

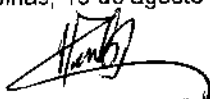
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE LEVEDURAS**  
**PRODUTORAS DE INULINASES**

**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por MIRIAM TERESINHA DOS SANTOS e aprovada pela Comissão Julgadora em 18 de agosto de 1997.

Campinas, 18 de agosto de 1997.



Prof. Dr. VANDERLEI P. CANHOS  
Presidente da Banca

**MÍRIAM TERESINHA DOS SANTOS**

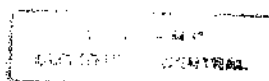
*Bacharel em Microbiologia e Mestre em Ciências de Alimentos*

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos

Campinas - Estado de São Paulo - Brasil

- 1997 -



|             |                                     |
|-------------|-------------------------------------|
| UNIDADE     | BC                                  |
| N.º CHAMADA | 10506                               |
| V.          | Ex.                                 |
| TOMBO BC    | 31.501                              |
| PROC.       | 284197                              |
| C           | <input type="checkbox"/>            |
| D           | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO       | 83,11,00                            |
| DATA        | 16/08/97                            |
| N.º         |                                     |

CM-00100506-3

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

59  
Sa38s

Santos, Míriam Teresinha dos

Seleção e caracterização taxonômica de leveduras produtoras de inulinases./ Míriam Teresinha dos Santos -- Campinas, SP: [s.n], 1997.

Orientador : Vanderlei Perez Canhos.

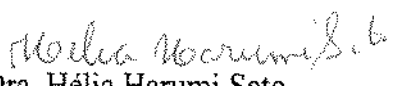
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Levedos - Seleção. 2. Inulinases. 3. Identificação. I. Canhos, Vanderlei Perez. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

## BANCA EXAMINADORA



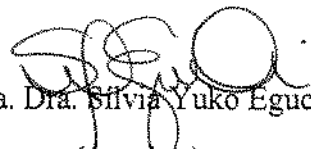
Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos  
(orientador)



Profa. Dra. Hélia Harumi Sato  
(membro)



Profa. Dra. Paula Benevides de Moraes  
(membro)



Profa. Dra. Silvia Yuko Eguchi  
(membro)



Dr. Gilson Manfio

(membro)

Prof. Dr. Fumio Yokoya

(suplente)

