GENÉTICA E MELHORAMENTO DE LEVEDURAS PARA A BIOCONVERSÃO DE EXTRATOS DE *Helianthus tuberosus* L.

SERGIO ECHEVERRIGARAY LAGUNA

Orientador: Prof. Dr. FLÁVIO C. A. TAVARES

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Julho - 1986

À minha esposa SILVANA

Aos meus filhos SERGIO e DANIEL

Aos meus pais,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Manifestamos sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

- Prof. Dr. Flávio Cesar Almeida Tavares
- Prof. Dr. Roland Venkovski
- Prof. Dr. José Osvaldo Carioca (UFCE)
- Dr. Joaquim A. Machado
- Ms. Aparecido Osdimir Bertolin
- Professores do Departamento de Genética da ESALQ/USP.
- Funcionários e estagiários do Laboratório de Genética de Leveduras do Departamento de Genética da ESALQ/USP: Ana Maria Brancalion, Luis Umberto Gomes, Paulo Ortolan, Ederson Akio Kido, Luis Gimenes Junior, Jonas Ferreira Barros, João Rodrigues de Jesus e Valária Rodrigues.
- Funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP.
- Colegas do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Genética da ESALQ/USP.
- Sr. Jorge Luiz Diorio pela datilografia do presente trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho.

INDICE

	Página
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	xviii
SUMMARY	xxii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1. Produção de etanol	07
2.2. Enzimas inulinolíticas	13
2.3. Produção de xaropes de frutose	17
2.4. Aspectos genéticos do gênero <i>Kluyveromyces</i> .	23
MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Linhagens	30
3.2. Meios de cultura	30
3.2.1. Meio completo (YEPD)	31
3.2.2. Meio sintético (SD)	31
3.2.3. Meio de Inulina (I)	33
3.2.4. Meio de "killer" (K)	33
3.2.5. Meio de Esporulação (RA)	34
3.2.6. Meio seletivo de regeneração (SDreg).	34
3.2.7. Meio completo de regeneração (YEP - Dreg)	34
3.2.8. Meio de Multiplicação (YEPD)	35
3.2.9. Meio de multiplicação com melaço de cana	35
3.2.10. Meios de caracterização	35
3.2.11. Meio com ciclohexamida	36
3.2.12. Meio de produção de inulinase	36
3.2.13. Meio de fermentação com inulina ...	36

3.2.14. Meios de fermentação com extratos de <i>H. tuberosus</i>	36
3.2.15. Outros meios de fermentação	38
3.3. Soluções e tampões	38
3.3.1. Solução salina	38
3.3.2. Solução de sais para fermentação	38
3.3.3. Solução de inulina	39
3.3.4. Reativo de Somogyi	39
3.3.5. Reativo de Nelson	39
3.3.6. Solução padrão de glicose	40
3.3.7. Tampão fosfato pH 4,5	40
3.3.8. Solução de cloreto de cálcio 1,2M ...	40
3.3.9. Solução de sorbitol-fosfato (TSF) ...	40
3.3.10. Solução tampão sorbitol-fosfato (TSF).	40
3.3.11. Solução de EDTA 10mM	41
3.3.12. Solução fusogênica (PEG)	41
3.3.13. Solvente para cromatografia	41
3.3.14. Corante para revelação de açúcares ..	41
3.3.15. Solução lítica	42
3.4. Esterilização e incubação	42
3.5. Multiplicação de leveduras	43
3.6. Testes de fermentação	43
3.6.1. Avaliação da capacidade fermentativa.	43
3.6.2. Cinética da fermentação	44
3.7. Avaliação da atividade de inulinase extrace- lular	45
3.8. Avaliação da inativação térmica	45
3.9. Testes de indução e repressão	45
3.10. Atividade de inulinase	46
3.11. Cromatografia de açúcares	47
3.12. Análise de etanol	48
3.12.1. Determinação do teor alcoólico no vi- nho por cromatografia gasosa	48

3.12.2. Determinação do teor alcoólico de destilados por densimetria	48
3.13. Determinação de álcoois superiores e compostos leves	49
3.14. Determinação de açúcar redutor total do mosto (ART)	49
3.15. Avaliação do caráter "killer"	50
3.16. Indução, enriquecimento e caracterização de mutantes auxotróficos em <i>Kluyveromyces</i>	
3.17. Hibridização em <i>Kluyveromyces</i>	52
3.18. Segregação e análise de segregantes de <i>Kluyveromyces</i>	53
3.19. Eletroforese de plasmídeos	53
3.20. Análises estatísticas	54
3.21. Fusão de protoplastos	54
4. RESULTADOS	56
4.1. Seleção de leveduras para fermentação alcoólica de extratos de <i>H. tuberosus</i>	56
4.2. Atividade inulinolítica e inulinase extracelular de leveduras	81
4.3. Aspectos genéticos do gênero <i>Kluyveromyces</i> ..	87
5. DISCUSSÃO	127
5.1. Seleção de leveduras para a fermentação alcoólica de extratos de <i>H. tuberosus</i>	127
5.2. Atividade inulinolítica e inulinase extracelular de leveduras	137
5.3. Aspectos genéticos do gênero <i>Kluyveromyces</i> ..	142
6. CONCLUSÕES	158
7. LITERATURA CITADA	163

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
01	Caracterização de espécies de leveduras quanto ao crescimento em inulina	58
02	Avaliação da capacidade de fermentação de inulina (6%) por leveduras. Valores de etanol (°GL) de 3 fermentações consecutivas de 24 horas a 35°C	59
03	Avaliação da produção de etanol a partir de extrato bruto de <i>H. tuberosus</i> , das linhagens selecionadas. Valores de etanol (°GL) de 3 fermentações consecutivas de 24 horas a 35°C e pH 3,7 com ART inicial de 14,58%	60
04	Avaliação da capacidade fermentativa de extrato bruto de <i>H. tuberosus</i> , das linhagens selecionadas. Valores de etanol (% v/v) de 3 fermentações consecutivas de 48 horas a 35°C e pH 4,0 com ART inicial de 15,60%	63
05	Análise de variância dos dados da Tabela 4. Experimento inteiramente casualizado	63
06	Perfil cinético da fermentação de extratos de <i>H. tuberosus</i> por <i>K. marxianus</i> (IZ 1339); <i>K. fragilis</i> (IZ 610) e <i>S. cerevisiae</i> (Fleischmann). Valores de etanol a 35°C com 10% de inóculo e 15,59% de ART inicial	64

TABELA Nº

Página

07	Perfil cinético da fermentação de extra <u>t</u> o de <i>H. tuberosus</i> por <i>K. marxianus</i> (IZ 1339) e <i>S. cerevisiae</i> (Fleischmann). Va <u>l</u> ores de etanol (°GL), ART e AR (g/100 l) de fermentação com agitação a 35°C e 10% de inóculo (peso fresco)	66
08	Cinética da fermentação de extrato de <i>H. tuberosus</i> por duas linhagens de <i>Torulopsis colliculosa</i> (IZ 1966 e IZ 1970) Valores de etanol (°GL), ART e AR (g/100 ml) de fermentação com agitação a 35°C e 10% de inóculo (peso fresco)....	68
09	Avaliação do efeito da concentração celular no perfil cinético da fermentação de <i>H. tuberosus</i> por <i>Torulopsis colliculosa</i> (IZ 1966). Valores de etanol (°GL) ART e AR (g/100 ml) de fermentação com agitação a 35°C e 1,5 a 10% de inóculo em peso fresco	70
10	Cinética da fermentação de glicose por leveduras de <i>Kluyveromyces</i> , <i>Saccharomyces</i> e <i>Candida</i> . Valores em gCO ₂ /l com ART inicial de 12,96%	72
11	Cinética da fermentação de extrato de <i>H. tuberosus</i> por leveduras de <i>Kluyveromyces</i> , <i>Saccharomyces</i> e <i>Candida</i> . Valores em gCO ₂ /l com ART inicial 8,23%	75

TABELA Nº

Página

12	Produção de etanol a partir de extrato de <i>H. tuberosus</i> e de glicose por linhagens de <i>Kluyveromyces</i> , <i>Saccharomyces</i> e <i>Candida</i> . Valores de etanol (°GL), ART e AR (g/100 ml) de fermentação de 24 horas a 35°C com 8,23% ART e 12,68% de ART respectivamente	77
13	Análise de compostos leves e álcoois superiores de destilados das amostras da tabela 11. Valores em mg/100 ml de etanol	79
14	Avaliação da taxa específica de crescimento em inulina, sacarose e glicose. Regressão linear. Valores de μ_x cm D.O. (μ_x - Taxa específica de crescimento).	79
15	Avaliação da atividade inulinolítica extracelular em linhagens pertencentes às espécies selecionadas. Dados em U/ml = nmoles de AR liberados por mililitro de extrato enzimático por minuto e AR no meio em 10^{-3} M frutose	82
16	Avaliação da atividade enzimática extracelular em linhagens de <i>K. marxianus</i> . Dados em U/ml e AR em 10^{-4} M frutose	83
17	Cinética da atividade de inulinase extracelular em <i>Kluyveromyces marxianus</i> e <i>K. fragilis</i> durante o crescimento destas em meio com inulina. Valores em U/ml e AR em 10^{-4} M frutose	85

TABELA Nº

Página

18	Indução e repressão catabólica da inulinase de <i>K. marxianus</i> e <i>K. fragilis</i> . Dados em U/ml	88
19	Avaliação da especificidade da enzima pelo substrato no caso da inulinase extracelular de <i>K. marxianus</i> e <i>K. fragilis</i> . Dados em U/ml	88
20	Determinação da atividade inulinolítica em vários valores de pH. Dados em U/ml	89
21	Análise da inativação térmica da inulinase extracelular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> e <i>K. fragilis</i> . Valores em U/ml após tratamento da enzima por 10 minutos às temperaturas de 40, 50, 60 e 70°C	89
22	Avaliação do caráter "killer" em leveduras pela formação de halos de inibição sobre a linhagem sensível AH22	92
23	Teste de sensibilidade entre linhagens "killer" de <i>Saccharomyces</i> e <i>Kluyveromyces</i> . (+) formação de halo; (-) não formação de halo e (+/-) halos reduzidos e de aparecimento após 48 horas	93

TABELA Nº

Página

24	Avaliação do espectro de ação da toxina de linhagens "killer" de <i>Saccharomyces</i> e de <i>Kluyveromyces</i> , sobre leveduras. (+) formação de halo; (-) não formação de halos e (+/-) halos reduzidos	95
25	Efeito do pH na expressão do caráter "killer" de várias leveduras com o caráter. (++) halo de inibição; (+) halo de inibição menor; (-) sem halo de inibição	96
26	Avaliação do efeito "killer" em linhagens curadas com brometo de etídio	99
27	Caracterização de híbridos intra e interespecíficos de <i>Kluyveromyces</i> quanto a marcas auxotróficas, esporulação, "killer" e assimilação de fontes de carbono	103
28	Segregação de marcas e segregantes de híbridos inter e intraespecíficos de <i>Kluyveromyces</i> e os valores de % de recombinação entre os marcadores	105
29	Avaliação da fermentação de glicose por híbridos de <i>Kluyveromyces</i> . Dados em %GL de etanol de 3 fermentações consecutivas de 15 horas a 35°C	107

TABELA Nº

Página

30	Análise de variância dos dados da tabela 29. Experimento inteiramente casuali <u>z</u> ado	108
31	Avaliação da fermentação de extrato de <i>H. tuberosus</i> por híbridos de <i>Kluyveromyces</i> . Dados em °GL de etanol de 3 fermentações consecutivas de 24 horas a 35°C	109
32	Análise de variância dos dados da tabela 30. Experimento inteiramente casuali <u>z</u> ado	109
33	Avaliação da atividade inulinolítica ex <tr>tracelular de parentais e híbridos de <i>Kluyveromyces</i> em três dias. Dados em U/ml</tr>	110
34	Avaliação da capacidade fermentativa de segregantes de MM1 em extrato bruto de <i>H. tuberosus</i> . Dados em °GL de etanol de dois blocos com três fermentações con <u>s</u> ecutivas em cada, a 35°C por 24 horas.	112
35	Análise de variância em parcelas subdivididas dos dados da tabela 33, com des <u>m</u> embramento dos segregantes	113
36	Avaliação da capacidade fermentativa de segretantes de MM50 em extrato bruto de <i>H. tuberosus</i> . Dados em °GL de etanol de dois blocos com duas fermentações consecuti <u>v</u> as em cada a 35°C por 24 horas	113

TABELA Nº

Página

37	Análise de variância em parcelas subdivididas dos dados da tabela 35, com desmembramento dos segregantes	115
38	Avaliação da capacidade fermentativa de segregantes de MF1 em extrato bruto de <i>H. tuberosus</i> . Dados de etanol em %GL de dois blocos com duas fermentações consecutivas em cada um, a 35°C por 24 horas	117
39	Análise de variância em parcelas subdivididas dos dados da tabela 37, com desmembramento dos segregantes	118
40	Avaliação da atividade inulinolítica dos extratos enzimáticos brutos de segregantes selecionados de MM1 e MM50. Dados em U/ml	119
41	Teste de atividade enzimática dos extratos enzimáticos após 72 hs de crescimento de segregantes e linhagens sobre sacarose e sobre inulina. Dados em U/ml .	119
42	Segregação dos híbridos MMRI e MMR3 para as marcas auxotróficas e o caráter inulina	121
43	Avaliação do conteúdo de DNA e o volume celular de parentais e produtos de fusão entre <i>K. marxianus</i> e <i>K. lactis</i>	122

TABELA Nº

Página

44	Avaliação da capacidade de assimilação de fontes de carbono por produtos de fusão entre <i>K. marxianus</i> e <i>K. lactis</i>	123
45	Avaliação do caráter "killer" em produtos de fusão	124
46	Avaliação da capacidade fermentativa de lactose, glicose e extrato de <i>H. tuberosus</i> por produtos de fusão entre <i>K. marxianus</i> e <i>K. lactis</i>	125

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		Página
01	Avaliação de leveduras para fermentação alcoólica de extrato de <i>H. tuberosus</i> ..	61
02	Cinética da fermentação sem agitação de extrato de <i>H. tuberosus</i> por IZ 1339 (Km); IZ 610 (Kf) e Fleischmann (Sc)	64
03	Cinética da fermentação com agitação de extrato de <i>H. tuberosus</i> por IZ 1339 (Km) e Fleischmann (Sc)	66
04	Modificação na composição de açúcares durante a fermentação com IZ 1339 (Km) de extrato de <i>H. tuberosus</i> . Representação esquemática de cromatografia de açúcares	67
05	Cinética comparativa da fermentação de extrato de <i>H. tuberosus</i> por duas linhagens de <i>Torulopsis colliculosa</i>	68
06	Efeito da concentração de células no perfil cinético de IZ 1966 (T.c) durante a fermentação de extrato de <i>H. tuberosus</i>	71
07	Cinética comparativa da fermentação de glicose por <i>Saccharomyces</i> e <i>Candida</i>	73

FIGURA Nº

Página

08	Cinética comparativa da fermentação de extrato de <i>H. tuberosus</i> por <i>Saccharomyces</i> , <i>Kluyveromyces</i> e <i>Candida</i>	76
09	Regressões lineares correspondentes à cinética do crescimento de IZ 1339 (Km); IZ 610 (Kf) e Fleischmann (Sc) em glicose, sacarose e inulina	80
10	Cinética da produção de inulinase extracelular e da liberação de açúcares redutores no meio, durante a fase estacionária de crescimento de IZ 1339 (Km) e IZ 610 (Kf)	86
11	Variação da atividade inulinolítica de extratos enzimáticos de <i>K. marxianus</i> (IZ 1339 e IZ 619) e <i>K. fragilis</i> (IZ 610 e IZ 275) de acordo com o pH	90
12	Inativação térmica da inulinase extracelular de <i>K. marxianus</i> (IZ 1339 e IZ 619) e <i>K. fragilis</i> (IZ 275 e IZ 610) ..	90
13	Identificação dos plasmídios "killer" de <i>K. marxianus</i> (IZ 1339) por eletroforese em gel de agarose	96
14	Curva de crescimento de uma cultura mixta da levedura "killer" IZ 1339 (Km) e M-304-2C (<i>S. cerevisiae</i>) em meio a pH 6,8	97

FIGURA Nº

Página

15	Curva de crescimento de uma cultura <u>mix</u>
ta da levedura "killer" IZ 1339 (Km) e
M304-2C (Sc) em meio tamponado a pH 4,5.
Efeito killer	98
16	Curvas comparativas de sensibilidade ao
ácido nitroso de <i>K. marxianus</i> , <i>K. fragi</i>
<i>lis</i> , <i>K. lactis</i> e <i>S. diastaticus</i>	101

GENÉTICA E MELHORAMENTO DE LEVEDURAS PARA A BIOCONVERSÃO
DE EXTRATOS DE *H. tuberosus* L.

Autor: Sergio Echeverrigaray Laguna

Orientador: Prof. Dr. Flávio C.A. Tavares

RESUMO

O presente trabalho teve como principais objetivos estabelecer quais as leveduras mais adequadas à fermentação alcoólica e à produção de xaropes de frutose, a partir de inulina de extrato de tubérculos de *H. tuberosus*. Para tanto foram desenvolvidos experimentos de seleção de leveduras, avaliação da atividade inulinolítica extracelular, estudo de parâmetros cinéticos e estudos genéticos importantes para o melhoramento destes organismos.

A seleção de leveduras permitiu estabelecer que as espécies mais adequadas à fermentação de extratos de *H. tuberosus* são *K. marxianus*, *K. fragilis* e *C. pseudotropicalis*. Com leveduras selecionadas foi possível desenvolver fermentações de 12 horas com 9,87%GL de etanol e rendimentos de 96,56%, com produtividade volumétrica de $7,87 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e produtividade específica de $2,35 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, o que torna o processo de fermentação deste substrato comparável com as fermentações de cana-de-açúcar.

As linhagens testadas de *K. marxianus*, *K. fragilis* e *C. pseudotropicalis* exibiram altas atividades inulinolíticas extracelulares, o mesmo não ocorrendo nas linhagens de *S. cerevisiae*, *C. guilliermondii* e *T. colliculosa*, nas quais não foi possível detectar atividade extracelular desta enzima.

Os dados obtidos mostraram que a inulinase extracelular de *K. marxianus* não apresenta repressão catabólica, e a sua síntese mesmo sendo constitutiva foi estimulada por inulina, sacarose e celobiose. Por outro lado, a inulinase extracelular de *K. fragilis* sofre repressão catabólica e retroinibição em concentrações de açúcares redutores superiores a $3 \times 10^{-3} M$, sendo a sua síntese induzida por inulina e por β -fructosídeos (incluindo sacarose). Observou-se adicionalmente que os extratos enzimáticos de *Kluyveromyces*, apresentam dois pH ótimos (pH 4,0 e 7,0) de atividade inulinolítica, e são sensíveis a temperaturas superiores a 50°C.

Dentre as linhagens testadas, três de *K. marxianus* exibiram caráter "killer" a pH 4,5, sendo a sua toxina muito ativa sobre leveduras do gênero *Saccharomyces*, mas não sobre o próprio gênero. O caráter "killer" nestas leveduras está associado à presença de dois plasmídios de DNA (pM1 e pM2) e a resistência à própria toxina deve-se a genes nucleares. Sendo a toxina muito eficiente no controle de contaminantes de *Saccharomyces* durante a multiplicação, esta levedura pode vir a ser usada onde a presença destas leveduras não for desejada.

As linhagens de *K. marxianus* não exibem reação sexual definida e as taxas de hibridização foram muito reduzidas, tanto em cruzamentos intra, como interespecíficos. Este aspecto não foi limitante para os estudos genéticos, permitindo a identificação de dois genes inulinolíticos designados lnl_1 e lnl_2 , presentes respectivamente em IZ 1339 e IZ 619. Estes genes estão ligados a 10 cM, e quando os alelos lnl_1 e lnl_2 estão presentes na mesma linhagem ocorre interação que resulta em atividades muito superiores aos genes individuais.

A variação entre segregantes de híbridos de *K. marxianus* mostrou-se significativa, sendo obtidos segregantes com capacidade fermentativa superior aos parentais e as linhagens selecionadas. As técnicas recombinogênicas empregadas mostraram-se eficientes e este resultado mostra o grande potencial de resposta de métodos que envolvem a recombinação nestas leveduras.

Mesmo os métodos não convencionais de cruzamento mostraram-se viáveis, sendo os produtos de fusão entre *K. marxianus* e *K. lactis* estáveis, produzindo ascas com esporos reniformes, porém com baixa viabilidade. Estes produtos de fusão apresentaram boa capacidade de fermentação de glicose, extratos de *H. tuberosus* e lactose, exibindo também o caráter "killer" do parental *K. marxianus*.

Os resultados permitem concluir que a fermentação de extratos de *H. tuberosus* e a produção de enzimas inulinolíticas por apresentarem produtividades e rendimentos eleva

dos que possibilitam a produção econômica de etanol e xarope de frutose via hidrólise enzimática a partir deste vegetal. Através do melhoramento das leveduras do gênero *Kluyveromyces* e da produção agrícola de *H. tuberosus*, estes processos podem ser mais econômicos e portanto com maior potencial de competição com outras tecnologias existentes.

GENETICS AND IMPROVEMENT OF YEASTS FOR THE BIOCONVERSION
OF *H. tuberosus* L. EXTRACTS.

Author: Sergio Echeverrigaray Laguna

Adviser: Prof. Dr. Flávio C.A. Tavares

SUMMARY

This work had the main objectives of selection of suitable yeasts for fermentation and enzyme production for inulin hydrolysis. Both properties are required to use *H. tuberosus* (Jerusalem Artichoke) extracts to obtain ethanol and fructose syrups. Kinetic parameters of fermentation and enzyme activities were studied and some genetics of *Kluyveromyces* yeasts developed as well as the breeding and selection of promising lines.

Among different yeasts tested, *K. marxianus*, *K. fragilis* and *C. pseudotropicalis* were considered to be adequate for *H. tuberosus* extracts fermentation. Fermentations were achieved in 12 hours with selected yeasts and 9,87%GL of ethanol production and a yield of 96,56%. Volumetric productivity reached 7,87 g.l⁻¹.h⁻¹ and the specific productivity of 2,35 g.g⁻¹.h⁻¹.

The yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida guilliermondii* and *Torulopsis colliculosa* do not show extra-

celular inulinase production but high levels of enzyme activity were found for *K. marxianus*, *K. fragilis* and *C. pseudotropicalis*. The extracellular inulinase of *K. marxianus* has not presented catabolic repression and synthesis appeared to be constitutive, but stimulated by inulin, sucrose and cellobiose. On the other hand, the extracellular inulinase of *K. fragilis* presented catabolic repression and possibly inactivation at concentrations above 3×10^{-3} M of reducing sugars. Synthesis was induced by inulin or other β -fructosides, including sucrose. In addition it was observed that *Kluyveromyces* extracellular enzymatic extracts show two peaks of inulinolytic activity, one at pH 4.0 and the other at pH 7.0, and activity was ceased in temperatures above 50°C.

Among the yeasts tested two strains of *K. marxianus* presented the killer character at pH 4.5 with a very active toxin against *Saccharomyces* yeasts but not to other *Kluyveromyces*. This killer character was determined by the presence of two DNA plasmids (pM1 and pM2) and toxin resistance was proved to be of nuclear nature. Considering the toxin very efficient against *Saccharomyces* contaminant yeasts during multiplication this ability could be of interest in fermentations where the presence of *Saccharomyces* is undesired.

The strains of *Kluyveromyces* did not exhibited mating type reaction and hybridization rates were very low in both intra and interespecific crosses. This aspects was not limitant for the genetic studies and it was possible to

identify two genes for inulin utilization designed Ini_1 and Ini_2 , which were present respectively in the strains IZ 1339 and IZ 619. The genes are linked at about 10 cM and when both are presented interreaction is observed leading to enhanced inulinase activity.

Variation among segregant strains from the hybrids of *K. marxianus* was significant and superior strains were obtained compared to the parental selected lines. The recombinogenic methods have shown to be efficient and such results are an evidence of the great response potential of this methods.

Even non conventional methods of intercrossing have shown to be viable. Fusion products among *K. marxianus* and *K. lactis* were stable and sporulated. However the spore viability was very low. The fusion hybrids show good fermentation ability of glucose, *H. tuberosus* extracts and lactose, and show the killer character of the parental *K. marxianus* strain.

The results obtained support the conclusion that *H. tuberosus* fermentation and the production of inulinolytic enzymes, due to its high productivity and yields, make possible the economic production of ethanol and fructose syrups via enzymatic hydrolysis. Considering the by the breeding of *Kluyveromyces* yeasts and better agricultural production of *H. tuberosus* the process could be more economical and competitive with other existent technologies.

1. INTRODUÇÃO

O etanol carburante é sem dúvida um dos substitutos mais importantes do petróleo, e sua produção vêm se elevando rapidamente nos últimos anos visando atender a crescente demanda por parte do mercado. Com isto, a procura de fontes alternativas de matérias primas que possam ser convertidas em etanol economicamente, tem se intensificado, surgindo assim como opções à sacarose de cana-de-açúcar, o amido de várias origens, a celulose de madeira e do bagaço de cana e a inulina de *Helianthus tuberosus*.

Devido às condições agronômicas exigidas pelo *H. tuberosus* e a sua elevada produtividade (90 toneladas / ha / ano no Ceará) em áreas nas quais a cana-de-açúcar encontra restrições ao seu cultivo; este vegetal apresenta vantagens sobre as outras opções de matérias primas. Adicionalmente, por apresentar elevadas concentrações de inulina, a fermentação de *H. tuberosus* requer leveduras com boa produção de inulina-se, e alto potencial fermentativo.

A inulina como é composta por subunidades de frutose pode ser utilizada com vantagens na produção de xaropes de frutose, através de métodos mais econômicos do que os aplicados atualmente com a hidrólise do amido de milho e posterior isomerização da glicose resultante. Inclusive, seria possível a obtenção de xaropes com teores de frutose mais elevados, já que a inulina é um polímero de frutoses com apenas uma glicose terminal (G.F.F_n).

O presente trabalho tem como objetivo estudar as leveduras capazes de hidrolizar inulina convertendo este polissacarídeo em frutose ou etanol, e melhorar as qualidades industriais destes organismos de forma a possibilitar a fermentação alcoólica direta de extratos brutos de *Helianthus tuberosus* com altos rendimentos e produtividade, assim como melhorar a produção e atividade da inulinase para uso na fabricação de xaropes de frutose. Para tanto, é necessário conhecer as leveduras a serem melhoradas, o que requer estudos dos sistemas biológicos envolvidos e a base genética dos caracteres fundamentais associados com o propósito do trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Com o aumento sistemático do preço do petróleo, a produção de energia alternativa, principalmente etanol, têm se intensificado nos últimos anos. No Brasil, quase a totalidade do etanol produzido provém da fermentação de sacarose obtida da cana-de-açúcar durante safras de duração média entre 180 a 200 dias. A procura de fontes alternativas de substrato para fermentação alcoólica visa, fundamentalmente, elevar a produção de etanol através da ampliação dos períodos de safra, assim como, pela utilização de novas áreas de plantio. Várias fontes tem sido pesquisadas como o amido de várias origens, a celulose de madeira ou bagaço de cana, sendo a inulina de tubérculos de *H. tuberosus* fonte mais recente e considerada a mais promissora.

Esta última vêm despertando crescente interesse devido a uma série de vantagens sobre as outras alternativas, sendo estas principalmente: a menor exigência agrícola

do vegetal, a fácil mecanização do plantio e colheita, a alta produtividade por área, a sua ampla distribuição geográfica, a possibilidade de armazenamento dos tubérculos, e a fermentação direta ou com pré-tratamentos simples e menos dispendiosos.

A origem do *Helianthus tuberosus* ainda permanece incerta. Este vegetal foi introduzido na Europa procedente dos Estados Unidos e Canadá por Champlain em 1603, tendo sido usado como alimento pelas tribos indígenas da região. Na América do Sul é incerta a sua introdução, constando o seu cultivo como forragem no Brasil, Argentina e Uruguai desde o século passado, sem excluir a possibilidade de ser na verdade um vegetal autoctone desta região, a hipótese mais aceita é que este vegetal é originário das montanhas do norte do México (30° LN), e que foi difundido em tempos remotos para toda a América do Norte.

O *Helianthus tuberosus* é conhecido sob vários nomes populares, principalmente, Tupinambour nos países latinos e Jerusalem Artichoke nos anglo-saxões. Até o momento, o cultivo de *H. tuberosus* tem visado principalmente a ração animal e a alimentação humana, sendo a sua utilização muito limitada. Na França, dados governamentais consideram áreas cultivadas da ordem de 117 a 164 mil hectares. Com este vegetal no período entre 1930 e 1956, tendo estas diminuído muito nos últimos anos. No Brasil, não existem dados quanto a ocorrência de plantações deste vegetal, a não ser para fins experimentais.

O *Helianthus* é um alohexaploide complexo ($2n=102$) com fórmula ($At1 At2 Bt/At1 At2 Bt$), sendo Bt um genoma muito semelhante ao Ba do girassol (*H. annuus* ; $2n = 34$). Por causa destas semelhanças e das suas características agrônômicas, o *H. tuberosus* tem sido utilizado em muitos casos em cruzamentos interespecíficos com o girassol.

O *H. tuberosus* é uma planta com multiplicação vegetativa por tubérculos, podendo também ser obtida a partir de sementes viáveis. Os cruzamentos são facilmente obtidos, e o seu cultivo não oferece maiores dificuldades devido à ausência de doenças viróticas. O melhoramento genético deste vegetal pode contribuir muito para o futuro de sua utilização, e os estudos neste sentido realizados pela Station d'Amélioration des Plantes, INRA, França, prevêem a obtenção de clones com maior produtividade e mais aptos à colheita mecânica.

Os tubérculos apresentam 20 a 26% de matéria seca, da qual 75 a 82% são carboidratos de reserva, 13% celulose e hemicelulose, 6 a 8% de compostos nitrogenados (proteínas), 1 a 5% de cinzas e lipídios em baixíssimas concentrações. Os carboidratos apresentam a fórmula geral $G.F.F_n$, sendo consideradas como inulinas aqueles carboidratos com n maior a 31. Mesmo correspondendo a no máximo 15% de carboidratos, a inulina pode ser considerada como o carboidrato do *H. tuberosus* já que os polímeros restantes de menor tamanho são da mesma composição e com o mesmo tipo de ligações. Com esta composição, a frutose corresponde a 75 a 98% do açúcar redutor total, sendo o restante glicose.

