

# ESTUDOS GENÉTICOS E PRODUÇÃO DE PROTEÍNA UNICELULAR EM LEVEDURAS DO GÊNERO *Corula*

MARIA REGINA DE MELO CRUZ

Instituto de Pesquisas Tecnológicas  
Divisão de Química

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.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Maio, 1977

*Ao Antonio Augusto*

*Aos meus pais*

## AGRADECIMENTOS

Agora cumpre agradecer a colaboração dada por algumas pessoas, e aqui me permitirei um tom mais pessoal.

- Ao professor Dr. João Lúcio de Azevedo, cuja orientação tem vindo durante quase toda minha formação acadêmica, dirigem-se os principais agradecimentos. Na realização deste trabalho sua colaboração foi intensiva, sua amizade constante e em alguns lugares onde se lê o formal "nós", seu significado é Dr. João Lúcio e eu, a não ser nas partes (que espero não hajam) onde ocorrem eventuais enganos.
- Agradeço ao professor Dr. João Rubens Zinsly por ter dado o "primeiro empurrão" no meu encaminhamento para a área de Genética e Melhoramento de Plantas.
- Ao professor Dr. Roland Vencovsky, professor Natal Antonio Vello e colega Isaias Geraldi pelo auxílio prestado, na resolução dos problemas estatísticos.
- Ao professor Dr. Walter Borzzani pela oportunidade de trabalho e facilidades concedidas.
- À professora Dra. Sonia Machado de Campos Dietrich, pelo apoio e sugestões recebidas.

- Ao colega José Manuel Cabral de Souza Dias, pela atenção dispensada durante as análises do teor protéico das linhagens de *Torula utilis*.
- Aos muitos amigos de todos os momentos, especialmente Laudete Maria Bordignon, Yoko Bomura Rosato, Glória Maria de Toledo Morais e Aline Aparecida Pizzirani, meus reconhecimentos.
- Aos singulares, Antonio Rocha Campos e Salvador Peixe, além dos Srs. Luiz Próspero e Rodolfo Fulini pela amizade e auxílio.
- Ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas S/A pelas muitas facilidades.
- Agradeço ao Departamento de Genética, na pessoa de seu Diretor Dr. Ernesto Paterniani, **pelas** facilidades técnicas concedidas; ao Sr. Cleusval Bissi, pela eficiente e ótima datilografia, e ao Sr. José Broglio pelo esmerado serviço de impressão.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo, pela ajuda financeira, sem a qual tudo seria muito mais difícil.
- À Tia Landa, pela amizade com que me acolheu em sua casa e agradável convívio de tantos anos, e a vovó Avaiana pelo carinho que me dedicou, enquanto **estivemos juntas**.
- À minha mãe Cloris, cujas razões não precisam ser descritas aqui.
- Ao Antonio Augusto, pelos muitos anos de compreensão e espera.

## I N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO . . . . .	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. . . . .	04
2.1. Alguns aspectos relacionados com a utilização das leveduras ( <i>Torula</i> ) na alimentação animal e humana . . . . .	04
2.2. Alguns aspectos da genética em leveduras que podem ser transpostos para o gênero <i>Torula</i>	12
3. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	19
3.1. Origem das linhagens. . . . .	19
3.2. Meios de cultura. . . . .	21
3.3. Drogas e soluções utilizadas . . . . .	24
3.4. Ensaio . . . . .	27
3.4.1. Escolha das linhagens. . . . .	27
3.4.2. Curvas de crescimento. . . . .	28
3.4.3. Testes de produção para avaliação de biomassa . . . . .	29
3.4.4. Testes de produção para avaliação do teor protéico das linhagens. . . . .	30
3.4.5. Cálculo da porcentagem de proteína a partir dos valores de transmitância ou absorvância. . . . .	32

Página

3.4.6. Isolamento e classificação de linhagens de levedura do bagaço de cana de açúcar. . . . .	33
3.4.7. Determinação dos níveis de resistência . . . . .	35
3.4.8. Avaliação da sobrevivência das linhagens de <i>Torula utilis</i> às drogas. . . . .	38
3.4.9. Isolamento de mutantes resistentes à drogas . . . . .	38
3.4.10. Determinação da sobrevivência das colônias selvagens e mutantes resistentes à nistatina. . . . .	40
3.4.11. Crescimento das colônias selvagens e mutantes resistentes à nistatina . . . . .	40
3.4.12. Sobrevivência de células de <i>Torula utilis</i> à luz ultra-violeta . . . . .	41
3.4.13. Sobrevivência de células de <i>Torula utilis</i> em meio líquido adicionado de nistatina. . . . .	42
3.4.14. Isolamento de mutantes auxotróficos . . . . .	43
3.4.15. Caracterização dos mutantes auxotróficos. . . . .	44
3.4.16. Testes de cruzamento . . . . .	45
3.4.17. Análises estatísticas. . . . .	47

	<u>Página</u>
4. RESULTADOS. . . . .	48
4.1. Escolha das linhagens. . . . .	48
4.2. Curvas de crescimento . . . . .	61
4.3. Isolamento e classificação de linhagens de levedura do bagaço de cana de açúcar. . . . .	66
4.4. Obtenção de mutantes resistentes à drogas..	69
4.5. Tempo de geração das linhagens selvagem e resistentes à nistatina em meio completo:- meia vida relativa . . . . .	80
4.6. Sobrevivência de células de <i>Torula utilis</i> à luz ultra-violeta . . . . .	81
4.7. Sobrevivência de células de <i>Torula utilis</i> em meio líquido adicionado de nistatina . . . . .	84
4.8. Isolamento de mutantes auxotróficos. . . . .	87
4.9. Caracterização dos mutantes auxotróficos. . . . .	90
4.10. Testes de cruzamento. . . . .	95
4.10.1. Testes de cruzamento entre mutan- tes auxotróficos. . . . .	95
4.10.2. Testes de cruzamento entre mutan- tes resistentes à drogas. . . . .	97
4.11. Ensaio de produção. . . . .	98
4.11.1. Análise da produção celular das li- nhagens de <i>Torula</i> . . . . .	98
4.11.2. Análise da produção celular das li- nhagens de <i>Torula</i> , isoladas do baga- ço de cana de açúcar. . . . .	103

	<u>Página</u>
5. DISCUSSÃO . . . . .	114
5.1. Variabilidade natural em <i>Torula</i> . . . . .	115
5.2. Isolamento de mutantes. . . . .	118
5.3. Recombinação em <i>Torula utilis</i> . . . . .	126
6. RESUMO E CONCLUSÕES. . . . .	130
7. SUMMARY AND CONCLUSIONS. . . . .	132
8. BIBLIOGRAFIA CITADA. . . . .	134

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>		<u>Página</u>
01	- Linhagens de leveduras, utilizadas no presente trabalho, com as respectivas origens e procedências . . . . .	20
02	- Quantidade da solução estoque de nistatina (solução estoque = 35,7 mg/ml) e de meio completo de leveduras para se obter a concentração desejada da droga - teste de resistência das linhagens. . . . .	36
03	- Quantidade da solução estoque de cristal violeta (solução estoque = 1 mg/ml) e de meio completo de leveduras para se obter a concentração desejada da droga - teste de resistência das linhagens. . . . .	37
04	- Absorbância e massa celular (peso seco) de oito linhagens de <i>Torula utilis</i> . . . . .	49
05	- Ensaio de produção de oito linhagens de <i>Torula utilis</i> . Análise de variância para o caráter peso seco. Experimento Inteiramente Casualizado com duas repetições. . . . .	50
06	- Dados de pH e absorbância de <i>Torula utilis</i> , linhagens L1, L2, L3 e L4 obtidos por ensaios de produção em agitador constante. Valores médios de duas medidas. . . . .	52
07	- Dados de produção de matéria seca e proteína de <i>Torula utilis</i> , linhagens L1, L2, L3 e L4 obtidos por ensaios de produção com agitação constante. Valores médios de duas medidas . . . . .	53
08	- Ensaio de produção de quatro linhagens de <i>Torula utilis</i> . Análise de variância para o caráter peso seco. Blocos ao Acaso com 6 amostras e 4 linhagens. . . . .	57

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
09 - Ensaio de produção de quatro linhagens de <i>Torula utilis</i> . Análise de variância para o caráter produção de proteína (g/l). Blocos ao Acaso com 6 amostras e 4 linhagens. . . . .	58
10 - Ensaio de produção de quatro linhagens de <i>Torula utilis</i> . Análise de variância para o caráter porcentagem de proteína. Blocos ao Acaso com 6 amostras e 4 linhagens. . . . .	59
11 - Teste de Tukey para os caracteres: matéria seca (g/l), proteína (g/l) e % de proteína, das quatro linhagens de <i>Torula utilis</i> . . . . .	60
12 - Dados de absorbância, número de células viáveis e peso seco das linhagens L 1 e L 3 de <i>Torula utilis</i> . Os valores representam a média de duas repetições por amostra. . . . .	62
13 - Amostras de levedura, provenientes do bagaço de cana de açúcar e meios de cultura utilizados para a seleção . . . . .	66
14 - Amostras de levedura, selecionadas morfológicamente e submetidas ao zimograma dos açúcares. . . . .	67
15 - Zimograma dos hidratos de carbono das linhagens de levedura. . . . .	68
16 - Níveis de resistência das linhagens L 1 e L 3 (selvagens) de <i>Torula utilis</i> e das linhagens mutantes resistentes a 71,4 e 357 µg/ml de nistatina (m 71,4 e m 357). . . . .	70
17 - Níveis de resistência das linhagens L 1 e L 3 (selvagens) de <i>Torula utilis</i> e das linhagens mutantes resistentes a 2,5 e 3,5 µg/ml de cristal violeta (m 2,5 e m 3,5). . . . .	71
18 - Dados de sobrevivência de células de <i>Torula utilis</i> , linhagem L 1, a concentrações crescentes de nistatina. . . . .	73

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
19 - Dados de sobrevivência de células de <i>Torula utilis</i> , linhagem mutante resistente a 71,4 µg/ml de nistatina, a concentrações crescentes da droga. . . . .	74
20 - Dados de sobrevivência de células de <i>Torula utilis</i> , linhagem mutante resistente a 357 µg/ml de nistatina, a concentrações crescentes da droga. . . . .	75
21 - Dados de crescimento da linhagem L1 (selvagem) de <i>Torula utilis</i> , em meio completo. Os valores representam médias de duas repetições por amostra. . . . .	76
22 - Dados de crescimento de células de <i>Torula utilis</i> , linhagem mutante resistente a 71,4 µg/ml de nistatina, em meio completo. Os valores representam médias de duas repetições por amostra. . . . .	77
23 - Dados de crescimento de células de <i>Torula utilis</i> , linhagem mutante resistente a 357 µg/ml de nistatina, em meio completo. Os valores representam médias de duas repetições por amostra. . . . .	78
24 - Taxa de crescimento de três linhagens de <i>Torula utilis</i> . . . . .	80
25 - Valores do coeficiente de regressão linear (r) e da meia vida relativa (MVR) das linhagens de <i>Torula utilis</i> . . . . .	81
26 - Dados de sobrevivência da linhagem L1 de <i>Torula utilis</i> à irradiação com luz ultra-violeta (resultados de duas repetições). . . . .	82
27 - Dados de sobrevivência da linhagem L1 de <i>Torula utilis</i> , em meio líquido adicionado de nistatina (concentração de nistatina = 10 µg/ml). . . . .	85
28 - Dados de crescimento de <i>Torula utilis</i> em meio completo, meio mínimo e meio mínimo suplementado. . . . .	93

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
29 - Dados de crescimento de <i>Torula utilis</i> em meio mínimo suplementado com aminoácidos, vitaminas e ácidos nucléicos. . . . .	94
30 - Dados de crescimento de linhagens de <i>Torula utilis</i> , envolvidas em testes de cruzamento. . . . .	96
31 - Dados de crescimento de linhagens de <i>Torula utilis</i> , resistentes à drogas. . . . .	98
32 - Dados de absorvância e peso seco de linhagens de <i>Torula</i> . . . . .	101
33 - Ensaio de produção das linhagens de <i>Torula</i> . Análise de variância para o caráter absorvância (24 horas). Experimento Inteiramente Casualizado com duas repetições. . . . .	102
34 - Ensaio de produção das linhagens de <i>Torula</i> . Análise de variância para o caráter peso seco em g/l (24 horas). Experimento Inteiramente Casualizado com duas repetições. . . . .	102
35 - Ensaio de produção das linhagens de <i>Torula</i> . Análise de variância para o caráter peso seco em g/l (48 horas). Experimento Inteiramente Casualizado com duas repetições. . . . .	102
36 - Dados de produção de biomassa e proteína de três linhagens de <i>Torula</i> (médias de duas medidas por linhagem). . . . .	104
37 - Ensaio de produção de três linhagens de <i>Torula</i> . Análise de variância para o caráter matéria seca em g/l. Blocos ao Acaso com 9 amostras e 3 linhagens. . . . .	109
38 - Ensaio de produção de três linhagens de <i>Torula</i> . Análise de variância para o caráter proteína em g/l. Blocos ao Acaso com 9 amostras e 3 linhagens. . . . .	110
39 - Ensaio de produção de três linhagens de <i>Torula</i> . Análise de variância para o caráter % de proteína em relação à matéria seca. Blocos ao Acaso com 9 amostras e 3 linhagens. . . . .	111

Tabela

Página

40 - Teste de Tukey para os caracteres: matéria seca (g/l), proteína (g/l) e % de proteína, de três linhagens de <i>Torula</i> . . . . .	113
--	-----

## LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
01 - Produção de matéria seca: Linhagens L 1, L 2, L 3 e L 4 de <i>Torula utilis</i> . . . . .	54
02 - Produção de proteína (g/l): linhagens L 1, L 2, L 3 e L 4 de <i>Torula utilis</i> . . . . .	55
03 - Produção de proteína em % de peso seco: linhagens L 1, L 2, L 3 e L 4 de <i>Torula utilis</i> ..	56
04 - Curva de crescimento das linhagens L 1 e L 3 de <i>Torula utilis</i> (medida de absorvância) . .	63
05 - Curva de crescimento das linhagens L 1 e L 3 de <i>Torula utilis</i> (número de células viáveis)	64
06 - Curva de crescimento das linhagens L 1 e L 3 de <i>Torula utilis</i> (peso seco em g/l). . . . .	65
07 - Curvas de crescimento de três linhagens de <i>Torula utilis</i> . . . . .	79
08 - Sobrevivência da linhagem L 1 de <i>Torula utilis</i> à luz ultra-violeta . . . . .	83
09 - Sobrevivência da linhagem L 1, de <i>Torula utilis</i> , em meio líquido adicionado de nistatina. . .	86
10 - Detecção de mutantes auxotróficos: placa con trole com meio completo (esquerda) e placa com meio mínimo (direita). . . . .	88
11 - Detecção de mutantes auxotróficos: placa con trole com meio completo (esquerda) e placa com meio mínimo (direita). . . . .	89
12 - Produção de matéria seca (g/l) por três linhagens de <i>Torula</i> . . . . .	105
13 - Dados de absorvância de três linhagens de <i>Torula</i> , a diferentes tempos de cultivo . . . .	106

Figura

Página

14 - Produção de proteína (g/l) por três linhagens de <i>Torula</i> . . . . .	107
15 - Produção de proteína (%) em relação a matéria seca, por três linhagens de <i>Torula</i> . . . . .	108

## 1. INTRODUÇÃO

A carência de alimentos de alto valor nutritivo é um problema que se reveste de grande importância e que de longa data ameaça a vida das populações humanas. Para contornar este problema, grandes centros de pesquisa utilizam plantas cultivadas e animais domésticos visando o aumento dos níveis de produção através dos métodos de Genética e Melhoria vegetal e animal.

Além das fontes convencionais de produção de alimentos entretanto, surge uma nova possibilidade: a utilização de microrganismos como produtores de proteínas e vitaminas, cujos valores nutritivos assemelham-se muito, aos dos alimentos normalmente utilizados, nas dietas animal e humana.

O interesse no estudo dos microrganismos produtores de alimentos, não se limita ao aspecto produtividade, mas procura auxiliar a solução de outro grande problema deste século: a poluição ambiental. A esse respeito, os microrganismos agiriam como destruidores de resíduos da indústria e agricultura, que normalmente seriam desprezados pelo homem e que no entanto, podem ser transformados pela ação dos microrganismos em componentes altamente nutritivos.

Além das vantagens já citadas, acrescentam-se outras, inerentes aos microrganismos e citadas por *KIHLBERG (1972)*: os organismos em questão tem um tempo de geração muito curto, podendo fornecer rápidos aumentos de massa; os microrganismos podem ser facilmente modificados geneticamente, o seu crescimento e produtividade independem de mudanças climáticas e alta produtividade pode ser conseguida em espaços relativamente pequenos.

A matéria seca dos microrganismos, com altos teores de aminoácidos essenciais, está sendo utilizada em vários países do mundo, como suplementadora da dieta cereal dos animais, desde que, a maioria dos cereais componentes dessas rações possuem baixas concentrações dos principais aminoácidos.

Dentre os microrganismos que poderiam se adaptar a esses propósitos, destacam-se as leveduras, principalmente aquelas espécies da família *Cryptococaceae* e do gênero *Torula*

(HENNEBERG, 1926). A *Torula utilis*, por exemplo (INSKEEP, et alii, 1951) pode produzir substâncias com alto teor protéico e vitamínico.

As leveduras do gênero *Torula* tem um ciclo vital muito simples, pois não se conhece nas mesmas um estágio diplóide perfeito, além disso, conforme citação de FOWELL (1969) são organismos exclusivamente haplóides e desprovidos de um ciclo sexual, multiplicando-se simplesmente por brotamento.

De acordo com as considerações citadas, o presente trabalho teve como principais finalidades a verificação da variabilidade natural existente em linhagens do gênero *Torula* isoladas da natureza, quanto ao caráter produção de biomassa e a investigação, em *Torula utilis*, da possibilidade de existência de um sistema de recombinação. A ocorrência de uma variabilidade natural elevada permitiria a seleção de linhagens mais apropriadas para a produção de biomassa e a constatação de um sistema de recombinação possibilitaria o emprego de métodos genéticos racionais de melhoramento de microrganismos associados aos métodos mais empíricos baseados na obtenção de mutantes induzidos por agentes mutagênicos, para a produção de linhagens melhoradas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Alguns aspectos relacionados com a utilização das leveduras (*Torula*) na alimentação animal e humana

Os microrganismos, foram durante muitos anos conhecidos, pelos males que causavam aos outros seres vivos; entretanto, ao lado desses males, figuram os grandes benefícios que provêm da existência desses seres na terra, tais como: destruição de matéria orgânica, eliminação de materiais poluidores, uso medicinal (antibióticos) e atualmente o seu emprego nas dietas animal e humana.

Principalmente nos últimos anos, está existindo uma tendência para o desenvolvimento de microrganismos a partir de resíduos das indústrias e agricultura e a seguir,

usar estes microrganismos como fonte de proteínas (JOHNSON, 1967; GRAY e STAFF, 1967). Dentre os microrganismos utilizados para esta finalidade, salientam-se as leveduras, principalmente espécies do gênero *Torula* (MOORE, 1945; SPERBER, 1945; VON LOESECKE, 1946; AGARWAL, SINGH e PETERSON, 1947; JOHNSON, 1947; AGARWAL e PETERSON, 1949; THATCHER, 1954; DAWSON, 1965; JOHNSON, 1967; BHATTACHARJEE, 1970; SERZEDELLO, NUEVO MIGUEL, BARSANTE de CAMARGO e BARBIERI, 1970; KIHBERG, 1972).

A busca de novas fontes de produção de alimentos, além das convencionais, tem sido constante nos últimos anos, motivada não só pela falta de quantidade dos alimentos como também pela sua má qualidade e principalmente pelo aumento populacional cujo crescimento ultrapassou significativamente o suplemento alimentar mundial (BHATTACHARJEE, 1970).

Os microrganismos, são importantes como fonte potencial de alimentos, (BHATTACHARJEE, 1970), porque o material celular microbiano é especialmente rico na maioria das vitaminas do grupo B e em proteínas que contém aminoácidos essenciais. Além disso, conforme o mesmo autor, eles podem contribuir para o enriquecimento potencial das dietas deficientes desde que, suas proteínas são comparáveis com fontes proteicas convencionais como: ovos, leite, carne e peixe em termos de todos os padrões de nutrientes.

Foi verificado por CARTER e PHILLIPS (1944), que leveduras do gênero *Torula* apresentam um teor protéico em tor

no de 45 a 55% além de alto conteúdo de vitaminas. *FINK e JUST (1939)* argumentaram, que essas leveduras apresentam-se com alto conteúdo de aminoácidos essenciais no seu padrão protéico.

*VON LOESECKE (1946)*, considerou que, a princípio deve-se utilizar as leveduras, principalmente *Torula* sp, para suplementar deficiências de aminoácidos e vitaminas dos grãos de cereais. Além do seu alto conteúdo protéico, as leveduras são uma das fontes mais ricas de vitaminas do complexo B e contém ~~grandes quantidades de minerais~~ essenciais.

*DAWSON (1965)* em sua revisão, salientou que as leveduras poderão no futuro, substituir a proteína animal, e contribuir satisfatoriamente para a melhoria da nutrição animal e mais tarde, humana.

Foi observado por *KUSHIGE, TAKEUCHI e IWASA (1964)* que a *Torula utilis*, apresentou-se com o mais alto conteúdo de lipídeos entre 10 espécies diferentes de leveduras, que foram ensaiadas.

*FINK, LECHNER e HEINRICH (1936)* verificaram que a *Torula utilis*, pode produzir grandes quantidades de gorduras em curtos períodos de crescimento. *HILDICH e SHRIVASTAVA (1948)* indicaram que a gordura de leveduras é semelhante a outras gorduras vegetais, exceto que, ela foi relativamente inferior em ácido hexadecanóico.

*THATCHER (1954)*, apresentou uma revisão sobre

as substâncias de valor nutricional produzidas pelas leveduras e sua contribuição na suplementação dos alimentos que apresentam deficiências específicas.

*KIHLBERG (1972)*, em recente revisão sobre o assunto salientou que, as leveduras são muito ricas em vitaminas B e apresentam um alto conteúdo do aminoácido lisina, que existe em quantidades muito baixas nas dietas cereais.

*BHATTACHARJEE (1970)* salientou que, dentre os microrganismos existentes, as leveduras apresentavam a maioria das características favoráveis para serem usadas preferencialmente como fonte de alimentos. O mesmo autor salientou, que durante a II.<sup>a</sup> Guerra Mundial a Alemanha incorporou cerca de 26.000 toneladas de *Torula utilis*, por ano, na alimentação do seu povo. A *Torula utilis* tem sido a espécie mais comumente utilizada nos dias de hoje, não somente pelo seu alto conteúdo protéico (cerca de 45-55% do peso seco) como pela sua habilidade em utilizar materiais baratos e residuais e pela sua rápida taxa de crescimento, palatibilidade e falta de patogenicidade.

De acordo com *MOORE (1945)*, a *Torula utilis* foi utilizada pela primeira vez pelos alemães em 1915; é mais palatável que a levedura da cerveja e tem um valor alimentar semelhante a esta. O autor acrescentou que, essa levedura poderia primeiramente ser usada em três direções: a) no tratamento de deficiências de vitaminas do complexo B, b) como fon

te indireta de alimento para o homem, sendo acrescentada em bolos, concentrados de porcos, galinhas, etc., e c) nos períodos de falta de alimentos de valor nutricional.

Além do alto valor alimentar *KIHLBERG (1972)* descreve outra grande vantagem do uso de leveduras na alimentação, que é a sua capacidade em utilizar como substrato, resíduos de indústria e agricultura de baixo custo que contribuem para a poluição ambiental. Vários substratos podem ser considerados tais como: resíduos rijos, melaços, resíduos do processamento de frutas, sôro de leite, resíduos de indústrias de fermentações alcoólicas, hidrolizados de celulose, material de esgoto além de hidrocarbonetos como a gasolina, alcanos refinados, gás natural e metano.

O próprio *KIHLBERG*, na sua revisão de 1972, calculou que uma quantidade de proteína equivalente ao requisito protéico de toda a população, poderia ser produzida usando 15 - 20% da produção de petróleo anual como um substrato para crescimento microbiano.

*AGARWAL e PETERSON (1949)*, trabalhando com leveduras alimentares verificaram que, a *Torula utilis*, foi a espécie que apresentou melhor produção celular, em substrato de melaço composto de outras fontes de carbono, que não o açúcar. Durante a II.<sup>a</sup> Guerra Mundial, os alemães haviam empregado a *Torula utilis* e outras espécies de leveduras como suplemento alimentar e tinham verificado que esses microrganismos

mos podiam usar pentoses residuais, ácido acético e outros compostos orgânicos presentes nos restos de fermentação alcoólica, para o seu desenvolvimento.

*DAWSON (1965)* em sua revisão, citou uma série de experimentos de crescimento de leveduras, sobre vários substratos principalmente restos de produção.

Estudos sobre obtenção de levedura alimentar em substratos de vinhaça, foram feitos por *SERZEDELLO, NUEVO MIGUEL, BARSANTE DE CAMARGO e BARBIERI (1970)*. A levedura usada foi a *Torula utilis* e os resultados obtidos mostraram que a vinhaça, adicionada de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (0,1%) pode ser um ótimo substrato para produção de massa celular e proteína por essa espécie de levedura. Além disso, os mesmos autores consideraram que a vinhaça adicionada do seu próprio resíduo autolizado poderia melhorar em 50% a sua capacidade alimentadora para *Torula utilis*.

*TAUK (1976)* estudando também produção de proteína por *Torula utilis*, sobre substrato de vinhaça verificou que, essa levedura pode produzir cerca de 32% de proteína sobre esse substrato, além de apresentar algumas vantagens em relação a outras espécies tais como ser pouco exigente e ter um crescimento muito rápido.

*JOHNSON (1967)* considerou que, as leveduras são organismos capazes de utilizar hidrocarbonetos, principalmente

alcanos, como substrato, para obtenção de altas produções celulares. Salientou que, nos Estados Unidos tem-se produzido em escala industrial, massa celular de leveduras do gênero *Torula*, crescidas em resíduos industriais de bebida alcoólica, para suplementar dietas animais.

*WILEY, DUBEY, LUECK e HUGHES (1950)* descreveram o conteúdo de gordura, proteína, fibra, carboidrato, vitaminas B, cálcio, fósforo e cinza de *Torula utilis*, crescendo sobre polpa de indústria de madeira e outros resíduos industriais. Foi notada, uma produção significativamente alta de vitaminas, por esses organismos.

Foi *EHRENSVÄRD (1948)* que, trabalhando com *Torula utilis* verificou a marcante adaptabilidade dessa espécie de leveduras a uma diversidade de substratos.