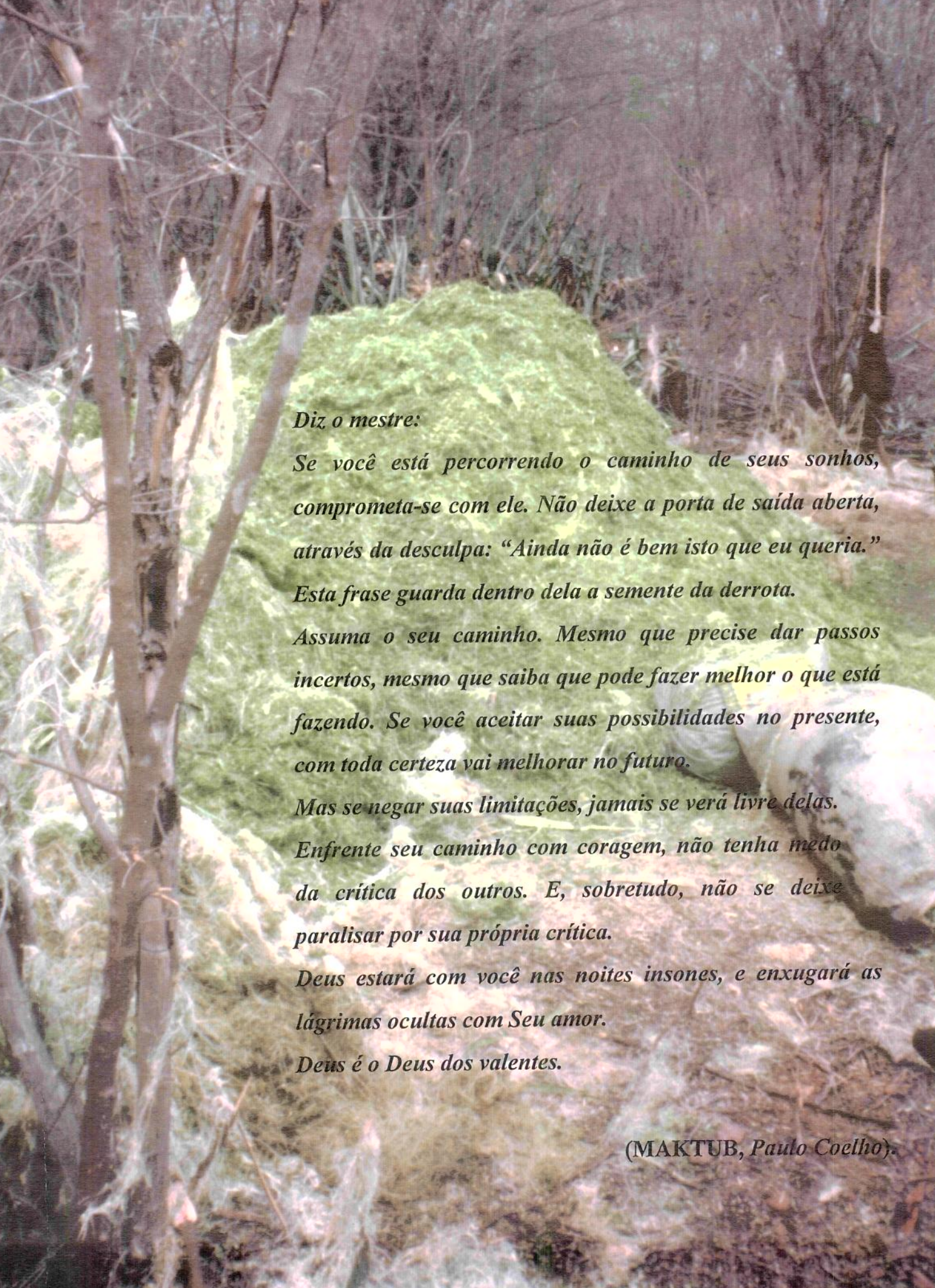
Prof. Dr. José Luiz Pereira

(suplente)

Campinas, de agosto de 1997

*A minha família,  
Meu pai Zé Inácio e minha mãe Terezinha e  
Meus irmãos Giovanny, Quely e Ana Luisa,*

*Dedico.*

A photograph of a forest floor. In the center, there is a large, rounded rock covered in bright green moss. To the left, several thin, bare tree trunks and branches reach upwards. The ground is covered with dry leaves and twigs. The background is a dense forest with more trees and foliage.

*Diz o mestre:*

*Se você está percorrendo o caminho de seus sonhos, comprometa-se com ele. Não deixe a porta de saída aberta, através da desculpa: "Ainda não é bem isto que eu queria."*

*Esta frase guarda dentro dela a semente da derrota.*

*Assuma o seu caminho. Mesmo que precise dar passos incertos, mesmo que saiba que pode fazer melhor o que está fazendo. Se você aceitar suas possibilidades no presente, com toda certeza vai melhorar no futuro.*

*Mas se negar suas limitações, jamais se verá livre delas.*

*Enfrente seu caminho com coragem, não tenha medo da crítica dos outros. E, sobretudo, não se deixe paralisar por sua própria crítica.*

*Deus estará com você nas noites insones, e enxugará as lágrimas ocultas com Seu amor.*

*Deus é o Deus dos valentes.*

*(MAKTUB, Paulo Coelho).*

## AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre está comigo no meu caminhar,

Ao Prof. Dr. VANDERLEI PEREZ CANHOS pela orientação, estímulo e confiança sempre manifestados,

Ao Prof. Dr. FUMIO YOKOYA pelo exemplo que tanto contribuiu para o meu aprendizado e gosto pela microbiologia,