Os estudos agronômicos mostram que durante o desenvolvimento do vegetal ocorrem variações na proporção frutose/glicose, sendo esta mais elevada no início do outono (setembro nos países europeus), de tal forma que é importante colher os tubérculos o mais tarde possível já que o rendimento em açúcar triplica neste período. Na região mediterrânea, a maior produtividade foi obtida em meados de novembro, quando ocorre a secagem da planta. A composição permanece então constante durante todo o inverno, ocorrendo somente uma pequena variação na composição de açúcares, já que os polifructosídeos são despolimerizados (CHABBERT et alii, 1983). A estocagem dos tubérculos também causa quebra da inulina e oligossacarídeos de alto peso em oligossacarídeos menores. Estas mudanças são completadas nas primeiras seis semanas de armazenamento. Com a quebra dos oligossacarídeos ocorre um aumento proporcional do conteúdo de sacarose e trissacarídeos principalmente, modificando-se a proporção de frutose para glicose (RUTHERFORD e WESTON, 1968).

As condições ideais para a cultura deste vegetal no Brasil vêm sendo estudadas recentemente na Universidade do Ceará, com dados promissores para a região Nordeste, e em condições experimentais estimam-se produções de 90 a 120 toneladas por hectare/ano em condições de semi-árido, considerando três a quatro ciclos anuais.

Mesmo com as vantagens agrícolas a utilização de *H. tuberosus* é muito reduzida, e nos escassos relatos da

sua utilização predominam os usos como ração animal. A potencialidade industrial deste vegetal vêm sendo pesquisada recentemente em vários países com o objetivo principal de produção de etanol, xaropes de frutose e proteína.

2.1. PRODUÇÃO DE ETANOL

A produção de etanol a partir de *H. tuberosus* vêm sendo pesquisada desde o fim do século XIX e durante a IIª Guerra obteve-se produções industriais. Os processos iniciais consistiam em uma hidrólise ácida do extrato seguida por uma fermentação clássica utilizando-se leveduras de destilaria, *Saccharomyces cerevisiae* (UNDERKOFER et alii, 1937; BOINOT, 1942).

Tratamentos ácidos brandos da polpa de tubérculos, são suficientes para hidrolizar a inulina e tornar os carboidratos fermentescíveis por *S. cerevisiae*. Ajustando-se o pH para 2,0 e cozinhando a polpa a 100°C por uma hora é possível processar fermentações com rendimentos elevados, atingindo-se teores alcoólicos de até 10,87% (p/p) (SACHS et alii, 1981) e produtividades de 131,61 litros de etanol por tonelada de tubérculos frescos (WILLIAMS e ZIOBR0, 1982). Porém, os pré-tratamentos demandam gastos de energia, equipamentos e ácido, além de provocar hidrólise de açúcares redutores, o que pode ser evitado com a utilização de microrganismos adequados, capazes de converter a inu-

lina diretamente em etanol, o que tornaria a fermentação de tubérculos de *H. tuberosus* uma opção econômica na produção de álcool carburante.

Leveduras de vários generos e espécies capazes de crescer e/ou fermentar inulina são conhecidas (LODDER, 1970; BARNETT et alii, 1974), para o que é necessária a produção de enzimas específicas capazes de hidrolizar este polifrutosídeo, tornando-o utilizável por parte da célula. Com base nestes dados, linhagens pertencentes a *Candida kefir*, *C. pseudotropicalis*, *C. macedoniensis*, *Debaryomyces cantarelli*, *Hansenula beijerinckii*, *Kluyveromyces fragilis*, *K. marxianus*, *Pichia guilliermondii*, *P. polymorpha*, *Saccharomyces fermentati*, *S. rosei*, *Schwanniomyces alluvius*, *Schw. castelli*, *Schw. occidentalis* e *Torulopsis colliculosa* foram estudadas por GUIRAUD et alii (1981a) quanto a produção de etanol a partir de inulina, destacando-se as espécies *K. fragilis* e *T. colliculosa*, as quais produziram mais de 5% de etanol a partir deste carboidrato. As espécies com maior capacidade de fermentação de glicose foram *K. fragilis*, *K. marxianus*, *C. pseudotropicalis* e *C. macedoniensis* que atingiram aproximadamente 12% de etanol.

Testes de produção de etanol a partir de extratos de *H. tuberosus* utilizando-se *K. fragilis*, *K. marxianus* e *T. colliculosa* submetidas a anaerobiose parcial ou total, mostram que *K. marxianus* apresenta alta produção (11,1%GL) e ren

dimento de 98% em anaerobiose total com fermentação de seis dias, podendo perfazer produções de 25 a 65 hectolitros de etanol por hectare, com um subproduto aproveitável como ração animal de alto conteúdo protéico (GUIRAUD et alii, 1981b).

Utilizando-se extratos de *H. tuberosus* várias linhagens de *S. cerevisiae*, *S. diastaticus*, *K. fragilis*, *K. marxianus* e *K. cicerisporus* foram testadas quanto à produção de etanol por DUVNJAK et alii (1982) concluindo-se que *K. marxianus* é mais favorável para processos industriais por apresentar a capacidade de utilizar todo o carboidrato fornecido, com produção de etanol e taxa específica de fermentação elevadas. O teor alcoólico máximo foi obtido com *K. marxianus* após 24 horas de fermentação, atingindo-se aproximadamente 5,5% (p/v) com uma conversão quase completa do carboidrato existente. Rendimentos de 78 a 84% em 20 horas foram obtidos para *S. cerevisiae* e *S. diastaticus*, enquanto *K. fragilis* atinge 92% em 50 horas, o que mostra a deficiência das primeiras em metabolizar os oligossacarídeos presentes no extrato.

A alta produção de *K. marxianus* foi também confirmada por MARGARITIS et alii (1981) e MARGARITIS e BAJPAL (1982a) comparando esta espécie com *Saccharomyces rosei*. Rendimento de 88% de etanol com consumo de 92% do açúcar disponível foram obtidos com *K. marxianus* em fermentações a 35°C com tempos de 36 horas. Esta levedura pode ser utilizada em processos de fermentação a pH reduzido (pH de 3,5), o que impede ou reduz os

problemas de contaminação, sem provocar redução na produtividade. Em comparação com *K. fragilis* e *T. colliculosa*, *K. marxianus* exibe os teores alcoólicos mais elevados com eficiência da ordem de 95,5% e rendimentos de 90% (GUIRAUD et alii, 1982a).

A eficiência de produção de álcool por *K. marxianus* é pouco afetada pela concentração do substrato, atingindo 0,45 g/g de açúcar utilizado para concentrações de inulina de 50 a 250 g/l. O maior teor alcoólico é obtido com 250 g/l de açúcar correspondendo este a 102 g/l de etanol com rendimento de 80%. Porém, o crescimento e a produção de biomassa são drasticamente reduzidos pelo aumento da osmolaridade caindo de $0,44 \text{ h}^{-1}$ com 50 g/l para $0,20 \text{ h}^{-1}$ com 200 g/l (MARGARITIS e BAJPAI, 1983). O etanol extracelular até 8 g/l não inibe a produção de etanol, porém afeta a produção de massa celular e a taxa específica de crescimento, reduzindo esta última de 0,42 para $0,09 \text{ h}^{-1}$ (BAJPAI e MARGARITIS, 1982).

A cinética da produção de etanol têm colocado também *K. marxianus* como a melhor espécie para a conversão de extratos de *H. tuberosus*. DUVNJAK et alii (1981) compararam a cinética de fermentação de várias leveduras do gênero *Kluyveromyces* em extratos de *H. tuberosus*, concluindo que estes extratos contêm nutrientes suficientes para a fermentação sem a adição de qualquer composto. A produtividade específica e a taxa específica de incorporação de glicose (ou frutose) em *K. marxianus* foram as mais elevadas correspondendo a 1,68

$\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$ e $3,78 \text{ gg}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente, atingindo rendimentos de até 87,5% em 25 horas de fermentação. Da mesma forma, MARGARITIS et alii (1983a) obtiveram os melhores resultados com uma linhagem de *K. marxianus*, chegando a atingir rendimentos de 97% com uma produtividade máxima de $4,97 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Pelo fato da composição de açúcares do tubérculo variar de acordo com a época de colheita e desenvolvimento do vegetal, a capacidade de fermentação dos açúcares presentes nestes extratos também é modificada. Tubérculos colhidos antes de secarem as folhas, apresentam açúcares mais polimerizados com a relação F/G = 11; enquanto que tubérculos colhidos após a secagem das folhas contêm açúcares menores com a relação F/G = 3 (CHABBERT et alii, 1983).

Uma opção no aumento da produtividade são as fermentações contínuas de extratos de *H. tuberosus* brutos. KOSARIC et alii (1982) utilizaram *K. marxianus* em fermentações contínuas com produtividade de $1,05 \text{ g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$, com rendimentos acima daqueles obtidos em fermentações em batelada (aproximadamente 90%). Rendimentos máximos de 90% do teórico foram obtidos com taxas de diluição de $0,05 \text{ h}^{-1}$, sendo confirmada a utilização de 95% dos açúcares em taxas de diluição de $0,15\text{h}^{-1}$, com mostos a pH 4,6 e temperatura de fermentação de 36°C . A produtividade volumétrica mais elevada e produção de biomassa atingiram $7 \text{ g (etanol).l}^{-1}\text{h}^{-1}$ e $0,6 \text{ g (peso seco).l}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente, em taxa de diluição de $0,2 \text{ h}^{-1}$. Os valores da taxa específica de produção de etanol e incorporação de açú-

cares aumenta linearmente com o aumento da taxa de diluição, tendo os seus valores máximos de 2,6 g (etanol) $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ e 7,9g (açúcar) $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente (MARGARITIS e BAJPAI, 1982b).

A utilização de células imobilizadas em fermentações contínuas tem-se mostrado a melhor alternativa de produção atingindo produtividades de 104 e 80 g (etanol) $\text{l}^{-1}\text{h}^{-1}$ com 80 e 92% de utilização do açúcar, respectivamente, chegando a ser até 15 vezes maior do que a produtividade em sistemas de células livres. O sistema mostrou-se estável utilizando-se taxa de diluição de $0,66\text{h}^{-1}$ durante o período de testes de 12 horas, durante o qual ocorreu uma perda de 8% da atividade celular original (MARGARITIS e BAJPAI, 1982c).

Em fermentações utilizando células imobilizadas, *Debaryomyces polymorphus* apresenta um incremento fermentativo em comparação com fermentações com células livres, passando de 88% para 96%. Estes rendimentos elevados se mantiveram constantes por 11 fermentações consecutivas com reciclo de células (MARGARITIS et alii, 1983b).

As leveduras do gênero *Kluyveromyces* e especialmente *K. marxianus* apresentam possibilidades de aplicação em processos industriais para a produção de etanol a partir de inulina de extratos de *H. tuberosus*, com produtividades elevadas e rendimentos satisfatórios, podendo ainda ser melhorada no sentido de torná-la mais adequada aos processos e mais produtiva.

/ Para utilizar a inulina as leveduras necessi-

tam hidrolizar este polissacarídeo em moléculas menores ou açúcares redutores, de tal forma que a célula possa convertê-los em etanol ou biomassa, para tanto, as leveduras utilizam-se de enzimas específicas capazes de hidrolizar a inulina nas suas unidades de frutose. Estas enzimas merecem atenção especial por serem a base da utilização da inulina.

2.2. ENZIMAS INULINOLÍTICAS

Apesar de conhecida a fermentação da inulina por leveduras desde 1900 por Lidner, os estudos relacionados com as enzimas envolvidas neste sistema catabólico só foram estudadas a partir do trabalho de SNYDER e PHAFF em 1960. Estes autores estudaram a beta-fructosidase produzida por *K. fragilis* tanto intra como extracelularmente. Esta enzima é capaz de hidrolizar inulina, levanas bacterianas, sacarose e a porção de frutose da rafinose, retirando as unidades de frutose terminais. É capaz de atacar tanto ligações beta-1,2 como beta-1,6. A beta-fructosidase não é portanto uma enzima específica para a hidrólise de inulina, porém, difere da invertase por atuar mais ativamente sobre inulina, apresentando uma relação de hidrólise sacarose/inulina de 25, enquanto a de invertase é de 14.000. Os dados de WEIDENHAGEN (1941) e de ADAMS et alii (1943) mostram que a invertase de *Saccharomyces cerevisiae* apresenta capacidade de degradação de inulina, po-

rêm, como este polissacarídeo não ultrapassa a parede celular, somente extratos de levedura são capazes de exibir esta atividade.

NEGORO e KITO (1973a) estudaram a produção de enzima com atividade de beta-fructofuranosidase em *Candida kefir*. Esta enzima é produzida quando as células são cultivadas em lactose, mas não em glicose, fructose ou sacarose. A proporção de enzima intra e extracelular muda de acordo com o estágio de crescimento. No início a concentração de enzima intracelular é elevada, diminuindo na fase estacionária com o aumento da enzima extracelular. A temperatura ideal de produção foi de 27 a 30°C, sendo a enzima induzida pela inulina. A purificação da inulinase intracelular confirmou a presença de uma única enzima estável em pH de 3 a 8 e a temperaturas inferiores a 55°C, com alta atividade sobre inulina quando comparada com a invertase de *S. cerevisiae* e *C. utilis* (NEGORO e KITO, 1973b). De forma semelhante, *Debaryomyces cantarelli* contém atividade de inulinase induzida por inulina e não por outros beta-fructosídeos, exibindo repressão catabólica por glicose e frutose. Diferente de *Candida kefir* esta levedura apresenta a sua atividade associada com a parede celular, com dois pH ótimos a 4 e 6 (BELUCHE et alii, 1980). As inulinase de *D. cantarelli* atua sobre inulina, sacarose e rafinose; apresentando uma razão I/S de 0,11 semelhante à observada em outras leveduras inulinolíticas, porém, muito maior do que a exibida pela invertase de *S. cerevisiae* (10^{-5}). A enzima tem

as condições ideais a pH 4,0, 50°C e seu Km é de 15 mM (GUIRAUD et alii, 1982b).

Candida salmenticensis possui inulinase induzível do tipo beta-fructosidase, ativa sobre inulina, sacarose e rafinose. A enzima, a semelhança de *C. cantarelli* está associada a parede celular, mas é liberada no meio da cultura durante o crescimento da levedura. As suas principais características para a degradação da inulina são: pH ótimo entre 3,5 e 4,0, temperatura ideal de 46°C com estabilidade até 50°C e Km de 17 mM (GUIRAUD et alii, 1980). Da mesma forma *Debaryomyces phaffii* apresenta atividade de inulinase induzida por fructosídeos e especialmente por inulina, localizada na parede celular, é excretada no meio durante a fase estacionária. A atividade máxima sobre inulina foi verificada a pH 4 e 50°C, possuindo um Km de 12 mM (DEMEULLE et alii, 1981).

Por outro lado, os estudos realizados em *Pichia polymorpha* indicam a presença de duas inulinases induzíveis do tipo beta-fructosidase. Ambas são sintetizadas e mantidas na parede celular, mas são facilmente excretadas no meio de cultivo. Estas enzimas diferem basicamente no pH ótimo de ação, sendo este de 2,0 para EI e de 4,5 para EII, e na presença de resíduos glicosídicos em EI (CHAUTARD et alii, 1981).

A repressão catabólica exibida pela frutose e glicose sobre a inulinase destas leveduras, e especialmente de *P. polymorpha*, impede a maior eficiência de degradação do polímero. Mutantes desreprimidos são desta forma vantajosos pa

ra qualquer aplicação destas leveduras. Este tipo de mutantes tem sido isolados em *P. polymorpha* após indução de mutação com etilmetanosulfonato e seleção em meio contendo inulina e 2 desoxi-D-glicose, que atua como análogo de glicose reprimindo a síntese de enzima, porém, sem ser utilizado no metabolismo celular. O mutante F5 isolado desta forma, apresentou além de desrepressão, um aumento na atividade enzimática tanto na presença quanto na ausência de açúcares redutores (BAJON et alii, 1984).

De um modo geral, portanto, as enzimas inulinolíticas de leveduras são do tipo beta-fructofuranosidases, induzíveis por fructosídeos e inulina, e com pH ótimo entre 2 e 4, temperatura ideal de 45 a 50°C e Km variando de 12 a 17 mM. Todas elas atuam liberando os resíduos de fructose terminal, o que difere das enzimas de *Penicillium* (NAKAMURA e NAKATSU, 1977), de *Aspergillus niger* (NAKAMURA et alii, 1978) e *Arthrobacter aureofaciens* (TANAKA et alii, 1972) cujos produtos de hidrólise são respectivamente, oligossacarídeos e difructose anidra.

Pela composição fructosídica da inulina, uma aplicação imediata deste polissacarídeo é na sua conversão em xaropes de fructose com altas concentrações e portanto de elevado valor comercial.

2.3. PRODUÇÃO DE XAROPES DE FRUTOSE

A frutose é um açúcar natural que pode ser utilizado como edulcorante nas indústrias de alimentos, possuindo inclusive um poder adoçante ($PS = 1,6$), superior àquele da sacarose e da glicose. A frutose apresenta várias vantagens sobre os açúcares convencionais para o consumo humano. Produz menos cáries dentárias (MAKINEN, 1972), é utilizável por pessoas diabéticas, é absorvido mais lentamente que a glicose no intestino e é usado sem a intervenção de insulina. Adicionalmente, este monossacarídeo acelera o metabolismo do etanol e dosa a absorção de ferro através da formação de um complexo quelante ferro-frutose. É um carboidrato solúvel em água e etanol e tem pouca tendência à cristalização.

A forma de obtenção de xarope de frutose mais aplicada atualmente é aquela que envolve a conversão do amido de milho em glicose através de sua hidrólise ácida ou enzimática, seguida pela isomerização da glicose por tratamentos alcalinos ou comumente por tratamento com glicose isomerase, podendo este último ser realizado em reatores contendo enzima imobilizada (MERMLLSTEIN, 1975).

A inulina surge assim, como uma opção na produção de xaropes ricos em frutose sem a necessidade de aplicação de complexos processos enzimáticos, e transformações dos açúcares redutores, já que este polissacarídeo é composto basicamente por subunidades de frutose, apresentado a fórmula

geral $G.F.F_n$ com n superior a 31 (BACON e LOXLEY, 1952 e KIERS TAN, 1978 e 1980). A hidrólise de extratos de *H. tuberosus* permite a obtenção de xaropes com média de 75% de frutose, o que é consideravelmente mais elevado do que aqueles obtidos a partir da isomerização de glicose de amido de milho (PILNIK e VERVELDE, 1976).

A hidrólise da inulina pode ser realizada através de tratamentos ácidos com ácido clorídrico, ou mais comumente, com ácido sulfúrico em temperaturas elevadas. Os tratamentos podem variar entre pH 1 e 4 e entre 60 e 100°C com duração de 5 minutos a várias horas.

Tratamento de 30 minutos a pH 2 e 110°C, de extrato de chicória purificado por precipitação calcocarbônica, passado posteriormente através de carvão ativado e resinas de troca iônica, permite a obtenção de xarope com 70° Brix contendo 97% de açúcares que correspondem a 75% de frutose e 25% de glicose (GUIRAUD e GALZY, 1981). Porém, a utilização de pH 3 a 4 e temperatura da ordem de 70 a 80°C durante hidrólises longas levam à produção de xaropes com qualidade superior em termos de aroma e cor, impedindo a perda de açúcar por degradação ácida, que ocorre comumente nos tratamentos mais drásticos (FLEMING e GROOTWASSINK, 1979). Os testes tem mostrado que a condição mais favorável para hidrólise é de pH 1,5 a 85°C por 30 minutos a 1 hora, sendo, que a elevação do pH além deste ponto leva a tratamentos muito mais demorados, sem melhorar significativamente a formação do xarope pela diminuição da cor do mesmo (FLEMING e GROOTWASSING, 1979).

Os xaropes de frutose obtidos após tratamento ácido devem ser neutralizados, o que normalmente é feito com óxido de cálcio, precipitando-se o cálcio excedente através da formação de carbonato de cálcio com anidrido carbônico. Falhas neste procedimento, que permitam a presença de pequenas quantidades de cálcio iônico, levam à formação de compostos de sabor amargo, que diminuem a qualidade do produto. Outros sais podem também ser utilizados, porém, com riscos semelhantes para o processo, tais como o bário e o cloreto de sódio.

Sistemas alternativos tem sido propostos para a neutralização dos xaropes, todos eles com poucas possibilidades de aplicação. Por causa destas dificuldades, a hidrólise enzimática têm surgido como uma via alternativa que pode vir a possibilitar a aplicação industrial da inulina como uma fonte de frutose.

Várias enzimas capazes de hidrolizar a inulina, tem sido encontradas nos próprios tubérculos de *H. tuberosus*, em outros vegetais, em leveduras, em fungos e em bactérias. As enzimas encontradas podem ser classificadas de acordo com a sua atividade sobre fructosídeos com vários níveis de polimerização. O primeiro grupo apresentando elevada atividade sobre inulina (DP superior a 30) e baixa atividade sobre sacarose, é representado por duas enzimas encontradas em *H. tubero*-*sus* (AVIGAD e BAVER, 1966) e que são consideradas verdadeiras inulinases. O segundo grupo de enzimas apresentam elevada atividade sobre sacarose e muito baixa atividade sobre inulina,

sendo estas as invertases. O terceiro grupo atuando efetivamente sobre sacarose e sobre inulina, é aquele mais considerado em processos industriais. Estas últimas são procedentes de leveduras (como foi visto) e de fungos como *Aspergillus niger*, *Fusarium roseum* e *Penicillium* sp. (INAGAKI e HONJO, 1949).

Os resultados experimentais utilizando hidrólise enzimática de extratos mostra que em tempos de 2 a 4 horas as inulinasas são capazes de realizar a hidrólise completa dos polifructosídeos, enquanto neste período, as invertases são capazes de hidrolizar parcialmente o extrato na ordem de 15 a 45% dos açúcares originais, a depender em ambos os casos do grau de polimerização da inulina utilizada (FLEMMING e GROOTWASSINK, 1979).

Utilizando-se beta-fructosidade extracelular de *K. fragilis*, BYUN e NAHN (1978) observaram que é possível a hidrólise enzimática total utilizando-se meios de cultura nos quais tenha sido crescida esta levedura (0,5 unidades/ml). Com esta concentração de enzima a hidrólise até 90%, ocorre em 2 a 4 horas para produção de xaropes com 77% de frutose e 23% de glicose.

A extração da exo-inulinase da parede celular de *K. fragilis* permite incrementar a atividade do extrato enzimático, e a sua produtividade. LAM e GROOTWASSINK (1985) desenvolveram um processo rápido para a extração completa da enzima em grande escala, o qual envolve o tratamento de células (10 g/l^{-1}) em tampão fosfato 0,4M pH 7-8, contendo 8mM de cisteína e a 25-30°C por 30 minutos.

Uma alternativa tecnológica na produção de xaropes está na utilização de reatores com células imobilizadas de leveduras que possuam atividade inulinolítica. Nestes casos, leveduras com alta atividade associada à parede celular são preferíveis, evitando desta forma a perda constante de enzima, o que levaria a um esforço metabólico desnecessário por parte da célula.

GUIRAUD et alii (1983) utilizando células de *Pichia polymorpha* um reator contínuo obteve xaropes de frutose. Com a ocorrência de multiplicação celular suficiente para garantir a manutenção do sistema, este funcionou ininterruptamente por 75 dias. Neste sistema as condições ótimas mostraram-se diferentes daquelas apresentadas pela enzima isolada, sendo estas 50°C e pH 3,0 (médio para ambas as enzimas), com um aumento significativo de estabilidade térmica. Se os valores obtidos experimentalmente forem mantidos em escala industrial, tal sistema permitiria a produção de 24 toneladas de açúcar por dia com um reator de 10 m³, usando-se extratos com 150 g/l e 16 trocas por dia.

A estabilidade das enzimas inulinolíticas (2,1- β -D-fructan fructano hidrolase ou fructo-furanosíase) é um dos fatores limitantes na utilização de sistemas contínuos de produção de xaropes de frutose a partir de inulina. BAJPAI e MARGARITIS (1985a) trataram células imobilizadas de *K. marxianus* com uma série de polímeros policatiônicos, observando que com estes aumenta a estabilidade da enzima, provocan-

do, porém, uma leve redução na produtividade volumétrica. Dependendo do polímero aplicado, a estabilidade foi incrementada duas a seis vezes.

A utilização de *K. marxianus* na produção de xarope de frutose a partir de inulina, depende também da formação de sistemas livres, ou preferencialmente imobilizados, nos quais a levedura mantenha a atividade inulinolítica. Células desta levedura tem sido imobilizadas em matriz de gelatina com poros abertos, retendo mais de 90% da atividade enzimática, porém, a temperatura ótima é incrementada em 10°C. A energia de ativação é reduzida a um terço do normal e o K_m é aumentado de 8 mM para 9,52 mM com a imobilização. Além destas vantagens, as células imobilizadas mantêm a atividade enzimática por 30 dias a 4°C e perdem somente 6% de atividade no mesmo período à temperatura ambiente (BAJPAI e MARGARITIS, 1985b). Com este sistema de imobilização os autores obtiveram xaropes de frutose com 93% de hidrólise ($F/G = 90/10$) em bateladas de 3 horas, com um produto contendo 4,2% de frutose. Em sistema contínuo, a percentagem de hidrólise se manteve aproximadamente em 100% durante 10 dias, com taxa de diluição de $1,26 \text{ h}^{-1}$. A produtividade máxima foi observada com $D = 2,08 \text{ h}^{-1}$, sendo esta de $100 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ com 80% de conversão (BAJPAI e MARGARITIS, 1985c).

2.4. ASPECTOS GENÉTICOS DO GÊNERO *Kluyveromyces*

A maior parte dos estudos em leveduras tem sido realizados no gênero *Saccharomyces* e mais especificamente em *S. cerevisiae*, devido as suas propriedades acessíveis a estudos genéticos, bioquímica conhecida, biologia favorável e alto interesse industrial. Já no gênero *Kluyveromyces* os estudos são muito limitados, e os principais dentre este, visam aspectos relacionados com o catabolismo da lactose em *K. lactis* (HERMAN e HALVORSON, 1963; DICKSON et alii, 1979; DICKSON e MARKIN, 1978; SHEETZ e DICKSON, 1980; SHEETZ e DICKSON, 1981).

Por definição as leveduras do gênero *Kluyveromyces* (LODDER, 1970) apresentam reprodução vegetativa por brotamento, células esferoidais, cilíndricas, elipsoidais ou alongadas, podem formar pseudomicélios, mas não micélios verdadeiros. Os ascos rompem-se quando estão maduros liberando os esporos, os quais tem tendência a se aglutinarem. Os ascosporos podem ter formas variadas predominando os reniformes e esféricos, presentes em número de um a vários dentro do asco. Há interfertilidade, possuem metabolismo oxidativo e fermentativo, requerem vitaminas e formam em muitos casos pigmentos vermelhos não carotenóides. O gênero possui 18 espécies, das quais *K. marxianus*, *K. fragilis* e *K. cicerisporus* caracterizam-se por apresentarem boa fermentação de inulina.

Análise da homologia de DNA entre espécies do

gênero *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* mostra que *S. cerevisiae*, *S. lactis* e *S. fragilis* apresentam grau muito reduzido de homologia. *K. marxianus* por sua vez apresenta 93% de homologia com *K. fragilis* e somente 9% com *K. lactis*. Híbridos entre *K. fragilis* e *K. lactis* contêm dois genomas não homólogos (BLCKNELL e DOUGLAS, 1970). Comparando-se as sequências 25S rRNA foi observado alto grau de homologia entre *K. lactis* e *S. cerevisiae* (92 a 94%) (PRICE et alii, 1978).

CAMPBELL (1972) estabeleceu a existência de 3 grupos dentro do gênero *Kluyveromyces* através da análise numérica baseada em 58 caracteres. O primeiro grupo é associado com *K. lactis* e se relaciona 70% com os quatro grupos de *Saccharomyces*; o segundo grupo é formado por uma única espécie *K. veronae*, relacionada ao grupo de *S. cerevisiae* e o terceiro grupo relacionado com *S. exiguus*. Através desta análise, *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. fragilis* e *K. cicerisporus* estão relacionadas, sendo *K. fragilis* e *K. marxianus* as mais próximas.

A ocorrência de hibridação interespecífica no gênero *Kluyveromyces* foi observada inicialmente por WICKERHAM e BURTON (1956a,b) entre *K. lactis* e *K. ashbyi* e entre *K. fragilis* e *K. dobzhanskii*. Os híbridos do primeiro cruzamento foram homotáticos como *K. ashbyi* e esporularam abundantemente; ou heterotáticos como *K. lactis* e alguns quase estéreis. Todos os híbridos apresentaram assimilação de lactose, inulina e alfa-glicosídeos. Certa instabilidade com a forma-

ção de setores foi observada em alguns híbridos. No segundo cruzamento foram obtidos alguns híbridos capazes de fermentar lactose e maltose.

JOHANNSEN e VAN DER WALT (1978) estudaram a interfertilidade entre espécies pertencentes ao gênero *Kluyveromyces* utilizando-se de marcas auxotróficas para a identificação dos híbridos. Neste trabalho foi observada a interfertilidade de *K. marxianus* com *K. bulgaricus*, *K. cicerisporus*, *K. dobzhanskii*, *K. drosophilorum*, *K. fragilis*, *K. lactis*, *K. phaeoelosporus*, *K. vanudenii* e *K. wikenii*. Através destes dados, a coespecificidade destas espécies com *K. marxianus* levou os autores a propor a junção destas espécies sobre a forma de raças dentro de *K. marxianus*.

Estudos genéticos no gênero *Kluyveromyces* têm se limitado à espécie heterotática *K. lactis*. TINGLE et alii (1968) realizaram a análise genética de mutantes para a biosíntese de histidina nesta espécie, utilizando análise de tetrades foi possível identificar quatro loci, três dos quais estão ligados enquanto o quarto localiza-se em outro grupo de ligação. Os passos metabólicos da síntese de histidina parecem ser semelhantes aos de outros microrganismos.

O caráter mais estudado em *Kluyveromyces* é a fermentação de lactose e a síntese de beta-galactosidade. Esta enzima é induzível 125 vezes por lactose e 150 vezes por galactose (TINGLE e HALVERSON, 1972). O mecanismo molecular da indução da beta-galactosidade tem sido estudado usando o ge-

ne estrutural da beta-galactosidade de *K. lactis* clonado como prova para medir os níveis de mRNA da enzima antes e após a indução (DICKSON e MARKIN, 1978). Estes experimentos tem mostrado um aumento correspondente nos níveis de mRNA e enzima logo após a indução. Como não foram observadas diferenças na vida média do mRNA da beta-galactosidade antes e após indução, o aumento nos níveis de mRNA estão provavelmente associados a aumentos de transcrição.

