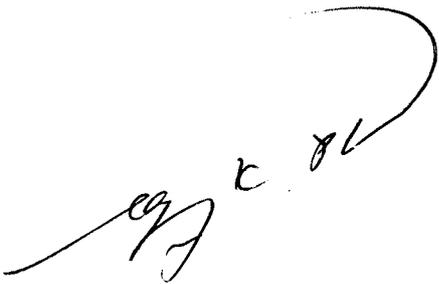


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS

Park

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Argentina Sampaio Costa e aprovada pela Comissão Examinadora em 31.10.95

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA LINHAGEM *NEUROSPORA*  
sp ISOLADA DE BEIJU DE MANDIOCA**



Argentina Sampaio Costa  
Química Industrial

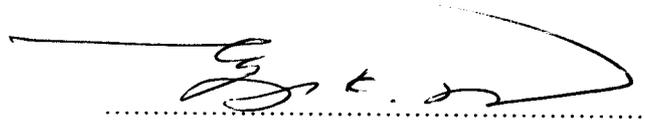
†  
Prof. Dr. Yong Kun Park  
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos como  
parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de mestre

Campinas-SP

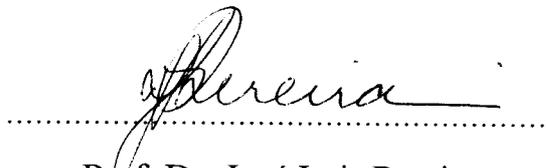
1995

**BANCA EXAMINADORA**



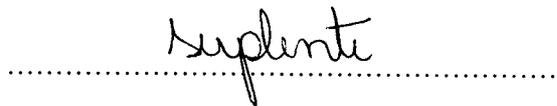
Prof. Dr. Yong Kun Park

Orientador



Prof. Dr. José Luis Pereira

Membro



Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore

Membro



Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

Suplente

Campinas, 31 de 10 de 1995

*"Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o bronze que soa, ou como o címbalo que retine. Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, mesmo que tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, e não tivesse amor, nada seria."*

*1 Cor 13. 1-2*

*João e Ilza, Ensino*  
*Claudia, Confidente*  
*Carminha, Amiga*  
*Helena, Exemplo*  
*Grça, Força*  
*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À FEA pela oportunidade concedida para a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Yong Park pela orientação e exemplo de dedicação à pesquisa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos Profs. Drs. José Luis, Hélia Sato e Gláucia Pastore da FEA-UNICAMP pelas valiosas correções desta tese.

Às professoras Clotilde Martins e Silvia Caldas da UFMA e à Prefeitura de Chapadinha-Ma pela contribuição e assistência na coleta das amostras.

À Dra. Pedrina da FIOCRUZ-RJ pela contribuição bibliográfica.

Ao Dong Koo pela contribuição nas análises de Ubiquinona.

Ao José Valdivia pela constante disponibilidade na elaboração final da tese.

Ao Dr. Ludwig da Fundação Tropical pela ajuda na técnica de identificação.

Aos amigos Marcolino, Edilsa, Masaharu e Ila Maria pelo apoio e incentivo.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração da tese.

# ÍNDICE GERAL

	Página
Índice.....	i
Índice de tabelas.....	v
Índice de figuras.....	vi
Resumo.....	viii
Summary.....	ix
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1. Microflora do beiju de mandioca e produção de aroma.....	3
2.2. Características bioquímicas e microbiológicas de <i>Neurospora</i> .....	9
2.3. Quinonas na classificação de microrganismos.....	19
<b>3.MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>

3.1. Meios de cultura.....	26
3.1.1 Meio Agar de Westergaard.....	26
3.1.2 Meio Agar Batata Dextrose.....	26
3.1.3 Meio Agar Farinha de Milho.....	26
3.1.4 Corante Azul de Algodão-Lactofenol.....	27
3.1.4.1 Solução Azul de Algodão.....	27
3.1.4.2 Solução de Lactofenol.....	27
3.2. Coleta de amostras.....	28
3.3. Preparo dos beijus.....	28
3.4. Isolamento de <i>Neurospora</i> sp do beiju.....	29
3.5. Seleção de <i>Neurospora</i> .....	29
3.6. Características bioquímicas.....	29
3.6.1 Estudo da capacidade fermentativa de <i>Neurospora</i> .....	29
3.6.1.1 Preparo do pré-inóculo.....	30
3.6.1.2 Fermentação em amido 5%.....	30
3.6.2 Determinação da atividade enzimática em <i>Neurospora</i> .....	30
3.6.2.1 Determinação da atividade de Amiloglicosidase.....	31
3.6.2.2 Determinação da atividade de Celulase (CMCase).....	31
3.6.2.3 Determinação da atividade de Xilanase.....	32
3.6.2.4 Determinação de Lipase.....	32
3.6.2.5 Determinação de Pectinase.....	32
3.6.3 Cromatografia em papel de açúcares.....	33
3.7. Características microbiológicas.....	33
3.7.1 Características morfológicas.....	33
3.7.1.1 Microcultivo.....	33
3.7.1.2 Formação de hifas, conídias e micélios.....	34

3.7.2 Crescimento de <i>Neurospora</i> em diferentes meios de cultura.....	34
3.7.3 Desenvolvimento em diferentes temperaturas.....	35
3.7.4 Características genéticas.....	35
3.7.4.1 Evidência de homotalismo.....	35
3.7.4.2 Evidência de heterotalismo.....	35
3.7.4.2.1 Estudo da interação de micélios.....	35
3.7.4.2.2 Espermatização experimental.....	36
3.7.4.3 Cruzamento.....	36
3.8. Características químicas.....	37
3.8.1 Determinação de ubiquinona.....	37
3.8.1.1 Preparo da amostra.....	37
3.8.1.2 Extração de ubiquinona e cromatografia em camada delgada.....	38
<b>4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
4.1. Seleção de <i>Neurospora</i> sp.....	39
4.2. Características bioquímicas.....	39
4.2.1 Capacidade fermentativa de <i>Neurospora</i> e influência da levedura Fleischmann na fermentação do amido 5 %.....	39
4.2.2 Atividade enzimática.....	40
4.3. Características microbiológicas.....	40
4.3.1 Morfologia de <i>Neurospora</i> sp.....	41
4.3.2 Características genéticas.....	41
4.3.3 Crescimento de <i>Neurospora</i> em diferentes meios de cultura.....	42
4.3.4 Desenvolvimento de <i>Neurospora</i> em diferentes temperaturas.....	43
4.4. Determinação de ubiquinona.....	43

<b>5.CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>6.SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DA PESQUISA.....</b>	<b>46</b>
<b>7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Características Morfológicas e Sexuais da linhagem <i>N. sitophila</i> NRRL 2884.....	48
Tabela 2 - Características Morfológicas e Sexuais da linhagem <i>N. sitophila</i> ATCC 46892.....	49
Tabela 3 - Características Morfológicas e Sexuais da linhagem <i>Neurospora</i> sp n.1 (beiju).....	50
Tabela 4 - Produção de Enzima Amiloglicosidase por linhagens de <i>Neurospora</i> .....	51
Tabela 5 - Características Microbiológicas das linhagens de <i>Neurospora</i> sp.....	52
Tabela 6 - Cruzamento entre <i>Neurospora sitophila</i> NRRL 2884 e linhagens de <i>Neurospora</i> sp.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 - Capacidade fermentativa de *N. sitophila* NRRL 2884 e influência da levedura Fleischmann em meio de amido 5% a 30°C por 10 dias.....55
- Figura 2 - Capacidade fermentativa de *N. sitophila* ATCC 46892 e influência da levedura Fleischmann em meio de amido 5% a 30°C por 10 dias.....55
- Figura 3 - Capacidade fermentativa de *Neurospora* sp n.1 (beiju) e influência da levedura Fleischmann em meio de amido 5% a 30°C por 10 dias.....56
- Figura 4 - Capacidade fermentativa de *N. intermedia* NRRL 5506 e influência da levedura Fleischmann em meio de amido 5% a 30°C em 10 dias.....56
- Figura 5 - Capacidade fermentativa de *N. crassa* NRRL 2223 e influência da levedura Fleischmann em meio de amido 5% a 30°C em 10 dias.....57
- Figura 6 - Capacidade fermentativa de *N. tetrasperma* NRRL 2164 e influência da levedura Fleischmann em amido 5% a 30°C em 10 dias.....57

Figura 7 - Hifas e conídias da linhagem <i>Neurospora sitophila</i> NRRL 2884 em meio de Westergaard a 25°C por 12 dias de incubação. Conídias medindo 10 µm. x400.....	58
Figura 8 - Hifas e conídias da linhagem <i>Neurospora sitophila</i> ATCC 46892 em meio de Westergaard a 25°C por 12 dias de incubação. Conídias medindo 8 µm. x400.....	58
Figura 9 - Cromatografia em Camada Delgada de Ubiquinona das linhagens <i>N. sitophila</i> NRRL 2884 e <i>N. sitophila</i> ATCC 46892.....	59
Figura 10 - Cromatografia em Camada Delgada de fase reversa ilustrando Ubiquinona Q-10 das linhagens <i>N. crassa</i> NRRL 2223, <i>N. intermedia</i> NRRL 5506, <i>N. sitophila</i> NRRL 2884, <i>N. tetrasperma</i> NRRL 2164, <i>N. sitophila</i> ATCC 46892, <i>Neurospora</i> sp n.1 e n.2.....	60

## RESUMO

Foram isoladas diversas linhagens de *Neurospora* sp de amostras de beijos provenientes de vários locais do Estado do Maranhão produtores de tiquira, bebida alcoólica típica da região. Em todas as linhagens, inclusive *N. sitophila* ATCC 46892 obtida do beiju por Park et alii em 1982 foi verificada a capacidade de produzir o composto identificado como etil hexanoato, responsável pelo forte aroma de frutas. Neste trabalho foram realizados estudos comparativos das características bioquímicas e microbiológicas entre *Neurospora* de beiju e outras linhagens de *Neurospora*, tais como *N. sitophila* NRRL 2884, *N. tetrasperma* NRRL 2164, *N. intermedia* NRRL 5506 e *N. crassa* NRRL 2223. Verificou-se que apenas as linhagens de *Neurospora* isoladas de beiju produziram o aroma de frutas. Estas linhagens apresentaram maior capacidade fermentativa em amido 5% e maior atividade amiloglicosidásica que as linhagens de *N. tetrasperma* 2164, *N. intermedia* 5506 e *N. crassa* 2223 da coleção de cultura NRRL, porém menor que a linhagem *N. sitophila* NRRL 2884. Quanto à atividade das enzimas xilanase, pectinase, CMCase e lipase as linhagens de *Neurospora* apresentaram resultados negativos. Através de análises quimiotaxonômicas foi identificada a Coenzima Q-10 em todas as linhagens. Observou-se diferenças no tamanho e coloração de conídias de *Neurospora* isoladas de beiju e *Neurospora* da coleção NRRL. Verificou-se o cruzamento pelo aparecimento de peritécios resultante da fertilização apenas entre *N. sitophila* NRRL 2884 e *Neurospora* isoladas de beiju. Concluiu-se que as linhagens de *Neurospora* isoladas de beiju e *N. sitophila* NRRL 2884 são da mesma espécie, porém apresentam características bioquímicas e microbiológicas diferentes.

## SUMMARY

Several strains of *Neurospora* sp were isolated from beiju which is used for production of tiquira in various regions of the state of Maranhão. All isolated strains, including *Neurospora sitophila* ATCC 46892 which was also isolated from beiju by Park et alii in 1982 have produced fruity aroma that was identified as ethyl hexanoate. In this research was studied biochemical and morphological characteristics of all strains of *Neurospora* sp such as *Neurospora sitophila* NRRL 2884, *N. tetrasperma* NRRL 2164, *N. intermedia* NRRL 5506 and *N. crassa* NRRL 2223. It was found that these strains of *Neurospora* sp from beiju have produced the fruity aroma whereas other strains of *Neurospora* sp did not. All strains of *Neurospora* from beiju produced less amyloglucosidase and alcohol by fermentation than *Neurospora sitophila* NRRL 2884, but produced more than other strains of *Neurospora* sp. It was also found that all strains of *Neurospora* did not produce xylanase, pectinase, carboxymethylcellulase and lipase. It was found that all strains of *Neurospora* have ubiquinone Q-10. Strains of *Neurospora* sp from beiju showed conidiation and pigmentation different from strains of *Neurospora* NRRL. It was examined crossing only between strains of *Neurospora* from beiju and *N. sitophila* NRRL 2884. It was concluded that the strains of *Neurospora* sp isolated from beiju and *N. sitophila* NRRL 2884 are kind level, however have different biochemical and morphological characteristics.

## 1. INTRODUÇÃO

A tiquira é uma bebida alcóolica do período pré-colombiano da região do Maranhão-Brasil obtida a partir da mandioca. A produção envolve três etapas: (a) preparo dos beijos, (b) fermentação e (c) destilação. Entre as três etapas do processo, a preparação dos beijos é a mais importante. Beiju é a placa ou cartucho obtido da massa de mandioca ralada, peneirada e aquecida sobre chapa metálica quente (PINHEIRO, 1981). Após a etapa de cozimento dos beijos, estes são mantidos em local escuro e úmido para o crescimento de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas, as quais transformam o amido de mandioca em açúcares redutores, favorecendo a fermentação, segunda etapa do processo onde os açúcares são transformados a etanol por leveduras selvagens.

Além de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas, estão presentes nos beijos linhagens de *Neurospora*, produtoras de um forte aroma de frutas, composto identificado como etil hexanoato (YAMAUCHI et alii, 1991). Yamauchi *et alii* relataram que etil hexanoato é sintetizado a partir de etanol e hexanoil Coenzima A por ação da álcool acil transferase.

Recentemente foram examinadas várias linhagens de *Neurospora* de diversas coleções de cultura do mundo e linhagens de *Neurospora* sp do beiju, inclusive *N. sitophila* ATCC 46892 isolada de beiju do Estado do Maranhão por Park et alii em 1982 para verificar a produção do aroma de frutas. Verificou-se que não existe linhagem de *Neurospora* estudada

que produza tal aroma, exceto linhagens de *Neurospora* isoladas nas diversas regiões do Maranhão.

O fungo *Neurospora* é um dos microrganismos mais estudados geneticamente porém pouco se sabe sobre sua população natural, o que vem impedir uma maior clareza da coleção sistemática deste microrganismo ou das informações ecológicas da sua população (PERKINS, 1976).

