FLAVIO C. A. TAVARES

Professor Assistente - Departamento de Genética
Escola Superior de Agricultura „Luiz de Queiroz”
Universidade de São Paulo

**PRINCÍPIOS DO MELHORAMENTO EM FUNÇÃO DE
PARÂMETROS BIOMÉTRICOS APLICADOS A
Saccharomyces uvarum BEIJERINCK.**

Orientador : Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universi-
dade de São Paulo, para obtenção do título
de Doutor.

PIRACICABA

Estado de São Paulo

1 9 7 4

A minha esposa

Aos meus pais

As minhas irmãs

Dedico

AGRADECIMENTOS

Diante das facilidades e apoio dispensados pela Direção, corpo docente e funcionários do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", formalizamos o nosso reconhecimento pela distinta contribuição para a realização deste trabalho. Especial menção fazemos às seguintes pessoas:

Dr. Almiro Blumenschein, quando Diretor do Departamento e Instituto de Genética.

Dr. Ernesto Paterniani, pelo seu estímulo e facilidades dispensadas como Diretor do Departamento e Instituto de Genética.

Dr. João Lúcio de Azevedo, pelo apoio, criticismo e sua singular qualidade como Orientador.

Dr. Roland Vencovsky, pelo entusiasmo prestado à orientação na parte estatística.

Dr. José Branco de Miranda Filho, por sua atenção na resolução dos problemas estatísticos.

Eng^o Agr^o Natal Antonio Vello, pela colaboração no desenvolvimento das esperanças matemáticas.

Sr. João Zandoval e Srta. Gerda Spruck, pela datilografia dos manuscritos.

Srs. Antonio da Rocha Campos, Salvador Pexe e Luiz Próspero, pelo auxílio dispensado na condução dos experimentos.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DAS TABELAS	VI
LISTA DAS FIGURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Produção de alimento protéico por microrganismos	5
2.1.1. Considerações sobre o emprego na alimentação humana	5
2.1.2. Considerações sobre espécies e substratos	12
2.2. Considerações sobre o melhoramento	18
2.2.1. Os microrganismos de interesse industrial e a técnica da mutação seguida de seleção	19
2.2.2. Outros métodos de melhoramento	23
3. MATERIAL	28
3.1. Material Biológico	28
3.2. Meios de Cultivo	30
3.2.1. Meio completo para leveduras	30
3.2.2. Meio para ensaios de produção	30
3.2.3. Solução salina 0,15 M	31
4. MÉTODO	32
4.1. Escolha do Material Biológico	32
4.2. Cultivo	33
4.2.1. Escolha do meio de cultivo para ensaios de produção	33
4.2.2. Curva de Crescimento	34
4.2.3. Ensaio de Produção	35
4.3. Estatísticas	38

4.3.1. Planejamento dos experimentos e análises da variância	38
4.3.2. Estimação de parâmetros genéticos	42
4.4. Seleção	44
5. RESULTADOS	45
5.1. Cultivo	45
5.1.1. Escolha do meio de cultivo para os ensaios de produção	45
5.1.2. Curva de Crescimento	46
5.1.3. Ensaios de produção	50
5.2. Estimação de parâmetros genéticos	60
6. DISCUSSÃO	61
6.1. Ensaios de produção	62
6.2. Seleção	65
6.3. Considerações Gerais	66
7. RESUMO E CONCLUSÕES	73
8. SUMMARY AND CONCLUSIONS	76
9. BIBLIOGRAFIA	78
APÊNDICE	90

LISTA DAS TABELAS

Tabela nº		Pág.
1	Composição percentual de aminoácidos em várias proteínas. THATCHER (1954)	7
2	Padrões nutritivos de aminoácidos essenciais de alimentos de leveduras e proteínas convencionais. (R mede a quantidade total de aminoácidos essenciais na proteína; V(r) mede a concordância de padrão). PEPPLER, 1969	8
3	Percentagem média da composição de células microbianas. Base peso seco. KIHLEBERG (1972)	9
4	Aminoácidos essenciais em microrganismos, trigo e ovos. (g. por 16 g de nitrogênio). KIHLEBERG (1972)	10
5	Ganhos genéticos na produção de antibióticos na USSR. ALIKHANIAN, 1962	21
6	Produção de aminoácidos e nucleotídeos por mutantes auxotróficos. DEMAIN (1973)	23
7	Linhagens de <u>Saccharomyces uvarum</u> utilizadas neste trabalho, com as respectivas origens e Instituições que as forneceram	29
8	Meios de cultivo usados para a determinação daquele mais adequado para os ensaios de produção	34
9	Quadro de análises da variância para os experimentos de produção, com as esperanças matemáticas dos Quadrados Médios, $E(QM)$, para as fontes de variação consideradas. Análise A: Linhagens e colonias delas obtidas. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições	40
10	Quadro de análises conjuntas da variância para os experimentos de produção com as esperanças matemáticas, $E(QM)$, para as fontes de variação consideradas. Análise A: Linhagens e colonias delas obtidas. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições	42
11	Densidade ótica obtida com a linhagem 2490, com inóculo padronizado, em meios derivados da fórmula de WIKERHAM (1946). Blocos ao acaso com três repetições ...	46
12	Crescimento da linhagem 2490 em meio de açúcar. Médias de duas repetições para cada tempo e de duas repetições por amostra tomada de cada repetição por tempo, para densidade ótica ($\overline{DO}$), número de células ($\overline{NC}$) por ml e peso seco ($\overline{PS}$) por 50 ml de meio	50

13	Ensaio de produção nº 1 - Análise da variância para os dados expressos em Peso Seco. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições	51
14	Ensaio de produção nº 1 - Análise da variância para os dados expressos em Densidade Ótica. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições	52
15	Ensaio de produção nº 2 - Análise da variância para os dados expressos em Peso Seco. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições	53
16	Ensaio de produção nº 2 - Análise da variância para os dados expressos em Densidade Ótica. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições	53
17	Ensaio de produção nº 3 - Análise da variância para os dados expressos em Peso Seco. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições	54
18	Ensaio de produção nº 3 - Análise da variância para os dados expressos em Densidade Ótica. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições	55
19	Ensaio de produção nº 4 - Análise da variância para os dados expressos em Peso Seco. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições	56
20	Ensaio de produção nº 4 - Análise da variância para os dados expressos em Densidade Ótica. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições	56
21	Ensaio de produção nº 5 - Análise da variância para os dados expressos em Peso Seco. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições	57
22	Ensaio de produção nº 5 - Análise da variância para os dados expressos em Densidade Ótica. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições	58

23	Análise da variância para valores expressos em peso seco dos experimentos de produção. Análise A: Linhagens e colônias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições	59
24	Análise conjunta da variância para valores expressos em densidade ótica dos experimentos de produção. Análise A: Linhagens e colônias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições	59
25	Progressos esperados por seleção para "Seleção Entre Colônias" e "Seleção Entre e Dentro de Linhagens"	60
26	Herdabilidade do caráter segundo a "Seleção Entre Colônias" e "Seleção Entre e Dentro de Linhagens"	60

LISTA DAS FIGURAS

Figura nº		Pág.
1	Organograma de trabalho para os ensaios de produção	36
2	Curva de crescimento da linhagem 2490 em meio de açúcar. Médias de duas repetições para cada tempo e de duas repetições por amostra tomada de cada repetição por tempo. Valores expressos em densidade (D ₀)	47
3	Curva de crescimento da linhagem 2490 em meio de açúcar. Médias de duas repetições para cada tempo e de duas repetições por amostra tomada de cada repetição por tempo. Valores expressos em logaritmo do número de células (log)	48
4	Curva de crescimento da linhagem 2490 em meio de açúcar. Médias de duas repetições para cada tempo e de duas repetições por amostra tomada de cada repetição por tempo. Valores expressos em peso seco (mg)	49

1. INTRODUÇÃO

Face a explosão demográfica e a carência de alimentos, há grande preocupação no sentido de desenvolver novas técnicas de produção e encontrar novas fontes de alimento. Estes são os meios técnicos com os quais se pretende a resolução do problema, que sem dúvida, não tomadas as providências, deverá se agravar ainda mais no futuro próximo, comprometendo inclusive a estabilidade da sociedade moderna.

Embora a modernização das práticas agrícolas e o melhoramento genético para produtividade tenham até certo ponto retardado a crise, a utilização racional de microrganismos vem sendo cogitada seriamente, principalmente como fonte mais promissora de alimento protéico. Isto porque, os microrganismos são altamente eficientes na conversão de matérias primas de baixo custo, ou que normalmente são desprezadas, como os resíduos industriais, em produtos de alto valor nutritivo. Desta maneira, além da vantagem da produção de alimentos se contorna outro problema, o da poluição do ambiente pelos resíduos industriais. Importa observar que esta é mais uma atividade benéfica dos microrganismos que pode ser proveitosamente explorada pelo homem, pois os problemas da técnica e da economia da produção de massa celular em larga escala vêm sendo solucionados, em consequência do progresso tecnológico do cultivo de microrganismos em gás natural e derivados do petróleo. Restando apenas o problema da

adequação do produto para a alimentação humana, considerou-se inicialmente sua utilização maior no arração de animais, com amplas vantagens sobre os concentrados tradicionais, hoje uma realidade com várias fábricas instaladas em muitos países.

A Microbiologia e a Engenharia Industrial, reconhecidamente têm contribuído para o progresso das Indústrias de Fermentações, o qual se estendeu ao campo da produção de alimentos por meios microbiológicos. Contudo, a tecnologia de produção vem aplicando muito pouco dos conhecimentos atualmente disponíveis da Genética de Microrganismos, mesmo onde foi possível obter aumentos consideráveis da produção pelo melhoramento genético, como no caso das espécies produtoras de antibióticos e outras drogas.

O desenvolvimento atual da Genética de microrganismos principalmente no campo da mutação e da elucidação dos vários processos de recombinação, já permite o melhoramento com base científica. E seguramente, os resultados de programas de melhoramento seriam mais concretos com a aplicação dos conhecimentos fornecidos pela Genética, do que aqueles que são desenvolvidos em bases empíricas, notadamente alguns métodos que empregam a indução de mutações com posterior seleção. Embora tal seja a realidade dos atuais programas de melhoramento, existem algumas tentativas com a finalidade de tornar os métodos menos empíricos, como o emprego da recombinação, à semelhança do que é feito para espécies superiores. Alguns trabalhos têm mostrado possibilidades amplas neste sentido, fazendo valer conclusivamente a aplicação da Genética aos microrganismos de interesse industrial.

Diante destes aspectos, pretende-se neste trabalho demonstrar a possibilidade de aplicação de alguns princípios comumente usados no melhoramento de plantas e animais superiores a microrganismos. Com

este objetivo foram utilizadas linhagens da levedura Saccharomyces uvarum Beijerinck, nas quais o carater quantitativo massa celular foi considerado, por ser importante para a produção de alimento protéico. Conforme os critérios biométricos aplicados, procuram-se principalmente sugerir métodos de seleção que aproveitam a variação natural e estimar parâmetros genéticos que auxiliam ao melhoramento. Os conceitos da Genética Quantitativa e da Estatística Experimental são fundamentais para o desenvolvimento desta proposição ainda especulativa, mas que devido a sua simplicidade e facilidade de execução, torna possível sua generalização para outras espécies e finalidades.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A síntese microbiológica de alimentos vem sendo considerada por muitos autores e muito se tem pesquisado principalmente devido ao forte interesse comercial. Isto é consequência da opinião de que os produtos microbianos serão capazes de competir economicamente com os suplementos protéicos convencionais usados no arração de animais e num estágio futuro, com as proteínas tradicionais da dieta humana.

THATCHER (1954), considerou esta síntese como fundamentada em três aspectos principais: a necessidade crítica de alimentos, particularmente os protéicos, existente em muitas partes do mundo; as vantagens econômicas da elaboração de alimentos ou vitaminas a partir de matérias primas relativamente baratas; e a redução dos custos de produção das indústrias disponíveis de produtos de fermentação. Sua importância maior segundo BHATTACHARJEE (1970), baseia-se em que o material celular microbiano é especialmente rico em vitaminas do grupo B e em proteínas ricas em aminoácidos essenciais, que se constituem num suplemento potencial para dietas deficientes. Além destas considerações, conforme KIHLEBERG (1972), os problemas microbiológicos e técnicos da produção contínua e em larga escala vêm sendo solucionados, tornando possíveis vários melhoramentos no sentido da redução dos custos de produção e inclusive da adequação do produto para a alimentação humana. Contudo, se faz necessário o

melhoramento genético para produtividade, seja procurando isolar linhagens de valor nutritivo o mais alto possível (JOHNSON, 1967) ou por outros métodos, como vêm pesquisando TAVARES e AZEVEDO (1972), TAVARES e col. (1973), TAVARES e AZEVEDO (1974) e TAVARES (1974).

2.1. Produção de alimento protéico por microrganismos

2.1.1. Considerações sobre o emprego na alimentação humana

O assunto em questão não é recente, embora atualmente venha tendo maior divulgação, principalmente devido a crescente demanda de alimento protéico. Já durante a 1ª Guerra Mundial, culturas puras de Torulopsis foram usadas na Alemanha para a alimentação humana, quando da necessidade crítica de proteínas, por indicação de HANNEBERG como se verifica em sua publicação de 1926. Durante a 2ª Guerra Mundial, segundo LINDEGREN (1949), neste mesmo país foi produzida uma quantidade mil vezes maior de leveduras secas e observa que no final da Guerra, a população estava livre da deficiência vitamínica do grupo B. THAYSEN (1957), em sua revisão, apresenta de modo minucioso a tecnologia de produção na Alemanha e outros países, salientando a importância do produto na alimentação. Neste sentido, estatísticas são fornecidas por PEPPLER (1969).

Apesar de ser a produção de alimento protéico por microrganismos um assunto do momento, já existem estes exemplos mencionados de utilização extensiva neste século e conforme THAYSEN (1957), convém salientar que os microrganismos têm participado de uma parte considerável de muitos alimentos, os quais são usados pelo homem desde os primórdios da história. Vinho, cerveja, queijo, leite fermentado e outros, podem proporcionar ao consumidor 6 a 10 g de material microbiano seco numa dieta diária, do qual mais de 40% podem ser proteínas. Além disto, segundo BHATTACHARJEE (1970), cogumelos comestíveis estão entre os alimentos mais

antigos do homem. Agaricus campestris, como outros cogumelos, eram familiares aos Gregos e Romanos.

HOOGERHEIDE (1969), considerando as diferentes formas de emprego de leveduras, assinala que a cerveja foi produzida pelos Sumerianos há mais de 7000 anos A.C. e o vinho há mais de 3500 anos A.C. Ainda aponta que a técnica de fermentação por leveduras já estava bem desenvolvida entre os Babilônios.

Em termos de antecedentes históricos, o valor dos microrganismos também foi relevante para os povos do Novo Mundo. ORTEGA (1972), descreve a evolução do Grande Lago do "Vale del Mexico" e também a de um produto conhecido como "tecuitlat", "cuculin", "amomoxtle" e atualmente como "cocol de agua". Entre outras considerações, descreve os componentes principais deste produto, as algas azuis Cyanophyta "Phormidium" tenue (Menegh) Gomont e Chroococcus turgidus (Knetz) Naegeli e a alga cianoficea Nostoc commune Vaucher. Salienta o autor que, entre os antigos habitantes, os povos do Anahuac, este produto era conhecido como suplemento da alimentação humana e que, em muitas situações de falta de alimento, esta fonte garantiu a sobrevivência. Considere-se também, que entre nossos indígenas muitos alimentos e bebidas são obtidos por fermentação, principalmente aqueles a partir da mandioca, o que a torna especialmente adequada a alimentação.

Neste século, segundo THATCHER (1954), os microrganismos despertaram grande interesse como fonte de proteínas a partir do trabalho de TAKATA (1929), o qual descobriu que o micélio de Aspergillus orizae era constituído de 38% de proteínas e também rico em vitaminas do grupo B. A partir de então, várias espécies foram analisadas quanto ao teor de proteínas e também quanto à sua qualidade, como inicialmente mostraram CLUTTERBUCK, LOVELL e RAISTRICK (1932). Estes autores isolaram de leveduras

uma fração protéica onde identificaram os aminoácidos arginina, histidina, cistina e lisina. Os estudos iniciais neste sentido foram revisados por SKINNER (1934), que também produziu micélio de Penicillium flavo-glau-cum com um alto conteúdo de proteína.

THATCHER (1954) em sua revisão, mostra os estudos feitos até então quanto às espécies analisadas e destaca os trabalhos que avaliam o valor nutritivo de alimentos de fungos, inclusive comparando sua composição de aminoácido com as proteínas de carne, pão e leite, como se observa na Tabela 1.

Tabela 1. Composição percentual de aminoácidos em várias proteínas.

THATCHER (1954).

Aminoácidos	Fungos (%)		Médias (%)		
	Amplitude	Média	Carne	Pão	Leite
Arginina	1,5 - 10,0	4,3	7,5	4,0	4,28
Histidina	1,3 - 7,0	2,98	2,1	2,0	2,57
Isoleucina	2,1 - 6,0	3,52	3,3	3,5	4,28
Leucina	3,3 - 7,4	4,46	12,5	12,0	16,28
Lisina	3,0 - 10,0	5,53	8,3	2,0	7,43
Metionina	1,0 - 2,7	1,6	4,2	4,0	4,0
Fenilalanina	1,0 - 4,5	2,5	4,6	5,5	5,71
Treonina	1,7 - 6,0	3,34	4,6	2,5	4,57
Triptofano	0,3 - 1,6	0,74	1,3	1,0	1,71
Valina	2,5 - 7,0	4,0	3,3	3,0	5,43

Resultados de análise mais recentes são dados por PEPPLER (1969), onde mostra a composição de várias espécies de leveduras produzidas comercialmente e também, adota o critério da FAO/WHO de comparação

das proteínas àquelas do ovo da galinha, tomadas como padrão. Este critério pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Padrões nutritivos de aminoácidos essenciais de alimentos de leveduras e proteínas convencionais. (R mede a quantidade total de aminoácidos essenciais na proteína; V(r) mede a concordância de padrão). PEPPLER, 1969

Material	R	V(r).10 ³
Ovo de galinha*	0,513	0,00**
<u>Saccharomyces cerevisiae</u> (seco)	0,457	14,55
<u>Candida utilis</u> (seco)	0,496	16,25
Levedura de cervejaria (seco)	0,434	8,14
Levedura da panificação	0,459	7,43
Leite de vaca	0,513	7,75
Soja	0,424	6,68

* Referência padrão adotada pela FAO/WHO; 0,513 indica 0,513 g de aminoácidos essenciais por g de proteína.