Através de análise de complementação e mapeamento de mutantes *lac*⁻ foram definidos sete genes responsáveis pela degradação da lactose (SHEETZ e DICKSON, 1980). Destes o gene estrutural responsável pela síntese da beta-galactosidade foi identificado como sendo *Lac 4* (DICKSON et alii, 1979).

Vários estudos também tem sido desenvolvidos na genética extracromossômica de *K. lactis*, visando fundamentalmente a genética mitocondrial e o caráter killer.

Mutantes resistentes a antibióticos que interferem com funções mitocondriais têm permitido estudos da genética mitocondrial em *K. lactis* que a diferença de *S. cerevisiae* não apresenta mutantes deficientes respiratórios mitocondriais (BRUNNER et alii, 1973; CELIS et alii, 1975). O facto do DNA mitocondrial de *K. lactis* apresentar 11,4 μ m de comprimento (SANDERS et alii, 1974; O'CONNOR et alii, 1975), correspondendo assim à metade do de *S. cerevisiae* (HOLLENBERG et alii, 1970) tem incentivado os estudos na área.

Mutantes resistentes a cloranfenicol e oligomicina (BRUNNER et alii, 1977) e eritromicina (DEL GIUDICE e BRUNNER, 1977) codificados por genes citoplasmáticos tem permitido estudar geneticamente as mitocôndrias desta levedura, definindo polaridade, taxas de recombinação mitocondrial e interação núcleo-mitocondrial.

Linhagens "killer" tem sido identificadas em vários gêneros e espécies de leveduras (PHILLISKIRK e YOUNG, 1975; STUMM et alii, 1977; ROSINI, 1983) como: *S. cerevisiae*, *S. calbergensis*, *S. diastaticus*, *Hansenula anomala*, *H. minuta*, *Candida*, *Torulopsis*, *Debaryomyces* e *Kluyveromyces*.

O caráter "killer" tem sido extensivamente estudado em *S. cerevisiae* (WICKNER, 1976a) sendo este codificado por plasmídios de RNA circulares e de fita dupla. A expressão deste caráter é influenciada por genes nucleares (WICKNER e LEIBOWITZ, 1976; WICKNER, 1976b) e citoplasmáticos (WICKNER, 1977). Sendo seu efeito sobre as células sensíveis mediado pela produção de proteínas específicas que interferem com o metabolismo ao se ligarem à parede celular. A ocorrência do caráter "killer" em *Kluyveromyces* foi observada por PHILLISKIRK e YOUNG (1975) em três linhagens deste gênero dentre 20 analisadas.

GUNGE et alii (1981) isolaram dois plasmídios de DNA lineares chamados pGKL1 e pGKL2 com 5,4 e 8,4 x 10⁶ de peso molecular, respectivamente; responsáveis pelo caráter "killer" em *K. lactis*. Estas leveduras são capazes de matar li-

nhagens sensíveis e "killers" de *S. cerevisiae* e algumas linhagens de *S. italicus*, *K. lactis*, *K. thermotolerans* e *K. vandenii*. Um único gene nuclear foi identificado como responsável pela resistência à toxina de *K. lactis*.

A irradiação com luz ultravioleta leva à cura dos plasmídios "killer" pGKL1 e pGKL2 de *K. lactis*. Dentre as linhagens curadas, a maior parte apresentou perda de ambos os plasmídios, e somente uma exibiu perda do plasmídio pGKL1 e presença do outro. Um novo plasmídio obtido por deleção da região central de pGKL1, pGKL1S; apresentou resistência a killer, mas foi incapaz de produzir a toxina, permitindo concluir que o gene responsável pelo caráter "killer" encontra-se nesta região do plasmídio pGKL1. Este plasmídio parece ser responsável tanto pela resistência quanto pelo caráter em si, sendo indefinida a ação do plasmídio pGKL2.

Este caráter pode ser transferido para *S. cerevisiae* através de fusão de protoplastos (GUNGE e SAKUGUCHI, 1981) e por transformação (GUNGE et alii, 1982). Ambos os plasmídios são mantidos e expressos em *S. cerevisiae* p^0 (petite), porém, quando componentes citoplasmáticos são transferidos por citodução a partir de linhagem p^+ (ρ^+), os plasmídios lineares ficam instáveis e são frequentemente perdidos durante a mitose, dando lugar a clones não "killers". Este efeito está associado à incompatibilidade entre os plasmídios e a mitocondria, já que mutações mitocondriais do tipo ρ^0 , restauram a estabilidade dos plasmídios (GUNGE e YAMANE, 1984).

Além de escassos, os estudos no gênero *Kluyveromyces* limitam-se quase que exclusivamente a *K. lactis*, devido fundamentalmente a semelhança existente entre esta espécie e *S. cerevisiae* no que diz respeito ao ciclo celular e ao seu sistema reprodutivo, sendo ela heterotática, possibilitando a análise de tétrades, facilidade na obtenção de mutantes, fase haplóide e diplóide, e importância aplicada. Porém, outras espécies deste gênero tem mostrado potencialidades tanto para estudos teóricos, quanto aplicados, como é o caso de *K. fragilis* e *K. marxianus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LINHAGENS

As linhagens de leveduras utilizadas no presente trabalho são pertencentes a uma série de coleções e podem ser identificadas pelas siglas IZ (Instituto Zimotécnico da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"), FT (Fundação de Tecnologia Industrial), ATCC (American Type Culture Collection) e NRRL (Northern Utilization Research and Development U.S. Department of Agriculture), estas são mantidas na coleção do Laboratório de Genética de Leveduras do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

3.2. MEIOS DE CULTURA

Os seguintes meios foram utilizados neste trabalho na manutenção de culturas, crescimento, esporulação, seleção de híbridos e caracterização das linhagens.

3.2.1. Meio Completo (YEPD)

Extrato de Levedura	1%
Peptona	2%
Glicose	2%
Agar (opcional)	2%

Este meio foi utilizado para manutenção de culturas, para crescimento, para conjugação e isolamento de segregantes. O valor de pH não precisa ser ajustado, ficando este na faixa de 6,5 a 6,8.

3.2.2. Meio Sintético (SD)

Yeast Nitrogen Base (w/o aacs)	0,67%
Glicose	2%
Agar Difco (opcional)	2%

O valor de pH deste meio foi ajustado para 6,5 a 6,8 com NaOH 1N. Foi usado na seleção de mutantes, seleção de híbridos e identificação das características dos segregantes.

Para a caracterização dos mutantes e a análise da segregação de caracteres auxotróficos, este meio foi acrescido de aminoácidos e/ou nucleotídeos adequados e acada caso, nas seguintes concentrações:

	Conc. Final (mg/l)	Sol. . . Estoque (mg/10ml)
Adenina	20	40
Uracila	20	40
Triptofano	20	40
Histidina	20	40
Arginina	20	40
Metionina	20	40
Tirosina	30	60
Leucina	30	60
Iso-Leucina	30	60
Lisina	30	60
Fenilalanina	50	100
Ácido Glutâmico	100	200
Ácido Aspártico	100	200
Valina	150	300
Treonina	200	400
Serina	375	750

A solução estoque foi calculada prevendo a adição de 1 ml em 200 ml de meio ou 0,1 ml por placa contendo 20 ml de meio.

3.2.3. Meio de Inulina (I)

Yeast Nitrogen Base	0,67%
Caseina Hidrolizada	0,5%
Solução de Adenina e Uracila	0,5% (v/v)
Inulina	1%
Solução de Purpura de Bromocresol .	
Agar Difco	2%

O valor de pH foi ajustado para 7,0 tornando o meio com coloração violácea. Este meio foi usado para a identificação de linhagens capazes de assimilar inulina, análise de segregantes e híbridos quanto a esta característica e velocidade de degradação, pelo aparecimento de halo referente à produção de ácidos orgânicos por parte da levedura.

Este meio também foi usado com sacarose com o mesmo propósito.

3.2.4. Meio de "Killer" (K)

O meio YEPD foi acrescido de soluções tampões de diferentes pH após a autoclavagem por separado de ambas, e de 4 mg/100 ml de azul de metileno.

pH 4,5: 20% de solução tampão fosfato-citrato pH 4,5

Ác. cítrico	14,07%
K ₂ HPO ₄	18,96%

pH 6,0: 20% de solução tampão fosfato-citrato pH 6,0; de composição igual à anterior com o pH ajustado com K_2HPO_4 .

Estes meios foram utilizados para a avaliação deste caráter em linhagens, híbridos e segregantes.

3.2.5. Meio de Esporulação (RA)

Sol. A) Rafinose 2,2%

Sol. B) Acetato de Potássio 20%

1 ml de solução A e 1 ml de solução B foram misturados e o volume ajustado para 200 ml com água destilada. A este foram acrescentados 4 g de agar.

3.2.6. Meio Seletivo de Regeneração (SDreg)

Este meio utilizado na seleção de híbridos obtidos por fusão de protoplastos, é o meio SD acrescido de 1M de Sorbitol (18,2%) que permite a estabilidade osmótica dos protoplastos de leveduras. O valor de pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N.

3.2.7. Meio Completo de Regeneração (YEPDreg)

Como meio completo de regeneração foi utilizado o meio completo (YEPD) com 1M de Sorbitol. Este meio foi

utilizado na determinação do número de clones totais em experimentos de fusão de protoplastos.

3.2.8. Meio de Multiplicação (YEPD)

O meio completo (YEPD) sem agar foi utilizado, também, na multiplicação de leveduras para ensaios de fermentação.

3.2.9. Meio de Multiplicação com Melaço de Cana

Na multiplicação de leveduras para a produção de inóculos dos testes de fermentação, foi utilizado melaço de cana a 2% de ART com 10 ml de solução de sais por litro. O valor de pH deste meio foi ajustado para 6,8 com NaOH 1 N quando necessário.

3.2.10. Meios de Caracterização

Yeast Nitrogen Base 0,67%

Caseína hidrolizada 0,5%

Açúcar 2%

O valor do pH foi ajustado para 6,0 com NaOH

1N. Este meio foi utilizado na caracterização da fermentação e assimilação de diferentes açúcares por parte de híbridos e produtos de fusão. Os açúcares utilizados foram inulina, xilose, celobiose, lactose, maltose, melezitose e arabinose.

3.2.11. Meio com ciclohexamida

Para testes de resistência a ciclohexamida foi usado o meio completo (YEPD) acrescido de 0,4 mg/l de ciclohexamida.

3.2.12. Meio de Produção de Inulinase

Yeast Nitrogen Base	1%
Caseína Hidrolizada	0,5%
Extrato de levedura	0,1%
Inulina	1%

Com a adição de NaOH 1N, o valor de pH foi ajustado para 6,0.

3.2.13. Meio de fermentação com Inulina

Yeast Nitrogen Base	1,34%
Caseína Hidrolizada	1%
Inulina	6%

Após a autoclavagem do meio com pH neutro, este foi ajustado para 4,0 com o auxílio de ácido sulfúrico.

3.2.14. Meios de fermentação com extratos de *H. tuberosus*

Dois métodos de extração foram utilizados no

preparo de mostos de fermentação a partir de farinha de tubérculos de *H. tuberosus*.

Método A) No primeiro ensaio de fermentação (Tabela 3) foi utilizado um extrato obtido com 325 g de farinha de tubérculos de *T. tuberosus* extraídos com 300 ml de água. A mistura foi filtrada e prensada, acrescentados 1% de solução de sais e utilizada sem autoclavagem a pH 3,7. Este método de extração mostrou-se pouco eficiente passando-se a adotar a continuação, o método B.

Método B) Os extratos foram preparados de acordo com o seguinte protocolo:

975 g de farinha + 2500 ml de água a 80°C

↓

Tratamento da mistura 10 min. a 80°C

↓

Prensagem

↓

Filtragem em algodão

↓

Centrifugação a 4000 g - 10 min.

↓

Autoclavagem a 0,5 atm - 30 min.
a pH neutro

↓

Ajuste do valor de pH para 4,0

3.2.15. Outros meios de fermentação

Extrato de levedura 1%

Peptona 1%

Açúcar 3% ou 15%

O valor de pH do meio foi ajustado para 4,0 com ácido sulfúrico. Os açúcares utilizados foram glicose(15%) e lactose (3%).

3.3. SOLUÇÕES E TAMPÕES

3.3.1. Solução salina

Solução de cloreto de sódio 0,89% em água destilada, sendo a seguir distribuída em frascos com 9 ml e autoclavados.

3.3.2. Solução de Sais para Fermentação

Sulfato de Amônio 5%

Fosfato monobásico de Potássio 2%

Sulfato de Magnésio 1%

Sulfato de Zinco 0,1%

Sulfato de Manganês 0,1%

Estes compostos são dissolvidos em água e a solução esterilizada por autoclavagem.

3.3.3. Solução de Inulina

Solução contendo 1% de inulina dissolvida em tampão fosfato pH 4,5, foi utilizada na determinação de atividade enzimática dos extratos de enzima (meio de cultura após crescimento da levedura). Soluções contendo sacarose (1%) ou rafinose (1%) foram usadas em alguns casos como substrato para determinação de atividade.

3.3.4. Reativo de Somogyi

28g de Na_2HPO_4 , 40 g de tartarato duplo de sódio e potássio ($\text{KNa.C}_4\text{O}_6.4\text{H}_2\text{O}$) e foram dissolvidos em 700 ml de água destilada. Adicionaram-se 100 ml de NaOH 1N. Em seguida gotejaram-se 80 ml de sulfato de cobre a 10% sob agitação constante. Acrescentaram-se 180 g de Na_2SO_4 e completou-se o volume para litro. Foi deixado em repouso e posteriormente filtrado e conservado em recipiente escuro à temperatura ambiente.

3.3.5. Reativo de Nelson

25 g de molibdato de amônio foram dissolvidos em 450 ml de água destilada. Cuidadosamente foram adicionados 26 ml de ácido sulfúrico gota a gota com agitação constante. Foram acrescentados 3 g de arseniato de sódio dissolvi-

dos em 25 ml de água. O reativo é mantido a 35°C no escuro por 48 hs e só posteriormente utilizado.

3.3.6. Solução Padrão de Glicose

Foi feita uma solução estoque contendo 0,1% de glicose em água destilada, e esta diluída 1/20 na hora de ser utilizada como padrão para testes de açúcares redutores. Para auxiliar na conservação da solução estoque foi adicionado ácido benzóico.

3.3.7. Tampão Fosfato pH 4,5

Uma solução de fosfato monobásico de potássio 0,05 M foi ajustada para pH 4,5 com NaOH 1N e/ou 0,1 N.

3.3.8. Solução de Cloreto de Cálcio 1,2M

CaCl ₂	6,65g
Água destilada até	50 ml

3.3.9. Solução de Sorbitol (SS)

Sorbitol	18,2 g
Água destilada até	100 ml

3.3.10. Solução Tampão Sorbitol-Fosfato (TSF)

Sol. A) 0,2M Na ₂ HPO ₄	217,5 ml
Sol. B 0,2M NaH ₂ PO ₄	32,5 ml
Sorbitol	91 g
Água destilada até	500 ml

Sol. A) 0,2M NaHPO_4

28,39g de NaHPO_4 em 1 litro de água.

Sol. B) 0,2M NaH_2PO_4

5,52g de NaH_2PO_4 em 200 ml de água.

3.3.11. Solução de EDTA 10mM

EDTA- Na_2 - Etileno tiamina tetraacetato de sódio

EDTA- Na_2 3,7225 g

Água destilada 1000 ml

3.3.12. Solução Fusogênica (PEG)

Polietileno Glicol 4000 ou 6000 8g

CaCl_2 11mg

Água destilada até 10ml

3.3.13. Solvente para cromatografia

n-Propanol 70 ml

Acetato de etila 10 ml

Água destilada 20 ml

3.3.14. Corante para revelação de açúcares

Sol. A) Difeninalina 2%

Sol. B) Anilina bidestilada 2% em etanol

Sol. C) Ácido fosfórico 85% (v/v)

No momento da coloração, estas soluções são misturadas na proporção 5:5:1.

3.3.15. Solução Lítica

A solução de enzima utilizada para a liberação dos ascósporos foi feita dissolvendo 1% de suco digestivo de *Megalobolínus paranaguensis* (liofilizado) em água estéril, e filtrando esta solução através de filtro Millipore (0,45 μ m). (Enzima cedida pelo Dr. G.D. Fontana, Univ. Fed. Paraná).

Em alguns casos também foi utilizada com o mesmo sucesso, uma solução de 0,5 mg/ml de Zimoliase 5000 (Kirim Brewing Co.).

3.4. ESTERILIZAÇÃO E INCUBAÇÃO

Os meios sólidos foram esterilizados por autoclavagem por 15 min. a 1 atm de pressão e os meios líquidos, meios de fermentação e tampões foram esterilizados em autoclave a meia atm por 35 min.

As soluções de vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos e antibióticos foram pasteurizados em banho maria por 25 min e mantidas em refrigerador.

A temperatura de incubação foi de 30°C para o crescimento em placas e multiplicação; 35°C para as fermentações com exceção dos testes de temperatura efetuados na faixa de 30 a 40°C em BOD (Fanem).

3.5. MULTIPLICAÇÃO DE LEVEDURAS

Independente do volume de células necessário as linhagens foram inicialmente crescidas em 10 ml de YEPD líquido a 30°C por 24 horas. Estes tubos foram usados para inocular Erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml de YEPD, os quais foram incubados com agitação rotatória a 30°C por 72 horas, com adições periódicas de meio 10 vezes concentrado.

Quando a quantidade de células necessária aos experimentos foi maior, os tubos de 10 ml foram usados para inocular erlenmeyers de 2000 ml contendo 1000 ml de melaço de cana 2%. Estes foram colocados em banho a 30°C com aeração constante durante 72 horas com adições periódicas de meio 20 vezes concentrado.

As células assim obtidas foram recuperadas por centrifugação a 4000 g em garrafas de centrífuga de 250 ml ou tubos de 100 ml.

3.6. TESTES DE FERMENTAÇÃO

3.6.1. Avaliação da capacidade fermentativa

Em ensaios de escala reduzida, foram feitas fermentações em volumes de 5 ml com inóculos de 10% de células centrifugadas (peso fresco). Os tubos de centrífuga, as-

sim inoculados, e contendo o meio de fermentação foram incubados a 35°C em estufa B.O.D. sem agitação. Este método foi utilizado nos ensaios de avaliação de linhagens e híbridos quanto à capacidade fermentativa de inulina, extratos de tubérculos de *H. tuberosus*, fermentação de lactose e de glicose.

Para a determinação da variabilidade existente entre linhagens fermentadoras de inulina, foram usados volumes maiores (40 ml) também com inóculos de 10%, sendo a incubação também a 35°C em estufa sem agitação. Os tempos de fermentação variaram de acordo com o experimento, e estes serão especificados para cada caso individualmente.

Os mostos fermentados foram analisados quanto ao conteúdo de etanol através de cromatografia gasosa ou densimetria, de acordo com os volumes disponíveis.

3.6.2. Cinética da Fermentação

Os ensaios cinéticos foram desenvolvidos de duas formas: (a) em tubos de centrífuga de 100 ml contendo 50 ml de meio de fermentação e inóculo de 10%, retirando-se amostras de 2 ml em intervalos de tempo de 0, 10, 24, 34, 48, 58 e 72 horas e analisando cromatograficamente o etanol produzido; (b) Em erlenmeyers de 500 ml contendo 250 ml de meio de fermentação e inóculos de 10%, a 35°C com agitação rotatória, retirando-se amostras de 5 a 10 ml em intervalos que serão

especificados em cada caso, e o conteúdo de etanol analisado através de cromatografia gasosa.

3.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE INULINASE EXTRACELULAR

As linhagens foram crescidas em 10 ml de YEPD por 24 horas, e um mililitro desta cultura transferido para 100 ml de meio contendo 1% de inulina. Estes erlenmeyers foram incubados a 30°C com agitação por 48 ou 72 horas. O meio de cultura foi recuperado por centrifugação, e livre de células foi usado para a determinação da atividade de inulinase extracelular produzida pelas diversas linhagens utilizadas.

3.8. AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO TÉRMICA

Amostras de extratos brutos da enzima (meio de cultura centrifugado) foram tratadas a 40, 50, 60 e 70°C por 10 min em banho, e a sua atividade avaliada após este tratamento comparando-se proporcionalmente os resultados obtidos com aqueles exibidos a 40°C, temperatura na qual esta enzima é estável.

3.9. TESTES DE INDUÇÃO E REPRESSÃO

Leveduras obtidas por crescimento em meio sin-

tético com glicose como fonte de carbono e enriquecido se necessário, foram usadas para inocular 10 ml de soluções de inulina, sacarose, glicose, celobiose, etanol e inulina com glicose em tampão fosfato pH 4,0 sem outros nutrientes, além de um branco contendo somente o tampão.

Estas soluções inoculadas com 10^9 cels/ml foram incubadas com agitação por 24 horas, e após este período, a atividade enzimática liberada no meio foi quantificada de acordo com o método a seguir.

3.10. ATIVIDADE DE INULINASE

Em um tubo de ensaio são colocados 1 ml de enzima (meio de cultura após crescimento ou outro) e 5 ml de solução de inulina 1% em tampão pH 4,5. Esta mistura é incubada a 40°C por 10 a 30 min de acordo com a atividade da levedura testada. 1 ml desta solução é então transferido para outro tubo contendo 1 ml de reativo de Somogyi, e este é colocado em banho maria fervente por 15 min. A amostra é então resfriada com água corrente, adicionam-se 1 ml de reativo de Nelson e 7 ml de água destilada. Após um período de repouso de 15 min a densidade óptica das amostras é lida em espectrofotômetro ou colorímetro a 540-580 μ m.

O branco é feito da mesma forma, porem, com amostras enzimáticas inativadas por fervura previamente a in-

cubação com inulina a 40°C. Como a concentração de açúcares redutores no extrato enzimático não é conhecida, é fundamental utilizar brancos para cada amostra, além de um branco geral no qual usa-se água e reagentes (sem inulina).

Um padrão de glicose (3.3.6) é utilizado para determinar a quantidade de açúcares redutores liberados pela enzima, desta forma a atividade enzimática é expressa em unidades por mililitro, as quais correspondem a quantidade de açúcares redutores liberados por 1 ml de solução enzimática por minuto nas condições anteriormente descritas.

De acordo com a atividade do extrato, este requer diluição para poder determinar os açúcares com boa precisão.

3.11. CROMATOGRAFIA DE AÇÚCARES

Inicialmente colocou-se o solvente na placa e na areia mantendo-se a câmara fechada por 24 horas até saturar. As amostras foram dispostas a 4 cm da base do papel Whatman nº 3 e a aproximadamente 1 cm uma das outras, sem permitir o alastramento das mesmas (aproximadamente 15 µl). Secou-se o papel em estufa a 35 ou 37°C e o papel com as amostras foi colocado dentro da câmara sem entrar em contato com o solvente, e mantido por 24 horas. Em seguida, o papel colocado em contato com o solvente permaneceu por 18 horas.

O papel foi seco e corado com a solução corante de difenilamina e anilina, e revelado a 37°C no escuro por 10 a 15 horas.

3.12. ANÁLISE DE ETANOL

3.12.1. Determinação do teor alcoólico no Vinho por Cromatografia gasosa

Foi feita diluição 1:100 do vinho e analisado o teor alcoólico em cromatógrafo de gás GC. Modelo 37-D com sistema de ionização de chama e coluna PAC-2694. O cálculo do teor alcoólico foi realizado automaticamente através do emprego de um integrador GC-100 previamente programado com padrões de etanol 10,5 e 2%.

3.12.2. Determinação do Teor alcólico de Destilados por Densimetria

a) Destilação do Vinho: Foi feita destilação fracionada com arraste por vapor, de 25 ml de vinho em destilador Kjeldahl adaptato, e foram coletados 50 ml de amostra. Este destilado contém, portanto, a quantidade de etanol da amostra diluída 1:1 com água, o que deve ser tido em conta no cálculo da concentração de etanol.

b) Análise do Destilado: O teor alcoólico do destilado foi determinado em densímetro AP PAAR DMA 46. Os valores de densidade foram transformados para concentração de etanol através da tabela adequada à conversão a 20°C, de densidade em teor alcoólico.

3.13. DETERMINAÇÃO DE ÁLCOOIS SUPERIORES E COMPOSTOS LEVES

O conteúdo de outros componentes do destilado foi determinado através de cromatografia gasosa em cromatôgrafo GC Modelo 37-D com sistema de ionização de chama, a coluna utilizada foi PAC 2626 com 2,8m de comprimento e 3mm de diâmetro interno.

O cálculo da concentração dos componentes foi feito por Integrador Processador Modelo CG-100. Através deste método foram determinadas as concentrações de acetaldeído, acetona, acetato de etila, n-propanol, iso-butanol e álcool iso-amílico.

3.14. DETERMINAÇÃO DO AÇÚCAR REDUTOR TOTAL DO MOSTO (ART)

Foram pipetados 5 ml do mosto e transferidos para balão volumétrico de 250 ml e o volume completado com água destilada. Após agitação adicionaram-se 0,2 g de oxalato de sódio e a mistura foi agitada novamente. A esta acrescentaram-se 0,5 a 1,0 g de Celite. Após agitação por 3 minutos a mistura foi filtrada em papel de filtro desprezando-se os primeiros 20-25 ml.

Foram transferidos 5 ml do filtrado para balão volumétrico de 200 ml, e adicionados 10 ml de HCl 0,75N gota a gota com agitação constante. Foi então colocado em banho-

maria a 80°C por 60 minutos. A mistura foi esfriada até a temperatura ambiente e adicionados 10 ml de NaOH 0,75 N. O volume foi completado com água destilada.

Tubos de ensaio foram numerados de 1 a 6 e em cada tubo foram adicionados:

Tubos 1 e 2: 1 ml de água destilada

Tubos 3 e 4: 1 ml de ádrão de glicose

Tubos 5 e 6: 1 ml de solução obtida pelo processo anterior.

A cada tubo foi adicionado 1 ml de Reativo de Somogyi e estes aquecidos durante 15 min em água fervente. Após esfriamento adicionaram-se a cada tubo 1 ml de reativo de Nelson e 7 ml de água destilada. Os tubos foram agitados e mantidos a temperatura ambiente antes de ser feita a leitura em colorímetro com filtro verde (535 nm).

O cálculo do ART% foi feito da seguinte forma:

$$\text{ART\%} = 10. \frac{(\text{Absorb. da amostra} - \text{Absorb. do Branco})}{(\text{Absorb. do Padrão} - \text{Absorb. do Branco})}$$

O valor assim obtido e dado em gramas de açú-car redutor em 100 ml de mosto.

3.15. AVALIAÇÃO DO CARÁTER "KILLER"

A levedura sensível AH22 (*S. cerevisiae*) foi espalhada sobre a placa contendo meio específico para avaliação

deste caráter, através da utilização de alça de Drigalski. Nesta placa foram feitas estrias das linhagens a serem testadas quanto ao caráter, preferencialmente contendo alta concentração de células, e após 48 horas de incubação a 30°C, observou-se a formação de halos de inibição do crescimento da linhagem sensível ao redor das linhagens "killer".

3.16. INDUÇÃO, ENRIQUECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS EM *Kluyveromyces*

A mutação foi induzida com luz ultravioleta, ou mais comumente com ácido nitroso. No primeiro caso, a suspensão de células foi submetida a irradiação com luz ultravioleta (2357 Å).

Para mutações com ácido nitroso, foram preparadas suspensões contendo 2 a 5×10^7 células por mililitro e estas lavadas duas vezes com água destilada, e ressuspensas com 9,67 ml de tampão acetato pH 4,4. A esta suspensão foram adicionados 0,33 ml de solução 0,5 M de nitrito de sódio, e incubada a 30°C retirando-se amostras com 10, 12 e 16 min. Estas amostras de 1 ml foram imediatamente transferidas para tubos contendo tampão fosfato pH 7,0, cessando-se desta forma a reação.

Independentemente do sistema de indução utilizado, os mutantes auxotróficos foram enriquecidos através da ação seletiva da nistatina (SNOW, 1966).

As colônias mutantes assim obtidas na forma de colônias capazes de crescer em meio completo, porém incapazes de se desenvolver em meio SD, foram então testadas quanto às deficiências nutricionais por elas apresentadas, analisando-se o seu crescimento em placas contendo diferentes combinações de aminoácidos e nucleotídeos:

Placa	1	2	3	4	5
6	Adenina	Guanina	Cisteína	Metionina	Uracila
7	Histidina	Leucina	Isoleucina	Valina	Lisina
8	Fenilalanina	Tirosina	Triptofano	Treonina	Prolina
9	Ác.Glutam.	Serina	Alanina	Ác.Aspar.	Arginina

3.17. HIBRIDIZAÇÃO EM *Kluyveromyces*

As linhagens auxotróficas a serem cruzadas foram misturadas sobre meio completo de forma a obter uma distribuição uniforme. Esta mistura foi incubada a 30°C por 24 horas e replicada novamente para meio completo. Após 24 horas de incubação a 30°C, uma pequena alçada desta mistura foi estriada em meio sintético de forma a obter colônias híbridas isoladas. Os híbridos nos quais ocorre complementação das marcas auxotróficas que são os únicos a crescer neste meio, foram isolados para estudos posteriores.

3.18. SEGREGAÇÃO E ANÁLISE DE SEGREGANTES DE *Kluyveromyces*

As linhagens híbridas foram crescidas por 24 horas em meio completo e então transferidas para meio de esporulação (RA). Neste meio observa-se a formação de esporos após 48 horas de incubação a 30°C. Os ascos contendo esporos reniformes de um modo geral encontram-se abertos ou são muito sensíveis a enzima lítica.

Foi feita uma suspensão de esporos em tampão e tratados com enzima lítica por 5 a 10 min., agitando o tubo vigorosamente após este período para liberar os esporos. A suspensão foi então tratada a 60°C por 10 min para eliminar as células vegetativas e plaqueada com as diluições correspondentes em placas de meio completo. Após 5 a 6 dias as colônias foram transferidas individualmente para placas de YEPD e incubadas a 30°C por 48 horas.

A análise das características dos segregantes foi feita através de réplica destes para os meios seletivos correspondentes.