A ecologia microbiana compreende entre outros, o estudo da interrelação entre estruturas e funções da célula microbiana e o meio ambiente em que vive, as mudanças acarretadas pelas populações microbianas ao ambiente e o papel que representam nas comunidades e ecossistemas e finalmente, as interações entre as próprias populações microbianas e entre os micro e macrorganismos. Os ambientes em que vivem os microrganismos tem peculiaridades atrativas, por exemplo, quando se fala de microbiologia aquática ou do solo está se relacionando aos macroambientes e às suas interações com o microrganismo (GUTIERREZ, 1968).

Assim, o presente trabalho tem por objetivo o estudo comparativo das características bioquímicas e microbiológicas entre linhagens de *Neurospora* sp obtidas de beijos provenientes do Estado do Maranhão e linhagens de *Neurospora* sp obtidas de outras fontes, tais como NRRL (Norther Regional Research). Foram estudados a capacidade fermentativa, produção de enzimas, características morfológicas, comportamento em meios de cultura de laboratório, temperaturas de desenvolvimento, características genéticas e análises quimiotaxonômicas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Microflora do beiju de mandioca e produção de aroma por microrganismos

TAHARA e FUJIWARA, 1973 isolaram constituintes voláteis neutros por cromatografia gasosa-espectrometria de massa de culturas de *Sporobolomyces odours*, microrganismo que produz aroma de frutas e apresenta uma coloração vermelho alaranjado proveniente de pigmentos carotenóides. Duas gama-lactonas foram encontradas e identificadas como cis-6-dodecen-4-olide, compostos também encontrados em manteiga. Além das cetonas vários outros constituintes foram identificados dentre álcoois, aldeídos e ésteres. A levedura foi cultivada em meio glicose-asparagina e frutose-alanina e a fração neutra de extrato etéreo foi utilizada nas análises de GLC e GC-MS. Os resultados mostraram picos em número 1 a 11 com um tempo de retenção (tR) de até 44,7 minutos e as duas lactonas saíram nos picos finais apresentando tR 33,6 e 39 minutos. Os ensaios mostraram que a produção de lactona II por *S. odours* foi maior quando esta foi cultivada em meio frutose-alanina. A produção máxima de 4-decanolide pela levedura em meio glicose-asparagina foi verificada após 7 dias de cultivo. Durante a produção de lactona e o crescimento da levedura o pH do meio decresceu rapidamente a partir do segundo dia de crescimento, porém esta queda não afetou a produção do composto lactona. Foi analisada ainda a relação entre a biossíntese de carotenóides e produção de voláteis em seis espécies de nove linhagens de leveduras que apresentavam pigmentos alaranjados em meio glicose-

asparagina sob as mesmas condições usada para *S. odours*. A linhagem *S. roseus* apresentou resultados similares à *S. odours*, diferente porém por produzir a enzima alfa-glicosidase.

HOWARD e ANDERSON, 1976 observaram que a síntese de acetato de etila durante a fermentação de uma preparação da levedura *Sacharomyces cereavisiae* ocorreu na presença dos compostos etanol e acetil CoA, encontrados na fração sobrenadante 3000 G, e que a atividade da enzima foi ativada por íons magnésio numa concentração de 6 a 8 mM. Não houve atividade da enzima na ausência dos substratos o que veio confirmar, segundo os autores a dependência da acetil-CoA pelo ácido acético.

PARK *et alii*, 1982 descreveram a microflora do beiju e suas características bioquímicas. Observaram que *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* e *Paecilomyces* sp são produtores de amiloglicosidase e ainda que *Paecilomyces* sp produz alfa-amilase ácida. Os autores verificaram que além da produção de enzimas amilolíticas no beiju, *Neurospora* produziu um forte aroma de frutas. As características morfológicas de *Neurospora* sp foram descritas após incubação da linhagem em meio de Agar Batata Dextrose por 48 horas como colônias alaranjadas, conídias medindo de 7-14 µm de diâmetro e micélios septados de 3,5-7,0 µm. No estágio peritecial foi observado a formação de peritécios negros e ascosporos amarronzados, ovais e lisos. Quanto à atividade amilolítica não foi detectada atividade de alfa-amilase pela linhagem de *Neurospora*. Houve atividade de amiloglicosidase, porém num valor muito baixo quando comparados com a atividade da enzima pelas outras linhagens isoladas do beiju de mandioca.

SARRIS e LATRASSE, 1985 verificaram que *Fusarium poae* é um fungo altamente específico para produção de lactona. Os autores concluíram que este microrganismo pode ser considerado como uma nova fonte natural produtora de aroma de pêsego. A linhagem foi cultivada em meio de malte a 25°C por 12 dias. Durante o crescimento foi observado um rápido acréscimo do pH do meio de 5,2 para 8,2 num intervalo de 3 dias. Os voláteis foram identificados por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) e o método detectou o composto cis-6-dodecen-4-olide em maior quantidade no meio de malte sendo portanto o responsável pelo aroma de pêsego produzido pela linhagem *F. poae*. Foram ainda detectados outros compostos como o furfural, benzaldeído, benzenoaldeído e tieno-2,3-piridina mas, não se mostraram envolvidos no metabolismo do fungo. Os autores notaram ainda que no cultivo com insuficiência de aeração a produção da lactona foi prejudicada pela formação de álcoois com 5 átomos de carbono como o 2-metil butanol e 3- metil butanol.

YOSHIZAWA e YAMAUCHI, 1988 identificaram o composto etil hexanoato como responsável pelo aroma de frutas produzido por *Neurospora* isolada do beiju e verificaram a maior produção no meio de cultura caldo malte revelado por análises de cromatografia gasosa com produção de mais de 30 ppm do éster neste meio num período de 3 a 4 dias. Além do etil hexanoato detectaram a produção considerável dos compostos etil acetato, metil hexanoato, metil-1-butanol e acetona. Foi verificada a produção de um aroma suave de frutas como pera ou maçã na linhagem *Neurospora* sp ATCC 46892. Os autores reportaram que vários microrganismos são capazes

de produzir aromas porém, não encontraram na literatura a produção de aroma por linhagens de *Neurospora*. O fungo foi submetido a análises para identificação dos voláteis, incubados no meio YM, com glicose como fonte de carbono, a 30°C por 2 a 3 dias. Foram utilizados os meios Caldo Malte, Meio Mínimo de Vogel e Caldo Czapek-Dox para produção de aroma, sob condições de 30°C por 3 a 5 dias e o Caldo Malte apresentou-se como o mais adequado. O extrato orgânico obtido do cultivo foi submetido a análises de cromatografia gasosa para identificação dos voláteis. Os autores observaram que o meio líquido favoreceu a produção do aroma conjuntamente com a agitação dos frascos. Na fermentação estática houve pequena formação de aroma.

YAMAUCHI *et alii*, 1989 demonstraram que a síntese do etil-éster responsável pelo aroma de frutas produzido por *Neurospora* sp do beiju não foi catalisada pela álcool acetil transferase e sim pela álcool acil transferase. Os autores estabeleceram algumas características da enzima álcool acil transferase como a localização no citoplasma, pH ótimo em torno de 8,0, aumento da atividade com NaCl e não inibição pelos ácidos graxos insaturados, diferenciando das propriedades da álcool acetil transferase de leveduras, a qual foi localizada na membrana celular, apresenta pH ótimo em torno de 7 a 8 e sofre inibição da atividade na presença de NaCl e ácidos graxos insaturados. No estudo comparativo quanto a produção do etil hexanoato entre a álcool acil transferase de *Neurospora* e a enzima esterase foi verificado que a álcool acil transferase produziu 48,5 ppm (97,9 %) do composto para 1,05 ppm pela esterase (2,1 %).

YAMAUCHI e HASUO, 1989 isolaram e purificaram a enzima álcool acil transferase de *Neurospora* sp ATCC 46892 e verificaram alguns fatores interessantes. A enzima apresentou peso molecular em torno de 30000 Daltons verificado através de cromatografia por filtração em gel, temperatura ótima de 25°C a pH 8,0, estável até 43°C e pH de estabilidade entre 3,0 e 9,0. Quanto a especificidade pelo substrato, a enzima apresentou atividade em vários acil coenzima A contendo mais que quatro carbono em uma cadeia linear como n-octanoil coenzima A, n-decanoil coenzima A, n-heptanoil coenzima A e n-hexanoil coenzima A, porém não apresentou atividade sobre o n-propionil coenzima A e acil coenzima A (com menos de 4 carbonos na cadeia). Outro fator interessante verificado foi a inibição da enzima pelo DFP (diisopropilfluorofosfato) e PMSF (fenilmetilsulfonilfluorido) resultados esses que vieram sugerir a presença de resíduos de serina no sítio ativo da enzima. O ácido p-cloromercuro benzóico também foi testado e não inibiu sua atividade. Os efeitos dos íons metálicos mostraram que  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  são inibidores potenciais da álcool acil transferase,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  causam inibição parcial e  $\text{Na}^{+}$  e  $\text{K}^{+}$ , uma fraca inibição.

CORMIER *et alii*, 1991 examinaram o microrganismo *Pseudomonas fragi* quanto a produção de odores de morango num meio de cultura rico em produtos lácteos e verificaram por cromatografia gasosa a presença de etil ésteres de ácido butírico, hexanoil e 3-metil butanóico como os maiores contribuintes para o odor produzido. Após o cultivo em BHI a linhagem foi inoculada em meio contendo leite (lactose como fonte de carbono), com 0,2% de etanol, incubada a 15°C por 48 horas sob agitação de 130 rpm. A adição de etanol favoreceu a produção de éster etil, composto

responsável pelo aroma (citado por REDDY et alii, 1968). Os resultados da análise cromatográfica da fração volátil da cultura de *P. fragi*, mostraram a presença de aproximadamente 90 picos. Porém, análises sensoriais realizadas simultaneamente revelaram que a maioria dos compostos não contribuíram ou contribuem muito pouco para a produção do aroma. Os poucos compostos responsáveis apresentaram odores característicos e bem específicos de frutas como morango, cereja e cítricas.

YAMAUCHI e OBATA, 1991 estudaram a produção de odores por várias espécies de *Neurospora* da coleção NRRL e de espécies coletadas do Estado do Maranhão em Caldo Malte 5-30 % por vários dias e verificaram que somente as linhagens selecionadas do Estado do Maranhão produziram voláteis identificados como álcool isoamílico, etil caproato e acetona 1-octen-3-ol. Foram analisadas 12 linhagens de *Neurospora*, incluindo *Neurospora* sp ATCC 46892 já descrita anteriormente como produtora de aroma (YOSHIZAWA et alii., 1988) e outras amostras de linhagens de *Neurospora* do beiju. As amostras foram incubadas em meio de Caldo de Malte 5% sob condições aeróbicas a 30°C por vários dias. Os voláteis foram extraídos e analisados por cromatografia gasosa-espectrometria de massa, onde observou-se a produção do composto etil caproato pela linhagem do beiju, *Neurospora* sp ATCC 46892 em maior quantidade, aproximadamente 30 ppm, enquanto a outra linhagem de *Neurospora* do beiju produziu mais álcool isoamil. Na espécie *N. sitophila* da coleção IFO 4596 não foram detectados estes compostos, porém uma grande quantidade de 1-octeno-3-ol (20ppm) foi produzido pela linhagem. Os autores concluíram que dos três compostos identificados o éster etil caproato parece ser o responsável pelo forte aroma de

frutas produzidos pelas linhagens de *Neurospora* obtidas do beiju do Estado do Maranhão.

PASTORE *et alii*, 1994 reportaram que a produção de aroma por *Neurospora* somente foi verificada nas linhagens isoladas do beiju de mandioca utilizado na fabricação de Tiquira (bebida alcóolica típica do Estado do Maranhão) quando comparadas com espécies isoladas do Estado de São Paulo e obtidas das coleções de cultura ATCC e NRRL. Vinte linhagens do Estado de São Paulo foram analisadas e mais 12 linhagens incluindo espécies da coleção de cultura NRRL e do beiju de mandioca do Estado do Maranhão. As culturas foram incubadas em meio de Caldo Malte 5% a 30°C por 6 dias sob agitação de 250 rpm. Pelas análises dos voláteis presente no extrato, as linhagens de NRRL e do Estado de São Paulo não apresentaram produção de aroma. O composto etil hexanoato foi detectado por cromatografia gasosa como o responsável pela produção de aroma por linhagens do Estado do Maranhão, o qual foi encontrado numa quantidade de aproximadamente 59 ppm em *Neurospora* sp ATCC 46892.

## **2.2. Características bioquímicas e microbiológicas de *Neurospora***

SHEAR e DODGE, 1927 estudaram o fungo róseo do pão, como era conhecido primeiramente o microrganismo *Neurospora* pelo fato da grande e quase incontrolável contaminação ocorrida em padarias. Foi isolado de bagaço de cana de açúcar e registrado pelo nome de *Monilia sitophila* onde foi observada a produção de conídias e peritécios. Mais tarde comparando a

formação de peritécios, conídias e ascosporos entre três diferentes espécies de *Monilia* verificou-se que essas características eram importantes para classificação taxonômica deste fungo, pois enquanto a quantidade de peritécio era produzido em abundância por uma espécie era bastante escassa por outras, além do tamanho que também apresentou muita variação.

Os autores reportaram ainda que dentre as três espécies estudadas, *N. crassa*, *N. sitophila* e *N. tetrasperma*, as duas primeiras são heterotáticas, ou seja apesar do micélio A produzir os dois órgãos sexuais, feminino e masculino, a união deles não produziria um zigoto e a autofecundação neste caso é impossível. Para que haja a formação do zigoto nestes organismos é necessário o contato do órgão sexual feminino do micélio A e o órgão sexual masculino do micélio B da mesma espécie, ou o contrário. Já *N. tetrasperma* foi identificada como homotática, podendo neste caso haver autofecundação. O resultado das investigações dos autores levou ainda ao conhecimento de que o fungo róseo do pão foi conhecido por muitos outros nomes no decorrer de seu estudo até ser classificado dentro do gênero *Neurospora*: *Penicillium sitophilium*, *Oidium aurantiacum*, *Monilia martini*, *Oospora aurantiaca*, *Monilia aurantiacum*, *Oospora lupuli*, *Oidium lupuli*, *Monilia aurea*, *Monilia carbonaria* e *Melanospora margini*. Três novas espécies de *Neurospora* foram identificadas neste trabalho, conhecidas por *N. sitophila*, *N. crassa*, e *N. erythraea*.