** Melhor concordância em padrões correspondentes a valores mais baixos de V(r).

KIHLBERG (1972), entre outras considerações sobre as vantagens dos microrganismos sobre plantas e animais como produtores de proteínas, apresenta os seguintes resultados de análise que podem ser observados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Percentagem média da composição de células microbianas. Base peso seco. KIHLEBERG (1972)

Componentes	Fungos Filamentosos	Algas	Leveduras	Bactérias
Nitrogênio	5,0 - 8,0	7,5 - 10,0	7,5 - 8,5	11,5 - 12,5
Gorduras	2,0 - 8,0	7,0 - 20,0	2,6 - 6,0	1,5 - 3,0
Cinzas	9,0 - 8,0	8,0 - 10,0	5,0 - 9,5	3,0 - 7,0
Ácidos Nucléicos		3,0 - 8,0	6,0 - 12,0	8,0 - 16,0

Tabela 4. Aminoácidos essenciais em microrganismos, trigo e ovos. (g. por 16 g de nitrogênio). KIHLEBERG,

1972

Aminoácidos	<u>Scenedesmus</u> <u>obliquus</u>	<u>Spirulina</u> <u>maxima</u>	<u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u>	<u>Candida</u> <u>lipolytica</u> (gás de petróleo)	<u>Pseudomonas</u> (metanol)	Trigo integral	Ovos
Lisina	5,7	4,6	7,7	7,8	5,3	2,8	6,5
Treonina	5,1	4,6	4,8	5,4	4,5	2,9	5,1
Metionina	1,7	1,4	1,7	1,6	1,8	1,5	3,2
Cistina	0,6	0,4	-	0,9	0,3	2,5	2,4
Triptofano	1,5	1,4	1,0	1,3	-	1,1	1,6
Isoleucina	3,8	6,0	4,6	5,3	3,9	3,3	6,7
Leucina	8,4	8,0	7,0	7,8	7,0	6,7	8,9
Valina	5,7	6,5	5,3	5,8	5,9	4,4	7,3
Fenilalanina	5,1	5,0	4,1	4,8	4,2	4,5	5,8

Existe contudo um obstáculo para o uso de proteínas de microrganismos para o consumo humano, pois a biomassa protéica tem um conteúdo relativamente alto de ácidos nucléicos (WASLIEN, COLLOWAY e MARGEN, 1968).

WASLIEN, COLLOWAY e MARGEN (1969), examinando a tolerância de pessoas à alimento produzido por bactérias, encontraram que houve distúrbios gastrointestinais, supostamente devido a alguma substância da parede celular. Já EDOZIEN e col. (1970), não encontraram estes inconvenientes quando administraram alimento de levedura. Neste trabalho, os autores estudaram o efeito do alimento de leveduras sobre o metabolismo do ácido úrico e determinaram que 2 g de ácidos nucléicos de proteínas monocelulares é provavelmente o limite e que, 3 g podem elevar a taxa de ácido úrico no sangue em alguns indivíduos. Outras observações interessantes fizeram estes autores, como sobre o mais baixo nível de ácido nucléico ministrado 2,9 g, aumentar a excreção de ácido úrico a mais de 1000 mg por dia. Um aumento adicional foi proporcional, quando a ingestão de ácido nucléico foi duplicada, porém, um aumento maior na quantidade de ácidos nucléicos, não produziu modificações consistentes na taxa de excreção. Também, com o nível máximo administrado de 135 g de levedura por dia, o que corresponde a 8,7 g de ácido nucléico, não registraram distúrbios gastrointestinais.

Segundo opinião de HEDEN e MOLIN (1971), a relação entre fatores fisiológicos e o conteúdo de ácido nucléico nas células microbianas, indica como este problema deve ser resolvido. O desenvolvimento de métodos econômicos para extração em larga escala de ácidos nucléicos e nucleotídeos de microrganismos, contribuirão para incrementar o uso da biomassa de leveduras e bactérias para o consumo humano. Com efeito, alguns trabalhos têm sido feitos neste sentido, como o de MAUL, SINSKEY e TANNENBAUM (1970), que usando choques de temperatura chegaram a remover mais de 85% dos ácidos nucléicos de leveduras. Os melhores resultados foram obtidos

com um aquecimento de 62-68°C por 17 segundos.

Em bactérias, CARENBERG e HEDEN (1970), tendo em conta que a célula intacta é resistente a digestão, que a parede celular é desbalanceada quanto à composição de aminoácidos e que os ácidos nucléicos são indesejáveis, propuseram um método para romper a parede celular e separar a proteína dos ácidos nucléicos.

O problema da adequação do material protéico de microrganismos para o consumo, tem sido atacado por muitos autores. Segundo HEDEN e col. (1971), o problema da transformação das proteínas em material fibroso que pudesse ser usado na indústria de alimentos vem sendo estudado e a adaptação de maior sucesso tem sido romper a célula e centrifugar uma solução alcalina de proteínas numa solução aquosa ácida. É o princípio aplicado para a soja e nucleoproteínas. HEDEN e col. (1971) encontraram como as melhores condições para obter fibras de proteínas bacterianas, quando as proteínas foram desnaturadas pelo calor a 80°C durante sua passagem através de um tubo capilar. Nestas condições, a percentagem de proteínas nas fibras de células crescidas em metano foi de 64% e em metanol de 66%.

2.1.2. Considerações sobre espécies e substratos

A produção de proteínas monocelulares pode ser efetuada em cultura contínua, o que independe de variações climáticas e ocupa pouco espaço, onde à fonte de carbono são adicionados alguns sais ao meio aquoso conforme KIHLEBERG (1972). Segundo o autor uma gama bastante variada de espécies vêm sendo estudadas, pertencendo aos seguintes gêneros:

Algas: Chlorella, Scenedesmus, Spirulina

Bactérias: Bacillus, Hydrogenomonas, Methanomonas, Methilomonas, Pseudomonas.

Leveduras: Candida, Rhodotorula, Saccharomyces.

Fungos filamentosos: Aspergillus, Fusarium, Penicillium.

Estas espécies são capazes de converter resíduos agrícolas e industriais, muitos deles poluentes, em produtos ricos em proteínas. Os resíduos podem ser do amido, vinhaça, do processamento de frutos, de laticínios, licor sulfítico, hidrolizados de celulose e material de esgoto. Mais recentemente os hidrocarbonetos têm sido usados como a gasolina, n-alcanos refinados, gás natural e metano e produtos da petroquímica como o metanol, etanol, ácido acético, isopropanol, etc.

Aspectos interessantes têm sido levantados quanto à utilização de substratos e a tecnologia de cultivo, como mostrou LINDEGREN (1949), ao basear a origem da domesticação de leveduras na fermentação do açúcar. Este substrato, vem sendo usado desde a pré-história para a produção de álcool nas indústrias de cervejas e vinhos e para a produção de gás carbônico na panificação, para amaciar a massa.

As expensas do licor sulfítico, hidrolisado de celulose e melaço, segundo estima HOOGERHEIDE (1969), no mundo se produziam aproximadamente 200.000 toneladas anuais de leveduras.

PIKE (1958), em sua revisão mostra o grande interesse em se explorar estes substratos e PEPFLER (1969), fornece estatísticas mais recentes sobre o assunto.

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para o emprego destes substratos e já em 1946, HEINES e NORD, descreveram um sistema muito interessante que envolve uma associação de microrganismos, Fusarium lini e leveduras, com bons resultados na fermentação do hidrolisado da madeira.

HARRIS e JOHNSON (1948), apresentaram um processo modificado de hidrólise da madeira para produção de açúcares, onde 50-85% são fermentáveis por espécies de Saccharomyces, 90-95% por espécies de Torula, Monilia ou Candida e 95-96% por Clostridium butylicum ou Aerobacter aerogenes.

INSKEEP e col. (1951) descreveram uma fábrica nos EUA onde Torula utilis foi a espécie usada para se obter um produto de alto conteúdo vitamínico e cerca de 50% de proteína.

Vários autores selecionaram linhagens altamente produtivas nestes substratos, como aquelas de Torula obtidas por KURTH (1946), HARRIS e JOHNSON (1948), HARRIS, HANNAN e MARQUADT (1948), DIEMAIR e NEU (1949) e IWATA (1950). Um pouco antes, THAYSEN e MORRIS (1943), divulgaram produções com sucesso de uma levedura poliplóide, Torula utilis var. major, adaptada para a produção comercial em melaço.

Revisões sobre os substratos para a produção de alimentos por síntese microbiana, onde se verifica a predominância das leveduras em relação a outros microrganismos, foram feitas por THATCHER (1954), ROMAN (1957), COOK (1958), BUNKER (1964), STARR (1964), PEPPLER (1969) e KIHLEBERG (1972).

Ainda na década de 1950, ROBERTS (1950, 1953), apontou a potencialidade das bactérias como produtoras de alimento. Culturas aeradas de Escherichia coli, usando glucose e sais de amônio como nutrientes, apresentaram a produção de 24 bilhões de células por ml em 9 horas a 39°C. Mortas pelo calor, as células secas proporcionaram um suplemento protéico altamente satisfatório para alimentação de ratos e galinhas. Mas, somente a partir da década de 1960 é que a utilização de bactérias foi objeto de maior atenção, graças a possibilidade de emprego de derivados de petróleo como substrato, principalmente depois do trabalho de CHAMPAGNAT e

col. (1963). Em suas investigações, estes autores mostraram que muitas espécies de microrganismos eram capazes de crescer e reproduzirem ativamente às expensas de misturas de hidrocarbonetos, apresentando um alto teor de proteínas. Neste trabalho, os autores ainda relatam a produção de um concentrado protéico, com alto teor de aminoácidos essenciais e vitaminas, que estava sendo administrado a ratos e galinhas.

Outro substrato estudado foi um meio de água do mar por GRAY, PINTO e PATHAK (1963). Investigaram quanto à possibilidade de se usar fungos imperfeitos para a produção de proteínas e encontraram que, esta classe de fungos, tem uma taxa rápida de crescimento e que também, pode utilizar uma variedade de substratos. A composição de aminoácidos foi satisfatória em relação a caseína.

Um novo substrato foi descrito por SANCHEZ-MARROQUIN e col. (1966), o suco de diversas espécies de Agave. Este suplementado com sais de amônio, mostrou-se um bom substrato para as leveduras Saccharomyces carbaajali, Candida utilis e Candida parapsilosis, em fermentadores de 20 l com aeração e agitação. A mistura das duas primeiras espécies foi particularmente adequada, dado o rendimento obtido. SANCHEZ-MARROQUIN (1971), apresentou um trabalho sobre esta mistura de espécies na conversão de suco de cana e do agave, para a produção de proteínas, lisina e riboflavina. Em 1973, SANCHEZ-MARROQUIN apresentou os estudos econômicos sobre a utilização do agave.

JOHNSON (1967), descreve a situação da pesquisa dirigida para encontrar os microrganismos mais adequados e os procedimentos para a produção de células, a partir de vários tipos de hidrocarbonetos. Apresenta inclusive um critério para a escolha, situando que um bom índice para a seleção é a composição de aminoácidos. Considerando os fatores econômicos envolvidos na produção de proteínas a partir de hidrocarbonetos,

torna claro que a pesquisa é necessária para o melhoramento da produção, que se deve procurar isolar culturas de valor nutritivo o mais alto possível e comparar várias fontes de hidrocarbonetos. Observa, a respeito do cultivo de bactérias, que há necessidade da Engenharia desenvolver métodos de colheita das células e de se planejar fermentadores com alta capacidade para transferir oxigênio.

MATELES, BARUAH e TANNENBAUM (1967), descreveram uma nova espécie do gênero Bacillus capaz de crescer em alcanos normais a 70°C. A análise preliminar da composição de aminoácidos, indica que a espécie poderia vir a ser uma boa fonte de proteínas. Os autores ainda situam que esta espécie seria vantajosa, pois poderiam ser simplificados os fermentadores e o processo de assepsia.

MOR e FIECHTER (1968a e 1968b) estudaram o crescimento de Saccharomyces cerevisiae em etanol sob várias condições. Foram medidos a matéria seca, concentração do substrato e entre outras medidas, o conteúdo de proteínas. Encontraram que um aumento na produção resultou da adição de ácido glutâmico ao meio.

Outro substrato cogitado foi o metano como fonte de carbono para a produção de células microbianas. HAMMER, HEDEN e CARENBERG (1967), no curso de suas investigações sobre a utilização do metano, julgaram necessário estudar a oxidação de alguns outros derivados desta substância. O mais comum destes, o metanol, foi estudado anteriormente por LEADBETTER e FOSTER (1959) e BROWN e STRAWINSKI (1958). Mas, embora alguns trabalhos tenham sido publicados sobre o crescimento de bactérias em metanol, somente poucas informações são disponíveis quanto à eficiência da conversão de metanol em biomassa microbiana, como fornecidas por WHITTENBURY (1969).

HAGGSTROM (1969), apresentou seus estudos sobre bactérias oxidantes do metanol onde uma mistura de culturas de bactérias foi cultivada em sais inorgânicos simples suplementados por este álcool. O crescimento ótimo ocorreu a 31°C, pH 6,0-6,3, a uma concentração de metanol entre 1 e 2 ml/l de meio. A produção máxima foi de 4,5 g peso seco/l e o tempo médio de geração de 3,2 horas. Estimou-se que 41% de carbono do metanol foi convertido em carbono celular e que 73% do nitrogênio inorgânico, convertido em orgânico.

BEWERSDORFF e DOSTALEK (1971), estudaram a produção de proteínas monocelulares numa cultura mista de bactérias em metano. Em cultura contínua os valores foram mais altos, com um valor máximo de produtividade $p = 0,15$ g/l/h. Metano e oxigênio foram consumidos na relação de 1:1,7 e o conteúdo protéico da biomassa foi de 71%.

Os problemas fermentativos utilizando hidrocarbonetos envolvem uma série de problemas que, segundo COONEY e WONG (1973), incluem uma alta demanda de oxigênio, a transferência de massa de hidrocarbonetos insolúveis na água e a produção de grande quantidade de calor. No seu trabalho, os autores apresentam os resultados de laboratório sobre o crescimento de bactérias termofílicas e leveduras termotolerantes em metanol.

Durante a realização em 1973 da IV Conferência sobre os Impactos Globais da Microbiologia Aplicada (GIAM-IV), muitos trabalhos foram apresentados sobre a produção de proteínas pela conversão de hidrocarbonetos, os quais refletem o estágio atual das pesquisas sobre o assunto. SENEZ (1973), descreveu os passos metabólicos da fermentação de hidrocarbonetos por Candida tropicalis e vários trabalhos sobre a otimização do cultivo foram apresentados, como os de HUMPHREY e JEFFERIS (1973); UNDEN e HEDEN (1973); AIBA, OKABE e OKADA (1973); MUELLER e MUELLER (1973) e LANE e BIACHERE (1973).

Outros substratos e espécies mostram-se viáveis para a produção de alimento por síntese microbiana, seja visando o arraaçoamento de animais ou a própria alimentação humana. MORRIS, PHILLIPS e IMRIE (1973), reportaram o cultivo de Aspergillus niger em cultura submersa para a produção de ração animal. Microalgas foram usadas por OSWALD (1973) na conversão de material de esgoto, e CALLIHAN, DUNIAP e IRWIN (1973), propõem a utilização de resíduos celulósicos. SAVAGE e col. (1973), descrevem a conversão microbiana de dejetos de suínos para produção de ração, usando Candida utilis e outras espécies e STESSSEL, SAVAGE e MAXWELL (1973), complementaram o trabalho. ARAUJO NETO e PANEK (1973), cresceram Candida utilis em resíduos celulósicos das folhas de banana e JOKL e OLIVEIRA (1973), estudaram o valor nutritivo de suplementos alimentícios produzidos por Saccharomyces cerevisiae, em meio de milho.

Um estudo comparativo entre as leveduras Saccharomyces cerevisiae, Candida utilis e Candida pelliculosa foi feito por NAWAWY e FOUDA (1973), para a produção de proteínas a partir de melaço e do efluente de leveduras de panificação. Fazem estimativas dos custos de produção para os substratos usados e apontam que sua utilização contorna o problema da poluição.

2.2. Considerações sobre o melhoramento

O homem desde os primórdios da fabricação de produtos de fermentação, vem cultivando e aprimorando espécies através da aplicação de métodos que, apesar de empíricos, têm produzido linhagens altamente eficientes para o desenvolvimento das fermentações a que se destinam. Desde o início do século, segundo HARRISON (1971), é feita a seleção de linhagens para fins específicos tendo havido o emprego constante de agentes químicos para produzir poliplóides, embora programas de melhoramento

baseados em outros princípios genéticos sejam mais recentes. Contudo, segundo o autor, em sua revisão sobre a produção de alimentos por leveduras, a maioria dos progressos são relativos ao melhoramento de equipamentos. Como menciona FOWELL (1958), para produzir linhagens híbridas com propriedades desejáveis, há necessidade de um planejamento estatístico cuidadoso e considerável esforço, especialmente se as diferenças quantitativas entre os híbridos sob exame, forem muito pequenas. Aliás, já tinha apontado LINDEGREN (1949), que os caracteres quantitativos são pouco melhorados devido a dificuldades de serem analisados.

Como se verifica na revisão de MORTIMER e HAWTHORNE (1969), o melhoramento de leveduras atualmente pode contar com uma base genética bem desenvolvida, principalmente se a espécie em questão for Saccharomyces cerevisiae. Contudo, para outras espécies e finalidades, como a produção de proteínas monocelulares, as referências são escassas. Por esta razão, esta revisão considera o melhoramento de microrganismos em geral e também porque, muitas técnicas que são utilizadas para outras espécies podem ser de interesse, especialmente para o melhoramento do teor de aminoácidos nas proteínas.

2.2.1. Os microrganismos de interesse industrial e a técnica da mutação seguida de seleção

Várias são as espécies que se têm mostrado eficientes para a produção de substâncias de interesse, segundo as quais BU'LOCK (1961) catalogou os microrganismos nos seguintes grupos:

a) Produtores de metabolitos primários - substâncias relacionadas a estrutura e função celulares, como álcoois, ácidos orgânicos, enzimas e proteínas celulares.

b) Produtores de metabólitos secundários - substâncias de restrita distribuição taxonômica, nunca indispensáveis para a célula, mesmo se algumas vezes são acumuladas ou secretados em grandes quantidades. Em geral são derivadas de ácidos simples, ácidos graxos, substâncias isoprenóis, aminoácidos, peptídeos, açúcares, fenilpropano e de metabólitos de origem mista. Citam-se neste grupo os antibióticos, alcalóides, hormônios, vitaminas e citotoxinas.

BALL (1973)*, incluiu mais uma categoria, ou seja:

c) Produtores de massa celular - onde a célula como um todo é objeto de interesse, principalmente para a produção de proteínas.

Em geral os métodos de melhoramento visam à substância produzida em quantidade e qualidade, sendo a Biologia e Genética da espécie consideradas secundariamente, pois o método mais comumente aplicado, a técnica da mutação, muitas vezes dispensa métodos mais sofisticados. Conforme DEMAIN (1973), os principais métodos empregando esta técnica são:

- a) Mutantes selecionados ao acaso
- b) Mutantes morfológicos
- c) Regulação metabólica
- d) Mutantes auxotróficos
- e) Reversões de mutações
- f) Mutantes resistentes ao produto final.

No caso dos mutantes selecionados ao acaso, uma população tratada com um mutagênico é semeada e colônias selecionadas ao acaso são experimentadas em frascos, para verificação da capacidade de aumento da produção. SERMONTI (1969), mostra vários exemplos de utilização desta

* C. BALL (1973) - Palestra proferida no Departamento de Genética em 2 de agosto de 1973.

técnica e BACKUS e STAUFER (1955), citam os resultados de um programa onde se conseguiu um aumento de produção de mais de 2000 UI de penicilina em Penicillium chrysogenum. Contudo, como opina DEMAINE (1973), infelizmente não se conhecem as razões para o aumento da produção nestes mutantes.

Os mutantes morfológicos facilitam a seleção fenotípica, pois causam modificações visíveis na morfologia da colônia. Segundo DEMAINE (1973) esta técnica foi de valor no desenvolvimento das linhagens produtoras de penicilina da família *Wisconsin*. ALIKHANIAN (1962) apresentou os seguintes resultados de aumento da produção de antibióticos, constantes da Tabela 5.