3.19. ELETROFORESE DE PLASMÍDIOS

O isolamento de plasmídios foi realizado de acordo com GUNGE et alii (1981) e a identificação dos mesmos através de eletroforese horizontal em gel de agarose (1%) com a utilização de tampão TEB.

3.20. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas utilizadas no trabalho seguiram os esquemas propostos por PIMENTEL GOMES (1963) e MATHER e JINKS (1972) para blocos casualizados e parcelas subdivididas. As comparações de médias foram feitas pelo teste de Tukey.

3.21. FUSÃO DE PROTOPLASTOS

A esferoplastização e posterior fusão de protoplastos foi feita seguindo o seguinte protocolo (MARAZ E FERENCZY, 1979; modificado).

As linhagens foram cultivadas em 100 ml de YEPD líquido até o fim da fase exponencial de crescimento ($1-5 \times 10^7$ céls/ml ou 0,4 a 0,8 de D.O. a 610 nm).

As células foram coletadas por centrifugação a 3500 xg e lavadas duas vezes em EDTA 10mM. A densidade de células foi ajustada para 1×10^8 /ml (4 a 5 ml).

Obs.: 0,1 ml desta suspensão foi plaqueada em meio seletivo e 0,1 ml de uma diluição 10^{-5} foi plaqueada em YEPD, ambos tratamentos com 3 repetições; a fim de determinar a frequência de reversão ou o aparecimento de crescimento residual.

A suspensão de células foi adicionado 2-mercap

toetanol até 1% e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram então coletadas por centrifugação a 1000 xg (5 min), lavadas duas vezes com o tampão estabilizador (TSF) e finalmente resuspendidas em 3 ml do tampão. A esta suspensão foi adicionado 1 ml de solução de Zimoliase 5000 (2 mg/ml) para a obtenção de uma concentração final de 0,5 mg de enzima/ml.

A suspensão foi incubada a 37°C e observada microscopicamente em tempos periódicos de 30 min até obter 95 a 100% de esferoplastização.

Os esferoplastos foram recuperados por centrifugação a 1000 rpm e lavados 3 vezes em tampão TSF e finalmente resuspendidos em 1 ml de solução de sorbitol (SS) com 0,25 ml de solução de CaCl_2 1,2M. Quantidades iguais de protoplastos das linhagens foram misturadas e centrifugadas a 1000 xg por 10 min. O sobrenadante foi removido e os protoplastos resuspendidos no resto do tampão. A esta mistura foi adicionado 1 ml de solução fusogênica (PEG) e incubada após leve agitação a 30°C por 30 minutos.

Após este tempo, foram adicionados 3 ml de SS e as células foram lavadas 3 vezes com o tampão SS com 10 mM de CaCl_2 . A suspensão foi então diluída convenientemente e plaqueada em meio seletivo de regeneração colocando por cima das células uma pequena camada do mesmo meio. Para estimar a frequência de fusão também foram plaqueadas 3 repetições em YEPD de regeneração em diluição 10^{-5} . As placas foram incubadas por 5 a 10 dias a 30°C.

4. RESULTADOS

Os resultados apresentados correspondem a seleção de linhagens, estudo das enzimas envolvidas na degradação da inulina e análise genética e melhoramento em leveduras do gênero *Kluyveromyces* visando a bioconversão de extratos de tubérculos de *H. tuberosus*.

4.1. SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE EXTRATOS DE *H. tuberosus*

Com o objetivo de selecionar leveduras mais adequadas à fermentação alcoólica de *H. tuberosus*, os trabalhos foram iniciados com a avaliação do crescimento em inulina de linhagens de leveduras pertencentes a vários gêneros e espécies. Dentre 75 linhagens pertencentes a 21 espécies de leveduras, somente 17 apresentaram bom crescimento em inulina. (Ta

bela 1), estando estas enquadradas em 11 espécies, quais sejam: *Candida tropicalis*, *C. utilis*, *C. pseudotropicalis*, *S. cerevisiae*, *S. fermentati*, *Schwanniomyces alluvius*, *S. castellii*, *Pichia polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *K. marxianus* e *Torulopsis colliculosa*.

As linhagens selecionadas foram testadas quanto a fermentação de inulina (Tabela 2), verificando-se que das 17 linhagens testadas pertencentes a 6 espécies, somente as linhagens de *K. marxianus*, *K. fragilis* e uma linhagem de *T. colliculosa* apresentaram rendimentos acima de 50%, sendo os maiores rendimentos obtidos com as linhagens IZ 1339 (76,5%) e IZ 619 (72,64%), ambas *K. marxianus*.

As linhagens selecionadas foram avaliadas quanto a fermentação de extratos brutos de tubérculos de *H. tuberosus*, confirmando-se as linhagens de *K. marxianus*, *K. fragilis* e *C. pseudotropicalis* como aquelas que apresentam os maiores rendimentos fermentativos e teores alcoólicos superiores a 5%GL, correspondentes a rendimentos acima de 53% (Tabela 3 e Figura 1). Os rendimentos máximos observados foram da ordem de 69,89% e 69,34%, com 6,595 e 6,543%GL respectivamente, para as linhagens IZ 610 (*K. fragilis*) e IZ 1339 (*K. marxianus*).

As espécies selecionadas pelos testes de crescimento e fermentação: *K. marxianus*, *K. fragilis*, *C. pseudotropicalis* e *T. colliculosa*; foram ensaiadas conjuntamente em teste de fermentação de extratos de *H. tuberosus*. Neste tes-

Tabela 1. Caracterização de espécies de leveduras quanto ao crescimento em inulina.

Espécie	Nº linhagens testadas	Nº linhagens com bom crescimento
<i>Candida tropicalis</i>	01	01
<i>Candida utilis</i>	03	02
<i>Candida pseudotropicalis</i>	03	01
<i>Saccharomyces acidifaciens</i>	02	00
<i>Saccharomyces bailli</i>	01	00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37	03
<i>Saccharomyces chevalieri</i>	01	00
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	03	00
<i>Saccharomyces italicus</i>	01	00
<i>Saccharomyces rouxii</i>	01	00
<i>Saccharomyces sake</i>	01	00
<i>Saccharomyces uvarum</i>	06	00
<i>Saccharomyces oviiformis</i>	01	00
<i>Saccharomyces fermentati</i>	03	01
<i>Schwanniomyces alluvius</i>	01	01
<i>Schwanniomyces castelli</i>	01	01
<i>Pichia polymorpha</i>	01	01
<i>Pichia stipitis</i>	01	00
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	01	01
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	03	03
<i>Torulopsis colliculosa</i>	03	02
6 gêneros - 21 espécies	75 linhagens	17

Tabela 2. Avaliação da capacidade de fermentação de inulina (6%) por leveduras. Valores de etanol (°GL) de 3 fermentações consecutivas de 24 horas a 35°C.

Linhagens	I	II	III	$\bar{x}$	Rend.
IZ 211 S.C	1.510	1.111	0.983	$1.201 \pm 0,224$	30,93
IZ 200 C.u	1.542	1.635	1.226	$1.463 \pm 0,175$	37,31
E202-36	1.302	1.009	1.210	$1.174 \pm 0,122$	30,24
IZ 310 S.c	1.647	1.576	1.901	$1.708 \pm 0,139$	41,00
IZ 318 S.c	1.885	1.801	2.000	$1.895 \pm 0,081$	48,21
IZ 610 K.f	2.828	2.653	2.594	$2.692 \pm 0,099$	69,34
IZ 619 K.m	2.686	2.892	2.881	$2.820 \pm 0,095$	72,64
IZ 863 S.c	0.917	1.107	0.965	$0,996 \pm 0,081$	25,65
IZ 1339 K.m	2.845	2.973	3.092	$2.970 \pm 0,101$	76,91
IZ 1821 K.m	2.739	2.551	2.536	$2.609 \pm 0,092$	67,21
IZ 1970 T.c	1.521	2.148	1.988	$1.885 \pm 0,266$	48,58
IZ 1967 T.c	2.011	2.366	1.761	$2,046 \pm 0,248$	52,70
IZ 1996 T.c	1.407	1.672	1.679	$1.586 \pm 0,127$	40,85
24858 S.c	1.606	1.547	1.811	$1.655 \pm 0,113$	42,63
26603 S.c	1.239	1.145	1.103	$1.162 \pm 0,057$	29,93
Ca - 1 C.u	1.369	1.300	1.021	$1.230 \pm 0,150$	31,68
Ct - 4 C.t	1.409	1.363	1.207	$1.326 \pm 0,086$	34,16

Tabela 3. Avaliação da produção de etanol a partir de extrato bruto de *H. tuberosus*, das linhagens selecionadas. Valores de etanol (°GL) de 3 fermentações consecutivas de 48 horas a 35°C e pH 4,0 com ART inicial de 14,58%.

Linhagens	Espécie	I	II	III	$\bar{x}$	Rend. %
IZ 209	<i>P. polimorpha</i>	0.298	2.157	0.986	1.147±0,77	12,15
IZ 1827	<i>S. fermentati</i>	2.528	3.180	1.804	2.507±0,56	26,57
IZ 247	<i>S. fermentati</i>	0.385	2.437	1.096	1.306±0,85	13,84
IZ 285	<i>S. fermentati</i>	0.290	2.151	0.865	1.102±0,78	11,68
IZ 431	<i>C. pseudotropicalis</i>	5.750	6.622	5.948	6.107±0,37	64,72
IZ 809	<i>C. pseudotropicalis</i>	0.068	0.198	0.276	0.181±0,09	1,92
54-103	<i>Schw. alluvius</i>	0.310	2.851	1.107	1.423±1,06	15,08
58-7	<i>Schw. castelli</i>	0.719	2.525	1.151	1.465±0,77	15,52
IZ 610	<i>K. fragilis</i>	6.298	7.236	6.252	6.595±0,45	69,89
IZ 275	<i>K. fragilis</i>	5.995	6.912	6.128	6.345±0,40	67,24
IZ 429	<i>K. fragilis</i>	5.413	5.435	4.498	5.115±0,44	54,21
IZ 1339	<i>K. marxianus</i>	6.144	6.563	6.913	6.543±0,31	69,34
IZ 619	<i>K. marxianus</i>	6.021	6.312	6.357	6.230±0,15	66,02
IZ 1821	<i>K. marxianus</i>	5.493	5.149	6.841	5.828±0,73	61,76
IZ 148	<i>K. marxianus</i>	5,658	5.542	5.360	5.520±0,12	58,50
IZ 1970	<i>T. colliculosa</i>	3.818	4.064	3.798	3.893±0,12	41,26
IZ 1967	<i>T. colliculosa</i>	0.312	3.279	3.060	2.217±1,35	23,50
IZ 1966	<i>T. colliculosa</i>	1.633	4.376	3.766	3.258±1,18	34,53
IZ 300	<i>C. utilis</i>	1.687	4.201	2.995	2.961±1,03	31,38
IZ 318	<i>S. cerevisiae</i>	2.962	5.484	4.693	4.380±1,05	46,42
ATCC 24858	<i>S. cerevisiae</i>	4.662	5.067	5.018	4.917±0,22	52,11
M300A	<i>S. cerevisiae</i>	2.926	3.886	3.336	3.383±0,39	35,85
Fleischmann	<i>S. cerevisiae</i>	3.412	3.862	4.168	3.814±0,31	40,42

Figura 1. Avaliação de leveduras para fermentação alcoólica de extrato de *H. tuberosus* (ver Tabela 4.3).

te (Tabela 4) os teores alcoólicos chegaram até 8,81%GL e o rendimento máximo médio de três fermentações consecutivas foi da ordem de 84,9%, com teores médios de etanol de 7,42 a 8,57 (% v/v). A variabilidade entre linhagens fermentadoras de inulina mostrou-se significativa a nível de 1% (Tabela 5).

As melhores linhagens de *K. marxianus* (IZ 1339) e de *K. fragilis* (IZ 610) foram ensaiadas para a avaliação do seu perfil cinético comparado com a levedura industrial Fleischmann, tomando-se como substrato o extrato de *H. tuberosus* sem agitação durante a fermentação.

Nestas condições as linhagens IZ 1339 e IZ 610 foram superiores à linhagem testemunha (Tabela 6 e Figura 2); IZ 1339 apresentou uma fase logarítmica de produção de etanol nas primeiras 10 horas de fermentação, chegando neste período ao rendimento de 74,38%, com uma produtividade global de $5,96 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e produtividade específica de $1,79 \text{ .gg}^{-1}.\text{h}^{-1}$. O máximo de produção foi atingido por esta linhagem com 48 horas de fermentação, com 8,472%GL de etanol, 89,93% de rendimento, porém, com uma redução da produtividade global para $1,12 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e da produtividade específica para $0,34 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, o que mostra que após 10 horas esta levedura entra em fase estacionária de produção. No caso de IZ 610, a fase exponencial de produção durou 24 horas atingindo neste período 7,143%GL, correspondentes a um rendimento de 70,76%, com produtividade global de $2,26 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e produtividade específica de $0,68 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Esta linhagem atingiu a produção máxima com 58 horas

Tabela 4. Avaliação da capacidade fermentativa de extrato bruto de *H. tuberculosis*, das linhagens selecionadas. Valores de etanol (% v/v) de 3 repetições consecutivas de 48 horas a 35°C e pH 4,0, com ART inicial de 15,60%.

Linhagens	I	II	III	$\bar{x}$	Rend.
Fleischmann	6,23	6,47	6,81	6,50±0,24	64,40
ATCC 24858	7,19	7,37	7,51	7,36±0,13	72,90
IZ 610	7,49	8,09	8,09	7,89±0,28	78,20
IZ 275	6,90	7,51	7,94	7,45±0,43	73,80
IZ 429	7,65	7,98	8,28	7,97±0,26	79,00
IZ 1399	8,04	8,67	8,76	8,49±0,32	84,10
IZ 619	8,23	8,61	8,53	8,46±0,16	83,80
IZ 1821	8,14	8,77	8,81	8,57±0,31	84,90
IZ 148	7,23	7,89	8,28	7,80±0,43	77,30
IZ 431	8,23	8,67	8,77	8,56±0,23	84,80
IZ 1970	7,85	7,70	7,19	7,58±0,28	75,10
IZ 1966	7,33	7,37	7,56	7,42±0,10	73,50

Tabela 5. Análise de variância dos dados da Tabela 4. Experimento inteiramente casualizado.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	11	12,8744	1,1704	21,00 ⁺⁺
Fermentações	2	1,6487	0,82453	14,79
Resíduo	22	1,2261	0,05573	
Total	35	15,7492		

Tabela 6. Perfil cinético da fermentação de extratos de *H. tuberosus* por *K. marxianus* (IZ 1339); *K. fragilis* (IZ 610) e *S. cerevisiae* (Fleischmann). Valores de etanol (°GL) de fermentação sem agitação a 25°C com 10% de inóculo e 15,59% de ART inicial.

Tempo (hs)	<i>K. marxianus</i>		<i>K. fragilis</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
	ETOH	Rend.	ETOH	Rend.	ETOH	Rend.
0	-	-	-	-	-	-
10	7.508	74,38	4.805	47,60	5.013	49,66
24	7.728	76,56	7.143	79,76	6.420	63,60
34	8.315	82,37	7.588	75,15	6.669	66,06
48	8.472	83,93	7.783	77,10	6.454	63,93
58	8.046	79,71	7.814	77,41	6.514	64,53
72	7.867	77,93	7.230	71,62	6.426	63,66

Figura 2. Cinética da fermentação sem agitação de extrato de *H. tuberosus* por IZ 1339 (K.m); IZ 610 (K.f) e Fleischmann (S.c) (ver tabela 6).

com 7,824%GL, rendimento de 77,41%, produtividade global de $0,90 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e taxa específica de produção de $0,27 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, mostrando também como pode ser visto na Figura 2, que após 24 horas esta linhagem entra em fase estacionária de produção de etanol.

Em condições de agitação o perfil cinético modificou-se consideravelmente. Neste caso, a linhagem fermentadora IZ 1339 atingiu seu máximo de produção de álcool com 12 horas, sendo este de 9,84%GL, correspondente a rendimento de 87,8%, e eficiência de 89,4%. A produtividade global foi de $7,83 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e a taxa específica de produção de $2,25 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, enquanto a linhagem testemunha teve uma produtividade global de $5,65 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e taxa específica de $1,70 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, atingindo a produção máxima de 5,925%GL com 22 horas, com 58,63% de rendimento e eficiência de 73,2% (Tabela 7 e Figura 3). O consumo dos diversos açúcares que compõem o extrato de *H. tuberosus*, foi avaliado em alguns períodos da cinética de fermentação de IZ 1339, evidenciando na Figura 4, que esta linhagem utiliza concomitantemente os vários açúcares que compõem o extrato.

Além de *Kluyveromyces* sp. e *Candida* sp. as linhagens que apresentaram maior produção de etanol em inulina foram as pertencentes à espécie *Torulopsis colliculosa*. Duas linhagens desta espécie IZ 1966 e IZ 1970, foram avaliadas quanto ao perfil cinético da fermentação de extrato de *H. tuberosus* em sistema agitado (Tabela 8 e Figura 5). Estas leve-

Tabela 7. Perfil cinético da fermentação de extrato de *H. tuberosus* por *K. marxianus* (IZ 1339) e *S. cerevisiae* (Fleischmann). Valores de etanol (°GL), ART e AR (g/100 ml) de fermentação com agitação a 35°C e 10% de inóculo (peso fresco).

Tempo (hs)	<i>K. marxianus</i>			<i>S. cerevisiae</i>		
	ETOH(°GL)	ART %	AR %	ETOH(°GL)	ART %	AR %
0	0.919	15,75	6,23	0.136	15,62	4,41
2	4.353	-	-	3.872	-	-
4	6.005	3,41	1,21	4.271	6,74	0,46
6	8.150	-	-	4.733	-	-
8	8.934	1,20	0,28	5.180	4,65	0,35
10	8.866	-	-	5.575	-	-
12	9.867	0,27	0,23	5.633	4,26	0,30
22	9.537	0,27	0,20	5.925	3,11	0,20

Figura 3. Cinética da fermentação com agitação de extrato de *H. tuberosus* por IZ 1339 (K.) e Fleischmann (S.c) (ver Tabela 6).

Figura 4. Modificação na composição de açúcares durante a fermentação com IZ 1339 (K.m) de extrato de *H. tuberosus*. Representação esquemática de cromatografia de açúcares.

Tabela 8. Cinética da fermentação de extrato de *H. tuberosus* por duas linhagens de *Torulopsis colliculosa* (IZ 1966 e IZ 1970). Valores de etanol (°GL), ART e AR (g/100 ml) de fermentação com agitação a 35°C e 10% de inóculo (peso fresco).

Tempo (hs)	IZ 1966			IZ 1970		
	ETOH(°GL)	ART %	AR %	ETOH(°GL)	ART %	AR %
0	0,929	14,70	1,41	0,705	14,80	1,15
2	2,437	13,84	0,39	1,986	11,71	0,44
4	4,246	9,33	0,39	3,654	8,90	0,44
6	4,591	7,49	-	4,004	8,48	-
8	4,962	-	0,25	4,488	8,34	0,30
10	5,328	-	0,26	4,938	8,66	0,36
22	6,254	4,50	0,20	5,143	5,12	0,30

Figura 5. Cinética comparativa da fermentação de extrato de *H. tuberosus* por duas linhagens de *Torulopsis colliculosa* (ver tabela 7).

veduras apresentaram uma produtividade global e específica muito reduzida em comparação com os dados obtidos para *Kluyveromyces*, e os seus rendimentos após 22 horas de fermentação foram reduzidos como mostram os valores de ART residual ao término da fermentação. O efeito da concentração de células na cinética de fermentação de extrato de *H. tuberosus* mostrou efeitos proporcionais ao aumento do teor de células (Tabela 9 e Figura 6) com produtividade de 2,15; 2,87 e 3,38 $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectivas as concentrações de 1, 5 e 10% de células (peso fresco), porém, ocorreu um decréscimo da taxa específica de fermentação (6,456; 1,73 e 1,015 $\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para 1, 5 e 10% de levedura, respectivamente).

A comparação entre a cinética de fermentação de glicose e extrato de *H. tuberosus* de linhagens pertencentes a *S. cerevisiae*, *S. diastaticus*, *K. marxianus*, *K. fragilis*, *C. pseudotropicalis* e *C. gilliermondii*, permitiu observar variações na eficiência fermentativa dos dois substratos e estabelecer o fator preponderante no perfil cinético da fermentação de *H. tuberosus*.

Quanto à capacidade fermentativa e produtividade de etanol a partir de glicose, os resultados apresentados na Tabela 10 e Figura 7, permitem verificar que as leveduras testadas, independente da espécie apresentam produtividades elevadas que variam entre 4,26 e 5,45 $\text{g.ETOH.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, com exceção de IZ 1735 (C.g) que tem produtividade de 2,48 $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

As diferenças tornam-se maiores quando as mesmas linhagens são comparadas quanto à capacidade de fermenta-

Tabela 9. Avaliação do efeito da concentração celular no perfil cinético da fermentação de extrato de *H. tuberosus* por *Torulopsis cellulososa* (12 1966). Valores de etanol (°GL), ART e AR (g/100 ml) de fermentação com agitação a 35°C e 1,5 a 10% de inóculo em peso fresco.

Tempo (hs)	1%				5%				10%			
	ETOH	ART	AT	ETOH	ART	AR	ETOH	ART	AR	ETOH	ART	AR
0	0.919	14,87	0,99	0.427	14,27	1,17	0.929	14,70	1,41			
2	0.405	-	-	1.821	-	-	2.437	-	-			
4	1.162	14,31	0,88	3.347	10,42	0,56	4.246	9,33	0,39			
6	1.674	-	-	3.742	-	-	4.591	-	-			
8	2.233	12,63	1,06	4.062	9,26	0,29	4.962	8,27	0,25			
10	2.717	12,19	0,75	4.123	9,08	0,31	5.328	7,49	0,26			
22	3.931	7,95	0,25	5.218	6,41	0,24	6.524	4,89	0,20

Figura 6. Efeito da concentração de células no perfil cinético de 1Z 1966 (T.c) durante a fermentação de extrato de *H. tuberosus* (ver tabela 8).

Tabela 10. Cinética da fermentação de glicose por leveduras de *Kluyvetomyces*, *Saccharomyces* e *Candida*. Valores em g CO₂/l com ART inicial de 12,96%.

Linhagens	2	4	6	8	10	12	24
Fleischmann (S.c.)	13,8	26,6	39,6	47,7	53,3	58,9	60,7
IZ 1339 (K.m.)	3,9	8,4	24,1	28,5	35,9	44,9	57,7
IZ 610 (K.f.)	10,2	21,9	33,1	41,5	48,8	55,8	60,3
IZ 619 (K.m.)	10,9	18,9	45,9	56,7	58,6	59,6	61,0
Y 2416 (S.d.)	24,0	44,6	51,6	52,2	52,5	53,1	54,4
Y 6373 (K.m.)	9,9	22,7	34,8	44,6	50,9	55,4	57,8
IZ 1735 (C.g.)	2,0	5,4	10,8	16,9	20,3	24,7	38,6
IZ 431 (C.p.)	4,4	12,6	21,8	29,9	35,7	41,7	54,8

Figura 7. Cinética comparativa da fermentação de glicose por *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Candidas* (ver tabela 9).

ção de extrato de *H. tuberosus*. Os resultados da Tabela 11 e Figura 8, mostram que as linhagens de *Kluyveromyces* e a linhagem de *C. pseudotropicalis* apresentam produtividades elevadas também neste substrato, comparáveis com aquelas observadas em glicose, variando neste caso entre 3,70 e 5,78 g.l⁻¹.h⁻¹. Dentre estas ressalta-se a linhagem IZ 431 que exibiu produtividade superior em extrato, sendo esta de 5,78 g.l⁻¹.h⁻¹. As linhagens pertencentes a *Saccharomyces* e *C. guilliermondii* não ultrapassaram os 2,73 g.l⁻¹.h⁻¹, sendo a menor produtividade aquela de NRRL-Y 2416 com 1,12 g.l⁻¹.h⁻¹.

Na Tabela 12 podemos observar que as linhagens Fleischmann, NRRL-Y-2416 e IZ 1735 não completaram a fermentação dos açúcares presentes no extrato de *H. tuberosus*, restando mais de 2% de ART na forma de polissacarídeos. A diferença de rendimento no extrato entre as linhagens Fleischmann e NRRL-Y-2416 pode ser associada a diferenças quanto as invertases ou a permeabilidade da parede destas duas leveduras a moléculas de oligossacarídeos. Já as leveduras pertencentes a *Kluyveromyces* e *C. pseudotropicalis* apresentam rendimentos elevados e consumo quase total dos mono, oligo e polissacarídeos do extrato.

Na fermentação de glicose as linhagens testadas apresentaram rendimentos superiores a 85% com exceção das linhagens IZ 1735 e IZ 431 (Tabela 12).

A análise de álcoois superiores e compostos leves das fermentações de glicose e extrato de *H. tuberosus* da

Tabela 11. Cinética da fermentação de extrato de *H. tuberosus* por leveduras de *Kluyvetomyces*, *Saccharomyces* e *Candida*. Valores em gCO₂/l com ART inicial de 8,23%.

Linhagens	2	4	6	8	10	12	24
Fleischmann	16,9	24,2	27,7	30,0	31,1	32,4	35,9
IZ 1339	15,7	2,30	31,2	39,7	42,3	43,8	44,6
IZ 610	15,4	29,7	35,2	37,7	39,6	41,2	45,5
IZ 619	15,2	32,3	39,9	41,8	42,2	42,6	44,0
Y 2416	8,3	12,4	14,2	15,0	15,9	16,5	18,4
I 6373	12,8	29,8	38,0	40,0	40,4	41,0	42,5
IZ 1735	3,9	7,2	14,4	19,3	22,9	25,4	29,9
IZ 431	5,6	21,8	31,7	40,0	42,2	43,3	45,1

Figura 8. Cinética comparativa da fermentação de extrato de *H. tuberosus* *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Candida* (ver tabela 10).

Tabela 12. Produção de etanol a partir de extrato de *H. tuberosus* e de glicose por linhagens de *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* e *Candida*. Valores de etanol (°GL), ART e AR (g/100 ml) de fermentação de 24 horas a 35°C com 8,23% de ART e 12,68% de ART respectivamente.

Linhagens	Glicose			<i>H. tuberosus</i>		
	Etanol	ART	AR	Etanol	ART	AR
Felschmann	6,86	0,12	0,13	3,78	2,34	0,16
IZ 1339	6,56	0,49	0,50	4,90	0,22	0,12
IZ 610	6,56	0,09	0,13	4,48	1,07	0,14
IZ 619	7,28	0,05	0,13	4,90	0,17	0,14
Y 2416	7,14	0,05	0,10	2,96	2,59	0,20
Y 6373	6,86	0,08	0,13	5,16	0,24	0,17
IZ 1375	4,48	2,54	2,68	3,96	2,14	0,40
IZ 431	5,72	2,30	2,63	5,16	0,24	0,17

Tabela 12, são mostrados na Tabela 13. Nesta pode ser observado que: a produção de metanol é muito maior na fermentação de extrato, independente da linhagem e da sua capacidade fermentativa; que a concentração de propanol é maior em linhagens de *Kluyveromyces*, quando estas fermentam o extrato; e que os valores médios de concentração de compostos leves e álcoois superiores é maior na fermentação do extrato.

A velocidade específica de crescimento em três fontes de carbono, foi estimada para as linhagens IZ 1339 (Km), IZ 610 (Kf) e Fleischmann (Sc) obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 14 e Figura 9. Nestas podemos verificar que a linhagem IZ 1339 apresenta a maior taxa de crescimento nos três açúcares testados, sendo as maiores diferenças observadas entre IZ 1339 e IZ 610 em glicose e entre estas duas e Fleischmann em inulina, como é de se esperar, dado que esta última é incapaz de degradar este polissacarídeo. O crescimento detectado nesta linhagem (S.c), pode ser atribuído à presença de açúcares redutores ou dissacarídeos produzidos durante a autoclavagem do meio.

Já que a fermentação de polifructosídios está associada à ação de enzimas específicas capazes de quebrar as ligações beta-1,2 liberando açúcares redutores fermentescíveis, capazes de serem transportados através da parede e membrana, foi feito o estudo dos sistemas enzimáticos extracelulares envolvidos na utilização de inulina, a seguir discriminados.

Tabela 13. Análise de compostos leves e alcoóis superiores de destilados das amostras da Tabela 11. Valores em mg/100 ml de etanol.

	Glicose	<i>H. tuberosus</i>
Acetaldeído	170,91	207,32
Acetona	3,26	9,99
Acetato etila	60,52	79,25
Metanol	4,29	391,54
n-propanol	100,53	141,49
Isobutanol	419,06	475,75
isoamílico	547,41	526,64

Tabela 14. Avaliação da taxa específica de crescimento em inulina, sacarose e glicose. Regressão linear. Valores de μ_x em D.O. (μ_x - Taxa específica de crescimento).

	IZ 1339		IZ 610		Fleischmann	
	μ_x	r^2	μ_x	r^2	μ_x	r^2
Sacarose	0,184	0,847	0,179	0,794	0,162	0,760
Dextrose	0,143	0,759	0,084	0,702	0,141	0,784
Inulina	0,083	0,759	0,071	0,834	0,030	0,715

Figura 9. Regressões lineares correspondentes a cinética do crescimento de IZ 1339 (K.m); IZ 610 (K.f) e Fleischmann (S.c) em glicose, sacarose e inulina (ver tabela 13).

4.2. ATIVIDADE INULINOLÍTICA E INULINASE EXTRACELULAR DE LEVEDURAS

A avaliação inicial da atividade inulinolítica extracelular em leveduras fermentadoras de inulina mostrou que mesmo as linhagens com certa capacidade de fermentação de inulina pertencentes a *S. cerevisiae*, *T. colliculosa* e *C. guilhermondii* não apresentam atividade inulinolítica extracelular. Em contraposição a atividade inulinolítica extracelular em *K. marxianus* (IZ 1339) e em *K. fragilis* (IZ 610) atingiu em 72 horas de crescimento em inulina valores de 3588,31 e 1372,58 U/ml, nmoles de frutose.ml⁻¹.min⁻¹, respectivamente.