Aos Professores Doutores HÉLIA H. SATO, PAULA BENEVIDES DE MORAIS, SÍLVIA EGUCHI, GILSON P. MANFIO, FUMIO YOKOYA e JOSÉ LUIZ PEREIRA membros da banca pelas valiosas sugestões,

À Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello" que proporcionou a realização de várias etapas deste trabalho, pelo auxílio de seus pesquisadores e corpo técnico-administrativo sempre solidários e eficientes,

Aos pesquisadores do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico de Joinville e GBF da Alemanha, especialmente aos Doutores HANS POREP e RAINER YONAS pelo aprendizado e doação do equipamento,

Ao pessoal da EMBRAPA da Paraíba pelo esforço e disponibilidade na coleta das amostras,

À Professora Dra. HÉLIA H. SATO pela disponibilidade para as discussões e ajuda durante o trabalho,

À Professora Dra. GLÁUCIA M. PASTORE pelo estímulo, confiança e discussões,

Ao Dr. GILSON MANFIO pela ajuda em relação à taxonomia numérica e discussões,

À MARIA APARECIDA DE MIRANDA PEDROSO pelas noções de química analítica e grande ajuda e paciência na extração e determinação das quinonas,

Aos professores, técnicos, auxiliares e colegas da área de Microbiologia de Alimentos pela cooperação,

Ao pessoal da secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos,

Ao pessoal da Biblioteca, do Centro de Informática e do xerox da FEA,

Ao pessoal da secretaria de Pós-graduação, e em especial à Cícera,

Aos outros laboratórios do DCA pelo empréstimo de materiais,

Ao RHAE/CNPq e a FAEP- UNICAMP pelo apoio financeiro,

Às amigas CIDA e ROSINHA que sempre acreditaram no meu potencial e me mostraram o valor de ter fé,

À GABI e YURI pelos vários momentos de alegria e descontração,

Aos vários amigos que compartilharam estes anos comigo MARIANNE, RAQUEL, MARIKO SAM, CRISTINA, ANA LURDES, ELI, ANA LÚCIA, ARGENTINA, CIDA VIEIRA, MARQUINHOS, VERA, SIMONE, ROGÉRIO, PAULA, PATRÍCIA CISALPINO, ZIG ...

À todos que proporcionaram as muitas dificuldades deste trabalho,

Eu sinceramente agradeço.

# ÍNDICE

|                                                                |      |
|----------------------------------------------------------------|------|
| ÍNDICE .....                                                   | i    |
| LISTA DE TABELAS .....                                         | iii  |
| LISTA DE FIGURAS .....                                         | v    |
| RESUMO .....                                                   | vii  |
| SUMMARY .....                                                  | viii |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                            | 1    |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA .....                                 | 3    |
| 2.1. Frutose: Uso e Produção .....                             | 3    |
| 2.2. Inulina: Alternativa para a Produção de Frutose .....     | 5    |
| 2.3. Microrganismos Capazes de Degradar Inulina .....          | 10   |
| 2.4. Leveduras Inulolíticas .....                              | 12   |
| 2.5. Isolamento, Ecologia e Taxonomia de Leveduras .....       | 17   |
| 2.6. Leveduras Associadas às Agaves .....                      | 30   |
| 2.7. Isolamento e Seleção de Microrganismos Inulolíticos ..... | 31   |
| 2.8. Metodologias de Microvolumes em Microbiologia .....       | 32   |