BEADLE e TATUM, 1945 desenvolveram um método de indução de mutantes através de requerimentos nutricionais, onde amostras de *N. crassa* e *N. sitophila*, derivadas de material tratado com raio X, UV e neutrons foram obtidas com capacidade alterada na síntese de vitamina B e dos

aminoácidos essenciais. Os autores verificaram que os microrganismos em estudo, além de requerer fontes orgânicas de carbono e inorgânica de sais necessitavam também da vitamina biotina para o seu crescimento que pode ser estimulado com a adição de aminoácidos asparagina e ácido aspártico. Para a verificação dos ascosporos os autores utilizaram hipoclorito como inibidor das conídias, fragmentos miceliais ou outros contaminantes de interferência para a ativação dos esporos sexuais. Nos testes de mutação os ascosporos foram submetidos à luz UV e os mutantes originados crescidos em meios completos pois não foram mais capazes de sintetizar vitaminas, aminoácidos e outros compostos biologicamente ativos e assim estes deviam ser acrescidos ao meio de crescimento. Cada linhagem foi então separada daquelas que não foram modificadas no seu fator de requerimento nutricional podendo portanto crescer no meio mínimo, composto apenas de sacarose como fonte de carbono. O não crescimento neste meio significou que a cultura sofreu mutação e portanto não conseguiu sintetizar algumas substâncias necessárias para o seu crescimento, e que não se encontravam no meio. Além desses mutantes bioquímicos foram observados também um certo número de mutantes morfológicos, porém em menor quantidade que os requerentes de vitamina, aminoácidos, piridinas ou purinas para o crescimento normal.

BEADLE, 1945 descreveu alguns aspectos genéticos e metabólicos em linhagens de *Neurospora* como, indução de mutantes, ciclo de vida, ativação de ascosporos e produção de mutantes específicos na síntese dos compostos arginina, triptofano, vitaminas e outros. O autor pode observar o homotalismo de *N. tetrasperma* verificado pelo crescimento de peritécios por toda a superfície do meio Agar Farinha de Milho evidenciando a característica

de auto-fecundação desta linhagem. Para a verificação do heterotalismo nas linhagens que não apresentaram peritécios sob o meio foi necessário a ativação dos ascósporos que foram submetidos à temperatura de 60°C por 30 minutos, tratamento padrão para a germinação dos esporos sexuais. No cruzamento ocorreu a fusão de núcleos de sexos opostos, resultando no zigoto necessário para a reprodução sexual e formação dos ascósporos. Nas linhagens *N. crassa* e *N. sitophila* foi evidenciado o heterotalismo pelos testes de cruzamento e ativação dos ascósporos.

Em experimentos bioquímicos foi utilizado o meio mínimo acrescido de alguns sais, elementos traços e biotina com consistência líquida ou semi-sólida, em tubos testes ou placas de Petri, e na produção de mutantes os métodos usados consistiram de radiações ionizantes, como raios X, gama e neutrons com cortes de conídias, ou luz UV, onde primeiro os esporos foram suspensos em meio líquido.

WESTERGAARD e MITCHELL, 1947 examinaram algumas condições ótimas para o crescimento vegetativo de *Neurospora* em meio Extrato de Milho variando a concentração de glicose. O ciclo sexual foi melhor induzido em 2% de glicose, com um crescimento estimado de peritécio em 11 dias, tempo este que não foi necessariamente igual para a formação de esporos. Do estudo foi obtido um meio sintético que ofereceu maior estímulo no cruzamento entre espécies e na identificação do peritécio no ciclo sexual de *Neurospora*, constituído por 0,1% KNO<sub>3</sub>, 0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% MgSO<sub>4</sub>, 0,01% CaCl<sub>2</sub>, 0,01% NaCl, 2,0% sacarose e 1,5% agar. Evidenciaram pelos resultados que a reprodução sexual em *Neurospora* foi favorecida por um

suplemento relativamente alto de glicose no meio em combinação proporcional com certos compostos nitrogenados. Os peritécios e ascosporos obtiveram bom desenvolvimento em meio Agar Farinha de Milho acrescido de 2% de glicose. E o cruzamento entre mutantes foi favorecido com o acréscimo de extrato de leveduras, extrato de malte, hidrolisado de caseína, mistura de vitaminas ou a combinação destes no meio sintético.

MARY, 1947 estudou a germinação de ascosporos em linhagens de *Neurospora crassa*, e verificou que o furfural é um agente químico bastante efetivo na ativação de ascosporos dormentes deste microrganismos. Foram utilizados nos testes de germinação, ascosporos obtidos do cruzamento entre as linhagens Em 5256A e Em 5297a, sendo a primeira anteriormente derivada do cruzamento de Abbot 4A x 25a e a segunda do cruzamento de Abbot 1A x 12a (BEADLE e TATUM,1945). A formação de peritécios foi verificada entre 1 a 4 semanas. O hipoclorito de sódio foi utilizado para inibir o crescimento conidial, afim de que a germinação dos ascosporos fosse mais completa. O meio utilizado no experimento foi constituído de sacarose como fonte de carbono, porém o autor relatou ainda que a xilose pode fornecer uma alta porcentagem de germinação espontânea de ascosporos. Observou-se ainda que altas temperaturas não afetaram a atividade do furfural na ativação dos esporos sexuais. Outros aldeídos e derivados furanos foram testados como agentes ativadores de ascosporos em *N. crassa* como, o furano álcool furfural, ácido furanóico, furanoamida e outros, porém apenas o álcool furfuril se mostrou ativo para a germinação dos esporos sexuais. Os esporos de *N. crassa* quando tratados sob temperatura de 50 a 60°C por um período variando entre 10 a 60

minutos apresentaram 100% de germinação, estimulada também pelo meio de crescimento composto de Extrato de Malte ou Extrato de Levedura.

GOCHENAUR e BACKUS, 1962 identificaram uma nova espécie, *Neurospora terrícola* isolada de solo coletado em Wisconsin, caracterizada pela presença de peritécios, ascos cilíndricos, oito ascosporos dentro de asco negro de forma ovóide. A nova espécie foi ainda identificada como homotática. Os esporos maduros foram tratados após 22 e 46 dias de cultivo a 46°C por 30 minutos, tratamento onde não foi observado a germinação dos esporos sexuais. Entretanto quando tratados a 60°C por 30 minutos pode se verificar germinação de 15% no tempo de 22 dias e 6% em 46 dias de incubação. O melhor resultado foi observado pelos autores, quando foi feita a combinação do tratamento térmico e químico, onde os ascosporos foram tratados a 60°C por 30 minutos com furfural 1-3 M, o que elevou a germinação para 70% dos esporos tratados após 22 dias de cultivo e 40% para os esporos de 46 dias. O tratamento apenas com furfural também não induziu a germinação de esporos.

Quanto às observações morfológicas da nova espécie foram revelados os seguintes pontos: os ascocarpos iniciais não são desiguais como em *Neurospora sitophila* Shear e Dodge, o centro do ascocarpo mostrou-se organizado, a estrutura da parede peritecial com frutificações, peritécios maduros semelhantes às outras espécies de *Neurospora* e ascosporos binucleados identificados em *N. sitophila* e *N. crassa* Shear e Dodge.

NELSON e NOVAK, 1964 isolaram uma nova espécie de *Neurospora*, *N. dodgei*, obtida do solo de Porto Rico pelo tratamento da amostra com álcool etílico 65% por 5 minutos. Após retirado o excesso de álcool etílico foram semeados em placas de Petri contendo Agar Czapek-Dox acidificado e 0.5% de Extrato de Levedura. A nova espécie foi identificada como homotática, produtora de peritécios largos e ascósporos achatados e ainda caracterizada pelo rápido crescimento vegetativo em meio comum de laboratório após 48 horas à temperatura de 24-25°C. Foi observado rápido crescimento da linhagem numa variedade de meios com aparecimento de micélios dentro de 48 horas à temperatura de 24-25°C. Nos meios Agar Batata Dextrose (PDA) e Agar Extrato de Malte o micélio apareceu de forma flocosa e densa, apresentando coloração escura. Em meio Agar Czapek-Dox o micélio inicialmente cresceu espalhado pela placa de forma escassa, e somente depois as hifas começaram a se espalhar por toda a placa de forma flocosa e aérea. Os autores concluíram do estudo do crescimento de *N. dodgei* nos vários substratos testados que os meios Agar de Westergaard e Agar Farinha de Milho foram claramente os melhores para o desenvolvimento dos micélios e ascocarpos respectivamente. Apesar do crescimento micelial escasso em Agar Farinha de Milho pode se observar principalmente a formação de peritécios por toda a superfície do meio, sendo portanto importante no estudo da reprodução sexual do fungo. O meio Agar Batata Dextrose (PDA), assim como o Agar Extrato Malte foram mais ativos no crescimento micelial. Curiosamente eles perceberam que *N. dodgei* cresceu razoavelmente bem sob o meio Agar-Água, e neste caso o micélio cresceu bastante espalhado em 3 dias. Poucos peritécios maduros foram formados. Quanto à germinação dos ascósporos

observou-se a eficiência do tratamento a 60°C por 30 minutos sob Agar Extrato de Malte contendo 1,7 ppm de formol resultando em 87% de germinação.

LOWRY e DURKEE, 1967 diferenciaram o período de germinação de microconídias e macroconídias de *Neurospora crassa* através de microscopia eletrônica e observaram que enquanto a formação de macroconídias se dava em 2 a 4 dias, as microconídias eram formadas após 8 a 10 dias a 25°C justificado pelo fato da grande complexidade do processo. Segundo os autores as células dos microconidióforos são uninucleadas o que requer que o núcleo das hifas vegetativas sejam segregados enquanto essas células são formadas, razão então da frequência de obstruções nos septos das células de microconídias e subsequente dificuldade na formação.

ROWLAND e FREDERICK, 1968 pesquisaram sobre as técnicas genéticas e microbiológicas em linhagem de *Neurospora crassa*, numa revisão que relatou a biologia do microrganismo, os meios de crescimento, as técnicas simples microbiológicas de isolamento da colônia e suspensão conidial, o mapeamento genético e a seleção de mutantes. Do estudo biológico do fungo foi verificado o sistema vegetativo composto de hifas multinucleadas e ramificadas com septos entre os núcleos apresentando poros de 0,5  $\mu$  de diâmetro no centro. Apresentaram três formas de esporos, dois assexuais (microconídias e macroconídias) e um sexual (ascosporo), sendo este último formado no final do processo sexual o qual vem requerer a participação de linhagens de sexos opostos A e a para a formação de peritécios. Quanto aos meios de cultura, os mais utilizados nos estudos bioquímicos e genéticos foram os meios sintéticos compostos de sais, solução

de biotina e elementos traços e também os meios complexos de suplementação, ou seja meios sintéticos complementados com Extrato de Levedura, Malte e Hidrolisado de Caseína auxiliares no crescimento de linhagens auxotróficas. Um meio desidratado obtido do laboratório Difco (Agar Cultura *Neurospora* Número 0321-15) que contém peptona, extrato de levedura e maltose também foi recomendado para o crescimento de mutantes. Outro meio de cultura muito utilizado como suporte para o desenvolvimento sexual de *N. crassa*, relatado na revisão foi o Agar Farinha de Milho, composto de infusão de milho.

MAHONEY e HUANG, 1969 descreveram duas novas espécies de *Neurospora*, obtidas de amostras de solos da ilha de Galápagos e da Nigéria. Foram registradas respectivamente como *Neurospora galapagosensis* Mahoney & Backus, sp e *Neurospora africana* Huang & Backus, sp. As amostras foram tratadas com álcool 65% por 10-20 minutos e depois plaqueadas em meio de Gochenaur (GOCHENAUR, 1964), contendo glicose e nitrato como fonte de carbono e nitrogênio respectivamente. Os autores utilizaram estreptomicina para inibir o crescimento de bactérias no meio. Para o estudo morfológico as novas linhagens de *Neurospora* foram crescidas em vários meios comuns de laboratório como Agar Batata Dextrose (PDA), Agar Czapek-Dox e Agar Farinha de Milho (Corn-Meal) à temperatura de 24°C. Foram utilizadas culturas de *N. dodgei* PR300 paralelamente no estudo para fim de comparação. Os resultados da identificação mostraram que *N. galapagosensis* apresentava formação de peritécios maduros em 14 dias de crescimento sobre a superfície do meio Agar Farinha de Milho à temperatura ambiente de cor amarronzada e medindo de 300-700  $\mu$  de diâmetro, ascos cilíndricos com oito esporos contínuos e elipsoidais medindo de 29-35 x 14-18

$\mu$ , e com características homotáticas. Aparentemente esta espécie apresentou semelhança com *N. dodgei* (linhagem utilizada para comparação no estudo), como foi o caso do crescimento no meio Agar Czapek-Dox que teve início com as hifas relativamente espalhadas e depois rapidamente cruzando todo o substrato. Nos outros meios o micélio se desenvolveu por toda a superfície do meio em 48 horas à temperatura ambiente. Sob Agar Malte e Agar Batata Dextrose verificou-se micélios flocosos e de coloração forte, em contraste com o meio Agar Farinha de Milho em que o micélio cresceu lentamente e com pouca pigmentação.

A nova espécie proveniente de solos da Nigéria, *Neurospora africana* mostrou-se aparentemente indistinguível da linhagem utilizada na comparação, *N. dodgei* assim como *N. galapagosensis* da Ilha de Galápagos quando crescidas em vários meios de culturas. Entretanto pode se verificar em estudos microscópicos as diferentes formas dos ascosporos e ascogônios quando comparadas à *N. dodgei*, assim como os menores tamanhos de sua estrutura reprodutora, o ascocarpo, os ascos e principalmente os esporos quando comparados à *N. galapagosensis*. O peritécio desta nova linhagem apresentou tamanho de 380-500  $\mu$  em diâmetro.