A Tabela 15 mostra os valores de atividade inulinolítica extracelular de leveduras fermentadoras pertencentes a *K. marxianus*, *K. fragilis* e *C. pseudotropicalis* após crescimento aeróbico por 24 e 48 horas em meio com inulina como fonte de carbono, associando-se os valores de AR no meio como forma de estabelecer os pontos de repressão. Nesta tabela pode-se observar a variabilidade existente entre espécies e dentro das espécies fermentadoras, sobressaindo pela atividade as linhagens IZ 1339 (Km), IZ 619 (Km) e IZ 275 (Kf). Verifica-se adicionalmente que a alta concentração de AR no meio ($1,09 \times 10^{-3}$ M frutose) no caso da linhagem IZ 429 (Kf) reflete numa atividade reduzida de inulinase extracelular (88,5 U/ml). Um segundo grupo de linhagens foi avaliado separadamente (Tabela 16) onde se destacam as linhagens IZ 619 e NRRL-Y-7521 (Km).

Tabela 15. Avaliação da atividade inulinolítica extracelular em linhagens pertencentes às espécies selecionadas. Dados em U/ml = nmoles de AR liberados por mililitro de extrato enzimático por minuto, e AR no meio em 10^{-3} M frutose.

Linhagens	Atividade de inulinase (U/ml)	
	24 hs	48 hs
IZ 148 K.m	282,1	708,5
IZ 1821 K.m	301,3	456,0
IZ 1339 K.m	439,8	946,6
IZ 619 K.m	355,4	896,6
IZ 429 K.f	88,5	267,9
IZ 275 K.f	728,3	990,7
IZ 610 K.f	448,8	494,1
IZ 431 C.p	429,6	297,7
Fleischmann	4,1	0,0

Linhagens	AR no meio (10^{-3} M frut.)	
	24 hs	48 hs
IZ148	0,55	0,50
IZ 1821	0,79	0,84
IZ 1339	0,59	0,72
IZ 619	0,91	0,80
IZ 429	1,09	0,90
IZ 275	0,46	0,56
IZ 610	0,46	0,45
IZ 431	0,62	0,77
Fleischmann	0,61	0,79

Tabela 16. Avaliação da atividade enzimática extracelular em linhagens de *K. marxianus*. Dados em U/ml e AR em 10^{-4} M frutose.

Linhagens	Atividade enzimática (U/ml)	
	24 hs.	48 hs.
IZ 1339	71,28	204,59
IZ 619	40,52	583,45
FF	0,00	0,00
FTI 20014	22,13	36,98
FTI 20015	62,66	204,59
ATCC 10606	13,83	102,44
NRRL-Y-1190	24,72	50,01
NRRL-Y-1195	53,21	90,93
NRRL-Y-1207	37,08	13,94
NRRL-Y-7521	131,92	409,17
NRRL-Y-6373	65,24	139,12
NRRL-Y-8278	43,25	25,76

Linhagens	AR no meio (10^{-4} M frut.)	
	24 hs.	48 hs.
IZ 1339	1,461	2,959
IZ 619	1,868	3,069
FF	1,437	1,973
FTI 20014	1,676	2,850
FTI 20015	1,341	3,288
ATCC 10606	1,341	2,850
NRRL-Y-1190	1,628	2,959
NRRL-Y-1195	1,580	2,740
NRRL-Y-1207	1,724	2,466
NRRL-Y-7521	2,586	2,171
NRRL-Y-6373	2,107	2,521
NRRL-Y-8278	1,293	1,978

Os valores correspondentes à cinética de produção de enzima, associada a concentração de açúcares redutores no meio de cultivo são apresentados na Tabela 17 e Figura 10. O aumento da atividade com o tempo, especialmente em *K. marxianus*, e a relação entre atividade e concentração de AR no meio, no caso de *K. fragilis*, são indicativos de repressão catabólica da produção desta enzima. No caso de *K. marxianus*, uma pequena redução de atividade foi observada na oitava hora, porém, não pode ser caracterizada como um efeito notório de repressão, por outra parte, a linhagem IZ 610 mostra também uma redução drástica da atividade após 33 horas.

Na Tabela 18 tem-se a atividade inulinolítica em duas linhagens de *K. marxianus* e duas de *K. fragilis* submetidas ao contato com diferentes fontes de carbono após crescimento em glicose. Nesta tabela pode-se observar que as atividades em meio com inulina e sacarose, são semelhantes nas linhagens de *K. marxianus*, porém, a atividade é inferior em sacarose nas linhagens de *K. fragilis*. No caso da celobiose as linhagens de *K. marxianus* apresentam elevada atividade inulinolítica, enquanto que as linhagens de *K. fragilis* exibiram baixa atividade nesta fonte de carbono. Em etanol, glicose e na ausência de fonte de carbono, as linhagens de *K. marxianus* exibiram uma redução na sua atividade em relação à apresentada em inulina, porém, mantendo valores elevados. Já no caso de *K. fragilis* a atividade nestes meios foi baixa, ou

Tabela 17. Cinética da atividade de inulinase extracelular em *Kluyveromyces marxianus* e *K. fragilis* durante o crescimento destas em meio com inulina. Valores em U/ml e AR em 10^{-4} M frutose.

Tempo (hs)	Atividade-U/ml (nmoles AR/ml.min)	
	K.m IZ 1339	K.f IZ 610
0	-	-
2	367,65	-
4	367,65	428,92
6	465,70	710,79
8	343,14	220,59
10	551,47	416,67
25	1568,64	1127,46
29	1519,62	1151,97
33	2120,11	637,26
48	2254,92	735,30

Tempo (hs)	AR no meio (10^{-4} M)	
	K.m IZ 1339	K.f IZ 610
0		
2	10,40	16,54
4	11,64	12,87
6	16,79	9,19
8	23,53	23,53
10	18,99	19,36
25	1,98	4,22
29	1,21	0,86
33	1,13	0,95
48	0,82	0,82

Figura 10. Cinética da produção de inulinase extracelular e da liberação de açúcares redutores no meio, durante a fase estacionária de crescimento de IZ 1339 (K.m) e IZ 610 (K.f) (ver tabela 16).

nula. Relacionando as atividades obtidas em inulina e em inulina acrescida de 0,5% de glicose, pode-se observar que as linhagens de *K. marxianus* não exibiram redução de atividade, enquanto que as duas linhagens de *K. fragilis* apresentaram uma redução considerável de atividade.

A atividade dos extratos enzimáticos sobre três açúcares mostram na Tabela 19 que a atividade enzimática é maior sobre sacarose do que sobre a inulina, denotando desta forma maior atividade de invertase do que os de inulinase nos extratos brutos de enzima utilizados.

Os extratos enzimáticos de *K. marxianus* e *K. fragilis* mostraram dois picos de pH ótimos sendo estes a pH 4 e a pH 7 (Tabela 20 e Figura 11).

O teste de inativação térmica dos extratos enzimáticos mostra na Tabela 21 e na Figura 12, que a partir de 60°C ocorre inativação rápida da enzima, existindo certa variabilidade entre as linhagens quanto à produção de extratos mais ou menos sensíveis à temperatura.

4.3. ASPECTOS GENÉTICOS DO GÊNERO *Kluyveromyces*

As linhagens de *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis* foram testadas quanto à sua capacidade de esporulação, auxotrofias e caráter "killer". Do total de 13 linhagens classificadas como *K. marxianus*, cinco não esporularam (IZ 1339, IZ 1821, IZ 619, IZ-

Tabela 18. Indução e repressão catabólica da inulinase de *K. marxianus* e *K. fragilis*. Dados em U/ml.

	IZ 1339	IZ 619	IZ 610	IZ 275
Inulina 0,5%	458,40	1815,50	400,30	305,30
Sacarose 0,5%	449,30	1339,40	117,26	90,98
Glicose 0,5%	367,60	960,70	14,58	0,00
Celobiose 0,5%	621,80	1647,60	18,20	11,00
Etanol 0,5%	351,70	771,60	18,20	0,00
Inulina 0,5%	526,50	1929,00	113,22	200,16
Inulina + Glicose 0,5% (cada)				
S/Carvão	365,00	1191,40	38,40	0,00

Tabela 19. Avaliação da especificidade da enzima pelo substrato no caso da inulinase extracelular de *K. marxianus* e *K. fragilis* (dados em U/ml).

	IZ 1339	IZ 619	IZ 275	IZ 610
Sacarose	2236,64	2231,58	2224,00	2236,64
Rafinose	698,62	1170,13	374,04	366,45
Inulina	170,76	199,65	25,27	30,33

Tabela 20. Determinação da atividade inulinolítica em vários valores de pH. Dados em U/ml.

pH	IZ 1339	IZ 619	IZ 610	IZ 275
2	63,72	40,29	37,48	28,11
3	98,39	159,30	46,85	32,80
4	191,10	356,09	121,82	168,67
5	79,65	210,84	140,56	51,54
6	365,46	515,39	201,47	107,76
7	501,33	651,27	254,88	249,26
8	352,34	209,90	224,90	243,64

Tabela 21. Análise da inativação térmica da inulinase extracelular de *Kluyveromyces marxianus* e *K. fragilis*. Valores em U/ml após tratamento da enzima por 10 minutos às temperaturas de 40, 50, 60 e 70°C.

Temperatura	IZ 1339	IZ 619	IZ 610	IZ 275
40	204,4(100)	330,3 (100)	165,2(100)	148,8(100)
50	171,7(84)	284,5(86)	147,0(89)	122,6(82)
60	148,8(73)	65,4(20)	129,2(78)	75,2(50)
70	55,6(27)	11,3(03)	55,1(33)	5,0(03)

Figura 11. Variação da atividade inulinolítica de extratos enzimáticos de *K. marxianus* (IZ 1339 e IZ 619) e *K. fragilis* (IZ 610 e IZ 275) de acordo com o pH (ver tabela 19).

Figura 12. Inativação térmica da inulinase extracelular de *K. marxianus* (IZ 1339 e IZ 619) e *K. fragilis* (IZ 1275 e IZ 610) (ver tabela 20).

148 e NRRL-Y-1207), nenhuma apresentou auxotrofias, e quatro linhagens exibiram o caráter "killer" (IZ 1339, IZ 1821, NRRL-Y-6373 e NRRL-Y-7521). As linhagens testadas de *K. fragilis* apresentaram esporulação pobre e a linhagem ATCC 8585 de *K. lactis* não esporulou.

Uma característica importante em leveduras industriais é o efeito "killer", e por esta razão em levantamento feito entre linhagens industriais, de laboratório e selvagens pertencentes a 10 gêneros e 29 espécies de leveduras, foram evidenciadas 10 linhagens com o caráter "killer" (Tabela 22), sendo estas pertencentes a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Saccharomyces diastaticus* e a *Kluyveromyces marxianus*.

Devido ao interesse que apresenta *Kluyveromyces marxianus* na fermentação de inulina e na produção de inulinase, procedeu-se ao estudo deste caráter. Em teste de sensibilidade entre linhagens "killer", foi observado (Tabela 23) que as linhagens pertencentes a *K. marxianus* são resistentes as toxinas liberadas tanto por *S. cerevisiae* como por *S. diastaticus* ao mesmo tempo que são capazes de matar todas as linhagens "killer" testadas, pertencentes a *Saccharomyces*.

Testando IZ 1339 (Km); ABxR-11A (Sc) e 76-171 (Sd) sobre uma série de leveduras pertencentes a vários gêneros e espécies, foi possível estabelecer um espectro de ação do caráter "killer" das três linhagens. Neste teste a linhagem IZ 1339 exibiu um espectro de ação mais amplo que as linhagens de *Saccharomyces*, sendo capaz de atuar sobre todas

Tabela 22. Avaliação do caráter "killer" em leveduras pela formação de ha los de inibição sobre a linhagem sensível AH22.

Espécies	Nº de linhagens testadas	Nº "killers"
<i>C. utilis</i>	2	0
<i>C. pseudotropicalis</i>	3	0
<i>C. tropicalis</i>	1	0
<i>K. lactis</i>	1	0
<i>K. fragilis</i>	3	0
<i>K. marxianus</i>	4	2
<i>S. cerevisiae</i>	55	5
<i>S. diastaticus</i>	4	3
<i>S. uvarum</i>	7	0
<i>S. bailli</i>	1	0
<i>S. rouxii</i>	1	0
<i>S. acidifaciens</i>	2	0
<i>S. tokio</i>	1	0
<i>S. fermentati</i>	2	0
<i>S. sake</i>	3	0
<i>S. italicus</i>	1	0
<i>E. bisporus</i>	1	0
<i>E. chodati</i>	1	0
<i>E. fibuligua</i>	2	0
<i>Schw. castelli</i>	1	0
<i>Schw. alluvius</i>	1	0
<i>P. stipitis</i>	1	0
<i>P. polymorpha</i>	1	0
<i>Schizo. pombe</i>	1	0
<i>Schizo. italicus</i>	1	0
<i>T. colliculosa</i>	3	0
<i>L. kononenkoae</i>	1	0
<i>L. starkeyi</i>	2	0
<i>R. glutinis</i>	1	0

Tabela 23. Teste de sensibilidade entre linhagens "killer" de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*. (+) Formação de halo, (-) não formação de halo, e (+/-) halos reduzidos e de aparecimento após 48 horas.

Linhagens	Testes						
	IZ 1339	AB+R-11A	164	LEv. Jap.	IZ 712	76-171	AH22
IZ 1339	+	+	+	+	-(+/-)	+	+
IZ 712	-	-	-	-	.	-	+/-
Lev. Jap.	-	-	-	.	+(+/-)	-	+
ABxR-11A	-	+	-	+	+	+	+
164	-	+	+	+	-	-	+
J 1326	-	-	-	-	-	-	+/-
AH22	-	-	-	-	-	-	-
76-171	-	+	+	+	+(+/-)	.	+
IZ1821	-	+	+	+	-(+/-)	+	+

as linhagens do gênero *Saccharomyces* testadas, sobre uma linhagem de *Kluyveromyces fragilis*, sobre *Pachysolem tanophyllus* e outras, como mostrado na Tabela 24.

Para determinar a condição ideal de expressão do caráter, e diferenciar as várias linhagens "killers", foi realizado um ensaio com vários pH, variando este de 4,5 a 7,0 (Tabela 25). As duas linhagens de *K. marxianus* testadas tiveram a sua expressão máxima do caráter (diâmetro do halo de inibição) com pH 4,5, mostrando redução do halo com pH 5,0. As linhagens de *Saccharomyces* 76-171 e ABxR-11A exibiram padrões semelhantes.

Através de eletroforese foi observada a existência de dois plasmídios de DNA nestas linhagens, os quais não existem em linhagens que não exibem o caráter (Figura 13). A cura de plasmídios induzida com brometo de etídio, mostra nos resultados da Tabela 26 que as linhagens curadas, perdem a capacidade "killer", mas não se tornaram sensíveis ao efeito "killer" das linhagens originais. Estas linhagens curadas quando testadas eletroforeticamente, mostraram a ausência de ambos os plasmídios.

As curvas das Figuras 14 e 15 permitem observar o efeito do caráter "killer" em culturas mixtas em pH 6,8 e pH 4,5, sendo que neste último a população de *S. cerevisiae* decresce a partir das 6 horas de cultivo, sendo impossível detectar a sua presença após 24 horas, mostrando assim o efeito do pH sobre a expressão do caráter, e a eficiência do sis-

Tabela 24. Avaliação do espectro de ação da toxina de linhagens "killer" de *Saccharomyces kluyveri*, sobre leveduras. (+) formação de halo; (-) não formação de halo e (+/-) halos reduzidos.

ABX-R-11A (S.C.) 76-171 (S.D.)	12 1339 (K.M.)	ABX-R-11A (S.C.) 76-171 (S.D.)	12 1399 (K.M.)	
+	+	+	+	<i>S. cerevisiae</i> (FF).
+	+	+	+	<i>S. cerevisiae</i> (Mont.).
+	+	+	+	<i>S. cerevisiae</i> (12862).
+	+	+	+	<i>S. cerevisiae</i> (Lev.Jap.).
+	+	+	+	<i>S. cerevisiae</i> (12902).
+	+	+	+	<i>S. cerevisiae</i> (ATCC26603).
+	+	+	+	<i>S. cerevisiae</i> (ATCC24858).
+	+	+	+	<i>S. cerevisiae</i> (ATCC4126).
+	+	+	+	<i>S. diastaticus</i> (J132b).
+	+	+	+	<i>S. diastaticus</i> (76-171).
+	+	+	+	<i>S. diastaticus</i> (57-5).
+	+	+	+	<i>S. acidifaciens</i> (121391).
+	+	+	+	<i>S. acidifaciens</i> (12307).
+	+	+	+	<i>S. uvarum</i> (ATCC28097).
+	+	+	+	<i>S. uvarum</i> (ATCC26602).
+	+	+	+	<i>S. italicus</i> (C-105)
+	+	+	+	<i>S. chevalieri</i> (61-22).
+	+	+	+	<i>S. fermentati</i> (122.3)
+	+	+	+	<i>S. fermentati</i> (1228.)
+	+	+	+	<i>S. bailii</i> (C-4).
+	+	+	+	<i>K. fragilis</i> (12610).
+	+	+	+	<i>K. fragilis</i> (12429).
+	+	+	+	<i>K. fragilis</i> (12275).
+	+	+	+	<i>K. lactis</i> (12255).
+	+	+	+	<i>K. lactis</i> (ATCC8585).
+	+	+	+	<i>K. marxianus</i> (121821).
+	+	+	+	<i>K. marxianus</i> (12148).
+	+	+	+	<i>K. marxianus</i> (12619)
+	+	+	+	<i>K. marxianus</i> (12 1339)
+	+	+	+	<i>P. tannophilus</i> (FTI 20064)
+	+	+	+	<i>C. freychussii</i> (78-47).

Tabela 25. Efeito do pH na expressão do caráter "killer" de várias leveduras com o caráter. (++) halo de inibição; (+) halo de inibição menor; (-) sem halo de inibição.

ph/linhagens	IZ 1339	IZ 1821	ABxR-11A	76171	LJ
4,5	++	++	++	+	+
5,0	+	+	-	+	+
6,0	-	-	-	-	+
7,0	-	-	-	-	-

1) CV 13	5) IZ 1821
2) IZ 148	6) IZ 1339
3) IZ 619	7) 2 μm.
4) pBR 322	

Figura 13. Identificação dos plasmídios "killer" de *K. marxianus* (IZ1339) por eletroforese em gel de agarose.

Tabela 26. Avaliação do efeito "killer" em linhagens curadas com brometo de etídio.

Linhagens	AH22	IZ 1339	IZ 1339 k_0^1
IZ 1339	++	-	-
IZ 1339 k_0^1	-	-	-
IZ 1339 k_0^2	-	-	-
IZ 1339 k_0^3	-	-	-
IZ 1821 k_0^1	-	-	-
IZ 1821 k_0^2	-	-	-
IZ 1821	++	-	-

Figura 14. Curva de crescimento de uma cultura mixta da levedura "killer" IZ 1339 (K.m) e M304-2C (*S. cerevisiae*) em meio a pH 6,8.

Figura 15. Curva de crescimento de uma cultura mista da levedura "killer" IZ 1339 (K.m) e M302-2C (S.c) em meio tamponado a pH 4,5. Efeito "killer".

tema no controle de eventuais contaminações por leveduras selvagens no processo.

Devido à ausência de reação sexual definida em *K. marxianus* e *K. fragilis* para a realização de estudos genéticos foi necessária a indução e seleção de mutantes auxotróficos. Assim, para determinar o tempo ideal de tratamento com ácido nitroso para a obtenção de mutantes, foram realizadas as curvas de sobrevivência de diversas leveduras. A Figura 16 mostra que as linhagens de *Kluyveromyces* são de um modo geral mais sensíveis ao ácido nitroso do que *Saccharomyces*, e que o tempo ideal de tratamento é de aproximadamente 10 a 12 minutos.

Após indução e enriquecimento com nistatina, foram obtidos vários mutantes auxotróficos das linhagens IZ 1339, IZ 1821, IZ 619, IZ 610, IZ 275 e ATCC 8585, listados a seguir.

Código	Deficiência	Origem	Espécie
KM 6	leu ⁻	IZ 1339	Km
KM 8	leu ⁻	IZ 1339	Km
KM 9	met ⁻	IZ 1339	Km
KM 14	ura ⁻	IZ 1821	Km
KM 16	met ⁻	IZ 1821	Km
KM 20	arg ⁻	IZ 619	Km
KM 21	arg ⁻	IZ 619	Km

Cont.

Código	Deficiência	Origem	Espécie
KF 3	ser ⁻	IZ 275	Kf
KF 4	ser ⁻	IZ 610	Kf
KF 6	thr ⁻	IZ 610	Kf
KL 1	arg ⁻	ATCC 8585	Kl
KL 2	lys ⁻	ATCC 8585	Kl
KL 4	his ⁻	ATCC 8585	Kl
KL 6	arg ⁻	ATCC 8585	Kl
KL 9	trp ⁻	ATCC 8585	Kl
KL 18	lys ⁻	ATCC 8585	Kl
KL 21	met ⁻	ATCC 8585	Kl

Através da metodologia aplicada comumente com leveduras foi possível obter híbridos entre linhagens auxotróficas de *K. marxianus*, *K. fragilis* e entre estas espécies. As taxas de hibridização calculadas com base no número de híbridos complementares mostraram-se relativamente baixas como mostra a tabela seguinte:

Linhagens	Taxa de hibridização (hibr./cels)
KM 9 x KM 21	$8,82 \times 10^{-5}$
KM 9 x KF 3	$3,11 \times 10^{-6}$
KF 3 x KF 6	$4,57 \times 10^{-5}$
KM 9 x KM 5	$2,87 \times 10^{-6}$
KM 5 x KM 16	$5,45 \times 10^{-5}$

Figura 16. Curvas comparativas de sensibilidade ao ácido nitroso de *K. marxianus*, *K. fragilis*, *K. lactis* e *S. diastaticus*.

Os híbridos foram caracterizados quanto ao crescimento e fermentação de inulina, lactose e maltose, caráter "killer", auxotrofia e esporulação, sendo os resultados apresentados na Tabela 27. Nesta pode ser observado que todos os híbridos são capazes de esporular, apresentando formação de ascos com 2, 3 e 4 esporos reniformes, os quais se abrem espontaneamente quando maduros, em todos os casos ocorreu complementação das marcas e não foi evidenciado o surgimento de setores auxotróficos ou de qualquer outro tipo. Quanto ao caráter "killer", os resultados mostram que em alguns cruzamentos entre linhagens "killers" e não "killers" de *K. marxianus* os híbridos exibem o caráter como é o caso de MM1 e MM51, e em outros isto não acontece como nos híbridos MM80 e MM81. Nos híbridos interespecíficos obtidos entre *K. fragilis* e *K. marxianus*, não foi evidenciada a formação de halos de inibição sobre linhagens sensíveis (AHZZ). Porém, híbridos interespecíficos entre *K. marxianus* e *K. lactis* não foram observados através de cruzamentos naturais, mesmo sendo testadas aproximadamente 10^8 células de três cruzamentos diferentes.

Os híbridos obtidos foram em parte esporulados e os segregantes analisados geneticamente através de esporos ao acaso. A análise por esporos ao acaso foi escolhida devido ao fato de que os ascos e esporos de *K. marxianus* e *K. fragilis* são de tamanho muito reduzido para proceder a sua micromanipulação e principalmente devido a que os esporos são espontaneamente liberados do asco quando maduros.

Tabela 27. Caracterização de híbridos intra e interespecíficos de *Kluyveromyces* quanto a marcas auxotróficas, esporulação, "killer" e assimilação de fontes de carbono.

Híbrido	Parentais	Marcas	Esporulação e esporos	killer	Assimilação		
					inul.	lact.	malt.
MM1	KM9 x KM21	-	+ reniformes	+	++	-	-
MM28	KM9 x KM5	-	+ reniformes	+	++	-	-
MM50	KM16 x KM9	-	+ reniformes	+	++	-	-
MM51	KM16 x KM21	-	+ reniformes	+	++	-	-
MM70	KM16 x KM14	-	+ reniformes	+	++	-	-
MM80	KM9 x IZ148	-	+ reniformes	-	++	-	-
MM81	KM21 x IZ148	-	+ reniformes	-	++	-	-
MF1	KM9 x KF3	-	+ reniformes	-	++	++	+
MF4	KM9 x KF6	-	+ reniformes	-	++	++	+
KM9	-	met.	-	+	++	-	-
KM5	-	leu.	-	+	++	-	-
KM14	-	ura.	-	+	++	-	-
KM16	-	met.	-	+	++	-	-
KM21	-	arg.	-	-	++	-	-
IZ148	-	-	-	-	++	-	-
KF3	-	ser.	+ reniformes	-	++	++	+
KF6	-	thr.	poucos reniformes	-	++	++	+

Os resultados de segregação obtidos são sumarizados na Tabela 28. As marcas analisadas mostraram valores percentuais de recombinação elevados, identificando-se ligação entre os genes Met 1 e Arg 1, e entre Leu 1 e Met 2. No caso específico do cruzamento 5, a segregação observada é induzida de uma linhagem triplóide, na qual a linhagem de *K. fragilis* contribui com dois genomas e *K. marxianus* com um genoma, mostrando uma relação de 1:2 para serina e 2:1 para metionina, o que é também evidência da proximidade filogenética existente entre estas espécies.

Do cruzamento entre KM9 e KM21 foram encontrados segregantes sem capacidade inulinolítica, o que denota a existência de mais de um gene envolvido na degradação deste polissacarídeo. De acordo com a frequência observada de segregantes incapazes de utilizar inulina, os genes responsáveis encontram-se ligados a uma distância de 9,97 cM.

Os híbridos (2n) obtidos através de cruzamentos naturais foram avaliados quanto à capacidade de fermentação de glicose. Como mostram os dados da Tabela 29, ocorre variação entre as linhagens parentais utilizadas e entre os híbridos, sendo esta altamente significativa (Tabela 30). Os híbridos quando comparados individualmente com as linhagens parentais mostraram não diferir da sua média, evidenciando desta forma a ausência de efeitos heteróticos. No caso dos híbridos interespecíficos MF1 e MF4, podem ser observados valores médios inferiores à média dos parentais envolvidos em cada cruzamento, respectivamente.

Tabela 28. Segregação de marcas em segregantes de híbridos inter e intra-específicos de *Kluyveromyces* e os valores de % de recombinação entre os marcadores.

CRUZAMENTO 1: KM 9 met₁ K⁺ x KM 5 leu₁ K⁰

HÍBRIDO (2n)

PROTOTRÓFICO

Met Leu	203
met Leu	196
Met leu	221
met leu	<u>189</u>
	809

%R = 48,45 (independente)

CRUZAMENTO 2: KM 9 met₁ K⁺ x KM 21 arg₁ K⁰

HÍBRIDO (2n)

PROTOTRÓFICO KILLER

K ⁺ Met Arg	335
K ⁺ met Arg	532
K ⁺ KMet arg	512
K ⁺ met arg.	<u>304</u>
	1683

%R = 37,97

CRUZAMENTO 3: KM 5 leu₁ K⁺ x KM 16 met₂ K⁺

HÍBRIDO (2n)

PROTOTRÓFICO KILLER

Leu Met	249
leu Met	339
Leu met	360
leu met	<u>208</u>
	1156

%R = 39,53

Cont.

Tabela 28. Continuação.

CRUZAMENTO 4: KM 5-6 leu₁ ade₁ x KM 9 met₁ ade₂

HÍBRIDO (2n)

PROTOTRÓFICO

Ade Leu Met	315
Ade leu met	81
ade Leu met	340
ade leu Met	355
Ade Leu met	148
Ade leu Met	72
ade Leu Met	411
ade leu met	<u>303</u>
	2025

CRUZAMENTO 5: KF 3 ser₁ K^O x KM 9 met₁ K⁺

HÍBRIDO (3n)

Prototrófico, NÃO KILLER

Ser Met	176
ser Met	422
Ser met	135
ser met	<u>105</u>
	838
ser Met K ⁺	58
ser Met K ^O	26
ser met K ⁺	15
ser met K ^O	6
Ser met K ⁺	15
Ser met K ^O	9

Tabela 29. Avaliação da fermentação de glicose por híbridos de *Kluyveromyces*. Dados em %GL de etanol de 3 fermentações consecutivas de 15 horas a 35°C.

Linhagens	I	II	III	$\bar{x}$
KM 16	4,62	3,66	3,52	3,93
KM 14	4,76	4,06	3,52	4,11
KM 5	4,34	3,24	4,34	3,97
KM 9	4,90	6,14	5,20	5,41
KM 21	5,16	4,34	3,52	4,34
KF 3	4,90	5,04	3,78	4,57
KF 6	1,48*	6,14	7,42	6,78*
IZ 148	4,76	4,20	4,90	4,62
MM 1	4,62	4,20	4,90	4,57
MM 28	4,76	3,52	4,20	4,16
MM 50	4,62	4,62	4,62	4,62
MM 51	4,62	5,04	4,34	4,67
MM 70	4,20	4,48	4,20	4,29
MM 80	4,62	4,20	4,90	4,57
MM 81	4,48	3,66	4,34	4,16
MF 1	4,62	4,48	3,24	4,11
MF 4	4,34	4,76	3,66	4,25
Fleischmann	4,62	5,58	6,42	5,54

* Dados em %GL.

Tabela 30. Análise de variância dos dados da tabela 29, experimento inteiramente casualizado.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	17	12,729	0,749	2,291*
Blocos	2	0,659	0,330	0,101ns
Resíduo	34	11,112	0,327	
Total	53	24,500		

Os mesmos híbridos foram também testados quanto à capacidade de fermentação de extratos de *H. tuberosus*. Na Tabela 31 pode ser observada a variação mais ampla nesta matéria prima, na qual a linhagem testadora Fleischmann apresenta uma média de 3,33%GL, muito inferior à das linhagens inulinolíticas. Também neste caso pode-se observar variação entre a capacidade fermentativa das linhagens parentais (Tabela 31), e a ausência de variação entre a média dos parentais e os híbridos respectivos, denotando desta forma a ausência de efeitos de dominância e sobredominância envolvidos na fermentação deste substrato.

A atividade inulinolítica de linhagens e híbridos foi testada em três períodos de tempo, evidenciando-se na Tabela 33, que a linhagem KM21 apresenta a maior atividade enzimática, que os mutantes auxotróficos da linhagem IZ 1339

Tabela 31. Avaliação da fermentação de extrato de *H. tuberosus* por híbridos de *Kluyveromyces*. Dados em %GL de etanol de 3 fermentações consecutivas de 24 horas a 35°C.