|                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....                                               | 35  |
| 3.1. Obtenção das Leveduras Inulolíticas a partir de Agave .....          | 35  |
| 3.1.1. Coleta de Amostras.....                                            | 35  |
| 3.1.2. Isolamento, Purificação e Preservação .....                        | 36  |
| 3.2. Caracterização Taxonômica .....                                      | 38  |
| 3.2.1. Caracterização Morfológica e Cultural .....                        | 39  |
| 3.2.2. Caracterização Fisiológica e Bioquímica .....                      | 40  |
| 3.2.3. Caracterização Quimiotaxonômica: Determinação de<br>Quinonas ..... | 42  |
| 3.2.4. Taxonomia Numérica .....                                           | 45  |
| 3.3. Seleção de Leveduras Inulolíticas .....                              | 46  |
| 3.4. Determinação da Atividade Enzimática de Inulinase .....              | 49  |
| 3.5. Determinação do Modo de Ação da Enzima Inulinase .....               | 51  |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                           | 52  |
| 4.1. Isolamento e Preservação das Leveduras Isoladas de Agave .....       | 52  |
| 4.2. Identificação das Leveduras Isoladas de Agave .....                  | 53  |
| 4.3. Leveduras Inulolíticas Seleccionadas .....                           | 75  |
| 4.4. Atividade de Inulinase das Leveduras Seleccionadas .....             | 81  |
| 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....                                        | 85  |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                       | 87  |
| 7. ANEXOS .....                                                           | 111 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1. Comparação das Características Fisiológicas de Interesse Biotecnológico entre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....                               | 16 |
| TABELA 2. Descrição das Coletas de Material para o Isolamento de Leveduras .....                                                                                                             | 35 |
| TABELA 3. Código das Leveduras Isoladas de Agave, Número de Depósito na Coleção de Culturas Tropical e Temperatura de Isolamento .....                                                       | 52 |
| TABELA 4. Características Diferenciais entre <i>Candida kefir</i> , <i>Candida guilhermondii</i> , <i>Candida lusitanae</i> e <i>Pichia strasburgensis</i> .....                             | 56 |
| TABELA 5. Descrição das Espécies Encontradas nos Diferentes Locais de Coleta .....                                                                                                           | 57 |
| TABELA 6. Distribuição das Leveduras Isoladas de Agave nos “Clusters” .....                                                                                                                  | 69 |
| TABELA 7. Distribuição em Porcentagem das 58 Características Fenotípicas entre os “Clusters” .....                                                                                           | 70 |
| TABELA 8. Análise da Cultura Centro-tipo, Médias dos Coeficientes “simple matching”, Jaccard e Desvio Padrão e Similaridade a partir do HMO (“Hypothetic Mean Organism”) “Intracuster” ..... | 72 |

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 9. Valores de $\mu_{\text{máx}}$ h <sup>-1</sup> das Leveduras em Meio YNB Inulina 1% em Diferentes pHs e Temperaturas .....                             | 76 |
| TABELA 10. Valores de $\mu_{\text{máx}}$ h <sup>-1</sup> das Leveduras em Meio YEP Inulina 1% em Diferentes pHs e Temperaturas .....                            | 78 |
| TABELA 11. Valores de $\mu_{\text{máx}}$ h <sup>-1</sup> das Leveduras em Meio YNB Frutose 1% em Diferentes pHs e Temperaturas .....                            | 79 |
| TABELA 12. Valores de $\mu_{\text{máx}}$ h <sup>-1</sup> das Leveduras Previamente Seleccionadas em Meio YNB Inulina 1% pH 4,0 em Diferentes Temperaturas ..... | 80 |
| TABELA 13. Atividade de Inulinase do Sobrenadante e Ligada à Parede das Leveduras em 12, 18 e 24 horas de Cultivo em Meio YNB Inulina 1% pH 5,5 a 37°C.....     | 82 |
| TABELA 14. Atividade de Inulinase Total das Leveduras em 12, 18 e 24 horas de Cultivo em Meio YNB Inulina 1% pH 5,5 a 37°C .....                                | 83 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1. Estrutura da Molécula de Inulina .....                                                                         | 6  |
| FIGURA 2. Classificação das Leveduras no Reino Eumycota .....                                                            | 20 |
| FIGURA 3. Classificação das Leveduras Ascosporogênicas .....                                                             | 22 |
| FIGURA 4. Planta de <i>Agave</i> e Resíduos da Indústria de Sisal .....                                                  | 37 |
| FIGURA 5. Esquema Utilizado na Determinação de Quinonas em Leveduras .....                                               | 43 |
| FIGURA 6. Esquema de Procedimentos Utilizados na Análise de Dados Fenotípicos Binários.....                              | 45 |
| FIGURA 7. Menus de Funções do Software X (CHUN, 1995) Utilizado na Análise dos Dados Fenotípicos .....                   | 47 |
| FIGURA 8. Diagrama Esquemático da Distribuição das Leveduras nos Meios YNB e YEP no Sistema "Microtiter Reader" .....    | 48 |
| FIGURA 9. Diagrama Esquemático de Distribuição das Leveduras no Meio YNB Inulina 1% no Sistema "Microtiter Reader" ..... | 49 |

