Número e frequência relativa de colônias da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger* com diferentes números de setores.

Nº de setores por placa	Número de placas		Frequência relativa	
	inoculação	microcolônias	inoculação	microcolônias
0	39	6	24,37	15,38
1	38	7	23,75	17,95
2	32	11	20,00	28,20
3	24	8	15,00	20,51
4	14	5	8,75	12,82
5	9	2	5,62	5,13
6	3	0	1,88	-
7	1	0	0,62	-

Podemos observar, no caso da produção de setores por inoculação, que o número de placas com número elevado de setores é pequeno, com tendência para aumento quando consideramos placas com menor número de setores. No caso das microcolônias, há uma tendência para aumento e nova diminuição na frequência.

De acordo com o procedimento descrito no ítem 3.7., foram observados os resultados que estão sumariados na Tabela 8, com relação ao crescimento da linhagem em diversos meios de cultura.

Tabela 8 - Diâmetro em milímetros de colônias da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger* após 72 hs. de incubação em diferentes meios de cultura.

Meios de Cultura	Repetições		
	1	2	3
MC*	4,4	4,0	4,2
MM	2,2	2,2	2,3
MPEP	3,5	3,3	3,3
MEL	4,0	4,1	3,9
MCH	2,3	2,4	2,4
MSV	2,3	2,2	2,2
MAN	2,2	2,2	2,3

*Para símbolos de meios de cultura ver Tabela 6.

Com os dados obtidos foi feita a análise da variância cujos resultados estão na Tabela 9.

Tabela 9 - Análise da variância dos dados da Tabela 8.

Fontes de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F
Linhagens	6	14,15905	2,35984	215,51050**
Resíduo	14	0,15334	0,01095	

**Significativo ao nível de 1%.

Os resultados do teste de Tukey com as médias de crescimento da linhagem nos diversos meios de cultura estão sumariados na Tabela 10.

Tabela 10 - Comparação das médias de diâmetro em milímetros das colônias em diversos meios de cultura pelo testes de Tukey.

Meios de Cultura	Médias
MC*	4,20 a**
MEL	4,00 a
MPEP	3,37 b
MCH	2,37 c
MSV	2,23 c
MAH	2,23 c
MM	2,23 c

*Para símbolo dos meios de cultura ver Tabela 6.

**Médias com letras diferentes são significativamente diferentes a nível de 5%.

É evidente o maior crescimento da linhagem em meio completo (MC) e em meio mínimo suplementado com extrato de leveduras (MEL) e peptona (MPEP). De acordo com o teste de médias usado, o crescimento em MC e MEL não diferem significativamente, que por sua vez diferem do crescimento em MPEP.

Nos demais meios de cultura o crescimento da linhagem não difere do crescimento medido no meio mínimo.

4.5. Viabilidade de conídios da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger* após semeadura em diversos meios de cultura.

Os dados obtidos, de acordo com o procedimento descrito no ítem 3.8., estão sumariados na Tabela 11.

Podemos observar, considerando como 100% a viabilidade dos conídios em meio completo, que a sobrevivência dos conídios em meio mínimo e meio mínimo suplementado com hidrolizado de ácido nucléico de leveduras é consideravelmente baixa. Ligeira diminuição é observada em meio mínimo suplementado com caseína hidrolizada (MCH) e com solução de vitaminas (MSV). Aumento na viabilidade pode ser observado em meio mínimo suplementado com extrato de leveduras (MEL) e peptona (MPEP), sendo considerável no primeiro caso e discreto no segundo.

4.6. Produção de ácido cítrico pela linhagem 10V10 de *Aspergillus niger* e seus mutantes em meio de fermentação de *DOELGER e PRESCOTT (1934)*

4.6.1. Determinação da concentração de ácido cítrico

O esquema para determinação da concentração de ácido cítrico compreendeu a titulação de soluções de ácido cítrico em água destilada, de acordo com o ítem 3.9.2., que apresentou os resultados condensados na Tabela 12.

Tabela 11 - Número, média por placa, viabilidade e frequência relativa de conídios viáveis da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger* em diversos meios de cultura.

Meios de cultura	Placa	Número de colônias	Média por placa	Viabilidade conídios/ml (x 10^6)	Frequência relativa
MC*	1	109			
	2	117			
	3	152	126,00	6,30	100,00
MEL	1	135			
	2	116			
	3	167	139,33	6,97	110,63
MPEP	1	118			
	2	111			
	3	156	128,33	6,42	101,90
MCH	1	133			
	2	138			
	3	100	123,67	6,18	98,09
MSV	1	134			
	2	112			
	3	118	121,33	6,07	96,35
MAN	1	26			
	2	58			
	3	24	36,00	1,80	28,57
MM	1	22			
	2	34			
	3	35	30,33	1,52	24,12

*Para símbolos dos meios de cultura ver Tabela 6.

Tabela 12 - Titulação de solução de ácido cítrico em água destilada.

Concentração de ácido cítrico na amostra (µg/ml)	Quantidade de solução NaOH 0,1N para neutralização (ml)
84.000	12,3
42.000	6,3
21.000	3,3
10.500	1,7
5.250	0,9
2.625	0,6
1.312	0,4
656	0,1

Outro passo, foi a confecção da curva padrão, que é média de duas reações conduzidas com concentrações conhecidas de ácido cítrico preparadas a partir de solução estoque. Os resultados obtidos estão sumariados na Tabela 13. Com esses resultados foi confeccionada a curva padrão da Figura 6. A equação da reta de regressão usada para calcular as concentrações de ácido cítrico nas alíquotas dos meios de fermentação está representada na Figura 6.

4.6.2. Determinação da produção de ácido cítrico

Os resultados da produção de ácido cítrico das linhagens, obtidos de acordo com os ítens 3.9.3. e 3.9.4., estão sumariados na Tabela 14. Os cálculos efetuados estão na Tabela A_3 do Apêndice.

Tabela 13 - Relação entre concentração de ácido cítrico e log 1/T (logarítmo do inverso da transmitância).

Concentração de ácido cítrico (µg/ml)	log 1/T		Média
	1a. Repetição	2a. Repetição	
100	0,022	0,023	0,0225
200	0,070	0,073	0,0715
400	0,180	0,177	0,1785