Tabela 5. Ganhos genéticos na produção de antibióticos na USSR.

ALIKHANIAN, 1962

Antibiótico	Produção inicial (UI/ml)	Ano	Após o melhoramento (UI/ml)	Ano
Penicilina	20	(1943)	8000	(1955)
Streptomicina	50	(1945)	5000	(1955)
Clorotetraciclina	200	(1948)	4000	(1959)
Oxitetraciclina	400	(1950)	6000	(1959)
Eritromicina	100	(1955)	2000	(1961)

Segundo DEMAINE (1973), mutantes para a coloração em Aspergillus niger foram importantes no aumento da produção de ácido cítrico. Menciona ainda que estas mutações produzem efeitos pleiotrópicos que podem afetar a concentração de metabólitos intermediários, coenzimas e outras, não sendo surpreendente que a capacidade de produção possa ser modificada.

Quanto à regulação metabólica, procura-se alterar os mecanismos de regulação de modo a se obter maior produção. Sobre o assunto, BRAMMAR (1974) apresenta um método para aumentar a produção de uma proteína específica, pela alteração do sítio promotor. Mostra que estas mutações causam um aumento da produção de dez vezes.

Os mutantes auxotróficos, conforme DEMAIN (1973), foram os principais utilizados na produção de metabólitos primários, como os aminoácidos e nucleotídeos (Tabela 6). Foram também importantes para o aumento da produção de metabólitos secundários como tetraciclina, clorotetraciclina, estreptomicina, actinomicina, cefalosporina, ácido córico e ácido fusárico.

Os revertantes de mutações, podem possuir enzimas alteradas com muito mais atividade que o original, como resultado de mutações estruturais ou reguladoras (DEMAIN, 1973). Embora MIRANDA FILHO (1972), ao estudar a taxa de crescimento de mutantes supressores, tenha encontrado para a maioria dos casos taxas menores de crescimento, conseguiu detectar em alguns, taxas iguais ou maiores que a linhagem original. No seu trabalho, também detectou que a resistência ao para-fluor-fenil-alanina pode ser obtida, como resultado do efeito pleiotrópico da supressão de nic 8.

Os mutantes resistentes ao produto final são obtidos com bons resultados pelo uso de metabólitos análogos. Conforme DEMAIN (1973), estes mutantes resistentes a análogos, geralmente produzem enzimas que são insensíveis a inibição pelo produto final. Foi importante no melhoramento da produção de estreptomicina, ristomicina e pirrolnitrina.

Tabela 6. Produção de aminoácidos e nucleotídeos por mutantes auxotróficos. DEMAIN (1973)

Produto	Requerimento	Organismo	Acumulação g/l
Citrulina	arginina	<u>B.subtilis</u>	16
Ornitina	arginina	<u>C.glutamicum</u>	26
Lisina	homoserina ou trionina + metionina	<u>C.glutamicum</u> <u>B.flavum</u>	42
Valina	isoleucina	<u>C.glutamicum</u>	11
Inosina 5'-mono- fosfato	adenina	<u>C.glutamicum</u> <u>B.amononiagenes</u>	13
Xantosina 5'-mono- fosfato	guanina	<u>C.glutamicum</u> <u>B.amononiagenes</u>	6

Segundo DEMAIN (1973) existem outros usos adicionais da técnica da mutação, como para eliminar produtos indesejáveis, enriquecer a proporção de um dado produto nas fermentações e também, na produção de moléculas novas.

2.2.2. Outros métodos de melhoramento

Comentou BRADLEY (1966), que a mutação e seleção ganhou aceitação universal como um dos principais métodos de obtenção de linhagens melhoradas. Contudo, maiores esforços precisam ser feitos para a discriminação de métodos seletivos, pois a identificação de tipos desejáveis é fundamental num programa de melhoramento. Situa que projetos propostos empregando a recombinação genética têm sido recebidos com relutância, talvez porque haja falta de compreensão dos resultados prováveis.

Os cruzamentos não devem ser esperados como capazes de produzir uma alta proporção de progênies superiores e a seleção cuidadosa deve ser imposta sobre populações grandes, para se conseguir tipos desejáveis. Sua opinião de certo modo vem de encontro a de DEMAÏN (1973), que julga desapontadores os esforços no sentido de se utilizar a recombinação genética em programas de melhoramento de microrganismos. Com efeito, vários autores têm reportado com sucesso seus resultados empregando esta técnica, e como observa LINDEGREN (1949), o interesse maior no melhoramento de leveduras está centralizado na obtenção de novos híbridos. Cita inclusive, métodos para produção de linhagens capazes de crescer em meios desfavoráveis, como o licor sulfítico. Uma massa de esporos poderia ser semeada, permitindo-se a conjugação daqueles capazes de sobreviver diretamente no meio e somente aqueles híbridos suficientemente vigorosos seriam capazes de crescer. Preconiza ainda o uso da hibridação interespecífica para o melhoramento da produção de álcool.

PONTECORVO, ROPER e FORBES (1953), apresentaram sugestões quanto a aplicação prática da recombinação somática nas indústrias de fermentação. Contudo FANTINI (1962), encontrou que a produção de antibiótico pelo diplóide de Emericellopsis spp, e por alguns recombinantes somáticos, foram essencialmente comparáveis ao tipo selvagem. Mas, BRADLEY (1962) em sua revisão sobre o fenômeno da parassexualidade em microrganismos, descreveu o vigor de híbridos em fungos, o que pode ser vantajosamente aproveitado.

MACKEVIC (1968), cita exemplos da aplicação prática da hibridização, para a produção de leveduras com capacidade fermentadora especial, como nos híbridos de Saccharomyces ellipsoideus com Saccharomyces globosus, que são mais eficientes que as leveduras comuns da panificação; híbridos entre leveduras do vinho e da cerveja com maior capacidade de

multiplicação e fermentação; e híbridos entre leveduras da panificação e cervejaria, superando ambas as formas paternas em eficiência. Discute ainda no seu trabalho os mecanismos da variação hereditária em fungos.

Resultados práticos foram apresentados por HOLT e MACDONALD (1968), sobre o isolamento de linhagens de Aspergillus nidulans com maior produção de penicilina, após hibridação. Do mesmo modo, BALL (1969) melhorou Penicillium chrysogenum para a produção de penicilina por recombinação. Aliás, este autor procura seguir esta linha de trabalho, como se verifica em suas publicações de 1971 e 1973.

No melhoramento para caracteres quantitativos em leveduras, JAMES, MACNUTT e MORSE (1965), descreveram que o objetivo de aumento da produção poderia ser alcançado pela técnica da mutação seguida de seleção e TANNENBAUM e MILLER (1967), mostraram que outros aspectos poderiam também ser levados em conta, no sentido de melhorar a qualidade de proteínas monocelulares. Estes últimos, demonstraram que a parede celular intacta limita o valor nutritivo da proteína monocelular obtida de Bacillus megaterium. Por uma técnica de fragmentação celular adequada à preparação em larga escala, mostram que o valor nutritivo pode ser aumentado. DAVIES (1971), divulgou que tal problema poderia ser resolvido de um outro modo. Através do uso de N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, isolou vários mutantes de Chlamydomonas reinhardtii com vários defeitos na biogênese da parede celular. Muitos destes mostraram taxas de crescimento comparáveis ao tipo selvagem e também as percentagens de proteínas e aminoácidos.

VAULINA, ANIKEEVA e SEVCENKO (1968), apresentam alguns métodos para o melhoramento de algas, principalmente em relação a Chlorella, para produtividade e termofilia. Em leveduras LODDER, KHOUDOKORMOFF e LANGEJAN (1969), mostram que a hibridação é adequada no melhoramento de

leveduras da panificação. Já LORMNZ (1969), obteve que o conteúdo de compostos de nitrogênio pode ser aumentado pela variação das condições de crescimento e pela adição de precursores adequados.

Para Candida tropicalis cultivada em hidrocarbonetos PASE-RO, DUVNSAK e AZOULAY (1969), discutem a possibilidade de seleção de mu-ntantes capazes de ter melhor crescimento às expensas de hidrocarbonetos.

SISKINA e ALIKHANIAN (1969), estudando a variabilidade de Actinomyces streptomycini, encontraram que elas diferem em coeficientes de variação para a produção de penicilina e atividade proteolítica, ambos antes e depois do tratamento com ultra-violeta ou dietil-sulfato, existindo uma correlação positiva entre as variâncias para as duas propriedades. A seleção para ambos aumentou a correlação, enquanto que a seleção apenas para atividade proetolítica a reduziu. O tratamento por mutagênicos tam-bém reduziu a correlação.

GARIBOVA (1970), melhorando cogumelos, descreve o aprovei-tamento da variabilidade natural e induzida por mutagênicos e CALAM, DA-GLISH e GAITSKELL (1973), mostram o aproveitamento do ciclo parassexual em Penicillium putulum e Fusarium moniliforme. ELANDER e col. (1973), sumarizam um programa utilizando técnicas da mutação-seleção e da paras-sexualidade, para a produção comercial de penicilina. MODWOOD (1973) dis-cute as possibilidades de recombinação em Actinomicetos e MACDONALD(1973), apresenta dados sobre o emprego da parassexualidade em Penicillium chry-sogenum e Aspergillus nidulans. Para a produção de alcaloides, SPALLA (1973) é da opinião que a heterocariose é a condição preferida. Ainda em-pregando a técnica da mutação, O'SULLIVAN e PIRT (1973) investigaram quan-to à produção de penicilina usando mutantes auxotróficas para lisina em P. chrysogenum.

Todos estes trabalhos, mostram que progressos podem ser alcançados utilizando-se várias técnicas e que estas têm aplicação mais geral a depender contudo, da biologia da espécie. Isto é o que se verifica nos trabalhos mais recentes, especialmente os apresentados no Segundo Simpósio Internacional de Genética de Microrganismos Industriais (GIM-74) em Sheffield, Inglaterra, 1974, onde a técnica da mutação predomina, mas novas áreas de interesse vem sendo descortinadas, como mostram os trabalhos sobre aplicação dos princípios da genética quantitativa de JINKS e CATEN (1974), MERRICK (1974) e outros.

3. MATERIAL

3.1. Material Biológico

A levedura Saccharomyces uvarum Beijerinck (Sacch.calsbergensis, Hansen), escolhida para a realização deste trabalho, tem a seguintes classificação sistemática (LODDER, 1971): Gen.Saccharomyces, subfam. Saccharomycoideae, fam. Saccharomycetaceae, ordem Endomycetales, esta pertencente aos Ascomicetos mais primitivos.

Segundo LODDER (1971), esta levedura crescendo em extrato de malte, após três dias a 28°C, apresenta células que podem ser esferoides, ovóides, elipsóides, cilíndricas ou alongadas. Ocorrem individuais, em pares, ocasionalmente em pequenas cadeias ou pequenos agregados.

De acordo com o comprimento das células, as linhagens são reunidas em três grupos morfológicos, embora existam formas intermediárias, ou mais ou menos de transição entre estes grupos. O primeiro grupo compreende linhagens que formam células grandes (4,0-10,0)x(5,5-16,0-25)µ. O segundo grupo compreende linhagens de células pequenas, (2,5-6,5)x(5,0-11,5-22)µ. No terceiro grupo e mais ou menos intermediário, as linhagens possuem células medindo (3,5-8,0)x(5,0-11,0-20)µ. Em todos estes grupos podem ser encontradas células mais ou menos filamentosas que medem 30µ ou mais.

Em ágar malte, após três dias a 28°C, as células podem ser esferoidais, sub-globosas, ovóides, elipsoides, cilíndricas ou alongadas e ocorrem individualmente, em pares e ocasionalmente, em pequenas cadeias ou pequenos agregados. Conforme o tamanho das células, reune-se as linhagens em três grupos morfológicos, também existindo formas intermediárias, ou mais ou menos de transição, entre estes grupos. O primeiro reune linhagens de células grandes de $(3,0-9,5) \times (4,5-14,0-22) \mu$; o segundo, células pequenas de $(2,5-7,0) \times (4,5-11,5-23) \mu$ e o terceiro, mais ou menos intermediário de $(3,0-8,0) \times (4,5-11,0-21) \mu$. Em todos estes grupos, células mais ou menos filamentosas podem ser encontradas.

As linhagens empregadas foram cedidas por Instituições que mantêm micotecas no Brasil e pela indústria como se discrimina na Tabela 7.

Tabela 7. Linhagens de Saccharomyces uvarum utilizadas neste trabalho, com as respectivas origens e Instituições que as forneceram

Linhagens	Origem	Instituição
IZ-67	IGS	Instituto Zimotécnico (ESALQ-USP)
IZ-210	ATCC(10596)	"
IZ-237	ATCC(9373)	"
IZ-626	FMSP(1206)	"
IZ-847	CBS (131)	"
IZ-1327	IZ-108(P-115)	"
IZ-1430	FFSP	"
IZ-1828	IZ-A 239	"
IZ-1834	IZ-A 245	"
IOC-2490	-	Instituto Oswaldo Cruz (Min.da Saúde)
402	-	Instituto de Medicina Tropical (USP)
9080	-	"
SC	-	Usina Monte Alegre (Piracicaba)

3.2. Meios de Cultivo

3.2.1. Meio completo para leveduras - meio completo não sintético, usado para a manutenção do material em estoque e como meio de crescimento. Tem a seguinte composição (MORTIMER e HAWTHORNE, 1969):

Extrato de leveduras	10 g
Peptona	20 g
Glucose	20 g
Água até	1000 ml
Ágar	20 g (quando sólido)
(pH	6.0)

Autoclavado a 1,5 atm de pressão por 15 minutos.

3.2.2. Meio para ensaios de produção - meio sintético de composição definida original de WICKERHAM (1946) modificado, substituindo-se as vitaminas por extrato de leveduras, glucose por sacarose, omitindo-se aminoácidos e traços de certos elementos. Após ensaio de produção com uma linhagem, definiu-se a seguinte composição:

Sulfato de amônio	5 g
Sacarose (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 leveduras	2 g
Água até ,	1000 ml
Ágar	20 g (quando sólido)

(pH 6,0)

Autoclavado a 1,5 atm de pressão por 15 minutos.

3.2.3. Solução salina 0,15 M - solução empregada para se fazer diluções nos casos de semeadura e padronização do inóculo para os ensaios de produção. Esta é obtida dissolvendo-se 8 g de cloreto de sódio em 1000 ml de água destilada. A solução foi autoclavada a 1,5 atm de pressão por 15 minutos e guardada em frascos com 9 ml.

4. MÉTODO

4.1. Escolha do Material Biológico

A escolha de uma espécie adequada à produção de proteínas por microrganismos, deve obedecer a uma série de requisitos. Segundo BHATTACHARJEE (1970), convém se levar em conta as seguintes características desejáveis:

- a) Crescimento rápido num meio de material barato e abundante
- b) Requerimentos nutricionais simples
- c) Cultivo em suspensão e contínuo
- d) Separação e coleta simples
- e) Resistência a contaminação e fermentação estável
- f) Propriedades genéticas e fisiológicas conhecidas e potencial para ser melhorado geneticamente
- g) Utilização eficiente da fonte de energia
- h) Propriedades não tóxicas e não alérgicas
- i) Palatabilidade e economia
- j) Conteúdo protéico, lipídico e de carboidratos de alta qualidade
- k) Estocagem e requerimentos de empacotamento simples

Quanto ao substrato empregado na síntese de alimento microbiano, deve ser considerado principalmente a sua disponibilidade em abundância e que este seja barato. Recentemente, muito se tem cogitado quanto ao emprego de derivados de petróleo e gás natural, mas no Brasil este substrato apresenta uma série de problemas, sendo mais recomendável a utilização de outro material (MORITZ, 1972, comunicação pessoal*). Considerando-se estes fatores, orientou-se a escolha no sentido de uma espécie que mais se aproximasse dos requisitos mencionados.

Para a realização deste trabalho escolheu-se a levedura Saccharomyces uvarum Beijerinck, espécie com potencial favorável a vir a ser importante na síntese microbiana de alimentos, mesmo porque já é uma espécie conhecida na indústria açucareira, onde é usada para a produção de álcool a partir de melaço da cana. Além disto, o melaço é um substrato abundante no Brasil e a massa de leveduras, obtida no processo fermentativo, muito procurada para o arraçamento animal. Também, contamos com a colaboração de Instituições e da Indústria, que nos forneceram as linhagens, o que veio facilitar os trabalhos, pois assim foi contornado o problema do isolamento e classificação sistemática.

4.2. Cultivo

4.2.1. Escolha do meio de cultivo para ensaios de produção.

Foi feito um experimento para determinação da composição de um meio adequado, onde a sacarose fosse a fonte de carbono, a semelhança do melaço da cana, mas cujo meio tivesse composição definida. Assim, a

* V. MORITZ (1972) - Instituto de Bioquímica, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Guanabara.

partir do meio formulado por WIKERHAM (1946), substituindo glucose por sacarose, vitaminas por extrato de leveduras, omitindo os traços de certos elementos e mantendo a mesma composição para alguns sais, formularam-se os seguintes meios cuja composição aparece na Tabela 8. Estes foram inoculados com a linhagem 2490, de modo a se obter 2×10^4 células por ml de meio. Utilizaram-se frascos de Erlenmeyer de 250 ml com 50 ml de meio (três repetições por meio de cultivo), em agitador recíproco (Etica Equip. Cient. Ltda. mod. AG,K), por 24 horas a 28°C , após o que se mediu a densidade ótica de amostras de 7 ml em fotocolorímetro (Evans Electro-selenium Ltd., England).

Tabela 8. Meios de cultivo usados para a determinação daquele mais adequado para os ensaios de produção

Requerimentos	Meios			
	1	2	3	4
Sulfato de amônio	5,0g	5,0g	5,0g	5,0g
Sacarose (açúcar refinado)	10,0g	10,0g	15,0g	15,0g
Fosfato de Potássio Monobásico	1,0g	1,0g	1,0g	1,0g
Sulfato de Magnésio	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g
Cloreto de sódio	0,1g	0,1g	0,1g	0,1g
Extrato de leveduras	-	2,0g	-	2,0g
Água destilada até	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml

Os meios foram autoclavados a 1,5 atm por 15 minutos, pH 6,0.

4.2.2. Curva de Crescimento

Feita a determinação do meio de composição mais adequada, efetuou-se um experimento inteiramente casualizado com duas repetições para obtenção da curva de crescimento neste meio. Utilizaram-se frascos de

Erlenmeyer de 250 ml com 50 ml de meio de açúcar, inoculados com 2×10^4 células por ml de meio, que foram colocados em agitador recíproco a 28°C . Amostras foram obtidas após os períodos de 0-8-12-16-20-24-28-32-36-40-44 e 48 horas para a determinação da densidade ótica, peso seco e número de células viáveis.

A densidade ótica, foi obtida como no experimento anterior e o mesmo procedimento foi usado para os ensaios que se seguem.

O peso seco foi tomado a partir de amostras de 25 ml que foram centrifugadas (centrífuga Sorwall Superspeed RC2-B) a 5000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi ressuspendido em 3 ml de água destilada e colocado em vasos da Boemia de peso conhecido com 50 ml de capacidade e levado a estufa a 70°C por 24 horas. Após pesagem dos vasos da Boemia com a massa seca de leveduras, por diferença em relação ao peso dos vasos da Boemia (em balança Mettler H20T), se obteve o peso da massa seca. Este foi multiplicado por dois, para se estimar o peso para 50 ml de meio utilizado durante o cultivo. Este procedimento foi padronizado para os demais experimentos.