FREDERICK e UECKER, 1969 identificaram uma nova espécie do gênero *Neurospora*, encontrada no solo do Paquistão, registrada pelo nome de *N. lineolata* Frederick & Uecker, sp e caracterizada por ser homotática e pela germinação de ascosporos uni e bipolar após tratamento a 55°C por 20-30 minutos. Em comparação com *N. dodgei* (MAHONEY et al, 1969) notaram que essa duas espécies diferenciaram principalmente em relação as

características da parede dos ascosporos e de seu tamanho, enquanto esta espécie apresentou ascosporos medindo de 30-33 x 15  $\mu$ , os de *N. lineolata* apresentaram tamanho típico de 22-25 x 12  $\mu$ .

MAHESHWARI e ANTONY, 1973 desenvolveram uma técnica seletiva eficiente para o isolamento de *Neurospora crassa* obtida do solo da Índia que consistiu da suspensão da amostra (3 a 5 g) em furfural e aquecimento a 60°C por 30 minutos com separação por centrifugação. Após remoção do sobrenadante o precipitado foi semeado em meio Vogel acidificado a pH 4,0 com HCl para prevenir o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas sob fluorescência numa câmara à temperatura de 20-30°C. Para o cruzamento os autores usaram o meio descrito por Westergaard, onde o aparecimento do protoperitécio foi verificado após 5-7 dias.

### **2.3. Quinonas na classificação de microrganismos**

Recentes avanços na bioquímica de microrganismos tem revelado que análises dos componentes celulares podem ser efetivamente aplicados para sistemática bacteriana provendo a base da quimiotaxonomia. Uma classe de lipídeos terpenóides que apresenta potencial considerável como valor taxonômico são os isoprenóides ou quinonas respiratórias presentes na cadeia de transporte de elétrons da célula.

LESTER e CRANE, 1959 relataram que os compostos homólogos encontrados na natureza, designados Coenzima Q, são derivados

da 2,3 dimetoxi-5 metilbenzoquinona, onde é substituída na posição 6 por uma cadeia poliisoprenóide que pode ter de 6 a 10 unidades de isoprenos e classificadas como Q-6, Q-7, Q-8, Q-9 e Q-10. Foi usado o termo ubiquinona para esse grupo de compostos presente na mitocôndria dos organismos. Os autores estudaram a presença de ubiquinona em alguns animais, plantas e microrganismos e verificaram a ocorrência de outras quinonas de interesse químico. Uma variedade de plantas e microrganismos examinados apresentaram além de Coenzima Q, uma quinona lipossolúvel similar presentes nos cloroplastos, no caso de plantas verdes, chamadas de Q254. E espécies de *Cyanophyceae* e bactérias aeróbicas do gênero *Mycobacterium* apresentam grande concentração de outra quinona lipossolúvel chamada vitamina K. Em *Clostridium perfringens*, bactéria anaeróbica, não foi encontrado nem Coenzima Q nem vitamina K. Nos *Basidiomycetes* examinados não foi detectado a presença de Coenzima Q, porém todos apresentaram Q254 e vitamina K. Essa classe de fungos pode ser reconhecida pela presença de basidioquinona, e os referidos compostos podem ser extraídos com solvente isooctano após o preparo de um extrato, por saponificação, com KOH em etanol na presença de pirogalol. Reconhecidos em espectro de absorção na região ultravioleta a 255 nm, que é dissipado sob redução com  $\text{KBH}_4$ . Dentre os fungos estudados pertencentes ao grupo *Ascomycetes*, o composto Coenzima Q-10 foi identificado em linhagens de *Neurospora crassa*, sendo verificado porém a ausência de vitamina K.

CRANE, 1964 durante investigações da distribuição de ubiquinona em animais, plantas e microrganismos detectou a existência de quatro tipos de quinonas terpenóides: ubiquinona, plastoquinonas,

tocoferolquinona e vitamina K, consideradas as quatro principais de origem biológica. O autor listou ainda outras quinonas terpenóides identificadas pelo teste de Craven, o qual foi baseado na produção de cor derivada da quinona não substituída pela adição de etilcianoacetato sob condições alcalinas, esse composto reage então com o grupo metoxi da ubiquinona refletindo uma forte cor azul. No estudo foi ainda identificada a presença de Coenzima Q-10 em linhagens de *Neurospora crassa*.

Na reunião da IUPAC-IUB realizado no ano de 1973, a Comissão de Nomenclatura em Bioquímica, diante do grande número de novas quinonas identificadas e da confusão dos nomes pelos pesquisadores da área, estabeleceram critérios para identificação de quinona: (a) Em relação ao comprimento da cadeia e número de unidades isoprenóides, por exemplo Q6 onde o número 6 vem representar o número de unidades isoprenos e assim possui cadeia menor que Q7 que tem 7 unidades isoprenos; (b) Nomes triviais para cada grupo de quinona como menaquinonas e ubiquinonas; (c) Símbolos individuais para cada grupo, assim menaquinona foi representada por MK-, ubiquinona por Q-, plastoquinona por PQ- e assim sucessivamente.

YAMADA e NOJIRI, 1976 testaram 131 culturas de leveduras do gênero *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Endomycopsis* e *Saccharomycopsis*, quanto ao sistema Coenzima Q, determinado por cromatografia em camada delgada de fase reversa. O gênero *Debaromyces* foi dividido em dois grupos: 3 espécies que contém Q-6 e 3 espécies que apresentam Q-9. O gênero *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Saccharomycopsis* foram marcados pela presença de apenas um tipo de

Coenzima, Q-6, Q-6 e Q-8 respectivamente. O gênero *Endomycopsis* foi representado por três tipos do sistema Coenzima Q: Q-7 em 3 espécies estudadas, Q-8 na maioria das espécies e Q-9 em 2 espécies.

YAMADA e ARIMOTO, 1976 examinaram 43 linhagens de leveduras quanto ao sistema de Coenzima-Q para os gêneros *Nadsonia*, *Saccharomycodes*, *Wickerhamia*, *Hanseniaspora* e *Kloeckera*, determinado por cromatografia de camada delgada de fase reversa e espectrometria de massa. Em todas as culturas foram encontradas apenas um tipo de ubiquinona presente, Q-6, com exceção do gênero *Wickerhamia* onde foi identificado o composto Q-9. Os autores fizeram paralelamente testes de composição de base DNA, presença de polissacarídeo da parede celular e características sorológicas para uma melhor identificação das espécies.

COLLINS e PIROUZ, 1977 verificaram a distribuição de quinonas isoprenóides e sua importância na classificação das famílias de *Actinomycetes* e *Corynebacteria*. Em todas as 48 culturas estudadas apenas menaquinonas foram encontradas e identificadas como dihidromenaquinona contendo 8 e 9 unidades isopreno, tetrahidromenaquinona com 6 e 8 unidades isopreno e ainda di-, tetra- e hexahidromenaquinona com 10 unidades isoprenóides.

COLLINS e JONES, 1981 elucidaram a composição de uma mistura natural de ubiquinonas utilizando método cromatográfico semi-qualitativo de fase reversa (TLC) baseado na separação dos componentes de acordo com suas propriedades físicas, representada por uma fase estacionária

não-volátil e uma fase móvel corrida em placas de sílica gel com misturas polares de acetona-água ou dimetilformaldeído-água. Os autores observaram a separação entre Q6, Q7, Q8, Q9 e Q10 em cromatografia ascendente.

SUGIYAMA e FUKAGAWA, 1985 estudaram algumas características taxonômicas de 108 linhagens de 61 espécies do gênero *Rhodosporidium*, *Leucosporidium*, *Rhodotorula* por análises da composição celular de carboidratos, composição de bases do DNA, sistema ubiquinona e teste de cor com o azul diazonium B (DBB) e verificaram que as leveduras em estudo poderiam ser classificadas dentro de 2 grandes grupos, *Basidiomycetes* e *Ascomycetes*, baseados na presença e ausência respectivamente de xilose na célula. Os três gêneros foram divididos quanto a composição de bases de DNA em grupos contendo 50,5-68,5 mol % G+C, 50,5-59,0 mol % G+C e 49,5-70,0 mol % G+C respectivamente. No sistema de Coenzima Q foram encontrados Q-8, Q-9, Q-10 ou Q-10 (H2). Todas as leveduras *Basidiomycetes* deram reação de cor positiva com DBB, exceto linhagens de *Rhodotorula glutinis*, já os *Ascomycetes* deram teste DBB negativo, com exceção de uma espécie.

KOMAGATA e SUZUKI, 1987 descreveram análises de lipídeos e componentes da parede celular para classificar e identificar bactérias. Ácido micólico, ácido graxo, lipídeos polares e quinonas isoprenóides foram utilizados nas análises como suporte na sistemática bacteriana. Os autores relataram um método de extração de quinona baseado na separação de menaquinona e ubiquinona de acordo com o Rf 0,7 e 0,4 cm respectivamente observado na placa de sílica gel em luz UV. Para a extração a massa celular (100-300mg) foi suspensa em solução 2:1 (v/v) de cloroformio-

metanol e incubada por uma noite a 25°C. Após a filtração o extrato foi evaporado e misturado com acetona. Esta solução foi aplicada em placa de sílica gel e a cromatografia desenvolvida com o solvente benzeno por 40 minutos. As quinonas puderam então ser observadas à luz UV, onde menaquinona foi identificada no Rf 0,7 e ubiquinona no Rf 0,4. Nesta fase as quinonas foram apenas identificadas, porém para separá-las foi necessário extrair a amostra da placa, acrescentar acetona a sílica e aplicá-la com um tubo capilar sob uma placa de TLC em fase-reversa (Reverse-phase thin layer chromatography) com solventes específicos, sendo que para menaquinona os autores usaram a mistura de 99:1 (v/v) de acetona-água e para ubiquinona a mistura 80:20 (v/v) de acetona-acetonitrila. O tempo de desenvolvimento foi 15 minutos. As quinonas foram visualizadas em luz UV. As análises deram resultados apenas qualitativo. Para obtenção de dados quantitativos as amostras foram analisadas através de Cromatografia líquida de alta eficiência.

GENEVIEVE, 1987 investigou a Coenzima Q em 68 linhagens de leveduras por HPLC, um método cromatográfico de análise quantitativa complementar ao TLC de fase reversa que permite a quantificação de Coenzima Q6, Q7, Q8, Q9 e Q10 presente em cada espécie. De todas as 31 espécies de *Hansenula* apenas uma, *H. holstri* apresentou maior quantidade de Q-8 enquanto nas restantes foi identificado o composto Q-7 em maior porcentagem. Nos gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces* os autores encontraram maior porcentagem de ubiquinona Q-9 assim como nas linhagens de *Lipomyces* testadas. E em espécies de *Hanseniaspora* e *Kloekera* identificaram Q-6 como quinona isoprenóide na célula, representando a maior parte.

ITOH *et alii*, 1988 isolaram uma nova ubiquinona de *Chaetomium funícola* de estrutura química identificada como 2,3-dimetoxi - 5-metil - 6-IX,X-tetrahidrofarnesil farnesilgeranil-geranil-1,4-benzoquinona. Este composto foi identificado por espectrometria de massa e H-NMR. O fungo caracterizou-se também por conter ubiquinona dihidrogenada com 10 unidades isoprenóides, porém como menor componente.

YAMAUCHI *et alii*, 1992 reportaram que linhagens do gênero *Malassezia* estavam relacionadas a leveduras da família *Basidiomycetes* pelo fato do sistema ubiquinona compreender-se de Q-9, além do microrganismo apresentar testes positivo DBB e urease e porcentagem de 50 mol % G+C.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Meios de cultura

##### 3.1.1 Agar Batata Dextrose ( PDA )

Infusão de batata.....	20%
Glicose.....	2%
Agar.....	1,5%

##### 3.1.2 Agar Farinha de Milho ( Corn-Meal )

Farinha de milho.....	1,7%
Agar.....	1,5%

##### 3.1.3 Agar de Westergaard

KNO <sub>3</sub> .....	0,1%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,1%
MgSO <sub>4</sub> .....	0,05%
CaCl <sub>2</sub> .....	0,01%
NaCl.....	0,01%
Biotina.....	5µg/l
Elementos traços.....	1ml/l
Sacarose.....	2,0%
Agar.....	1,5%

Extrato de levedura..... 0,25%

#### Elementos traços

Ácido cítrico H<sub>2</sub>O.....5,0%

ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O.....5,0%

Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O.....1,0%

CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O.....0,25%

MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O.....0,05%

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.....0,05%

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O.....0,05%

Dissolver em 95 ml de água e completar o volume para 100 ml.  
Todos os meios de culturas foram esterilizados a 121°C por 15 minutos em autoclave.

### 3.1.4 Corante Azul de Algodão-Lactofenol

#### 3.1.4.1 Solução de Azul de Algodão (Cotton-Blue)

Cotton blue.....10 ml

Glicerol.....10 ml

Água.....80 ml

#### 3.1.4.2 Lactofenol

Ácido lático.....	100 ml
Fenol.....	100 g
Glicerol.....	100 ml
Água.....	100 ml

Dissolver o fenol em água, sem aquecimento e em seguida acrescentar o ácido lático e o glicerol. Para o preparo do corante misturar partes iguais da solução de azul de algodão e lactofenol.

### **3.2. Coleta de amostras**

Para o isolamento de *Neurospora* foram coletadas amostras de beijos mofados de diferentes municípios do Estado do Maranhão, acondicionadas em sacos plásticos e transportadas ao laboratório de Bioquímica da FEA/UNICAMP.

Foram utilizadas as culturas puras de *Neurospora* da coleção NRRL, *N. sitophila* 2884, *N. tetrasperma* 2164, *N. crassa* 2223 e *N. intermedia* 5506 para fins de comparações com as linhagens isoladas de *Neurospora* sp do beiju, inclusive *N. sitophila* ATCC 46892.

### **3.3. Preparo dos beijos**

Com a massa de mandioca ralada e peneirada foram feitos os beijos, bolos de aproximadamente 40 x 40 cm de largura e 3 cm de espessura. Foram assados em fornos à lenha, e após esfriados, colocados em local úmido

e escuro para proliferação de microrganismos. Após dez dias de incubação os beijos se encontravam totalmente mofados e prontos para coleta. Estes microrganismos são os agentes naturais da fermentação, a próxima etapa na preparação da tiquira.

### **3.4. Isolamento de *Neurospora* do beiju**

Amostras de 0,5 g de beiju foram suspensas em 75 ml de água destilada estéril e agitadas com bastão de vidro. Após homogeneização as amostras foram semeadas em placas contendo meio Agar Batata Dextrose (PDA) sob forma de estrias com alça de níquel-cromo, e as placas foram incubadas a 30°C por 5 dias. As colônias isoladas foram inoculadas em tubos inclinados de PDA.