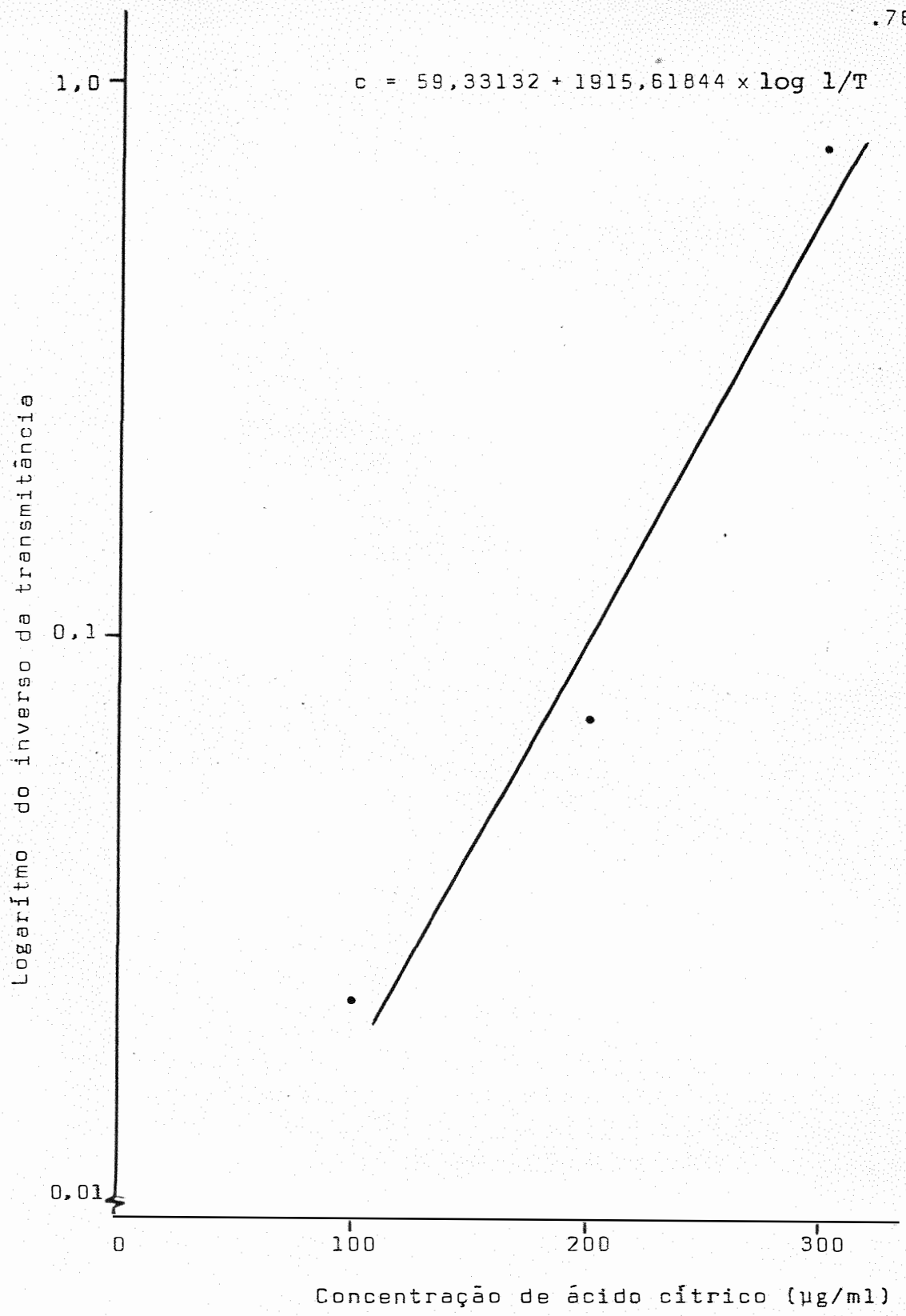


Figura 6 - Curva padrão e equação da reta de regressão da concentração de ácido cítrico.

Tabela 14 - Produção de ácido cítrico da linhagem **10V10** de *A. niger* e seus mutantes expressa em miligramas por mililitro do meio de fermentação de *DOELGER e PRESCOTT (1934)*.

Linhagens	Repetições				
	1	2	3	4	5
10V10	86,336	86,336	40,811	86,336	64,343
nic_1*	67,222	55,487	46,752	58,263	48,995
pir_1 olv_1	0,441	0,700	0,700	0,478	1,022
pab_1	57,558	54,749	66,538	37,482	61,925
pir_2	67,429	80,578	80,986	73,192	83,568
tia_1	40,811	127,984	78,422	105,281	117,722
pab_1 fwn_1	63,313	33,815	38,842	86,351	80,986
pir_1	3,192	1,434	1,802	1,950	3,114
pir_1 arg_1	0,700	0,827	0**	0	0
pur_1	0	0	0	0	0

*Para símbolo das linhagens ver Figura 3.

**0 método, nas condições usadas, não mede quantidades de ácido cítrico inferiores a 200 µg/ml.

A Tabela 15 mostra os resultados da análise da variância dos dados de Produção.

Tabela 15 - Análise da variância da produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus niger* em meio de *DOELGER e PRESCOTT (1934)*.

Fontes de variação	G.L.	SQ	QM	F
Repetições	4	840,22502	210,05625	0,84636 ns
Linhagens	9	61973,50047	6885,94449	27,74508**
Resíduo	36	8934,69830	248,18606	
		C.V. = 37,60256		

ns - Não significativo.

** - Significativo ao nível de 1%.

As comparações de médias feitas pelo teste de Tukey estão na Tabela 16, juntamente com a porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao controle, que no caso é a linhagem 10V10.

Tabela 16 - Médias comparadas pelo teste de Tukey e porcentagem em relação ao controle da produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus niger*.

Linhagens	Médias	Porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao controle.
tia_1*	94,048 a**	+ 29,13
pir_2	77,151 a b	+ 5,93
10V10 (Controle)	72,832 a b	0,00
pab_1 fwn_1	60,661 a b	- 16,71
pab_1	55,650 b	- 23,59
nic_1	55,344 b	- 24,01
pir_1	2,298 c	- 96,84
pir_1 olv_1	0,668 c	- 99,08
pir_1 arg_1	0,305 c	- 99,58
pur_1	0 c	- 100,00

*Para símbolo das linhagens ver Figura 3.

**Médias com letras diferentes são significativamente diferentes ao nível de 5%.

Os resultados obtidos indicam a superioridade de duas linhagens em relação ao controle que são, respectivamente, **tia**$_1$ e **pir**$_2$. A diferença, no entanto, não é significativa ao nível de 5%.

As demais linhagens foram inferiores à linhagem controle, significativamente ou não, sendo interessante observar que o grupo de linhagens compreendendo a linhagem **pir**$_1$ e seus derivativos e a linhagem **pur**$_1$ tiveram sua produção sensivelmente diminuída, com redução superior a 96%.

4.7. Correlações entre produção, peso seco e título das linhagens

Os valores de título e peso seco das linhagens estão na Tabela A_4 do Apêndice, sendo que na Tabela 17 estão sumariadas as correlações calculadas.

Tabela 17 - Valores de correlação entre produção, peso seco e título das linhagens.

Correlação entre:	r
Peso Seco x Produção	- 0,36267**
Peso Seco x Título	- 0,21567^{ns}
Título x Produção	0,88817**

ns - Não significativo.

** - Significativo ao nível de 1%.

Os resultados indicam a possibilidade de ser calculada a produção, num valor aproximado, utilizando-se os valores obtidos com a titulação e/ou peso seco. Ainda mais, não foi encontrada correlação entre peso seco e título.

4.8. Tentativas de obtenção de diplóides com cruzamentos entre mutantes auxotróficos e morfológicos da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger*.

Foram tentados dois métodos de cruzamentos que estão sumariados nas Tabelas 18 e 19.

Como está evidente, dentro das concentrações de conídios semeadas em meio mínimo, não houve crescimento de colônia alguma que pudesse ser classificada como diplóide pelos critérios do ítem 3.9.2.

Em diversos cruzamentos, após a semeadura de conídios provenientes de micélio heterocariótico, houve crescimento residual e de algumas colônias isoladas. Estas colônias ensaiadas de acordo com o ítem 3.9.2., revelaram serem heterocarióticas.

Tabela 18 - Cruzamentos entre mutantes para obtenção de diplóides de acordo com a técnica de *ROPER (1952)*.

Cruzamento	Número de conídios por placa de meio mínimo (x 10^6)	Nº de diplóides obtidos
pir_1 // pab_1*	1,81	0
	1,3	0
pir_1 // pur_1	1,79	0
pir_2 // pab_1	1,27	0
	1,49	0
pir_1 // tia_1	1,34	0
pir_1 // pab_1 fwn_1	1,32	0
tia_1 // pab_1	1,4	0
pab_1 // pir_1 arg_1	1,1	0
pur_1 // pab_1	1,07	0

*Para símbolo dos mutantes ver Figura 3.

Tabela 19 - Cruzamentos entre mutantes para obtenção de diplóides de acordo com o método de estrias.

Cruzamento	Número de conídios por placa (x 10^6)	Nº de diplóides obtidos
pir_2*// pab_1 fwn_1	1,5	0
tia_1 // pab_1 fwn_1	1,02	0
tia_1 // pir_2	1,04	0
nic_1 // pir_1 arg_1	1,05	0
pur_1 // pir_1 olv_1	1,6	0
	1,7	0
pab_1 // tia_1	2,0	0
pir_1olv_1 // pab_1fwn_2	1,26	0
pir_1 // pir_2	-**	-
pir_2 // pir_1 olv_1	-	-

*Para símbolo dos mutantes ver Figura 3.