*THATCHER (1954)*, em sua revisão sobre alimentos de fungos, descreveu uma série de trabalhos que trataram de substratos usados para produção de alimento microbiano. A esse respeito, foram citados como substrato para leveduras: restos de queijaria e soro, resíduos de bebida alcoólica, hidrolizado de madeira, melão e resíduos da agricultura. Nos experimentos, nos quais esses substratos foram utilizados, a *Torula utilis* foi considerada a espécie mais produtiva.

Com relação a produção de proteínas por microrganismos, *KIHLBERG (1972)* apresentou uma brilhante revisão

são, detalhando as vantagens do uso dos microrganismos na ali mentação; a produção de proteína usando materiais de baixo custo e os modelos de produção em grande escala.

Também *BHATTACHARJEE (1970)*, salientou em sua revisão sobre o assunto, que na Inglaterra cêrca de 30.000 toneladas de leveduras desenvolvidas sobre resíduos de cervejaria, são usadas anualmente para alimentação animal, extratos de leveduras, e suplementação de dietas.

*AGARWAL, SINGH e PETERSON (1947)* estudaram as produções de quatro espécies de leveduras cujos substratos foram: melação de cana e beterraba. Os resultados obtidos, mostraram que a *Torula utilis* foi a espécie mais produtiva, sendo que o seu teor protéico esteve ao redor de 52%, além de apresentar um alto conteúdo de vitaminas do complexo B.

*GRAHAM et alii (1976)* estudando produção de proteína por três diferentes espécies de fungo, verificaram que o pH do meio, a temperatura de incubação, a concentração de esporos e o tempo de incubação, influem no crescimento microbiano e na produção de proteína unicelular.

Naturalmente, mais pesquisas serão necessárias visando transformar a produção microbiana em alimentos aceitáveis e adequados para o uso nas dietas **animais** e **humanas** (*KIHLBERG, 1972*) mas, os dados confirmam a certeza de que, um novo horizonte se abre para a solução do problema da fome, que

existe em muitos países do globo terrestre.

Uma perfeita revisão sobre o assunto poderá ser encontrada em *TAVARES (1974)* que focaliza a questão sob dois aspectos principais: a) produção de alimento protéico por microrganismos visando o seu emprego na alimentação humana, as espécies e substratos mais adequados para produção de biomassa e b) considerações sobre o melhoramento das espécies microbianas, a exemplo do que se faz nas plantas e animais superiores.

## 2.2. Alguns aspectos da genética em leveduras que podem ser transpostos para o gênero *Torula*

As leveduras da família *Cryptococcaceae* e do gênero *Torula*, tem um ciclo vital muito simples pois não se conhece nas mesmas, um estágio diplóide perfeito; essas leveduras são exclusivamente haplóides e desprovidas portanto de um ciclo sexual, multiplicando-se simplesmente por brotamento (*FOWELL, 1969*). Segundo *SATAVA (1934)* a *Torulopsis*, por exemplo, seria uma levedura haplóide derivada do gênero *Saccharomyces*, idéia esta que foi aceita ainda por *WINGE e LAUSTSEN (1937)* e *LINDEGREN e LINDEGREN (1943)*.

Portanto, quase nada se conhece sobre a genética da *Torula*, especialmente da *Torula utilis* que é uma das es

pécies mais valiosas, para ser usada como produtora de proteínas e vitaminas (BATTACHARJEE, 1970; AGARWAL, SINGH e PETERSON, 1947). Sabe-se no entanto, que a ausência de um estágio sexual nestas leveduras, é um obstáculo ao seu melhoramento genético e portanto, há necessidade de se encontrar na *Torula utilis*, algum processo de recombinação genética para melhoria das qualidades da espécie, à semelhança do ciclo parassexual que ocorre em *Aspergillus* (revisto por AZEVEDO, 1972) ou do tipo transformação, que ocorre em bactérias e algumas espécies de leveduras (OPPERNOORTH, 1962).

Alguns estudos genéticos começam a surgir, com a *Torula utilis*, mas são fragmentários e por esta razão os métodos básicos são aqueles geralmente usados para outras leveduras mais bem estudadas geneticamente como *Saccharomyces cerevisiae* (MORTIMER e HAWTHORNE, 1969). Nessa espécie, REAUME e TATUM (1949) encontraram uma quantidade de mutantes equivalente a 10% do total de células tratadas com nitrogênio mostarda. Foi notado, no entanto, que as colônias mutantes apresentavam mais que uma deficiência bioquímica e os requisitos dessas linhagens para aminoácidos simples, vitaminas, purinas e pirimidinas eram raramente absolutos. Também outros mutagênicos tais como a luz ultra-violeta (POMPER e BURKHOLDER, 1949) foram usados para obtenção de mutantes deficientes nutricionais de linhagens haplóides de *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, métodos seletivos são altamente eficientes na obtenção de mutantes. Assim, MOAT, PETERS e SRB (1957) usaram

o antibiótico nistatina, que tem a mesma ação seletora de mutantes que a penicilina em bactérias (revisto por *ADELBERG e MYERS, 1953*). A nistatina é usada como seletora de mutantes causando uma remoção seletiva ou morte das células que crescem no meio mínimo, em relação aos mutantes, que não crescem nesse meio. *SNOW (1966)* trabalhando com uma levedura, *Saccharomyces cerevisiae* e tratando as células com o mutagênico etilmetano-sulfonato e o antibiótico nistatina, isolou 10% de células mutantes e considerou que o método usado com a nistatina era análogo àquela da seleção de mutantes pelo uso da penicilina em bactérias.

*CIRILLO, HARSCH e LAMPEN (1964)*, estudando o efeito de antibióticos polienos, sobre a membrana celular de leveduras, verificaram que a nistatina em baixas concentrações, afeta a integridade da membrana o que resulta em defeitos de permeabilidade relativamente específicos; a altas concentrações a nistatina causa a destruição da membrana celular.

*STACHIEWICZ e QUASTEL (1963)*, descreveram a nistatina como sendo um polieno produzido por *Streptomyces noursei*; salientaram que a nistatina inibiu o crescimento da maioria dos fungos em concentrações de 1 - 10 µg/ml, mas que não teve efeito sobre bactérias ou células animais.

*LAMPEN, MORGAN, SLOCUM e ARNOW (1959)*, verificaram que a nistatina é absorvida pelos organismos que são sensíveis a sua ação e essa absorção parece ter duas fases: a) uma

que é a penetração ou ataque a célula e que é dependente de energia, do pH e da concentração de nistatina de fora e b) uma forte ligação aos constituintes celulares, que é relativamente estável ao calor e é **revertida** com muita dificuldade.

*MARINI, ARNOW e LAMPEN (1961)*, evidenciaram que a nistatina, em concentrações acima de 5 µg/ml afetam a membrana celular produzindo um rápido aumento na permeabilidade da célula à pequenos íons.

*KINSKY (1961)*, sugeriu que a toxicidade seletiva dos polienos para fungos e algumas algas poderia ser devida a um único componente da membrana desses organismos que, especificamente se combinaria com os antibióticos polienos.

*PANIKER, KURUP e INDIRA DEVI (1963)*, trabalhando com diferentes espécies de *Candida* verificaram que, a concentração mínima inibitória de nistatina (concentração essa, que prevenia visíveis crescimentos) para todas as espécies ensaiadas foi igual ou menor que 40 unidades/ml.

*BODENHOFF (1969)*, estudando resistência de linhagens dos gêneros *Candida* e *Torulopsis* a antifúngicos, verificou que a concentração mínima inibitória para as linhagens foi de 30 unidades/ml para o antibiótico nistatina.

*CAMPOS (1973)* apresentou, uma importante revisão sobre o assunto e encontrou que os níveis de resistência das linhagens de *Candida albicans* a nistatina, variaram de

1,0 a 50 µg/ml.

Muitos mutantes resistentes a drogas, são usados para estudos genéticos e *BRYSON e SZYBALSKY (1952)*, trabalhando com bactérias desenvolveram a técnica da placa gradiente, que facilitou grandemente a obtenção de mutantes resistentes, através de sucessivas passagens do microrganismo em estudo, em concentrações crescentes da droga. Essa técnica, aplica-se muito bem a outros fungos e leveduras.

*BODENHOFF (1969)* estudando leveduras dos gêneros *Candida* e *Torulopsis* obteve mutantes resistentes a nistatina usando a técnica da placa gradiente.

*CAMPOS (1973)*, apresentou uma revisão sobre mutantes de levedura resistentes a drogas e selecionou colônias resistentes até a concentração de 200 µg/ml de nistatina; salientou ainda, que o modelo de resistência a essa droga era de múltiplos passos. Nesse mesmo trabalho, a autora revisou e discutiu aspectos relacionados com o crescimento de células selvagens e resistentes a nistatina e competição entre essas células, verificando que, em um meio de cultura ausente da droga, as colônias selvagens apresentaram crescimento mais exuberante que as mutantes resistentes.

Resultados semelhantes, foram descritos por *BERGAMIN FILHO (1973)*, que comparou o crescimento de linhagens de *Corynebacterium michiganense*, selvagens e mutantes

resistentes a antibióticos.

Também o corante cristal violeta (*BIER, 1965*) pode ser usado para obtenção de mutantes resistentes a drogas em leveduras. A esse respeito, *PELCZAR e REID (1966)* comentaram que essa droga, na diluição de 1:10.000 era letal para os fungos dos gêneros *Monilia* e *Torula* e na diluição de 1:1000000 era inibitória para esses microrganismos. Segundo os mesmos autores, parece que os corantes atuam nos microrganismos através da combinação com as proteínas celulares, produzindo alterações nocivas às células.

Os estudos de cruzamentos genéticos entre células haplóides, para obtenção de heterozigotos ou células diplóides estão muito avançados em certas espécies de leveduras, particularmente em *Saccharomyces cerevisiae* (*MORTIMER e HAWTHORNE, 1969*). Entretanto, nas outras espécies, principalmente *Torula utilis*, esses estudos são mais raros e tem se baseado principalmente no fenômeno da transformação.

*OPPERNOORTH (1960)*, trabalhando com *S. carlsbergensis*, que tinha capacidade de fermentar certos açúcares e usando preparações de ácido nucléico dessa espécie, transformou células de *S. cerevisiae* que não fermentavam os referidos açúcares em células capazes de fermentá-los.

*KHAN e SEN (1974)*, estudaram transformação em três espécies de leveduras: *S. cerevisiae*, *Candida* e *Hansenula*.

As células doadoras se diferenciavam das receptoras pela capacidade de crescer em determinado substrato, e os experimentos foram feitos expondo as células receptoras a 10 µg de DNA/ml, por 30 minutos a 30°C e sob condições de agitação aeróbica. Os resultados obtidos, mostraram que, células de *C. lipolytica* transformaram células de *C. utilis* e vice-versa; células de *S. cerevisiae* transformaram células de *S. aceti*, *S. mellis* e *S. oleaceus* e células de *H. petersonii* transformaram células de *H. jadinii*. Portanto, evidenciou-se com esse trabalho que, DNA exógeno pode transformar células receptoras de leveduras, transmitindo a essas células certas características, a exemplo da transformação que ocorre em bactérias.

Quanto aos aspectos relacionados com o melhoramento de leveduras, à semelhança do que é feito comumente em plantas e animais superiores, uma excelente revisão é encontrada em TAVARES (1974) que, estudando produção celular da levedura *Saccharomyces uvarum*, planejou os ensaios de produção segundo o delineamento estatístico em blocos ao acaso com três repetições e utilizou os métodos de "seleção entre colônias" e "entre e dentro de linhagens" concluindo que nessa espécie existe uma grande variabilidade natural que deve ser aproveitada em qualquer programa de melhoramento. Argumentou finalmente, que os princípios do melhoramento em função de parâmetros biométricos, poderão ser muito bem usados para os microrganismos a exemplo do que já acontece em outros organismos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Origem das linhagens

Foram utilizadas oito linhagens de *Torula utilis*, (*Candida utilis*; *Torulopsis utilis*) provenientes do estoque do Instituto de Medicina Tropical - São Paulo, e mais quatro linhagens de leveduras, não classificadas, isoladas de bagaço de cana-de-açúcar da Usina Monte Alegre do Município de Piracicaba - São Paulo. As linhagens usadas, estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Linhagens de leveduras, utilizadas no presente trabalho, com as respectivas origens e procedências.

Linhagens	Origem	Espécie	Procedência
L 1	477	<i>Torula utilis</i>	Instituto de Medicina Tropical (USP)
L 2	806	<i>Torula utilis</i>	Instituto de Medicina Tropical (USP)
L 3	702	<i>Torula utilis</i>	Instituto de Medicina Tropical (USP)
L 4	253	<i>Torula utilis</i>	Instituto de Medicina Tropical (USP)
L 5	Tu	<i>Torula utilis</i>	Instituto de Medicina Tropical (USP)
L 6	Tu	<i>Torula utilis</i>	Instituto de Medicina Tropical (USP)
L 7	3016	<i>Torula utilis</i>	Instituto de Medicina Tropical (USP)
L 8	3017	<i>Torula utilis</i>	Instituto de Medicina Tropical (USP)
L 9	1	<i>Torula sp</i>	Usina Monte Alegre (Piracicaba)
L 10	2	<i>Torula sp</i>	Usina Monte Alegre (Piracicaba)
L 11	3	<i>Torula sp</i>	Usina Monte Alegre (Piracicaba)
L 12	4	<i>Torula sp</i>	Usina Monte Alegre (Piracicaba)

### 3.2. Meios de cultura

Os seguintes meios de cultura foram utilizados:

#### Meio Completo (*REAUME e TATUM, 1949*)

Extrato de levedura. . . . .	5,0 g
Peptona . . . . .	3,0 g
Glucose. . . . .	10,0 g
Ágar . . . . .	15,0 g
Água destilada . . . . .	1 litro

O pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 4% ou HCl 1N. Este meio, foi usado para manutenção das linhagens no estoque, para crescimento das culturas e o mesmo meio, líquido (sem ágar), foi usado para ensaios de produção de biomassa.

#### Meio Mínimo (*REAUME e TATUM, 1949*)

Glucose. . . . .	20,0 g
Asparagina . . . . .	2,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O . . . . .	0,5 g
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O . . . . .	0,3 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . . . .	2,0 g
KI . . . . .	0,1 g
Biotina. . . . .	10,0 µg
Piridoxina . . . . .	1,0 mg
Pantoteno de cálcio. . . . .	1,0 mg
Ácido p-aminobenzóico. . . . .	1,0 mg
Inositol . . . . .	1,0 mg
Tiamina. . . . .	1,0 mg
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> . 10 H <sub>2</sub> O . . . . .	0,01 mg

MnSO <sub>4</sub> . . . . .	0,02 mg
ZnSO <sub>4</sub> . . . . .	2,0 mg
CuSO <sub>4</sub> . . . . .	0,1 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> . 4 H <sub>2</sub> O . . . . .	0,02 mg
FeSO <sub>4</sub> . . . . .	0,2 mg
Ágar . . . . .	15,0 g
Água destilada. . . . .	1 litro

O pH foi ajustado para 5,6 com NaOH 4% ou HCl 1N. Este meio, foi usado para detecção de colônias mutantes e o mesmo meio, líquido (sem ágar), se prestou a ensaios de produção de biomassa.

Meio de Pijper - Meio Ácido (*JOLY, 1954*)

Peptona . . . . .	10 g
Extrato de carne. . . . .	5 g
Água destilada. . . . .	1 litro

O pH foi ajustado para 3,8 com NaOH 4% ou HCl 1N. Este meio, foi usado para eliminar contaminação por bactérias que são inibidas em meio ácido.

Meio de Malte (*LILLY e BARNETT, 1951*)

Extrato de malte . . . . .	20 g
Extrato de levedura. . . . .	2 g
Ágar . . . . .	15 g
Água destilada . . . . .	1 litro

O pH foi ajustado para 5,0 com NaOH 4% ou HCl 1N.

Este meio foi utilizado, para o isolamento de leveduras do gênero *Torula*, de bagaço de cana de açúcar.

Meio de Ágar Sabouraud Dextrose (*BEECH e DAVENPORT, 1971*)

Peptona micológica. . . . .	10 g
Dextrose . . . . .	40 g
Ágar . . . . .	20 g
Água destilada. . . . .	1 litro

O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 4% ou HCl 1N.

Este meio foi utilizado, para se fazer isolamento de leveduras, do gênero *Torula*, de bagaço de cana de açúcar.

Meio de Açúcar (*BEECH e DAVENPORT, 1971*)

Sulfato de amônia . . . . .	5 g
Açúcar refinado . . . . .	10 g
Fosfato de potássio monobásico. . . . .	1 g
Sulfato de magnésio . . . . .	0,5 g
Cloreto de sódio. . . . .	0,1 g
Cloreto de cálcio . . . . .	0,1 g
Extrato de levedura . . . . .	2,0 g
Água destilada. . . . .	1 litro

O pH foi ajustado para 5,0 com NaOH 4% ou HCl 1N.

Este meio foi utilizado, para se fazer isolamento de leveduras, do gênero *Torula*, de bagaço de cana de açúcar.

Todos os meios de cultura, foram esterilizados em autoclave por 15 minutos, à pressão de 1 atmosfera e à temperatura de 120<sup>o</sup>C. A temperatura de incubação em todos os experimentos foi de 28<sup>o</sup>C.

### 3.3. Drogas e soluções utilizadas

Solução salina - A preparação desta solução foi feita, diluindo-se 8,5 g de cloreto de sódio em 1 litro de água destilada. A seguir, a solução foi autoclavada (1 atmosfera de pressão por 15 minutos).

A solução salina foi usada, para se proceder as diluições e posteriores semeaduras dos inóculos, nas placas de Petri ou nos frascos de produção de massa celular.

Solução de estreptomicina - O antibiótico em questão, foi acrescentado aos meios de isolamento de diferentes espécies de levedura, para prevenir contaminações bacterianas. A solução foi preparada, usando-se 100 mg de estreptomicina em 10 ml de água esterilizada.

Solução de tetraciclina - Esse antibiótico, foi acrescentado aos meios de isolamento de diferentes espécies de leveduras, para evitar contaminação das culturas com bactérias. A preparação da droga foi feita, dissolvendo-se 250 mg de tetraciclina em 2,5 ml de HCl 0,1 N e o volume foi comple-

tado para 25 ml com água esterilizada.

Solução de Vitaminas

Ácido p-aminobenzóico . . . . .	10 mg
Piridoxina . . . . .	50 mg
Tiamina . . . . .	50 mg
Ácido nicotínico. . . . .	.100 mg
Biotina . . . . .	0,2 mg
Riboflavina . . . . .	.100 mg
Água destilada. . . . .	.100 ml

A solução foi aquecida em banho-maria por 15 minutos, e colocada em frasco escuro adicionada de 2 ml de clorofórmio, sendo então conservada em refrigerador a 4°C.

Solução de ácido nucléico de leveduras - Dissolveram-se 2 gramas de ácido nucléico em 15 ml de HCl, 1N e 2 gramas em 15 ml de NaOH 1N, as duas soluções foram fervidas separadamente, durante 20 minutos e misturadas em seguida, acertando-se o pH para 6,0. Após filtração foi completado para 40 ml o volume, com água destilada e a solução foi conservada em frasco escuro em clorofórmio, no refrigerador.

Solução de caseína hidrolisada - Dissolveu-se 1 g de caseína hidrolisada em 100 ml de água.

Solução de extrato de leveduras - Dissolveu-se 1 g de extrato de leveduras em 100 ml de água.

As soluções de vitaminas, ácido nucléico de leveduras, caseína hidrolisada e extrato de leveduras foram uti

lizadas, para caracterização dos mutantes auxotróficos.

Para se efetuar a caracterização final dos mutantes deficientes nutricionais foram usados os seguintes aminoácidos: prolina, arginina, lisina, triptofano, metionina, histidina, isoleucina, glutamina, homoserina, sendo todos eles na concentração de 10 µg/ml, além de treonina (20 µg/ml) e cistina (50 µg/ml); vitaminas: ácido nicotínico (0,5 µg/ml), ácido *p*-aminobenzóico (0,05 µg/ml), biotina (0,05 µg/ml), tiamina (10 µg/ml), riboflavina (0,5 µg/ml) e piridoxina (0,5 µg/ml) e ácidos nucleicos: adenina, guanina, timina e citosina na concentração de 10 µg/ml. Foram usadas também: xantina dissolvida em HCl 0,1N e uracila dissolvida em NH<sub>4</sub>OH 1N.

Solução de nistatina - (Lederle Laboratories Division) - 100.000 unidades por ml. Este produto foi utilizado, para obtenção de mutantes resistentes a drogas e como agente selecionador de mutantes auxotróficos.

Solução de cristal violeta - Foi feita uma solução de 100 mg de cristal violeta diluídos em 100 ml de água esterilizada. Este corante foi utilizado, para a obtenção de mutantes resistentes a drogas.

Os reagentes usados para determinação do teor protéico das linhagens de *Torula* foram:

Solução D - Adicionou-se 2,0 ml de uma solução a 2% de sulfato de cobre pentahidratado e 2,0 ml de uma solu-

ção a 4% de tartarato duplo de sódio e potássio em um frasco de 100 ml. O volume foi completado com solução a 2% de carbnato de sódio. Esta solução foi sempre preparada no momento de uso.

Reativo de Folinciocalteau - Foi usado o produto comercial (marca E. Merck) que foi diluído, para uma normalidade igual a 1,0.

### 3.4. Ensaios

#### 3.4.1. Escolha das linhagens

Foi feito um experimento, para avaliar a produção, em termos de massa celular, das linhagens de *Torula utilis* do estoque. As medidas de avaliação consideradas foram: absorbância e peso seco. Foram semeados inóculos de  $10^6$  células, em frascos de 250 ml com 50 ml de meio completo líquido. Os inóculos, provieram de uma cultura de 48 horas de incubação a  $28^{\circ}\text{C}$ , em placas de Petri contendo meio completo. As colônias foram tomadas ao acaso e o inóculo foi padronizado, por contagem das células em câmaras de Newbauer.

Os frascos foram incubados em agitador a  $28^{\circ}\text{C}$  por um período de 48 horas, quando foram medidas a absorbância e o peso seco da massa celular.

A medida da absorbância foi feita, no Fotocolorímetro (Evans Electro Selenium Ltd., England), sendo o meio completo usado como "Blank".

O peso seco das células foi medido, centrifugando-se 25 ml das amostras (centrífuga Sorwall Superspeed RC2-B) a 5.000 rpm, durante 10 minutos. A seguir, descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o precipitado em 5 ml de água destilada, colocou-se a solução em vasos da Boemia com a tara determinada previamente e procedeu-se a secagem do material em estufa a 70°C por 24 horas. Finalmente, efetuou-se a pesagem da matéria seca de levedura, nos vasos de Boemia e calculou-se o peso seco, por diferença. As pesagens foram efetuadas, em balança Mettler H20T, e os pesos foram equacionados, padronizando-se as medidas para peso seco por litro de meio de cultura utilizado.

### 3.4.2. Curvas de crescimento

A determinação da curva de crescimento foi feita, para as linhagens de *Torula utilis* e foram consideradas três medidas: absorbância, peso seco e contagem de células. As medidas da absorbância e do peso seco, foram feitas, como descrito anteriormente. O método da contagem das células, foi aquele proposto por AZEVEDO e NEDER (1963). Foram tomadas culturas de dois dias e inoculadas ( $10^6$  células) em frascos de

250 ml, contendo 50 ml de meio de cultura.

Esses frascos, foram incubados a 28<sup>o</sup>C; amostras de 0,1 ml foram retiradas a intervalos de 5 horas e em seguida, semeadas em placas de Petri contendo meio completo de leveduras. Essas placas foram incubadas a 28<sup>o</sup>C e após dois dias procedia-se a contagem das colônias. Para as medidas de absor**u** bância e peso seco, foram também retiradas amostras a intervalos de 5 horas e o ensaio foi feito em estufa.

### 3.4.3. Testes de produção para avaliação de biomassa

Para os testes de produção, que tinham por finalidade a avaliação da biomassa, 10<sup>6</sup> células da levedura, pro venientes de colônias crescidas durante dois dias em placas de Petri, incubadas a 28<sup>o</sup>C, foram inoculadas em frascos de 250 ml, contendo 50 ml de meio completo. Esses frascos, foram conservados no agitador por 24 - 48 horas, à uma temperatura de 28<sup>o</sup>C. As seguintes medidas foram tomadas: absor**u** bância e peso seco e o procedimento foi idêntico aos citados anteriormente.

#### 3.4.4. Testes de produção para avaliação do teor protéico das linhagens

Foram feitos ensaios de produção, com as linhagens de *Torula utilis*, visando principalmente a determinação do teor protéico das mesmas.

Para o preparo do inóculo, foi utilizado um frasco de 250 ml, contendo no seu interior 100 ml de meio completo. Nesse frasco foram semeados 5 ml de uma suspensão aquosa de células da levedura obtidos por raspagem de um tubo de cultura pura. O frasco assim preparado, foi incubado a 28°C por 48 horas. Após esse tempo, adicionou-se ao meio, 50 ml de água destilada, esterilizada e agitou-se até que toda a cultura estivesse em suspensão; essa solução foi transferida para um frasco vazio, esterilizado e filtrada através de lã de vidro, para reter as partículas do meio de cultura. Do filtrado foram utilizados 2 ml, que eram inoculados em cada frasco Erlenmeyer contendo 50 ml de meio completo líquido. Os frascos preparados com o inóculo (todos os frascos apresentavam o mesmo número de células, isto é,  $10^6$  células/50 ml de meio) eram transferidos para agitador onde permaneciam em agitação constante por 48 horas.

Amostras foram retiradas a intervalos que variaram conforme as medidas tomadas: intervalos de 1 hora para medidas de pH e absorbância e intervalos variáveis de 1 a 4 horas para medidas de peso seco.

As medidas do pH, foram feitas no pH - meter E520 Metrohm Herisan e de absorbância no espectrofotômetro Coleman Junior II (Comprimento de onda de 660 nm).

As medidas do peso seco foram feitas com auxílio do miliporo, os miliporos vazios eram pesados e após a filtração do material, eram secos em estufa de 100<sup>o</sup>C e novamente pesados. A diferença encontrada entre os pesos, correspondia a quantidade de biomassa produzida pelas células de *Torula* por um determinado período de tempo.

Para a dosagem das proteínas foi usado o "método de *LOWRY et alii* (1951)" e as células receberam alguns tratamentos preliminares tais como:

- O material celular filtrado foi, juntamente com o papel de filtro (após ter sido seco e pesado) transferido para um tubo de ensaio.
- Foram adicionados 25 ml de NaOH - 1N e foi agitado o conteúdo do tubo de ensaio, até o material se desprender do papel e se desagregar.
- O tubo foi levado em banho de água fervente, durante 30 minutos.
- Foi resfriado suavemente e transferido o conteúdo do tubo para um balão volumétrico de volume conveniente (normalmente 50 ou 100 ml), a solução de NaOH, 1N foi usada para atingir o traço de aferição do balão.

- O volume foi filtrado e as proteínas dosadas pelo "método de Lowry".