O número de células viáveis foi obtido a partir de amostras dos tempos mencionados. Foram coletadas duas amostras de 3 ml por frasco de Erlenmeyer para semeadura com diluições em meio completo sólido. Contagens foram efetuadas nas placas onde as diluições foram favoráveis a obtenção de colônias isoladas. Através da multiplicação do número das colônias pelo fator da diluição, determinou-se o número de células por ml de meio de cultivo.

4.2.3. Ensaio de Produção

Um organograma de trabalho é dado na Figura 1.

Figura 1. Organograma de trabalho para os ensaios de produção

As linhagens disponíveis foram semeadas com diluições em placas de Petri com meio completo sólido, para se obter colonias isoladas. Estas foram repicadas para uma placa de Petri e aí dispostas ordenadamente dez colonias tomadas ao acaso por linhagem. Estas placas serviram como placas mestras e usadas para se obter réplicas, segundo a técnica de LEDERBERG e LEDERBERG (1952). Este procedimento tinha por finalidade contornar o problema da contaminação, pois estas placas teriam que ser manuseadas constantemente. Assim, julgou-se conveniente manter um estoque das mesmas colonias isoladas durante os ensaios de produção.

Os experimentos foram planejados para atender à capacidade do agitador, no máximo 36 frascos de Erlenmeyer e ao mesmo tempo ao material, de modo a se ter convenientemente estudadas as linhagens e respectivas colonias. Para sua realização, inicialmente tomaram-se duas colonias isoladas de placas réplicas de cada linhagem e estas foram colocadas em tubos de ensaio com dez ml de meio de açúcar líquido e aí cultivadas por 24 horas a 28°C. Do mesmo modo tomaram-se as colonias testemunhas, a 2490-T e 402-T que foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 250 ml com 50 ml de meio para o cultivo por 24 horas a 28°C no agitador, para a produção de inóculo suficiente para todos os experimentos realizados. Em seguida, foi efetuada a contagem do número de células em câmaras de Neubauer e após diluições, se padronizou o inóculo para 10^6 células por mililitro.

Foi inoculado 1 ml deste inóculo em frascos de Erlenmeyer de 250 ml com 50 ml de meio líquido, o que representa uma concentração de 2×10^4 células por ml de meio de cultivo, a mesma empregada na determinação da curva de crescimento. Após o cultivo em agitador por 24 horas a 28°C foram feitas as mensurações para densidade ótica e peso seco. Este

procedimento em geral se repetiu nas mesmas condições por mais duas vezes, totalizando três repetições por experimento. Foram conduzidos cinco experimentos como mencionado, tendo apenas como variável em cada experimento, duas colônias diferentes tomadas ao acaso de cada linhagem. Assim, ao todo foram estudadas dez colônias de cada linhagem.

4.3. Estatísticas

4.3.1. Planejamento dos experimentos e análises da variância

Os ensaios de produção foram planejados segundo o delineamento estatístico em blocos ao acaso com três repetições, tendo como tratamentos duas colônias originárias de cada uma das treze linhagens disponíveis e mais duas testemunhas repetidas três vezes dentro de cada uma das repetições. Este procedimento se justifica pela necessidade de comparação de todas as linhagens entre si e também, das colônias dentro de cada linhagem. As colônias testemunhas com tal número de repetições dentro de experimentos, tinham por finalidade permitir a determinação da variação ambiental e possibilitar a comparação do material ensaiado com um genótipo padrão para todos os ensaios.

Estes experimentos foram analisados em duas etapas, compreendendo uma análise para os genótipos (Análise A) e uma análise complementar para as testemunhas (Análise B), correspondentes aos seguintes modelos matemáticos:

$$\text{Análise A: } y_{ijk} = \mu + r_j + s_i + v_{k(i)} + e_{ijk} \quad \text{onde: } s_i + v_{k(i)} = z_g$$

$$\text{Análise B: } y_{ijk} = \mu + r_j + t_i + e_{ij} + d_{k(ij)}$$

Onde as variáveis representam os seguintes efeitos:

r_j -- blocos
 s_i -- linhagens
 $v_{k(i)}$ -- colônias dentro de linhagens
 z_g -- genótipos
 t_i -- testemunhas
 e_{ijk}, e, e_{ij} -- erro
 $d_{k(ij)}$ -- erro dentro

Segundo estes modelos tem-se o quadro de análise da variância, com as esperanças matemáticas dos Quadrados Médios, como apresentado na Tabela 9.

Para aplicar o Teste de F, na Análise A se utilizou o QM_1 como usualmente é feito para se obter os valores de F. Para o cálculo deste valor correspondente ao QM_3 foi empregado o QM_2 , por ser mais adequado como mostram suas Esperanças Matemáticas. Para a Análise B, nos casos onde o QM_b apresentou valores de F não significativos quando relacionados ao QM_a , foi obtida uma estimativa da variação residual mais adequada para o cálculo dos valores de F, resultado da reunião dos QM_a e QM_b . Quando o QM_b mostrou-se significativo, foi usado para o cálculo dos valores de F para os demais Quadrados Médios.

Tabela 9. Quadro de análises da variância para os experimentos de produção, com as esperanças matemáticas dos Quadrados Médios, $E(QM)$, para as fontes de variação consideradas. Análise A: Linhagens e colônias delas obtidas. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições

	Fontes de variação	GL	$E(QM)$	QM
(A)	Blocos	2	$\sigma_a^2 + 26 \sigma_r^2$	(QM_5)
	Genótipos	25	$\sigma_a^2 + 3 \sigma_g^2$	(QM_4)
	Linhagens	12	$\sigma_a^2 + 3 \sigma_{v/s}^2 + 6 \sigma_s^2$	(QM_3)
	Colônias/Linh.	13	$\sigma_a^2 + 3 \sigma_{v/s}^2$	(QM_2)
	Resíduo	50	σ_a^2	(QM_1)
(B)	Blocos	2	$\sigma_b^2 + 3 \sigma_{rt}^2 + 6 \sigma_r^2$	(QM_d)
	Testemunhas	1	$\sigma_b^2 + 3 \sigma_{rt}^2 + 9 \sigma_t^2$	(QM_c)
	Resíduo	2	$\sigma_b^2 + 3 \sigma_{rt}^2$	(QM_b)
	Intrablocos/Testem.	12	σ_b^2	(QM_a)

Uma análise conjunta foi efetuada considerando os cinco experimentos, também em duas etapas correspondentes a uma análise conjunta para os genótipos (Análise A) e a uma análise conjunta complementar para testemunhas (Análise B). Estas análises obedeceram aos seguintes modelos matemáticos:

$$\text{Análise A: } y_{ijkl} = \mu + p_l + r_{j(l)} + s_{i(l)} + v_{k(i,l)} + e_{ijkl}$$

$$\text{Onde: } s_{i(l)} + v_{k(i,l)} = z_{g(l)}$$

$$\text{Análise B: } y_{ijkl} = \mu + p_l + r_{j(l)} + t_i + (tp)_{il} + e_{ijl} + d_{k(ijl)}$$

Onde as variáveis correspondem aos seguintes efeitos:

p_l	- experimentos
$r_{j(1)}$	- blocos dentro de experimentos
$s_{i(1)}$	- linhagens dentro de experimentos
t_i	- testemunhas
$(tp)_{il}$	- testemunhas x experimentos
$v_{k(i,1)}$	- colonias dentro de linhagens dentro de experimentos
$z_{g(1)}$	- genótipos dentro de experimentos
e_{ijkl}, e, e_{ijl}	- erro
$d_{k(ijl)}$	- erro dentro

Segundo estes modelos, tem-se o quadro de análise da variância, com as esperanças matemáticas dos Quadrados Médios, como apresentado na Tabela 10.

Ao se aplicar o Teste de F, na Análise A se utilizou o QM_1 como usualmente é feito para se obter os valores de F, mas para os QM_3 e QM_6 estes foram obtidos do seguinte modo:

$$F(QM_3) = \frac{QM_3}{QM_2} \quad e \quad F(QM_6) = \frac{QM_6 + QM_1}{QM_3 + QM_5}$$

Para a Análise B, nos casos onde o QM_b apresentou valores de F não significativos quando relacionado ao QM_a , foi obtida uma estimativa mais adequada da variância residual pela reunião dos QM_a e QM_b , para se calcular os valores de F para os demais Quadrados Médios. Apenas para o QM_f este valor foi calculado do seguinte modo:

$$F(QM_f) = \frac{QM_f + QM_b}{QM_e + QM_c}$$

Tabela 10. Quadro de análises conjuntas da variância para os experimentos de produção com as esperanças matemáticas, $E(QM)$, para as fontes de variação consideradas. Análise A: Linhagens e colônias delas obtidas. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições

Fontes de Variação	GL	$E(QM)$	QM
Experimentos	4	$\sigma_a^2 + 3\sigma_{v/s/p}^2 + 6\sigma_{s/p}^2 + 26\sigma_{r/p}^2 + 78\sigma_p^2$	(QM_6)
Blocos/Exper.	10	$\sigma_a^2 + 26\sigma_{r/p}^2$	(QM_5)
Genótipos/Exper.	125	$\sigma_a^2 + 3\sigma_{g/p}^2$	(QM_4)
(A) L Linhagens/Exper.	60	$\sigma_a^2 + 3\sigma_{v/s/p}^2 + 6\sigma_{s/p}^2$	(QM_3)
Colônias/Linh./Exper.	65	$\sigma_a^2 + 3\sigma_{v/s/p}^2$	(QM_2)
Resíduo Médio	250	σ_a^2	(QM_1)
Experimentos	4	$\sigma_b^2 + 3\sigma_e^2 + 6\sigma_r^2 + 9\sigma_{tp}^2 + 18\sigma_p^2$	(QM_f)
Blocos/Exper.	10	$\sigma_b^2 + 3\sigma_e^2 + 6\sigma_r^2$	(QM_e)
Testemunhas	1	$\sigma_b^2 + 3\sigma_e^2 + 9\sigma_{tp}^2 + 45\sigma_t^2$	(QM_d)
(B) Testem. x Exper.	4	$\sigma_b^2 + 3\sigma_e^2 + 9\sigma_{tp}^2$	(QM_c)
Resíduo Médio	10	$\sigma_b^2 + 3\sigma_e^2$	(QM_b)
Intrablocos/Exper.	60	σ_b^2	(QM_a)

A partir das análises conjuntas, obtiveram-se estimativas de variância com a finalidade de se estimar os parâmetros genéticos importantes para a seleção.

4.3.2. Estimação de parâmetros genéticos

O progresso esperado (ALLARD, 1960) foi estimado para cada método de seleção empregado segundo as fórmulas:

$$\Delta g_1 = k \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\sqrt{\frac{\hat{\sigma}^2}{3} + \hat{\sigma}_g^2}}$$

para "Seleção Entre Colonias", onde:

k - diferencial de seleção em unidades de desvio padrão retirado da ta
bela de FISCHER e YATES (1943), igual a 1,27.

$\hat{\sigma}_g^2$ - estimativa da variância entre genótipos.

$\hat{\sigma}^2$ - Quadrado Médio Residual

$$\Delta g_2 = k \frac{\hat{\sigma}_s^2}{\sqrt{\frac{\hat{\sigma}^2}{3} + \hat{\sigma}_s^2}}$$

para "Seleção Entre Linhagens", onde

k - igual a 0,81

$\hat{\sigma}_s^2$ - estimativa da variância genética entre linhagens

$$\Delta g_3 = k \frac{\hat{\sigma}_v^2}{\sqrt{\frac{\hat{\sigma}^2}{3} + \hat{\sigma}_v^2}}$$

para "Seleção Dentro de Linhagens", onde

k - igual a 0,56

$\hat{\sigma}_v^2$ - estimativa da variância genética entre colonias

Pela soma de Δg_2 e Δg_3 tem-se o progresso esperado
para "Seleção Entre e Dentro de Linhagem".

As herdabilidades foram calculadas pelas seguintes fórmu-
las:

$$h^2 = \frac{\hat{\sigma}_s^2}{\hat{\sigma}^2 + \hat{\sigma}_s^2 + \hat{\sigma}_v^2} \quad \text{para "Seleção Entre e Dentro de Linhagens".}$$

$$h^2 = \frac{\hat{\sigma}_v^2}{\hat{\sigma}^2 + \hat{\sigma}_v^2} \quad \text{para "Seleção Entre Colonias".}$$

4.4. Seleção

O critério de seleção empregado neste trabalho levou em conta os dois processos de medida, densidade ótica e peso seco, cujos valores foram obtidos no final da fase logarítmica de crescimento. Estes dados de produção de massa celular foram considerados para a seleção, em totais para as três repetições de cada experimento, do mesmo modo que usados para a Análise da Variância. São assinalados no Apêndice os valores correspondentes a linhagens e colonias selecionadas.

Os métodos de seleção aplicados, aqui chamados "Seleção Entre Colonias" e "Seleção Entre e Dentro de Linhagens", procuram aproveitar a variação natural existente entre os genótipos estudados e demonstrar o progresso que se pode conseguir mediante a sua aplicação.

Com a finalidade de comparação dos dois métodos de seleção, foi feita em ambos uma seleção com praticamente a mesma intensidade (aproximadamente 20%). Deste modo, para cada experimento, aplicando-se o método "Seleção Entre Colonias" foram escolhidas as seis colonias com maior produção entre as 26 colonias constantes do ensaio. Pelo método "Seleção Entre e Dentro de Linhagens", foram consideradas as seis linhagens mais produtivas dentre as treze linhagens (seleção "entre") e a colônia mais produtiva entre as duas colonias de cada linhagem selecionada (seleção "dentro").

5. RESULTADOS

Para maior facilidade de apresentação dos resultados, estes se acham subdivididos nos tópicos seguintes, obedecendo-se a sequência de obtenção das informações.

5.1. Cultivo

5.1.1. Escolha do meio de cultivo para os ensaios de produção

Como se verifica no item 4.2.1., inicialmente houve necessidade de ser determinada a composição do meio de cultivo utilizado nos ensaios de produção. Para isto foi conduzido um experimento em blocos ao acaso com três repetições e quatro tratamentos, estes correspondentes a quatro fórmulas de composição do meio. Os resultados obtidos após o cultivo da linhagem 2490, são apresentados na Tabela 11.

Para este caso foi julgado desnecessário fazer a análise estatística, pois se pode observar facilmente que os meios 2 e 4 permitiram um maior crescimento do que os meios 1 e 3. Os valores em densidade óptica obtidos nos meios mais favoráveis são muito próximos e como o meio nº 2 tem na sua composição uma menor quantidade de sacarose, portanto mais econômico que o nº 4 e produzindo resultados semelhantes a este, foi escolhido para ser utilizado nos ensaios de produção. Antes porém, um

experimento foi conduzido com a finalidade de se determinar a curva de crescimento da levedura neste meio.

Tabela 11. Densidade ótica obtida com a linhagem 2490, com inóculo padronizado, em meios derivados da fórmula de WIKERHAM (1946). Blocos ao acaso com três repetições

Meios \ Rep.	I	II	III	Média
1	0,54	0,54	0,60	0,56
2	5,50	5,40	5,40	5,43
3	0,87	0,78	0,70	0,77
4	5,70	5,45	5,50	5,55

5.1.2. Curva de Crescimento

Usando-se a linhagem 2490, inóculo padronizado para 2×10^4 células por ml de meio e conduzindo o ensaio com repetições, conseguiu-se determinar a curva de crescimento mediante três critérios de medida. Os resultados constam da Tabela 12 e das Figuras 2, 3 e 4.

Como mostram os dados, embora nos tempos iniciais haja uma grande discordância segundo os três critérios de medida, praticamente se obtém um comportamento semelhante a partir do tempo de 24 horas, por esta razão, aqui considerado como o tempo adequado para se efetuar as medidas nos ensaios de produção. Neste tempo, praticamente foi alcançado o final da fase logarítmica de crescimento e se inicia a fase de aceleração negativa, que é anterior a fase estacionária máxima, quando então há um equilíbrio entre o número de células vivas e as que morrem. Segundo os critérios de seleção estabelecidos, seria interessante selecionar o material antes de atingir esta fase.

Figura 2. Curva de crescimento da linhagem 2490 em meio de açúcar. Médias de duas repetições para cada tempo e de duas repetições por amostra tomada de cada repetição por tempo. Valores expressos em densidade ótica (DO)

Figura 3. Curva de crescimento da linhagem 2490 em meio de açúcar. Médias de duas repetições para cada tempo e de duas repetições por amostra tomada de cada repetição por tempo. Valores expressos em logaritmo do número de células (log)

Figura 4. Curva de crescimento da linhagem 2490 em meio de açúcar. Médias de duas repetições para cada tempo e de duas repetições por amostra tomada de cada repetição por tempo. Valores expressos em peso seco (mg)

Tabela 12. Crescimento da linhagem 2490 em meio de açúcar. Médias de duas repetições para cada tempo e de duas repetições por amostra tomada de cada repetição por tempo, para densidade ótica ($\overline{DO}$), número de células ($\overline{NC}$) por ml e peso seco ($\overline{PS}$) por 50 ml de meio

Horas	$\overline{DO}$	$\overline{NC}$	$\overline{PS}$
0	0,00	$1,8 \times 10^4$	0,00000
8	0,00	$3,0 \times 10^5$	0,01370
12	0,00	$2,2 \times 10^6$	0,03016
16	1,67	$6,9 \times 10^7$	0,07386
20	3,15	$2,1 \times 10^8$	0,09520
24	5,75	$3,4 \times 10^8$	0,17072
28	7,00	$4,6 \times 10^8$	0,22710
32	7,10	$2,8 \times 10^8$	0,21856
36	7,15	$2,1 \times 10^8$	0,21492
40	7,20	$1,9 \times 10^8$	0,21512
44	7,20	$1,1 \times 10^8$	0,21640
48	7,20	$2,6 \times 10^7$	0,21264

5.1.3. Ensaio de produção

Os ensaios de produção conduzidos num total de cinco experimentos, forneceram uma série de dados para densidade ótica e peso seco do material que são apresentados nas Tabelas I a X do apêndice. Nestas estão discriminadas a produção das linhagens utilizadas e das respectivas colônias delas isoladas ao acaso, e também, aquelas que foram selecionadas segundo os métodos adotados.

Cada experimento foi analisado isoladamente, sendo feita uma análise para cada tipo de mensuração efetuada, a saber densidade ótica e peso seco, como aparecem nas Tabelas 13 a 22. As Tabelas 13 e 14, referem-se ao primeiro ensaio de produção e nestas se pode verificar que houve uma certa concordância quanto ao padrão de significância para os dois critérios de medida. A significância para repetições mostra que foi conveniente se delinear os experimentos em blocos ao acaso, pois este efeito pode ser isolado, não contribuindo para afetar outras fontes de variação e com isto conferindo maior precisão aos resultados da análise. Um resultado interessante foi aquele da fonte de variação "Colonias/Linhagens", pois revela que existem diferenças significativas entre as duas colonias isoladas de cada linhagem.

Tabela 13. Ensaio de produção nº 1 - Análise da variância para os dados expressos em Peso Seco. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições.