**Não foi evidenciado crescimento de heterocário em meio mínimo.

Outro ponto que deve ser destacado vem a ser que nos cruzamentos não houve desenvolvimento de heterocários típicos, como os encontrados em *Aspergillus nidulans*. Casos extremos foram os cruzamentos $pir_1 // pir_2$ e $pir_1 olv_1 // pir_2$ em que o crescimento ficou restrito ao bloco de ágar transferido para o meio mínimo após sobreposição de crescimento de hifas das linhagens em meio completo. Este fato pode sugerir que os genes envolvidos sejam alelos.

5. DISCUSSÃO

5.1. Estabilidade

Como se verifica pela Tabela 6 e Figura 4 e 5, a linhagem 10V10 desenvolvida em meio mínimo evidencia setores de morfologia alterada. Através de microcolônias a ocorrência de setores pode ser novamente constatada indicando, se considerarmos que pelo menos parte das microcolônias sejam originadas de um único conídio, possível causa genética para o processo.

O único setor evidenciado em meio completo foi do tipo aconidial (sem conídios), que não foi encontrado em 300 setores desenvolvidos em meio mínimo.

Pode ser levantada hipótese de que os setores possam ser produzidos em meio completo sem que seja possível a sua evidenciação devido a ausência de vantagem seletiva que existiria em meio mínimo. Isto pode ser visualizado ao cons

tatarmos que extrato de levedura e peptona adicionados ao meio mínimo causam a estabilidade da linhagem (Ver Tabela 6).

Considerando, pelo menos a vantagem seletiva em meio mínimo, *BONATELLI e AZEVEDO (1974)* sugeriram como causa da ocorrência de setores a heterocariose, tendo em vista também, a presença de elevada porcentagem de conídios binucleados da linhagem cerca de 60% *(BARACHO e Col., 1975)*, que poderiam manter a condição heterocariótica.

Esta hipótese pode ser ainda reforçada devido à baixa viabilidade dos conídios da linhagem em meio mínimo (24,12%) em relação à observada quando conídios são semeados em meio completo. De acordo com a Tabela 11, os elementos que produzem viabilidade maior em meio completo são extrato de leveduras, peptona, solução de vitaminas e caseína hidrolisada. Nos dois primeiros casos pode ser notada ligeira elevação da viabilidade, coincidindo com o fato de serem responsáveis pela estabilização da linhagem quando adicionados ao meio mínimo. Este aspecto pode ser considerado como indicativo de presença no heterocário de um tipo de núcleo com deficiência nutricional cuja manutenção é possível devido ao outro tipo que é normal com relação a este aspecto.

Os dados de *HAAS e Col. (1956)* em *Penicillium chrysogenum* são bastante semelhantes aos encontrados no presente trabalho. A instabilidade nesse caso era constatada pela produção de setores em meio de lactose e licor de milho

(LCS), enquanto que a linhagem era estável em Czapek-Dox (CD) e "honey-peptone" ágar (HPA ou mel peptona ágar). Estes resultados lhes permitiram concluirem como causa da instabilidade a heterocariose da linhagem original que permanecia balanceada em CD e HPA e era quebrada em LCS.

Casos semelhantes são descritos em *Aspergillus niger* por *YUILL (1953)* e *NGA e Col. (1975)*. No primeiro caso, a instabilidade era melhor evidenciada devido à coloração diferencial dos setores, o que não ocorreu em nosso trabalho. No segundo caso, a causa da instabilidade foi atribuída ao fato da linhagem ser diplóide devido às características dos setores quanto a diâmetro de conídios, ação da *para*-fluorfenilalanina na linhagem original, à presença de setores auxotróficos e à incapacidade de serem obtidos mutantes auxotróficos na linhagem original.

Nos resultados constatados foi possível a obtenção de mutantes auxotróficos (ver ítem 5.3. da Discussão e Figura 3) o que diferencia dos dados de *NGA e Col. (1975)* tendo ainda que ser considerado que todos os setores isolados apresentaram crescimento em meio mínimo. Podemos então, pelo menos em princípio, rejeitar a hipótese de que a linhagem 10V10 seja diplóide.

Outro dado observado que diferencia os resultados do presente trabalho dos de *YUILL (1953)* vem a ser a dificuldade de isolamento dos setores devido à ausência de marca

morfológica, por exemplo, para coloração de conídios. Os setores isolados mostraram novamente instabilidade, i.é, produziram novos setores semelhantes aos constatados na linhagem original. Isto pode significar que os setores produzidos sejam apenas setores com taxa de crescimento ligeiramente melhor que a linhagem original que são selecionados em meio de cultura em que há restrição de crescimento como é o caso do meio mínimo e meio mínimo suplementado com hidrolisado de ácidos nucléicos, solução de vitaminas e caseína hidrolisada, que são meios aonde existe evidenciação de setores, de acordo com os dados das Tabelas 8 e 10 e, inclusive, pela menor viabilidade de conídios, que pode ser evidenciada principalmente em meio mínimo e meio mínimo suplementado com hidrolisado de ácido nucléico, de acordo com a Tabela 11.

Esta especulação tem apoio nos dados de *STEINBER (1939)* que evidenciou maior crescimento (medido em peso seco) em linhagem de *Aspergillus niger* com meios de cultura que foram suplementados com extrato de leveduras e peptona.

Os dados disponíveis permitem a elaboração de outras hipóteses, que são enumeradas abaixo: presença de genes mutadores, aberração cromossômica e inclusive, o envolvimento de fatores citoplasmáticos.

O objetivo maior de uma extensão do presente trabalho seria verificar a correlação possível entre a produção de setores e a instabilidade observada com relação à pro-

dução de ácido cítrico. A instabilidade observada, em condições indústriais, está relacionada com flutuações da produção entre diferentes câmaras de fermentação. Seria portanto, de utilidade, estudar uma possível correlação entre estes dois eventos o que poderia estabelecer um procedimento seletivo para a separação de linhagens com essas flutuações na produção, de outras mais estáveis. A possibilidade de que alta produção de ácido cítrico esteja associada com flutuações na produção também poderia ser ensaiada.

5.2. Produção de ácido cítrico

Os dados das Tabelas 14 e 15 resumem os experimentos conduzidos para determinação da produção de ácido cítrico da linhagem **10V10** e dos mutantes dela obtidos pelo uso de mutagênicos.

Como pode ser notado duas linhagens, no caso **tia**$_1$ e **pir**$_2$, superaram a linhagem **10V10** com relação à produção de ácido cítrico. As diferenças entre estas duas linhagens e a paternal revelaram ser não significativas quando comparadas pelo teste de médias (Ver Tabela 15). Deve no entanto, ser ressaltado, que o aumento da linhagem **tia**$_1$ foi de 29,13% em relação à **10V10** e, que, possivelmente, esta diferença não tenha sido significativa devido ao alto coeficiente de variação do experimento *(GOMES, 1970)*.

Casos em que mutantes auxotróficos superam a linhagem paternal em termos de produção são relatados por muitos autores, como é o caso dos dados extraídos de *DEMAIN (1972)* e que estão relacionados nas Tabelas 1 e 2, e os relatos de *ALIKHANIAN e Col. (1959)*, *ELANDER (1966, apud SERMONTI, 1969)*, e *SERMONTI (1969)* ao agrupar seus dados e os de *MAcDONALD e Col. (1963)*.

Os dados de *ALIKHANIAN e Col. (1959)* indicam que o fator primordial para o aumento de produção encontrado em linhagens de *Streptomyces rimosus* deficientes para metionina e nicotinamida, foi a quantidade da substância requerida pelos mutantes adicionada ao meio de fermentação.

O mesmo raciocínio pode ser considerado no caso dos mutantes com produção superior à linhagem 10V10, bastando que sejam observados os valores constantes dos ítens 3.2.9. e 3.2.10.