### **3.5. Seleção de *Neurospora***

Durante o período de crescimento da flora microbiana em placas contendo Agar Batata Dextrose (PDA), as colônias que apresentavam a característica de cor alaranjada, rósea ou salmão e com hifas bem espalhadas foram inoculadas em tubos inclinados contendo o meio PDA e incubados a 30°C por 5 dias.

### **3.6. Características bioquímicas**

#### **3.6.1 Estudo da capacidade fermentativa de *Neurospora* em amido**

### **3.6.1.1 Preparo do pré-inóculo**

A massa celular de *Neurospora* correspondente a uma alçada foi suspensa em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml do meio líquido constituído de 5% de amido 0,1% de extrato de levedura e 0,1% de peptona, incubados a 30°C por 24 horas.

Para controle foi utilizada a linhagem de levedura Fleischmann. A levedura cultivada em Agar YM durante 24 horas foi usada para a preparação do pré inóculo como descrito acima. Foram incubadas ainda culturas mistas de *Neurospora* e levedura Fleischmann.

### **3.6.1.2 Fermentação em amido 5%**

Uma amostra de 30 ml de pré-inóculo foi transferida assepticamente para frascos de 500 ml contendo 200 ml do meio amido 5%. Após adaptação de rolha de borracha com dispositivo de vidro na forma de U contendo ácido sulfúrico concentrado os frascos foram incubados a 30°C e a perda de CO<sub>2</sub> foi acompanhada por meio da variação de massa medida durante 12 dias de incubação.

### **3.6.2 Determinação da produção de enzimas por *Neurospora***

As linhagens de *Neurospora* sp cultivadas em Agar Batata Dextrose foram inoculadas com alça de níquel-cromo em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml do meio constituído de amido solúvel 4%, extrato de

levedura 1% e peptona 1% ajustado para pH 6,5 previamente autoclavados a 121°C por 15 minutos. Após incubação por 5 dias com agitação de 180 rpm as amostras foram filtradas em lã de vidro e guardadas a -20°C para a determinação enzimática.

### **3.6.2.1 Determinação da atividade de amiloglicosidase**

A atividade da enzima amilolítica de *Neurospora* foi determinada pelo método de Park e Azuma, 1990. As misturas de reação constituídas de 0,5 ml de 1 % de amido solúvel em tampão fosfato 0,2 M, pH 5,0 e 0,5 ml de solução de enzima diluída 1:10 de *Neurospora* foram incubadas a 55°C por 30 minutos. Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944), usando-se a glicose como padrão. Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de glicose/minuto sob as condições de ensaio.

### **3.6.2.2 Determinação da atividade de celulase ( CMCCase )**

A atividade de celulase foi determinada pelo método descrito por Asquiere, 1992. Amostras de 0.1 ml de solução enzimática foram adicionadas a 0,9 ml de substrato 1% de carboximetilcelulose em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 e a mistura incubada a 40°C por 10 minutos e os açúcares redutores foram determinados pelo método de DNS. Uma unidade de atividade de CMCCase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a

formação de 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor expresso como glicose por minuto nas condições de ensaio.

### **3.6.2.3 Determinação da atividade de xilanase**

A atividade de xilanase foi determinada como descrito no item 3.6.2.2 utilizando-se xilana como substrato. Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1  $\mu\text{mol}$  de xilose por minuto sob as condições de ensaio (SILVA et alii, 1994).

### **3.6.2.4 Determinação da atividade de lipase**

A atividade de lipase foi determinada pela titulação de ácidos graxos liberados utilizando-se 1 g de óleo de oliva, 4 ml de tampão acetato 0,05 M pH 5,6, com 6 pérolas de vidro e 1 ml da solução enzimática.

Os frascos Erlenmeyer contendo esta mistura de reação foram incubados a 40°C por 60 minutos com agitação. A reação paralizada pela adição de 20 ml de solução de etanol:acetona na proporção 1:1. Os ácidos graxos livres foram titulados com KOH 0,1 N utilizando-se fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera ácido oléico expresso como  $\mu\text{mol}$  de ácido oléico/minuto/ml de enzima (PASTORE, 1992).

### **3.6.2.5 Determinação da atividade de pectinase**

A atividade de pectinase foi realizada como descrito no item.3.6.2.2 utilizando pectina como substrato. Uma unidade de atividade de pectinase foi definida como 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor expresso em glicose por minuto.

### **3.6.3 Cromatografia em papel de açúcares**

Os açúcares resultantes da hidrólise do amido das amostras *Neurospora* sp n.1, *Neurospora* sp n.2 e *N. sitophila* ATCC 46892 do beiju, *N. sitophila* NRRL 2884, *N. tetrasperma* NRRL 2164, *N. intermedia* NRRL 5506 e *N. crassa* NRRL 2223 foram verificados por cromatografia em papel, realizada com papel Whatman número 1. O sistema de solvente utilizado para a cromatografia descendente constituiu-se de butanol:piridina:água na proporção 6:4:3 v/v respectivamente. O tempo de desenvolvimento da cromatografia foi de aproximadamente 17 horas. Utilizou-se como padrões glicose 10 %, maltose 10 % e amido hidrolisado.

Os açúcares redutores foram revelados com  $\text{AgNO}_3$  em acetona, tiosulfato de sódio 10% e NaOH alcóolico, de acordo com o método descrito por Trevelyan et alii, 1950.

## **3.7. Características microbiológicas**

### **3.7.1 Características morfológicas**

#### **3.7.1.1 Microcultivo**

Para a verificação das características morfológicas das linhagens por microcultivo, foram preparadas placas contendo uma fina camada de meio Agar Batata Dextrose (PDA), Agar Farinha de Milho (Agar Corn Meal ) e meio Agar de Westergaard (WESTEGAARD, 1947). Após autoclavadas a 121°C por 15 minutos o meio foi cortado em quadradinhos de 1 x 1 cm, e com uma espátula estéril foram transferidos para a lâmina sobre papel de filtro contido na placa previamente esterilizada. Pequenas porções do micélio da cultura foram semeadas nas bordas do meio de cultura em forma de quadrado, com auxílio de uma alça de níquel-cromo e o meio coberto com a lamínula estéril. O papel de filtro no fundo da placa foi umedecido com água estéril. As placas foram incubadas a temperatura de 25°C por 12 dias. Após a incubação a lamínula foi retirada, o meio descartado e a lâmina corada com azul de algodão lactofenol. Lamínulas novas foram usadas para cobrir o crescimento das culturas e depois fixadas com esmalte.

### **3.7.1.2 Formação de hifas, conídias e micélios**

A formação de hifas septadas ou não-septadas, produção de macroconídeas e/ou microconídeas, e micélios foram verificadas em microscópico JENAMED, ocular GF.PW 10x (25), objetiva 40x / 0,65 nas lâminas de microcultivo coradas com azul de algodão lactofenol onde a cultura cresceu por 12 dias sob o meio Agar de Westergaard à temperatura de 25°C, condições propícias para o crescimento micelial.

### **3.7.2 Crescimento em diferentes meios de cultura.**

Para verificar o crescimento em alguns meios de cultura as linhagens de *Neurospora* sp do beiju e *Neurospora* NRRL foram semeadas em forma de estria com alça de níquel-cromo nos meios Agar Farinha de Milho, Agar Batata Dextrose e Agar de Westegaard em placas de Petri e tubos inclinados, incubados à temperatura de 25°C por 12-14 dias.

### **3.7.3 Desenvolvimento em diferentes temperaturas**

As linhagens de *Neurospora* foram examinadas quanto à capacidade de desenvolvimento a 25, 30, 37, 40, 45 e 50°C em Agar Batata Dextrose durante 96 horas.

### **3.7.4 Características genéticas**

#### **3.7.4.1 Evidência do homotalismo**

Em placa de Petri estéril com meio Agar Farinha de Milho, foi semeado um inóculo da linhagem de *N. tetrasperma* NRRL 2164. Em seguida foi incubada por 5 dias a 28°C em estufa e depois por mais cinco dias sob iluminação fluorescente nas mesmas condições de temperatura, conforme descrito por Larpent, 1938.

#### **3.7.4.2 Evidência do heterotalismo**

##### **3.7.4.2.1 Estudo da interação de micélios**

Foi semeado em uma placa de Petri contendo meio Agar Farinha Milho um inóculo do micélio da linhagem *N. sitophila* NRRL 2884 e *N. sitophila* ATCC 46892. A placa foi incubada por dez dias na obscuridade a 28°C (em estufa) a fim de permitir a interação dos micélios. Após este tempo colocou-se a placa de Petri sob iluminação fluorescente por cinco dias nas mesmas condições de temperatura para estimular o desenvolvimento das frutificações. Os micélios foram observados através de lupa.

#### **3.7.4.2 Espermatização experimental**

Foram semeados três tubos contendo o meio Agar Farinha de Milho, com o micélio de *N. sitophila* NRRL 2884 e uma placa de Petri com o micélio de *N. sitophila* ATCC 46892 em forma de estria com uma alça de níquel-cromo. Após incubação por dez dias em estufa a 28°C foram adicionados 4 ml de água destilada estéril no primeiro tubo o qual foi agitado e o inóculo transferido para o tubo 2, agitado novamente e vertido no tubo 3. Em seguida uma gota desta suspensão foi colocada com pipeta estéril na placa de Petri previamente semeada, e incubada por 5 dias a 28°C sob iluminação fluorescente contínua.

#### **3.7.4.3. Cruzamento**

Para o cruzamento com *N. sitophila* NRRL 2884 foram utilizadas as linhagens heterotáticas *N. sitophila* ATCC 46892, *Neurospora* sp n.1 e n.2 (beiju), *N. crassa* NRRL 2223 e *N. intermedia* NRRL 5506. Numa

placa de Petri contendo meio Agar Farinha de Milho foram semeadas com alça de níquel-cromo uma estria das amostras de *N. sitophila* NRRL 2884 e *N. sitophila* ATCC 46892, cada linhagem num lado da placa, e esta incubada por 12 dias à temperatura ambiente sob iluminação fluorescente. Do mesmo modo foram realizados cruzamentos entre *N. sitophila* NRRL 2884 X *Neurospora* sp n.1, *N. sitophila* NRRL 2884 X *Neurospora* sp n.2, *N. sitophila* NRRL 2884 X *N. crassa* NRRL 2223, *N. sitophila* NRRL 2884 X *N. intermedia* NRRL 5506, *N. sitophila* ATCC 46892 X *N. crassa* NRRL 2223 e *N. sitophila* ATCC 46892 X *N. intermedia* NRRL 5506.

### **3.8. Características químicas**

#### **3.8.1 Determinação de Ubiquinona**

##### **3.8.1.1 Preparo da amostra**

As linhagens de *Neurospora* foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio líquido constituído de 1,7% de extrato de malte e 0,3% de peptona, ajustado a pH 5,0 e incubados com agitação a 30<sup>o</sup>C por 72 horas a 180 rpm.

Após a incubação o meio de cultura foi filtrado em lã de vidro, alíquota de 2 ml do sobrenadante inicial foi congelado e a massa celular lavada com água destilada por 6 vezes e armazenada em freezer.

### **3.8.1.2 Extração de ubiquinona e cromatografia em camada delgada**

A extração de ubiquinona das linhagens de *Neurospora* foi realizada conforme o método descrito por Komagata, 1987. A mistura de 20 g da massa celular (peso úmido), 50 ml de água destilada, 20 g de NaOH, 5 ml de pirogalol e 150 ml de metanol foi mantida em ebulição por 40 minutos e em seguida resfriada em gelo. Adicionou-se 90 ml de hexano e a mistura permaneceu por uma noite na geladeira. Após a separação e evaporação do hexano foi adicionado 500 µl de acetona e o lipídeo extraído foi aplicado em placas de TLC (Merck Kiesel-gel 60 F254, 20 x 20 cm). A cromatografia foi desenvolvida com benzeno por 40 minutos.

A mistura de ubiquinona foi aplicada com tubo capilar (10 µl) em placas de TLC (Merck HPTLC RP-18 F254, 10 x 10 cm), desenvolvida com solvente acetona-acetonitrila (80:20) por 15 minutos e visualizada sob UV a 254 nm (COLLINS e JONES, 1981).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Seleção de *Neurospora***

Neste estudo foram analisadas 7 linhagens de *Neurospora*, das quais 3 foram isoladas, como descrito no item 3.4, a partir de amostras de beijos obtidos de diferentes municípios do Estado do Maranhão: *Neurospora sitophila* ATCC 46892, *Neurospora* sp n.1 e *Neurospora* sp n.2. E 4 linhagens foram fornecidas pela coleção de cultura NRRL: *Neurospora sitophila* 2884, *N. crassa* 2223, *N. tetrasperma* 2164 e *N. intermedia* 5506.

As colônias de *Neurospora* foram evidenciadas pela coloração laranja, rósea ou salmão e pela presença de hifas aéreas espalhadas sob o meio de cultura.

### **4.2. Características bioquímicas**

#### **4.2.1 Capacidade fermentativa de *Neurospora* e influência da levedura Fleischmann em amido 5%**

As figuras 1 a 6 ilustram a capacidade fermentativa respectivamente das linhagens *N. sitophila* ATCC 46892, *Neurospora* sp n.1, *N. sitophila* NRRL 2884, *N. intermedia* NRRL 5506, *N. crassa* NRRL 2223, *N. tetrasperma* NRRL 2146 e a influência da levedura Fleischmann na fermentação do amido 5% em 10 dias a 30°C.

Verificou-se que as linhagens do beiju, *N. sitophila* ATCC 46892 e *Neurospora* sp n.1 apresentaram maior capacidade fermentativa que as linhagens NRRL e menor apenas que *N. sitophila* NRRL 2884. Foram inoculadas culturas mistas de *Neurospora* e levedura Fleischmann no meio amido 5% e observados os mesmos comportamentos pelas linhagens de *Neurospora* em estudo, porém o tempo de fermentação obtido por estas linhagens em 12 dias foi reduzido para 4-6 dias pelas culturas mistas. Verificou-se ainda que a levedura Fleischmann inoculada no meio de amido sem as linhagens de *Neurospora* apresentou baixa capacidade fermentativa.

#### **4.2.2 Atividade enzimática**

Todas as linhagens de *Neurospora* em estudo apresentaram resultado negativo quanto à atividade das enzimas CMCase, lipase, xilanase e pectinase e resultado positivo quanto à atividade da enzima amiloglicosidase.