F.V.	GL	QM	F
Blocos	2	0,001685	3,82*
Genótipos	25	0,005305	12,03**
(A) Linhagens	12	0,008840	4,33**
Colonias/Linhagens	13	0,002043	4,63**
Resíduo	50	0,000441	CV = 18,99%
Blocos	2	0,000110	0,25 n.s
Testemunhas	1	0,003307	7,66*
(B) Resíduo	14	0,000432	
Intrablocos/Test.	12	0,000483	CV = 16,14%

Tabela 14. Ensaio de produção nº 1 - Análise da variância para os dados expressos em Densidade Ótica. Análise A: Linhagens e colônias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições

F.V.	GL	QM	F
Blocos	2	0,3748	3,52*
Genótipos	25	5,9246	55,58**
(A) Linhagens	12	11,7738	22,42**
Colônias/Linhagens	13	0,5252	4,93**
Resíduo	50	0,1066	CV = 9,74%
Blocos	2	0,1488	0,94 n.s
(B) Testemunhas	1	4,6005	29,21**
Resíduo	14	0,1575	CV = 9,69%

Os resultados das análises efetuadas para o segundo experimento são apresentados nas Tabelas 15 e 16, onde se nota que para a maioria das fontes de variação houve concordância quanto à significância. Mas, para "Colônias/Linhagens" a significância foi diferente segundo os dois critérios de medida, o mesmo ocorrendo de modo contrário para "Testemunhas".

Tabela 15. Ensaio de produção nº 2 - Análise da variância para os dados expressos em Peso Seco. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições

F.V.	GL	QM	F
Blocos	2	0,004348	9,39**
Genótipos	25	0,005859	12,65**
(A) Linhagens	12	0,011448	16,35**
Colonias/Linhagens	13	0,000700	1,51 n.s
Resíduo	50	0,000463	CV = 19,04%
Blocos	2	0,006366	11,11**
(B) Testemunhas	1	0,003146	5,49*
Resíduo	14	0,000573	CV = 14,47%

Tabela 16. Ensaio de produção nº 2 - Análise da variância para os dados expressos em Densidade Ótica. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições

F.V.	GL	QM	F
Blocos	2	0,6488	3,61*
Genótipos	25	5,4252	30,21**
(A) Linhagens	12	10,8621	26,72**
Colonias/Linhagens	13	0,4065	2,26*
Resíduo	50	0,1796	CV = 13,17%
Blocos	2	2,6016	232,28**
(B) Testemunhas	1	0,0450	4,02 n.s
Resíduo	14	0,0112	CV = 2,14%

As análises da variância para o terceiro experimento são apresentadas nas Tabelas 17 e 18. Comparando o padrão de significância das análises para peso seco e densidade ótica, verifica-se na análise complementar para testemunhas um resultado diferente segundo os dois critérios de medida.

Tabela 17. Ensaio de produção nº 3 - Análise da variância para os dados expressos em Peso Seco. Análise A: Linhagens e colônias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições.

F.V.	GL	QM	F
Blocos	2	0,000576	1,50 n.s
Genótipos	25	0,006369	16,54**
(A) Linhagens	12	0,011299	6,21**
Colônias/Linhagens	13	0,001819	4,72**
Resíduo	50	0,000385	
CV = 16,00%			
Blocos	2	0,003191	2,74 n.s
(B) Testemunhas	1	0,000228	0,20 n.s
Resíduo	14	0,001166	
CV = 19,48%			

Tabela 18. Ensaio de produção nº 3 - Análise da variância para os dados expressos em Densidade Ótica. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições

F.V.		GL	QM	F	
Blocos		2	0,4467	1,98 n.s	
Genótipos		25	5,9556	26,40**	
(A)	Linhagens	12	10,3209	5,36**	
	Colonias/Linhagens	13	1,9260	8,54**	
Resíduo		50	0,2256		CV = 17,40%
Blocos		2	0,1600	0,65 n.s	
Testemunhas		1	2,5233	10,30**	
(B)	Resíduo	2	0,2450	9,57**	
Intrablocos/Test.		12	0,0256		CV = 11,08%

Nas Tabelas 19 e 20 são apresentados os quadros das análises da variância para o quarto experimento, onde se verifica que apenas para "Colonias/Linhagens" e para "Testemunhas" os padrões de significância são diferentes para os critérios de medida usados.

Tabela 19. Ensaio de produção nº 4 - Análise da variância para os dados expressos em Peso Seco. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições

F.V.	GL	QM	F	
Blocos	2	0,000167	0,56 n.s	
Genótipos	25	0,007608	25,53**	
(A) Linhagens	12	0,013064	69,12**	
Colonias/Linhagens	13	0,000189	0,63 n.s	
Resíduo	50	0,000298		CV = 17,24%
Blocos	2	0,000216	0,30 n.s	
(B) Testemunhas	1	0,001494	2,09 n.s	
Resíduo	14	0,000714		CV = 19,91%

Tabela 20. Ensaio de produção nº 4 - Análise da variância para os dados expressos em Densidade Ótica. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições.

F.V.	GL	QM	F	
Blocos	2	0,0574	0,71 n.s	
Genótipos	25	7,9899	99,25**	
(A) Linhagens	12	14,8788	9,12**	
Colonias/Linhagens	13	1,6310	19,89**	
Resíduo	50	0,0805		CV = 11,70%
Blocos	2	0,0239	0,04 n.s	
Testemunhas	1	6,7222	10,23**	
(B) Resíduo	2	0,6572	6,36*	
Intrabloco/Test.	12	0,1034		CV = 21,78%

As análises da variância para o quinto experimento constam das Tabelas 21 e 22, que mostram discordância quanto à significância apenas para a Análise B, ao se comparar as análises para peso seco e densidade ótica.

Tabela 21. Ensaio de produção nº 5 - Análise da variância para os dados expressos em Peso Seco. Análise A: Linhagens e colônias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições

F.V.	GL	QM	F
Blocos	2	0,001340	5,36**
Genótipo	25	0,007970	31,88**
(A) Linhagens	12	0,015618	17,16**
Colônias/Linhagens	13	0,000910	3,64**
Resíduo	50	0,000250	
CV = 11,69%			
Blocos	2	0,002522	16,27**
(B) Testemunhas	1	0,004140	26,71**
Resíduo	14	0,000155	
CV = 7,76%			

Tabela 22. Ensaio de produção nº 5 - Análise da variância para os dados expressos em Densidade Ótica. Análise A: Linhagens e colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições.

F.V.	GL	QM	F
Blocos	2	0,6835	4,06*
Genótipos	25	7,8222	46,45**
(A) Linhagens	12	14,9150	11,70**
Colonias/Linhagens	13	1,2750	7,57**
Resíduo	50	0,1684	
CV = 12,75%			
Blocos	2	1,4288	4,37*
Testemunhas	1	0,5000	1,53 n.s
(B) Resíduo	2	0,3267	7,63**
Intrablocos/Test.	12	0,0428	
CV = 12,86%			

Os quadros da análise da variância das Tabelas 23 e 24 permitem obter informações mais gerais, pois são reunidos numa só análise os resultados obtidos nos cinco experimentos. Na Tabela 23 tem-se a análise para o peso seco e na Tabela 24 para densidade ótica. Nestas se pode verificar que o padrão de significância para a Análise A é o mesmo para os dois critérios de medida adotados, mas que para a Análise B apenas há concordância para as fontes de variação "Experimentos" e "Blocos/Experimentos".

Tabela 23. Análise da variância para valores expressos em peso seco dos experimentos de produção. Análise A: Linhagens e Colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições

F.V.	GL	QM	F
Experimentos	4	0,005632	0,44 n.s
Blocos/Exper.	10	0,001623	4,42**
Genótipos/Exper.	125	0,006622	12,04**
(A) Linhagens/Exper.	60	0,012054	10,65**
Colonias/Linh./Exper.	65	0,001132	3,08**
Resíduo Médio	250	0,000367	
Experimentos	4	0,007421	2,48 n.s
Blocos/Exper.	10	0,002481	5,92**
(B) Testemunhas	1	0,010736	27,18**
Testem. x Exper.	4	0,000395	0,94 n.s
Resíduo Médio	70	0,000419	

Tabela 24. Análise conjunta da variância para valores expressos em densidade ótica dos experimentos de produção. Análise A: Linhagens e Colonias. Análise B: Testemunhas. Blocos ao acaso com três repetições

F.V.	GL	QM	F
Experimentos	4	11,0481	0,87 n.s
Blocos/Exper.	10	0,3056	2,01*
Genótipos/Exper.	125	6,6235	43,52**
(A) Linhagens/Exper.	60	12,5501	10,89**
Colonias/Linh./Exper.	65	1,1527	7,57**
Resíduo Médio	250	0,1522	
Experimentos	4	3,7841	1,34 n.s
Blocos/Exper.	10	0,8726	2,92*
Testemunhas	1	4,3560	2,22 n.s
(B) Testem. x Exper.	4	1,9580	6,56**
Resíduo Médio	10	0,2986	12,55**
Intrablocos/Exper.	60	0,0238	

Como se verifica, houve uniformidade na condução dos ensaios ("Experimentos", n.s.) e o delineamento experimental usado foi adequado ("Blocos/Experimentos*").

5.2. Estimação de parâmetros genéticos

Pelo fato de haver diferenças significativas entre linhagens e entre colônias, há possibilidade de se fazer seleção entre linhagens, dentro de linhagens ou combinados os dois métodos. Assim, na Tabela 25, têm-se os progressos esperados para os métodos seleção descritos e na Tabela 26 as herdabilidades para ambos, segundo densidade ótica e peso seco.

Tabela 25. Progressos esperados por seleção para "Seleção Entre Colônias" e "Seleção Entre e Dentro de Linhagens"

Progresso esperado	Peso Seco		Densidade Ótica	
	(g)	%	Valor	%
Δ_g Entre Linhagens	0,033453	29,64	1,1018	37,30
Δ_g Dentro de Linhagens	0,007354	6,52	0,3013	10,20
Δ_g Entre e Dentro de Linhagens	0,040807	36,15	1,4031	47,50
Δ_g Entre Colônias	0,056365	49,94	1,8437	62,42

Tabela 26. Herdabilidade do caráter segundo a "Seleção Entre Colônias" e "Seleção Entre e Dentro de Linhagens"

Herdabilidade (h^2)	Peso Seco (%)	DO (%)
h^2 para "Entre Colônias"	41,00	68,66
h^2 para "Entre e Dentro de Linhagens"	74,53	79,64

Como se observa, a "Seleção Entre Colônias" apresenta valores maiores do progresso esperado por seleção do que a "Seleção Entre e Dentro de Linhagens". As herdabilidades, para este último método são maiores.

6. DISCUSSÃO

Como parte de um projeto integrado de pesquisas visando ao aumento da produção de proteínas, considerou-se de interesse o desenvolvimento de um programa de melhoramento de microrganismos produtores de proteínas, no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Como providências iniciais procurou-se escolher uma espécie adequada como modelo para a produção microbiológica de proteínas, mediante o critério apresentado por BHATTACHARJEE (1970). Também, esta espécie deveria ser favorável a aplicação de métodos de melhoramento realizáveis em condições de laboratório. Estes aproveitariam a variação natural, à semelhança do melhoramento de organismos superiores, onde se tem alcançado resultados mais consistentes do que através da variação induzida.

Os resultados aqui discutidos, demonstram que alguns recursos técnicos do melhoramento em função de parâmetros brométricos, são de franca aplicação para microrganismos produtores de proteínas e que também, devido a sua simplicidade, podem ser generalizados para outras espécies, onde o melhoramento envolva caracteres quantitativos.

Para maior facilidade de apresentação da discussão, esta se acha repartida nos tópicos seguintes:

6.1. Ensaio de produção

Como anteriormente explicado, os ensaios de produção obedeceram a um planejamento estatístico envolvendo um total de cinco experimentos. Estes foram conduzidos após a determinação de um meio adequado para o cultivo e da curva de crescimento neste meio, sob condições que foram padronizadas para os demais ensaios.

Os procedimentos preliminares foram conclusivos para o estabelecimento do critério de seleção a ser aplicado nos ensaios de produção. Este levou em conta como padrão que, a densidade ótica e o peso seco obtidos após 24 horas de cultivo, em agitador a 28°C, com inóculo inicial de 2×10^4 células por ml de meio, representavam as mensurações mais adequadas para a seleção. Nestas condições, a seleção seria efetuada antes da fase estacionária máxima da curva de crescimento, evitando assim o início da mortalidade das células.

As medidas de densidade ótica e peso seco, mostraram-se mais viáveis do que a contagem do número de células, esta impraticável devido ao volume do material a ser manuseado. Como pode ser observado na Tabela 12 e Figuras 2, 3 e 4, para o tempo padrão de tomada de dados, há uma certa concordância entre os valores das mensurações efetuadas. Com efeito, calculando o valor de r da correlação entre os dados de densidade ótica e peso seco, encontrou-se um valor igual a 0,99, altamente significativo, para o experimento da curva de crescimento. Deste modo, estes processos de medida forneceriam praticamente a mesma informação. Contudo, as análises estatísticas para os experimentos evidenciaram que nem sempre, as fontes de variação consideradas obedeceram ao mesmo padrão de significância, isto é, de modo concordante para os dois processos de medida. Embora o rigor para ambas tenha sido praticamente o mesmo, supõe-se que fatores ambientais influenciaram a precisão de cada tipo de mensuração, como

mostram os coeficientes de variação relativamente elevados. Isto de certo modo permite inferir que as diferenças foram suficientemente grandes para permitir a detecção de significância, mesmo com valores relativamente altos dos coeficientes de variação. Aliás, resultados obtidos por TAVARES e AZEVEDO (1974), em ensaios de produção na indústria de cruzamentos dialélicos em Aspergillus niger, revelaram valores ainda maiores para os coeficientes de variação, sem prejuízo das conclusões.

Pelas razões mencionadas, o planejamento estatístico com repetições foi adequado para este estudo, pois dificilmente no manuseio de tal número de tratamentos, se conseguiria manter uniformes as condições ambientais para todos eles. Através do delineamento usado, as diferenças referentes a repetições pode ser isolada num efeito devido a "Blocos", o que confere maior precisão às respostas obtidas para as demais fontes de variação. Observe-se que em praticamente todos os experimentos os efeitos de "Blocos" foram significativos, evidenciando que o delineamento experimental foi conveniente, sendo recomendável para outros casos semelhantes.

No primeiro experimento (Tabelas 13 e 14), foram detectadas diferenças significativas para "Linhagens" e "Colonias/Linhagens", segundo os dois processos de medida. Seria de se esperar o primeiro resultado, pois as linhagens são diferentes, mas para "Colonias/Linhagens", pode ser explicado devido a variações causadas por mutações que devem ter ocorrido durante a estocagem do material. Quanto a este aspecto CATEN (1970), estudando a variabilidade espontânea de isolados de Phytophthora infestans, encontrou que a variação numa progênie de zoosporos de uma cultura individual é maior que entre uma amostra de isolados selvagens. Em relação a análise das testemunhas (Análise B), as diferenças de significância para os dois processos de medida podem ser explicadas em virtude das diferenças

entre os respectivos coeficientes de variação.

No segundo experimento (Tabelas 15 e 16), as diferenças de resposta para as análises B podem ser explicadas do mesmo modo que para o primeiro experimento, assim como as diferenças para "Colonias/Linhagens", devido às diferenças entre os coeficientes de variação. Neste caso houve uma significância pouco consistente para densidade ótica e não significância para o peso seco.

No terceiro experimento (Tabelas 17 e 18), apenas nas análises das testemunhas o padrão de significância não foi o mesmo para densidade ótica e peso seco. Isto também pode ser devido a precisão das medidas serem diferentes e como as testemunhas provavelmente interagem mais com o ambiente, apresentam resultados mais contrastantes.

No quarto experimento (Tabelas 19 e 20), os resultados obtidos podem ser discutidos do mesmo modo que para o primeiro experimento.

No quinto experimento (Tabelas 21 e 22), os resultados se mostraram semelhantes ao terceiro experimento e são explicados do mesmo modo.

Os resultados obtidos nas análises conjuntas (Tabelas 23 e 24), pelas razões anteriormente mencionadas, permitem se obter informações mais gerais, pois delas constam a reunião dos dados obtidos nos cinco experimentos. Assim, para os dados aqui discutidos, pode-se afirmar que as colonias de cada linhagem apresentaram produções diferentes, que o delineamento experimental foi adequado e que os experimentos foram conduzidos com certa uniformidade, o que é dado pela não significância para a fonte de variação "Experimentos". A análise B para peso seco mostrou que o erro cometido para esta medida foi menor, não havendo interação entre as testemunhas e experimentos. Isto não ocorreu para a Análise B da densidade ótica, o que contribuiu para um mascaramento da resposta para

"Testemunhas".

Com base nas análises conjuntas se fez a determinação do progresso esperado por seleção, para os métodos de seleção aqui propostos, "Seleção Entre Colonias" e "Seleção Entre e Dentro de Linhagens" e também, das herdabilidades para ambas as técnicas.

6.2. Seleção

Como justificado no item 4.4., foram utilizados neste trabalho dois métodos de seleção e para ambos estimaram-se os progressos esperados e suas herdabilidades (Tabelas 25 e 26). Neste estudo a intensidade de seleção foi praticamente a mesma, o que permite comparar tais valores. Assim, a "Seleção Entre Colonias" apresentou ganhos genéticos esperados, segundo a densidade ótica (62,42%) e o peso seco (49,94%), superiores à "Seleção Entre e Dentro de Linhagens" (respectivamente 47,50% e 36,15%), embora para este último as herdabilidades ao nível de indivíduos tenham sido maiores. Estes resultados mostram claramente que através do aproveitamento da variação natural é possível se esperar ganhos genéticos altamente satisfatórios, mediante os métodos de seleção aqui empregados. Desse modo, pelo menos em estágio inicial de um programa de melhoramento, seria conveniente procurar se aproveitar a variação natural existente, antes de se optar pela variação induzida, comumente utilizada no melhoramento de microrganismos.

Os métodos de seleção propostos neste trabalho, têm possibilidade de aplicação em populações segregantes obtidas das linhagens e colonias selecionadas como mencionado. Para isto é necessária a obtenção de uma esporulação homogênea do material e intercruza-lo em pares, em todas as combinações ou ao acaso. Em seguida, para o estudo da produção das colonias obtidas de cruzamento, pode ser aplicada a metodologia

apresentada no item 4.2.. Contudo considere-se que nem todas as colonias são capazes de esporular e que a espécie Saccharomyces uvarum Beijerinck possui fraca esporulação (FOWELL, 1969).

O procedimento acima sugerido deverá dar continuidade ao presente trabalho, objetivando ainda demonstrar que os métodos de melhoramento propostos e a metodologia utilizada podem ser aplicados a populações segregantes, deste modo acentuando a sua generalização.

6.3. Considerações Gerais

Para o mundo atual, os processos fermentativos de muitas espécies microbianas tornaram-se fundamentais para o cotidiano da vida moderna e por isto, cada vez maior é a importância da indústria de fermentações. Além disto, os microrganismos atualmente são considerados como fonte de alimento promissora, para atender à crescente demanda, de modo que sua importância tende a ser ainda maior. Diante destes aspectos cada vez mais são necessários trabalhos que visem ao seu aprimoramento genético e que sejam formulados métodos mais eficientes para se alcançar este objetivo.