Esta hipótese poderia ser verificada com a adição ao meio de fermentação de quantidades menores das substâncias envolvidas, chegando-se até à quantidade adicionada em meio mínimo sólido que está no ítem 3.2.9. Outro caminho pode ser a verificação da influência de altas concentrações das substâncias adicionadas em meio de fermentação da linhagem 10V10.

Nos dados extraídos de *DEMAIN (1972)* pode ser encontrado outro caminho para explicar esta produção maior dos

mutantes. Envolveria vias biossintéticas relacionadas ou não ou, ainda, mutação dupla. Esta hipótese poderia ser testada com estudos de reversões dos mutantes como foi o caso de *MAcDONALD e Col. (1963)* com relação à influência de mutante para tiossulfato na produção de penicilina em *Penicillium chrysogenum*.

Pode ainda ser considerado que as duas possíveis causas discutidas estejam envolvidas concomitantemente. No caso da tiamina, isto parece mais evidente, pois *LEHNINGER (1975)* informa que a tiamina, na forma de pirofosfato, é grupo prostético da enzima desidrogenase do piruvato que age no passo I da decarboxilação oxidativa do piruvato para acetil-coenzima A e gás carbônico. É pois, parte importante na entrada dos carbohidratos via piruvato no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Esse ciclo é considerado como produtor do ácido cítrico acumulado pelos organismos que têm essa capacidade *(LOCKWOOD, 1975)*. Tendo em vista esses dados, poderíamos supor que a mutação para deficiência alterasse de tal maneira a síntese de tiamina que a presença de tiamina exógena, em grande quantidade, pudesse acelerar o processo levando a um acúmulo maior de ácido cítrico.

No caso do mutante pir_2 o envolvimento das duas causas também é válido, não havendo porém dados disponíveis que permitam a elaboração de hipótese melhor fundamentada.

Em *Aspergillus niger*, a produção de ácido cí-

trico por mutantes auxotróficos foi estudada principalmente por *MUSÍLKOVÁ e FENCL (1969)*, *ILCZÜK (1971)* e *CHANG e TERRY (1973)*. Relatos de aumento na produção são feitos por *MUSÍLKOVÁ e FENCL (1969)*, com relação a mutante deficiente para arginina com produção superior à linhagem paternal em 14%. Produções semelhantes à linhagem paternal são comuns aos três trabalhos, sendo interessante constatar que *ILCZUK (1971)* relata que os mutantes deficientes para piridoxina e tiamina obtidos produziram consideravelmente menos que a linhagem paternal, o que pode ser interpretado como genes diferentes envolvidos na deficiência e/ou quantidade pequena da substância adicionada ao meio de fermentação.

Os demais mutantes ensaiados no presente trabalho produziram quantidades inferiores à linhagem 10V10, sendo que dados semelhantes foram descritos em *Aspergillus niger* pelos autores citados acima. Na literatura consultada com relação a outros microrganismos dados deste tipo também são comuns, como é o caso dos de: *BONNER (1947)*, *FANTINI e OLIVE (1960)*, *FANTINI (1961)*, *ALIKHANIAN e BORISOVA (1961)* e outros, que podem ser encontrados no ítem 2.3.1.1.

Também pode ser observado que existe um grupo de mutantes cuja produção é inferior em cerca de 96% ou mais com relação ao controle, como é o caso dos mutantes pir_1 e seus derivativos (Ver Figura 3) e o mutante pur_1. Podemos considerar que para mutantes que a baixa produção constatada seja

devida a efeito drástico das marcas auxotróficas obtidas, como foi observado por *SERMONTI (1969)* e *MUSÍLKOVÁ e FENCL(1969)* com relação à adenina para a produção de penicilina e ácido cítrico, respectivamente, ou então, que os mutantes tenham sido induzidos em conídios que determinariam o aparecimento de linhagens com produção diminuída, que surgem espontaneamente na linhagem 10V10 *(BONATELLI Jr., dados não publicados)*.

Estas considerações podem ser levadas em conta quando verificamos que os dois mutantes deficientes para piridoxina, que são pir_1 e pir_2, apresentam produção de ácido cítrico bastante diferente. Dados semelhantes envolvendo produção diferente de mutantes com a mesma deficiência estão relatados por *MUSÍLKOVÁ e FENCL (1969)* em *A. niger* e *SERMONTI (1969)* em *P. chrysogenum*.

Um fato a ser ressaltado vem a ser a grande variação observada nas diversas repetições efetuadas com as linhagens (Ver Tabela 14). Este fato já foi observado por muitos autores, destacando-se no caso do *A. niger* os relatos de *GARDNER e Col. (1956)*, *PERLMAN e SIH (1960)*, *MILLIS e Col. (1963)* e *BONATELLI Jr. e AZEVEDO (dados não publicados)*. Existem ainda os dados de *BALL (1973)* em *P. chrysogenum*, que ressalta a falta de dados com respeito à ocorrência dessas variações. Este fato pode ter muitas explicações considerando a influência de pequenas diferenças entre as condições das repetições o que poderia indicar pequena homeostasia da linhagem, ou então, presença nas diversas repetições de diferentes por-

centagens de derivativos de baixa produção que podem surgir espontaneamente. Fato semelhante à segunda hipótese foi observado por *HAAS e Col. (1956)* em *P. chrysogenum* quando heterocários sintetizados de tipos segregantes da mesma linhagem estando não balanceados causavam diminuição na produção do segregante mais produtivo. Existem ainda os dados de *CIEGLER e RAPER (1957)* que estudando a possibilidade de aplicação de heterocários em fermentações comerciais concluíram que uma das dificuldades era a instabilidade dos heterocários. Hipótese de que o método usado na determinação de ácido cítrico possa ser a causa, pelo menos em parte, dessa variação não pode ser descartada.

Cabe ainda ressaltar a correlação positiva encontrada entre a produção e o título e, a correlação negativa entre peso seco e produção. Estes dados indicam a possibilidade de cálculo, em valor aproximado, da produção com dados de titulação do meio de fermentação e peso seco do micélio. Com a facilidade da obtenção de valores da titulação, estes dados poderiam ser usados para selecionar colônias com produção de ácido cítrico aumentada em programa de seleção que venha a ser conduzido com a linhagem 10V10.

Como principal consideração e final, um estudo envolvendo o isolamento de outros mutantes deficientes para tiamina poderia ser efetuado tendo em vista a potencialidade apresentada pelo mutante tia_1. Este estudo visaria possível uso deste tipo de mutante em condições industriais.

5.3. Tentativas de obtenção de diplóides

Cabe neste ítem consideração sobre os mutantes obtidos que estão demonstrados na Figura 3.

Os mutantes deficientes obtidos, com exceção de um duplo mutante, apresentaram deficiências que foram, através de auxanografia, classificadas como sendo para vitaminas. No caso do duplo mutante, derivado da linhagem pir_1, a deficiência pode ser suplementada com arginina.

Tentativas para obtenção de outros mutantes deficientes para aminoácidos não tiveram êxito. Novas tentativas deveriam ser feitas, mas, existe a possibilidade de que sejam letais na linhagem 10V10. Essa possibilidade deve ser melhor estudada. O relato de *ILCZUK (1971)* em *Aspergillus niger* assemelha-se bastante com o do presente trabalho uma vez que só são referidos mutantes deficientes para vitaminas, que no caso foram tiamina, piridoxina, niacina e ácido fólico. Certa semelhança pode ser observada no trabalho de *ALIKHANIAN e BORISOVA (1961)* com *Streptomyces aureofaciens*, em que a maioria dos mutantes obtidos foram deficientes para um único aminoácido, a arginina. No final, apenas mutantes deficientes para aminoácidos foram isolados, incluindo trabalho de *JÁRAI (1961, apud SERMONTI, 1969)*.

Considerando outros trabalhos com *Aspergillus niger*, existem descrições de mutantes para todos os grupos

de substâncias e que são encontrados nos trabalhos de *PONTECORVO (1952), PONTECORVO e Col. (1953a), LHOAS (1961, 1967), MUSÍLKOVÁ e FENCL (1969)* e *CHANG e TERRY (1973)*.