### 3.4.5. Cálculo da porcentagem de proteína a partir dos valores de transmitância ou absorbância

O cálculo da porcentagem de proteína, em relação a produção total de biomassa é feito, levando-se em conta o valor de transmitância, que é determinado no espectrofotômetro.

Para esse cálculo, é necessário se tomar um padrão de proteína, que no caso foi o soro humano com uma curva determinada previamente, pelo "método de Lowry". A curva de calibração para proteína de soro humano foi usada em todos os ensaios:

$$C^* = 1666,4882 - 849,6378 \log. \bar{T}$$

onde:  $C^*$  é a concentração protéica calculada pela curva de calibração e  $T$  é o valor de transmitância do produto final.

O valor protéico real da amostra é calculado pela fórmula:

$$P = \frac{C^* \cdot \frac{Vb}{1000} - Ep \cdot mp}{Va}$$

onde:

Vb = volume do balão onde se fez a diluição (ml).

Ep = equivalente em proteína do papel (mg de proteína/  
mg do papel).

mp = massa do millipore (mg).

Va = volume da amostra, filtrado (ml).

Para a avaliação da proteína das amostras, usando-se os dados de absorbância, procedeu-se a leitura no mesmo espectrofotômetro acima e o cálculo foi feito diretamente, considerando-se o soro albumina bovino como padrão protéico.

#### 3.4.6. Isolamento e classificação de linhagens de levedura do bagaço de cana de açúcar

Foram isoladas linhagens de levedura, da natureza, mais propriamente de bagaço de cana de açúcar na Usina Monte Alegre - Município de Piracicaba. Foram utilizados dois métodos de isolamento: método de enriquecimento e semeadura da água de lavagem.

O método do enriquecimento consistiu em se pesar 1 g do bagaço de cana de açúcar e diluir em 40 ml de água destilada; a seguir tomar 1 ml dessa solução e inocular em um frasco contendo 200 ml de meio de malte líquido. Essa solução final, foi incubada à 28°C, por 48 horas para que os microrganismos pudessem se desenvolver. A Após esse tempo, foi

feita a semeadura desse material nos seguintes meios: meio completo de leveduras, meio de açúcar e meio sabouraud dextrose; todos eles acrescidos de antibióticos para evitar contaminações bacterianas.

O segundo método, consistiu na lavagem de 1 g do bagaço de cana de açúcar, com 40 ml de água destilada e posterior filtragem desse material. A seguir, fez-se diluições apropriadas do filtrado e semeou-se 0,1 ml em placas de Petri contendo os mesmos meios de cultura citados acima. As placas de Petri foram conservadas em estufa de 28°C por 48 horas.

Após esse período de tempo, foram isoladas colônias de leveduras, que se assemelhavam morfológicamente àquelas espécies do gênero *Torula*. Essas colônias foram transferidas pela técnica da estria para placas de Petri contendo os mesmos meios de cultura e novamente permaneceram em estufa de 28°C por 48 horas. As células, assim purificadas, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio completo inclinado e conservadas em refrigerador, a espera dos ensaios preliminares de classificação dos diferentes tipos. Esses ensaios foram efetuados, uma semana após o isolamento e o método de classificação seguido foi o de *LODDER (1971)*. Os estudos de identificação das diferentes espécies de levedura encontradas, basearam-se principalmente na morfologia e na fisiologia das espécies (zimograma dos hidratos de carbono).

### 3.4.7. Determinação dos níveis de resistência

Para a obtenção de mutantes de *Torula utilis*, resistentes a drogas foi necessária, primeiramente, a determinação dos níveis de resistência das amostras a nistatina e cristal violeta.

O método consistiu em se preparar placas de Petri com concentrações variáveis das drogas (Tabelas 2 e 3) adicionadas de meio completo de leveduras. Após a solidificação das placas procedeu-se a semeadura de uma alça de platina, retirada de uma cultura líquida da linhagem a ser dosada, cultura essa proveniente de placas de Petri, com meio completo, mantidas em estufa de 28°C por 48 horas.

As placas semeadas, permaneciam em estufa de 28°C por 48 horas, quando eram anotados os resultados. A concentração da droga imediatamente inferior aquela, onde não houve crescimento indicava o valor correspondente a resistência da linhagem. As Tabelas 2 e 3 fornecem as concentrações, que foram utilizadas.

Tabela 2 - Quantidade da solução estoque de nistatina (solução estoque = 35,7 mg/ml) e de meio completo de leveduras para se obter a concentração desejada da droga: teste de resistência das linhagens.

Solução estoque (ml)	Diluição da solução estoque	Quantidade de meio completo (ml)	Concentração da droga ( $\mu\text{g/ml}$ )
0,4	sem diluir	19,6	714,00
2,0	1:10	18,0	357,00
1,0	1:10	19,0	178,50
0,4	1:10	19,6	71,40
2,0	1:100	18,0	35,70
1,5	1:100	18,5	26,70
1,2	1:100	18,8	21,36
1,0	1:100	19,0	17,85
0,8	1:100	19,2	14,24
0,6	1:100	19,4	10,68
0,4	1:100	19,6	7,10
2,0	1:1000	18,0	3,50
1,0	1:1000	19,0	1,70
0,0	-	20,0	0,00

Tabela 3 - Quantidade da solução estoque de cristal violeta (solução estoque = 1 mg/ml) e de meio completo de leveduras para se obter a concentração desejada da droga - teste de resistência das linhagens.

Solução estoque (ml)	Diluição da solução estoque	Quantidade de meio completo (ml)	Concentração da droga ( $\mu\text{g/ml}$ )
2,0	sem diluir	18,0	100,0
1,0	sem diluir	19,0	50,0
0,7	sem diluir	19,3	35,0
0,5	sem diluir	19,5	25,0
0,3	sem diluir	19,7	15,0
2,0	1:10	18,0	10,0
1,0	1:10	19,0	5,0
0,7	1:10	19,3	3,5
0,5	1:10	19,5	2,5
0,3	1:10	19,7	1,5
2,0	1:100	18,0	1,0
1,0	1:100	19,0	0,5
0,7	1:100	19,3	0,3
0,5	1:100	19,5	0,2
0,3	1:100	19,7	0,1
0,0	-	20,0	0,0

#### 3.4.8. Avaliação da sobrevivência das linhagens de *Torula utilis* à drogas

O método consistiu em se preparar placas de Petri, contendo meio completo adicionado de concentrações variáveis das drogas nistatina e cristal violeta. Após a solidificação do meio de cultura, procedeu-se a semeadura, de 0,1 ml de uma solução de células de *Torula utilis*, previamente cultivadas em meio completo líquido a 28°C por 48 horas. As placas de Petri, semeadas, foram conservadas em estufa de 28°C por 48 horas, quando foi efetuada a leitura, por contagem do número de células viáveis. Para a análise da sobrevivência das linhagens foram utilizadas concentrações de nistatina e cristal violeta, semelhantes aquelas descritas nas Tabelas 2 e 3.

#### 3.4.9. Isolamento de mutantes resistentes à drogas

Os mutantes de *Torula utilis*, resistentes a drogas foram isolados pelo método da placa gradiente de BRYSON e SZYBALSKY (1952).

Para a nistatina foram efetuadas 8 transferências empregando-se os gradientes:

1 - 0 - 3,5 µg/ml  
2 - 0 - 7,1 µg/ml  
3 - 0 - 17,8 µg/ml  
4 - 0 - 35,7 µg/ml  
5 - 0 - 71,4 µg/ml  
6 - 0 - 178,5 µg/ml  
7 - 0 - 357,0 µg/ml  
8 - 0 - 714,0 µg/ml

Para o cristal violeta, foram feitas 7 transferências usando-se os seguintes gradientes:

1 - 0 - 0,2 µg/ml  
2 - 0 - 0,3 µg/ml  
3 - 0 - 0,5 µg/ml  
4 - 0 - 1,0 µg/ml  
5 - 0 - 1,5 µg/ml  
6 - 0 - 2,5 µg/ml  
7 - 0 - 3,5 µg/ml

As colônias que conseguiram crescer nos gradientes superiores aos da linhagem selvagem, após as respectivas transferências, foram isoladas em tubos de ensaio contendo meio completo inclinado e estocadas em refrigerador. As colônias mutantes resistentes a nistatina, foram semeadas em placas de Petri contendo meio completo e as seguintes concentrações da droga: 3,5; 7,1; 17,8; 35,7; 71,4; 178,5; 357,0 e

714,0 µg/ml, tendo como finalidade a confirmação das resistências. No caso do cristal violeta, as seguintes concentrações foram utilizadas no meio completo: 0,2; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5 e 3,5 µg/ml. A leitura foi feita, pelo crescimento das colônias (inoculadas nas placas por meio de uma alça de platina) nas concentrações acima.

#### 3.4.10. Determinação da sobrevivência das colônias selvagens e mutantes resistentes à nistatina

Após o isolamento das colônias mutantes resistentes a nistatina, pelo método da placa gradiente, foram observados os níveis de resistência dessas colônias à nistatina, pelo método descrito no ítem 3.4.7.

Além disso, foram também observados os níveis de sobrevivência a nistatina, das colônias selvagens e mutantes, pelo método descrito em 3.4.8.

#### 3.4.11. Crescimento das colônias selvagens e mutantes resistentes a nistatina

O método utilizado para se efetuar as curvas de crescimento das colônias selvagens e mutantes resistentes a nistatina, consistiu em se semear células de *Torula utilis*,

em meio completo de levedura e proceder a contagem das colônias. As culturas semeadas, foram primeiramente cultivadas em meio completo sólido a 28<sup>o</sup>C durante 48 horas. A seguir, retiraram-se colônias isoladas, que foram inoculadas em solução salina e contadas na câmara de Newbauer. Após a contagem das células, inoculou-se  $1 \times 10^6$  células nos frascos de 250 ml, contendo 50 ml de meio completo líquido. Esses frascos foram agitados, à temperatura de 28<sup>o</sup>C por 48 horas.

Aliquotas de 1 ml, foram retiradas a intervalos de 4 horas e semeadas em placas de Petri contendo meio completo. Essas placas, foram incubadas a 28<sup>o</sup>C por 48 horas e após esse tempo, foi feita a contagem do número de células.

Um estudo comparativo do crescimento das linhagens selvagem e resistentes foi feito através dos cálculos do coeficiente de regressão linear e meia vida relativa das linhagens, de acordo com os esquemas de *BERGAMIN FILHO (1973)*.

#### 3.4.12. Sobrevivência de células de *Torula utilis* à luz ultra-violeta

Para a obtenção de mutantes auxotróficos, foi usado como agente mutagênico, a luz ultra-violeta e para isso determinou-se a sobrevivência das células de *Torula utilis*, a esse mutagênico. A técnica usada, consistiu em se tratar uma suspensão de células (obtidas de colônias isoladas, crescidas

em placas de Petri em estufa de 28<sup>o</sup>C por 48 horas) com luz ultra-violeta. O tratamento com luz ultra-violeta (2537 Å) tinha a duração final de 80 segundos e a distância da luz às células de *Torula utilis* era de 15 cm. Amostras foram retiradas nos seguintes tempos: 0; 10; 20; 30; 40; 60 e 80 segundos. As amostras, eram semeadas em placas de Petri, e permaneciam incubadas a 28<sup>o</sup>C por 48 horas, quando então se procedia a contagem das células viáveis. Finalmente, estimava-se a porcentagem de sobrevivência das células de *Torula utilis*, em relação à amostra não irradiada (tempo zero).

#### 3.4.13. Sobrevivência de células de *Torula utilis* em meio líquido adicionado de nistatina

A nistatina foi usada como agente selecionador de mutantes auxotróficos e a solução estoque de nistatina era de 10 µg/ml. O método, consistiu em se cultivar células de *Torula utilis* em placas de Petri, contendo meio completo, em estufa de 28<sup>o</sup>C por 48 horas. Em seguida, foram tomadas colônias isoladas e diluídas em solução salina. Após diluições apropriadas, foi tomado 0,1 ml e inoculado em um tubo de ensaio contendo meio completo líquido (9 ml) e nistatina (1 ml = 10 µg de nistatina). Amostras foram retiradas, semeadas em meio completo sólido e incubadas a 28<sup>o</sup>C por 48 horas. As amostras foram retiradas nos seguintes tempos: 0; 20; 40 e 60 minutos. Finalmente, fez-se a contagem das células viáveis e

calculou-se a porcentagem de sobrevivência das mesmas.

#### 3.4.14. Isolamento de mutantes auxotróficos

A técnica do isolamento de mutantes auxotróficos, usando a luz ultra violeta (2537 Å) como mutagênico e a nistatina como agente selecionador consistiu em se inocular, colônias isoladas de *Torula utilis* (previamente crescidas em meio completo à 28°C por 48 horas) em um frasco de 250 ml, contendo 50 ml de meio completo líquido, por um período de 24 horas. Em seguida, procedeu-se a centrifugação do material a 5000 rpm por 10 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado em solução salina. Fez-se uma contagem das células de *Torula utilis* em câmaras de Newbauer.

A seguir as células foram tratadas com luz ultra-violeta (a distância da luz à placa contendo as células de *Torula utilis* foi de 15 cm), por um tempo correspondente a 5% de sobrevivência. As células tratadas, foram inoculadas em 20 ml de meio completo líquido, e permaneceram incubadas à 28°C durante 18 horas. A seguir, foram centrifugadas, suspensas em solução salina, recentrifugadas, ressuspendidas em solução salina e inoculadas (1 ml da solução salina) em meio mínimo líquido sem nitrogênio (sem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ).

As células de *Torula utilis*, permaneceram por 3 a 5 horas nesse meio, quando foi adicionada uma solução de

nistatina de 10 µg/ml. Após 60 minutos de tratamento, procedeu-se a semeadura em placas contendo meio completo de levedura. As placas permaneceram na estufa de 28°C por 48 horas, quando as colônias foram transferidas para duas séries de placas (uma delas contendo meio mínimo e a outra meio completo), pela técnica da réplica de *LEDERBERG e LEDERBERG (1952)*. Após incubação por 48 horas a 28°C, foi feita a leitura das placas e as colônias que cresceram no meio completo, mas não no meio mínimo, foram consideradas mutantes deficientes nutricionais ou auxotróficas.

#### 3.4.15. Caracterização dos mutantes auxotróficos

As colônias mutantes auxotróficas de *Torula utilis* foram ensaiadas, com a finalidade de se caracterizar as suas deficiências nutricionais. O método consistiu em se preparar placas, contendo meio mínimo de levedura e semeá-las com 0,1 ml de uma solução de células de *Torula utilis*, mutantes auxotróficas. As células da linhagem mutante, tinham sido isoladas das placas de meio completo, que haviam crescido em estufa de 28°C por 48 horas.

As placas assim preparadas, permaneciam incubadas a 28°C por 12 horas, quando lhes eram adicionadas as seguintes substâncias: caseína hidrolisada, ácido nucléico de levedura, vitaminas, extrato de levedura e meio completo. Es-

As substâncias eram colocadas em locais separados nas placas, com o auxílio de uma alça de platina. O crescimento visível, ao redor de qualquer uma dessas substâncias, com exceção do meio completo, indicava a deficiência da linhagem mutante. Para a caracterização final das células mutantes, o procedimento foi idêntico ao anterior, utilizando-se apenas todas as substâncias que compunham os grandes grupos.

#### 3.4.16. Testes de cruzamentos

Para verificação da existência de algum sistema de recombinação ou troca de material genético entre células de *Torula utilis*, procedeu-se a uma série de cruzamentos entre indivíduos mutantes.

Foram considerados dois tipos de cruzamentos: o primeiro, entre células de *Torula utilis* mutantes auxotróficas e o segundo entre células de *Torula utilis* mutantes resistentes a drogas.

O método usado, para o cruzamento de células mutantes auxotróficas consistiu em se tomar duas colônias mutantes para requisitos nutricionais diferentes que foram centrifugadas separadamente. A seguir, elas foram suspensas em solução salina, recentrifugadas e ressuspensas novamente em solução salina. Foi inoculado 0,1 ml de cada solução, separa

damente, em dois tubos de ensaio contendo 9 ml de meio mínimo de levedura. A seguir, foram tomados 0,05 ml de cada solução e efetuou-se a mistura em um 3º tubo de ensaio contendo 9 ml de meio mínimo; todos os tubos foram incubados a 28°C por 6 horas. Após esse tempo, foi feita a semeadura das placas da seguinte forma: cinco placas de meio mínimo foram semeadas com inóculos procedentes do tubo número três, cinco placas com inóculos do tubo número um e cinco placas com inóculos do tubo número dois, o mesmo número de placas contendo meio completo foi semeado como anteriormente e serviu de testemunha nos cruzamentos. Todas as placas foram incubadas a 28°C por 24 - 48 horas. Finalmente, foram observados os resultados, por presença ou ausência de crescimento das células e contagem das mesmas nas diferentes placas.

No caso do cruzamento entre células de *Torula utilis*, mutantes resistentes a drogas o método consistiu em se tomar duas colônias, resistentes cada uma delas a uma droga diferente, centrifugá-las e suspendê-las em solução salina. A seguir, 0,1 ml de cada uma dessas soluções foi inoculado separadamente em um tubo de ensaio contendo 9 ml de meio completo e em um terceiro tubo foram inoculados 0,05 ml de cada solução. Os tubos foram inoculados à 28°C por 6 horas. Finalmente, procedeu-se a semeadura e de cada tubo foram semeadas vinte placas, sendo cinco de cada um dos seguintes meios: meio completo, meio completo mais nistatina, meio completo mais cristal violeta e meio completo mais nistatina mais cris

tal violeta; isso porque, uma das linhagens era resistente a nistatina e a outra a cristal violeta.

As placas foram incubadas a 28<sup>o</sup>C por 24 - 48 horas, quando foram observados os resultados.

#### 3.4.17. Análises estatísticas

Os ensaios de produção, foram feitos conforme o delineamento estatístico em Blocos ao Acaso e Inteiramente Casualizado com duas ou três repetições. As colônias de cada linhagem ou tratamento foram tomadas ao acaso e o procedimento geral seguiu os esquemas propostos por *PIMENTEL GOMES (1963)*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Escolha das linhagens

Com a finalidade de se escolher as linhagens mais promissoras, para os estudos genéticos foi feito um ensaio de produção de massa celular, envolvendo as oito linhagens de *Torula utilis* do estoque. Esse ensaio, que constou do crescimento das células em meio completo de leveduras por 48 horas a 28<sup>o</sup>C, foi realizado conforme o método descrito no ítem 3.4.1. e os resultados obtidos representam médias de três colônias por linhagem, com duas repetições. A Tabela 4, apresenta os resultados obtidos.

Tabela 4 - Absorbância e massa celular (peso seco) de oito linhagens de *Torula utilis*.

Linhagens	Absorbância			Peso seco (g/l)		
	1. <sup>a</sup> rep.	2. <sup>a</sup> rep.	Média	1. <sup>a</sup> rep.	2. <sup>a</sup> rep.	Média
L 1	4,40	4,30	4,35	2,26	2,96	2,61
L 2	4,20	4,30	4,25	1,86	2,72	2,29
L 3	4,30	4,30	4,30	2,12	3,00	2,56
L 4	4,10	4,40	4,30	2,00	2,76	2,38
L 5	4,30	4,20	4,25	1,86	2,56	2,21
L 6	4,30	4,40	4,35	2,00	2,56	2,28
L 7	4,20	4,30	4,25	2,50	2,50	2,50
L 8	4,30	4,30	4,30	2,20	2,16	2,18

Nota-se facilmente, mesmo sem análise estatística que o valor de absorbância, para todas as linhagens não difere, isto é, as linhagens apresentam produções semelhantes quanto ao caráter absorbância.

Quanto ao caráter peso seco, foi feita uma análise de variância através de um Experimento Inteiramente Casualizado, com duas repetições e oito tratamentos. A não significância para tratamentos, sugere, que as linhagens não diferem quanto ao caráter produção de massa celular (em termos de peso seco). Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Ensaio de produção de oito linhagens de *Torula utilis*. Análise de variância para o caráter peso seco. Experimento Inteiramente Casualizado com duas repetições.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	7	0,373	0,0533	
Resíduo	8	1,694	0,212	0,251 n.s.
Total	15	2,067		

Em vista dos resultados obtidos, foram escolhidas as linhagens 1, 2, 3 e 4 que apresentavam colônias isoladas, com bordos delimitados e com ótimo crescimento nos dois meios de cultura utilizados (meio completo e meio mínimo).

Essas linhagens foram submetidas a novos testes de produção, com a finalidade de selecionar aquelas, mais adequadas para serem usadas nos estudos genéticos da *Torula utilis* e nos ensaios de produtividade.

Os testes de produção, foram levados a efeito sob agitação constante a 28<sup>0</sup>C, de acordo com os métodos descritos nos ítems 3.4.3., 3.4.4. e 3.4.5. As medidas consideradas foram pH, absorvância, peso seco e teor de proteína.

Foi observado, que o valor do pH diminuía, a medida que a cultura crescia em agitação constante, enquanto

que, os valores de absorbância e peso seco aumentavam. O teor protéico das linhagens esteve em torno de 30 - 35% da concentração total do meio, para todas as linhagens de *Torula utilis* examinadas.

Quanto ao teor de proteína em g/l, houve um aumento gradativo a medida que a cultura evoluía até a amostra final de 30 horas. A porcentagem de proteína aumentou muito na amostra de 3 horas, mas tendeu a estabilização nos demais tempos, para todas as linhagens ensaiadas.

Os resultados obtidos com os ensaios de produção constam das Tabelas 6 e 7 e das Figuras 1, 2 e 3.

Os dados de produção de matéria seca e proteína, das quatro linhagens de *Torula utilis* (amostras de 0 a 12 horas) foram delineadas em Blocos ao Acaso com 8 amostras e 4 linhagens. Os resultados obtidos, são os constantes das Tabelas 8, 9 e 10.

Tabela 6 - Dados de pH e absorvância de *Torula utilis*, linhagens L 1, L 2, L 3 e L 4 obtidos por ensaios de produção em agitador constante. Valores médios de duas medidas.

Tempo (horas)	L i n h a g e n s							
	pH				Absorvância			
	L 1	L 2	L 3	L 4	L 1	L 2	L 3	L 4
0	5,20	5,20	5,10	5,25	0,140	0,100	0,145	0,170
1	5,10	5,18	5,00	5,10	0,150	0,120	0,170	0,190
2	4,75	4,80	4,80	4,90	0,217	0,160	0,220	0,250
3	4,50	4,60	4,50	4,70	0,210	0,160	0,270	0,350
4	4,10	4,30	4,30	3,50	0,130	0,100	0,102	0,200
5	3,70	4,50	4,20	4,25	0,225	0,100	0,140	0,200
6	3,30	4,00	4,10	4,50	0,280	0,230	0,200	0,220
7	3,15	3,30	4,00	4,40	0,339	0,350	0,240	0,270
8	3,10	3,00	3,90	4,40	0,393	0,380	0,290	0,290
9	3,10	3,00	3,70	4,20	0,225	0,440	0,308	0,310
10	3,10	3,45	3,70	4,25	0,235	0,300	0,360	0,450
11	3,25	3,05	3,30	4,00	0,251	0,550	0,400	0,400
12	3,30	2,95	3,50	4,10	0,280	0,310	0,300	0,300
24	4,50	4,00	3,90	4,45	-	-	-	-
30	4,50	4,60	4,00	4,50	-	-	-	-
35	4,50	4,40	4,20	4,50	-	-	-	-

Tabela 7 - Dados de produção de matéria seca e proteína de *Torula utilis*, Linhagens L1, L2, L3 e L4 obtidos por ensaios de produção com agitação constante. Valores médios de duas medidas.

Tempo (horas)	Matéria seca (g/l)				Proteína (g/l)				% Proteína			
	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4
0	0,363	0,261	0,388	0,310	0,107	0,132	0,157	0,124	29,4	50,5	40,8	39,7
3	1,310	0,280	0,544	0,770	0,563	0,193	0,211	0,360	43,0	69,3	38,8	46,8
6	2,500	0,970	1,700	2,050	0,818	0,347	0,596	0,601	32,6	35,8	35,1	29,4
8	3,130	3,070	2,700	2,410	0,795	1,135	1,055	0,781	25,4	37,0	39,3	32,4
10	3,600	2,430	3,300	3,390	1,065	0,930	1,091	1,027	29,6	38,4	33,1	30,3
12	4,000	3,910	3,690	3,850	1,212	1,410	1,144	1,055	30,3	36,1	31,0	27,4
24	5,040	-	-	5,620	1,487	-	-	1,451	29,5	-	-	25,4
30	5,920	6,780	4,780	6,000	1,787	1,967	1,525	1,801	30,2	29,1	31,9	30,0

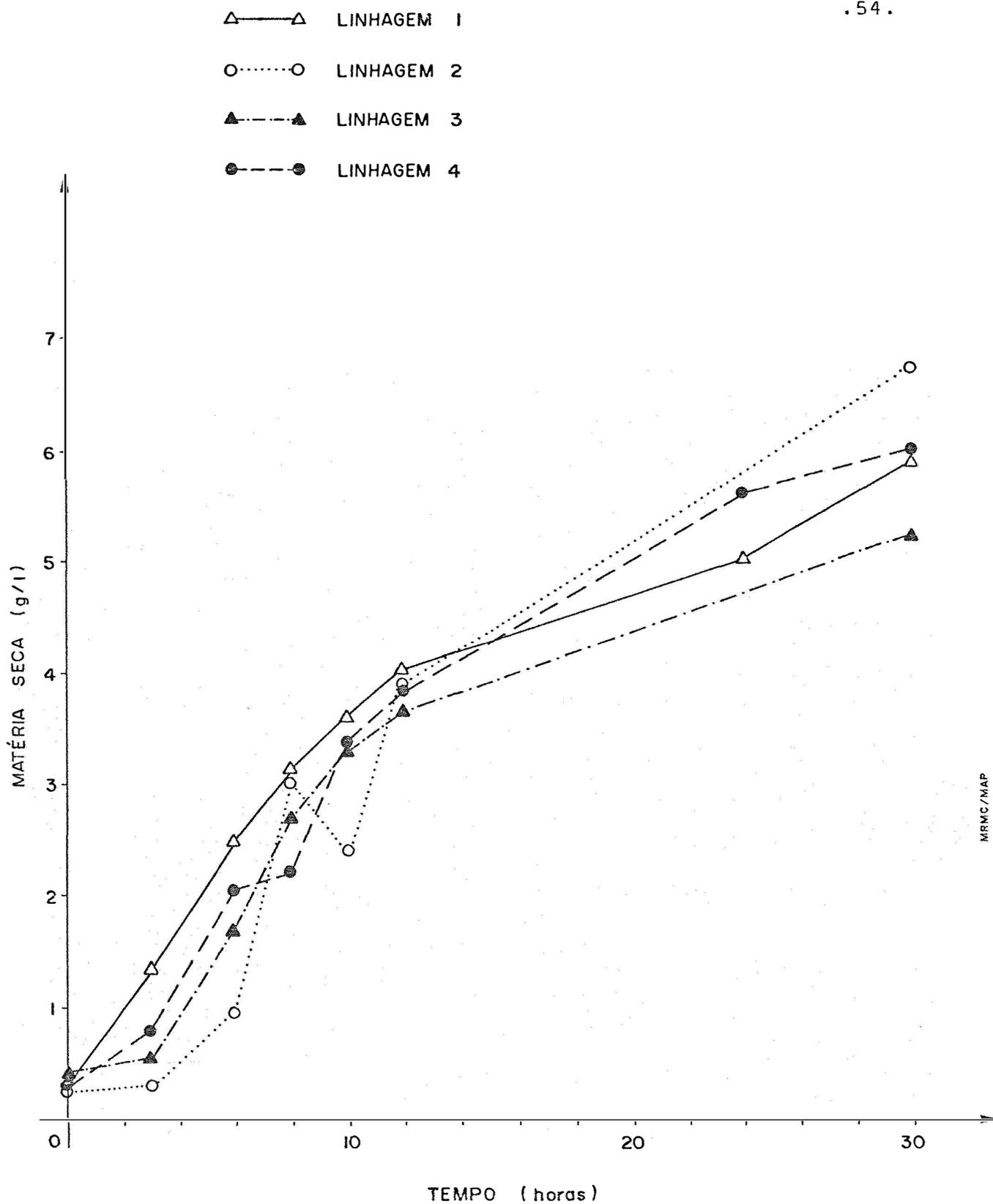


Figura 1 - Produção de matéria seca: linhagens L1, L2, L3 e L4 de *Torula utilis*.