O melhoramento de microrganismos fundamentado em bases científicas é recente e pode-se considerar como iniciado há cerca de 30 anos, quando foi isolada com sucesso a primeira linhagem altamente eficiente para a produção de penicilina, mediante a indução de mutação pelos raios X. A linhagem de Penicillium chrysogenum X-1612 obtida na Carnegie Institution Cold Spring Harbour, tem originado outras não menos importantes (DEMAIN, 1973). Contudo, o homem desde os primórdios da fabricação de vinho, cervejas, pão e derivados do leite, vem cultivando e aprimorando linhagens, aplicando métodos que apesar de empíricos, têm produzido linhagens altamente eficientes para o desenvolvimento das fermentações a que

se destinam.

A Microbiologia Industrial e a Engenharia muito têm contribuído para o desenvolvimento da indústria de fermentações. A partir de 1940, a Genética de Microrganismos, com seu progresso espetacular, vem fornecendo subsídios principalmente no campo da mutação e da elucidação dos processos de recombinação, que podem ser positivamente explorados no melhoramento de microrganismos de interesse. Contudo, a Microbiologia Industrial e a Genética de Microrganismos, têm progredido por caminhos diversos e nem sempre os trabalhos consideram um objetivo de interesse mútuo. As espécies modelo da Genética de Microrganismos não possuem importância direta para a Indústria de Fermentações, mas o seu estudo tem possibilitado oportunidades de aplicação com sucesso dos princípios e descobertas que tem sido feitos. Neste particular, o estudo da mutação e dos mutagênicos, representam a maior contribuição fornecida pela Genética de Microrganismos, haja visto o grande emprego da técnica da mutação-seleção no melhoramento como se verifica nas publicações de SERMONTI (1969) e DEMAÏN (1973).

Com menor expressão a recombinação genética tem auxiliado o desenvolvimento de linhagens superiores, apesar da sugestão de PONTECORVO, ROPER e FORBES (1953), quanto a aplicação prática da recombinação somática nas Indústrias de Fermentações. Embora para muitos a recombinação não tenha produzido bons resultados, atestam os trabalhos de vários autores que, por este método, podem ser obtidos aumentos consideráveis da produção, como apresentam HOLT e MACDONALD (1968), BALL (1969), LODDER, KHOU-DOKORMOFF e LANGEAN (1969), GARIBOVA (1970), BALL (1971), BALL (1973), CALAM, DAGLISH e GAITSKELL (1973), ELANDER e col. (1973), MACDONALD (1973), SPALLA (1973) e MORRISON e BALL (1974).

Face a repercussão dos resultados obtidos pelos pesquisadores que utilizaram a recombinação no melhoramento, um grande interesse vem sendo despertado para a utilização deste método. DEMAIN (1973), de certo modo justifica que os trabalhos têm sido escassos neste sentido, por que poucos são os pesquisadores que possuem um treinamento formal em Genética de Microrganismos. Embora estes tenham obtido sucesso na aplicação dos conceitos simples da mutação, tem sido difícil conduzir experimentos sofisticados de recombinação genética. Além disto, conforme o autor, o planejamento e a execução de experimentos de recombinação são difíceis e requerem tempo e paciência, condições nem sempre encontradas em laboratórios de indústrias, os quais estão continuamente sob pressão para melhorar a produção tão rapidamente quanto possível.

Apesar desta situação, temos a considerar que novas áreas de interesse vêm sendo desenvolvidas, como os estudos de vias biossintéticas primárias e secundárias, de regulação, etc..., que se revelam mais imediatamente promissoras para o melhoramento científico de microrganismos. Contudo, convém observar que a aplicação da recombinação é uma área de grande potencial, como também uma nova orientação que surge, a adaptação dos princípios do melhoramento de organismos superiores a microrganismos. Esta metodologia vem sendo aplicada no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e também por alguns autores como JINKS e CATEN (1974); CALAM, DAGLISH e MACCANN (1974) e MERRICK (1974).

Como mencionado por JINKS e CATEN (1974) esta metodologia pode ser prontamente adaptada a microrganismos possuidores de sistemas de recombinação, mesmo se o caráter considerado envolva as fases haplóides, dicariótica ou diplóide do ciclo vital. No seu trabalho sugerem que de um simples cruzamento haplóide, informações podem ser obtidas para a

herdabilidade do caráter, o número de genes envolvidos e seu modo de ação e localização nos cromossomos. Embora os resultados aqui discutidos não tenham considerado estes últimos aspectos, envolveram a determinação das herdabilidades e os progressos esperados por seleção.

Um aspecto importante foi levantado por JINKS e CATEN (1974), quanto às dificuldades de extensão da Genética Quantitativa a sistemas de recombinação não meióticos, uma vez que esta é complicada devido a sua natureza seletiva e pela necessidade de usar marcadores. Devido a seleção de segregantes e recombinantes, a adaptação de métodos que visem aos componentes da variância não podem ser aplicados. Contudo, regiões marcadas do genoma de diferentes linhagens podem ser estudadas para alelos afetando o caráter, deste modo tornando possível a formação de linhagens incorporando segmentos de genomas desejáveis de muitas fontes. Um mapa de ligação será essencial para esta finalidade e para os marcadores que afetam frequentemente os caracteres quantitativos, se faz necessário adotar delineamentos experimentais balanceados para evitar esta complicação. A propósito, DITCHEBURN, HOLT e MACDONALD (1974) apresentaram resultados da localização genética de mutações que aumentam a produção de penicilina em Aspergillus nidulans, o que mostra a viabilidade de tal proposição. E, TAVARES e AZEVEDO (1974), não encontraram limitações quanto à natureza seletiva da recombinação não meiótica, provavelmente em virtude do seu objetivo prático de utilização do ciclo parassexual. Neste trabalho os autores estudaram vinte e cinco linhagens comerciais de Aspergillus niger para a produção de ácido cítrico, utilizando cruzamentos dialélicos envolvendo o ciclo parassexual. Obtiveram diplóides estáveis com elevada produção de ácido e estimaram parâmetros genéticos de utilidade para o melhoramento, como as capacidades geral e específica de combinação, estas com diferenças significativas. As estimativas da variação natural e induzida,

permitiram observar que esta última foi de magnitude inferior à natural e também as herdabilidades para o caráter em estudo.

Um outro trabalho com o mesmo objetivo deste em discussão, foi apresentado por MERRICK (1974), que tinha por finalidade a adaptação de princípios biométricos para a produção de penicilina, estudando-se a extensão e a natureza da variação genética em isolados selvagens de Aspergillus nidulans. Uma comparação de 52 isolados revelou variação significativa para a produção de penicilina, resultado semelhante àquele aqui apresentado, embora o caráter seja produção de massa celular.

O estudo de MERRICK (1974) foi mais adiante, detectando que os genes controlando o título de penicilina estavam agindo de um modo aditivo. Para isto, necessitou fazer cruzamentos sexuais entre os isolados selvagens, os quais confirmaram que as diferenças de título eram geneticamente controladas, embora a segregação de genes que afetam o caráter tenha sido consistente em quatro de sete cruzamentos efetuados. Um programa de seleção foi então iniciado para obter linhagens de alto título, usando a variação natural. Oito isolados selvagens foram cruzados sexualmente em pares para estabelecer quatro linhas de seleção independentes. Em todas as quatro, o título médio foi aproximadamente duplicado depois de quatro ou cinco gerações, em cujo tempo as respostas tenderam à estabilização e a maior parte da variação genética foi esgotada. Convém comentar que os métodos de seleção, sugeridos no presente trabalho, para aplicação pelo menos em estágio inicial de um programa de melhoramento, se fundamentam em resultados como estes de MERRICK (1974), do aproveitamento da variação natural até onde sejam obtidos progressos. A partir de então, conviria se utilizar outras técnicas capazes de aproveitar de modo mais eficiente a variação natural, ou promover maior variação através do uso de mutagênicos. Com efeito, MERRICK (1974) conseguiu num segundo ciclo de

seleção dos cruzamentos, um aumento no título de penicilina. Provavelmente aplicou técnicas mais eficientes de seleção, isto supondo, porque o autor observou que os cruzamentos entre linhagens diferentes mostraram maior variação, do que os cruzamentos entre isolados selvagens independentes, causada pela fixação de diferentes genes.

Como conclui MERRICK (1974), o seu trabalho demonstra o valor dos métodos biométricos na análise do controle poligênico do título de penicilina e a possibilidade de se produzir linhagens melhoradas pela hibridação. Observou contudo, que a quantidade de variação em Aspergillus nidulans induzida pela mutação está agora sendo examinada. A propósito, numa linha de trabalho relacionada CALAM, DAGLISH e McCANN (1974), desenvolveram um programa exploratório usando linhagens de alta produção de Penicillium chrysogenum. O programa envolveu cruzamentos ao acaso, uma série de mutações, investigações quanto a recombinação com linhagens possuidoras de mutações auxotróficas e coloração diferente de esporos e a obtenção de diplóides de cruzamentos entre irmãos. Verificaram que os melhores isolados, para produção e esporulação abundante, provieram dos cruzamentos ao acaso seguido por três etapas de mutações. Os diplóides homozigotos possuíam produção alta, porém cresceram menos vigorosamente que o esperado e frequentemente não esporularam adequadamente. Esta metodologia empregada, como se verifica, envolve o aproveitamento da variação natural e induzida, e como faz o melhorista de organismos superiores, também aproveita os efeitos heteróticos que podem ser obtidos na forma diplóide, aliás a semelhança do que fizeram TAVARES e AZEVEDO (1974) com a espécie Aspergillus niger.

Numa consideração final, convém salientar que esta nova linha de pesquisa, contando com outros trabalhos, permitirá fundamentar o melhoramento de microrganismos em bases mais concretas. Embora a técnica

da mutação-seleção tenha produzido bons resultados, sua metodologia consiste essencialmente na produção de variações aleatórias. Por outro lado, através da aplicação da recombinação, torna-se possível a obtenção de mudanças na direção desejada. Especialmente para os métodos salientados, a seleção dirigida pode contar com muitos exemplos fornecidos pelo melhoramento de organismos superiores, os quais podem ser positivamente capitalizados no melhoramento de microrganismos.

7. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho conduzido no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, tem por finalidade demonstrar a aplicação de alguns princípios do melhoramento de organismos superiores a microrganismos. Utilizou-se a levedura Saccharomyces uvarum Beijerinck, considerada como espécie promissora para a produção de proteína monocelular no Brasil. O caráter quantitativo massa celular foi objeto de atenção, como possível de ser melhorado mediante os critérios utilizados, que visam ao aproveitamento da variação natural.

Foram empregadas treze linhagens diferentes, fornecidas por Instituições que mantêm micotecas no Brasil e pela Indústria, das quais se obteve colônias isoladas para a realização dos experimentos. Estes num total de cinco, obedeceram ao delineamento em blocos ao acaso com três repetições, onde se ensaiaram 32 tratamentos, correspondentes a duas colônias diferentes de cada uma das linhagens disponíveis e mais duas testemunhas repetidas três vezes em cada experimento. Através das medidas de densidade ótica e peso seco, efetuaram-se análises da variância para cada experimento e uma análise conjunta com a finalidade de se obter informações mais gerais. Esta última permitiu estimar variâncias e parâmetros genéticos importantes para o melhoramento.

As análises estatísticas evidenciaram diferenças significativas entre linhagens e colônias delas isoladas permitindo-se aplicar dois métodos de melhoramento, a "Seleção Entre Colônias" e a "Seleção Entre e Dentro de Linhagens", adequados ao aproveitamento da variação disponível entre os genótipos. Foram estimados os progressos esperados por seleção para ambos os métodos e também as herdabilidades para a produção, considerando os dois processos de medida empregados nos ensaios.

Segundo os resultados obtidos podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1. Os métodos utilizados neste trabalho para a levedura Saccharomyces uvarum Beijerinck, foram eficientes e demonstram que os princípios do melhoramento de organismos superiores são de franca aplicação para microrganismos.

2. Os métodos de seleção "Seleção Entre Colônias" e "Seleção Entre e Dentro de Linhagens", aplicados em função das diferenças significativas entre os genótipos estudados, evidenciam que o aproveitamento da variação natural deve ser feito pelo menos em estágio inicial de um programa de melhoramento, antes de se utilizar a variação induzida como feito comumente.

3. Os métodos de seleção mencionados, apresentaram um progresso esperado por seleção e herdabilidade com valores elevados, mostrando-se promissores para o melhoramento de microrganismos e principalmente, devido a sua simplicidade e facilidade de execução, podem ser generalizados para outras espécies e finalidades.

4. A produção de massa celular, como outros caracteres quantitativos em microrganismos, podem ser melhorados e convenientemente estudados através da metodologia preconizada neste trabalho, que utiliza os

princípios da Genética Quantitativa e da Estatística Experimental.

5. Como evidenciado neste trabalho, os princípios do melhoramento em função de parâmetros biométricos, podem não apenas ser vantajosamente aplicados a microrganismos, como também, devido ao potencial favorável dos microrganismos para o desenvolvimento de estudos com finalidade teórica e prática, estes podem contribuir efetivamente na solução de muitos problemas do melhoramento.

8. SUMMARY AND CONCLUSIONS

This work has been carried out at The Department of Genetics, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", University of São Paulo. The main purpose was to approach to microorganisms some breeding principles of higher organisms. The yeast Saccharomyces uvarum Beijerinck was chosen because it has economic value in the sugar cane industry and could be of great value for single cell protein production in Brazil. Cell mass production, a quantitative character measured by optical density and dry weigh, was considered to be improved by methods wich hold the natural variation.

Thirteen different strains were at our disposal, from which one ten isolates were tested. Arandomized complete block design was applied to five experiments. Through estimates of variances the genetic parameters heritability and the expected genetic advance were obtained. Those were related to the selection methods devised "Selection Among Isolates" and "Selection Among and Intra Strains".

The results obtained support the following conclusions:

1. The employed methods in this work to the yeast Saccharomyces uvarum Beijerinck were efficient and demonstrate that the breeding methods used for higher organisms could be approached to microorganisms.

2. The selection methods "Selection Among Isolates" and "Selection Among and Intra Strains", devised in relation to significative differences among the studied genotypes, have shown that it is convenient to hold the natural variation mainly to start a breeding program, before to use, as commonly, the induced variation.

3. The mentioned selection methods, have presented high values to the expected genetic advance and heritability which shows its suitability to the breeding of microorganisms and mainly due to its simplicity and easiest execution, could be generalized to others species and purposes.

4. The cell mass production, as another quantitative characters in microorganisms, could be conveniently improved and studied by the suggested methodology in this work, which utilizes Quantitative Genetics and Experimental Statistics principles.

5. To have been shown in this work, the breeding principles related to biometric parameters should not only be advantageously applied to microorganisms, but also due to its favorable potential, develop studies for theoretical and practical purposes, to which the microorganisms must contribute to the resolutions of many breeding problems.

9. BIBLIOGRAFIA

- AIBA, S., M. OKABE e M. OKADA (1973) - Optimization of continuous fermentation; plug-flow fermentors. Global Impacts of Applied Microbiology, IVth International Conference. Abstracts, p. 20.
- ALIKAWIAN, S.I. (1962) - Induced mutagenesis in the selection of microorganisms. Advances in Applied Microbiology, 4:1-50.
- ALLARD, R.W. (1960) - Principles of Plant Breeding. John Wiley & Sons, New York, 485 pp.
- ARAUJO NETO, J.S. e A.D. PANEK (1973) - Growth of Candida utilis on cellulosic wastes (extracts of banana leaves). Global Impacts of Applied Microbiology, IVth International Conference. Abstracts, p. 24.
- BACKUS, M.P. e J.F. STAUFER (1955) - The production and selection of a family of strains in Penicillium chrysogenum. Micologia, 47:429-463.
- BALL, C. (1969) - Improvement of penicillin productivity in P.chrysogenum by recombination. Heredity, 24:691.
- BALL, C. (1971) - Haploidization analysis in Penicillium chrysogenum. Journal of General Microbiology, 66:63-69.
- BALL, C. (1973) - Improvement of penicillin productivity in Penicillium chrysogenum by recombination. IN: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN (eds.) - Genetics of Industrial Microorganisms, II. Elsevier Publ.Co., Amsterdam, 511 pp.

- BEWERSDORF, M. e M. DOSTALEK (1971) - The use of methane for production of bacterial proteins. Biotechnology and Bioengineering, 13:49-62.
- BHATTACHARJEE, J.K. (1970) - Microorganisms as potential sources of food. Advances in Applied Microbiology, 13:139-161.
- BRADLEY, S.G. (1962) - Parasexual phenomena in microorganisms. Annual Review of Microbiology, 16:35-52.
- BRADLEY, S.G. (1966) - Genetics in applied microbiology. Advances in Applied Microbiology, 8:29-57.
- BRAMMAR, W.J. (1974) - Genetic aproaches to the stimulation of bacterial protein biosynthesis. Genetics of Industrial Microorganisms, IInd International Symposium. Abstracts, p. 23.
- BROWN, L.R. e R.J. STRAWINSKY (1958) - Intermediates in the oxidation of methane. Bacterial Proceedings, 23:122-123.
- BU'LOCK, J.D. (1961) - Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. Advances in Applied Microbiology, 3:293-342.
- BUNKER, H.J. (1964) - Microbial food. IN: STARR, M.P. (ed.) - Global Impacts of Applied Microbiology. Almqvist & Wiksell, Stockholm, 572 pp.
- CALAM, C.T., L.B. DAGLISH e W.S. GAITSKELL (1973) - Hybridization experiments with Penicillium patulum and Fusarium moniliforme. IN: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN (eds.) - Genetics of Industrial Microorganisms, II. Elsevier Pub. Co., Amsterdam, 511 pp.
- CALAM, C.T., L.B. DAGLISH e E.P. MACCANN (1974) - Penicillin-Tactics in strain improvment. Genetics of Industrial Microorganisms, IInd International Symposium. Abstracts, p. 20,
- CALIHAN, C.D., C.E. DUNLAP e G. IRWIN (1973) - Single cell protein from cellulosic wastes. Global Impacts of Applied Microbiology, IVth International Conference, Abstracts, p. 21.

- CARENBERG, C.O. e C.-G. HEDEH (1970) - Experiments with lysis of living cells of Eremothecium ashbyii and of Methanomonas by microbial enzymes. Biotechnology and Bioengineering, 12:167-178.
- CATEN, C.E. (1970) - Spontaneous variability of single isolates of Phytophthora infectans. II - Pathogenic variation. Canadian Journal of Botany, 48:897-905.
- CHAMPAGNAT, A., C. VERNET, B. LAINE e J. FILOSA (1963) - Biosynthesis of protein-vitamin concentrats from petroleum. Nature (London), 197:13-14.
- CLUTTERBUCK, P.W., R. LOVELL e H. RAISTRICK (1932) - Biochemistry Journal (London) 26:1907-1918. IN: THATCHER, F.S. (1954) - Foods and feeds from fungi. Annual Review of Microbiology, 8:449-472.
- COOK, A.H., 1958 (ed.) - The Chemistry and Biology of Yeasts. Acad. Press Inc. Ltd., London, 763 pp.
- COONEY, C.L. e D.I.C. WONG (1973) - Engineering problems in hydrocarbon fermentation. Global Impacts of Applied Microbiology. IVth International Conference. Abstracts, p. 20.
- DAVIS, D.R. (1971) - Single cell protein and the exploitation of mutant algae lacking cell walls. Nature (London) 233:143-144.
- DEMAIN, A.L. (1973) - The marriage of genetics and industrial microbiology--after a long engagement, a bright future. IN: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN (eds.) - Genetics of Industrial Microorganisms, I. Elsevier Pub. Inc., Amsterdam, 496 pp.
- DIEMAIR, W. e H. NEU (1949) - Biochemical Zhurnal, 319:257-262. IN: THATCHER, F.S. (1954) - Foods and feed from fungi. Annual Review of Microbiology, 8:449-472.
- DITCHBURN, P., G. HOLT e K.D. MACDONALD (1974) - The genetic location of mutants increasing penicillin yield in Aspergillus nidulans. Genetics of Industrial Microorganisms, IInd International Symposium. Abstracts, p. 16.