De acordo com esses resultados é possível, também, que a técnica empregada possa ter selecionado contra os possíveis mutantes deficientes para aminoácidos.

Na Tabela 5, está evidente a estabilidade dos mutantes pois, não foi obtida nenhuma reversão entre $4,6 \times 10^5$ a $1,52 \times 10^6$ conídios ensaiados para os diferentes mutantes.

As tentativas de obtenção de diplóides, de acordo com os dois métodos propostos, estão sumariadas nas Tabelas 18 e 19 e, evidenciam que dentro das condições usadas não houve desenvolvimento de nenhuma colônia que pudesse ser classificada como diplóide.

O método de *ROPER (1952)* usado no presente trabalho foi usado com sucesso em *Aspergillus niger* por *PONTECORVO (1952), PONTECORVO e Col. (1953a), LHOAS (1961 e 1967)* e *CHANG e TERRY (1973)*.

Diversas considerações podem ser feitas com relação a este evento, as quais discutiremos abaixo. O evento necessariamente não deve ser devido a apenas um dos fatores relacionados abaixo, pode ser inclusive a união de vários dos fatores expostos ou de todos, podendo inclusive não haver nenhum destes fatores envolvidos.

PRASAD (1970) ao estudar complementação de mutantes morfológicos para coloração de conídios em *Aspergillus niger* observou que certos grupos de mutantes, apesar de derivados da mesma linhagem, não formavam conidióforos com mistura de conídios quando 2 linhagens eram colocadas para formar heterocário. As hipóteses por ele levantadas podem ser consideradas no nosso caso, visto que não houve a formação de heterocários típicos como os observados em *Aspergillus nidulans*. Foram: a)incompatibilidade de mutantes, b)rara fusão de hifas ou c)fusão frequente, porém instável. Um destes fatores poderia ser o responsável pela ausência de colônias diplóides em alguns cruzamentos em que não houve o desenvolvimento de colônias heterocarióticas.

Outra consideração envolve os resultados de *CHANG e Col. (1974)* que observaram frequência de conídios heterocarióticos em cerca de 10^{-4} e de diplóides em cerca de 10^{-6} conídios provindos de heterocários de linhagem de *A. niger* por eles estudadas. Conforme relatado em nosso trabalho foi encontrado crescimento residual nas placas de meio mínimo usadas para a seleção de diplóides o que poderia ter mascarado o crescimento de colônias diplóides formadas possivelmente em menor número. Outro fato seria o crescimento de colônias heterocarióticas que poderia também prejudicar a visualização de diplóides formados.

Entre os novos estudos a serem desenvolvidos neste aspecto poderia ser incluído o uso de mutantes com duas

deficiências nutricionais que seriam prioritários como tática de trabalho no estudo da síntese de diplóides. Essas medidas visariam a introdução dos métodos de diploidização, hibridização e recombinação no melhoramento de linhagens utilizadas na produção em escala industrial de ácido cítrico.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi conduzido tendo como objetivos: 1) o estudo de características, em meios de cultura utilizados para a análise genética de *Aspergillus nidulans*, da linhagem 10V10 de *A. niger* utilizada em indústria, na tentativa de elucidar as causas da instabilidade na produção de ácido cítrico, 2) a produção de ácido cítrico dos mutantes auxotróficos e morfológicos induzidos com o uso da luz ultravioleta e da N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, e 3) a possibilidade de síntese de diplóides.

Foram evidenciados setores em meio mínimo mas não em meio completo. Mutantes auxotróficos deficientes para vitaminas, purinas e arginina foram obtidos, assim como, mutantes morfológicos com alteração na coloração de conídios. A produção de ácido cítrico dos mutantes auxotróficos e morfológi-

cos foi comparada com a produção da linhagem **10V10**. Os resultados obtidos indicaram aumento de 29,13% na produção de ácido cítrico no mutante com deficiência nutricional para a tiamina em relação à linhagem paternal, embora no experimento esta diferença não fosse significativa. Cruzamentos entre os mutantes auxotróficos e morfológicos foram feitos não tendo sido possível a obtenção de diplóides.

Tendo em vista os resultados obtidos, pode ser concluído o seguinte:

1) A linhagem **10V10** de *A. niger* evidenciou setores quando desenvolvida em meio mínimo, sendo que esta evidenciação não foi possível em meio completo. Os elementos responsáveis pela não evidenciação dos setores em meio completo são o extrato de levedura e peptona. A ampliação deste estudo deve ser feita visando estabelecer a importância do processo em outras linhagens produtoras de ácido cítrico.

2) A produção de ácido cítrico da linhagem original pode ser aumentada, diminuída ou permanecer inalterada com a introdução de marcas para auxotrofia. É sugerida a possibilidade da utilização do mutante **tia**$_1$ em condições indústriais.

3) A correlação entre titulação do meio de fermentação e a produção de ácido cítrico pode ser utilizada na seleção de linhagens mais produtivas.

4) E, dentro das condições dos experimentos, não foi possível a obtenção de diplóides nos cruzamentos entre os mutantes obtidos. As causas do evento são discutidas.

7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The present work was carried out with the industrial strain 10V10 of *Aspergillus niger* aiming: 1) the study of the characteristics of such strain in culture media normally utilized in genetic analysis in filamentous fungi in an attempt to detect the causes of instability during citric acid production, 2) the obtention of auxotrophic and morphological mutants induced by ultra-violet light and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and the study of the citric acid production from these mutants, and 3) the possibility of obtention of diploids in this strain.

Sectors were obtained on minimal medium but not on complete medium. Auxotrophic mutants for vitamins, purines and arginine were isolated, as well morphological mutants with altered conidial colour. Citric acid production

from auxotrophic and morphological mutants was compared with citric acid production from 10V10 strain. The obtained results have shown an increase in 29,13% in citric acid production from the tiamine defficient mutant in relation to the parental strain although such difference have been not statistically significant. Crosses between auxotrophic and morphological mutants were carried out but no diploids were obtained.

From the obtained results, the following conclusions can be drawn:

1) The non obtention of sectors on CM are due to the presence of yeast extract and peptone in such medium,

2) the citric acid production from auxotrophic strains can be increased, decreased or not affected depending of the auxotrophic marks used. It is suggested the possibility of use of a tiamine requiring mutant for industrial purposes,

3) the correlation found between titulation on fermentation media and citric acid production can be used for selection of more productive strains.

4) and, diploids were not formed utilizing the mutants obtained in the present research, at least in the conditions used. The causes of the failure are discussed.

8. BIBLIOGRAFIA

ADELBERG, E.A., M. MANDEL e G.C.C. CHEN, 1965. Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 18:*788-795.

ALIKHANIAN, S.I. e L.N. BORISOVA, 1961. Recombination in *Actinomyces aureofaciens*. *Journal of General Microbiology, 26:*19-28.

ALIKHANIAN, S.I., S.Z. MINDLIN, S.U. GOLDAT e A.V. VLADIMIZOV, 1959. Genetics of organisms producing tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences, 81:*914.

AZEVEDO, J.L., 1970. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: Derivatives from deteriorated variants. *Aspergillus Newsletter, 11:*21.

AZEVEDO, J.L., 1971. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. England, University of Sheffield, 240p. (Ph.D. Thesis).

AZEVEDO, J.L., 1976. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica, 2:*3-15.

AZEVEDO, J.L. e J.A. ROPER, 1970. Mitotic non-conformity in *Aspergillus*: sucessive and transposable genetic changes. *Genetical Research,* Cambridge, *16:*79-93.

BACKUS, M.P. e J.F. STAUFFER, 1955. The production and selection of a family of strains in *Penicillium chrysogenum*. *Mycologia, 47:*429.

BAINBRIDGE, B.W. e J.A. ROPER, 1966. Observations on the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology, 42:*417-424.