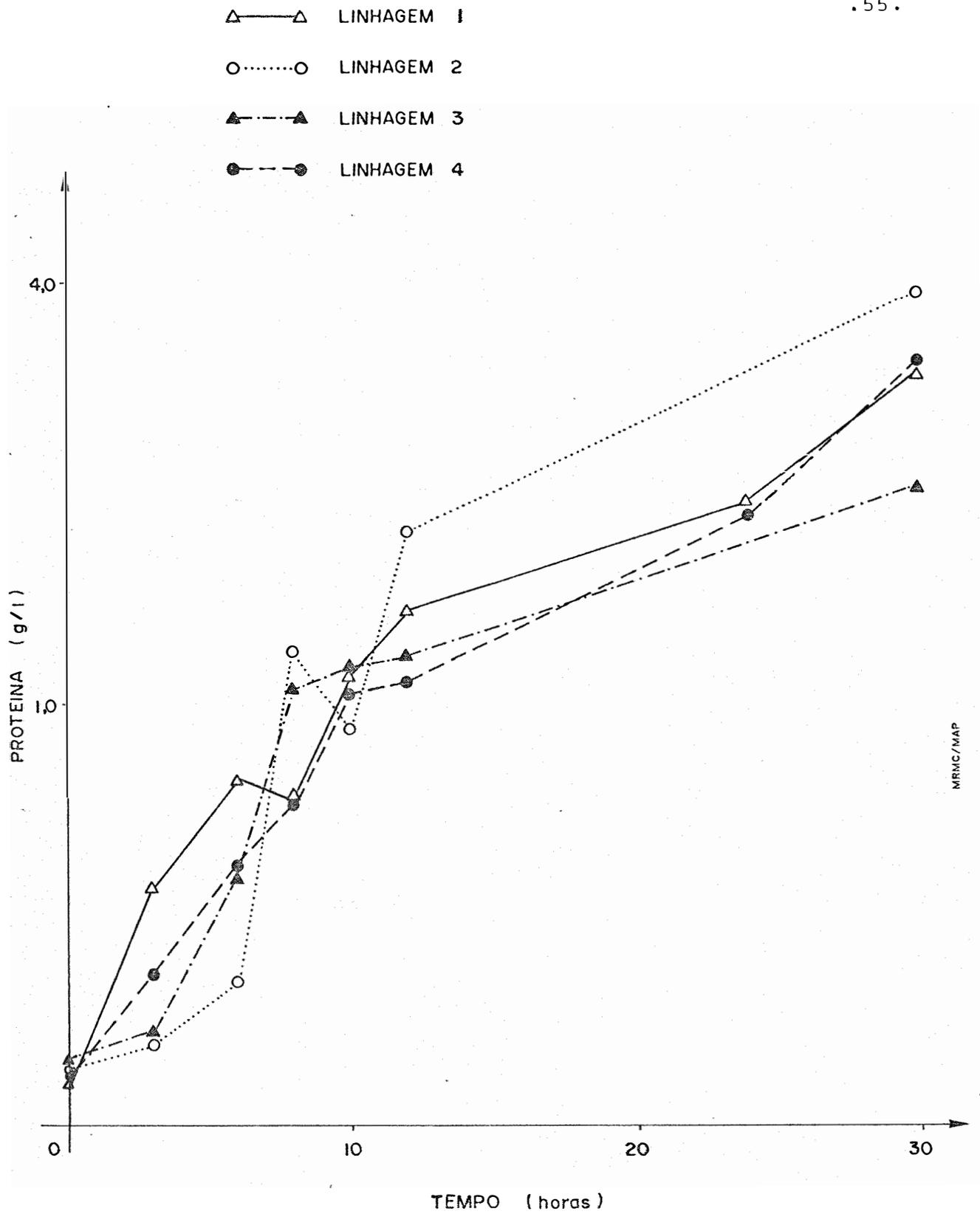


Figura 2 - Produção de proteína (g/l): linhagens L 1, L 2, L 3 e L 4 de *Torula utilis*.

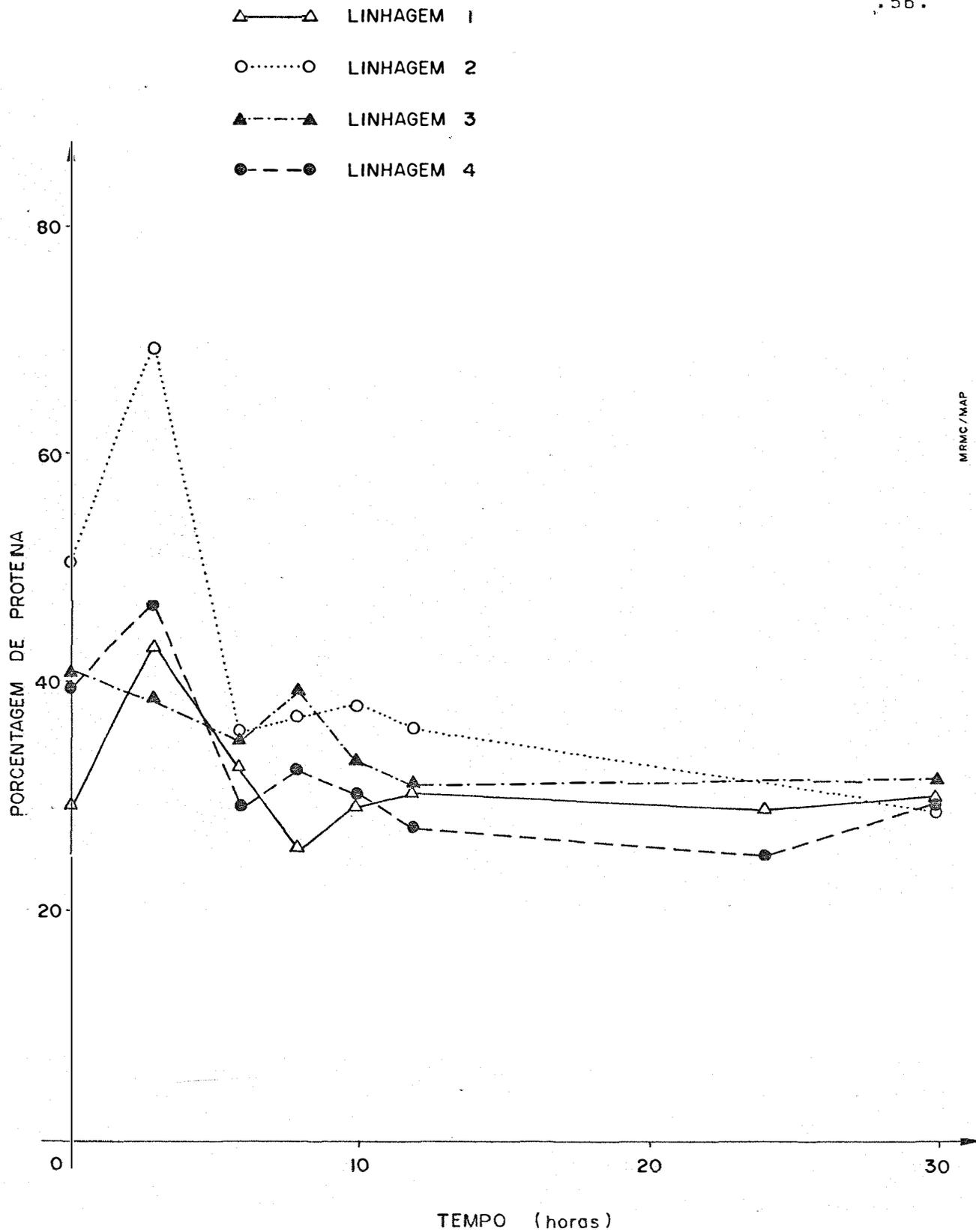


Figura 3 - Produção de proteína em % de peso seco: Linhagens L 1, L 2, L 3 e L 4 de *Torula utilis*.

Tabela 8 - Ensaio de produção de quatro linhagens de *Torula utilis*. Análise de variância para o caráter peso seco. Blocos ao Acaso com 6 amostras e 4 linhagens.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Linhagens	3	1,360	0,453	4,09*
Amostras	5	39,620	7,924	71,39**
Resíduo	15	1,664	0,111	
Total	23			$\bar{X} = 2,12$ C.V. = 15,7%

O resultado obtido para blocos, é significativo ao nível de 5% de probabilidade, isto é, existem linhagens que diferem entre si, quanto ao caráter produção de matéria seca. Em relação as amostras tomadas, há diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade para todas as linhagens.

Para testar, quais as linhagens que se diferenciam em termos de matéria seca foi usado o teste de Tukey, que compara médias. O teste mostrou que, a linhagem L 1 foi estatisticamente superior às demais, quanto ao teor de matéria seca produzida. As linhagens L 2 e L 3 não diferiram entre si, para o caráter em questão, entretanto a linhagem L 2 foi diferente da L 4 e as linhagens L 3 e L 4 não diferiram para o mesmo caráter.

Tabela 9 - Ensaio de produção de quatro linhagens de *Torula utilis*. Análise de variância para o caráter produção de proteína (g/l). Blocos ao Acaso com 6 amostras e 4 linhagens.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Linhagens	3	0,032	0,010	0,469 n.s.
Amostras	5	3,574	0,714	30,810**
Resíduo	15	0,348	0,023	
Total	23			$\bar{X} = 0,71$ C.V. = 21,7%

Portanto, não existem diferenças significativas entre as linhagens quanto a produção de proteína em g/l. Com relação as amostras elas diferem entre si, como era de se esperar para uma cultura em crescimento.

Tabela 10 - Ensaio de produção de quatro linhagens de *Torula utilis*. Análise de variância para o caráter porcentagem de proteína. Blocos ao Acaso com 6 amostras e 4 linhagens.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Linhagens	3	549,920	183,3067	6,99**
Amostras	5	967,937	193,5874	7,38**
Resíduo	15	393,550	26,2367	
Total	23			$\bar{X} = 36,7$
				C.V. = 13,9%

Quanto ao caráter, porcentagem de proteína em relação ao peso seco, a análise estatística mostrou que, existem diferenças altamente significativas entre pelo menos duas das linhagens de *Torula utilis* examinadas. Também foram detectadas diferenças significativas entre pelo menos duas das amostras consideradas para todas as linhagens.

Foi aplicado o teste de Tukey, para verificar quais foram as linhagens que diferiram quanto ao caráter porcentagem de proteína.

Comparando-se as médias de produção de proteína em porcentagem, de todas as linhagens, observou-se que a linhagem L 2 é mais produtiva que as linhagens L 1 e L 4 e não

diferiu significativamente da linhagem L 3. Quanto as demais linhagens (L 1, L 3 e L 4) não foram detectadas diferenças significativas entre elas, com relação ao caráter ensaiado.

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos, para todos os caracteres.

Tabela 11 - Teste de Tukey para os caracteres: matéria seca (g/l), proteína (g/l) e % de proteína das quatro linhagens de *Torula utilis*.

Linhagens	Matéria seca (g/l)	Proteína (g/l)	% de proteína
	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
L 1	7,45 a*	0,76 a	31,72 a
L 2	5,46 b	0,69 a	44,52 b
L 3	6,16 b,c	0,71 a	36,35 a,b
L 4	6,39 c	0,66 a	34,33 a

Teste de Tukey: diferenças mínimas significativas.

Matéria seca { 1% = 1,93  
5% = 0,77

Proteína(g/l) { 1% = 0,44  
5% = 0,35

% de proteína { 1% = 14,85  
5% = 11,78

\*Em cada coluna, médias com a mesma letra não diferem estatisticamente.

As linhagens L 1 e L 3, foram escolhidas para serem usadas nos ensaios subsequentes.

#### 4.2. Curvas de crescimento

Os dados das curvas de crescimento das linhagens L 1 e L 3, foram computados conforme o método descrito em 3.4.3., sendo retiradas amostras a intervalos de 5 horas, considerando-se a média de duas repetições por amostra.

Foi verificado, que as linhagens apresentaram um comportamento semelhante para todas as medidas consideradas. A fase logarítmica para os dados de absorbância, e número de células viáveis, se prolongou até cerca de de 25-30 horas, seguindo-se a fase estacionária. Após esse intervalo de tempo, houve diminuição da taxa de crescimento, para as medidas ensaiadas.

Desde que, os dados apresentados sugerem que o melhor intervalo de produção de massa celular por células de *Torula utilis*, foi de 45 - 50 horas de crescimento a 28<sup>o</sup>C, o tempo usado nos demais experimentos foi padronizado para 48 horas de incubação.

Os resultados obtidos para absorbância, número de células viáveis e peso seco constam da Tabela 12 e as curvas de crescimento podem ser visualizadas nas Figuras 4, 5 e 6.

Tabela 12 - Dados de absorvância, número de células viáveis e peso seco das linhagens L1 e L3 de *Torula utilis*. Os valores, representam a média de duas repetições por amostra.

Amostras (horas)	Absorvância		Nº de células viáveis		Peso seco (g/l)	
	L 1	L 3	L 1	L 3	L 1	L 3
0	0,00	0,00	$8,0 \times 10^1$	$1,6 \times 10^2$	0,40	0,44
5	0,00	0,00	$6,3 \times 10^2$	$3,7 \times 10^2$	0,36	0,76
10	0,00	0,10	$8,7 \times 10^4$	$6,1 \times 10^4$	0,60	1,20
15	0,23	0,30	$4,6 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$	1,20	1,52
20	1,95	2,00	$3,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	1,40	1,56
25	2,70	2,50	$1,1 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	1,24	1,64
30	3,35	3,40	$6,6 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	1,56	1,68
35	3,30	3,40	$4,1 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$	1,48	1,68
40	3,70	3,40	$3,0 \times 10^9$	$7,1 \times 10^8$	1,60	1,64
45	3,40	3,50	$5,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^{10}$	1,50	1,72
50	3,40	3,70	$1,0 \times 10^9$	$7,5 \times 10^9$	1,68	1,70
55	3,40	3,60	$5,0 \times 10^8$	$1,4 \times 10^{10}$	1,40	1,80
60	3,35	3,60	$5,4 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$	1,44	1,60

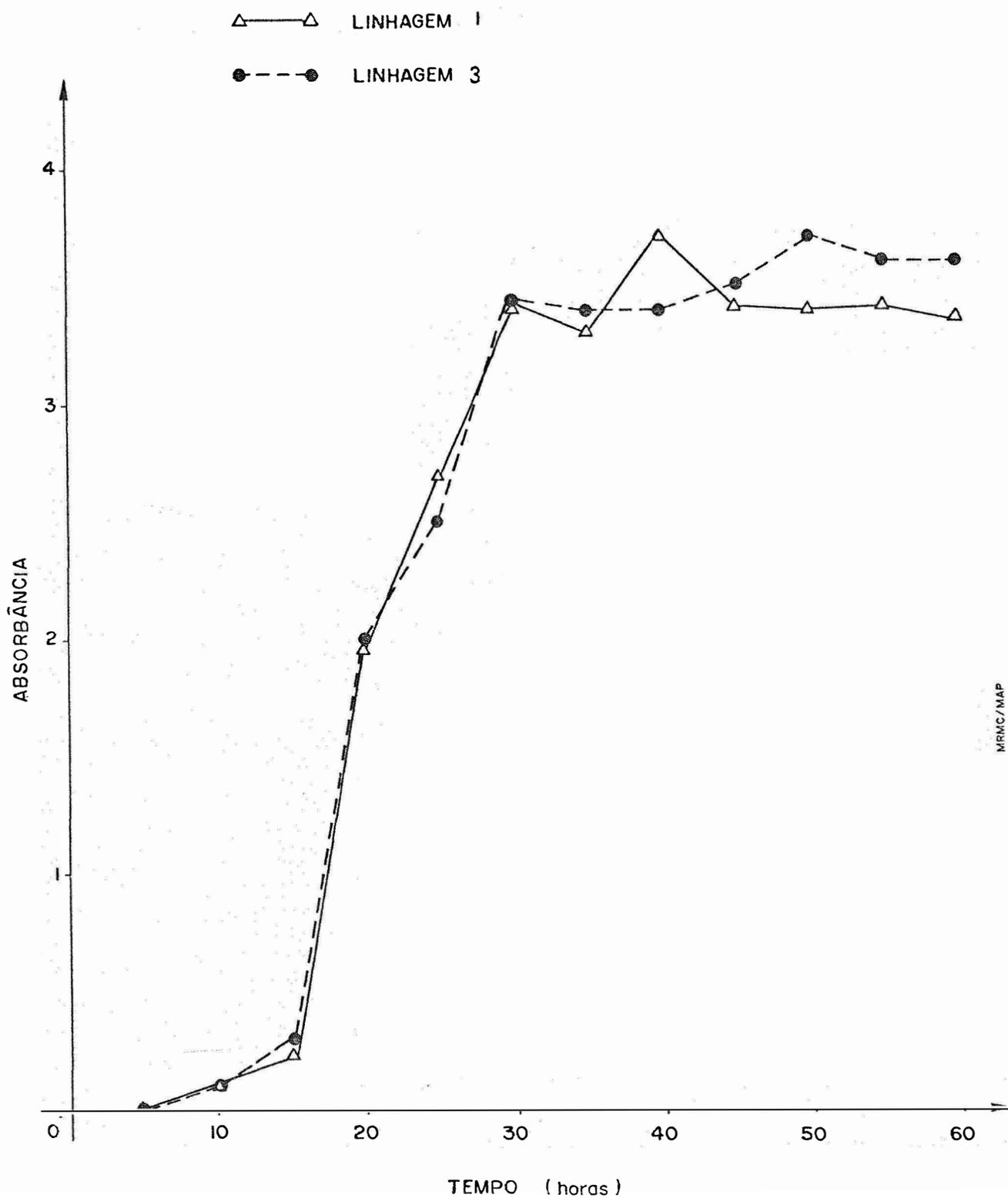
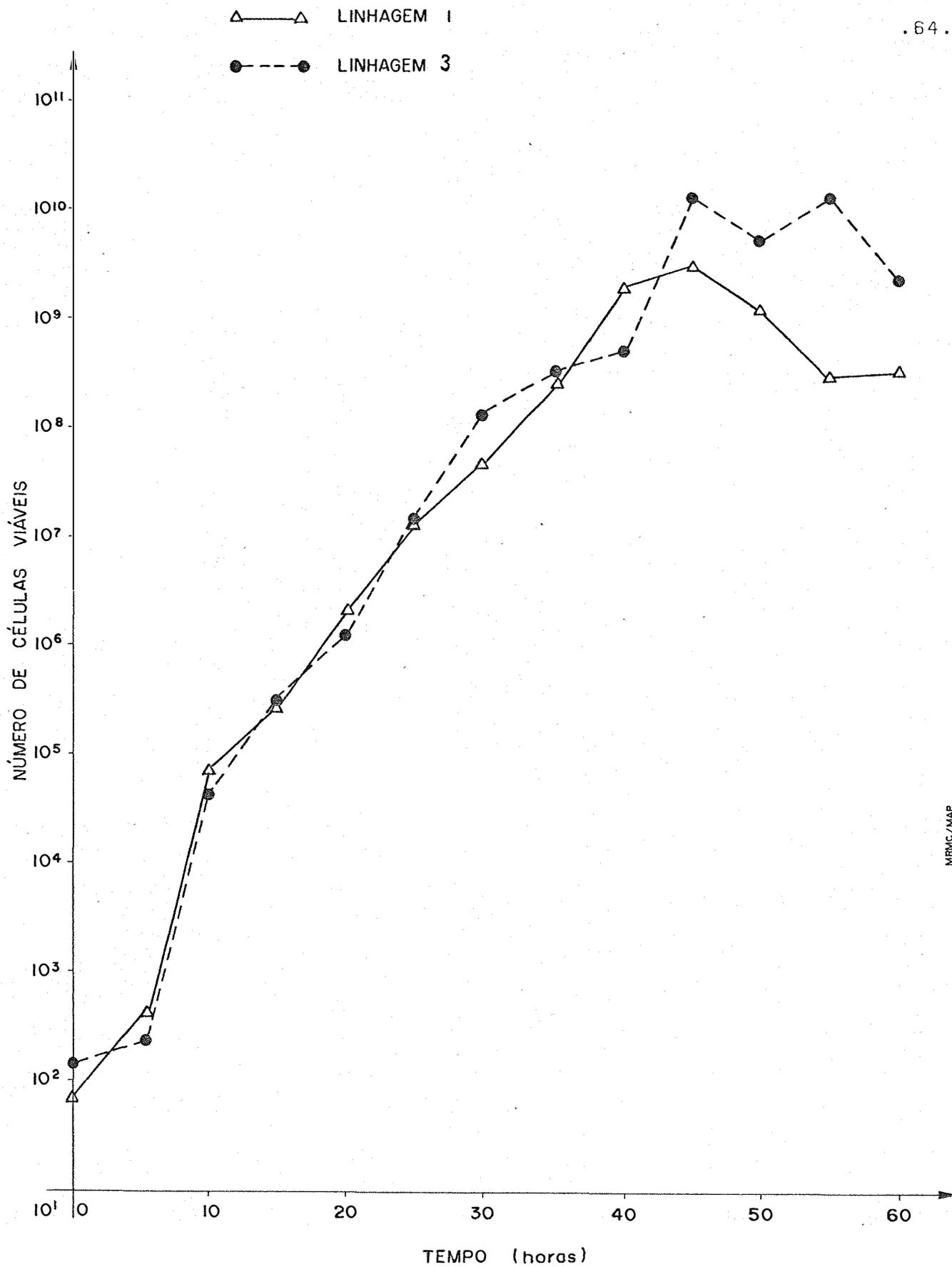


Figura 4 - Curva de crescimento das linhagens L 1 e L 3 de *Torula utilis* (medida de absorbância).



MRMC/MAP

Figura 5 - Curva de crescimento das linhagens L1 e L3 de *Torula utilis* (nº de células viáveis).

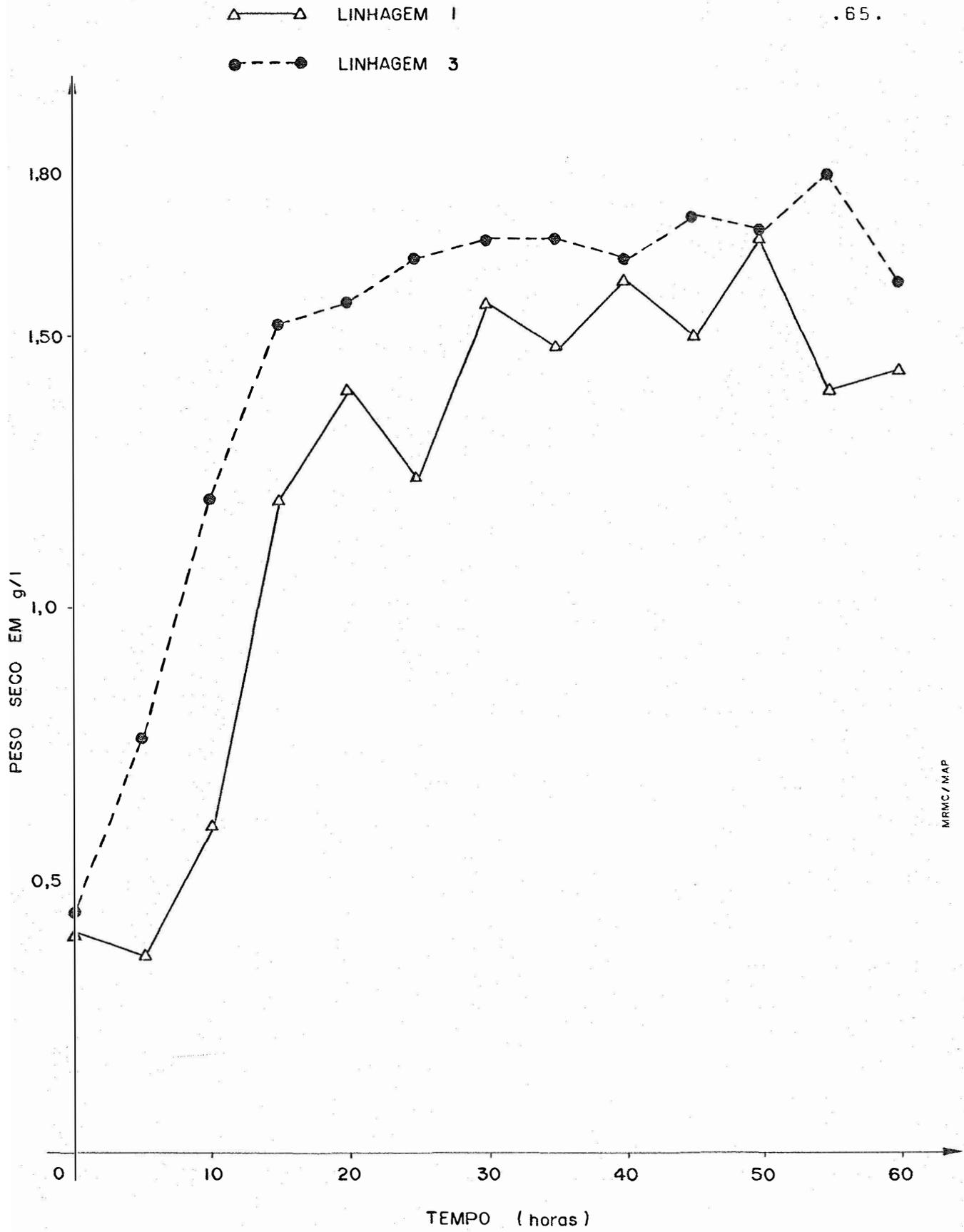


Figura 6 - Curva de crescimento das linhagens L 1 e L 3 de *Torula utilis* (peso seco em g/l).