- DOZIEN, J.C., U.U. UDO, U.R. YOUNG e N.S. SCRIMSHAW (1970) -- Effects of high levels of yeast feeding on uric acid metabolism of young men. Nature (London), 228:180.
- ELANDER, R.P., M.A. EPENSHADE, S.G. PATHAK e C.H. PAN (1973) - The use of parasexual genetics in an industrial-strain improvement with. Penicillium chrysogenum. IN: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN (eds.) Genetics of Industrial Microorganisms, II. Elsevier Pub. Inc., Amsterdam, 511 pp.
- FANTINI, A.A. (1962) - Genetics and antibiotic production of Emericellopsis species. Genetics, 47:161-177.
- FISCHER, R.A. e F. YATES (1943) - Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research. Oliver and Boyd Ltd., London, 98 pp.
- FOWELL, R.R. (1958) - Recent Studies in Yeast. (Soc. of Chem. Industry, London, p. 116). IN: HARRISON, J. S. (1971) - Yeast production. HOCKENHULL, D. J. D. (ed.) - Progress in Industrial Microbiology. Churchill Livingstone, Edinburg & London, 280 pp.
- FOWELL, R.R. (1969) - Sporulation and hybridization of yeasts. IN: ROSE, A.H. e J.S. HARRISON (eds.) - The Yeasts, I. Acad. Press Inc., New York, 508 pp.
- GARIBOVA, L.V. (1970) - Breeding varieties of mushroom. Nauka (1969), 239-260, Moscow, USSR. IN: Plant Breeding Abstracts, 42:1105 (Abstract 9489).
- GRAY, W.D., P.U.C. PINTO e S.G. PATHAK (1963) - Growth of fungi in sea water medium. Applied Microbiology, 11:501-503.
- HAGSTROM, L. (1969) - Studies on methanol oxidizing bacteria. Biotechnology and Bioengineering, 11:1043-1054.

- HAMMER, G., C.-G. HEDEN e C.D. CARENBERG (1967) - Methane as a carbon substrate for the production of microbial cells. Biothechnology and Bioengineering, 9:449-514.
- HANNENBERG, W. (1926) - Handbuch der Gurungsbakteriologie. 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.
- HARRIS, E.E. e M.J. JOHNSON (1948) - Paper Industry & Paper World 30:30-35. IN: THATCHER, F.S. (1954) - Foods and feeds from fungi. Annual Review of Microbiology, 8:449-472.
- HARRIS, E.E., M.L. HANAN e R.R. MARQUADT (1948) - Industrial Engineering and Chemistry 40:2068-2077. IN: THATCHER, F.S. (1954) - Foods and feeds from fungi. Annual Review of Microbiology, 8:449-472.
- HARRISON, J.S. (1971) - Yeasts production. IN: HOCKENHULL, D.J.D. (ed.) - Progress in Industrial Microbiology. Churchill Livingstone Inc, Edinburgh & London, 280 pp.
- HEDEN, C.-G., e N. MOLIN (1971) - The productivity of microorganisms - a catalytic factor for research and transdisciplinary cooperation. Symposia of the Society of General Microbiology, 21:1-14.
- HEDEN, C.-G., N. MOLIN, V. OLSSON e A. RUPPRECHT (1971) - Preliminary experiments on spinning bacterial proteins into fibers. Biotechnology and Bioengineering, 13:147-150.
- HEINES, U. e F.F. NORD (1946) - Arch. Bioch. 11:521-530. IN: THATCHER, F. S. (1954) - Foods and feeds from fungi. Annual Review of Microbiology, 8:449-472.
- HOLT, G. e K.D. MACDONALD (1968) - Isolation of strains with increased penicillin yield after hybridization in A. nidulans. Nature (London), 219:636-637.
- HOOPERHEIDE, J.C. (1969) - Horizons in industrial application of yeasts. Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology, 35 (Suppl.): 71-82.

- HOPWOOD, D.A. (1973) - Developments in Actinomycete genetics. IN: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN (eds.) - Genetics of Industrial Microorganisms, II. Elsevier Pub. Co., Amsterdam, 511 pp.
- HUMPHREY, A.E. e R.P. JEFFERIS (1973) - Optimization of batch fermentation processes. Global Impacts of Applied Microbiology, IVth International Conference. Abstracts, p. 20.
- INSKEEP, G.S., A.J. WILLY, J.M. HOLDERBY 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.
- IWATA, Y. (1950) - Journal of Fermentation Association (Japan) 8:49-53. IN: THATCHER, F.S. (1954) - Foods and feeds from fungi. Annual Review of Microbiology, 8:449-472.
- JAMES, A.P., M.M. MACNUTT e P.M. MORSE (1965) - The influence of dose on the spectrum of radiation-induced mutants affecting a quantitative character in yeast. Genetics, 52:21-29.
- JINKS, J.L. e C.E. CATEN (1974) - Quantitative genetics. Genetics of Industrial Microorganisms, IInd International Symposium. Abstracts p.8.
- JOHNSON, M.S. (1967) - Growth of microbial cells on hydrocarbons. Science, 155:1515-1519.
- JOKL, L. e J.E.D. OLIVEIRA (1973) - Nutritive value of food supplements produced with Saccharomyces cerevisiae in corn media. Global Impacts of Applied Microbiology, IVth International Conference. Abstracts, p. 24.
- KIHLBERG, R. (1972) - The microbe as a source of food. Annual Review of Microbiology, 26:427-466.
- KURTH, E.F. (1946) - Industrial Engineering and Chemistry 38:204-207. IN: THATCHER, F.S. (1954) - Foods and Feeds from fungi. Annual Review of Microbiology, 8:449-472.

- LANE, A.G. e H. BLACHERE (1973) - Computer control and optimization in the cultivation of yeast. Global Impacts of Applied Microbiology, IVth International Conference. Abstracts, p. 25.
- LEADBETER, E.R. e J.W. FOSTER (1959) - Incorporation of molecular oxygen in bacterial cells utilizing hydrocarbons for growth. Nature (London), 184:1428-1429.
- LEDERBERG, J. e E.M. LEDERBERG (1952) - Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. Journal of Bacteriology, 63:399-405.
- LINDEGREN, C.C. (1949) - The Yeast Cell, its Genetics and Cytology. Ed. Publ. Inc., Saint Louis, 296 pp.
- LODDER, J., B. KHOUDOKORMOFF e A. LANGEAN (1969) - Melibiose-fermenting baker's yeast hybrids. Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology, 35 (Suppl.):F9.
- LODDER, J. (1971) - The Yeasts - A Taxonomic Study. North Holland Publ. Co., Amsterdam, 1385 pp.
- LORENZ, M. (1969) - Relations between growth conditions and the content of nitrogen compounds in cells of Candida utilis. Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology, 35 (Suppl.):F1-F2.
- MACDONALD, K.D. (1973) - Genetics of penicillin production in Penicillium chrysogenum and Aspergillus nidulans. IN: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN (ed.) - Genetics of Industrial Microorganisms, II. Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 511 pp.
- MACKEVIC, N.V. (1968) - Mechanisms of hereditary variability in fungi. Bull Moscow Soc. Nat. Biol. Sect. 73:129-138. IN: Plant Breeding Abstracts, 39:512 (Abstract 3879).
- MATELES, R.I., J.N. BARUAH e S.R. TANNENBAUM (1967) - Growth of a thermophilic bacterium on hydrocarbons. A new source of single-cell protein. Science, 157:1322-1323.

- MAUL, S.B., A.J. SINSKEY e S.R. TANNENBAUM (1970) - New process for reducing the nucleic acid content of yeast. Nature (London), 228:181.
- MERRICK, M.J. (1974) - A biometrical approach to penicillin production in Aspergillus nidulans. Genetics of Industrial Microorganisms, IInd International Symposium. Abstracts, p. 17.
- MIRANDA FILHO, J.B. (1972) - Supressores do mutante nic⁸ em Aspergillus nidulans. Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.
- MOR, J.R. e A. FIECHTER (1968a) - Continuous cultivation of Saccharomyces cerevisiae. I - Growth on ethanol under steady-state conditions. Biotechnology and Bioengineering, 10:159-176.
- MOR, J.R. e A. FIECHTER (1968b) - Continuous cultivation of Saccharomyces cerevisiae. II - Growth on ethanol under transient-state conditions. Biotechnology and Bioengineering, 10:787-803.
- MORRIS, G.G., K.C. PHILLIPS e F.K.E. IMRIE (1973) - The production of animal feedstuffs by the submerged culture of fungi on agricultural wastes. Global Impacts of Applied Microbiology, IVth International Conference. Abstracts, p. 20.
- MORRISON, K.B. e C. BALL (1974) - Mitotic crossing-over in Penicillium chrysogenum. Genetics of Industrial Microorganisms, IInd International Symposium. Abstracts, p. 83.
- MORTIMER, R.K. e D.C. HAWTHORNE (1969) - Yeast Genetics. IN: ROSE, A.M. e J.S. HARRISON (eds.), I - The Yeasts. Acad. Press Inc. Ltd., New York, 508 pp.
- MUELLER, H. e F. MUELLER (1973) - Examples and studies of continuous fermentation, optimization by computers. Global Impacts of Applied Microbiology, IVth International Conference. Abstracts, p. 21.

- NAWAWY, A.S. e M.A. FOUDA (1973) - Comparative study on SCP production from molasses, vinnasse, or bakers yeast effluent. Global Impacts of Applied Microbiology, IVth International Conference. Abstracts, p.26.
- ORTEGA, M.M. (1972) - Estudio de algas comestibles del valle del Mexico. Revista Latinoamericana de Microbiologia, 14:85-97.
- O'SULLIVAN, C. e S.J. PIRT (1973) - Penicillin production by lysine auxotrophs of Penicillium chrysogenum. Journal of General Microbiology, 76:65-75.
- OSWALD, W.J. (1973) - Microbial conversion of wastes. Global Impacts of Applied Microbiology, IVth International Conference. Abstracts, p. 21.
- PASERO, J., Z. DUVNJAK e E. AZOULAY (1969) - Isolation and study of mutants selected from Candida tropicalis cultivated on hydrocarbons. Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology, 35 (Suppl.):F17-F18.
- PEPPLER, H.J. (1969) - Food yeasts. IN: ROSE, A.H. e J.S. HARRISON (eds.) III - The Yeasts. Acad. Press Inc. Ltd., New York, 533 pp.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER e E. FORBES (1953) - Genetic recombination without sexual reproduction in Aspergillus nidulans. Journal of General Microbiology, 8:198-210.
- PYKE, M. (1958) - The technology of yeasts. IN: COOK, A.M. (ed.) The Chemistry and Biology of yeasts. Acad. Press. Inc. Ltd., London, 763 pp.
- ROBERTS, R.S. (1950) - Influence of aeration on rate of growth in cultures. Nature (London), 165:494-495.
- ROBERTS, R.S. (1953) - Nature (London) 172:351:352. IN: THATCHER, F.S. (1954) - Foods and feeds from fungi. Annual Review of Microbiology, 8:449-472.
- ROMAN, W. (1957) (ed.) - Yeasts, Acad. Press Inc. Ltd., New York, 246 pp.

- SANCHES-MARROQUIN, A., C. ZERMENO, A. ZAMARRIPA e J. GARCIA (1966). Nuevo substrato para la propagacion de levadura alimenticia en escala de laboratorio. Revista Latinoamericana de Microbiologia e Parasitologia, 8: 189-195.
- SANCHES-MARROQUIN, A. (1971) - Sugar cane and agave juices as substrates for the microbiological production of SCP, L-lysine and riboflavine. Revista Latinoamericana de Microbiologia, 13:107-112.
- SANCHES-MARROQUIN, A. (1973) - Economic approach to SCP production from agave juice. Global Impacts of Applied Microbiology, IVth International Conference. Abstracts, p. 24.
- SAVAGE, J., W.A. MAXWELL, T. CHASE e J.D. MACMILLAN (1973) - Microbial conversion of swine waste to single cell protein. Global Impacts of Applied Microbiology, IVth International Conference. Abstracts, p. 24.
- SENEZ, J.C. (1973) - Metabolic pathways in hydrocarbon fermentation. Global Impacts of Applied Microbiology, IVth International Conference. Abstracts p. 20.
- SERMONTI, G. (1969) - Genetics of antibiotic-producing microorganisms. Wiley-Interscience Ltd., London, 389 pp.
- SISKINA, T.A., S.I. ALIKANIAN (1969) - Some genetic features of the variability of Actinomyces streptomycin the producer of streptomycin, with respect to two quantitative characters. Genetika (Moscow) 5:103-112. IN: Plant Breeding Abstracts, 39:1041 (Abstract 7966).
- SKINNER, C.S. (1934) - Journal of Bacteriology 28:95-106. IN: THATCHER F. S. (1954) - Foods and feeds from fungi. Annual Review of Microbiology, 8:449-472.
- SPALLA, C. (1973) - Genetic problems of production of ergot alkaloids in saprophytic and parasitic conditions. IN: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIR (eds.) - Genetics of Industrial Microorganisms, II. Elsevier Publ. Inc., Amsterdam, 511 pp.

- STARR, M.P. (1964) ed. - Global Impacts of Applied Microbiology. Almqvist & Wiksell, Stockholm, 572 pp.
- STESSEL, H., J. SAVAGE e W.A. MAXWELL (1973) - Kinetic studies in mixed culture fermentation of swine waste. Global Impacts of Applied Microbiology, IVth International Conference. Abstracts, p. 26.
- TAKATA, R. (1929) - Journal of the Society of Chemistry and Industry (Japan) 32:243-244. IN: THATCHER, F.S. (1954). Foods and feeds from fungi. Annual Review of Microbiology, 8:449-472.
- TANNENBAUM, S.R. e S.A. MILLER (1967) - Effect of cell fragmentation on nutritive value of Bacillus megaterium protein. Nature (London), 214: 1261-1262.
- TAVARES, F.C.A. e J.L. AZEVEDO (1972) - Melhoramento de microorganismos para a produção de proteínas. Relatório Científico do Departamento e Instituto de Genética, ESALQ-USP, 6:117-119.
- TAVARES, F.C.A., J.L. AZEVEDO, J.B. MIRANDA FILHO, R. VENCOVSKY e N.A. VELLO (1973) - Variabilidade natural em Saccharomyces calshbergensis para a produção de massa celular. Relatório Científico do Departamento e Instituto de Genética, ESALQ-USP, 7:201-204.
- TAVARES, F.C.A. (1974) - Genetic Improvement of Saccharomyces calshbergensis for single cell protein production. Genetics of Industrial Microorganisms, IInd International Symposium. Abstracts, p. 97.
- TAVARES, F.C.A. e J.L. AZEVEDO (1974) - Genetical improvement of Aspergillus niger for citric acid production. Genetics of Industrial Microorganisms, IInd International Symposium. Abstracts, p. 86.
- THATCHER, F.S. (1954) - Foods and Feeds from fungi. Annual Review of Microbiology, 8:449-472.
- THAYSEN, A.C. e M. MORRIS (1943) - Preparation of a giant strain of Torulopsis utilis. Nature (London), 152:526-528.

- THAYSEN, A.C. (1957) - Food and fodder yeast. IN: ROMAN, W. (ed.) - Yeasts
Acad. Press. Inc. Ltd., New York, 246 pp.
- UNDEN, G.A. e C.G. HEDEN (1973) - An approach to on-line continuous optimization. Global Impacts of Applied Microbiology, IVth International Conference. Abstracts, p. 20.
- VAULINA, E.N., I.D. ANIKEEVA e U.A. SEVCENKO (1968) - Some methods beeing insed in breeding algae. Trans. Kirov. Agric. Inst. 1969, 20:73-80.
IN: Plant Breeding Abstracts, 40:1141 (Abstract 8904).
- WASLIEN, C.I., D.M. COLLOWAY e S. MARGEN (1968) - Uric acid production of men fed graded amounts of egg protein and yeast nucleic acid. Annual Journal of Clinics and Nutrition, 21:892-894.
- WASLIEN, C.I., D.M. COLLOWAY e S. MARGEN (1969) - Human intolerance to bacteria food. Nature (London), 221:84-85.
- WHITTENBURY, R. (1969) - Microbial utilization of methane. Procedings in Biochemistry, (Jan.) 51-56.
- WIKERHAM, L.J. (1946) - A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts. Journal of Bacteriology, 52:293-301.

A P Ê N D I C E

Tabela I - Ensaio de produção nº 1 - Valores expressos em peso seco para linhagens e colonias delas obtidas. Blocos ao acaso com três repetições

Genot.	Rep.	I	II	III	Total	
					Colonias	Isolados
9080-1		0,138	0,088	0,181	0,407	
9080-2		0,110	0,084	0,157	0,351	0,758 ⁺⁺
1327-1		0,116	0,082	0,110	0,308	
1327-2		0,132	0,105	0,164	0,401	0,709 ⁺⁺
402-1		0,169	0,144	0,132	0,445 ⁺	
402-2		0,153	0,142	0,184	0,479 ⁺	0,924 ⁺⁺
847-1		0,020	0,035	0,023	0,078	
847-2		0,040	0,023	0,045	0,108	0,186
2490-1		0,163	0,157	0,200	0,520 ⁺	
2490-2		0,150	0,163	0,176	0,489 ⁺	1,009 ⁺⁺
626-1		0,119	0,131	0,098	0,348	
626-2		0,109	0,085	0,090	0,284	0,632
Sc-1		0,141	0,135	0,185	0,461 ⁺	
Sc-2		0,138	0,150	0,130	0,418	0,879 ⁺⁺
1834-1		0,098	0,054	0,114	0,266	
1834-2		0,132	0,151	0,193	0,476 ⁺	0,742 ⁺⁺
210-1		0,095	0,102	0,103	0,300	
210-2		0,110	0,138	0,101	0,349	0,649
237-1		0,106	0,095	0,080	0,281	
237-2		0,134	0,142	0,101	0,377	0,658
1430-1		0,131	0,119	0,124	0,374	
1430-2		0,077	0,032	0,037	0,146	0,520
1828-1		0,132	0,111	0,160	0,403	
1828-2		0,095	0,105	0,062	0,262	0,665
67-1		0,029	0,020	0,046	0,095	
67-2		0,070	0,059	0,071	0,200	0,295
2490-T		0,144	0,168	0,146	0,458	
2490-T		0,116	0,120	0,154	0,390	
2490-T		0,154	0,144	0,135	0,433	1,281
402-T		0,114	0,106	0,108	0,328	
402-T		0,106	0,115	0,091	0,312	
402-T		0,132	0,098	0,167	0,397	1,037

(+) Colonias selecionadas

(++) Linhagens selecionadas

Tabela II - Ensaio de produção nº 2 - Valores expressos em peso seco para linhagens e colonias delas obtidas. Blocos ao acaso com três repetições.