Linhagens	I	II	III	$\bar{x}$
KM16	5,16	5,44	5,04	5,21
KM14	5,44	5,16	4,90	5,17
KM5	4,76	5,16	4,90	4,94
KM9	5,16	4,90	4,06	4,69
KM21	5,30	5,44	5,16	5,30
IZ148	4,76	4,90	4,76	4,81
KF3	5,44	5,30	5,16	5,30
KF6	1,88	2,56	3,66	2,70
MM1	5,30	5,44	4,90	5,21
MM28	4,76	5,30	4,76	4,94
MM50	5,04	5,04	5,04	5,04
MM51	5,16	5,16	5,16	5,16
MM70	4,90	5,44	4,90	5,08
MM80	4,90	5,16	5,16	5,07
MM81	5,04	4,90	4,90	4,95
MF1	4,76	5,04	4,62	4,81
MF4	4,48	5,44	4,90	4,94
Fleischmann				

Tabela 32. Análise de variância dos dados da tabela 4.30. Experimento inteiramente casualizado.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	17	23,888	1,405	13,91
Blocos	2	0,462	0,231	0,229ns
Resíduo	24	3,428	0,101	
Total	53	27,778		

Tabela 33. Avaliação da atividade inulinolítica extracelular de parentais e híbridos de *Kluyveromyces* em três dias. Dados em U/ml.

Linhagem	24 hs	48 hs	72 hs
MM90	28,19	248,56	193,86
MM51	33,09	372,10	335,92
MM50	31,87	261,96	320,77
KM21	15,93	1114,81	1143,66
IZ 1339	46,58	425,68	476,10
MF4	3,06	178,61	203,07
MM81	30,84	133,95	126,79
MM91	7,60	194,68	146,49
KF3	34,32	428,66	479,39
MM70	25,74	96,74	236,92
KM16	28,19	65,49	77,03
MM28	28,19	473,31	721,61
KM14	14,71	151,81	304,35
MM1	74,76	785,87	983,78
MM80	0,00	105,67	152,68
IZ610	45,35	303,63	534,95
KM5	7,97	116,09	193,22
FF	3,06	0,00	0,00
IZ148	26,97	87,81	155,33
MF1	56,38	406,33	436,96
KM9	57,61	148,84	121,24

apresentam redução drástica da atividade e que os híbridos exibem atividade intermediária entre os parentais.

A avaliação da capacidade de fermentação de extratos de *H. tuberosus* por parte de segregantes de híbridos entre linhagens de *K. marxianus* (MM1 e MM50) e o híbrido interespecífico entre *K. marxianus* e *K. fragilis* (KF1), permite observar a variação significativa existente entre os segregantes.

Nas Tabelas 34 e 35 pode ser observado que para valores de Δ (Tukey) 1% = 0,14 e Δ 5% = 0,12; a maior parte das médias dos segregantes apresentam variação significativa com relação à média dos parentais e à linhagem híbrida MM1; por outro lado, esta última difere significativamente da média das linhagens parentais KM9 e KM21, sendo muito próxima porém daquela da linhagem IZ 1339 da qual deriva o parental KM9. O segregante com produção mais elevada (MM1-1-68) apresentou média de 6,85%GL que em comparação com a média da linhagem selecionada IZ 1339 representa um ganho significativo de 5,9%, e um ganho de 8,6% em relação à média das linhagens parentais. Por outro lado, a linhagem segregante de menor produção (MM1-3-52) apresentou valor médio 22,4% menor que a linhagem IZ 1339 e 20,38% inferior à média dos parentais.

Nas Tabelas 36 e 37 a variação entre os segregantes do híbrido MM50 também é evidente, ressaltando as produções elevadas das linhagens MM50-15, -18 e -19 com produções de 6,10 e 6,00%GL, que correspondem a um ganho de 7,4% e 5,6%

Tabela 34. Avaliação da capacidade fermentativa de segregantes de MMI em extrato bruto de *H. tuberosus*. Dados em °GL de etanol de dois blocos com três fermentações consecutivas em cada, a 35°C por 24 horas.

Linhagens	Bloco A			Bloco B			$\bar{x}$
	I	II	III	I	II	III	
Fleischmann	4,20	4,20	4,06	4,18	4,20	4,00	4,14
IZ 1339 (Km)	6,14	6,86	6,42	6,14	6,70	6,56	6,47
KM9	6,56	6,86	5,72	6,56	6,56	6,14	6,40
KM21	6,65	5,16	6,56	6,42	6,00	6,56	6,21
MM1	6,00	6,56	6,86	6,14	6,56	6,86	6,50
MM1-1-1	6,42	6,86	6,86	6,14	7,14	6,86	6,71
MM1-1-2	6,70	6,70	6,28	6,86	6,86	6,42	6,64
MM1-1-13	6,00	6,14	6,14	6,00	6,00	6,14	6,07
MM1-1-31	6,70	7,00	6,56	6,86	6,86	6,70	6,78
MM1-1-33	6,00	6,14	6,14	6,14	6,00	6,14	6,09
MM1-1-34	5,86	5,72	5,86	5,86	5,44	5,72	5,74
MM1-1-44	6,70	6,14	6,14	6,42	6,14	6,42	6,33
MM1-1-53	6,70	5,58	6,28	6,70	5,44	6,42	6,19
MM1-1-54	6,65	6,86	6,42	6,56	6,86	6,42	6,61
MM1-1-56	6,28	5,44	6,14	6,14	5,44	6,28	5,95
MM1-1-58	6,28	6,42	6,28	6,28	6,28	6,42	6,33
MM1-1-61	6,70	7,14	6,42	6,86	7,14	6,28	6,76
MM1-1-68	6,70	7,14	6,70	6,86	6,86	6,86	6,85
MM1-2-29	6,56	6,86	6,14	6,56	6,56	6,42	6,52
MM1-2-41	6,42	6,70	6,28	6,42	6,70	6,28	6,47
MM1-2-67	6,42	6,56	6,42	6,42	6,56	6,56	6,49
MM1-3-10	6,56	6,42	6,56	6,56	6,56	6,56	6,54
MM1-3-31	5,44	6,56	5,72	5,44	6,14	6,14	5,91
MM1-3-42	6,14	6,56	6,14	6,14	6,56	6,14	6,28
MM1-3-46	6,70	6,86	6,56	6,70	6,70	6,70	6,70
MM1-3-47	6,86	6,86	6,28	6,86	6,86	6,28	6,67
MM1-3-50	6,86	6,86	6,42	6,70	6,70	6,56	6,68
MM1-3-51	6,42	6,56	6,28	6,42	6,70	6,14	6,42
MM1-3-52	4,90	5,04	5,04	5,04	5,04	5,04	5,02

Tabela 35. Análise de variância em parcelas subdivididas dos dados da tabela 33, com desmembramento dos segregantes.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	28	53,06407	1,89514	315,33**
Ea	1	0,00798	0,00798	1,33
Ferment.	2	0,37874	0,18937	10,01**
F x T	56	9,21512	0,16455	8,70**
F x B	2	0,11128	0,05564	2,94ns
Eb	56	1,04939	0,01892	
Total	173	64,00494		
Segregantes	23	23,4267	1,01855	169,48**
C.V. = 2,18%		$\Delta 1\% = 0,14$		
$\bar{x} = 6,2916$		$\Delta 5\% = 0,12$		
s = 0,1375				

Tabela 36. Avaliação da capacidade fermentativa de segregantes de MM 50 em extrato bruto de *H. tuberosus*. Dados em %GL de etanol de dois blocos com duas fermentações consecutivas em cada, a 35°C por 24 horas.

Linhagens	Bloco A		Bloco B		$\bar{x}$
	I	II	I	II	
Fleischmann	3,66	3,78	3,66	3,66	3,69
IZ 1339 (Km)	4,06	5,72	4,06	5,72	4,89
KZ 1821 (Km)	5,16	6,14	5,72	5,72	5,68

Cont.

Tabela 36. Continuação

Linhagens	Bloco A		Bloco B		$\bar{x}$
	I	II	I	II	
KM5	5,16	5,16	5,16	5,16	5,16
KM16	3,10	3,92	3,66	3,66	3,58
MM50	4,90	5,72	5,04	5,72	5,34
MM50-2	3,10	2,96	3,10	3,10	3,06
MM50-3	4,20	5,16	4,48	4,62	4,61
MM50-5	3,66	4,20	3,78	4,06	3,92
MM50-6	3,78	4,62	4,06	4,34	4,20
MM50-9	4,48	5,44	4,48	5,44	4,96
MM50-10	5,72	6,14	5,86	6,00	5,93
MM50-12	2,42	4,90	2,42	4,90	3,66
MM50-14	4,34	4,62	4,34	4,62	4,48
MM50-15	6,14	6,00	6,14	6,14	6,10
MM50-16	4,62	5,44	4,90	4,90	4,96
MM50-17	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72
MM50-18	6,14	6,00	6,14	6,14	6,10
MM50-19	5,86	6,14	6,00	6,00	6,00
MM50-20	5,72	6,14	5,72	6,00	5,89
MM50-22	5,72	5,44	5,44	5,72	5,58
MM50-26	1,74	4,20	1,74	4,20	2,97
MM50-29	3,66	4,62	3,78	4,48	4,13
MM50-30	2,86	3,78	3,10	3,78	3,40
MM50-31	4,76	5,44	4,76	5,44	5,10
MM50-33	4,20	5,72	4,76	4,60	4,82
MM50-32	4,06	4,48	4,06	4,48	4,27
MM50-34	3,78	4,90	4,78	4,90	4,34
MM50-36	5,16	5,44	5,44	5,44	5,37
MM50-39	5,16	5,42	5,16	5,16	5,22
MM50-41	5,44	4,62	5,44	4,62	5,03

Cont.

Tabela 36. Continuação.

Linhagens	Bloco A		Bloco B		$\bar{x}$
	I	II	I	II	
MM50-42	4,34	2,96	4,48	2,84	3,65
MM50-43	3,78	4,90	3,66	5,16	4,37
MM50-44	4,48	5,16	4,62	4,90	4,79
MM50-46	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72
MM50-54	4,62	5,16	4,90	4,90	4,89
MM50-61	3,92	4,34	3,92	4,34	4,13
MM50-63	4,48	4,90	4,62	4,62	4,65
MM50-64	3,66	4,76	3,66	4,76	4,19
MM50-65	4,90	5,04	4,90	4,90	4,93
MM50-67	2,84	2,96	2,96	2,96	2,93
MM50-68	6,00	5,72	6,00	6,00	5,92
MM60-70	4,34	4,34	4,34	4,34	4,34
MM50-71	3,92	3,92	3,92	3,78	3,88
MM50-76	3,52	3,68	3,68	3,52	3,60
MM50-82	5,16	4,90	5,16	5,16	5,09

Tabela 37. Análise de variância em parcelas subdivididas dos dados da tabela 36, com desmembramento dos segregantes.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	45	140,32409	2,11831	512,04**
Blocos	1	0,00003	0,00003	0,005ns
Erro(a)	45	0,27406	0,00609	
Fermentação	1	7,06695	7,06695	191,41**
F x T	45	21,14714	0,46993	12,73**
F x B	1	0,37442	0,37442	10,14**
Erro(b)	45	1,66169	0,03692	
Total	183	170,8484		
Segregantes	39	73,5992	1,8871	309,8783**
C.V. = 4,10%		$\Delta 1\% = 0,30$		
$\bar{x} = 4,6853$; s = 0,1921		$\Delta 5\% = 0,26$		

com respeito à linhagem IZ 1821, e um ganho de 39,6% e 37,3% em relação à média dos pais, respectivamente. Também são evidentes os baixos valores de produção exibidos por algumas linhagens, especialmente MM50-26 e 67, que apresentam decréscimos da ordem de 32 e 33% com relação à média dos parentais marcados, sendo estes inclusive inferiores aos exibidos pela linhagem testemunha Fleischmann.

A avaliação da produção de etanol a partir de extrato de *H. tuberosus*, por segregantes do híbrido interespecífico MF1, mostrou significância na variação entre segregantes, destacando-se as linhagens 1-29 e 1-33 com produções de 8,31%GL e 8,11%GL respectivamente, correspondendo a ganhos de 14,6 e 11,9% em relação à média das linhagens parentais (Tabelas 38 e 39).

A atividade inulinolítica em segregantes de MM1 e MM50 mostrou-se muito variável observando-se linhagens com alta atividade como MM1-1-31 e linhagens com atividade muito reduzida como MM1-3-52. Nos segregantes de MM50 as variações são menores, oscilando entre 650,60 U/ml e 333,33 U/ml. (Tabela 40).

Na Tabela 41 são apresentados os resultados de um teste de atividade enzimática dos extratos de segregantes e linhagens selecionadas, em sacarose e em inulina. Nela pode-se observar que as linhagens MM1-3-31 e MM1-3-52 apresentam baixa atividade sobre inulina, porém, mantendo elevada atividade sobre sacarose. Por outro lado, os híbridos MM1-1-31 e

Tabela 38. Avaliação da capacidade fermentativa de segregantes de MF1 em extrato bruto de *H. tuberosus*. Dados de etanol em °GL de dois blocos com duas fermentações consecutivas em cada um, a 35°C por 24 horas.

Linhagens	Bloco A			Bloco B			$\bar{x}$
	I	II	III	I	II	III	
Fleischmann	5,68	5,98	5,30	5,68	6,01	5,21	5,64
IZ 1339	5,05	6,72	7,66	5,18	6,54	7,62	6,46
IZ 275	7,86	6,83	8,22	7,71	7,01	8,35	7,67
KM9	6,08	6,66	8,68	6,08	6,87	8,56	7,16
KF3	6,92	7,68	7,45	7,10	7,45	7,45	7,34
MF1	6,98	7,73	8,90	6,92	7,68	8,74	7,83
I-1	7,16	7,82	8,74	7,10	7,76	8,90	7,91
I-3	4,68	6,35	9,23	4,68	6,35	8,96	6,71
I-4	4,26	5,44	8,35	4,24	5,50	8,40	6,03
I-6	5,92	6,87	8,48	6,00	6,74	8,48	7,08
I-7	6,95	7,10	8,56	7,10	7,10	8,36	7,53
I-8	6,71	6,86	7,81	6,71	6,86	7,90	7,14
I-9	5,90	6,07	7,71	5,82	6,22	7,66	6,56
I-10	3,63	7,46	8,05	4,00	7,10	8,15	6,40
I-12	5,03	6,42	7,30	5,13	6,35	7,20	6,24
I-15	3,46	6,64	7,31	3,46	6,73	7,10	5,78
I-16	4,90	5,37	7,94	4,93	5,46	7,81	6,07
I-18	6,46	6,57	9,28	6,46	6,55	9,18	7,42
I-19	6,12	7,74	9,03	6,07	7,90	9,03	7,65
I-21	5,98	8,35	9,87	6,03	8,22	8,83	8,05
I-22	5,93	7,80	9,17	6,09	7,64	9,26	7,65
I-26	6,94	7,71	9,06	6,75	7,80	9,13	7,90
I-29	8,15	7,88	8,90	8,04	8,11	8,78	8,31
I-30	4,33	7,80	8,92	4,33	7,83	8,90	7,02
I-31	6,06	5,66	8,40	6,06	5,66	8,43	6,71

Cont.

Tabela 38. Continuação.

Linhagens	Bloco A			Bloco B			$\bar{x}$
	I	II	III	I	II	III	
1-32	4,40	7,27	8,79	3,97	7,54	8,68	6,78
1-33	7,50	7,87	9,01	7,63	7,54	9,11	8,11
1-35	4,93	7,58	9,16	4,99	7,55	9,13	7,22
1-37	5,08	6,78	9,24	5,00	6,71	9,50	7,05
1-40	4,90	7,18	9,13	4,85	7,26	9,09	7,07
1-43	4,12	5,93	8,97	4,00	6,00	9,00	6,34
1-45	4,23	5,93	8,05	4,65	5,53	8,22	6,10
1-51	4,75	5,17	8,66	4,75	5,17	8,66	6,19
1-52	5,08	7,13	8,62	5,00	7,24	8,75	6,97
1-53	5,71	6,95	7,74	5,93	6,74	7,73	6,80
1-54	4,29	7,72	9,33	4,32	7,71	9,40	7,13

Tabela 39. Análise de variância em parcelas subdivididas dos dados da tabela 37, com desmembramento dos segregantes.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	F
Tratamentos	35	102,362	1386,09**
Blocos	1	0,001	0,33ns
Erro (a)	35	0,074	
Segregantes	29	81,954	1339,33**
Fermentações	2	292,127	10221,39**
F x T	70	96,765	96,74**
F x B	2	0,012	0,44ns
Erro (b)	70	1,000	
Total	215	492,343	

Tabela 40. Avaliação da atividade inulinolítica dos extratos enzimáticos brutos de segregantes selecionados de MM1 e MM50. Dados em U/ml.

Linhagens	30 hs.	48 hs.	72 hs.
IZ 619	99,65	634,14	698,79
IZ 1339	66,67	256,10	289,15
IZ1821	94,74	313,01	437,75
MM1	105,96	609,75	807,22
MM50	157,89	178,86	417,67
MM1-3-31	28,07	113,82	136,54
MM1-1-31	150,88	1162,59	1317,26
MM1-1-34	147,37	528,45	730,92
MM1-3-52	41,40	73,17	96,38
MM1-1-56	52,63	559,35	716,46
MM1-1-61	268,07	1886,17	1130,92
MM1-1-68	124,91	556,91	746,98
MM50-15	41,40	227,64	409,64
MM50-18	21,75	208,94	333,33
MM50-19	77,19	306,50	578,31
MM50-20	80,70	394,31	626,50
MM50-26	44,91	307,31	566,26
MM50-67	81,40	300,81	650,60

Tabela 41. Teste de atividade enzimática dos extratos enzimáticos após 72 horas de crescimento de segregantes e linhagens sobre sacarose e sobre inulina. Dados em U/ml.

Linhagens	Sacarose	Inulina
IZ 619	1220,03	795,20
IZ 1339	1189,53	302,83
IZ 1821	1466,22	257,08
MM1-3-31	1503,25	44,55
MM1-1-31	1368,82	1323,73
MM1-3-52	1363,82	31,45
MM1-1-61	1272,32	1529,39

MM-1-61 exibem alta atividade em ambos os substratos, sendo a sua atividade sobre inulina, o dobro da apresentada pela maior linhagem parental.

A análise genética dos híbridos MMRI e MMR3 sumarizada na Tabela 42, mostra a existência de dois genes associados à degradação de inulina, presente nas linhagens IZ 1339 e IZ 619, respectivamente.

Após testar a obtenção de híbridos entre *K. mar*xianus e *K. lactis* por cruzamentos naturais, procedeu-se à obtenção destes híbridos através de fusão de protoplastos.

As linhagens KM9 met⁻ (K.m.) e KL 18 lys⁻ (K.l) permitiram obter taxas de esferoplastização da ordem de 100% e 96% respectivamente, e taxas de reversão das marcas inferiores a 5×10^{-8} em ambos os casos. No meio seletivo, foram isolados produtos de fusão na frequência de 1×10^{-6} . Os produ-tos de fusão mostraram-se variáveis quanto ao conteúdo de DNA, e volume celular, porém, sendo estes sempre maiores do que as linhagens parentais (Tabela 43).

A capacidade de assimilação de fontes de carbono dos híbridos correspondeu à combinação das fontes assimiláveis por ambos os parentais, de forma que foram capazes de assimilar lactose como *K. lactis* e inulina como *K. mar*xianus (Tabela 44). Além destas características os produtos de fu-são expressaram o caráter "killer" procedente de KM9, sendo capazes de matar as leveduras "killers" de *Saccharomyces cere*visiae (Tabela 45).

Tabela 42. Segregação dos híbridos MMR1 e MMR3 para as marcas auxotróficas e o caráter inulina.

MM1-1-31 ($\text{arg}_1 \text{Inl}^+$) x MM1-3-52 ($\text{met}_1 \text{inl}^-$)

↓

MMR1 (2n)

PROTOTRÓFICO- Inl^+

Arg Met Inl	203
Arg met Inl	320
arg Met Inl	298
arg met Inl	189
Arg Met inl	22
Arg met inl	68
arg Met inl	13
arg met inl	74
	<hr/>
	1187

MM1-3-52 ($\text{met}_1 \text{inl}^-$) x KM5 ($\text{leu}_1 \text{Inl}^+$)

↓

MMR3 (2n)

PROTOTRÓFICO - Inl^+

Met Leu Inl	111
met Leu Inl	134
met leu Inl	123
Met leu Inl	119
Met Leu inl	139
met Leu inl	112
met leu inl	116
Met leu inl	128
	<hr/>
	982

Tabela 43. Avaliação do conteúdo de DNA e o volume celular de parentais e produtos de fusão entre *K. marxianus* e *K. lactis*.

Linhagens	Comprimento	Largura	Volume	Cont. DNA
KM9	5,35	3,89	32,80	18,35
KL18	4,71	3,64	42,40	16,17
FML-01	4,92	3,96	40,40	26,99
FML-02	5,89	4,12	52,35	25,81
FML-03	6,18	3,96	50,74	17,79
FML-04	6,37	4,42	65,20	41,61
FML-05	6,08	3,84	46,90	26,78
FML-09	5,02	4,07	43,54	21,87
FML-11	4,84	4,11	42,80	33,20

Tabela 44. Avaliação da capacidade de assimilação de fontes de carbono por produtos de fusão entre *K. marxianus* e *K. lactis*.

Linhagens	Arabinosa	Lactose	Maltose	Melezitose	Inulina
KM9	-	-	-	-	***
KL18	**	***	***	***	-
KML-04	**	***	**	**	***
FML-05	**	**	**	**	***
FML-08	*	*	*	*	***
FML-09	**	***	***	**	***
FML-11	-	***	***	**	***

Tabela 45. Avaliação do caráter "killer" em produtos de fusão.

Linhagens	AH22	IZ 1339	KL18	ABxR-11A	FML-04
AH22	-	-	-	-	-
IZ 1339	++	-	-	++	-
KL18	-	-	-	-	-
FML-04	++	-	-	++	-
FML-05	++	-	-	+	-
FML-09	+	-	-	+	-
FML-11	++	-	-	++	-

A avaliação da capacidade de fermentação de glicose, lactose e extrato de *H. tuberosus*, mostra na Tabela 46, que os híbridos apresentam capacidade fermentativa de glicose variável, sendo esta inferior aos parentais no híbrido FML-04, semelhante a IZ 1339 em FML-05 e FML-11 é superior a ambos os parentais no produto FML-09

Os quatro híbridos testados mostram fermentação de inulina (extrato de *H. tuberosus*) com produção de etanol semelhante ao parental IZ 1339. Quanto à fermentação de lactose, os híbridos mostraram-se variáveis, apresentando no caso de FML-04 e FML-09 valores próximos de *K. lactis*, e muito inferiores a este parental em FML-05 e FML-11.

Tabela 46. Avaliação da capacidade fermentativa de lactose, glicose e extrato de *H. tuberosus* por produtos de fusão entre *K. marxianus* e *K. lactis*.

Linhagens	13% glicose	13% extr.. <i>H. tuberosus</i>	3% lactose
Fleischmann	7,734 ± 0,152	3,963 ± 0,315	0,000
KM9	6,683 ± 0,201	5,796 ± 0,208	0,000
KL18	6,171 ± 0,111	2,283 ± 0,112	1,340 ± 0,038
FML-04	5,064 ± 0,204	5,743 ± 0,342	1,158 ± 0,121
FML-05	6,780 ± 0,103	5,536 ± 0,204	0,706 ± 0,209
FML-09	7,301 ± 0,099	5,233 ± 0,094	1,026 ± 0,264
FML-11	6,641 ± 0,215	5,530 ± 0,209	0,258 ± 0,125

Todos os produtos de fusão foram capazes de esporular em meio de rafinose-acetato, dando lugar a ascos com baixo percentual de esporos. Verificou-se que os ascos e os ascósporos apresentam morfologia como os de *K. marxianus*, sendo os esporos reniformes e não esféricos como os de *K. lactis*. A avibilidade dos esporos mostrou-se muito reduzida, embora os híbridos apresentassem alta estabilidade mitótica.

5. DISCUSSÃO

A discussão obedecerá a ordem de apresentação dos resultados, considerando-se os itens: seleção de leveduras para a fermentação alcoólica de extratos de *H. tuberosus*, atividade inulinolítica e inulinase extracelular de leveduras e aspectos genéticos do gênero *Kluyveromyces*.

5.1. SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE EXTRATOS DE *H. tuberosus*

A avaliação preliminar de leveduras quanto ao crescimento em meio contendo inulina como única fonte de carbono, permitiu selecionar dentre 75 linhagens pertencentes a 21 espécies de leveduras, 17 linhagens promissoras com bom crescimento neste polifructosídeo. Foi utilizada a inulina para selecionar leveduras adequadas à fermentação de extratos

de tubérculos de *H. tuberosus*, com base na composição de carboidratos deste vegetal, o qual apresenta 15% dos açúcares totais na forma de inulina ($F = 31$). Os carboidratos restantes são na maior parte formas intermediárias da síntese ou decomposição deste polifructosídio, e portanto, exibem o mesmo tipo de ligação $\beta - 1,2$, e assim, para se obterem altos rendimentos fermentativos é necessária a utilização de todos os açúcares presentes no extrato (CHABBERT et alii, 1983).

Estas 17 linhagens selecionadas pertencem a 11 espécies de leveduras (Tabela 1): *Candida tropicalis*, *C. utilis*, *C. pseudotropicalis*, *S. cerevisiae*, *Schw. castelli*, *Schw. alluvius*, *S. fermentati*, *P. polymorpha*, *K. fragilis*, *K. marxianus* e *Torulopsis colliculosa*. Estes resultados estão de acordo com os de BARNETT e PANKHURST (1974), embora algumas linhagens de *C. pseudotropicalis*, *T. colliculosa* e *C. utilis* consideradas como assimiladoras de inulina não apresentaram esta característica.

A avaliação das linhagens selecionadas, quanto à fermentação de inulina, mostrou que as espécies *K. marxianus*, *K. fragilis* e *T. colliculosa* são aquelas com maior capacidade fermentativa, exibindo rendimentos acima de 50% com 24 horas de fermentação (Tabela 2). Os maiores rendimentos porém, foram obtidos com as linhagens IZ 1339 (76,5%) e IZ 619 (74,5%) ambas pertencentes a *K. marxianus*. Nos trabalhos realizados por GUIRAUD et alii (1981a) também foram consideradas estas

três espécies como as mais promissoras, ressaltando-se também neste caso o potencial de *K. marxianus*.

A capacidade fermentativa das leveduras selecionadas, foi confirmada mediante ensaios em extratos de *H. tuberosus* (Tabela 3 e Figura 1). Reiterando os resultados anteriores, as linhagens com maiores rendimentos foram pertencentes às espécies de *K. marxianus*, *K. fragilis* e *C. pseudotropicalis*. Os rendimentos mais elevados foram registrados pelas linhagens IZ 610 (69,89%) de *K. fragilis* e IZ 1339 (69,34%) de *K. marxianus* com teores alcoólicos médios de 6,6%GL e 6,5%GL, respectivamente. As linhagens de *T. colliculosa* e *S. cerevisiae* avaliadas neste ensaio, não superaram 50% de rendimento. Os rendimentos obtidos neste ensaio foram baixos quando comparados com os dados de GUIRAUD et alii (1981a), GUIRAUD et alii (1981b) e MARGARITIS et alii (1983), porém, estes rendimentos correspondem à média de três fermentações consecutivas de 24 horas com reciclo de células, e não a fermentações individuais com tempos prolongados até o término do processo fermentativo como nos casos citados. A vantagem da realização de fermentações com tempo reduzido, é que através dos resultados obtidos, torna-se possível diferenciar as leveduras pela taxa fermentativa.

As várias linhagens de leveduras pertencentes às espécies *K. marxianus*, *K. fragilis*, *C. pseudotropicalis* e *T. colliculosa* foram avaliadas quanto à fermentação de extratos de *H. tuberosus* em fermentações consecutivas de 48 horas

com reciclo de células (Tabela 4), resultando teores alcoólicos de até 8,8%GL e rendimentos médios de até 84,9%, os quais foram significativamente superiores aos valores apresentados por *S. cerevisiae* (Tabela 5). As variações significativas evidenciadas entre linhagens do gênero *Kluyveromyces*, indicam a existência de variabilidade genética que pode ser explorada em programas de melhoramento. Em todas as referências anteriores nas quais foram avaliadas mais de uma linhagem deste gênero, podem ser verificadas variações entre estas (GUIRAUD et alii, 1981a e 1981b; MARGARITIS et alii, 1983). No caso específico de resultados de DUVNJAK et alii (1982), as duas linhagens de *K. marxianus* avaliadas chegam a apresentar rendimentos de 79,7% e de 87,5%, respectivamente.

A cinética de fermentação de extratos de *H. tuberosus* das linhagens selecionadas IZ 1339 de *K. marxianus*, IZ 610 de *K. fragilis* e a testemunha *Fleischmann*, em sistema sem agitação (Tabela 6 e Figura 2), permitiu observar que a linhagem IZ 1339 apresenta uma produtividade global elevada, da ordem de $5,96 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, com produtividade específica de $1,79 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, durante as primeiras 10 horas, atingindo ao término deste período 74,4% de rendimento com 7,5%GL. Porém, o máximo de produção só foi atingido com 48 horas, com 8,5%GL e rendimento de 83,9%, o que corresponde à produção de somente 1%GL de álcool durante 38 horas. Este valor não considera a evaporação do álcool neste período. Esta situação provoca uma redução drástica da produtividade global para $1,12 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$,

e da produtividade específica para $0,32 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, até o término da fermentação. No caso de IZ 610 ocorreu uma fase logarítmica de produção durante as primeiras 24 horas de processo, atingindo com este tempo 7,14%GL e 70,76% de rendimento. A produtividade global máxima de $2,26 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, é menos da metade da taxa máxima observada para IZ 1339, reiterando as vantagens de *K. marxianus* para a fermentação de extratos de *H. tuberosus*.

A redução drástica da taxa de fermentação, a partir das 10 horas de processo, pode ser também atribuída aos problemas de transferência de massa resultante da utilização de escalas de bancada para a avaliação de cinéticas fermentativas. Nestas condições surgem problemas tais como decantação do fermento e distribuição não homogênea do substrato e do produto. Mesmo com estas desvantagens, os resultados exibidos por IZ 1339 são superiores aos descritos por DUVNJAK et alii, (1981), embora com produtividades mais baixas (3,6%).