#### 4.3. Isolamento e classificação de linhagens de levedura do bagaço de cana de açúcar

Para esse isolamento, foram consideradas amostras de bagaço de cana de açúcar curtido (denominado bagaço velho) e bagaço recém moído (denominado bagaço novo). O bagaço de cana de açúcar, de onde provieram as linhagens de *Torula* sp., foi coletado na Usina Monte Alegre, no município de Piracicaba, sendo que as linhagens B1 e B4 vieram do bagaço velho e as linhagens restantes do bagaço novo.

Os métodos de isolamento e seleção das amostras de *Torula* sp foram aqueles descritos em 3.4.6. e os resultados obtidos são os constantes das Tabelas 13, 14 e 15.

Tabela 13 - Amostras de levedura, provenientes do bagaço de cana de açúcar e meios de cultura utilizados para a seleção.

Meios de cultura	Amostras coletadas do bagaço de cana de açúcar	
	Velho	Novo
Meio de açúcar	2	4
Meio Sabouraud	4	1
Meio completo	3	8
Meio de malte	1	3
Total	10	16

Tabela 14 - Amostras de levedura, selecionadas morfologicamente e submetidas ao zimograma dos açúcares.

Nº das amostras	Método de obtenção	Meio de cultura	Bagaço de cana de açúcar
B 1*	Enriquecimento	Meio de malte	velho
B 2	Semeadura da água de lavagem	Meio completo	novo
B 3	Enriquecimento	Meio completo	novo
B 4	Semeadura da água de lavagem	Meio completo	velho
B 5	Semeadura da água de lavagem	Meio completo	novo
B 6	Enriquecimento	Meio de malte	novo

\*B = Bagaço

Foi observado que, o maior número de amostras provenientes do bagaço de cana de açúcar velho, cresceu no meio Sabouraud, enquanto que o menor número delas foi obtido do meio de malte. Para as linhagens de *Torula* sp isoladas do bagaço de cana de açúcar novo, o melhor meio foi o completo enquanto que poucas colônias cresceram no meio Sabouraud. Foram isoladas 10 amostras do bagaço de cana de açúcar velho e 16 do bagaço de cana de açúcar novo.

Através de análises morfológicas visuais e microscópicas foram selecionadas 2 amostras do bagaço velho e 4 do bagaço novo e estas foram submetidas aos testes de fermentação dos açúcares, nos tubos de Durham.

Tabela 15 - Zimograma dos hidratos de carbono das linhagens de levedura.

Amos- tras	Fontes utilizadas					
	Galactose	Lactose	Maltose	Rafinose	Glicose	Sacarose
B 1	-	-	-	1/3 +	+	+
B 2	-	-	-	1/3 +	+	+
B 3	-	-	-	1/3 +	+	+
B 4	-	-	-	+	+	+
B 5	-	-	-	-	+	+
B 6	+	-	+	-	+	+
L 1*	-	-	-	1/3 +	+	+
L 3**	-	-	-	1/3 +	+	+

\* A linhagem L 1 corresponde a *Torula utilis* número 1, do estoque.

\*\*A linhagem L 3 corresponde a *Torula utilis* número 3, do estoque.

Os resultados obtidos (Tabela 15), indicaram que as amostras B 1, B 2 e B 3 isoladas, provavelmente são do gênero *Torula* sp, enquanto que a amostra B 6, possivelmente está classificada em outro gênero de levedura. A amostra B 5, não conseguiu fermentar a rafinose, mas como esse açúcar é apenas parcialmente fermentável pela *Torula utilis*, talvez essa linhagem não esteja tão distante dessa espécie. A amostra B 4, por fermentar totalmente a rafinose pode não estar situada no

mesmo gênero.

Para o ensaio final de produção de proteína foram utilizadas as linhagens B 1 e B 2 providas respectivamente dos bagaços de cana de açúcar velho e novo.

#### 4.4. Obtenção de mutantes resistentes à drogas

Para se iniciar o estudo genético da *Torula utilis*, primeiramente foram obtidos mutantes resistentes às drogas nistatina e cristal violeta, pelo método descrito no item 3.4.9. Os níveis de resistência das linhagens selvagens de *Torula utilis* às duas drogas foram determinados previamente de acordo com o método descrito em 3.4.7.

Os resultados obtidos mostraram que, as linhagens L 1 e L 3 (selvagens) de *Torula utilis* apresentaram crescimento até a concentração de 10,68 µg/ml de nistatina. Quanto ao cristal violeta, as linhagens selvagens L 1 e L 3 de *Torula utilis* tiveram um comportamento diferente, desde que, a linhagem L 1 apresentou crescimento até a concentração de 0,5 µg/ml e a linhagem L 3 se desenvolveu até a concentração de 1,0 µg/ml (Tabelas 16 e 17). A partir da linhagem L 1 foram obtidos mutantes resistentes à concentração de 357 µg/ml de nistatina e 3,5 µg/ml de cristal violeta (Tabelas 16 e 17).

Tabela 16 - Níveis de resistência das linhagens L1 e L3 (selvagens) de *Torula utilis* e das linhagens mutantes resistentes a 71,4 e 357 µg/ml de nistatina (m 71,4 e m 357).

Concentração da droga (µg/ml)	L i n h a g e n s			
	L 1	L 3	m 71,4	m 357
0,00	+	+	+	+
7,14	+	+	+	+
3,57	+	+	+	+
7,14	+	+	+	+
10,68	+	+	+	+
14,24	-	-	+	+
17,80	-	-	+	+
21,36	-	-	+	+
26,70	-	-	+	+
35,70	-	-	+	+
71,40	-	-	+	+
178,50	-	-	-	+
357,00	-	-	-	+
714,00	-	-	-	-

+ = Presença de crescimento.

- = Ausência de crescimento.

Tabela 17 - Níveis de resistência das linhagens L1 e L3 (selvagens) de *Torula utilis* e das linhagens mutantes resistentes a 2,5 e 3,5 µg/ml de cristal violeta (m 2,5 e m 3,5).

Concentração da droga (µg/ml)	L i n h a g e n s			
	L 1	L 3	m 2,5	m 3,5
0,0	+	+	+	+
0,1	+	+	+	+
0,2	+	+	+	+
0,3	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+
1,0	-	+	+	+
1,5	-	-	+	+
2,5	-	-	+	+
3,5	-	-	-	+
5,0	-	-	-	-

+ = Presença de crescimento.

- = Ausência de crescimento.

Foi feito também, um ensaio de competição entre a linhagem L 1 (selvagem) e duas colônias mutantes resistentes a nistatina. Em primeiro lugar, procedeu-se a um ensaio de sobrevivência das linhagens a concentrações crescentes da droga (Tabelas 18, 19 e 20) e em seguida foi analisado o crescimento das mesmas em meio completo (Tabelas 21, 22 e 23). Os resultados obtidos podem também ser melhor visualizados na Figura 7.

Tabela 18 - Dados de sobrevivência de células de *Torula utilis*, linhagem L 1, a concentrações crescentes de nistatina.

Concen- tração da droga ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Número médio de células (dil. $10^{-4}$ )			% média de sobrevivência
	1a. Repetição	2a. Repetição	Média	
0,0	280,000	324,000	302,000	100,00
0,7	242,000	258,000	250,000	82,78
1,7	240,000	280,000	260,000	86,10
3,5	253,000	265,000	264,000	87,42
7,1	230,000	298,000	264,000	87,42
17,8	35,000	23,000	29,000	9,60
35,7	0,002	0,002	0,002	0,0007
71,4	0,001	0,001	0,001	0,0003
178,5	0,000	0,000	0,000	0,00

Tabela 19 - Dados de sobrevivência de células de *Torula utilis*, linhagem mutante resistente a 71,4 µg/ml de nistatina, a concentrações crescentes da droga.

Concentração da droga (µg/ml)	Número médio de células (dil. 10 <sup>-4</sup> )			% média de sobrevivência
	1a. Repetição	2a. Repetição	Média	
0,0	340,0	380,0	360,0	100,000
0,7	276,0	290,0	283,0	78,610
1,7	218,0	270,0	244,0	67,780
3,5	253,0	249,0	251,0	69,720
7,1	200,0	255,0	227,0	63,060
17,8	225,0	267,0	246,0	68,330
35,7	275,0	234,0	256,0	70,560
71,4	68,8	86,4	77,6	21,560
178,5	85,6	56,8	71,2	19,780
357,0	26,0	29,2	27,6	7,670
714,0	8,0	9,6	8,8	2,450
1785,0	2,0	1,0	1,5	0,420
3570,0	0,2	0,0	0,1	0,028

Tabela 20 - Dados de sobrevivência de células de *Torula utilis*, linhagem mutante resistente a 357 µg/ml de nistatina, a concentrações crescentes da droga.

Concentração da droga (µg/ml)	Número médio de células (dil. 10 <sup>-5</sup> )			% média de sobrevivência
	1a. Repetição	2a. Repetição	Média	
0,0	536,0	402,0	469,0	100,00
0,7	454,0	410,0	432,0	92,11
1,7	390,0	432,0	411,0	87,63
3,5	402,0	342,0	372,0	79,32
7,1	360,0	344,0	352,0	75,05
17,8	400,0	312,0	356,0	75,91
35,7	292,0	350,0	321,0	68,44
71,4	131,0	99,0	115,0	24,50
178,5	122,0	78,0	100,0	21,32
357,0	92,0	128,0	110,0	23,45
714,0	112,0	90,0	101,0	21,53
1785,0	20,0	28,0	24,0	5,12
3570,0	5,0	7,0	6,0	1,28

Tabela 21 - Dados de crescimento da linhagem L 1 (selvagem), de *Torula utilis*, em meio completo. Os valores representam médias de duas repetições por amostra.

Tempo (horas)	Diluições	Número médio de col/placa	Nº médio de céls viáveis/ml (Redução a uma levedura)
0	$10^{-1}$	32,0	1,00
4	$10^{-2}$	42,5	8,70
8	$10^{-2}$	134,0	$2,88 \times 10^1$
12	$10^{-3}$	37,6	$7,93 \times 10^1$
16	$10^{-4}$	168,5	$3,48 \times 10^3$
20	$10^{-6}$	48,4	$9,85 \times 10^4$
24	$10^{-7}$	31,4	$6,54 \times 10^5$
28	$10^{-7}$	62,0	$1,30 \times 10^6$
32	$10^{-8}$	78,2	$1,76 \times 10^7$
36	$10^{-9}$	75,2	$1,55 \times 10^8$
42	$10^{-9}$	24,4	$4,96 \times 10^7$
48	$10^{-10}$	19,0	$1,95 \times 10^8$

Tabela 22 - Dados de crescimento de células de *Torula utilis* linhagem mutante resistente a 71,4 µg/ml de nistatina em meio completo. Os valores representam médias de duas repetições por amostra.

Tempo (horas)	Diluições	Número médio de col/placa	Nº médio de céls viáveis/ml (Redução a uma levedura)
0	$10^{-1}$	50,0	1,00
4	$10^{-2}$	16,0	3,37
8	$10^{-2}$	22,0	4,41
12	$10^{-2}$	124,0	$2,62 \times 10^1$
16	$10^{-4}$	64,5	$1,33 \times 10^3$
20	$10^{-6}$	33,0	$7,0 \times 10^4$
24	$10^{-6}$	183,5	$3,79 \times 10^5$
28	$10^{-6}$	66,5	$1,38 \times 10^5$
32	$10^{-8}$	41,0	$8,66 \times 10^6$
36	$10^{-9}$	36,5	$3,25 \times 10^7$
42	$10^{-9}$	23,5	$2,28 \times 10^7$
48	$10^{-10}$	24,5	$1,10 \times 10^8$

Tabela 23 - Dados de crescimento de células de *Torula utilis*, linhagem mutante resistente a 357 µg/ml de nistatina, em meio completo. Os valores representam médias de duas repetições por amostra.

Tempo (horas)	Diluições	Número médio de col/placa	Nº médio de céls viáveis/ml (Redução a uma levedura)
0	10 <sup>-1</sup>	35,0	1,00
4	10 <sup>-2</sup>	82,0	2,33
8	10 <sup>-2</sup>	219,0	6,35
12	10 <sup>-2</sup>	116,0	3,28 × 10 <sup>1</sup>
16	10 <sup>-4</sup>	37,0	1,06 × 10 <sup>3</sup>
20	10 <sup>-6</sup>	38,0	1,08 × 10 <sup>4</sup>
24	10 <sup>-6</sup>	95,5	2,80 × 10 <sup>4</sup>
28	10 <sup>-6</sup>	35,5	7,13 × 10 <sup>4</sup>
32	10 <sup>-8</sup>	41,5	1,20 × 10 <sup>6</sup>
36	10 <sup>-9</sup>	33,0	9,20 × 10 <sup>6</sup>
42	10 <sup>-9</sup>	14,0	1,98 × 10 <sup>6</sup>
48	10 <sup>-10</sup>	72,5	2,09 × 10 <sup>7</sup>

- — ○ L 1 - LINHAGEM SELVAGEM
- △ — △ L 71,4 - LINHAGEM MUTANTE RESISTENTE A 71,4 µg/ml DE NISTATINA
- — ● L 357 - LINHAGEM MUTANTE RESISTENTE A 357 µg/ml DE NISTATINA

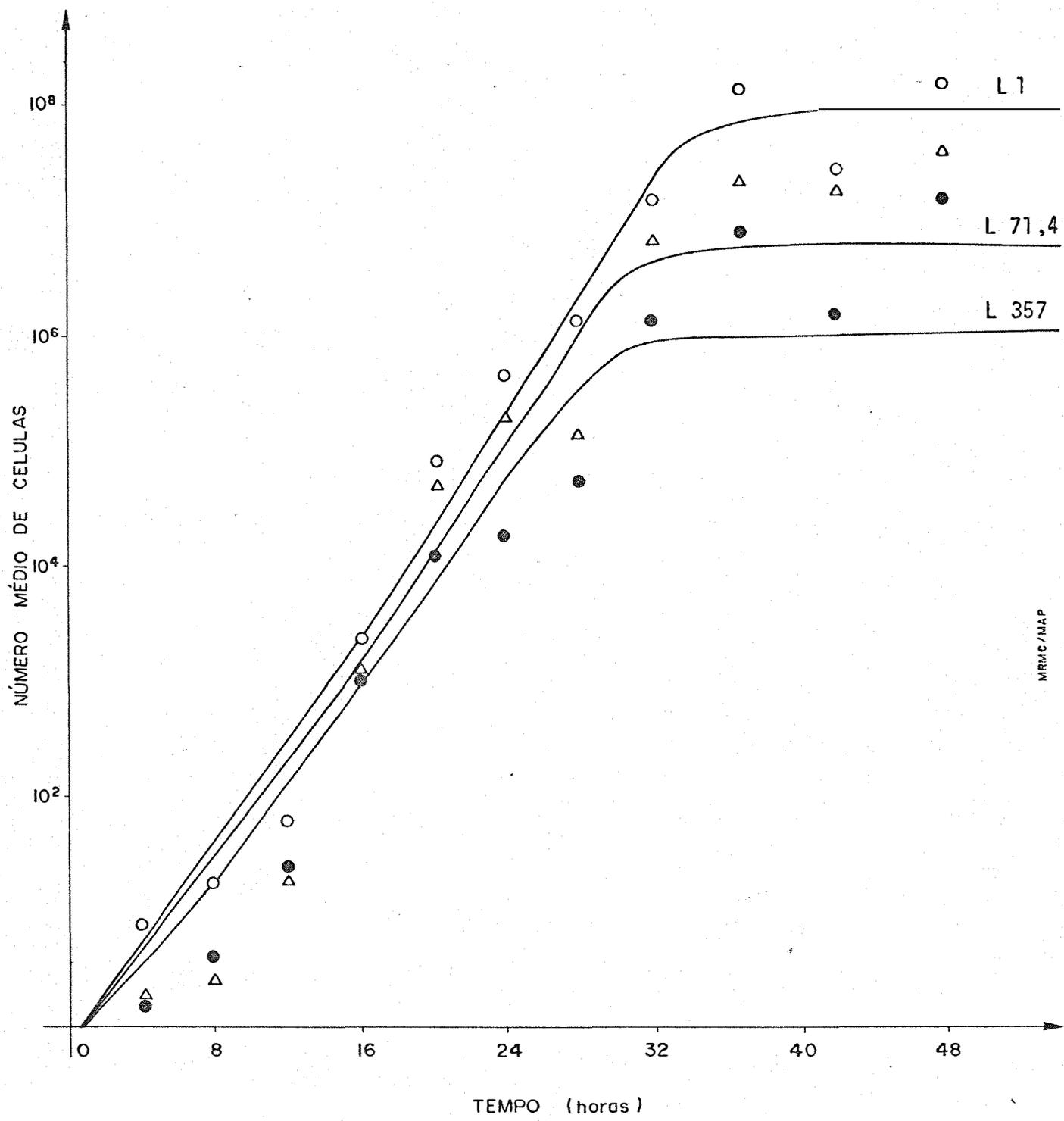


Figura 7 - Curvas de crescimento de três linhagens de *Torula utilis*.

MRMC/MAF

#### 4.5. Tempo de geração das linhagens selvagem e resistentes à nistatina em meio completo: meia vida relativa

A análise do crescimento das linhagens selvagem e resistentes a nistatina, foi feita pelo método descrito no item 3.4.11. Foi observado, um tempo de geração maior para os mutantes resistentes em relação à linhagem selvagem. O maior tempo de geração foi encontrado no mutante resistente a 357 µg/ml em comparação com as demais linhagens (Tabela 24).

Tabela 24 - Taxa de crescimento de três linhagens de *Torula utilis*.

Linhagens	Taxa de geração (gerações/hora)	Tempo de geração (horas / geração)
L 1	0,75	1,33
m 7 1,4	0,72	1,39
m 357,0	0,68	1,47

Quanto ao coeficiente de regressão linear, os valores encontrados para os mutantes resistentes foi inferior ao da linhagem selvagem e os cálculos da meia vida relativa mostraram que, o mutante com maior resistência tem uma meia vida relativa muito mais curta que o mutante com resistência menor (Tabela 25).

Tabela 25 - Valores do coeficiente de regressão linear (r) e da meia vida relativa (MVr) das linhagens de *Torula utilis*.

Linhagens	r	MVr (horas)
L 1	0,1917 ± 0,01400	
m 71,4	0,1904 ± 0,01456	533
m 357,0	0,1686 ± 0,01118	30

#### 4.6. Sobrevivência de células de *Torula utilis* à luz ultra-violeta

Para obtenção de mutantes auxotróficos de *Torula utilis*, foi utilizada a luz ultra-violeta, sendo feita uma curva de sobrevivência das células dessa levedura a esse agente mutagênico, de acordo com o método descrito no ítem 3.4.12.

Os resultados obtidos com este ensaio, constam da Tabela 26 e da Figura 8. Pode-se observar que, usando-se 58 segundos de irradiação com luz ultra-violeta ocorre uma mortalidade de cerca de 95% das células de *Torula utilis*.

Tabela 26 - Dados de sobrevivência da linhagem L 1 de *Torula utilis* à irradiação com luz ultra-violeta (resultados de duas repetições).

Tempo (segundos)	Número de células viáveis			% média de sobrevivência
	1a. Repetição	2a. Repetição	Média	
0	$5,4 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$	100,00
10	$4,2 \times 10^7$	$3,8 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$	80,80
20	$2,4 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	40,40
30	$1,3 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	36,40
40	$1,4 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	29,30
50	$9,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$	17,20
55	$3,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	8,10
60	$3,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	1,00
90	$1,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	0,04

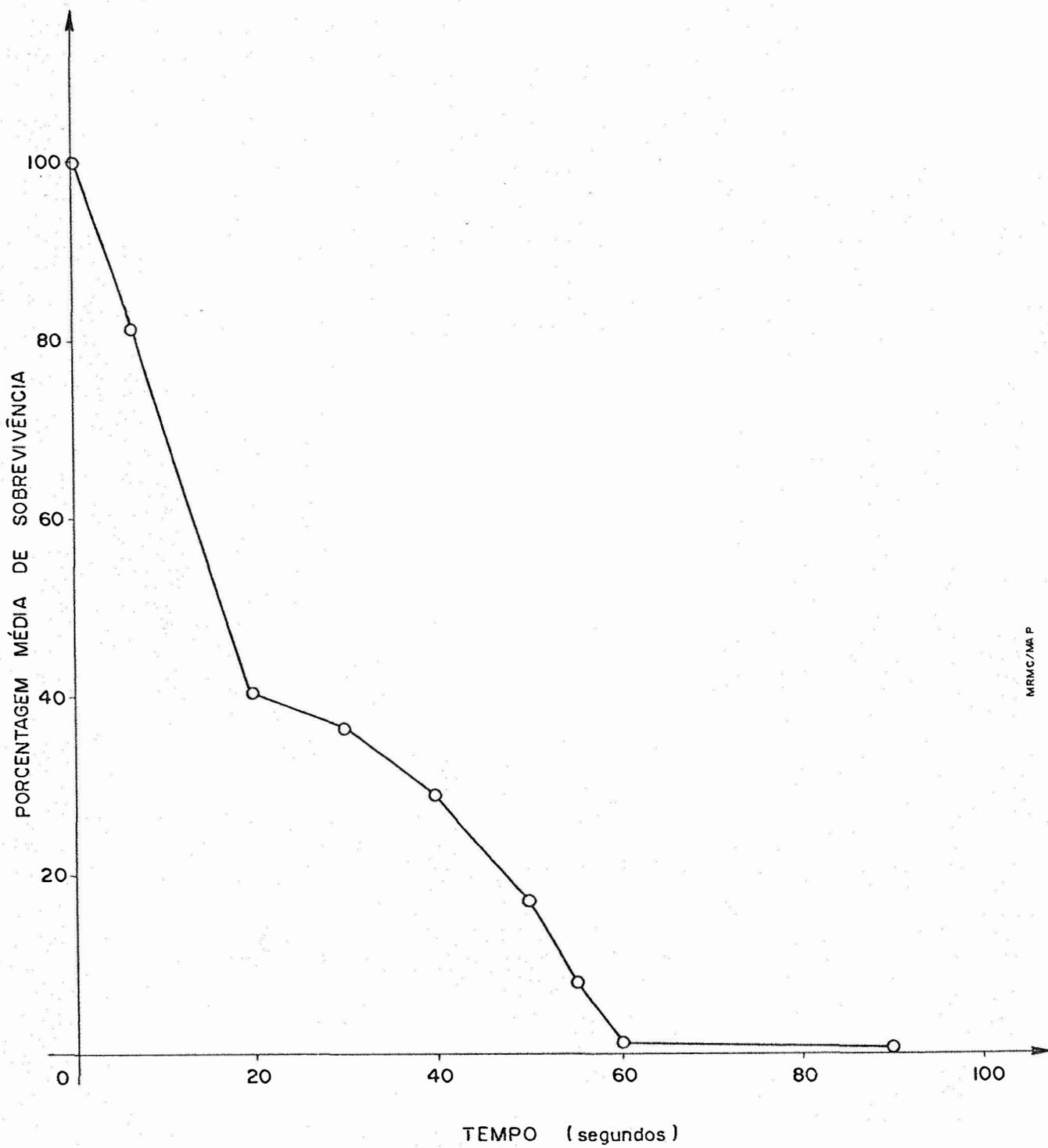


Figura 8 - Sobrevivência da linhagem L 1 de *Torula utilis* à luz ultra-violeta.

MRMC/MA P

Sabe-se, que a ocorrência de mutantes é alta (*BURNETT, 1975*) quando se considera uma sobrevivência de 5% das células e esse tempo foi usado para obtenção de mutantes auxotróficos dessa levedura, nos demais ensaios efetuados.

#### 4.7. Sobrevivência de células de *Torula utilis* em meio líquido adicionado de nistatina

A nistatina foi usada, como agente selecionador de mutantes auxotróficos de *Torula utilis*, e a sobrevivência das células a essa droga foi determinada de acordo com o método descrito em 3.4.13.

A Tabela 27 e Figura 9, apresentam os resultados obtidos. Com esses dados, foi verificado que a nistatina teve um efeito inibitório sobre células de *Torula utilis* com uma concentração de 10 µg/ml, e que esse efeito era tanto mais acentuado quanto maior fosse o tempo de exposição à essa droga.

Para obtenção dos mutantes auxotróficos dessa levedura, foi utilizada a luz ultra-violeta como agente mutagênico e a nistatina como selecionadora dos mutantes, com um tempo de exposição de cerca de 60 minutos.

Tabela 27 - Dados de sobrevivência da linhagem L1 de *Torula utilis*, em meio líquido adicionado de nistatina (concentração de nistatina = 10 µg/ml).

Tempo (minutos)	Número de células viáveis			% média de sobrevivência
	1a. Repetição	2a. Repetição	Média	
0	$2,7 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	100,0
20	$6,0 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$	$6,5 \times 10^4$	23,6
40	$3,2 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	14,4
60	$6,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$	3,2
80	$7,0 \times 10^2$	$8,0 \times 10^2$	$7,5 \times 10^2$	0,3

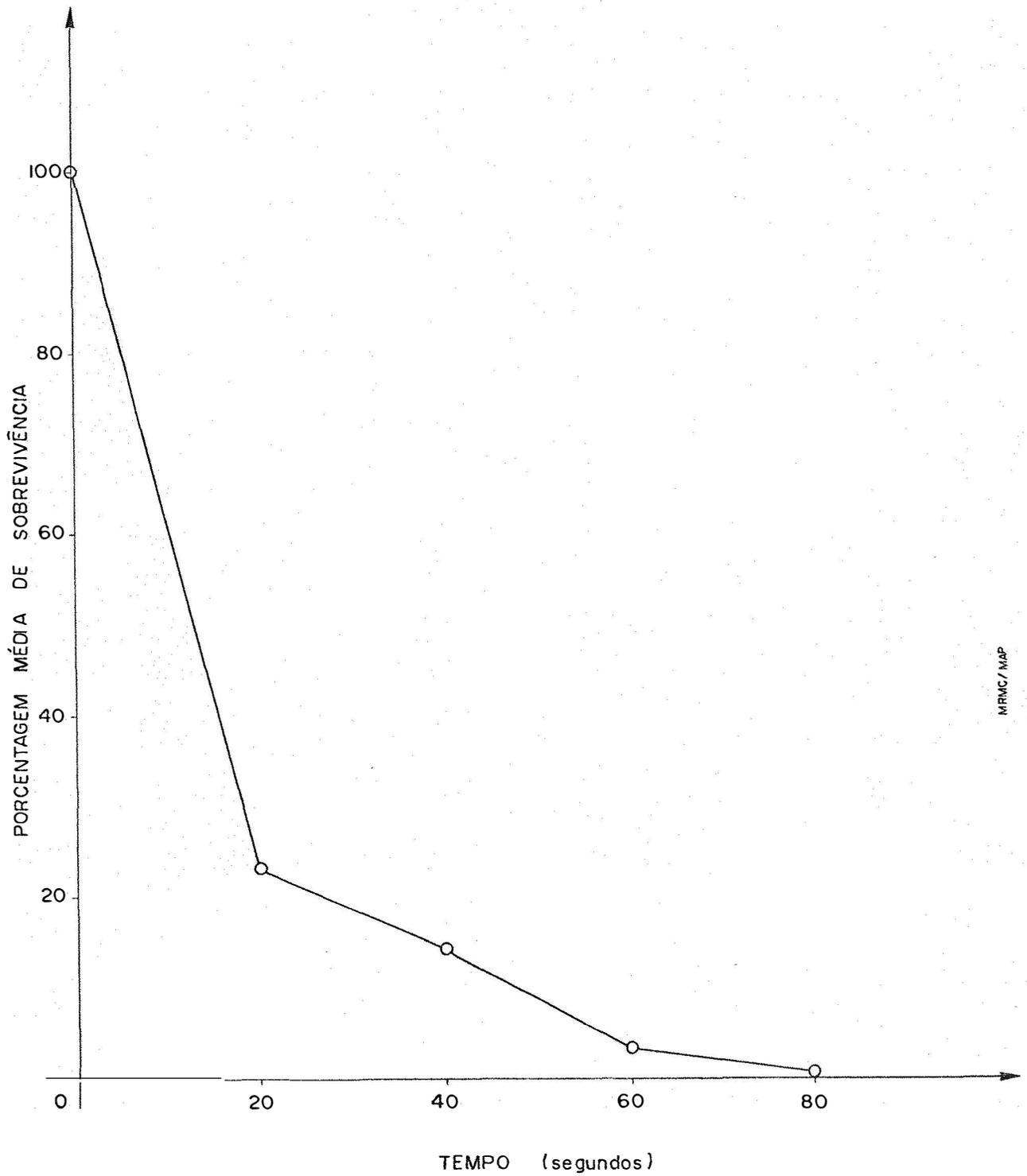


Figura 9 - Sobrevivência da linhagem L 1 de *Torula utilis*, em meio líquido adicionado de nistatina.