As linhagens do beiju *Neurospora sitophila* ATCC 46892, *Neurospora* sp n.1 e *Neurospora* sp n.2 apresentaram maior atividade de amiloglicosidase que as linhagens NRRL, menor apenas que *N. sitophila* NRRL 2884, conforme descrito na tabela 4.

Todas as linhagens de *Neurospora* em estudo hidrolizaram o amido, verificado pela produção de glicose na cromatografia em papel.

#### **4.3. Características microbiológicas**

### 4.3.1 Morfologia de *Neurospora*

O estágio conidial das linhagens de *Neurospora* foi verificado após cultivo em meio Agar de Westgaard conforme descrito no item 3.7.1.2. Verificou-se que todas as linhagens apresentaram hifas segmentadas e entre os septos a presença de vários núcleos (Tabela 5). O sistema vegetativo característico do gênero *Neurospora* é composto de hifas multinucleadas, ramificadas e septadas.

As linhagens de *Neurospora* NRRL apresentaram tamanhos de conídias diferentes de *Neurospora* do beiju: *N. tetrasperma* 2164, 9 µm; *N. intermedia* 5506, 11 µm; *N. crassa* 2223, 7 µm; *N. sitophila* 2884, 10 µm e *N. sitophila* ATCC 46892, *Neurospora* sp n.1 e *Neurospora* sp n.2 do beiju, 8 µm em diâmetro, verificados na tabela 5. As figuras 7 e 8 mostram essa diferença entre as linhagens *N. Sitophila* NRRL 2884 e *N. Sitophila* ATCC 46892. As diferenças conidiais como pigmentação da massa e morfologia em geral não são característicos para distinção de espécies de *Neurospora*. Entretanto, estudos do ciclo sexual como a formação de ascosporos, ascos e peritécios assim como o cruzamento entre espécies e as características heterotáticas ou homotáticas representam valores fundamentais na classificação e taxonomia de fungos (PERKINS, 1976).

### 4.3.2 Características genéticas

Foi evidenciado o homotalismo pela linhagem *N. tetrasperma* NRRL 2164, onde verificou-se a formação de peritécios medindo 300-350 µm

sob toda a superfície do meio Agar Farinha de Milho em 10 dias de incubação. Por outro lado todas as outras linhagens de *Neurospora* NRRL em estudo e as linhagens isoladas de beiju foram identificadas como heterotáticas (tabela 5).

A linhagem de *Neurospora sitophila* NRRL 2884 foi cruzada com as linhagens de *N. sitophila* ATCC 46892, *Neurospora* sp n.1 e n.2 (beiju), *N. crassa* NRRL 2223 e *N. intermedia* NRRL 5506 conforme descrito no item 3.7.4.3. Verificou-se o cruzamento pelo aparecimento de peritécios, resultante da fertilização apenas entre *N. sitophila* NRRL e linhagens de *Neurospora* de amostras do beiju: *N. sitophila* NRRL 2884 X *N. sitophila* ATCC 46892, *N. sitophila* NRRL 2884 X *Neurospora* sp n.1 e *N. sitophila* NRRL 2884 X *Neurospora* sp n.2 (observados na tabela 6). Quando o microrganismo apresenta características heterotáticas os cruzamentos só ocorrem quando dentro da mesma espécie, os fungos com diferentes tipos de reação sexual encontram-se para que ocorra a fertilização (AZEVEDO, 1987).

#### **4.3.3 Estudo do crescimento de *Neurospora* em diferentes meios de cultura**

Os micélios das linhagens de *Neurospora* do beiju assim como das linhagens NRRL se desenvolveram rapidamente em 48 horas por toda a placa e tubo de ensaio de forma flocosa e densa nos meios Agar Batata Dextrose (PDA) e Agar de Westergaard. Verificou-se que as linhagens de *Neurospora* do beiju apresentaram massa conidial de coloração diferente das linhagens NRRL nestes meios. Como mostra nas tabelas 1 e 2 respectivamente, *N. sitophila* NRRL 2884 apresentou uma cor laranja forte

enquanto a linhagem do beiju *N. sitophila* ATCC 46892 apresentou cor rósea claro. Em meio Agar Farinha de Milho o crescimento micelial foi escasso e espalhado pela superfície do meio e a diferença na coloração da massa conidial foi observada com menos intensidade neste meio de cultura.

#### **4.3.4 Desenvolvimento de *Neurospora* em diferentes temperaturas**

Todas as linhagens de *Neurospora* em estudo apresentaram desenvolvimento nas temperaturas de 25, 30 e 37°C dentro de 24 horas. À temperatura de 40°C o crescimento foi lento, demorando cerca de cinco dias de incubação para o desenvolvimento do microrganismo. As temperaturas 45 e 50°C inibiram o crescimento micelial ou vegetativo das linhagens de *Neurospora*. O melhor crescimento se deu à temperatura de 25°C a partir de 48 horas de incubação.

#### **4.4. Determinação de Ubiquinona**

Quanto às análises quimiotaxonômicas, todas as linhagens em estudo apresentaram resultados similares. Foi detectado a presença de Ubiquinona contendo 10 unidades isoprenóides na sua cadeia (Q-10), numa proporção qualitativa semelhante verificada na placa de TLC (Figura 10). A figura 9 mostra a presença de Ubiquinona das linhagens de *Neurospora* em estudo observada no tempo de retenção (tR) 0,4. Dihidrogenada Ubiquinona Q-10 é largamente distribuída nos Ascomycetes (ITOH, 1988). Esta quinona tem sido isolada de *Neurospora crassa* assim como outras espécies de *Neurospora* (CRANE, 1965).

## 5. CONCLUSÕES

5.1 Houve cruzamento apenas entre as linhagens *N. sitophila* NRRL e *Neurospora* sp isoladas de amostras de beiju verificado pela produção de peritécios, resultante da fertilização das linhagens.

5.2 Todas as linhagens de *Neurospora* sp do beiju coletadas do Estado do Maranhão foram produtoras de aroma de frutas, inclusive *N. sitophila* ATCC 46892 obtida do beiju por Park et alii, 1982. As linhagens NRRL, assim como *N. sitophila* 2884 não produziram o aroma.

5.3 As linhagens de *Neurospora* do beiju apresentaram maior capacidade fermentativa em amido 5% e maior atividade de amiloglicosidase que as linhagens NRRL, menor apenas que *N. sitophila* NRRL 2884.

5.4 Todas as linhagens de *Neurospora* em estudo apresentaram resultados negativos quanto a atividade das enzimas CMCase, xilanase, pectinase e lipase.

5.5 As linhagens de *Neurospora* do beiju apresentaram tamanhos conidiais diferentes das linhagens NRRL: *Neurospora sitophila* ATCC 46892, *Neurospora* sp n.1 e n.2 do beiju, 8  $\mu\text{m}$ ; *N. sitophila* NRRL 2884, 10  $\mu\text{m}$ ; *N. tetrasperma* NRRL 2164, 9  $\mu\text{m}$ ; *N. intermedia* NRRL 5506, 11  $\mu\text{m}$  e *N. crassa* NRRL 2223, 7  $\mu\text{m}$ .

5.6 *Neurospora* do beiju apresentaram coloração micelial rósea clara nos meios Agar Farinha de Milho, Agar de Westergaard e Agar Batata Dextrose diferente quando comparada com a pigmentação micelial das linhagens NRRL.

5.7 Foi identificada a Coenzima Q-10 como a Ubiquinona presente em todas as linhagens de *Neurospora* em estudo.

## 6. SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DA PESQUISA

Como sugestões para a continuidade da pesquisa são apresentados os seguintes tópicos:

6.1 Estudos genéticos do cruzamento entre linhagens de *Neurospora* sp do beiju e outras linhagens de *Neurospora* conforme Perkins, 1976.

6.2 Estudo da ecologia microbiana de linhagens de *Neurospora* sp isolada do Estado do Maranhão.

6.3 Avaliação da aplicação industrial de *Neurospora* sp proveniente do Estado do Maranhão na produção de aroma.

## **TABELAS**

Tabela 1 - Características morfológicas e sexuais da linhagem *Neurospora sitophila* NRRL 2884.

---

**Estágio Conidial:** micélio cresce rapidamente em 24 horas no meio Agar de Westergaard e Agar Batata Dextrose; massa conidial de coloração laranja forte; crescimento com maior intensidade no topo do tubo de ensaio em forma de farinha. No meio Agar Farinha de Milho apresenta crescimento micelial lento, em 96 horas e escasso em todo o tubo; hifas septadas e ramificadas; macroconídias globosas, lisas medindo 10  $\mu\text{m}$  e microconídias medindo 4  $\mu\text{m}$  em diâmetro.

**Estágio Peritecial:** peritécio presente nos meios Agar de Westergaard, Agar Batata Dextrose e Agar Farinha de Milho à temperatura de 25°C de coloração amarronzada. A espécie é heterotática.

---

Tabela 2 - Características morfológicas e sexuais da linhagem *Neurospora sitophila* ATCC 46892.

---

**Estágio Conidial:** micélio cresce rapidamente em 24 horas nos meios Agar de Westergaard e Agar Batata Dextrose; massa conidial de coloração rósea claro; crescimento com maior intensidade no topo do tubo de ensaio em forma de farinha. No meio Agar Farinha de Milho o crescimento é lento, em 96 horas e escasso em todo o tubo; hifas septadas e ramificadas; macroconídeas globosas, lisas medindo 8µm e microconídeas medindo 3 µm de diâmetro.

**Estágio Peritecial:** não houve crescimento de peritécios nos meios Agar de Westergaard e Agar Batata. No meio Agar Farinha de Milho ( CM ) produziu peritécio de coloração marrom escuro após o cruzamento com *N. sitophila* NRRL 2884 em 10 dias de incubação a 30°C. A espécie é heterotática.

---

Tabela 3 - Características morfológicas e sexuais da linhagem *Neurospora* sp n.1 (beiju).

---

**Estágio Conidial:** micélio cresce rapidamente nos meios Agar de Westergaard e Agar Batata Dextrose em 24 horas; massa conidial de coloração rósea claro crescimento com maior intensidade no topo do tubo de ensaio. No meio Agar Farinha de Milho o crescimento é lento e escasso em 96 horas; hifas septadas e ramificadas; macroconídeas globosas e lisas medindo 8  $\mu\text{m}$  e microconídeas 3  $\mu\text{m}$ .

**Estágio Peritecial:** não houve formação de peritécios quando inoculada nos meios Agar de Westergaard, Agar Batata Dextrose. Aparecimento de peritécios de coloração marrom escuro no meio Agar Farinha de Milho. A espécie é heterotálica.

---

Tabela 4 - Produção de amiloglicosidase.

Linhagens de <i>Neurospora</i>	Atividade de amiloglicosidase μmol de glicose/minuto/ml de enzima
<i>N. sitophila</i> NRRL 2884	1,963
<i>N. sitophila</i> ATCC 46892	1,045
<i>Neurospora</i> sp n.1 (beiju)	0,907
<i>Neurospora</i> sp n.2 (beiju)	1,336
<i>N. intermedia</i> NRRL 5506	0,878
<i>N. crassa</i> NRRL 2223	0,825
<i>N. tetrasperma</i> NRRL 2164	0,380

Tabela 5 - Características microbiológicas das linhagens de *Neurospora* sp

Linhagens de <i>Neurospora</i>	Conídias ( $\mu\text{m}$ ). x400 WA/12 dias	Ciclo sexual (CM)	Pigmentação PDA, WA, CM	Septos (Hifas)	Ubiquinona
<i>N.sitophila</i> ATCC 46892	8	heterotática	rósea	+	Q-10
<i>Neurospora</i> sp no 1	8	heterotática	rósea	+	Q-10
<i>Neurospora</i> sp no 2	8	heterotática	rósea	+	Q-10
<i>N.sitophila</i> NRRL 2884	10	heterotática	laranja forte	+	Q-10
<i>N.tetrasperm</i> NRRL 2164	9	homotática	amarela	+	Q-10
<i>N.crassa</i> NRRL 2223	7	heterotática	salmão	+	Q-10
<i>N.intermedia</i> NRRL 5506	11	heterotática	laranja	+	Q-10

CM → Meio de cultura Com meal ( Agar Farinha de Milho )

PDA → Meio Potato Dextrose Agar ( Agar Batata Dextrose )

WA → Agar de Westergaard

Tabela 6 - Cruzamento entre as linhagens de *Neurospora* sp

	<i>Neurospora sitophila</i> NRRRL 2884	<i>Neurospora sitophila</i> ATCC 46892
<i>Neurospora sitophila</i> ATCC 46892	+	ND
<i>Neurospora</i> sp n.1 (beiju)	+	ND
<i>Neurospora</i> sp n.2 (beiju)	+	ND
<i>Neurospora crassa</i> NRRRL 2223	-	-
<i>Neurospora intermedia</i> NRRRL 5506	-	-

+ → Fértil

- → Não fértil

ND → Não determinado

## FIGURAS

Figura 1 - Capacidade fermentativa da linhagem de *N. sitophila* NRRL 2884 e influência da levedura Fleischmann na fermentação de amido 5% a 30°C

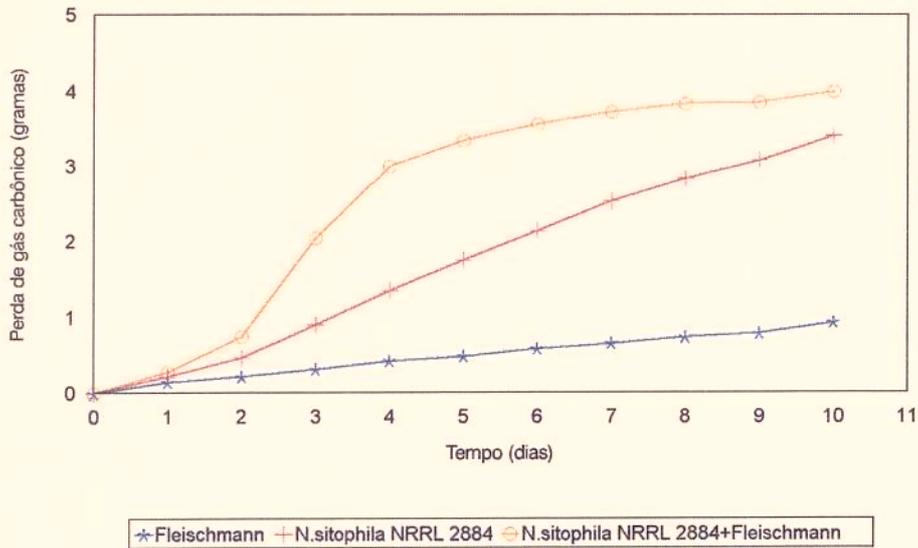


Figura 2 - Capacidade fermentativa da linhagem *N. sitophila* ATCC 46892 e influência da levedura Fleischmann na fermentação de amido 5% a 30°C