BALL, C., 1971. Haploidization analysis in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of General Microbiology, 66:*63-69.

BALL, C., 1973. Improvement of Penicillin productivity in *Penicillium chrysogenum* by recombination. *In: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN,* Eds. Genetics of Industrial microorganisms, vol. II. Amsterdan, Elsevier Publishing Co., pp.227-237.

BALL, C. e J.L. AZEVEDO, 1976. Genetic instability in parassexual fungi. *In: MAcDONALD, K.D.,* Ed. *Proceedings of the 2nd International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms.* New York, Academic Press, pp.243-251.

BONATELLI Jr., R. e J.L. AZEVEDO, 1974. Instabilidade em *A. niger*. *Relatório Científico do Instituto de Genética/ESALQ--USP, 8:*47-49.

BONNER, D., 1947. Studies on the biosynthesis of penicillin. *Archives of Biochemistry, 13:*1-25.

CHANG, L.T. e C.A. TERRY, 1973. Intergenic complementation of glucoamylase and citric acid production in two species of *Aspergillus*. *Applied Microbiology, 25:*890-895.

CHANG, L.T., C.A. TERRY e R.W. TUVESON, 1974. The influence of heterokaryotic conidia on the selective recovery of somatic diploids in *Aspergillus niger*. *Mycologia, 66:* 67-72.

CIEGLER, A. e K.B. RAPER, 1957. Application of heterokaryons of *Aspergillus* to commercial-type fermentations. *Applied Microbiology, 5:*106-110.

CLUTTERBUCK, A.J. e U.K. SINHA, 1966. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) as a mutagen for *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus Newsletter, 7:*12-13.

BARACHO, I.R., W.R. COELHO e M. KIMURA, 1975. Variações no número de núcleos em conídios de *Aspergilli* do grupo *niger*. *Ciência e Cultura, 27:*227.

COX, E.C., G.E. DEGNEN e M.L. SCHEPPE, 1972. Mutator gene studies in *Escherichia coli*: the **mut-s** gene. *Genetics, 72:*551-567.

DAS, A., 1972. Strain selection in citric acid fermentation - a review. *Current Science, 41:*593-596.

DAS, A., e P. NANDI, 1969. A new strain of *Aspergillus niger* producing citric acid. *Experientia, 25:*1211.

DAS, A. e P. NANDI, 1972. Specific effects of mutagens on *Aspergillus niger* in producing citric acid. *Folia Microbiologica, 17:*248-250.

DAWSON, G.W.P. e SMITH-KEARY, P.F., 1963. Epissomic control of mutation in *Salmonella typhimurium*. *Heredity, 18:*1-20.

DEMAIN, A.L., 1973. The marriage of genetics and industrial microbiology - after a long engagement, a bright future. *In: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN,* Eds. *Genetics of Industrial Microorganisms,* vol. I. Amsterdan, Elsevier Publishing Co., p.19-32.

DEMEREC, M., 1937. Frequency of spontaneous mutations in certain stocks of *Drosophila melanogaster*. *Genetics, 22:* 469-478.

DEMEREC, M., 1941. Unstable genes in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, 9:*145-150.

DITCHBURN, P., G. HOLT e K.D. MAcDONALD, 1976. The genetic location of mutations increasing penicillin yield in *Aspergillus nidulans*. *In: MAcDONALD, K.D.,* Ed. *Proceedings of the 2nd International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms.* New York, Academic Press, pp.213-227.

DOELGER, W.P. e S.C. PRESCOTT, 1934. Citric acid fermentation. *Industrial and Engineering Chemistry, 26:*1142-1149.

ELANDER, R.P., 1966. Potential application of concepts of microbial genetics in antibiotic producing microorganisms. *Induced Mutations and their utilization, Abh. deutch Akad. Wiss., Berlin. Apud: SERMONTI, G., 1969.* Genetics of Antibiotic-producing microorganisms. John Wiley e Sons, Ltd., London. 389pp.

EMERSON, R.A., 1914. The inheritance of somatic variation in variegated ear of maize. *American Naturalist, 48:*87-115.

FANTINI, A.A., 1962. Genetics and antibiotic production of *Emericellopsis* species. *Genetics, 47:*:161-177.

FANTINI, A.A., e L.S. OLIVE, 1960. Sexual recombination in a homothallic, antibiotic producing fungus. *Science, 132:* 1670.

FOSTER, J.W., e H. DAVIS, 1949. Detection and occurence of acid producing fungi. *Bulletin of the Torrey Botanical Club, 76:*174-176.

GARDNER, J.F., L.V. JAMES e S.D. RUBBO, 1956. Production of citric acid by mutants of *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology, 14:*228-237.

GOLDSTEIN, A. e J.S. SMOOT, 1955. A strain of *Escherichia coli* with an unusually high rate of auxotrophic mutation. *Journal of Bacteriology, 70:*588-595.

GOMES, F.P., 1970. Curso de Estatística Experimental. Gráfica Benetti Ltda., São Paulo. 430pp.

HAAS, F.L., T.A. PUGLISI, A.J. MOSES e J. LEIN, 1956. Heterokaryosis as a cause of culture rundown in *Penicillium*. *Applied Microbiology, 4:*187-195.

HANNAN, M.A., 1972. Variants of *Aspergillus niger* induced by gamma rays. *Indian Journal of Experimental Biology, 10:* 379-381.

ILCZUK, Z., 1968. Genetics of citric acid producing strains of *Aspergillus niger*. I- Citric acid synthesis by morphological mutants induced with UV. *Acta Microbiologica Polonica, 17:*331-336.

ILCZUK, Z., 1971. Genetyczne aspekty selekcji szczepów *Aspergillus niger* przydatnych w procesie syntezy kwasu cytrynowego. *Przemysl Fermentacyjny i rolny, 7:*15-19.

JAMES, L.V., S.D. RUBBO e J.F. GARDNER, 1956. Isolation of high acid-yielding mutants of *Aspergillus niger* by a paper culture selection technique. *Journal of General Microbiology, 14:*223-227.

JÁRAI, M., 1961. Genetic recombination in *Streptomyces aureofaciens*. *Acad. Sci. Hung., 8:*73. *Apud: SERMONTI, G., 1969.* Genetics of antibiotic-producing microorganisms. John Wiley e Sons Ltd., London. 389pp.

JINKS, J.L., 1966. Extranuclear Inheritance. *In: AINSWORTH, G.C. e SUSSMAN, A.S.,* Eds. *The Fungi,* vol. II, pp.619-660.

JOHNSTON, J.R., 1975. Strain improvement and strain stability in filamentous fungi. *In: SMITH, J.E. e D.R. BERRY,* Eds. *The Filamentous Fungi,* Vol. I. Edward Arnold Ltd., London. pp.59-78.

KÄFER, E., 1960. High frequence of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. *Nature, 186:* 619-620.

KÄFER, E., 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics, 46:*1581-1609.

KALYANI, S., P. NANDI e A.K. MISHRA, 1969. Transformation of nutricionally deficient mutants of *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology, 55:*195-200.

KRESLING, E.K. e E.A. STERN, 1935. Proc. Inst. Sci. Res. Food. Ind., 3:5. Apud: DAS, A., 1972. Strain selection in citric acid fermentation-a review. *Current Science, 41:*593-596.

LEHNINGER, A.L., 1975. Biochemistry, 2nd Ed. Worth Publishers, Inc., New York, 1104pp.

LOCKWOOD, L.B., 1975. Organic acid production. *In: SMITH, J.E. e D.R. BERRY,* Eds. *The Filamentous Fungi,* vol. I. Edward Arnold Ltd., London. pp.140-157.

LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with *para*-fluorphenylalanine. *Nature, 190:*744.

LHOAS, P. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in *Aspergillus niger. Genetical Research,* Cambridge, *10:* 45-61.

MAcDONALD, K.D., 1968. Degeneration of penicillin titre in cultures of *Penicillium chrysogenum. Nature, 218:*371-372.