#### 4.8. Isolamento de mutantes auxotróficos

O método utilizado para se isolar mutantes auxotróficos de levedura foi aquele descrito no ítem 3.4.14. Foi examinado, um total de 8.000 colônias de *Torula utilis*, linhagem L 1 e foram ensaiadas 50 possíveis colônias das quais 8 foram caracterizadas como mutantes auxotróficos.

Os resultados obtidos com os testes de isolamento dos mutantes, podem ser melhor visualizados nas Figuras 10 e 11.

Pela técnica da réplica de *LEDERBERG e LEDERBERG (1952)* foram selecionados os 50 prováveis mutantes, sendo submetidos a um novo teste nas placas de meio mínimo e meio completo de leveduras.

Nas Figuras 10 e 11 podem ser observadas duas placas, sendo a da esquerda constituída de meio completo e a da direita de meio mínimo. As colônias foram numeradas de 1 a 26 da esquerda para a direita, sendo o número 26, a linhagem selvagem, nas duas placas consideradas. Da placa da Figura 10, foram isoladas as colônias 12, 19 e 25 que não apresentaram crescimento algum no meio mínimo, desenvolvendo-se muito bem no meio completo. Da mesma maneira, foram isoladas as colônias 1, 12, 14, 15 e 16 da placa apresentada na Figura 11. Os mutantes auxotróficos isolados, foram numerados de M 1 a M 8.

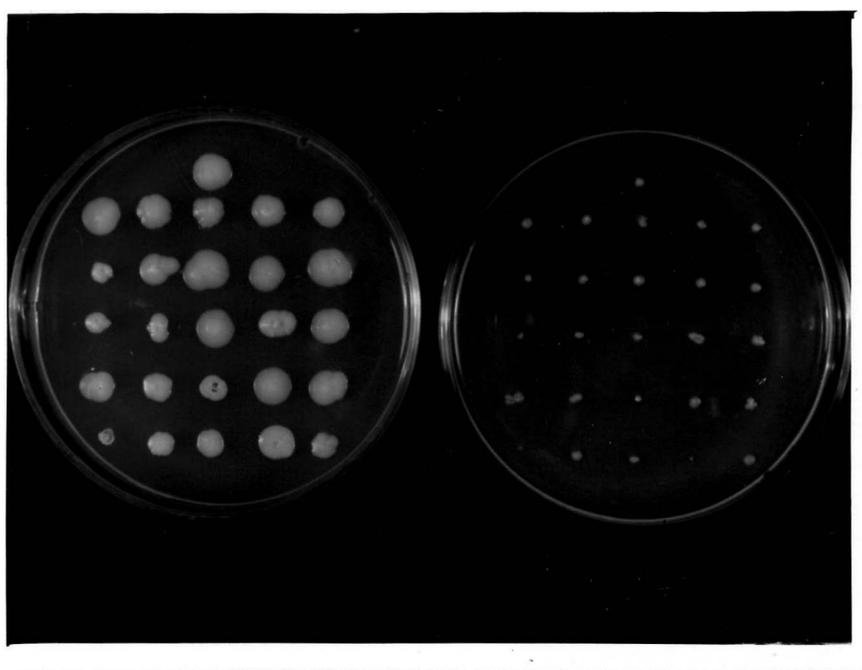


Figura 10 - Detecção de mutantes auxotróficos: placa cõntro-  
le com meio completo (esquerda) e placa com meio  
mínimo (direita).

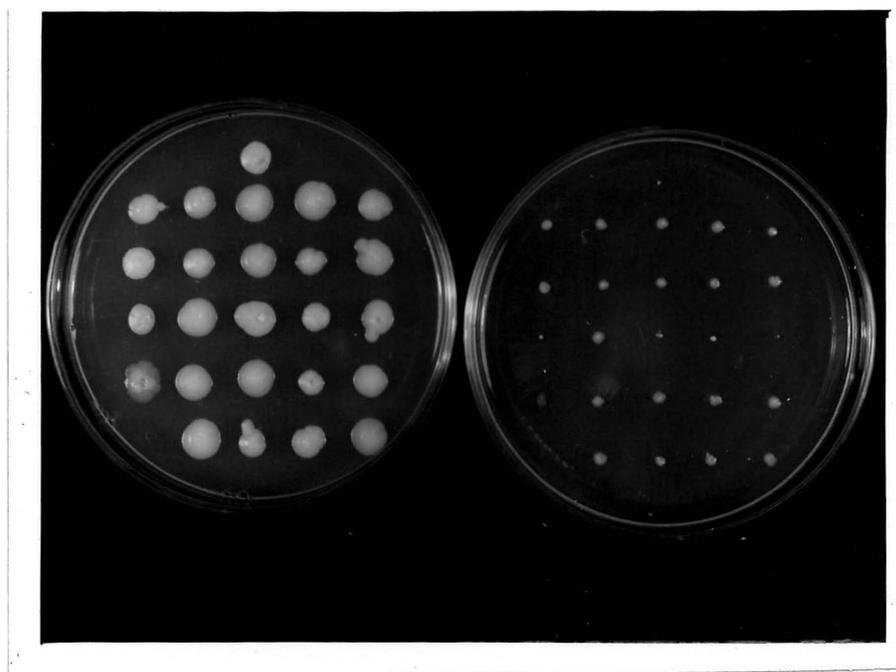


Figura 11 - Detecção de mutantes auxotróficos: placa controle com meio completo (esquerda) e placa com meio mínimo (direita).

#### 4.9. Caracterização dos mutantes auxotróficos

Para a detecção das exigências nutricionais dos mutantes de *Torula utilis* foi utilizado o método descrito no item 3.4.15.

Observou-se que, os mutantes tinham diferentes requisitos nutricionais e não apresentavam deficiências específicas, isto é, requeriam tanto alguns aminoácidos como vitaminas, purinas e pirimidinas para crescer no meio mínimo. O comportamento dos mutantes, diante das soluções de caseína hidrolisada, vitaminas e ácidos nucleicos pode ser observado na Tabela 28. Todos os mutantes apresentaram halos de crescimento ao redor da solução de caseína hidrolisada e com exceção dos mutantes M 3 e M 6, todos os demais cresceram no meio adicionado de ácido nucleico. Para a solução de vitaminas houve resposta de crescimento apenas dos mutantes: M2, M4 e M 8, os demais não apresentaram requisitos para vitaminas. Formaram-se halos de crescimento ao redor da solução de meio completo, para todas as colônias mutantes.

Os resultados da análise das necessidades nutricionais, para cada substância componente dos grandes grupos, constam da Tabela 29. Observou-se que, M 1, apresentou crescimento no meio mínimo suplementado separadamente com os seguintes aminoácidos: triptofano, metionina, isoleucina, treonina ou valina e com os seguintes ácidos nucleicos (pirimi-

dinas): timina, citosina ou uracila. O mesmo mutante não apresentou crescimento, quando eram adicionadas vitaminas, ao meio de cultura.

O mutante M 2, cresceu muito bem nas placas de meio mínimo suplementado com vitaminas ou purinas e pirimidinas. Quanto à suplementação com aminoácidos essa colônia se desenvolveu fracamente quando se acrescentou: triptofano, metionina, treonina ou ácido aspártico, ao meio de cultura.

Quanto aos mutantes M 3 e M 6, embora não sendo provenientes de um único ensaio, apresentaram-se com as mesmas deficiências nutricionais parecendo pertencer a um mesmo grupo de mutantes. Essas colônias só conseguiram se desenvolver no meio mínimo adicionado dos seguintes aminoácidos: triptofano, metionina, treonina ou valina, bem como o fizeram fracamente no meio mínimo adicionado de uracila.

O mutante M 4, apresentou melhor desenvolvimento nas placas que continham purinas ou pirimidinas, embora tivesse crescido fracamente nas placas contendo riboflavina ou piridoxina e alguns aminoácidos como: triptofano, metionina, histidina, treonina ou valina. Da mesma forma, o mutante M 5 apresentou requerimentos principalmente para purinas e pirimidinas, crescendo fracamente em placas contendo o ácido *p*-aminobenzóico e os aminoácidos: prolina, triptofano, metionina, treonina ou valina.

O mutante M 7, apresentou ~~o~~ desenvolvimento no meio mínimo acrescido dos seguintes aminoácidos isoladamente: prolina, arginina, lisina, triptofano, metionina, histidina, treonina, ácido aspártico ou valina, entretanto, no meio mínimo adicionado de guanina, timina ou uracila, houve um pequeno crescimento desse mutante.

O desenvolvimento satisfatório do mutante M 8, no meio de cultura acrescido dos ácidos nucleicos: timina, citosina ou uracila, sugere sua dependência para pirimidina, embora tivesse apresentado um pequeno desenvolvimento quando se acrescentou riboflavina, triptofano, isoleucina, treonina ou valina ao meio mínimo.

Observou-se também, que todos os mutantes se desenvolveram no meio mínimo quando lhe era adicionado triptofano, treonina ou uracila. A maioria deles, com exceção do M 8, cresceu no meio mínimo acrescido de metionina e todos os mutantes exceto o M 2, cresceram quando se acrescentou valina ao meio de cultura.

Foram selecionados, para os testes de cruzamento os mutantes: M 1, M 2, M 3, M 5 e M 7, todos provenientes da linhagem L 1, selvagem.

Tabela 28 - Dados de crescimento de *Torula utilis* em meio completo, meio mínimo e meio mínimo suplementado.

Linhagens	Meio completo	Meio mínimo	Meio mínimo adicionado de		
			Caseína hidrolisada	Vitaminas	Ácidos nucléicos
L 1 (selvagem)	+	+	+	+	+
M 1	+	-	+	-	+
M 2	+	-	+	+	+
M 3	+	-	+	-	-
M 4	+	-	+	+	+
M 5	+	-	+	-	+
M 6	+	-	+	-	-
M 7	+	-	+	-	+
M 8	+	-	+	+	+

+ = Crescimento.

- = Ausência de crescimento.

Tabela 29 - Dados de crescimento de *Torula utilis* em meio mínimo suplementado com aminoácidos, vitaminas e ácidos nucleicos.

Linha-gens	Meio mínimo adicionado de																							
	Aminoácidos				Vitaminas				Ácidos nucleicos															
	pro	arg	lys	trp	met	his	ile	gln	tre	cis	asp	val	nic	paba	tia	ribo	pyro	ade	gua	thi	cit	ura	xant	
M1	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M5	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M6	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M7	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M8	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L1 (Selvag.)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Obs.: pro, arg, lys, trp, met, his, ile, gln, tre, cis, asp, val, nic, paba, tia, ribo, ade, gua, thi, cit, ura, xant, correspondem respectivamente a: prolina, arginina, lisina, triptofano, metionina, histidina, isoleucina, glutamina, treonina, cisteína, ácido aspártico, valina, ácido nicotínico, ácido p-aminobenzóico, tiamina, riboflavina, piridoxina, adenina, guanina, timina, citosina, uracila e xantina.

#### 4.10. Testes de cruzamento

##### 4.10.1. Testes de cruzamento entre mutantes auxotróficos

Os testes de cruzamento, para verificar a existência de algum sistema de recombinação em *Torula utilis*, foram feitos utilizando-se as linhagens mutantes auxotróficas, duas a duas, de acordo com o método descrito em 3.4.16. Os resultados obtidos constam da Tabela 30.

Os mutantes envolvidos nos cruzamentos foram aqueles descritos em 4.9. e estes foram misturados dois a dois em todas as combinações possíveis.

Uma análise dos dados apresentados, sugere a presença de possíveis recombinantes, resultantes de alguns cruzamentos tais como: M 1 x M 2; M 1 x M 5; M 1 x M 7; e M 2 x M 5. Dos cruzamentos: M 2 x M 3; M 3 x M 5; M 3 x M 7; e M 5 x M 7 não resultou crescimento algum nas placas de meio mínimo, em todos os ensaios realizados.

Foi notado que, os recombinantes resultantes dos cruzamentos acima eram bastante precoces, desde que apareceram após 36 horas de cultivo em estufa de 28°C. O seu desenvolvimento no meio mínimo, em relação ao tamanho das colônias foi superior aquele das linhagens selvagens.

Tabela 30 - Dados de crescimento de linhagens de *Torula utilis* envolvidas em testes de cruzamento.

Linhagens	Número médio* de células viáveis	
	MC	MM
Selvagem (L 1)	220	245,0
M 1	183	0,0
M 2	205	0,0
M 3	150	4,0
M 5	139	0,0
M 7	212	2,0
M 1 x M 2	150	6,0
M 1 x M 3	147	7,5
M 1 x M 5	201	4,0
M 1 x M 7	173	15,0
M 2 x M 3	152	0,0
M 2 x M 5	167	5,0
M 2 x M 7	193	0,0
M 3 x M 5	126	0,0
M 3 x M 7	138	0,0
M 5 x M 7	210	0,0

\*Os valores, representam médias do número de células em 5 placas. As contagens foram feitas após 36 horas de incubação.

#### 4.10.2. Testes de cruzamento entre mutantes resistentes à drogas

Os mutantes de *Torula utilis*, resistentes às drogas nistatina e cristal violeta foram cruzados, conforme o método descrito em 3.4.16., para verificar a presença de recombinantes.

Os mutantes utilizados, apresentavam os seguintes níveis de resistência:

m 71,4 - Resistente a 71,4 µg/ml de nistatina e 0,5 µg/ml de cristal violeta.

m 3,5 - Resistente a 10,6 µg/ml de nistatina e 3,5 µg/ml de cristal violeta.

Pelos resultados obtidos (Tabela 31), pode-se verificar a ausência de crescimento das células de *Torula utilis* mutantes resistentes a nistatina, nas placas contendo cristal violeta, da mesma maneira que células de *Torula utilis* mutantes resistentes ao cristal violeta, não se desenvolveram nas placas de meio completo adicionadas de nistatina. Entretanto, notou-se facilmente o grande número de células que se desenvolveu em todos os meios utilizados, quando o inóculo era resultante do cruzamento entre os dois mutantes.

Tabela 31 - Dados de crescimento de linhagens de *Torula utilis*, resistentes à drogas.

Linhagens	Número médio* de células viáveis			
	MC	MC + nist.	MC + c. violeta	MC + nist. + c. violeta
Res. nistatina	65	34	0	0
Res. cristal violeta	67	0	73	0
Res. nist. x res. c. violeta	73	56	67	48

\*Os valores representam médias da contagem do número de células de 5 placas.

#### 4.11. Ensaio de produção

##### 4.11.1. Análise da produção celular das linhagens de *Torula*

Com a finalidade de verificar a variabilidade existente, em termos de produção de biomassa, entre as diferentes linhagens de *Torula*, envolvidas neste estudo, procedeu-se a um ensaio de produção em agitador, a 28°C por um período de 48 horas, de acordo com o método descrito em 3.4.3.

A Tabela 32, resume os resultados obtidos e pode ser observada uma desvantagem, em termos de produção ce-

lular, das linhagens mutantes de *Torula* em relação as linhagens selvagens e isoladas do bagaço de cana de açúcar, principalmente na amostra de 24 horas de cultivo. Quanto a amostra de 48 horas, os mutantes auxotróficos apresentaram um desenvolvimento semelhante ao das linhagens selvagens e isoladas de bagaço de cana de açúcar enquanto que, os mutantes resistentes a drogas apresentaram uma produção inferior.

A análise estatística dos dados de absorbância e peso seco (Tabelas 33 e 34) das linhagens de *Torula* (amostra de 24 horas), confirmaram os resultados acima desde que, as linhagens mutantes foram significativamente inferiores em termos de produção celular às linhagens selvagens e isoladas do bagaço de cana de açúcar. Observou-se ainda que, a produção celular das linhagens mutantes auxotróficas, foi também inferior àquela dos mutantes resistentes a drogas. As linhagens isoladas do bagaço de cana de açúcar e selvagens não diferiram estatisticamente quando o caráter analisado foi peso seco. Quanto ao caráter absorbância, as linhagens selvagens foram significativamente inferiores àquelas isoladas do bagaço de cana de açúcar.

Também para a amostra de 48 horas, a análise estatística, confirmou a produção celular significativamente mais baixa dos mutantes resistentes a drogas, em relação às demais linhagens estudadas (Tabela 35).

Os resultados obtidos (Tabela 32) com o teste de produção das linhagens de *Torula*, foram ensaiados em Experimentos Inteiramente Casualizados com duas repetições e após a revelação da significância de teste F, na análise de variância, procedeu-se a aplicação do teste de Tukey que compara médias, de acordo com os esquemas de *PIMENTEL GOMES (1963)*.

Tabela 32 - Dados de absorvância e peso seco de linhagens de *Torula*.

Linhagens	Amostra das 24 horas		Amostra das 48 horas	
	Absorbância*	Peso seco (g/l)	Absorbância	Peso seco (g/l)
L 1	7,20	4,20	10,00	5,20
L 3	7,50	4,10	10,00	5,10
M 1	0,70	0,55	10,00	5,00
M 2	0,70	0,64	10,00	5,00
M 3	0,35	0,43	10,00	4,60
M 5	1,70	1,14	9,50	4,50
M 7	2,20	1,30	9,80	4,90
m 71,4	5,70	3,10	9,70	3,70
m 3,5	4,90	2,90	9,00	3,80
B 1	8,50	4,40	10,00	5,00
B 2	9,30	4,60	10,00	4,90

\*Os valores de absorvância e peso seco representam médias de duas repetições por amostra.

Tabela 33 - Ensaio de produção das linhagens de *Torula*. Análise de variância para o caráter absorbância (24 horas). Experimento Inteiramente Casualizado com duas repetições.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Linhagens	10	231,254	23,125	152,138**
Resíduo	11	1,669	0,152	
Total	21			

Tabela 34 - Ensaio de produção das linhagens de *Torula*. Análise de variância para o caráter peso seco em g/l. (24 horas). Experimento Inteiramente Casualizado com duas repetições.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Linhagens	10	57,649	5,764	653,515**
Resíduo	11	0,097	0,00882	
Total	21			

Tabela 35 - Ensaio de produção das linhagens de *Torula*. Análise de variância para o caráter peso seco em g/l (48 horas). Experimento Inteiramente Casualizado com duas repetições.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Linhagens	10	5,240	0,524	48,073**
Resíduo	11	0,120	0,0109	
Total	21			

#### 4.11.2. Análise da produção celular das linhagens de *Torula*, isoladas do bagaço de cana de açúcar

Foi feito um ensaio de produção, com as linhagens B 1 e B 2, (comparadas com a linhagem L 1) isoladas respectivamente de bagaço de cana de açúcar velho e novo, e foram consideradas as medidas de pH, absorvância, peso seco e teor de proteína, conforme os métodos descritos em 3.4.4. e 3.4.5.

Os resultados obtidos, constam da Tabela 36, e pode ser observada uma certa variabilidade com relação as medidas consideradas, para as diferentes linhagens. Quanto ao caráter matéria seca, foi notada uma produção maior das linhagens B 1 e B 2 em relação a linhagem selvagem. Quanto as medidas de absorvância e proteína, houve um aumento gradativo em relação ao tempo de cultivo, para as três linhagens ensaiadas, chegando a estabilização em torno da amostra de 20 horas. Os resultados obtidos podem ser melhor visualizados, nas Figuras 12, 13, 14 e 15.

Foi feita uma análise estatística dos resultados obtidos, para cada caráter ensaiado, como pode ser observado nas Tabelas (37 a 39).

Tabela 36 - Dados de produção de biomassa e proteína de três linhagens de *Torula* (média de duas medidas por linhagem).

Tempo (horas)	L I N H A G E N S											
	L 1				B 1				B 2			
	Mat. seca (g/l)	$\bar{A}b$ 660 nm	Proteína g/l	%	Mat. seca (g/l)	$\bar{A}b$ 660 nm	Proteína g/l	%	Mat. seca (g/l)	$\bar{A}b$ 660 nm	Proteína g/l	%
0	0,31	0,07	0,048	15,5	0,47	0,09	0,060	12,3	0,33	0,08	0,005	16,5
4	0,40	0,27	0,174	43,5	0,60	0,36	0,103	17,2	0,65	0,21	0,132	20,2
6	0,52	0,21	0,123	23,7	0,92	0,36	0,168	27,1	1,07	0,49	0,316	29,5
8	0,83	0,42	0,271	32,7	1,16	0,82	0,271	28,2	1,79	1,04	0,671	37,6
12	2,57	0,94	0,607	23,6	3,07	0,89	0,575	27,8	3,74	1,34	0,865	24,4
16	3,52	1,49	0,962	27,3	4,59	0,89	0,575	17,0	3,83	1,54	0,994	26,0
20	3,90	1,34	0,865	22,2	5,61	1,44	0,801	17,4	4,34	1,29	0,833	20,6
24	3,43	1,29	0,833	24,3	6,44	1,41	0,736	13,5	5,16	1,34	0,865	20,8
48	5,01	1,49	0,962	19,2	11,47	1,69	0,962	9,2	6,87	1,34	0,865	13,6

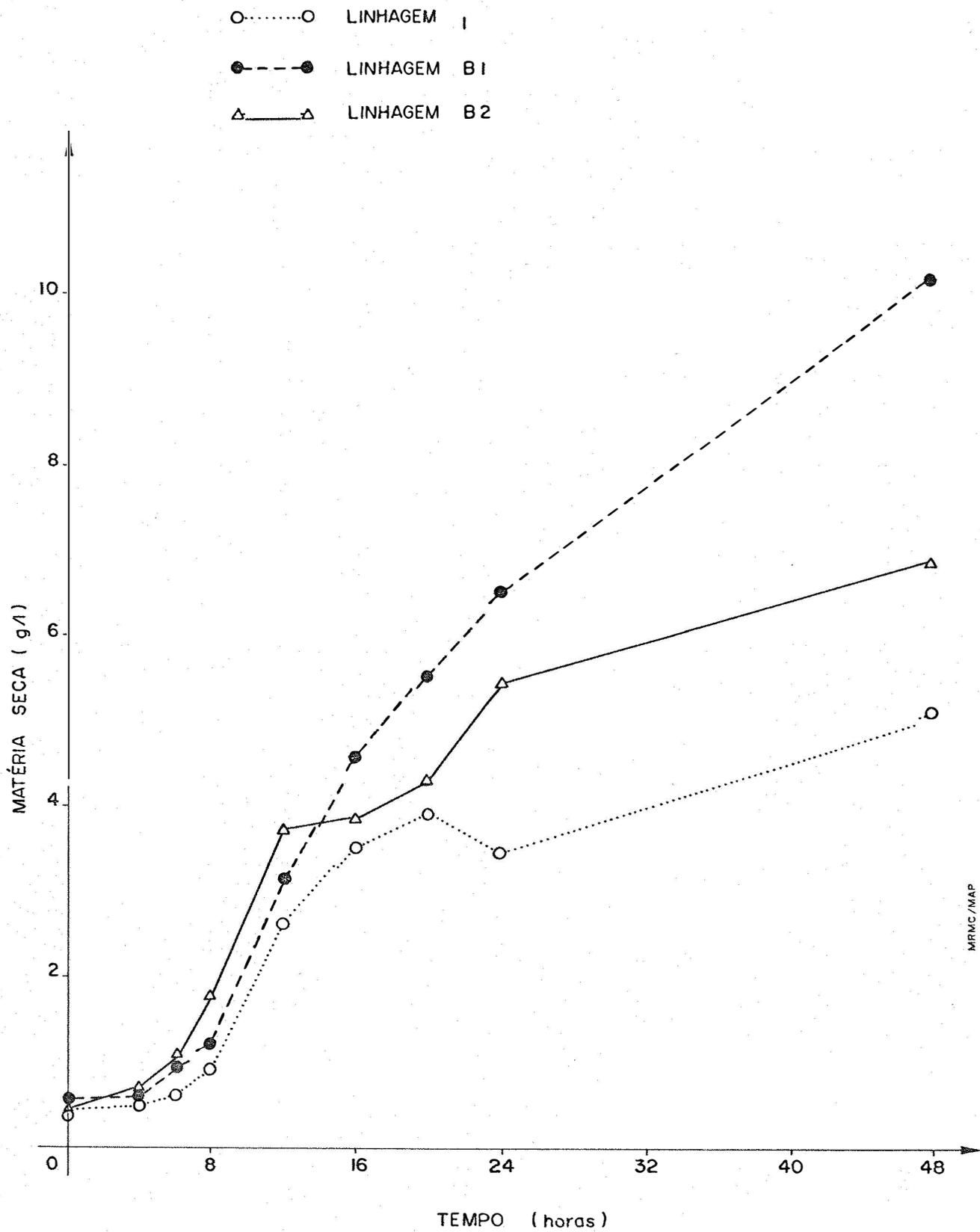


Figura 12 - Produção de matéria seca (g/l) por três linhagens de *Torula*.