Genot.	Rep.	I	II	III	Total	
					Colonias	Isolados
9080-3		0,101	0,101	0,136	0,338	
9080-4		0,094	0,062	0,153	0,309	0,647
1327-3		0,128	0,119	0,150	0,397	
1327-4		0,109	0,101	0,141	0,351	0,748 ⁺⁺
402-3		0,125	0,166	0,217	0,508 ⁺	
402-4		0,169	0,185	0,187	0,541 ⁺	1,049 ⁺⁺
847-3		0,049	0,050	0,068	0,167	
847-4		0,049	0,062	0,062	0,173	0,340
2490-3		0,133	0,159	0,198	0,490 ⁺	
2490-4		0,175	0,190	0,248	0,613 ⁺	1,103 ⁺⁺
626-3		0,100	0,142	0,116	0,358	
626-4		0,140	0,095	0,103	0,338	0,696 ⁺⁺
Sc-3		0,150	0,151	0,165	0,466 ⁺	
Sc-4		0,140	0,198	0,174	0,512 ⁺	0,978 ⁺⁺
1834-3		0,120	0,116	0,138	0,374	
1834-4		0,138	0,102	0,162	0,402	0,776 ⁺⁺
210-3		0,122	0,114	0,111	0,347	
210-4		0,119	0,082	0,117	0,318	0,665
237-3		0,130	0,099	0,114	0,343	
237-4		0,082	0,093	0,053	0,228	0,571
1430-3		0,049	0,090	0,118	0,257	
1430-4		0,036	0,085	0,087	0,208	0,465
1828-3		0,085	0,062	0,074	0,221	
1828-4		0,108	0,085	0,147	0,340	0,561
67-3		0,020	0,038	0,030	0,088	
67-4		0,050	0,020	0,056	0,126	0,214
2490-T		0,139	0,190	0,226	0,555	
2490-T		0,141	0,220	0,156	0,517	
2490-T		0,134	0,194	0,208	0,526	1,608
402-T		0,124	0,116	0,183	0,423	
402-T		0,126	0,193	0,174	0,493	
402-T		0,103	0,194	0,157	0,454	1,370

Tabela III - Ensaio de produção nº 3 - Valores expressos em peso seco para linhagens e colonias delas obtidas. Blocos ao acaso com três repetições

Genot.	Rep.			Total	
	I	II	III	Colonias	Isolados
9080-5	0,138	0,148	0,107	0,393	
9080-6	0,119	0,163	0,110	0,392	0,785 ⁺⁺
1327-5	0,121	0,084	0,125	0,330	
1327-6	0,159	0,158	0,164	0,481	0,811 ⁺⁺
402-5	0,088	0,056	0,096	0,240	
402-6	0,155	0,160	0,197	0,512 ⁺	0,752
847-5	0,096	0,096	0,053	0,245	
847-6	0,037	0,035	0,029	0,101	0,346
2490-5	0,170	0,176	0,229	0,575 ⁺	
2490-6	0,227	0,186	0,236	0,649 ⁺	1,224 ⁺⁺
626-5	0,142	0,104	0,113	0,359	
626-6	0,109	0,094	0,112	0,315	0,674
Sc-5	0,194	0,170	0,162	0,526 ⁺	
Sc-6	0,162	0,139	0,184	0,485	1,011 ⁺⁺
1834-5	0,160	0,190	0,155	0,505 ⁺	
1834-6	0,173	0,130	0,146	0,449	0,954 ⁺⁺
210-5	0,146	0,103	0,122	0,371	
210-6	0,116	0,113	0,113	0,342	0,713
237-5	0,099	0,120	0,094	0,313	
237-6	0,071	0,123	0,094	0,288	0,601
1430-5	0,049	0,031	0,051	0,131	
1430-6	0,086	0,060	0,065	0,211	0,342
1828-5	0,140	0,144	0,140	0,424	
1828-6	0,143	0,151	0,191	0,485 ⁺	0,909 ⁺⁺
67-5	0,082	0,071	0,081	0,234	
67-6	0,081	0,043	0,088	0,212	0,446
2490-T	0,151	0,159	0,232	0,542	
2490-T	0,150	0,169	0,194	0,513	
2490-T	0,183	0,178	0,194	0,555	1,610
402-T	0,164	0,134	0,201	0,499	
402-T	0,160	0,168	0,192	0,520	
402-T	0,178	0,151	0,198	0,527	1,546

Tabela IV - Ensaio de produção nº 4 - Valores expressos em peso seco para linhagens e colonias delas obtidas. Blocos ao acaso com três repetições

Genot.	Rep.	I	II	III	Total	
					Colonias	Isolados
9080-7		0,123	0,143	0,099	0,365	
9080-8		0,150	0,139	0,149	0,438 ⁺	0,803 ⁺⁺
1327-7		0,128	0,125	0,162	0,415	
1327-8		0,108	0,109	0,140	0,357	0,772 ⁺⁺
402-7		0,182	0,168	0,156	0,506 ⁺	
402-8		0,172	0,158	0,202	0,532 ⁺	1,038 ⁺⁺
847-7		0,026	0,034	0,058	0,118	
847-8		0,013	0,017	0,010	0,040	0,158
2490-7		0,065	0,056	0,100	0,221	
2490-8		0,070	0,066	0,105	0,241	0,462
626-7		0,040	0,012	0,014	0,066	
626-8		0,124	0,139	0,145	0,408	0,474
Sc-7		0,151	0,169	0,130	0,450 ⁺	
Sc-8		0,149	0,151	0,115	0,415	0,865 ⁺⁺
1834-7		0,143	0,101	0,121	0,365	
1834-8		0,138	0,144	0,164	0,446 ⁺	0,811 ⁺⁺
210-7		0,102	0,100	0,117	0,319	
210-8		0,148	0,128	0,107	0,383	0,702
237-7		0,102	0,096	0,108	0,306	
237-8		0,065	0,037	0,021	0,123	0,429
1430-7		0,032	0,043	0,065	0,140	
1430-8		0,067	0,051	0,032	0,150	0,290
1828-7		0,136	0,165	0,175	0,476 ⁺	
1828-8		0,118	0,094	0,115	0,327	0,803 ⁺⁺
67-7		0,040	0,039	0,019	0,098	
67-8		0,046	0,044	0,017	0,107	0,205
2490-T		0,139	0,133	0,177	0,449	
2490-T		0,161	0,141	0,103	0,405	
2490-T		0,157	0,128	0,151	0,436	1,290
402-T		0,115	0,107	0,107	0,329	
402-T		0,118	0,113	0,109	0,340	
402-T		0,114	0,148	0,195	0,457	1,126

Tabela V - Ensaio de produção nº 5 - Valores expressos em peso seco para linhagens e colonias delas obtidas. Blocos ao acaso com três repetições

Genot.	Rep.			Total	
	I	II	III	Colonias	Isolados
9080-9	0,150	0,159	0,163	0,472 ⁺	
9080-10	0,160	0,154	0,156	0,470	0,942 ⁺⁺
1327-9	0,154	0,144	0,134	0,432	
1327-10	0,110	0,134	0,136	0,380	0,812
402-9	0,139	0,172	0,175	0,486 ⁺	
402-10	0,184	0,177	0,179	0,540 ⁺	1,026 ⁺⁺
847-9	0,074	0,030	0,045	0,149	
847-10	0,033	0,030	0,046	0,109	0,258
2490-9	0,171	0,198	0,186	0,555 ⁺	
2490-10	0,182	0,234	0,187	0,603 ⁺	1,158 ⁺⁺
626-9	0,102	0,116	0,113	0,331	
626-10	0,099	0,119	0,120	0,338	0,669
Sc-9	0,106	0,142	0,126	0,374	
Sc-10	0,129	0,179	0,158	0,466	0,840 ⁺⁺
1834-9	0,165	0,166	0,164	0,495 ⁺	
1834-10	0,140	0,166	0,148	0,454	0,949 ⁺⁺
210-9	0,141	0,113	0,115	0,369	
210-10	0,099	0,103	0,111	0,313	0,682
237-9	0,102	0,110	0,120	0,332	
237-10	0,041	0,068	0,026	0,135	0,467
1430-9	0,023	0,057	0,050	0,130	
1430-10	0,062	0,072	0,070	0,204	0,334
1828-9	0,104	0,167	0,174	0,445	
1828-10	0,105	0,151	0,159	0,415	0,860 ⁺⁺
67-9	0,019	0,022	0,034	0,075	
67-10	0,064	0,034	0,031	0,129	0,204
2490-T	0,157	0,177	0,225	0,559	
2490-T	0,150	0,170	0,193	0,513	
2490-T	0,170	0,170	0,169	0,509	1,581
402-T	0,114	0,147	0,167	0,428	
402-T	0,127	0,155	0,161	0,443	
402-T	0,121	0,146	0,170	0,437	1,308

Tabela VI - Ensaio de produção nº 1 - Valores expressos em densidade ótica para linhagens e colonias delas obtidas. Blocos ao acaso com três repetições

Genot.	Rep.	I	II	III	Total	
					Colonias	Isolados
9080-1		4,1	3,0	4,2	11,3	
9080-2		3,1	3,1	4,4	10,6	21,9 ⁺⁺
1327-1		3,2	3,3	3,0	9,5	
1327-2		3,8	4,2	4,4	12,4	21,9
402-1		4,6	4,9	4,5	14,0 ⁺	
402-2		4,6	5,5	5,5	15,6 ⁺	29,6 ⁺⁺
847-1		2,0	1,6	1,7	5,3	
847-2		0,1	0,5	0,1	0,7	6,0
2490-1		4,9	5,8	5,5	16,2 ⁺	
2490-2		4,9	5,7	5,3	15,9 ⁺	32,1 ⁺⁺
626-1		3,4	3,5	3,4	10,3	
626-2		3,2	3,1	3,3	9,6	19,9
Sc-1		4,1	4,2	4,8	13,1	
Sc-2		4,1	4,5	4,6	13,2 ⁺	26,3 ⁺⁺
1834-1		3,6	3,8	4,3	11,7	
1834-2		4,2	4,5	4,5	13,2 ⁺	24,9 ⁺⁺
210-1		2,9	3,2	3,0	9,1	
210-2		2,8	3,0	3,0	8,8	17,9
237-1		2,9	3,1	3,2	9,2	
237-2		3,1	2,9	3,2	9,2	18,4
1430-1		3,2	3,2	2,4	8,8	
1430-2		2,4	2,4	2,1	6,9	15,7
1828-1		3,6	4,3	4,7	12,6	
1828-2		3,8	4,0	3,8	11,6	24,2 ⁺⁺
67-1		0,4	0,3	0,2	0,9	
67-2		0,6	0,9	0,3	1,8	2,7
2490-T		4,3	4,6	4,9	13,8	
2490-T		4,3	4,7	4,9	13,9	
2490-T		4,1	4,6	5,0	13,7	41,4
402-T		3,6	3,3	3,4	10,3	
402-T		3,7	3,9	3,6	11,2	
402-T		3,5	3,8	3,5	10,8	32,3

Tabela VII -- Ensaio de produção nº 2 -- Valores expressos em densidade ótica para linhagens e colonias delas obtidas. Blocos ao acaso com três repetições

Genot.	Rep.	I	II	III	Total	
					Colonias	Isolados
9080-3		3,5	2,7	3,3	9,5	
9080-4		3,4	3,0	3,9	10,3	19,8 ⁺⁺
1327-3		3,7	3,1	3,4	10,2	
1327-4		3,0	3,1	3,0	9,1	19,3 ⁺⁺
402-3		4,4	5,4	5,7	15,5 ⁺	
402-4		3,9	5,2	5,3	14,4 ⁺	29,9 ⁺⁺
847-3		1,2	1,3	1,2	3,7	
847-4		1,6	2,3	2,2	6,1	9,8
2490-3		4,4	4,7	4,7	13,8 ⁺	
2490-4		4,9	5,1	5,5	15,5 ⁺	29,3 ⁺⁺
626-3		3,3	2,9	3,0	9,2	
626-4		3,1	3,0	3,1	9,2	18,4
Sc-3		4,3	4,2	4,3	12,8	
Sc-4		4,4	4,0	4,5	12,9 ⁺	25,7 ⁺⁺
1834-3		4,0	3,2	4,1	11,3	
1834-4		4,2	4,0	4,7	12,9 ⁺	24,2 ⁺⁺
210-3		2,9	2,7	3,0	8,6	
210-4		2,9	2,8	2,9	8,6	17,2
237-3		2,5	2,4	2,0	6,9	
237-4		2,4	1,3	0,9	4,6	11,5
1430-3		1,5	2,0	2,4	5,9	
1430-4		1,2	2,4	2,6	6,2	12,1
1828-3		3,0	1,3	3,2	7,5	
1828-4		3,8	3,1	4,0	10,9	18,4
67-3		0,1	0,2	0,2	0,5	
67-4		0,2	0,4	0,6	1,2	1,7
2490-T		4,3	5,2	5,4	14,9	
2490-T		4,0	5,3	5,3	14,6	
2490-T		4,1	5,2	5,3	14,6	44,1
402-T		4,2	5,3	5,6	15,1	
402-T		4,4	5,1	5,5	15,0	
402-T		4,2	5,2	5,5	14,9	45,0

Tabela VIII - Ensaio de produção nº 3 - Valores expressos em densidade ótica para linhagens e colonias delas obtidas. Blocos ao acaso com três repetições

Genot.	Rep.	I	II	III	Total	
					Colonias	Isolados
9080-5		3,2	3,8	2,9	9,9	
9080-6		2,9	4,2	3,0	10,1	20,0 ⁺⁺
1327-5		2,8	2,8	2,8	8,4	
1327-6		3,9	4,0	3,6	11,5	19,9 ⁺⁺
402-5		1,3	1,5	1,2	4,0	
402-6		4,2	4,8	5,0	14,0 ⁺	18,0
847-5		1,7	2,4	0,2	4,3	
847-6		0,1	0,1	0,1	0,3	4,6
2490-5		3,9	4,1	4,6	12,6 ⁺	
2490-6		4,5	4,8	5,0	14,3 ⁺	26,9 ⁺⁺
626-5		2,9	2,8	2,5	8,2	
626-6		2,7	2,9	2,6	8,2	16,4
Sc-5		4,3	4,7	4,8	13,8 ⁺	
Sc-6		3,9	4,0	4,2	12,1 ⁺	25,9 ⁺⁺
1834-5		4,0	4,5	3,9	12,4 ⁺	
1834-6		3,6	3,9	3,3	10,8	23,2 ⁺⁺
210-5		2,7	2,7	2,4	7,8	
210-6		2,6	2,5	2,4	7,5	15,3
237-5		2,3	2,8	1,3	6,4	
237-6		1,5	1,2	1,8	4,5	10,9
1430-5		0,8	0,4	0,8	2,0	
1430-6		1,5	1,6	1,5	4,6	6,6
1828-5		3,5	4,2	3,6	11,3	
1828-6		4,1	3,8	2,7	10,6	21,9 ⁺⁺
67-5		0,1	0,2	0,2	0,5	
67-6		0,1	0,2	2,5	2,8	3,3
2490-T		3,6	4,5	5,1	13,2	
2490-T		3,7	4,5	4,6	12,8	
2490-T		3,7	4,5	4,8	13,0	39,0
402-T		4,5	4,4	5,2	14,1	
402-T		4,4	4,2	5,0	13,6	
402-T		4,2	4,6	4,9	13,7	41,4

Tabela IX - Ensaio de produção nº 4 - Valores expressos em densidade ótica para linhagens e colonias delas obtidas. Blocos ao acaso com três repetições

Genot.	Rep.	I	II	III	Total	
					Colonias	Isolados
9080-7		4,0	3,9	3,2	11,1	
9080-8		3,9	3,5	2,6	10,0	21,1 ⁺⁺
1327-7		3,3	3,5	3,5	10,3	
1327-8		2,9	3,1	3,1	9,1	19,4 ⁺⁺
402-7		4,6	5,1	5,0	14,7 ⁺	
402-8		4,9	5,3	5,1	15,3 ⁺	30,0 ⁺⁺
847-7		0,1	0,1	0,1	0,3	
847-8		0,1	0,1	0,1	0,3	0,6
2490-7		1,1	1,4	1,9	4,4	
2490-8		1,2	1,6	2,3	5,1	9,5
626-7		0,1	0,2	0,1	0,4	
626-8		3,0	3,0	2,9	8,9	9,3
Sc-7		3,9	3,6	4,1	11,6 ⁺	
Sc-8		4,0	3,9	4,2	12,1 ⁺	23,7 ⁺⁺
1834-7		3,9	4,0	4,2	12,1 ⁺	
1834-8		3,6	3,2	3,5	10,3	22,4 ⁺⁺
210-7		2,5	2,7	2,4	7,6	
210-8		2,6	2,7	2,4	7,7	15,3
237-7		2,6	2,5	2,4	7,5	
237-8		0,6	0,6	0,4	1,6	9,1
1430-7		0,4	0,2	0,1	0,7	
1430-8		1,6	1,7	1,0	4,3	5,0
1828-7		3,5	4,5	3,5	11,5 ⁺	
1828-8		4,1	3,7	3,5	11,3	22,8 ⁺
67-7		0,2	0,2	0,3	0,7	
67-8		0,1	0,1	0,1	0,3	1,0
2490-T		3,8	4,6	4,8	13,2	
2490-T		4,0	4,5	4,5	13,0	
2490-T		3,9	4,2	4,7	12,8	39,0
402-T		3,5	3,1	3,0	9,6	
402-T		3,4	3,0	2,8	9,2	
402-T		3,3	3,1	2,8	9,2	28,0

Tabela X - Ensaio de produção nº 5 - Valores expressos em densidade ótica para linhagens e colonias delas obtidas. Blocos ao acaso com três repetições

Genot.	Rep.	I	II	III	Total	
					Colonias	Isolados
9080-9		4,4	4,3	4,4	13,1	
9080-10		4,4	4,4	4,3	13,1	26,2 ⁺⁺
1327-9		3,7	3,9	3,7	11,3	
1327-10		3,4	2,2	3,9	9,5	20,8
402-9		4,6	4,5	4,9	14,0 ⁺	
402-10		5,4	5,5	5,1	16,0 ⁺	30,0 ⁺⁺
847-9		1,7	3,1	3,3	8,1	
847-10		0,1	0,1	0,2	0,4	8,5
2490-9		5,3	5,2	5,4	15,9 ⁺	
2490-10		5,6	5,8	5,8	17,2 ⁺	33,1 ⁺⁺
626-9		3,0	2,5	3,4	8,9	
626-10		3,2	2,1	3,3	8,6	17,5
Sc-9		3,7	3,9	4,3	11,9	
Sc-10		4,7	4,6	5,0	14,3 ⁺⁺	26,2 ⁺⁺
1834-9		4,6	4,1	4,8	13,5 ⁺⁺	
1834-10		4,2	3,8	4,6	12,6	26,1 ⁺⁺
210-9		2,6	1,6	2,8	7,0	
210-10		2,6	2,8	2,8	8,2	15,2
237-9		2,9	3,0	3,2	9,1	
237-10		1,9	2,1	0,5	4,5	13,6
1430-9		1,1	1,4	1,1	3,6	
1430-10		1,1	1,7	2,2	5,0	8,6
1828-9		3,7	3,4	4,8	11,9	
1828-10		3,7	4,2	4,1	12,0	23,9 ⁺⁺
67-9		0,2	0,2	0,3	0,7	
67-10		0,2	0,2	0,3	0,7	1,4
2490-T		4,4	4,4	5,4	14,2	
2490-T		4,4	4,5	4,5	13,4	
2490-T		4,5	4,4	5,0	13,9	41,5
402-T		3,7	4,5	5,0	13,2	
402-T		3,5	4,2	5,0	12,7	
402-T		3,5	4,2	4,9	12,6	38,5