MAcDONALD, K.D., 1972. Storage of conidia of *Penicillium chrysogenum* in liquid nitrogen. *Applied Microbiology, 23:* 990-993.

MAcDONALD, K.D., 1973. Genetics of penicillin production in *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans. In: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN,* Eds. *Genetics of Industrial Microorganisms,* vol. I. Elsevier Publishing Co., Amsterdan. pp.255-264.

MAcDONALD, K.D., J.M. HUTCHINSON e W.A. GILLETT, 1963a. Isolation of auxotrophs of *Penicillium chrysogenum* and their penicillin yields. *Journal of General Microbiology, 33:*365-374.

MAcDONALD, K.D., J.M. HUTCHINSON e W.A. GILLETT, 1963b. Formation and segregation of heterozygous diploids between a wild-type strain and derivatives of high penicillin yields in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of General Microbiology, 33:*385-394.

MAYNE, R.Y., J.W. BENNETT e J. TALLANT, 1971. Instability of an aflatoxin-producing strain of *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia, 63:*644-648.

McCLINTOCK, B., 1951. Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 16:*13-47.

McCLINTOCK, B., 1953. Induction of instability at selected loci in maize. *Genetics, 38:*579-599.

McCLINTOCK, B., 1956. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 21:* 197-216.

McCLINTOCK, B., 1965. The control of gene action in maize. *Brookhaven Symposia on Biology, 18:*162-182.

MERRICK, M.J., 1975a. Hybridization and selection for increased penicillin titre in wild-type strains of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology, 91:*278-286.

MERRICK, M.J., 1975b. The inheritance of penicillin titre in crosses between lines of *Aspergillus nidulans* selected for increased productivity. *Journal of General Microbiology, 91:*287-294.

MILLIS, N.F., B.H. TRUMPY e B.M. PALMER, 1963. The effects of lipids on citric acid production by an *Aspergillus niger* mutant. *Journal of General Microbiology, 30:*365-379.

MUSILKOVÁ, M. e Z. FENCL, 1970. Isolation of auxotrophic mutants of *Aspergillus niger* by ethylmethanesulphonate treatment. *Folia Microbiologica, 15:*34-39.

NEWMEYER, D., 1965. Somatic instability in *Neurospora* resulting from a pericentric inversion. *Genetics, 52:* 462-463.

NEWMEYER, D. e C.W. TAYLOR, 1967. A pericentric inversion in *Neurospora* with unstable duplication progeny. *Genetics, 56:*771-791.

NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1968. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics, 58:*193-209.

NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1969. A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research,* Cambridge, *14:*63-70.

NGA, B.H., S.P. TEO e G. LIM, 1975. The occurrence in nature of a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology, 88:*364-366.

PARRY, E.M. e B.S. COX, 1970. The tolerance of aneuploidy in yeast. *Genetical Research,* Cambridge, *16:*333-340.

PERLMAN, D. e C.J. SIH, 1960. Fungal synthesis of citric, fumaric and itaconic acids. *Progress in Industrial Microbiology, 2:*168-194.

PERLMAN, D., R.B. GREENFIELD e E. O'BRIEN, 1954. Degeneration of a *Streptomyces griseus* mutant on repeated transfer. *Applied Microbiology, 2:*199.

PETERSON, P.A., 1960. The pale green mutable system in maize. *Genetics, 45:*115.

POLSINELLI, M., A. ALBERTINI, G. CASSANI e O. CIFERRI, 1963. Relation of biochemical mutations to actinomycin synthesis in *Streptomyces antibioticus*. *Journal of General Microbiology, 33:*238-246.

PONTECORVO, G., 1952. Non-random distribution of multiple mitotic crossing-over among nuclei of heterozygous diploi *Aspergillus*. *Nature, 170:*204-205.

PONTECORVO, G. e E. KÄFER, 1958. Genetic analysis based on mitotic recombination. *Advances in Genetics, 9:*71-104.

PONTECORVO, G., J.A. ROPER e E. FORBES, 1953a. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology, 8:*198-210.

PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONS, K.D. MAcDONALD e A.W.J. BUFTON, 1953b. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics, 5:*141-238.

PONTECORVO, G. e G. SERMONTI, 1953. Recombination without sexual reproduction in *Penicillium chrysogenum*. *Nature, 172:*126-127.

PONTECORVO, G., E. TARR GLOOR e E. FORBES, 1954. Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Genetics, 52:*226-237.

PRASAD, I., 1970. Genetic analysis of the coloured mutants of *Aspergillus niger*. *Genetica*, Netherlands, *41:*388-398.

RAPER, K.B. e D.I. FENNELL, 1965. The genus *Aspergillus*. Williams e Wilkins Co., Baltimore, 686pp.

REUSSER, F., H.J. KOEPSELL e G.M. SAVAGE, 1961. Degeneration of *Streptomyces niveus* with repeated transfers. *Applied Microbiology, 9:*342-345.

RHOADES, M.M., 1941. The genetic control of mutability in maize. *Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology, 9:*138-144.

ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia, 8:*14-15.

SAFFRAN, M. e O.F. DENSTEDT, 1948. A rapid method for determination of citric acid. *Journal of Biological Chemistry, 175:*849-855.

SERMONTI, G., 1969. Genetics of antibiotic-producing microorganisms. John Wiley e Sons Ltd., London, 398pp.

SHAFFER, B., I. BREARLEY, R. LITTLEWOOD e G.R. FINK, 1971. A stable aneuploid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics, 67:*483-495.

SHU, P. e M.J. JOHNSON, 1947. Journal of Bacteriology, 54: 161. *Apud: PERLMAN, D. e C.J. SIH, 1960.* Fungal synthesis of citric, fumaric and itaconic acids. *Progress in Industrial Microbiology, 2:*168-194.

SILVA, J.C., 1977. Seleção e estabilização de *Aspergillus niger* para produção de ácido, através de radiação gama. Campinas, UNICAMP. 85p. (Tese de Mestrado).

SKAAR, P.D., 1956. A binary mutability system in *Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences,* USA, *42*:245-249.

SMITH-KEARY, P.F., 1958. An unstable mutation in *Salmonella typhimurium. Nature, 181:*1672.

STEINBERG, R.A., 1939. Relation of carbon nutrition to trace-elements and acessory requirements of *Aspergillus niger. Journal of Agricultural Research, 59:*749-763.

TREFFERS, H.P., V. SPINELLI e N.O. BELSER, 1954. A factor or mutator gene influencing mutation rates in *Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences,* USA, *40:*1064-1071.

TAVARES, F.C.A., 1974. Princípios do Melhoramento em função de parâmetros biométricos aplicados a *Saccharomyces uvarum* Beijerinck. Piracicaba, ESALQ. 100pp. (Tese de Doutoramento).

VON BORSTEL, R.C., S.K. QUAH, C.M. STEINBERG, F. FLURY e D.J.C. FOTTIEB, 1973. Mutants of yeast with enhanced spontaneous mutation rates. *Genetics Suplement, 73:* 141-151.

*WEHMER, C., 1893. Compt. Rend., 117:*332. *Apud: PERLMAN, D. e C.J. SIH, 1960.* Fungal synthesis of citric, fumaric and itaconic acids. *Progress in Industrial Microbiology, 2:*168-194.

YUILL, J.L., 1953. Culture study of an unstable strain of *Aspergillus niger. Journal of General Microbiology, 8:*a.

APÊNDICE

Tabela A_1 - Número e total de setores produzidos por inoculação da linhagem 10V10 em meio mínimo e meio completo.