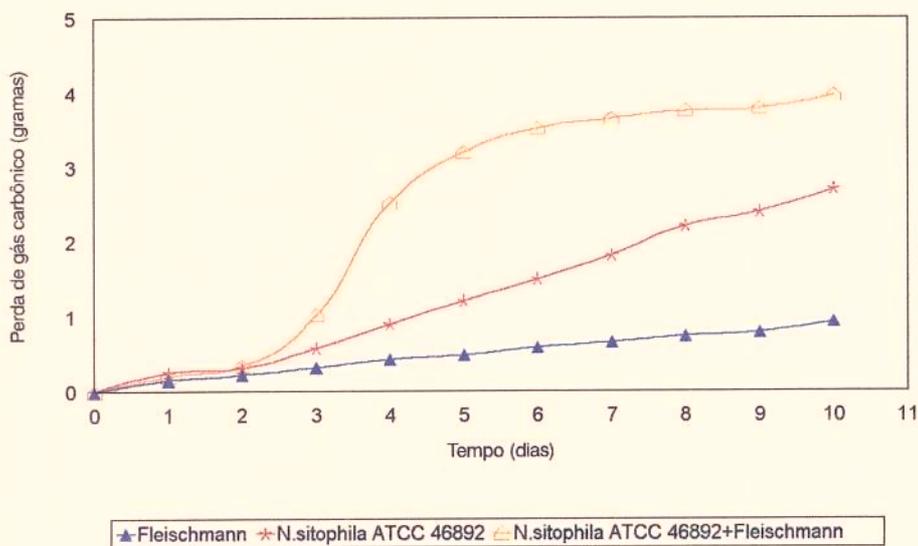


Figura 3 - Capacidade fermentativa da linhagem *Neurospora* sp n.1(beiju) e influência da levedura Fleischmann na fermentação de amido 5% a 30oC

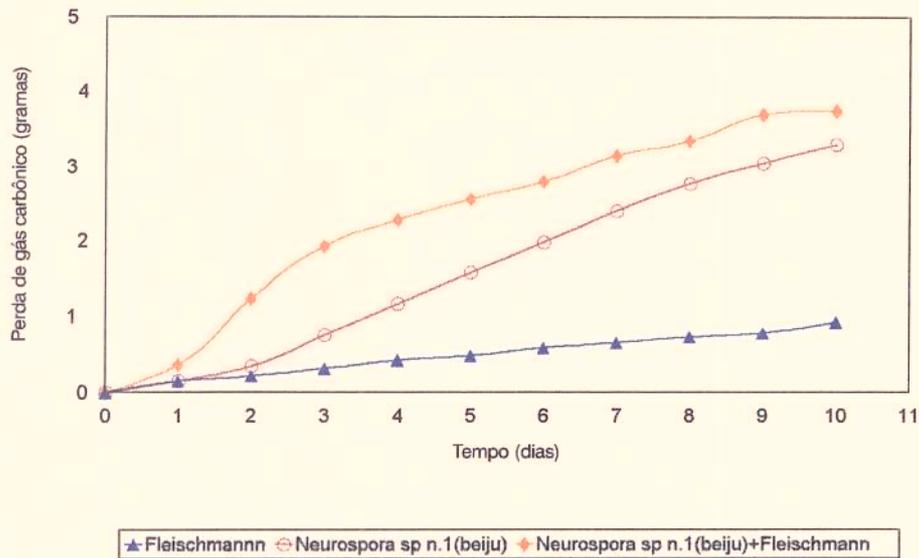


Figura 4 - Capacidade fermentativa da linhagem *N. intermedia* NRRL 5506 e influência da levedura Fleischmann na fermentação de amido 5% a 30oC

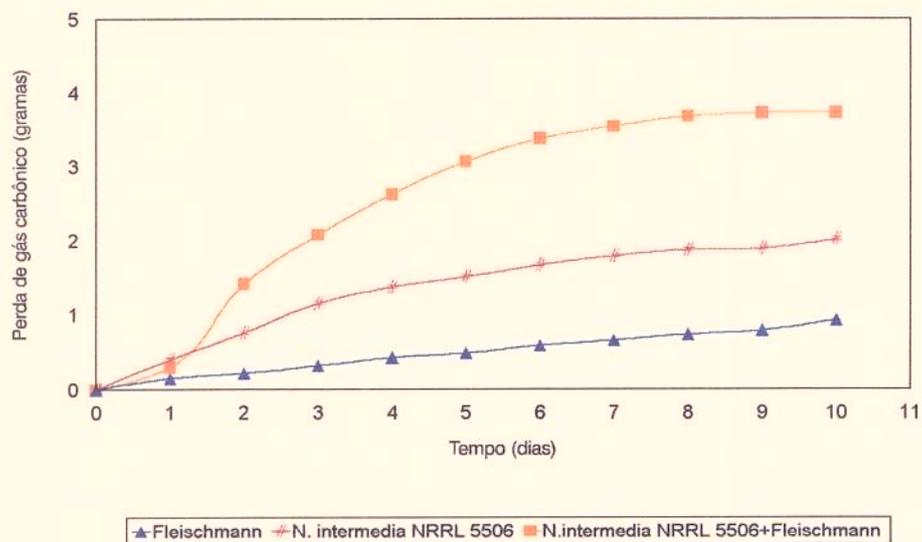


Figura 5 - Capacidade fermentativa da linhagem *N. crassa* NRRL 2223 e influência da levedura Fleischmann na fermentação do amido 5% a 30oC

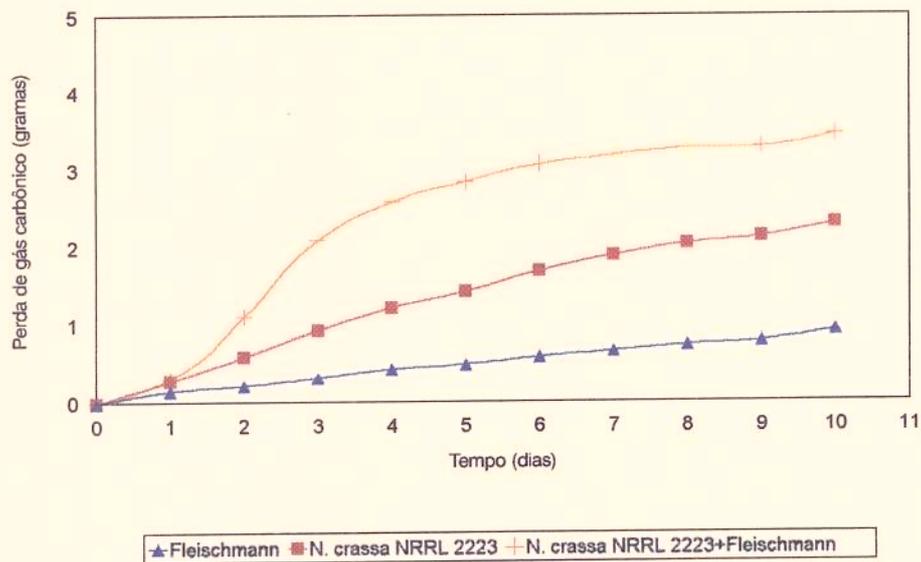
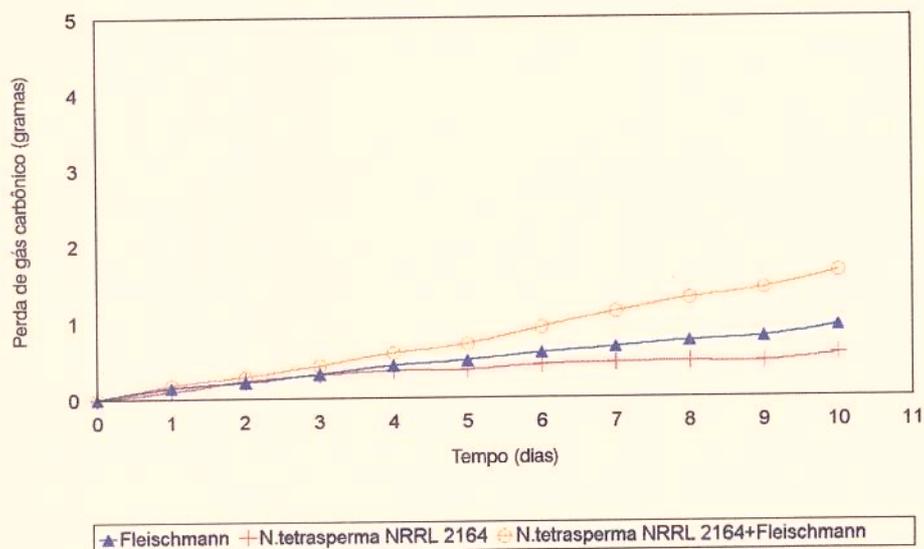


Figura 6 - Capacidade fermentativa de *N. tetrasperma* NRRL 2164 e influência da levedura Fleischmann na fermentação de amido 5% a 30oC



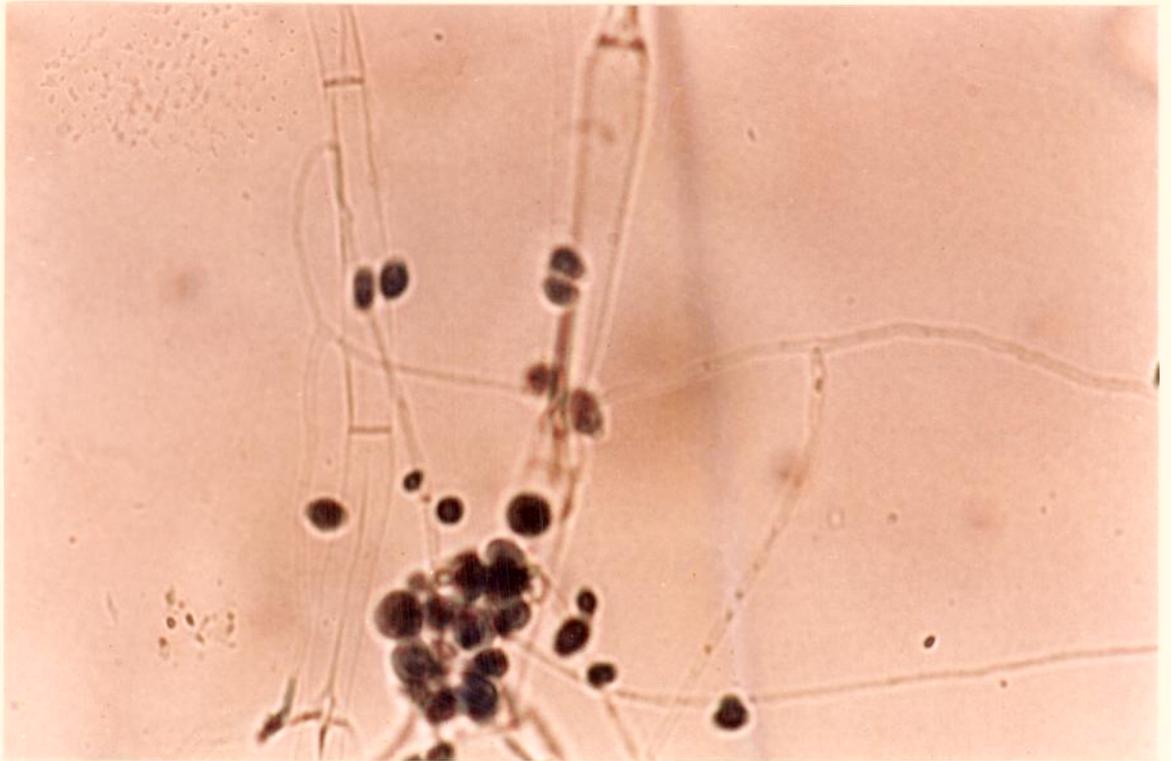


Figura 7 - Hifas e conídias de *Neurospora sitophila* NRRL 2884. Conídias medindo 10 $\mu$ m. Aumento: x 400



Figura 8 - *Neurospora sitophila* ATCC 46892 (beiju). Conídias medindo 8 $\mu$ m. Aumento: x 400.

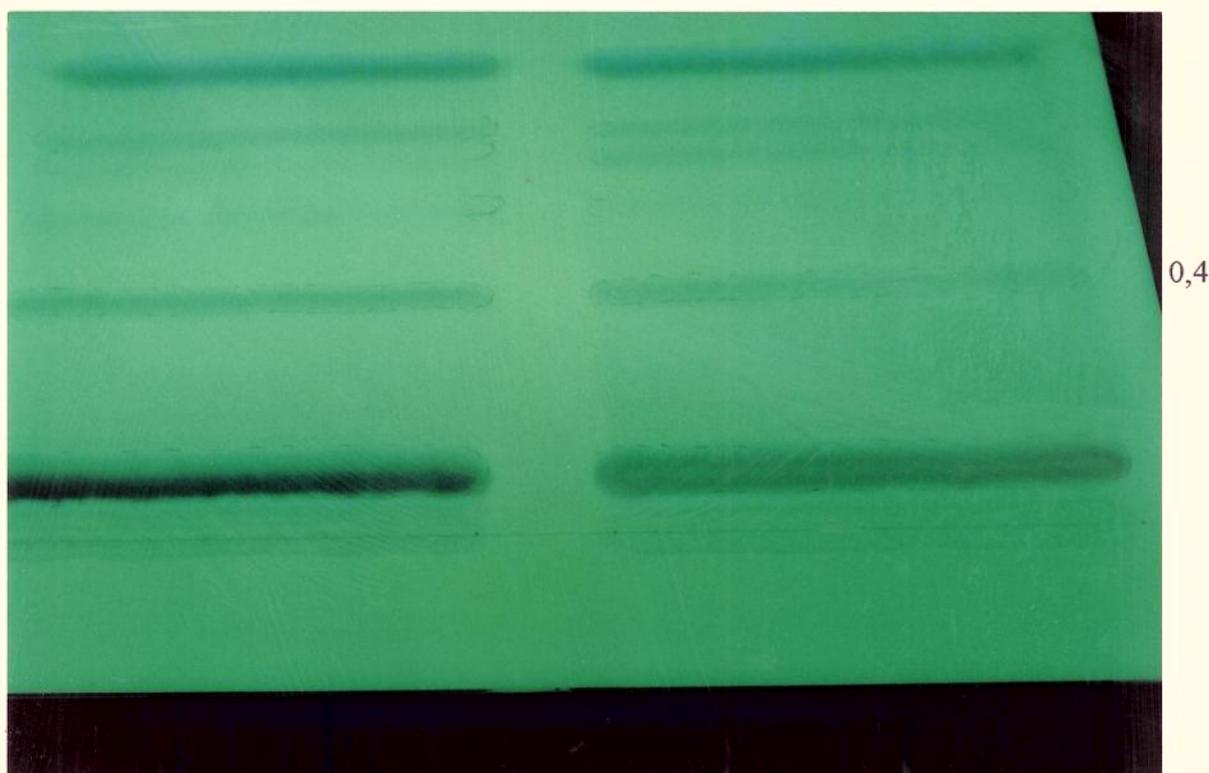


Figura 9 - Cromatografia em Camada Delgada (Merck Kiesel-gel F254 20x20 cm) de *N. sitophila* ATCC 46892 e *N. sitophila* NRRL 2884 respectivamente. Solvente: benzeno, corrida: 40 min., tR: 0,4.