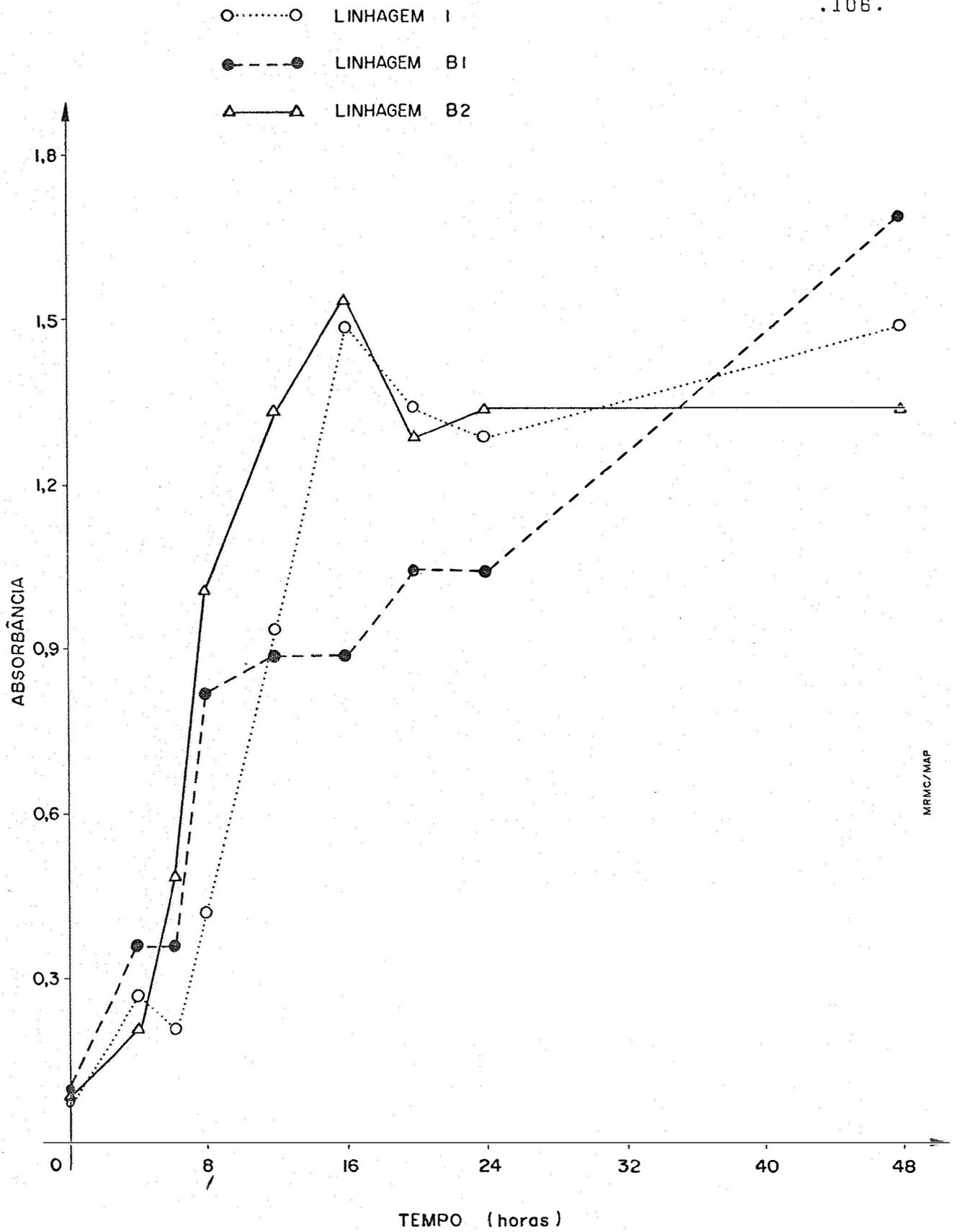


Figura 13 - Dados de absorbância de três linhagens de *Torula*, a diferentes tempos de cultivo.

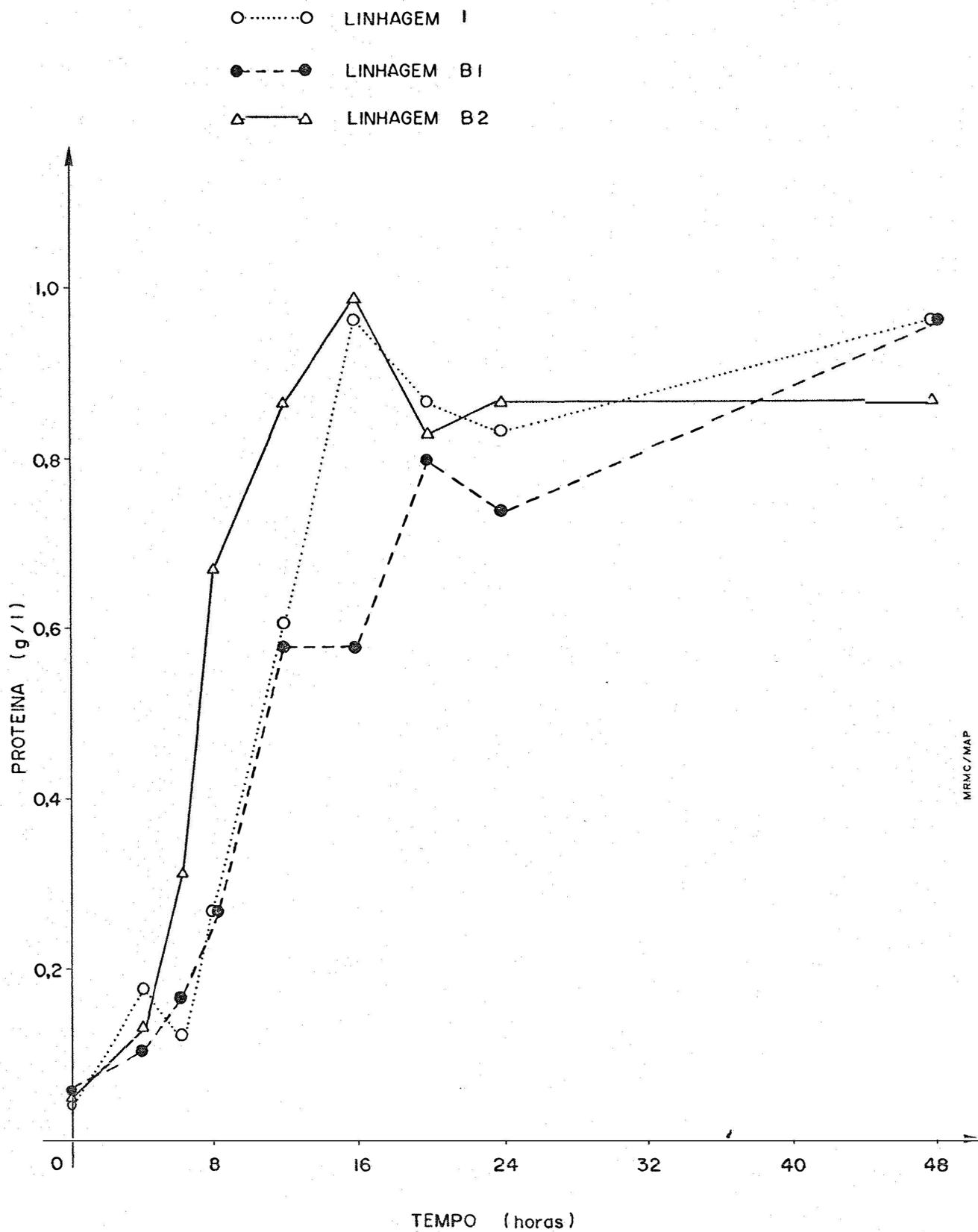


Figura 14 - Produção de proteína (g/l) por três linhagens de *Torula*.

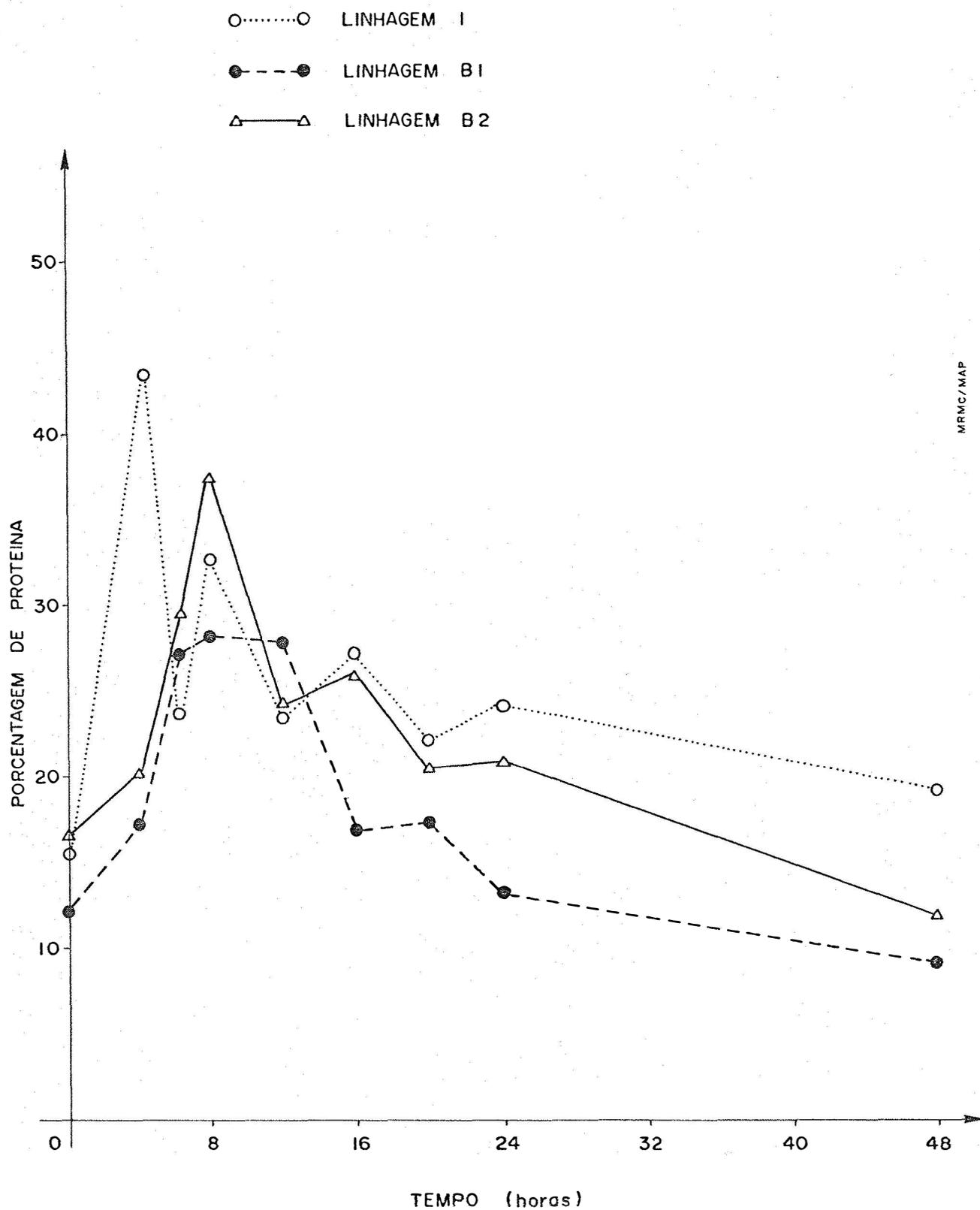


Figura 15 - Produção de proteína (%) em relação à matéria seca, por três linhagens de *Torula*.

Tabela 37 - Ensaio de produção de três linhagens de *Torula*. Análise de variância para o caráter matéria seca em g/l. Blocos ao Acaso com 9 amostras e 3 linhagens.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Linhagens	2	10,66	5,33	4,63*
Amostras	8	153,32	19,17	16,67**
Resíduos	17	19,60	1,15	
Total	27			$\bar{X} = 3,053,06$ C.V. = 35,05

Como o teste F (Tabela 37), deu significativo ao nível de 95% de probabilidade, isso quer dizer que existem diferenças entre linhagens para a medida de matéria seca. Para testar as linhagens que diferiam foi usado o teste de Tukey, que mostrou ser a linhagem B 1 mais produtiva que a L 1 e semelhante a B 2. Quanto as linhagens L 1 e B 2 não foram detectadas diferenças significativas entre elas, para a produção de matéria seca (g/l).

O valor, altamente significativo do teste F, para as amostras era esperado para uma cultura em crescimento, mas o teste de Tukey foi aplicado com a finalidade de se conhecer o ponto de máximo crescimento da cultura. Os resultados obtidos mostraram que, nas primeiras amostras (0 a 6 horas) a produção de matéria seca foi estatisticamente menor que

nas demais, sendo semelhantes entre si. Contudo, as amostras de 8 a 16 horas só foram estatisticamente menos produtivas do que a amostra de 48 horas, sendo semelhantes entre si. As amostras de 20 a 48 horas, não diferiram estatisticamente em termos de produção de matéria seca (g/l).

Tabela 38 - Ensaio de produção de três linhagens de *Torula*. Análise de variância para o caráter proteína em g/l. Blocos ao Aleaso com 9 amostras e 3 linhagens.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Linhagens	2	0,111	0,055	5,5**
Amostras	8	2,88	0,36	36,0**
Resíduo	17	0,17	0,01	
Total	27			$\bar{X} = 0,54$ C.V. = 18,51

Como os valores de F, foram altamente significativos (99% de probabilidade) para linhagens e amostras (Tabela 38) para o caráter produção de proteína, pode-se dizer que existem diferenças entre as linhagens e entre as amostras dessas linhagens, para o caráter em questão.

Para saber quais as linhagens que diferiam entre si, foi aplicado o teste Tukey, sendo verificado que a linhagem B2 foi estatisticamente mais produtiva que a B1 e não diferiu da L1. Por outro lado, as linhagens L1 e B1 não di

feriram estatisticamente em termos de produção de proteína (g/l).

Quanto aos resultados do teste Tukey, para amostras foi verificado que as amostras de 0 a 8 não diferiram entre si mas foram estatisticamente inferiores as demais, para produção de proteína. Da mesma maneira, não foram detectadas diferenças significativas entre as amostras de 16 a 48 horas de cultivo, para o mesmo caráter.

Tabela 39 - Ensaio de produção de três linhagens de *Torula*. Análise de variância para o caráter % de proteína em relação a matéria seca. Blocos ao Acaso com 9 amostras e 3 linhagens.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Linhagens	2	220,79	110,40	4,08*
Amostras	8	900,28	112,50	4,15**
Resíduos	17	460,34	27,08	
Total	27			$\bar{X} = 22,63$ C.V. = 22,99

Como os valores foram significativos para blocos, ao nível de 5% de probabilidade para o caráter % de proteína em relação à matéria seca (Tabela 39) provavelmente, existem linhagens que diferem para esse caráter. Os resulta-

dos do teste Tukey mostraram que a linhagem L 1 foi mais produtiva que a B 1 e semelhante a B 2 e não foram estatisticamente diferentes as linhagens B 1 e B 2, para o mesmo caráter.

Quanto as amostras, foi verificada uma alta significância do teste F (99%) sugerindo diferenças entre elas. O teste Tukey mostrou que, as amostras de 0 e 48 horas foram estatisticamente diferentes para % de proteína ao contrário das demais (amostras de 4 a 24 horas) que foram estatisticamente semelhantes para o mesmo caráter.

Os resultados obtidos, foram reunidos na Tabela 40.

Tabela 40 - Teste de Tukey para os caracteres: matéria seca (g/l), proteína (g/l) e % de proteína, de três linhagens de *Torula*.

Linhagens	Matéria seca (g/l)	Proteína (g/l)	% de Proteína
	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
L 1 Selvagem	2,28 a*	0,54 a	25,8 a
B 1	3,81 b	0,47 a, b	18,9 b
B 2	3,09 a, b	0,62 a, c	23,2 a, b

Teste de Tukey: diferenças mínimas significativas.

Matéria seca { 1% = 1,70  
5% = 1,30

Proteína(g/l) { 1% = 0,16  
5% = 0,12

% de Proteína { 1% = 8,20  
5% = 6,28

\*Em cada coluna, médias com a mesma letra não diferem estatisticamente.

## 5. DISCUSSÃO

A procura de novas fontes de alimentos e da melhoria daquelas já existentes, foi uma das grandes preocupações do homem desde os primeiros tempos de sua vida, quando muitos recursos naturais existiam e muitas espécies de plantas e animais úteis para a alimentação não tinham ainda sido descobertos ou explorados.

Até nossos dias, pesquisas foram feitas no campo da Genética e do Melhoramento de Plantas e Animais Superiores, mas são recentes os estudos da utilização de microrganismos como suplemento protéico das dietas alimentares. Contudo, necessários se tornam cada vez mais esses estudos, uma vez que, o acréscimo populacional nos últimos anos tem-se distanciado bastante do suplemento alimentar disponível, tornando incerto

o futuro do homem em termos de alimentação (BHATTACHARJEE, 1970).

Aliados aos estudos microbiológicos, bioquímicos e nutricionais que já vem sendo feitos, estudos genéticos também se revestem de grande importância pois através deles, poderão ser conseguidas linhagens mais produtivas e selecionadas para diversas condições. Para que esses estudos sejam realizados a contento, há então necessidade de se conhecer a variabilidade natural dentro da espécie escolhida bem como a possibilidade de cruzamento de linhagens através de um ou mais sistemas de recombinação.

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, que visou o estudo da variabilidade do caráter produção de biomassa em leveduras do gênero *Torula* e a verificação da existência de recombinação na espécie *Torula utilis* a discussão será dividida nos seguintes tópicos: variabilidade natural em *Torula*, isolamento de mutantes e recombinação.

### 5.1. Variabilidade natural em *Torula*

Um ensaio preliminar realizado com as oito linhagens disponíveis mostrou que as medidas de peso seco obtidas após 48 horas de crescimento não apresentaram diferenças significativas (Tabelas 4 e 5). No entanto, quando quatro dessas linhagens foram estudadas mais detalhadamente, após poucas horas de incubação já se notavam diferenças entre as linha

gens (Tabelas 6 a 11). Possivelmente então, uma triagem de linhagens para seleção com relação à matéria seca e outras características deve ser feita, após poucas horas de incubação, isto é, na fase logarítmica de crescimento. Inclusive, em determinados tempos nota-se grande variação na porcentagem de proteína; por exemplo, após 3 horas de incubação atinge-se um ponto máximo de porcentagem de proteína. Esse pico deve corresponder a fase que antecede a logarítmica, quando as células devem acumular proteínas para iniciar a fase de divisão exponencial. Os resultados obtidos, confirmaram as afirmações de *TAVARES (1974)*, que encontrou grande variação natural entre linhagens de *Saccharomyces uvarum* ensaiadas.

A escolha das linhagens mais promissoras foi feita, com a finalidade de aproveitar a variabilidade já existente nos demais ensaios de produtividade e acrescentar que o início de qualquer programa que vise o melhoramento de espécies de *Torula* para produtividade celular ou protéica deve ser a seleção das linhagens selvagens, como mostrou ainda *TAVARES (1974)*.

De acordo com as Tabelas 6 a 11 e as Figuras 1, 2 e 3 as linhagens L 1 e L 3 foram selecionadas para os demais experimentos desde que, a linhagem L 1 apresentou-se como a mais produtiva em termos de matéria seca e quantidade de proteína (g/l), características importantes quando se pretende produzir biomassa para fins industriais. Para os objetivos deste trabalho, a linhagem L 3, foi também escolhida, pois

além de ter uma produção semelhante às demais, possuía as características desejáveis para os nossos propósitos.

O relativamente fácil isolamento de leveduras do gênero *Torula* de resíduos industriais, como o bagaço de cana de açúcar, mostrou que esses organismos podem sobreviver em resíduos industriais, que podem ocasionar problemas de poluição ambiental. O aproveitamento de resíduos industriais para crescimento de leveduras do gênero *Torula*, tem sido constantemente citado principalmente por SERZEDELLO *et alii* (1970), THATCHER (1954), BHATTACHARJEE (1970), e KIHBERG (1972).

Além disso, os ensaios de produção celular e de proteína das linhagens de *Torula* isoladas do bagaço de cana de açúcar (Tabelas 13, 14 e 15) em comparação com a linhagem L 1 (original) de *Torula utilis* sugeriram a existência de variabilidade natural nesse gênero de leveduras, principalmente para as seguintes características: produção de matéria seca e proteína. Essa variabilidade, detectada entre espécies isoladas da natureza seria de grande valia nas indústrias interessadas em produzir leveduras em larga escala para uso nas dietas alimentares, desde que, antes da melhoria da espécie pelo uso de agentes mutagênicos, seriam selecionadas da natureza as linhagens mais produtivas para os caracteres desejados. O próprio TAVARES (1974) já havia sugerido essa idéia a exemplo das inúmeras seleções que são efetuadas em plantas e animais superiores, nos programas de melhoramento das espécies.

## 5.2. Isolamento de mutantes

Para que qualquer trabalho de Genética possa ser realizado é necessário primeiramente, o isolamento de mutantes que se diferenciem do tipo original ou selvagem em uma ou mais características. Em microrganismos, diversos tipos de mutantes são utilizados, maior ênfase sendo dada aos mutantes auxotróficos e resistentes à drogas, devido ao seu fácil isolamento e caracterização (FINCHAM e DAY, 1971). Especificamente em leveduras um grande número de mutantes dos mais diversos tipos tem sido isolados, principalmente nos gêneros *Saccharomyces* (SHERMAN e LAWRENCE, 1974) e *Schizosaccharomyces* (GUTS et alii, 1974).

No entanto, no gênero *Torula* poucos são os trabalhos a respeito, e mesmo assim visando mais estudos bioquímicos do metabolismo de aminoácidos do que propriamente estudos genéticos (EHRENSVÄRD et alii, 1947; 1951; STRASSMAN et alii, 1953; 1956). Assim, em uma primeira etapa tiveram que ser isolados mutantes na espécie em estudo, a escolha recaindo em mutantes resistentes à drogas e deficientes nutricionais.

Mutantes resistentes à nistatina foram obtidos a partir de uma linhagem selvagem (L 1) e altos níveis de resistência foram conseguidos espontaneamente após a utilização da técnica da placa gradiente (BRYSON e SZYBALSKY, 1952) (Ta-

bela 16). Uma outra droga utilizada, foi a cristal violeta onde, pela mesma técnica mutantes resistentes foram obtidos (Tabela 17).

Mutantes resistentes a nistatina já foram obtidos em diversas espécies de leveduras. *STACHIEWICZ e QUASTEL (1963)*, verificaram que a nistatina inibe o crescimento da maioria dos fungos em concentrações que variam de 1 a 10 µg/ml. Por outro lado, *BODENHOFF (1969)* estudando a resistência de amostras de *Candida* e *Torulopsis* à nistatina verificou que a concentração mínima inibitória para essas espécies era de 30 µg/ml, resistência essa superior a das linhagens de *Torula utilis* por nós estudadas.

Quanto ao corante cristal violeta, foi verificado que acima de 1 µg/ml havia inibição do crescimento de *Torula utilis* - L 1. Para a linhagem L 3 a concentração mínima inibitória de cristal violeta foi de 1,5 µg/ml. Os resultados obtidos no presente trabalho, concordaram com aqueles citados por *PELCZAR e REID (1966)* para os fungos dos gêneros *Monília* e *Torula*.

Quanto aos mutantes de *Torula utilis* resistentes à nistatina, foi observado que o modelo de resistência era de múltiplos passos (Tabelas 18, 19 e 20) a exemplo do que já havia sido descrito por *CÂMPOS (1973)* para a mesma droga aplicada a *Candida albicans*. *DEMEREK (1948)*, admitiu que, a re-

sistência por múltiplos passos era controlada por vários genes com potencialidades semelhantes e a cada passo o microrganismo que estaria sendo selecionado, mutaria para um desses genes que se somariam aos demais, aumentando assim a sua resistência. No nosso caso, foram obtidos mutantes para diferentes concentrações de nistatina, cujas resistências aumentaram a cada passo; a seleção requereu várias passagens pelas placas gradientes o que nos levou a considerar o modelo de resistência como sendo de múltiplos passos.

Para o corante cristal violeta, o modelo de resistência foi também provavelmente de múltiplos passos, desde que, a resistência das células foi aumentando gradativamente.

Com relação aos mutantes resistentes à nistatina, tornou-se interessante um estudo mais detalhado dos mesmos antes de empregá-los nos testes de cruzamentos. Assim, curvas de crescimento de dois mutantes resistentes foram realizadas em comparação com a linhagem L 1 original e sensível (Tabelas 21, 22 e 23 e Figura 7). Foi assim possível, o cálculo do tempo de geração dos mutantes e da linhagem original, notando-se um maior tempo de geração para os mutantes (Tabela 24).

As curvas de crescimento das células de *Torula utilis* selvagem, mutantes resistentes a 71,4 µg/ml e a 357 µg/ml de nistatina, concordaram com aquelas obtidas por *BERGAMIM FILHO (1973)* e *CAMPOS (1973)*. Foi observada, no meio

completo ausente da droga uma desvantagem em termos de crescimento das linhagens mutantes em relação a selvagem. Notou-se que, o grau de resistência teve influência na taxa de crescimento, pois a linhagem mutante resistente a 71,4  $\mu\text{g/ml}$  de nistatina, foi inferior a linhagem selvagem e superior a linhagem mutante resistente a 357  $\mu\text{g/ml}$  naquele meio. A linhagem mutante resistente a 357  $\mu\text{g/ml}$ , foi a que apresentou menor crescimento no meio completo sem nistatina. Os fatos acima se explicam, pela necessidade das linhagens mutantes resistentes, em mutar para genes de resistência em detrimento de algumas de suas características, como por exemplo crescimento em meio completo. É provável que, a mutação para esses genes tenha modificado o genótipo, das linhagens mutantes, que era adaptado ao meio em questão, tornando-o menos apto que as linhagens selvagens, para esse caráter. Quanto as diferenças de crescimento, em função do grau de resistência das linhagens, foi interessante notar que, a linhagem com resistência menor apresentou-se mais adaptada ao meio completo, que a linhagem mais resistente, desde que deve ter mutado para um número menor de genes e seu genótipo apresentou-se menos modificado que o da linhagem mutante resistente a 357  $\mu\text{g/ml}$  de nistatina.

As curvas de sobrevivência das linhagens de *Torula utilis*, mutantes resistentes a nistatina e selvagem, em meio completo adicionado da droga sugeriram como anteriormen-

te, que as linhagens mutantes apresentaram vantagens em termos de crescimento, em relação a linhagem selvagem, por estarem melhor adaptadas nesse meio.