Em ensaio cinético comparativo entre *K. marxianus* e *S. cerevisiae* com agitação (Tabela 7 e Figura 3) a produção máxima de *K. marxianus* foi atingida com 12 horas de fermentação, correspondendo a um teor alcoólico de 9,84%GL, rendimento de 96,56% e eficiência de 98,50%. Com esta nova condição, na qual a transferência de massa ficam maximizadas, a produtividade global de IZ 1339 passou a ser de $7,83 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, e a produtividade específica de $2,35 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Estas produtivi

dades são mais elevadas, que os dados obtidos para fermentações em batelada por DUVNJAK et alii (1981 e 1982), sendo somente comparáveis com as produtividades máximas obtidas por MARGARITIS e BAJPAI (1982) em fermentações contínuas com células livres de *K. marxianus*, nas quais foram obtidas produtividade volumétrica de $7 \text{ g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$ e produtividade específica de $2,6 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Os rendimentos e a eficiência fermentativa de IZ 1339 neste ensaio são comparáveis com os melhores resultados obtidos com cana de açúcar, confirmando o potencial da fermentação de extratos de *H. tuberosus*.

A análise cromatográfica dos açúcares do extrato de *H. tuberosus* durante a fermentação do mesmo por *K. marxianus* IZ 1339, permite observar na Figura 4, a ausência de um efeito marcado de diauxia, já que tanto mono, oligo como polissacarídeos são degradados e consumidos durante todo o processo fermentativo. As diferenças existentes na hidrólise dos polissacarídeos, os quais permanecem no fim da fermentação, não corresponde a um verdadeiro efeito de diauxia mas à menor eficiência das enzimas sobre este tipo de moléculas (SNYDER e PHAFF, 1960; GUIRAUD et alii, 1982b).

Devido a que as enzimas inulinolíticas de *K. marxianus* são excretadas no meio de fermentação sendo portanto, uma nova síntese necessária a cada batelada, verifica-se reduzido consumo de inulina no início da fermentação. Desta forma o processo de fermentação contínua apresentaria óbvias

vantagens sobre a fermentação de extratos de *H. tuberosus* em bateladas. Isto justifica os resultados favoráveis obtidos por KOSARIC et alii (1982) e por MARGARITIS e BAJPAI (1982 a e b), especialmente utilizando células imobilizadas.

Com a observação de que as enzimas inulinolíticas de *Torulopsis colliculosa* encontram-se associadas à parede celular, e não são excretadas no meio, foram realizados ensaios cinéticos para estabelecer a sua capacidade de fermentação de extratos de *H. tuberosus*, avaliando-se também a possível alternativa contra a lixiviação de enzima durante os processos de fermentação em batelada. Os resultados obtidos (Tabela 8 e Figura 5) mostram que estas leveduras apresentam produtividade volumétrica e específicas muito reduzidas, quando comparadas com *K. marxianus* e *K. fragilis*, sendo incapazes de completar a fermentação mesmo com 22 horas de processo, quando ainda restaram de 34,6 a 30,6% dos açúcares redutores totais. A concentração de células provocou um aumento proporcional da produtividade volumétrica de etanol (Tabela 9 e Figura 6), sendo esta de 2,15; 2,87 e 3,38 g.l⁻¹h⁻¹ para as concentrações celulares de 1%, 5% e 10% respectivamente. Porém, ocorreu um decréscimo da produtividade específica de 6,45 g.g⁻¹.h⁻¹ para 1,015 g.g⁻¹h⁻¹ com o aumento do teor de fermento de 1 para 10% (peso fresco). Com base nestes resultados, *T. colliculosa* não se apresenta como uma opção vantajosa na fermentação alcoólica de *H. tuberosus*. As comparações com os dados da literatura ficam prejudicadas, por não considerarem efeitos ci-

néticos e utilizarem períodos de fermentação muito elevados de 4 a 7 dias (GUIRAUD et alii, 1981a e b).

As curvas cinéticas obtidas para as fermentações de glicose e de extratos de *H. tuberosus* permitiram a comparação da capacidade de fermentação destes dois substratos, individualizando os efeitos devidos à degradação da inulina. Com excessão da linhagem IZ 1735 de *C. guilliermondii*, as outras leveduras pertencentes a *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Candida* apresentaram taxas elevadas de fermentação de glicose, ressaltando entre as linhagens de *Kluyveromyces* a cepa IZ 619 (Tabela 10 e Figura 7). Independente da espécie, as leveduras testadas exibiram produtividades volumétricas elevadas da ordem de 4,26 a 5,45 g.l.⁻¹.h⁻¹

As mesmas linhagens apresentaram diferenças maiores, quando comparadas quanto à cinética e capacidade de fermentação de extratos de *H. tuberosus*. Os resultados da Tabela 11 e Figura 8, permitiram observar que as linhagens IZ 1735 (*C. guilliermondii*); Fleischmann (*S. cerevisiae*) e NRRL-Y 2416 (*S. diastaticus*) apresentaram taxas de fermentação muito reduzidas, atingindo teores alcoólicos menores do que as linhagens pertencentes a espécies inulinolíticas, não ultrapassando produtividades volumétricas da ordem de 2,73 g.l.⁻¹.h⁻¹. Por outro lado, as leveduras do gênero *Kluyveromyces* e a linhagem IZ 431 de *C. pseudotropicalis* tiveram produtividades entre 3,70 e 5,78 g.l.⁻¹.h⁻¹. Dentre as linhagens testadas aquela com maior produtividade em extrato foi IZ 431 com 5,78

$\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, e a de menor produtividade foi NRRL-Y-2416 com $1,12 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A comparação das produtividades em glicose e em extrato de *H. tuberosus* permitem concluir que as leveduras *Saccharomyces* e *C. guilliermondii*, possuem capacidade de fermentação limitada especificamente, devido a ausência de produção de enzimas inulinolíticas. As leveduras inulinolíticas mostraram-se igualmente eficientes na fermentação de ambos substratos.

A avaliação do conteúdo de etanol e da concentração final de açúcares redutores totais nos vinhos do experimento anterior, permitiram evidenciar rendimentos elevados em ambos os substratos para as linhagens pertencentes a *Kluyveromyces* e *C. pseudotropicalis*, enquanto, as linhagens NRRL-Y-2416 e IZ 1735 não completaram a fermentação dos açúcares presentes no extrato, restando mais de 2% de ART. na forma de polissacarídeos. As diferenças de rendimento entre *Fleischmann* e NRRL-Y-2416 podem ser atribuídas à variação na permeabilidade da parede destas linhagens a moléculas de oligo- e polissacarídeos, ou a diferenças na atividade invertásica.

Os resultados obtidos diferem daqueles de DUVNIJAK et alii (1982), pois as linhagens de *S. cerevisiae* e *S. diastaticus* testadas exibiram taxas de fermentação e rendimentos muito reduzidos, enquanto estes obtiveram produtividades semelhantes mas rendimentos entre 78 e 84%, respectivamente para estas duas espécies. A aparente diferença entre os resultados podem ser atribuídas à variação entre linhagens de *Saccha*

romyces quanto a capacidade de fermentação de extratos de *H. tuberosus*, como pode ser visto na Tabela 3.

A análise dos compostos leves e alcoóis superiores dos vinhos fermentados (Tabela 13), permite estabelecer a existência de diferenças significativas na composição de acetona e metanol, quando comparadas as fermentações de glicose e extratos de *H. tuberosus*. Estas diferenças foram independentes da espécie de levedura e da sua capacidade de fermentação em qualquer um dos substratos, o que indica que tais diferenças estão associadas à composição destes meios de fermentação. Em média a produção de acetona nos extratos de *H. tuberosus* fermentados foi três vezes maior do que em glicose, e a concentração de metanol foi 90 vezes maior.

Em todo processo fermentativo, a velocidade de crescimento e a produção de biomassa representam fatores fundamentais à manutenção da estabilidade do processo industrial, já que ambas garantem a população microbiana no sistema. A velocidade específica de crescimento, representada pelo aumento da densidade ótica em função do tempo, (Tabela 14 e Figura 9) permite observar que a linhagem 12 1339 de *K. marxianus*, apresenta além de alta capacidade fermentativa, taxa de crescimento mais elevada tanto em sacarose e dextrose, quanto em inulina. Comparando-se as velocidades de crescimento em cada um dos substratos para as linhagens avaliadas, pode ser observa-

do em todos os casos, que a taxa de crescimento em inulina é inferior à exibida nas outras duas fontes de carbono. Esta diferença pode ser associada à necessidade de síntese do sistema enzimático inulinolítico pela linhagem antes de atingir um máximo de velocidade de multiplicação e utilização do substrato, aumentando desta forma, a fase LAG no início do crescimento.

Tanto a fermentação alcoólica quanto o crescimento em inulina, dependem da ação da β - fructo furanosidase liberada no meio de cultura, e portanto, cabe a seguir uma discussão especial sobre este tema.

5.2. ATIVIDADE INULINOLITICA E INULINASE EXTRACELULAR DE LEVEDURAS

Os extratos enzimáticos utilizados no presente trabalho, correspondem a preparações brutas do meio de cultivo no qual foram crescidas as leveduras, desta forma os dados correspondentes a atividade enzimática são referentes à uma mistura e não a atividade específica das enzimas inulinolíticas. Esta observação torna-se de fundamental importância em certos testes desenvolvidos, em especial naqueles de especificidade do extrato por açúcares como veremos posteriormente.

As linhagens com capacidade parcial de fermentação de inulina como *S. cerevisiae*, *C. guillieromondii* e *T.*

colliculosa, as quais não ultrapassam 50% de rendimentos em extratos de *H. tuberosus*, não exibiram produção de inulinase extracelular, o que está de acordo com as observações de WEIDENHAGEM (1941) e de ADAMS et alii (1943), quanto à ação da invertase sobre a inulina. *Saccharomyces* assim como outras leveduras que apresentam a invertase no espaço periplásmico, não conseguem degradar inulina pois este polissacarídeo não ultrapassa a parede celular, porém degradam oligossacarídeos menores aos quais esta é permeável. No caso de *T. colliculosa* e de *C. guilliermondii*, a parede celular permite a passagem de moléculas maiores, e desta forma possibilita rendimentos fermentativos superiores aos de *Saccharomyces*. Em contraposição as leveduras *K. marxianus*, *K. fragilis*, e as suas formas imperfeitas, *C. macedoniensis* e *C. pseudotropicalis* (LODDER, 1970), são capazes de excretar uma enzima com atividade de β -fructofuranosidase, com alta capacidade de hidrolizar inulina. No presente trabalho verificaram-se atividades da ordem de 3588,31 U/ml e 1372,58 U/ml para IZ 1339 e IZ 610 respectivamente, após 72 horas de crescimento em meio contendo inulina como única fonte de carbono.

Esta inulinase foi identificada inicialmente por SNYDER e PHAFF em 1960 em *K. fragilis*, hidrolizando as ligações β -1,2 e β -1,6, retirando as unidades de frutose terminais. Os resultados obtidos com IZ 1339 e IZ 610 correspondem a atividades muito superiores as observadas por estes autores, os quais foram de aproximadamente 300 U/ml.

As leveduras avaliadas neste trabalho, pertencentes a *K. marxianus* e *K. fragilis*, mostraram-se com diferente atividade inulinolítica, e como se observa na Tabela 15, destacam-se as elevadas atividades enzimáticas das linhagens, IZ 1339 e IZ 619 de *K. marxianus* e da linhagem IZ 275 de *K. fragilis*. A comparação dos dados de atividade enzimática com as concentrações de açúcares redutores, permitem verificar com maior evidência em *K. fragilis* IZ 429, que a alta concentração de açúcares redutores no meio (1×10^{-3} M frutose), reflete em baixa atividade enzimática, caracterizando um efeito de repressão catabólica. Num segundo grupo de linhagens avaliadas (Tabela 16) destacam-se as leveduras IZ 619 e NRRL-Y-7521 quanto à atividade inulinolítica extra celular. Estes resultados permitem a seleção de linhagens superiores, sugerindo a possibilidade de exploração da variabilidade existente entre linhagens no melhoramento de *Kluyveromyces*.

O efeito de repressão catabólica anteriormente citado, fica caracterizado com base nos resultados da cinética de atividade inulinolítica durante o crescimento das leveduras *Kluyveromyces*, IZ 1339 e IZ 610, em meio contendo inulina como única fonte de carbono. Na Tabela 17 e Figura 10 é possível evidenciar que a atividade inulinolítica extracelular de IZ 610 sofre uma redução drástica quando a concentração de açúcares redutores no meio atinge 2×10^{-3} M. Já no caso de IZ 1339 este efeito é menos notório, porém, uma pequena redução de atividade foi observada em concentrações de

$2 \times 10^{-3}M$ de açúcares redutores. Efeitos de repressão catabólica tem sido descritos para as inulinases de *Debaryomyces cantarelli*, (BELUCHE et alii, 1980), *Candida salmenticensis* (GUIRAUD et alii, 1980), *Debaryomyces phaffii* (DEMEULLE et alii, 1981) e *Pichia polymorpha* (CHAUTARD et alii, 1981) na mu tantes desreprimidos foram selecionados em 2-desoxi-D-glicose (BAJON et alii, 1984). Um teste adicional desenvolvido com estas leveduras mostrou que somente *K. fragilis* (IZ 610 e IZ 275) apresentam sensibilidade a concentrações de $3 \times 10^{-3}M$ de 2-desoxi-D-glicose, enquanto *T. colliculosa* (IZ 1970 e IZ 1967) e *K. marxianus* (IZ 1339 e IZ 1821) continuam a crescer normalmente em meio de inulina com estas concentrações do análogo de glicose, caracterizando assim a repressão catabólica em *K. fragilis*, e permitindo antever a possibilidade de utilizar este análogo na seleção de mutantes desreprimi dos desta espécie.

A redução drástica da atividade durante as curvas cinéticas (Figura 10), associada a estabilidade da enzima inulinolítica (3 a 4 dias a temperatura ambiente), permitem considerar que o efeito da glicose ou frutose sobre a enzima é tanto de retroinibição como de repressão catabólica.

A semelhança do que tem sido observado em outras leveduras inulinolíticas como *D. cantarelli*, *C. salmenticensis*, *D. phaffii* e *P. polymorpha* (BELUCHE et alii, 1980; GUIRAUD et alii, 1980; DEMEULLE et alii, 1981; CHAUTARD et alii, 1981), a enzima inulinolítica de *K. fragilis* mostrou ser

induzida por inulina, e em menor grau por sacarose (Tabela 18). No entanto, *K. marxianus* apresentou alta atividade em todas as fontes de carbono utilizadas, mesmo em glicose e na ausência de açúcares, sendo a produção de inulinase desta levedura constitutiva. No caso particular de IZ 619, a inulina, a sacarose e a celobiose, provocam um aumento da atividade inulinolítica extracelular, o qual pode estar associado à produção de duas enzimas por esta linhagem (uma constitutiva e uma induzível), ou a um estímulo de síntese por parte destes carboidratos.

Considerando que a inulina é incapaz de penetrar através da parede celular, e que a sacarose não induz a síntese de inulinase em *K. fragilis* no mesmo grau que a inulina, pode-se considerar que oligossacarídeos de baixo peso molecular são os indutores desta enzima.

Os resultados da Tabela 19 quanto à especificidade do extrato enzimático mostra que neste existe alta atividade invertasica, e baixa atividade inulinolítica, porém, este teste como já foi discutido é inconsistente para estabelecer a especificidade da própria inulinase.

Um fator importante para a utilização destas leveduras, ou da enzima das mesmas, é estabelecer as condições ótimas para a degradação de inulina. Na tabela 20 e Figura 11 foram evidenciados dois picos de atividade enzimática em pH diferentes, resultando a maior atividade em pH 7,0. Este resultado pode ser explicado através de uma das duas possibilidades seguintes: (i) a atividade da enzima ter realmente

dois pH ideais como foi observado por SNYDER e PHAFF em *K. fragilis*, onde a enzima apresenta um pH ótimo para a hidrólise de sacarose (pH 4,0) e outro para hidrólise de inulina (pH 6,0), ou dois pH ótimos como em *D. cantarelli* (BELUCHE et alii, 1980); ou (ii) a presença de duas enzimas inulinolíticas com pH ótimos diferentes como foi observado em *P. polymorpha* (CHAUTARD et alii, 1981).

Os dados da Tabela 21 e Figura 12, mostram que as enzimas inulinolíticas são sensíveis a temperaturas superiores a 50°C tanto em *K. marxianus*, quanto *K. fragilis*, ao igual do que as enzimas inulinolíticas de outras leveduras como *D. cantarelli* (BELUCHE et alii, 1980), *C. salmenticensis* (GUIRAUD et alii, 1980) e *P. polymorpha* (CHAUTARD et alii, 1981), porém sendo mais sensíveis a inativação térmica do que a inulinase de *D. Phaffii* a qual é estável até 55°C.

5.3. ASPECTOS GENÉTICOS DO GÊNERO *Kluyveromyces*

Após caracterizar *Kluyveromyces marxianus* e *K. fragilis* como as espécies com maior potencial para a fermentação de inulina e conseqüentemente para a fermentação de extratos de tubérculos de *H. tuberosus*, foram desenvolvidos trabalhos visando o estudo genético de caracteres importantes na fermentação e o melhoramento genético de *K. marxianus* para a fermentação deste polifructosídeo.

Apesar dos problemas existentes na classificação de leveduras do gênero *Kluyveromyces* (CAMPBELL, 1972; PRICE et alii, 1978; e JOHANNSEN e VAN DER WALT, 1978), e especialmente na definição de *K. marxianus*, adotamos como tais as linhagens classificadas com este nome e que se ajustam às características definidas para esta espécie por LODDER (1970), sendo estas: a condição haplóide e a ausência de assimilação e fermentação de lactose, duas características que auxiliam na separação de *K. fragilis* e *K. marxianus*. De um total de 13 linhagens de *K. marxianus* foram encontradas cinco linhagens que se ajustaram à classificação, sendo estas: IZ 1339, IZ 1821, IZ 619, IZ 148 e NRRL-Y-1207.

As leveduras do gênero *Kluyveromyces* estudadas não apresentaram auxotrofias, todas elas foram capazes de crescer e fermentar inulina e quatro delas exibiram o caráter "killer".

Devido a importância industrial e acadêmica do caráter "killer", o qual representa uma forma de controle de contaminações por leveduras selvagens durante os processos industriais de multiplicação de fermento e durante a própria fermentação, foi dada uma ênfase especial ao estudo do caráter em *Kluyveromyces marxianus*.

Em experimento preliminar foram testadas quanto ao caráter "killer" uma série de leveduras pertencentes a 10 gêneros e 29 espécies, dentro das quais foram evidenciadas

10 linhagens "killers" (Tabela 22) ressaltando duas linhagens pertencentes a *K. marxianus*, sendo estas IZ 1339 e IZ 1821.

Através de um teste de sensibilidade entre linhagens "killers" pertencentes a *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, foi observado que as linhagens de *K. marxianus* são resistentes às toxinas de *Saccharomyces cerevisiae* tanto do tipo K1, quanto K2, representadas no experimento pelas linhagens AB x R-11A e 76-171, respectivamente. Ao mesmo tempo, a toxina liberada no meio de cultivo pelas linhagens "killers" de *K. marxianus* mata todas as linhagens "killer" ou normais de *Saccharomyces* por nós testadas (Tabela 23).

O caráter "killer" tem sido identificado em vários gêneros de leveduras, incluindo *Kluyveromyces* (PHILLISKIRK e YOUNG, 1975; STUMM et alii, 1977; ROSSINI et alii, 1983), porém, esta é a primeira referência sobre a ocorrência deste caráter em *K. marxianus*.

Os estudos genéticos do caráter "killer" tem sido amplamente desenvolvidos em *Saccharomyces*, onde o caráter é codificado por plasmídios de RNA circulares e de fita dupla (WICKNER, 1976), sendo a sua expressão influenciada e modificada por genes nucleares e citoplasmáticos (WICKNER e LEIBOWITZ, 1976; WICKNER, 1977). Em *Kluyveromyces* os estudos sobre o caráter "killer" são recentes e limitam-se ao estudo deste caráter em *K. lactis* (GUNGE et alii, 1981), na qual foram identificados dois plasmídios de DNA lineares chamados p GKL1 e p GKL2 caracterizados como responsáveis pelo carã-

ter. Estas leveduras são capazes de matar linhagens sensíveis de *Saccharomyces*, algumas de *S. italicus*, *K. lactis*, *K. termo**tolerans* e *K. vanudenii*.

O aspecto de ação do caráter "killer" identificado em *K. marxianus* (linhagens IZ 1339) apresenta-se muito amplo, como mostram os resultados da tabela 24, sendo capaz de eliminar todas as linhagens pertencentes ao gênero *Saccharomy**ces* por nos testadas, porém sendo muito ineficiente sobre leveduras do próprio gênero *Kluyveromyces*. A comparação do seu espectro com o de linhagens de *Saccharomyces* permite evidenciar sua amplitude e as diferenças existentes entre o caráter dos dois gêneros.

Uma possibilidade levantada foi que o caráter observado em *K. marxianus* pudesse ser determinado pelos mesmos plasmídios já identificados em *K. lactis*. Para tanto, foi feito um teste para avaliar a expressão do caráter em vários pH (Tabela 25) o qual permitiu definir que *K. marxianus* exibe o efeito "killer" em pH inferiores a 5,0, sendo seu ótimo entre pH 4,0 e 4,5. Esta observação permite já estabelecer uma diferença importante entre o caráter "killer" de IZ 1339 e o identificado em *K. lactis*, visto que, esta última expressa o caráter em pH acima de 6,0 (GUNGE et alii, 1983).

Através do estudo do caráter "killer" em segregantes de cruzamentos entre linhagens "killers" e normais de *K. marxianus*, foi possível evidenciar a natureza citoplasmática do mesmo, já que todos os segregantes dos híbridos MM1

e MM51 expressaram o caráter. Para confirmar a natureza citoplasmática, foi realizada eletroforese de DNA (Figura 13) na qual foram identificados dois plasmídios em IZ 1339 e em IZ 1821, os quais não estão presentes nas linhagens normais IZ 619 e IZ 148 de *K. marxianus*. Estes plasmídios chamados de pM1 e pM2 não foram encontrados em linhagens curadas com brometo de etídio, as quais também deixaram de expressar o caráter, mas não se tornaram sensíveis à toxina da linhagem "killer" (Tabela 26) evidenciando a natureza nuclear da resistência à toxina.

Com base nas diferenças encontradas entre o caráter "killer" de *K. marxianus* e o de *K. lactis*, podemos definir estes como sendo de natureza distinta.

Para quantificar o efeito do caráter "killer" e garantir a sua eficiência em processos industriais, foi desenvolvido um ensaio de crescimento mixto da linhagem "killer" de *K. marxianus* (IZ 1339) e da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* (M304-2C) em pH neutro e em pH 4,5; observando-se que no pH neutro, ambas linhagens crescem normalmente, enquanto que, em pH 4,5 a população da linhagem M304-2C decresce a partir das 6 horas de cultivo, desaparecendo completamente em 24 horas, enquanto *K. marxianus* mantém uma taxa normal de crescimento.

Para a realização de estudos genéticos em *K. marxianus* envolvendo principalmente os caracteres associados a produção de inulinase e fermentação de extratos de *H. tuberosus*, procedeu-se inicialmente a observação de zigotos para

a sua separação por micromanipulação, mas estas leveduras não exigem reação sexual definida e a frequência de formação de híbridos é muito reduzida para se proceder ao isolamento por este método. A forma alternativa para a obtenção de híbridos foi a utilização do método massal selecionando os híbridos pela complementação de marcas auxotróficas, como foi previamente realizado por JOHANNSEN e VAN DER WALT (1978).

Com o objetivo de obter mutantes foi desenvolvido num experimento preliminar para estabelecer a curva de sobrevivência destas leveduras frente ao ácido nitroso. Na Figura 16 pode ser observado que *Kluyveromyces*, de um modo geral, são mais sensíveis ao ácido nitroso, do que *Saccharomyces*, e que o tempo ideal para o isolamento de mutantes com base na taxa de mortalidade é de 10 a 12 minutos de tratamento. Aplicando este tempo de mutação e usando enriquecimento com nistatina de acordo com SNOW (1966) foi possível isolar uma série de mutantes auxotróficos de *K. marxianus* (IZ 1339, IZ 1821 e IZ 619), *K. fragilis* (IZ 275 e IZ 610) e *K. lactis* (ATCC 8585).

As taxas de hibridização natural observadas para diferentes cruzamentos com base no número de colônias crescidas em meio sintético, foi da ordem de 5×10^{-5} a 3×10^{-6} . Estes resultados são comparáveis com os obtidos por JOHANNSEN e VAN DER WALT (1978), porém, neste caso não foram observadas taxas elevadas, da ordem de 10^{-3} , como apresentados pelos autores. É importante ressaltar que no presente trabalho, não

foram observados híbridos interespecíficos entre *K. marxianus* e *K. lactis*, duas espécies que segundo os dados de JOHANNSEN e VAN DER WALT (1978) cruzam-se naturalmente, em taxas elevadas.

Os híbridos intraespecíficos e interespecíficos exibiram características de ambos os parentais, de tal forma que além de serem prototróficos, expressaram em alguns casos o caráter "killer", foram fermentadores de inulina e de lactose (Tabela 27). Todos os híbridos esporularam formando ascas com 2, 3 e 4 esporos reniformes, característicos de *K. marxianus* e *K. fragilis* (LODDER, 1970), estes esporos quando maduros foram liberados espontaneamente do asco, o que impediu o isolamento de segregantes por micromanipulação, e consequentemente, o mapeamento através da análise de tétrades.

Desta forma, procedeu-se à análise dos segregantes dos vários cruzamentos realizados, através da análise de esporos ao acaso (Tabela 28).

No cruzamento 1, foi observado que os genes MET 1 e LEU 1 segregam independentemente. Já, o gene MET 1 verificou-se estar ligado a 37,97 cM do gene ARG 1. Através da análise dos segregantes do cruzamento 2. Neste caso, que envolve o parental KM 9 com o caráter "killer" e KM 21 sem este caráter, foi evidenciado que tanto o híbrido MM 1, assim como todos os segregantes exibiram o caráter, demonstrando a herança citoplasmática do mesmo. Dentre os segregantes de MM1, foram encontrados segregantes não inulinolíticos, indicando a

presença de mais de um gene envolvido no catabolismo deste polissacarídeo. Os dois genes, presentes um em cada linhagem parental, mostram-se ligados a 9,97 cm.

Pela segregação do híbrido MM55 (cruzamento 3) foi possível estabelecer a ligação existente entre o gene LEU 1 e MET 2, estando estes a 39,5 cm. No cruzamento 4 envolvendo os genes ADE 1 e ADE 2, não foi observada ligação entre eles, porém, os resultados obtidos com este cruzamento devem ser verificados em cruzamentos posteriores, pois não foi possível caracterizar individualmente ambos os genes.

A segregação do híbrido interespecífico MF 1 (cruzamento 5) permitiu observar que a linhagem KF3 quando cruzada com *K. marxianus* dá lugar a um híbrido triplóide estável. A diploidia de KF 3 e a estabilidade do híbrido foram confirmadas pela segregação do gene SER 1, que segrega 1:2, e do gene MET 1 que apresentou a segregação 2:1. Um resultado interessante foi a observação de que o híbrido MF1 não expressa o caráter "killer" presente na linhagem parental KM 9. Este caráter, por outra parte, surge novamente entre os segregantes de MF1 em uma frequência de aproximadamente 66%, estes dados permitem supor a existência de um gene dominante presente em KF3 (*K. fragilis*), o qual impede a expressão do caráter "killer", sem no entanto eliminar os plasmídios que determinam tal caráter. Os estudos deste gene assim como demais estudos envolvidos com o caráter "killer" de *K. marxianus* continuam a ser desenvolvidos.

A avaliação da capacidade de fermentação de glicose nos híbridos de *Kluyveromyces* e nos parentais destes (Tabela 29), mostra a existência de variação significativa na produção de etanol, tanto entre parentais, quando entre híbridos. Porém, as diferenças entre as médias dos parentais e a média dos híbridos correspondentes não foram significativas, evidenciando a ausência de efeitos heteróticos. Nos casos particulares dos híbridos interespecíficos MF1 e MF4, os valores médios de produção de álcool foram inferiores à média dos parentais envolvidos em cada cruzamento, respectivamente.

Os mesmos híbridos quando avaliados quanto a capacidade fermentativa em extratos de *H. tuberosus* (Tabela 31), exibiram uma variação mais ampla, correspondendo, como esperado, o valor mais baixo à linhagem Fleischmann pertencente a *S. cerevisiae* com a produção de 3,33%GL em média. Também neste caso, foi observada a variação significativa entre as linhagens parentais e entre os híbridos, porém, da mesma forma que em glicose, a média das linhagens híbridas não difere da média dos parentais correspondentes, o que indica ausência de efeitos heterotróficos na fermentação alcoólica de *K. marxianus*. Este resultado é de certa forma discrepante com os procedimentos normalmente adotados no melhoramento de leveduras, os quais envolvem a hibridização como forma de obtenção de ganhos através do surgimento de efeitos heteróticos.

A atividade inulinolítica extracelular dos híbridos e parentais foi avaliada em três períodos de tempo após

atingir a fase estacionária de crescimento (Tabela 33), confirmando-se que a linhagem com maior atividade é IZ 619 pertencente a *K. marxianus*, a qual atingiu neste experimento 1143,66 U/ml em 72 horas. É importante ressaltar que os mutantes KM9 e KM5 apresentam atividade inferior à linhagem original IZ 1339, e por isto esta linhagem foi considerada como parental na comparação com os híbridos. Os híbridos MM1 e MM50 apresentaram produção intermediária entre os parentais, o híbrido MM28 apresentou produção superior à de IZ 1339, e os híbridos MM80, MM81 e os híbridos interespecíficos MF1 e MF4 exibiram produções inferiores à média dos parentais tendo nos dois primeiros casos ao parental IZ 148.

A avaliação da capacidade fermentativa de extratos brutos de *H. tuberosus* por parte de segregantes de híbridos entre linhagens de *K. marxianus* (MM1 e MM50) e do híbrido interespecífico MF1 entre *K. marxianus* e *K. fragilis* permitiu determinar a herdabilidade deste caráter, assim como verificar a ampla variabilidade existente para o mesmo.

Os segregantes de cada cruzamento avaliados quanto a capacidade fermentativa, correspondem a uma amostragem ao acaso dentre os segregantes com marcas auxotróficas, utilizadas para o seu mapeamento.

Os segregantes do híbrido MM1 exibiram variação significativa entre eles, como pode ser observado na análise de variância da Tabela 35. A comparação das médias dos segregantes permite destacar aqueles com produções mais eleva

das, como é o caso dos segregantes MM1-1-31, MM1-1-61 e MM1-1-68. Estes correspondem a ganhos da ordem de 4,5 até 5,9% em relação a linhagem inulinolítica IZ 1339, sendo que os segregantes MM1-1-34, MM1-3-31 e MM1-3-52 exibem valores médios muito baixos e que correspondem a decréscimos de produção de etanol da ordem de 8,6% a 22,4% (Tabela 34).