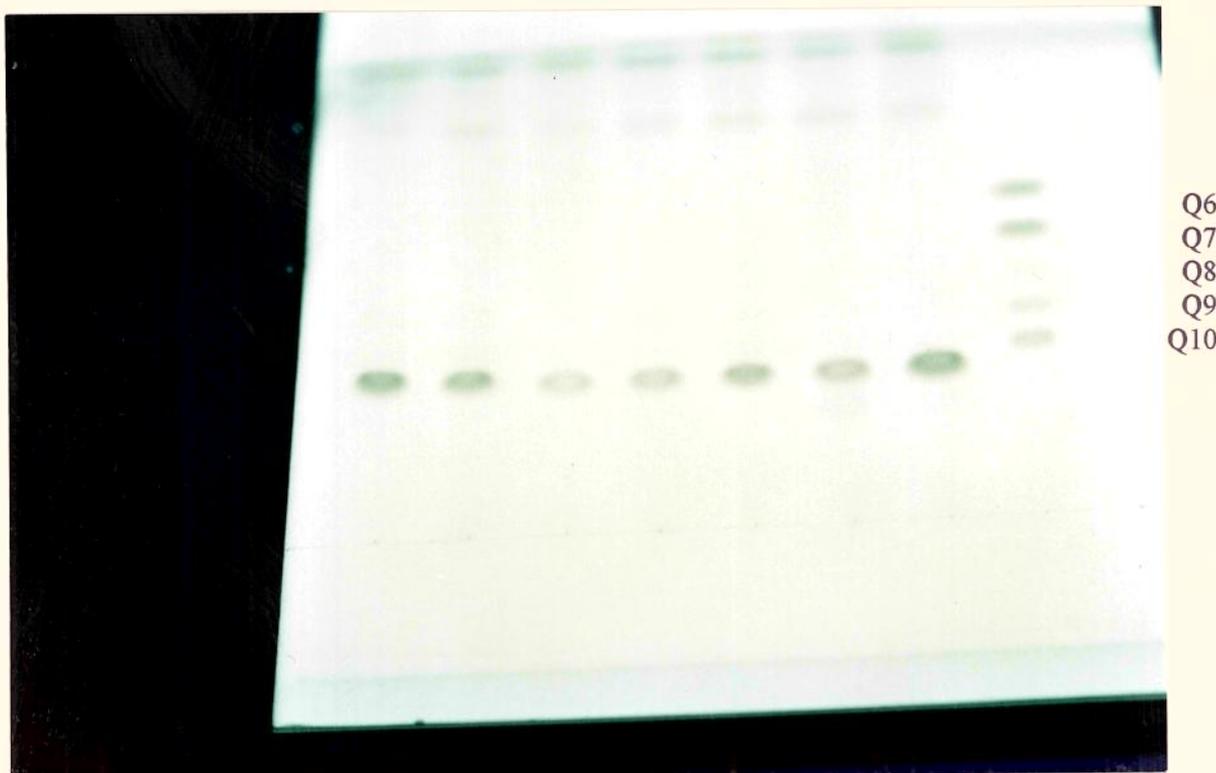


Figura 10- Cromatografia em Camada Delgada de fase reversa(Merck HPTLC RP-18 F254 10x10 cm): *N. crassa* NRRL 2223, *N. intermedia* NRRL 5506, *N. tetrasperma* NRRL 2164, *N. sitophila* NRRL 2884, *N. sitophila* ATCC 46892, *Neurospora* sp n.1 e n.2 (beiju) respectivamente. Solvente: acetona:acetonitrila (80:20 ), tempo de corrida: 15 min., padrão de Ubiquinona: Q6-10.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASQUIERI, E. R.; PARK, Y. K. Production and characterization of extracellular cellulases from a thermostable *Aspergillus sp.* Rev. Microbiol., v.23, n.3, p.183-188, 1992.
2. AZEVEDO, J. L.. Recombinação em fungos filamentosos. Genética Molecular e microrganismos, capítulo 24, p.394-400, 1987.
3. BEADLE, G. W., Genetics and metabolism in *Neurospora*. Physiol. Rev., v.25, n.4, p. 643-663, 1945.
4. BEADLE, G. W.; TATUM, E. L. Methods of producing and detection mutations concerned with nutritional requirements. American Journal of Botany, v.32, p.678-686, dec., 1945.
5. COLLINS, M.D.; JONES, D. A note on the separation of natural mixtures of bacterial ubiquinones using reverse-phase partition thin-layer chromatography and high performance liquid chromatography. J. of Appl. Bact., v.51, p.129-134, nov., 1981.
6. COLLINS, M. D.; PIROUZ, T.; GOODFELLOW, M. Distribution of menaquinones in *Actinomycetes* and *Corynebacteria*. Journal of General Microbiology, v.100, n.1, may., 1977.

7. CORMIER, F.; RAYMON, D.; CHAMPAGNE, P. et alii. Analysis of odor-active volatiles from *Pseudomonas fragi* grown in milk. J. Agric. Food Chem., v.39, p.159-161, 1991. 1991
8. CRANE, F. L. Distribution of ubiquinones. Methods in microbiology, chapter 6, p.183-206, 1964.
9. FREDERICK, L.; UECKER, F. A.; BENJAMIN, C. R., A new species of *Neurospora* from soil of west Pakistan. Mycologia. v.61, p.1077-1084, 1969.
10. GENEVIEVE, B. Minor ubiquinones of the yeast Coenzyme Q system: importance in the taxonomy of the yeasts. J. Gen. Appl. Microbiol., v.33, p.381-390, june, 1987.
11. GOCHENAUR, S. E.; BACKUS, M. P. A new species of *Neurospora* from Wisconsin Lowland soil. Mycologia, v.54, p.555-562, 1962.
12. GUTIERREZ-VAZQUEZ, J. M.. Série de biología. Microorganismos, n.6, cap.5, p. 61-71, 1968.
13. HOWARD, D.; ANDERSON, R. G. Cell-free synthesis of ethyl acetate by extracts from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Inst. Brew., v.82, p.70-71, marc., 1976.

14. ITOH, M.; KATAYAMA, Y.; SUGIYAMA, J. *et alii*. Isolation and structure elucidation of a tetrahydrogenated isoprenoid side-chain ubiquinone with ten isoprene units isolated from *Chaetomium funicola* JS 525. Agric. Biol. Chem., v.52, n.5, p.1195-1201, nov., 1987.
15. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature of quinones with isoprenoid side-chains. Biochem. J., v.147, p.15-21, 1975.
16. KOMAGATA, K.; SUZUKI, K. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. Methods in Microbiology, v.19, p.161-192, 1987.
17. LARPENT, J. P., Algunas técnicas de genéticas. Microbiología Práctica, capítulo 5, p.101-126, 1938.
18. LESTER, R. L.; CRANE, F. L. The natural occurrence of Coenzyme Q and related compounds. Journal of Biological Chemistry, v.234, n.8, p.2169-2175, aug., 1959.
19. LOWRY, R. J.; DURKEE, T. L.; SUSSMAN, A. S. Ultrastructural studies of microconidium formation in *Neurospora crassa*. Journal of Bacteriology, v.94, n.5, p.1757-1763, nov., 1967.
20. MAHESHWARI, R.; ANTONY, A. A selective technique for the isolation of *Neurospora crassa* from soil. Journal of General Microbiology, v.81, p.505-597, july, 1973.

21. MAHONEY, D. P.; HUANG, L. H.; BACKUS, M. P. New homothallic *Neurospora* from tropical soils. Mycologia, v.61, p.264-272, 1969.
22. MARY, E. R. Chemical activation of ascospore germination in *Neurospora crassa*. Mycologia, v.29, p.327-330, nov., 1947.
23. NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi Method for determination of glucose. J. Biol. Chem., v.153, p.375-380, 1944.
24. NELSON, A. C.; NOVACK, R. O.; BACKUS, M. P. A new specie of *Neurospora* from soil. Mycologia, v.56, p.384-392, 1964.
25. PARK, Y. K.; AZUMA, E. H. Screening of yeast strains capable of hiperproducing amylyolytic enzymes. Biotechnol. Letters, v.12, n.5, p.373-376, 1990.
26. PARK, Y. K.; ZENIN, C.T.; UEDA, S. et alii. Microflora in beiju and their biochemical characteristics. J. Ferment. Technol., v.60, n.1, p.1-4, 1982.
27. PASTORE, G. M.; PARK, Y. K.; MIN, D. B. Production of fruity aroma by *Neurospora* from beiju. Mycol. Res., v.98, n.11, p.1300-1302, 1994.

- 28.PASTORE, G. M. Produção e caracterização bioquímica de monoacilglicerol lipase microbiana e aplicação de lipase na hidrólise e esterificação enzimática. Dissertação (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP,1992.
- 29.PERKINS, D. D.; TURNER,B. C.; BARRY, E. D. Strains of *Neurospora* collected from nature. Evolution, v.30,p.281-313, june, 1976.
- 30.PINHEIRO, J. C. D. A tiquira de mandioca. Lav. Arrozeira, v.34, p.68-70, set., 1981.
- 31.REEDY, M. C.; BILLS, D. D.; LINDSAY, R. C. et alii. Ester production by *Pseudomonas fragi*. I. Identificacion and Quantification of some esters produced in milk cultures. J. Dairy Sci., v.51, n.5, p.656-659, 1968.
- 32.ROWLAND, D. H.; FREDERICK, J. S. Genetic and microbiological research technics for *Neurospora crassa*. Microbiological Techniques, p.79-143, 1968.
- 33.SARRIS, J; LATRASSE, A. Production of odoriferous gama-lactones by *Fusarium poae*. Agric. Biol. Chem., v.49, n.1, p.3227-3230, 1985.
- 34.SHEAR, C. L.; DODGE, B. O. Life histories and heterothaliism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sithophila* group. Journal of Agriculture Reserch, v.24, n.11, p.1019-1042, june, 1927.

35. SILVA, R.; DONG, K. Y.; PARK, Y. K. Application of thermostable xylanases from *Humicola sp.* for pulp improvement. Journal of Fermentation and Bioengineering, v.77, n.1, p.109-111, septem., 1994.
36. STANIER, R. Y.; INGRAHAM, J. L.; WHEELIS, M. L. PAINTER, P. R. The Microbial World, 4 th ed, New Jersey, 1976.
37. SUGIYAMA, J.; FUKAGAWA, M.; CHIU, S. *et alii*. Celular carbohydrate composition, DNA base composition, ubiquinone systems and diazonium blue B color test in the genera *Rhodosporidium*, *Leucosporidium*, *Rhodotorula* and related *Basidiomycetous* yeast. J. Gen. Appl. Microbiol., v.31, p.519-550, dec., 1985.
38. TAHARA, S.; FUJIWARA, K.; MIZUTANI, J. Neutral constituents of volatiles in cultured broth of *Sporobolomyces odours*. Agr. Biol. Chem., v.37, n.12, p.2855-2861, july, 1973.
39. TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. G. Detection of sugars on paper cromatograms. Nature, v.166, p.444-445, 1950.
40. YAMADA, Y.; ARIMOTO, M.; KONDO, K. Coenzyme Q system in the classification of apiculate yeast in the genera *Nadsonia*, *Saccharomycodes*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera* and *Wickerhamia*. J. Gen. Appl. Microbiol., v.22, p.293-299, aug., 1976.

41. YAMADA, Y.; NOJIRI, M.; MATSUYAMA, M. *et alii*. Coenzyme Q system in the classification of the ascosporegenous yeast genera *Debaromyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and *Endomycopsis*. J. Gen. Appl. Microbiol., v.22, p.325-337, septem., 1976.
42. YAMAUCHI, H.; HASUO, T.; AMACHI, T. *et alii*. Cell-free synthesis of ethyl hexanoate by extract from *Neurospora sp.*, containing a novel Acyl Coenzyme A: Alcohol Acyltransferase. Agric. Biol. Chem., v.53, n.3, p.821-825, nov., 1989.
43. YAMAUCHI, H.; HASUO, T.; AMACHI, T. *et alii*. Purification and characterization of Acyl CoA: Alcohol Acyltransferase of *Neurospora sp.* Agric. Biol. Chem., v.53, n.6, p.1551-1556, dec., 1988.
44. YAMAUCHI, H.; OBATA, T.; AMACHI, T. *et alii*. Production of characteristic odors by *Neurospora*. Agric. Biol. Chem., v.55, n.12, p.3115-3116, june, 1991.
45. YOSHIKAWA, K.; YAMAUCHI, H.; HASUO, T. *et alii*. Production of fruity odor by *Neurospora sp.* Agric. Biol. Chem., v.52, n.8, p.2129-2130, apr., 1988.
46. WESTERGAARD, M.; MITCHELL, H. K. *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. American Journal of Botany, v.34, p.573-579, dec., 1947.