Foi notado, pelo cálculos do coeficiente de regressão linear das linhagens selvagem e mutantes resistentes que, a nistatina é uma droga forte desde que, o coeficiente de regressão linear foi menor nas linhagens mutantes em relação à selvagem. Quanto a meia vida relativa (MVR) das mesmas, foi interessante observar que o mutante de maior resistência (m 357) teve uma MVR muito curta em comparação com o mutante de resistência menor (m 71,4) (Tabela 25). Nossos dados concordam com as observações de *BERGAMIM FILHO et alii* (1975) a respeito do mesmo fato, desde que os autores consideram na maioria dos casos como droga forte, aquela cujo modelo de resistência seja do tipo múltiplos passos e que essa força tende a ser tanto maior quanto maior o nível da resistência dos mutantes. Desde que, a meia vida relativa (MVR) é uma função do coeficiente de regressão linear, as observações acima, são válidas para a MVR dos mutantes em comparação com a linhagem original.

Para o isolamento de mutantes auxotróficos de *Torula utilis*, verificou-se em ensaios preliminares (*MELO CRUZ, não publicado*) que a luz ultra violeta foi o mutagênico mais apropriado, pelas facilidades de manuseio e tempo, além do isolamento de maior número de células mutantes e fácil obten-

ção de 5% de sobrevivência (Tabela 26 e Figura 8) considerada ideal para isolamento de mutantes (*BURNETT 1975*). Entretanto, foi necessário o uso da nistatina como agente selecionador dos mutantes a exemplo da técnica da penicilina muito utilizada em bactérias (*DAVIS, 1948*). A técnica da nistatina para o isolamento de mutantes auxotróficos em leveduras já foi utilizada com sucesso por outros autores (*MOAT et alii, 1959; SNOW, 1966* e *NEDER et alii, não publicado*).

Para a *Torula utilis*, foi necessário um ensaio preliminar a fim de verificar qual a concentração de nistatina a ser utilizada (Tabela 27 e Figura 9). A obtenção de mutantes auxotróficos em *Torula utilis*, com requisitos nutricionais bem definidos não ocorreu em caso algum. Todos os mutantes auxotróficos isolados, mostraram um pequeno crescimento em meio mínimo, quando comparados com a linhagem selvagem, mas esse crescimento podia se tornar igual ao da linhagem original pela adição de vários nutrientes; assim exemplificando para o mutante 1 (M1), ele apresentou crescimento em meio mínimo adicionado de caseína hidrolisada ou ácidos nucleicos (Tabela 28) e dentre os aminoácidos, vários deles isoladamente, permitiram o crescimento do mutante (Tabela 29). O mesmo ocorreu com os outros mutantes. Também os mutantes auxotróficos, podem ser caracterizados apenas até 36 horas depois da inoculação, pois após esse período de tempo, eles apresentam um crescimento que finalmente se iguala ao da linhagem selvagem. Pode-se dizer portanto, que os mutantes apresentam ape-

nas uma auxotrofia parcial. Mutantes semelhantes foram encontrados em *S. cerevisiae* por REAUME e TATUM (1949). Uma vez que, mesmo com deficiências parciais, esses mutantes podiam ser usados em testes de cruzamentos, desde que, respeitadas certas condições (tempo de leitura das placas, por exemplo) e uma vez que eles foram isolados visando especificamente essa utilização, as causas dessas deficiências parciais não foram pesquisadas. No entanto, seria interessante o desenvolvimento de futuros estudos nesse sentido, que poderiam elucidar vários aspectos do metabolismo de aminoácidos ou de sistemas de regulação em *Torula utilis*.

Para uma melhor caracterização dos mutantes resistentes e auxotróficos obtidos, foi feita uma análise da produção de biomassa dos mesmos em comparação com as linhagens selvagens L 1 e L 3 e isoladas do bagaço de cana de açúcar (B 1 e B 2). Foram detectadas diferenças altamente significativas, para a amostra de 24 horas de cultivo (Tabelas 32 a 35). A produção celular dos mutantes auxotróficos foi inferior aquela dos mutantes resistentes a drogas, das linhagens selvagens L 1 e L 3 e das linhagens isoladas do bagaço de cana de açúcar. Da mesma maneira, os mutantes resistentes foram menos produtivos que as linhagens L 1 e L 3 e isoladas do bagaço de cana de açúcar. Entretanto, na amostra de 48 horas, as diferenças deixaram de ser significativas, especialmente para os mutantes auxotróficos, sugerindo que os mesmos por apresen

tarem deficiências apenas parciais tinham se recuperado durante a evolução da cultura. O fato acima, não ocorreu com os mutantes resistentes, provavelmente devido a sua mutação para resistência ter atingido um ou mais, genes importantes, que afetam o crescimento de células, nessa espécie.

Portanto, os resultados obtidos através dos ensaios de produção, confirmam inteiramente os dados já discutidos acima. De fato, era de se esperar que os mutantes resistentes fossem menos produtivos que as linhagens originais sensíveis, uma vez que eles apresentam uma taxa de crescimento reduzida e tempo de geração maior. Os mutantes auxotróficos, mesmo em meio completo utilizado para o ensaio de produção, continuam a apresentar menor produção de biomassa, indicando que os nutrientes do meio completo, pelo menos nos primeiros estágios de crescimento não conseguem suprir as deficiências nutricionais desses mutantes. Isso parece indicar também, que essas mutações envolvem processos metabólicos complexos ou regulação gênica.

Embora os mutantes isolados no presente trabalho, não visassem uma produção superior de biomassa foi constatado que todos eles tiveram um comportamento inferior as linhagens selvagens. Esse fato, vem indiretamente reforçar a idéia de que, no estágio atual o isolamento de linhagens da natureza e uma posterior seleção das mesmas é mais apropriado. Poder-se-ia também pensar no uso de uma linhagem resistente

a determinada droga como a nistatina, para crescimento preferencial da mesma, em substratos adicionados dessa droga. Assim, poderiam ser evitadas contaminações por outras espécies, mesmo em ambientes não assépticos. No entanto, há que se considerar no caso, que como demonstrado no presente trabalho, mutantes resistentes são menos produtivos. Talvez uma maneira de se contornar o problema, seja a partir de uma linhagem já resistente, isolar um variante que continue resistente, porém, apresente produção semelhante a da linhagem selvagem sensível. Para isso, não só técnicas de mutação, mas especialmente recombinação sejam talvez as mais apropriadas.

### 5.3. Recombinação em *Torula utilis*

Graças a obtenção de mutantes auxotróficos e resistentes, foi possível ensaiar a existência de recombinação em *Torula utilis*. A mistura de mutantes auxotróficos, dois a dois, em todas as combinações possíveis mostrou que, a partir de certas combinações de mutantes foram obtidas colônias capazes de crescer em meio mínimo, enquanto que as linhagens parentais não cresciam nesse meio (Tabela 30). Também a mistura de mutantes resistentes à nistatina e cristal violeta revelou colônias, que podiam crescer em meio contendo as duas drogas, enquanto as linhagens parentais não foram capazes de crescer nesse meio (Tabela 31).

Esses resultados, revelaram que, deve ter ocorrido uma possível recombinação entre as linhagens parentais, resultando em segregantes que se diferenciavam geneticamente das mesmas. Entretanto, pelos dados do presente trabalho, é ainda prematuro afirmar, se o fenômeno observado foi realmente uma recombinação e fica muito mais difícil ainda, saber qual o sistema de recombinação que está ocorrendo.

No caso do cruzamento dos mutantes auxotróficos, as linhagens M1 e M2, por exemplo, não apresentaram crescimento algum, quando semeadas isoladamente em meio mínimo; no entanto da mistura M1 x M2 de 150 células semeadas, 6 formaram colônias no meio mínimo. Esses resultados sugerem fortemente a ocorrência de recombinação, mas não pode ainda ser afastada a hipótese que essas células que cresceram em meio mínimo, sejam reversões do fenótipo mutante para o selvagem. Isso no entanto, é improvável pois reversões não foram detectadas nas linhagens isoladas, embora a mistura pudesse ter algum efeito, tipo mutagênico, aumentando a frequência de reversões.

Com relação aos cruzamentos envolvendo linhagens resistentes, a alta frequência de colônias capazes de crescer em um meio no qual as duas linhagens parentais não conseguem crescer, também pode indicar a existência de um eficiente sistema de recombinação, embora seja mais fácil admitir nesse caso que o mecanismo de resistência envolvido seja

tal, que o mutante produza um produto exógeno capaz de degradar a substância inibidora; nesse caso a mistura das linhagens resistentes semeada em meio contendo as duas drogas, seria capaz de anular os efeitos inibitórios de uma ou ambas as drogas, permitindo então o crescimento de colônias. Maior número de estudos devem ser realizados, para comprovar ou não a existência real de recombinação nessa espécie.

Admitindo-se no entanto que, recombinação tenha ocorrido, especialmente no caso dos mutantes auxotróficos, pode-se especular a respeito do mecanismo de recombinação envolvido. Em leveduras, um mecanismo sexual de recombinação é conhecido em várias espécies. Em *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, existem tipos de reação sexual diferentes. Células haplóides de tipos de reação sexual opostas se fundem dando a fase diplóide e linhas haplóides puras são formadas, a partir de ascóporos (FINCHAM e DAY, 1971; MORTIMER e HAWTHORNE, 1969). No presente trabalho, uma vez que os mutantes foram originários de uma mesma linhagem, não deve estar ocorrendo uma recombinação sexual propriamente dita, mas pode ter ocorrido fusão de células haplóides, dando indivíduos diplóides. Se as mutações para auxotrofia forem recessivas, como ocorre na maioria dos microrganismos, o diplóide heterozigoto formado tem capacidade de crescer no meio mínimo. Inclusive, esse diplóide formado, pode por um processo parassexual produzir segregantes haplóides selvagens. Formação de diplóides e recombina-

nação mitótica foi verificado pela primeira vez em fungos, por *PONTECORVO e ROPER (1952)* e a produção de recombinantes a partir desses diplóides, sem ocorrência de meiose foi denominado de ciclo parassexual. A existência do ciclo parassexual, já foi constatada em dezenas de fungos, estudados geneticamente (*BURNETT, 1975; AZEVEDO, 1976*). Em leveduras, recombinação mitótica é conhecida em *Saccharomyces cerevisiae* (*ROMAN, 1956; HURST e FOGEL, 1964*) e *Schyzosaccharomyces pombe* (*ANGEHRN e GUTZ, 1968*).

Se recombinação houve, nas células de *Torula utilis*, analisadas na presente pesquisa, deve ter sido do tipo parassexual, com formação de diplóides e talvez permuta mitótica e haploidização. Muito mais estudos, ao nível genético e citológico tem no entanto que ser realizados, para comprovar as idéias aqui propostas.

De qualquer maneira, os resultados obtidos abrem uma nova perspectiva no melhoramento de *Torula*, com a finalidade de produção de biomassa. A variabilidade natural existente, permite que se estabeleçam programas de seleção para serem obtidas linhagens mais produtivas e adaptadas a diferentes condições. A perspectiva de um sistema de recombinação nessa espécie, permite que além de técnicas de mutação, cruzamentos genéticos possam ser efetuados, visando a combinação de características genéticas favoráveis em uma mesma linhagem.

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

As leveduras do gênero *Torula* foram utilizadas muitos anos atrás, durante as últimas Grandes Guerras como suplemento alimentar de dietas humanas, mas seu uso mais acentuado hoje em dia é na complementação protéica de rações cereais deficientes. Dentre as espécies do gênero citado, salientou-se a *Torula utilis* pela sua alta eficiência em utilizar substratos inaproveitáveis pelo homem, convertendo-os em elementos nutritivos de grande valor nas dietas alimentares.

Os principais objetivos do presente trabalho foram: testar a variabilidade natural entre algumas das linhagens de *Torula* isoladas do bagaço de cana de açúcar (resíduo industrial) e compará-las com linhagens de laboratório; obter mutantes auxotróficos e resistentes a drogas de *Torula utilis*

e através de cruzamentos entre eles, verificar a ocorrência de algum sistema de recombinação genética na espécie.

De acordo com os resultados obtidos, as seguintes conclusões foram tiradas:

a) Existe variabilidade natural entre esses organismos, que poderá ser aproveitada na seleção das linhagens de *Torula* para produção de proteína.

b) Mutantes auxotróficos parciais e resistentes à drogas puderam ser obtidos espontaneamente e induzidos por luz ultra-violeta em *Torula utilis*.

c) A produção de biomassa nos mutantes obtidos, foi quase na maioria dos casos inferior a das linhagens selvagens usadas como controle.

d) A detecção de possíveis recombinantes que se diferenciavam das linhagens parentais mutantes usadas em cruzamentos, sugeriu a existência de algum sistema de recombinação na espécie.

e) A existência de variabilidade natural e de um sistema de recombinação em leveduras do gênero *Torula*, facilitará o seu melhoramento, não somente pela aquisição das melhores linhagens da natureza, bem como, pelos processos de mutação e testes de cruzamento com obtenção de recombinantes altamente eficientes para as características desejáveis.

## 7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Yeasts from genus *Torula* have been used years ago, during the last two Great Wars as food supply for humans. However their use increased today as a rich source of vitamin and protein animal feed supplement. Among the yeasts, *Torula utilis* has been mostly used due to its high capacity in utilizing substrats which constitute industrial residues, converting them in foods of great nutritional value.

The present research was carried out with the following aims: to test the natural variability among strains of *Torula* isolated from sugar cane residues and to compare them with laboratory strains; to obtain auxotrophic and drug resistant mutants in *Torula utilis* and from crosses between them to test the existance of a genetic recombination system

From the obtained results the following conclusions can be drawn:

a) *Natural variability was found in Torula. Such variability can be used in the selection of strains aiming the improvement for protein production.*

b) *Partial auxotrophic mutants and drug resistant mutants were obtained both spontaneously and induced by ultra violet light in Torula utilis.*

c) *Biomass production from the obtained mutants was in most cases below the biomass production from the wild-type strains used as controls.*

d) *The detection of possible recombinants which distinguished from the parental mutants used in crosses between strains suggested the existence of some recombination system in Torula utilis.*

e) *The occurrence of natural variability and the existence of a recombination system in Torula utilis will facilitate breeding programs not only by isolation of better strains from nature as well by employing mutation and cross techniques with the production of recombinants highly efficient for the desirable characteristics.*

S. BIBLIOGRAFIA CITADA

ADELBERG, E.A. e J.W. MYERS. 1953. Modification of the penicillin technique for the selection of auxotrophic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 65: 348-353.

AGARWALL, P.N. e W.H. PETERSON, 1949. Utilization of non sugar carbon of molasses by food yeasts. *Archives of Biochemistry*, 20, 59-74.

AGARWAL, P.N., K. SINGH, P.S. KING e W.H. PETERSON, 1947. Yields and vitamin content of food yeasts grown on different kinds of molasses. *Archives of Biochemistry*, 14: 105-115.

ANGEHRN, P. e H. GUTZ, 1968. Influence of the mating type on mitotic crossing over in *S. pombe*. *Genetics*, 60, 1581.

- AZEVEDO, J.L., 1972. O ciclo parassexual em fungos. *Revista de Microbiologia*, 3(3): 157-168.
- AZEVEDO, J.L., 1976. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, 2: 1-15.
- AZEVEDO, J.L. e R.N. NEDER, 1963. Comparação entre o crescimento de linhagens mutantes resistentes a antibióticos e linhagens não mutantes de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson. *Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"*, 20: 163-173.
- BEECH, F.W. e R.R. DAVENPORT, 1971. Isolation, purification, and maintenance of yeasts. In: Booth, C. 1971. *Methods in microbiology*, IV. Academic Press, New York, 795 pp.
- BERGAMIN FILHO, A., 1973. O conceito de força de drogas ilustrado com resistência de *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen a antibióticos. Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre. 55p.
- BERGAMIN FILHO, A., H. KIMATI e J.L. AZEVEDO, 1975. O conceito de força de drogas. *Summa Phytopathologica*, 1: 31-42.
- BHATTACHARJEE, J.K., 1970. Microorganisms as potential sources of foods. *Advances in Applied Microbiology*, 13: 139-159.
- BIER, O., 1965. *Bacteriologia e Imunologia*. Edições Melhoramentos, São Paulo, 12a. Edição. 983 pp.

- BODENHOFF, J., 1969. Development of strains of genus *Candida* and genus *Torulopsis* resistant to antimycotics. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 75: 622-630.
- BRYSON, V. e W. SZYBALSKY, 1952. Microbial selection. *Science* 116: 45-51.
- BURNETT, J.H., 1975. Mycogenetics. John Wiley & Sons, London. 375 pp.
- CAMPOS, C.E.O.P., 1973. Resistência de *Candida albicans* a nistatina e anfotericina B. Alterações no crescimento de mutantes resistentes. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, para obtenção do Título de Doutor. 88 pp.
- CARTER, H.E. e G.E. PHILLIPS, 1944. The nutritive value of yeast proteins. *Federation Proceedings*, 3: 123-128.
- CIRILLO, V.P., M. HARSCH e J.O. LAMPER, 1964. Action of the polyene antibiotics filipin, nystatin and n-acetyl-candidim on the yeast cell membrane. *The Journal of General Microbiology*, 35: 249-259.
- DAVIS, B.D., 1948. Isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by penicillin. *Journal of the American Chemical Society*, 70: 4267.
- DAWSON, R.C., 1965. Potential for increasing food production through microbiology. *Bacteriological Review*, 29(2): 251-266.

- DEMEREK, M., 1948. Origin of bacterial resistance to antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 56: 63-74.
- EHRENSVÄRD, G., 1948. Aminoacid metabolism in *Torulopsis utilis*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 13: 81-87.
- EHRENSVÄRD, G., L. REIO, E. SALUSTE e R. STJERNHOLM, 1955. Acetic acid metabolism in *Torulopsis utilis*. III. Metabolic connection between acetic acid and various aminoacids. *Journal of the Biological Chemistry*, 189: 93-108.
- EHRENSVÄRD, G., E. SPERBER, E. SALUSTE, L. REIO e R. STJERNHOLM, 1947. Metabolic connection between proline and glycine in the amino acid utilization of *Torulopsis utilis*. *Journal of the Biological Chemistry*, 169: 759-760.
- ESSER, K. e R. KUENEN, 1967. Genetics of Fungi. Springer-Verlag, Berlin. 500 pp.
- FINCHAM, J.R.S. e P.R. DAY, 1971. Fungal Genetics. 3a. Edição. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 402 pp.
- FINK, H. e F. JUST, 1938-1939. *Biochemische Zeitschrift*, 300 pp. 84. In: Carter, H.E. e G.E. Phillips, 1944. The nutritive value of yeast proteins. *Federation Proceedings*, 3: 123-128.
- FINK, H., R. LECHNER e E. HEINRICH, 1936. *Biochemical Zhurnal*, 183: 71-91. In: Thatcher, F.S., 1954. Foods and feeds from fungi. *Annual Review of Microbiology*, 8: 449-472.

- POWELL, R.R., 1969. Life cycles in yeasts. In: Rose, A.H. e J.S. Harrison (eds.) - *The yeasts*, I. Acad. Press Inc., New York, p. 461-471.
- GRAHAM, D.C.W., K.H. STEINKRAUS e L.R. HACKLER, 1976. Factors affecting production of mold mycelium and protein in syntetic media. *Applied and Environmental Microbiology*, 32(3): 381-387.
- GRAY, W.D. e T.A. STAFF, 1967. Fungal protein for food and feeds. VII. Caloric values of fungus mycelium. *Economic Botany*, 21: 341-344.
- GUTZ, H., H. HESLOT, U. LEUPOLD e N. LOPRIENO, 1974. *S. pombe*. In: King, R.C. (ed.) - "Handbook of Genetics", I. Plenum Press, New York, p. 395-446.
- HANNENBERG, W., 1926. Handbuch der Gärungs- und Bakteriologie. Paul Parey, Ltd. Berlin, 602 pp. In: Lindegren, C.C., 1949. *The yeast cell, its genetics and cytology*. Ed. Pub. Inc., Saint Louis. 296 pp.
- HILDITCH, T.P. e R.K. SHRIVASTAVA, 1948. *Biochimica et Biophysica Acta*, 22: 80-85. In: Thatcher, F.S., 1954. Foods and feeds from fungi. *Annual Review of Microbiology*, 8: 449-472.
- HURST, D.D. e S. FOGEL, 1964. Mitotic recombination and heteroallelic repair in *S. cerevisiae*. *Genetics*, 50: 435-458.

- INSKEEP, G.S., A.J. WILLY, J.M. HOLDERLY e L.P. HUGHES, 1951. Industrial Engineering and Chemistry, 43: 1702-1711. In: Pyke, M., 1958. *The technology of Yeast*. Cook, A. H. (ed.). *The Chemistry and Biology of Yeasts*. Acad. Press Inc. Ltd. London, 763 pp.
- JOHNSON, M.J., 1947. Industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 1: 159-172.
- JOHNSON, M.J., 1967. Growth of microbial cells on hydrocarbons. *Science*, 155: 1515-1519.
- JOLY, S., 1954. Levantamento de leveduras ocorridas em frutos maduros: sua posição sistemática. Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor. 74 pp.
- KHAN, N.C. e S.P. SEN, 1974. Genetic transformation in yeasts. *The Journal of General Microbiology*, 83: 237-250.
- KIHLBERG, R., 1972. The microbe as a source of food. *Annual Review of Microbiology*, 26: 427-466.
- KINSKY, S.C., 1962b. Nystatin binding by protoplasts and a particulate fraction of *Neurospora crassa* and a basis for the selective toxicity of polyene antifungal antibiotics. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America*, 48: 1049-1056.
- KUSHIGE, T., Y. TAKEUCHI e Y. IWASA, 1964. Studies on the culture method and fatty acids composition of *Torula utilis* and *Rhodotorula gracilis*. *Bulletim of University of Osaka Prefecture*, 15: 115-124.

- LAMPEN, J.O., E.R. MORGAN, A. SLOCUM e P. ARNOW, 1959. Absorption of nystatin by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 78: 282.
- LEDERBERG, J. e E.M. LEDERBERG 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology*, 63: 390-406.
- LILLY, V.G. e H.L. BARNETT, 1951. Physiology of the fungi. Mc Graw-Hill Book Co. Inc. 464 pp.
- LINDEGREN, C.C. e G. LINDEGREN, 1943. A new method for hybridizing yeasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 29: 306-308.
- LODDER, J., 1971. The yeasts - A taxonomic study. North-Holland Publishing Company Amsterdam, London. 2 nd. Ed. 1385 pp.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR e R.J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of the Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- MARINI, F., P. ARNOW e J.O. LAMPEN, 1961. The effect of monovalent cations on the inhibition of yeast metabolism by nystatin. *The Journal of General Microbiology*, 24: 51-62.
- MOAT, A.G., N. Jr. PETERS e A.M. SRB, 1959. Selection and isolation of auxotrophic yeast mutants with the aid of antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 77: 673-577.
- MOORE, D.J., 1945. *Torula utilis* yeast or food yeast. *Tropical Medicine and Hygiene*, 48: 75-77.

- MORTIMER, R.K. e D.C. HAWTHORNE 1969. Yeast genetic. In: Rose, A.H. e J.S. Harrison (eds.). The yeasts, I, Acad. Press. Inc. Ltd., New York. 533 pp.
- OPPERNOORTH, W.F.F., 1960. Modification of the heredity character of yeast by ingestion of cell free extracts. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology* 26: 129-168.
- OPPERNOORTH, W.F.F., 1962. Transformation in yeast: evidence of a genetic change by the action of DNA. *Nature*, 193:706.
- PANIKER, C.K.J., P.V. KURUP e K.I. DEVI, 1963. Nystatin sensitivity of *Candida* strains. *Indian Journal of Medical Research*, 51(5): 846-850.
- PIMENTEL GOMES, F., 1963. *Curso de estatística experimental*. 2a. Edição. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP. 384 p.
- POMPER, S. e P.R. BURKHOLDER, 1949. Studies on the biochemical genetics of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 35: 456-464.
- PONTECORVO, G. e J.A. ROPER, 1952. Genetic analysis: without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of General Microbiology*, 6: VII.
- REAUME, S.E. e E.L. TATUM, 1949. Spontaneous and nitrogen mustard induced nutritional deficiencies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry*, 22: 331-338.

- REID, R.D. e M.J. PELCZAR, 1966. Microbiologia. Ediciones Castilla S.A. Madrid, España. 2ª Ed. 644 pp.
- ROMAN, H., 1956. Studies of gene mutation in *Saccharomyces*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 21: 175-185.
- SATAVA, J., 1934. Congrès International Technique et Chimique de **Sucrierie** et de Distillerie. 3 Paris. In: Fowell, R.R., 1969. Life cycles in yeasts. Rose, A.H. e J.S. Harrison (eds.). The yeasts, Vol. I. Acad. Press. Inc. Ltd., New York. 533 pp.
- SERZEDELLO, A., A.P. NUEVO MIGUEL, I.J.B. CAMARGO e G. BARBIERI, 1970. Estudos sobre obtenção de levedura alimentar em substratos de vinhaça. *Revista da Agricultura*, 45: 22-27.
- SHERMAN, F. e C.W. LAWRENCE, 1974. *Saccharomyces*. In: King, R.C. (ed.). "Handbook of Genetics", Vol. I, Plenum Press, New York. p. 359-393.
- SNOW, R., 1966. An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic nystatin. *Nature*, 211: 206-207.
- SPERBER, E., 1945. Studies in the metabolism of growing *Torulopsis utilis* under aerobic conditions. *Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi*, 21A: 1-136.
- STACHIEWICZ, E. e J.H. QUASTEL, 1963. Aminoacid transport in yeast and effects of nystatin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 41: 397-407.

- STRASSMAN, M., A.J. THOMAS, L.A. LOCKE e S. WEINHOUSE, 1953.  
Valine biosynthesis in *Torulopsis utilis*. *Journal of the American Chemical Society*, 75: 5135.
- STRASSMAN, M., A.J. THOMAS, L.A. LOCKE e S. WEINHOUSE, 1956.  
A study of leucine biosynthesis in *Torulopsis utilis*. *Journal of the American Chemical Society*, 78: 1599-1602.
- TAUK, S.M., 1976. Estudo preliminar da vinhaça como substrato para leveduras. *Revista de Microbiologia*, 7: 92-97.
- TAVARES, F.C.A., 1974. Princípios do melhoramento em função de parâmetros biométricos aplicados a *Saccharomyces uvarum* Beijerinck. Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor. 100 pp.
- THATCHER, F.S., 1954. Foods and feeds from fungi. *Annual Review of Microbiology*, 8: 449-472.
- VON LOESECKE, H.W., 1946. Controversial aspects: yeast in human nutrition. *Journal of the American Dietetic Association*, 22: 485-493.
- WILEY, A.J., G.A. DUBEY, B.F. LUECK e L.P. HUGHES, 1950.  
Industrial Engineering Chemistry, 42: 1830-1833. In:  
Thatcher, F.S., 1954. Foods and feeds from fungi. *Annual Review of Microbiology*, 8: 449-472.
- WINGE, Ö e O. LAUSTSEN, 1937. On two types of spore germination and on genetic segregations in *Saccharomyces* demonstrated through single spore cultures. *Compte Rendu des Travaux du Laboratoire de Carlsberg*. Copenhague 22(6): 99-116. In:  
Biological Abstracts, 12: 1275-1276 (Abstract 1938).