Placa nº	Número de setores meio de cultura		Placa nº	Número de setores meio de cultura	
	MM	MC		MM	MC
01	2	0	25	0	0
02	4	0	26	2	0
03	6	0	27	3	0
04	5	0	28	4	0
05	0	0	29	0	0
06	0	0	30	3	0
07	3	0	31	2	0
08	3	0	32	0	0
09	4	0	33	6	0
10	4	1	34	2	0
11	3	0	35	1	0
12	0	0	36	3	0
13	4	0	37	3	0
14	0	0	38	2	0
15	5	0	39	4	0
16	0	0	40	0	0
17	5	0	41	0	0
18	1	0	42	5	0
19	1	0	43	1	0
20	3	0	44	3	0
21	0	0	45	0	0
22	1	0	46	0	0
23	5	0	47	0	0
24	1	0	48	1	0

(Continua)

- Continuação da Tabela A_1.

Placa nº	Número de setores Meio de cultura MM	MC	Placa nº	Número de setores Meio de cultura MM	MC
49	2	0	78	3	0
50	2	0	79	3	0
51	0	0	80	3	0
52	1	0	81	0	0
53	1	0	82	0	0
54	2	0	83	0	0
55	0	0	84	2	0
56	1	0	85	6	0
57	0	0	86	2	0
58	3	0	87	3	0
59	1	0	88	4	0
60	0	0	89	0	0
61	0	0	90	1	0
62	0	0	91	2	0
63	0	0	92	1	0
64	1	0	93	2	0
65	5	0	94	1	0
66	1	0	95	0	0
67	2	0	96	1	0
68	1	0	97	3	0
69	2	0	98	1	0
70	0	0	99	0	0
71	0	0	100	0	0
72	0	0	101	0	0
73	0	0	102	7	0
74	0	0	103	4	0
75	2	0	104	0	0
76	2	0	105	1	0
77	3	0	106	0	0

(Continua)

- Continuação da Tabela A_1.

Placa nº	Número de setores Meio de cultura MM	MC	Placa nº	Número de setores Meio de cultura MM	MC
107	0	0	136	5	0
108	1	0	137	3	0
109	1	0	138	4	0
110	2	0	139	4	0
111	2	0	140	3	0
112	1	0	141	2	0
113	1	0	142	1	0
114	5	0	143	2	0
115	4	0	144	1	0
116	4	0	145	2	0
117	3	0	146	2	0
118	3	0	147	1	0
119	1	0	148	1	0
120	5	0	149	1	0
121	3	0	150	1	0
122	2	0	151	3	0
123	4	0	152	2	0
124	1	0	153	2	0
125	1	0	154	2	0
126	2	0	155	1	0
127	1	0	156	1	0
128	0	0	157	2	0
129	0	0	158	1	0
130	2	0	159	2	0
131	2	0	160	1	0
132	3	0	TOTAIS	300	1
133	2	0			
134	3	0			
135	4	0			

Tabela A_2 - Número e total de setores produzidos por microcolônias da linhagem 10V10 em meio mínimo (MM) e meio completo (MC).

Placa nº	Número de setores Meio de cultura		Placa nº	Número de setores Meio de cultura	
	MM	MC		MM	MC
01	3	0	25	0	0
02	2	0	26	1	0
03	2	0	27	1	0
04	1	0	28	1	0
05	1	0	29	2	0
06	2	0	30	2	0
07	4	0	31	2	0
08	2	0	32	3	0
09	3	0	33	4	0
10	5	0	34	4	0
11	0	0	35	4	0
12	5	0	36	3	0
13	1	0	37	3	0
14	4	0	38	1	0
15	3	0	39	2	0
16	0	0	TOTAIS	83	0
17	0	0			
18	0	0			
19	0	0			
20	3	0			
21	2	0			
22	3	0			
23	2	0			
24	2	0			

Tabela A_3 - Cálculos efetuados para determinação da concentração de ácido cítrico em miligramas por mililitro do meio de fermentação de *DOELGER e PRESCOTT(1934)*.

Linhagens	Repetição	Transmitância	Diluição	Ácido cítrico total(mg/ml)
10v10	1	76	1:150	86,336
	2	76	1:150	86,336
	3	84	1:100	40,811
	4	76	1:150	86,336
	5	83	1:150	64,343
nic_1	1	82	1:150	67,222
	2	86	1:150	55,487
	3	89	1:150	46,752
	4	85	1:150	58,263
	5	80	1:100	48,995
pir_1olv_1	1	94	1:2	0,441
	2	87	1:2	0,700
	3	87	1:2	0,700
	4	93	1:2	0,478
	5	79	1:2	1,022
pab_1	1	76	1:100	57,558
	2	77,3	1:100	54,749
	3	72	1:100	66,538
	4	81	1:080	37,482
	5	74	1:100	61,925

(Continua)

- Continuação da Tabela A_3.

Linhagens	Repetição	Transmitância	Diluição	Ácido cítrico total (mg/ml)
pir_2	1	82	1:150	67,429
	2	77,7	1:150	80,578
	3	66	1:100	80,986
	4	72	1:110	73,192
	5	68	1:110	83,568
tia_1	1	84	1:100	40,811
	2	64,3	1:150	127,984
	3	67	1:100	78,422
	4	66	1:130	105,281
	5	69	1:160	117,722
pab_1fwn_1	1	76	1:110	63,313
	2	87,6	1:100	33,815
	3	86	1:100	38,842
	4	69,6	1:120	86,351
	5	66	1:100	80,986
pir_1	1	78	1:6	3,192
	2	93	1:6	1,434
	3	92	1:7	1,802
	4	88,3	1:6	1,950
	5	78,6	1:6	3,114

(Continua)

- Continuação da Tabela A_3.

Linhagens	Repetição	Transmitância	Diluição	Ácido cítrico total (mg/ml)
pir_1arg_1	1	87	1:2	0,700
	2	91	1:3	0,827
	3	100	s/d*	0
	4	100	s/d	0
	5	100	s/d	0
pur_1	1	100	s/d	0
	2	100	s/d	0
	3	100	s/d	0
	4	100	s/d	0
	5	100	s/d	0

*Amostra sem diluição para fazer a reação.

Tabela A_4 - Titulação do meio de fermentação e peso seco do micélio das linhagens.

Linhagem	Repetição	Título (ml de NaOH 0,1N)		Peso seco (mg)	
10V10	1	28,2		510	
	2	28,6		420	
	3	13,2		290	
	4	24,0		500	
	5	21,4	Média: 23,08	320	Média: 408
nic_1	1	22,2		420	
	2	17,4		360	
	3	19,0		360	
	4	12,2		400	
	5	7,8	Média: 15,72	370	Média: 382
pir_1olv_1	1	0,7		560	
	2	0,7		720	
	3	0,7		650	
	4	0,7		530	
	5	0,8	Média: 0,72	1340	Média: 760
pab_1	1	12,2		480	
	2	9,1		420	
	3	10,0		400	
	4	5,5		310	
	5	8,8	Média: 9,12	400	Média: 402

(Continua)

- Continuação da Tabela A_4.

Linhagem	Repeti-ção	Título (ml de NaOH 0,1N)		Peso seco (mg)	
pir_2	1	18,2		630	
	2	17,6		630	
	3	11,5		460	
	4	11,4		420	
	5	12,7	Média: 14,28	540	Média: 536
tia_1	1	10,0		310	
	2	27,5		890	
	3	10,5		370	
	4	15,7		500	
	5	18,7	Média: 16,48	800	Média: 574
pab_1fwn_2	1	14,0		570	
	2	7,8		370	
	3	8,9		480	
	4	19,8		630	
	5	11,5	Média: 12,4	550	Média: 520
pir_1	1	0,3		1130	
	2	0,9		840	
	3	0,7		1040	
	4	1,0		870	
	5	1,0	Média: 0,78	1110	Média: 998

(Continua)

- Continuação da Tabela A_4.

Linhagem	Repetição	Título (ml de NaOH 0,1N)		Peso seco (mg)	
pir_1arg_1	1	0,6		1100	
	2	0,7		1050	
	3	0,6		950	
	4	0,6		700	
	5	1,3	Média: 0,76	800	Média: 920
pur_1	1	0,5		440	
	2	0,8		560	
	3	0,2		1500	
	4	0,6		590	
	5	0,7	Média: 0,56	590	Média: 736