O híbrido MM1 apresenta uma produção média superior à dos parentais KM9 e KM21, sendo porém, muito próxima da média da linhagem IZ 1339 da qual deriva o parental KM9.

A variação entre segregantes de MM50, também mostrou-se significativa (Tabela 37), sendo a amplitude entre os mesmos muito maior do que no caso anteriormente discutido. Ressaltaram as produções elevadas de segregantes como MM50-15, MM50-18 e MM50-19, os quais apresentam ganho de até 7,4% acima da linhagem parental IZ 1821. Por outro lado, alguns segregantes como MM50-26 e MM50-57 exibiram médias de produção inclusive inferior à média da linhagem Fleischmann, pertencente a *Saccharomyces cerevisiae*. Em comparação com a média dos parentais estes valores correspondem a decréscimos de até 33,0%. O híbrido MM50 apresentou valor médio de produção superior ao do parental marcado, porém, quando comparado com a média dos parentais originais sem marcas auxotróficas. A média deste híbrido não mostrou diferença significativa (Tabela 36).

O híbrido MF1 obtido pelo cruzamento entre a linhagem de *Kluyveromyces marxianus* e linhagem KF3 de *K. fragilis*

gilis, exibiu capacidade fermentativa superior à linhagem IZ 1339, porém sendo muito semelhante à linhagem parental IZ 275 de *K. fragilis*. Dentre os segregantes, aqueles com maior produção de etanol como MF1-1-21, MF1-1-29 e MF1-1-33, exibiram ganhos de até 14,6% em relação à media dos parentais (Tabela 38).

Como a fermentação de extratos de *H. tuberosus* requer além de uma boa capacidade fermentativa, a hidrólise da inulina pela ação da inulinase, os ganhos e os decréscimos observados em segregantes podem estar influenciados pela atividade inulinolítica dos mesmos. Para estabelecer o efeito da enzima na capacidade fermentativa, algumas linhagens segretantes representativas das várias faixas de produção de etanol foram avaliadas quanto à sua atividade inulinolítica. Dentre os segregantes de MM1 avaliados, é possível observar pelos dados da Tabela 40, que existem três faixas de atividade. Os segregantes MM1-1-31 e MM1-1-61 apresentam atividade superior à das linhagens parentais e do híbrido MM1, sendo esta com 72 horas aproximadamente o dobro da atividade do parental superior IZ 619, um segundo grupo encontra-se na faixa de 700 a 750 U/ml, semelhante a produção do parental IZ 619, e o terceiro grupo exibe atividades muito reduzida de aproximadamente 100 U/ml. Quando correlacionadas estas atividades com a capacidade fermentativa, as três faixas correspondem ao grupo de alta, média e baixa produção de etanol, com a única exceção do segregante MM1-1-68, que apresenta ativi-

dade média e produção de etanol elevada, desta forma é evidente a influência da atividade enzimática na capacidade de fermentação de extratos de *H. tuberosus*.

Entre os segregantes de MM50 as variações na atividade inulinolítica são menores, e não são correlacionadas com os dados de produção de etanol, e portanto a variação observada na Tabela 36 indica neste caso diferenças na capacidade fermentativa.

Partindo do princípio que as leveduras do gênero *Kluyveromyces* excretam a invertase e que esta energia apresenta baixa atividade sobre a inulina (ADAMS et alii, 1943; SNYDER e PHAFF, 1960), foi levantada a possibilidade de que os segregantes MM1-3-31 e MM1-3-52 fossem na verdade não inulinolíticos, e que a baixa atividade observada nos mesmos fosse referente a ação da invertase sobre a inulina. Esta hipótese foi confirmada pelos resultados obtidos na comparação da atividade dos extratos enzimáticos destes segregantes sobre sacarose e sobre inulina. Como pode ser observado na Tabela 41, estas linhagens mantêm alta atividade invertásica, porém, sua atividade sobre inulina é muito reduzida.

Durante o decorrer do presente trabalho foi tentada reiteradamente a obtenção de mutantes não inulinolíticos, sendo sempre infrutíferos todos os nossos esforços neste sentido. Agora pode-se explicar este insucesso com base em resultados obtidos, já que pela ação da invertase extracelular, mesmo os mutantes não inulinolíticos apresentam crescimento neste carboidrato.

Como foi levantado anteriormente, existem em *K. marxianus* dois genes envolvidos no catabolismo da inulina, presentes em IZ 1339 (Inl_1) e em IZ 619 (Inl_2), a existência dos quais é confirmada pelos resultados da Tabela 42, na qual foram apresentadas as segregações do híbrido MMR1 entre os segregantes MM1-1-31 em alta atividade inulinolítica e MM1-3-52 não inulinolítico, e do híbrido MMR3 entre o segregante MM1-3-52 e linhagem KM5 procedente de IZ 1339. No primeiro caso, confirma-se pela segregação a existência dos dois genes Inl_1 e Inl_2 na linhagem MM1-1-31, os quais mapeiam a uma distância de 14,9 cM. Este resultado permite ao se comparar os dados de atividade das Tabelas 40 e 41 concluir que estes genes quando presentes na mesma linhagem levam a uma atividade inulinolítica muito superior a simples adição dos seus efeitos, caracterizando a interação dos seus produtos gênicos. A segregação do segundo híbrido confirma a presença de um único gene inulinolítico Inl_1 na linhagem IZ 1339.

Como foi visto na Tabela 40, o híbrido MM1 apresenta uma produção intermediária, semelhante à do parental IZ 619, e que à luz dos resultados discutidos anteriormente, permite concluir que a interação entre os alelos Inl_1 e Inl_2 é prejudicada pela presença dos alelos recessivos inl_1 e inl_2 .

Devido à impossibilidade de obter híbridos entre *K. lactis* e *K. marxianus* através de cruzamentos naturais, estes foram obtidos por fusão de protoplastos e selecionados pela complementação de marcas auxotróficas. Mesmo com elevada

taxa de esferoplastização, a frequência de fusão mostrou-se muito reduzida, sendo esta da ordem de 1×10^{-6} .

O volume celular e o conteúdo de DNA dos produtos de fusão foi superior àquele das linhagens parentais (Tabela 43) com exceção de FML-01, FML-09 e FML-11 que apresentaram volumes semelhantes a *K. lactis*, porém, o conteúdo de DNA das mesmas mostrou-se o dobro do conteúdo das linhagens parentais. A linhagem FML-04 exibiu o maior volume celular e o mais elevado conteúdo de DNA, sendo possivelmente o produto de fusão múltipla entre protoplastos destas espécies, e correspondendo pelo conteúdo de DNA a um triplóide. Todos estes produtos de fusão foram capazes de esporular, produzindo ascas com esporos reniformes, a semelhança do que observaram JOHANNSEN e VAN DER WALT (1978) em híbridos naturais obtidos entre estas duas espécies.

A caracterização destes produtos quanto à capacidade de assimilação mostrou na Tabela 44, que os híbridos exibem uma combinação das características de ambos os parentais, exibindo assimilação de lactose e maltose como o parental *K. lactis* e assimilação de inulina como o parental *K. marxianus*. No caso particular do híbrido FML-08 a expressão das características de *K. lactis* mostrou-se reduzida, apresentando este um crescimento reduzido em lactose, maltose, arabino-se e melezitose. Todos os híbridos obtidos por fusão expressaram o caráter "killer" de *K. marxianus*, sendo esta reduzida no caso de FML-09 (Tabela 45).

Através da avaliação da capacidade de fermentação de glicose, extrato de *H. tuberosus* e de lactose, pode ser evidenciada a variabilidade entre os produtos de fusão. Na Tabela 46 ressalta a alta produção do híbrido FML-09, o qual produziu em glicose 7,4%GL de etanol em média, contra 6,43%GL da média dos parentais, o que corresponde a um ganho de 13,6%. Outros híbridos como FML-05 e FML-11 também exibiram produções superiores à do melhor parental em glicose. Já em extratos de *H. tuberosus* o melhor híbrido foi FML-04, porém, todos os produtos de fusão assemelharam-se à produção do parental *K. marxianus*. A maior variabilidade foi referente à fermentação de lactose, na qual somente os híbridos FML-04 e FML-09 apresentaram produções semelhantes ao parental *K. lactis*, enquanto FML-05 e FML-11 exibiram produções muito menores.

6. CONCLUSÕES

O estudo de leveduras quanto a capacidade de hidrolisar inulina visando a produção de etanol e maior atividade inulinolítica necessária a fabricação de xarope de frutose, com base nos resultados obtidos, permitiu obter as seguintes conclusões:

1. As leveduras mais adequadas à produção de etanol a partir de extratos de *H. tuberosus* pertencem às espécies *K. marxianus*, *K. fragilis* e *C. pseudotropicalis*, sendo possível obter rendimentos de até 97% utilizando-se a linhagem selecionada IZ 1339.

2. Existe ampla variabilidade natural entre linhagens de *K. marxianus* e *K. fragilis*, tanto em termos de capacidade fermentativa quanto de atividade inulinolítica, o que viabiliza obter ganhos em programas de melhoramento genético.

3. A transferência de massa é um fator importante na produtividade volumétrica e específica de *K. marxianus* (IZ 1339), pelo que é necessária a utilização de sistemas agitados.

4. Dentro de condições de fermentação de laboratório, e mantendo agitação constante, é possível atingir 9,87% de etanol com rendimentos de 96,56% e com 12 horas de processo, o que torna a fermentação alcoólica de *H. tuberosus* a melhor alternativa dentre as matérias primas não sacarinas.

5. Não ocorre diauxia durante a fermentação de extratos de *H. tuberosus* por *K. marxianus*.

6. A levedura *T. colliculosa* apresenta boa capacidade de fermentação de inulina, porém sua produtividade é inferior à apresentada por *Kluyveromyces*, observando-se como em outras leveduras, que a concentração de células de *T. colliculosa* afeta a produtividade volumétrica.

7. As concentrações de metanol e acetona em vinhos da fermentação de *H. tuberosus* foram significativamente maiores do que as observadas com outros substratos, independente da espécie utilizada.

8. A levedura *K. marxianus* IZ 1339 exibe a maior taxa específica de crescimento em glicose, sacarose e inulina, mesmo quando comparada com Fleischmann, o que torna adequada a utilização em processos fermentativos e produção de biomassa.

9. As leveduras *S. cerevisiae*, *C. guilliermondii* e *T. colliculosa* não apresentam inulinase extracelular, enquanto *K. marxianus*, *K. fragilis* e *C. pseudotropicalis* exibem altas atividades inulinolítica extracelular (3588,31 U/ml).

10. A inulinase extracelular de *K. marxianus* não sofre repressão catabólica marcante dentro de níveis estudados (5×10^{-3} M glicose ou frutose). A sua síntese é constitutiva, porém, estimulada por inulina, sacarose e ou, celobiose.

11. A inulinase extracelular de *K. fragilis* sofre repressão catabólica e retroinibição em concentrações de 3×10^{-3} M de açúcares redutores. A sua síntese é induzida por inulina e por outros β -fructosídeos, incluindo sacarose.

12. Tanto os extratos de *K. marxianus* como os de *K. fragilis* apresentam pH ótimos de atividade, sendo estes pH 4,0 e pH 7,0.

13. As enzimas inulinolíticas de *Kluyveromyces* são inativadas rapidamente em temperaturas superiores a 50°C, impedindo sua concentração térmica acima desta temperatura.

14. Duas linhagens de *K. marxianus* exibiram o caráter "killer" a pH 4,5, diferindo assim de *K. lactis*.

A toxina "killer" de *K. marxianus* apresenta amplo espectro de ação sobre leveduras do gênero *Saccharomyces*,

mas não sobre o seu próprio gênero, verificando-se ser o caráter "killer" de *K. marxianus* determinado por dois plasmídeos de DNA (pM1 e pM2), e a resistência à toxina codificada pelo núcleo.

15. As linhagens de *K. marxianus* não exibiram reação sexual definida e as taxas de hibridização foram muito reduzidas, obrigando-se a efetuar cruzamentos forçados (rare mating) ou fusão de protoplastos.

16. Foram identificados dois genes inulinolíticos designados lnl_1 e lnl_2 , presentes respectivamente em IZ 1339 e IZ 619. Estes genes estão ligados a aproximadamente 10 cM um do outro, e quando os alelos lnl_1 e lnl_2 estão presentes na mesma linhagem, a atividade inulinolítica é o dobro daquela apresentada pelos genes isolados, e 1/4 maior do que a soma das atividades individuais de cada gene, indicando um tipo de interação gênica.

17. A linhagem KF3 apresenta um gene dominante em dose simples, capaz de impedir a expressão do caráter "killer" de *K. marxianus*, um aspecto importante para o estudo deste caráter.

18. A variação entre segregantes de híbridos de *K. marxianus* e de híbridos interespecíficos entre *K. marxianus* e *K. fragilis* permitiu obter linhagens com capacidade fermentativa superior aos híbridos e as linhagens parentais, indicando a possibilidade de obter ganhos ainda maiores utilizando métodos recombinogênicos.

19. Os produtos de fusão entre *K. marxianus* e *K. lactis* são estáveis durante mitoses sucessivas, porém, a viabilidade de esporos dos mesmos é muito reduzida, o que é esperado em função de sua não homologia e consequentes problemas meióticos.

20. Os híbridos entre KM9 e KL18 obtidos por fusão, apresentam capacidade de fermentação de glicose, extratos de *H. tuberosus* e de lactose, reunindo assim características favoráveis de ambos parentais.

7. LITERATURA CITADA

- ADAMS, M.; RICHTMYER, N.K. e HUDSON, C.C., 1943. Some enzymes present in highly purified invertase preparations: A contribution to the study of fructo furanosidase, galactosidases, glucosidases and mannosidases. J. Am. Chem. Soc., 65: 1369.
- AVIGAD, H. & BAVER, S., 1966. Fructan hydrolases, in methods in enzymology. Vol. 8, Academic Press, N.Y. 621.
- BACON, J.S. e LOXLEY, R., 1952. Seasonal changes in the carbohydrates of the Jerusalem Artichoke Tuber. Biochem. J. 51: 208.
- BAJON, A.M.; GUIRAUD, J.P. e GALZY, P., 1984. Isolation of an inulinase derepressed mutant of *Pichia polymorpha* for the production of fructose. Biotechn. Bioeng., 26: 128-133.
- BAJPAI, P. e MARGARITIS, A., 1982. Ethanol inhibition kinetics of *Kluyveromyces marxianus* grown on Jerusalem Artichoke juice. Appl. and Env. Microb., 44: 1325-1329.

- BAJPAI, P. e MARGARITIS, A., 1985a. Improvement of inulinase stability of calcium alginate immobilized *Kluyveromyces marxianus* cells by treatment with hardening agents. Enzyme Microb. Technol., 7: 34-36.
- BAJPAI, P. e MARGARITIS, A., 1985b. Immobilization of *Kluyveromyces marxianus* cells containing inulinase activity in open pore gelatin matrix: 1. Preparation and enzymatic properties. Enzyme Microb. Technol. 7: 373-376.
- BAJPAI, P. e MARGARITIS, A., 1985c. Immobilization of *Kluyveromyces marxianus* cells containing inulinase activity in open pore gelatin matrix: 2. Application for high fructose syrup production. Enzyme Microb. Technol. 7: 377-379.
- BARNETT, J.A. e R.J. PANKHURST, 1974. A new key to the yeasts. Amsterdam North-Holland Publishing Co.
- BELUCHE, I.; GUIRAUD, J.P. e GALZY, P., 1980. Inulinase activity of *Debaryomyces cantarelli*. Folia Microbiol. 25: 32-39.
- BICKNELL, J.N. e DOUGLAS, H.C., 1970. Nucleic acid homologies among species of *Saccharomyces*. J. Bacteriol. 101: 505-512.
- BOINOT, F., 1942. Le topinambour dans la fabrication de l'alcool. Bull. Assoc. Chim. 59: 147-150.
- BRUNNER, A.; MAS, J.; CELIS, E. e MATTOON, J.Ri, 1973. Cytoplasmatic and nuclear inheritance of resistance to alkylguanidines and ethidium bromide in a petite negative yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 53: 638-644.

- BRUNNER, A.; TUENA DE COBOS, A. e GRIFFITHS, D.E., 1977. The isolation and genetic characterization of extrachromosomal chloranphenicol and oligomycin-resistant mutants from the petite-negative yeast *Kluyveromyces lactis*. Molec. Gen. Genet. 152: 183-191.
- BYUN, S.M. e NAHM, B.H., 1978. Production of fructose from Jerusalem Artichoke by enzymatic hydrolysis. J. Food Sci. 43: 1871-1873.
- CAMPBELL, I., 1972. Numerical analysis of the genera *Saccharomyces* and *Kluyveromyces*. J. Gen. Microbiol. 73: 279-301.
- CELIS, E.; MAS, J. e BRUNNER, A., 1975. Nuclear and cytoplasmic cross-resistance and correlated sensitivity to DNA intercalating drugs in a petite negative yeast. Genet. Res. 25: 59-69.
- CHABBERT, N.; BRAUN, P.H.; GUIRAUD, J.P.; ARNOUX, M. e GALZY, P., 1983. Productivity and fermentability of Jerusalem Artichoke according to harvesting data. Biomass, 3: 209-224.
- CHAUTARD, P.; GUIRAUD, J.P. e GALZY, P., 1981. Inulinase activity of *Pichia polymorpha*. Acta Microbiol. 28: 245-255.
- DEL GIUDICE, L. e BRUNNER, A., 1977. Chromosomal and extra-chromosomal inheritance of erythromycin-resistance in the "petite-negative" yeast *Kluyveromyces lactis*. Molec. Gen. Genet. 152: 325-329.
- DEMEULLE, S.; GUIRAUD, J.P. e GALZY, P., 1981. Study of inulinase from *Debaryomyces phaffii* Capriotti. Z. Allgemeine-Mikrobiologie 21: 181-189.

- DICKSON, R.C. e MARKIN, J.S., 1978. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a yeast gene coding for β -galactosidase. Cell 15: 123-130.
- DICKSON, R.C.; DICKSON, L.R. e MARKIN, J.S., 1979. Purification and properties of an inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. J. Bacteriol. 137: 51-61.
- DUVNJAK, Z.; KOSARIK, N. e HAYES, R.D., 1981. Kinetics of ethanol production from Jerusalem Artichoke juice with some *Kluyveromyces* species. Biotechn. Lett. 3: 589-594.
- DUVNJAK, Z.; KOSARIC, N. e KLIZA, S., 1982. Production of alcohol from Jerusalem Artichoke by yeasts. Biochn. Bioeng. 24: 2297-2308.
- FLEMING, G.E. e GROOTWASSINK, J.W.D., 1979. Preparation of high-fructose syrup from the tubers of the Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 12: 1-28.
- GUIRAUD, J.P.; VIARD-GAUDIN, C. e GALZY, P., 1980. Étude de l'inulinase de *Candida salmenticensis* Van Uden et Buckley. Agric. Biol. Chem. 44: 1245-1252.
- GUIRAUD, J.P. e GALZY, P., 1981. Production de fructose par hydrolyse chimique de l'inuline. Ind. Alim. et Agric. 98: 45-52.
- GUIRAUD, J.P.; DEVILLE-DUC, T. e GALZY, P., 1981a. Selection of yeast strains for ethanol production from inulin. Folia Microbiol. 26: 147-150.

- GUIRAUD, J.P.; DAURELLES, J. e GALZY, P., 1981b. Alcohol production from Jerusalem Artichoke using yeasts with inulinase activity. Biotechn. Bioeng. 23: 1461-1465.
- GUIRAUD, J.P.; CAILLAUD, J.M. e GALZY, P., 1982a. Optimization of alcohol production from Jerusalem Artichokes. Europ. J. Appl. Microb. Biotechn. 14: 81-85.
- GUIRAUD, J.P.; BERNIT, C. e GALZY, P., 1982b. Inulinase of *Debaryomyces cantarelli*. Folia Microbiol. 27: 19-24.
- GUIRAUD, J.P.; BAJON, A.M.; CHAUTARD, P. e GALZY, P., 1983. Inulin hydrolysis by a immobilized yeast-cell reactor. Enz. Microb. Technol. 5: 185-190.
- GUNGE, N.; TAMARU, A.; OZAWA, G. e SAKAGUCHI, K., 1981. Isolation and characterization of linear desoxiribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. J. Bacteriol. 145: 382-390.
- GUNGE, N. & SAKAGUCHI, K., 1981. Intergenic transfer of desoxiribonucleic acid killer plasmids, pGKL1 and pGKL2, from *Kluyveromyces lactis* into *Saccharomyces cerevisiae* by cell fusion. J. Bacteriol. 147: 155-160.
- GUNGE, N.; MURATA, K. e SAKAGUCHI, K., 1982. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with linear DNA killer plasmids from *Kluyveromyces lactis*. J. Bacteriol. 151: 462-464.
- GUNGE, N. e YAMANE, C., 1984. Incompatibility of linear DNA killer plasmids pGKL1 and pGKL2 from *Kluyveromyces lactis* with mitochondrial DNA from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 159: 533-539.

- HERMAN, A. e HALVORSON, H.O., 1963. Identification of the structural gene for β -glucosidase in *Saccharomyces lactis*. J. Bacteriol. 85: 895-900.
- HOLLENBERG, C.P.; BORST, P. e Van BRUGGEN, E.F.J., 1970. Mitochondrial DNA. V. A25 μ closed circular duplex DNA molecule in wild type yeast. Mitochondria, structure and genetic complexity. Biochim. biophys. Acta. 209: 1-15.
- INAGAKI, S. e HONJO, A.A., 1949. Preparation of fructose from Jerusalem Artichoke. J. Pharm. Soc. Jpn. 69: 418.
- JOHANSEN, E. e VAN DER WALT, J.P., 1978. Infertility as a basis in the delimitation of *Kluyveromyces marxianus*. Arch. Microbiol. 118: 45-48.
- KIERSTAN, M.P.J., 1978. Production of fructose syrups from inulin containing plants. Biotechn. Bioeng. 20: 447.
- KIERSTAN, M.P.J., 1980. Production of fructose syrups from inulin. Process. Biochem. 5: 2.
- KOSAIC, N.; WIECZOREK, A. DUVNJAK, Z. e KLIHA, S., 1982. Production of fuel ethanol by fermentation. Proc. Bioenergy. 4th; R&D Seminar Ed. 491-495.
- LAM, K.S. e GROOTWASSINK, J.W.D., 1985. Efficient, non - killing extraction of β -D-fructofuranosidase (an exo-inulase) from *Kluyveromyces fragilis* at high cell density. Enzyme Microb. Technol. 7: 239-242.
- LODDER, J. (Editor), 1970. The yeast, a taxonomic study, second edition. Amsterdam, North-Holland Publishing Co.

- MAKINEN, K.K., 1972. The role of sucrose and other sugars in the development of dental caries. Int. Dent. J. 22:263.
- MARGARITIS, A.; BAJPAI, P. e CANNELL, E., 1981. Optimization studies for the bioconversion of Jerusalem Artichoke tubers to ethanol and microbial biomass. Biotechn. Lett. 3: 595-599.
- MARGARITIS, A. e BAJPAI, P., 1982a. Ethanol production from Jerusalem Artichoke tubers (*Helianthus tuberosus*) using *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces rosei*. Biotech. Bioeng. 24: 941-953.
- MARGARITIS, A. e BAJPAI, P., 1982b. Continuous ethanol production from Jerusalem Artichoke tubers. I. Use of free cells of *Kluyveromyces marxianus*. Biotechn. Bioeng. 24: 1473-1482.
- MARGARITIS, A. e BAJPAI, P., 1982c. Continuous ethanol production from Jerusalem Artichoke tubers. II. Use of immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. Biotechn. Bioeng. 24: 1483-1493.
- MARGARITIS, A. e BAJPAI, P., 1983. Effect of sugar concentration in Jerusalem Artichoke extract on *Kluyveromyces marxianus* growth and ethanol production. Appl. and Env. Microbiol. 45: 723-725.
- MARGARITIS, A.; BAJPAI, P. e BAJPAI, P.K., 1983. Fuel ethanol production from Jerusalem Artichoke stalks using different yeasts. Developments in Industrial Microbiology 24: 321-327.

- MARGARITIS, A.; BAJPAI, P. e M.A. LACHANCE, 1983b. The use of free and immobilized cells of *Debaryomyces polymorpha* to produce ethanol from Jerusalem Artichoke tubers. J. Ferment. Technol. 61: 533-537.
- MATHER, K. e J.L. JINKS, 1972. Biometrical genetics. Chapman and Hall Ltd. London. 382p.
- MERMELSTEIN, N.H., 1975. Immobilized enzymes produce high fructose syrup. Food Technol. 29: 21.
- NAKAMURA, T. e NAKATSU, S., 1977. General properties of extracellular inulinase from *Penicillium*. Agric. Biol. Chem. 51: 68.
- NAKAMURA, T.; KUROKAWA, T.; NAKATSU, S. e UDEA, S., 1978. Crystallization and general properties of an extracellular inulinase from *Aspergillus* sp. Agric. Biol. Chem. 52: 159.
- NEGORO, H. e KITO, E., 1973a. β -fructo furanidase from *Candida kefyr*. J. Ferment. Technol. 51: 96-102.
- NEGORO, H. e KITO, E., 1973b. Purification and enzymatic properties of intracellular β -fructofuranosidase from *Candida kefyr*. J. Ferment. Technol. 51: 103-110.
- O'CONNOR, R.M.; McARTHUR, C.R. e CLARK-WALKER, D.G., 1975. Closed-circular DNA from mitochondrial enriched fractions of four petite-negative yeasts. Europ. J. Biochem. 53: 137-144.
- PHILLISKIRK, G. e YOUNG, T.W., 1975. The occurrence of killer character in yeasts of various genera. Ant. van Leeuwenhoek. 41: 147-151.

- PILNIK, W. e VERVELDE, G.J., 1976. Jerusalem Artichoke as a source of fructose a natural alternative sweetener. J. Agron. Crop. Sc. 142: 153-162.
- PIMENTEL GOMES, F., 1966. Curso de Estatística Experimental. 24ª edição. Piracicaba, Esc. Sup. Agric. "Luiz de Queiroz", USP. 384p.
- PRICE, C.W.; FUSON, G.B. e PHAFF, H.J., 1978. Genome comparison in yeast systematics: delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* and *Pichia*. Microbiol. Rev. 42: 161-193.
- ROSINI, G., 1983. The occurrence of killer characters in yeasts. Can. J. Microbiol. 29: 1462-1464.
- RUTHERFORD, P.P. e WESTON, E.W., 1968. Carbohydrate changes during cold storage of some inulin-containing roots and tubers. Phytochemistry 7: 175-180.
- SACHS, R.M.; LOW, C.B.; VASAVADA, A.; SULLY, M.J.; WILLIAMS, L.A. e ZIOBRU, G.C., 1981. Fuel alcohol from Jerusalem Artichoke. Calif. Agr. 4-6.
- SANDERS, J.P.M.; WEIJERS, P.J.; GROOT, G.S.P. e BORST, P., 1974. Properties of mitochondrial DNA from *Kluyveromyces lactis*. Biochem. Biophys. Acta. 374: 136-144.
- SHEETZ, R.M. e DICKSON, R.C., 1980. Mutations affecting synthesis of β -galactosidase activity in the yeast *Kluyveromyces lactis*. Genetics 95: 877-890.
- SHEETZ, R.M. e DICKSON, R.C., 1981. Lac^4 is the structural gene for β -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. Genetics 98: 729-745.

- SNOW, R., 1966. An environment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic "Nystatin". Nature, London, 9: 211-212.
- SNYDER, H.E. e PHAFF, J., 1960. Studies on a beta-fructosidase (inulinase) produced by *Saccharomyces fragilis*. Ant. van Leewenhoek. 26: 433-452.
- STUMM, C.; HERMANS, J.M.H.; MIDDELBEEK, E.J.; CROES, A.F. e DE VRIES, G.J.M.L., 1977. Killer-sensitive relationships in yeasts from natural habitats. Ant. van Leewenhoek 43: 125-128.
- TANAKA, K.; UCHIYAMA, T. e ITO, A., 1972. Formation of Di-D-fructofuranose 1,2';2.3'-diahydride from by a extracellular inulinase of *Arthrobacter ureafaciens*. Biochim. Biophys. Acta. 284: 248.
- TINGLE, M.; HERMAN, A. e HALVORSON, H.O., 1968. Characterization and mapping of histidine genes in *Saccharomyces lactis*. Genetics 58: 361-371.
- TINGLE, M. e HALVORSON, H.O., 1972. Mutants in *Saccharomyces lactis* controlling both β -glucosidase and β -galactosidase-activities. Genet. Res. 19: 27-32.
- UNDERKOFER, L.A.; McPHERSON, W.K. e FULMER, E.I., 1937. Alcoholic fermentation of Jerusalem Artichoke. Ind. Eng. Chem. 29: 1160-1164.
- WEIDENHAGEN, R., 1941. "Fructases". Methoden der fermentforschung. Bamann e Myrbäck, Ed. 2: 1900-1902.

- WICKERHAM, L.J. e BURTON, K.A., 1956a. Hybridization studies involving *Saccharomyces lactis* and *Zygosaccharomyces as-hbyi*. J. Bacteriol. 71: 290-295.
- WICKERHAM, L.J. e BURTON, K.A., 1956b. Hybridization studies involving *Saccharomyces fragilis* and *Zygosaccharomyces do**z**hanskii*. J. Bacteriol. 71: 296-302.
- WICKNER, R.B. e LEIBOWITZ, M.J., 1976. Two chromosomal genes required for killing expression in killer strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 82: 429-442.
- WICKNER, R.B., 1976a. Killer of *Saccharomyces cerevisiae*: a double ribonucleic acid plasmid. Bacteriol. Rev. 40: 757-773.
- WICKNER, R.B., 1976b. Mutants of the killer plasmid of *Saccharomyces cerevisiae* dependent on chromosomal diploidy for expression and maintenance. Genetics 82: 273-285.
- WICKNER, R.B., 1977. Deletion of mitochondrial DNA bypassing a chromosomal gene needed for maintenance of the killer plasmid of yeast. Genetics 87: 441-452.
- WILLIAMS, L.A. e ZIOBR0, G., 1982. Processing and fermentation of Jerusalem Artichoke for ethanol production. Bio-tech. Lett. 4: 45-50.