|                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 10. Cromatogramas Referentes à Determinação de Quinona Q <sub>6</sub> da Espécie <i>Candida kefir</i> e Cultura Referência <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 .....                        | 59 |
| FIGURA 11. Cromatogramas Referentes à Determinação de Quinona Q <sub>7</sub> da Espécie <i>Pichia strasburgensis</i> “like” e Cultura Referência <i>Pichia strasburgensis</i> CCT 4474.....            | 60 |
| FIGURA 12. Cromatogramas Referentes à Determinação de Quinona Q <sub>8</sub> da Espécie <i>Candida lusitanae</i> e Cultura Referência <i>Pachysolen tannophilus</i> CCT 2380 .....                     | 61 |
| FIGURA 13. Cromatogramas Referentes à Determinação de Quinona Q <sub>9</sub> da Espécie <i>Candida guilhermondii</i> e Cultura Referência <i>Candida guilhermondii</i> CCT 2492 .....                  | 62 |
| FIGURA 14. Dendograma Representando as Relações de Similaridade (“simple matching”/UPGMA) entre as Linhagens de Leveduras Isoladas de Agave Baseado na Análise de 58 Características Fenotípicas ..... | 67 |
| FIGURA 15. Dendograma Representando as Relações de Similaridade (Jaccard/UPGMA) entre as Linhagens de Leveduras Isoladas de Agave Baseado na Análise de 58 Características Fenotípicas .....           | 68 |

## RESUMO

Com o objetivo de obter leveduras produtoras de inulinasas com propriedades biotecnológicas interessantes fez-se o isolamento de leveduras a partir de suco da planta *Agave* e resíduos da indústria de sisal (substratos ricos em inulina). Para a seleção de linhagens tolerantes a pH baixo e altas temperaturas, utilizou-se o sistema "Microtiter Reader" automatizado para reduzir tempo, custo e mão-de-obra. A caracterização taxonômica incluiu técnicas convencionais, quimiotaxonômica e taxonomia numérica. Foram isoladas 79 leveduras a partir de 4 locais de coleta em condição seletiva (meio de cultura contendo inulina em diferentes temperaturas). A caracterização morfológica e bioquímica, junto com a determinação do tipo de coenzima-Q (quinona) foram utilizadas na identificação de 73 leveduras ascomicéticas compreendendo os estados anamórficos: 42 linhagens de *Candida kefir* (estado teleomórfico *Cluyveromyces marxianus*); 11 linhagens de *Candida lusitaniae* (estado teleomórfico *Clavispora lusitaniae*) e 6 linhagens de *Candida guilhermondii* (estado teleomórfico *Pichia guilhermondii*); 14 isolados semelhantes à espécie *Pichia strasburgensis*, que não apresentaram reprodução sexuada; e 6 leveduras deuteromicéticas identificadas como pertencentes à espécie *Rhodotorula rubra*. Na análise por taxonomia numérica, utilizou-se 58 características fenotípicas para o cálculo da similaridade entre as leveduras (coeficientes "simple matching" e Jaccard) e foram construídos dendogramas através dos programas computacionais X e NTSYS. As leveduras foram agrupadas em sete "clusters". Três "clusters" Q<sub>6</sub>, Q<sub>7</sub> e Q<sub>10</sub> apresentaram boa definição e incluíram 18 linhagens de *Candida kefir*, 10 linhagens de *Pichia strasburgensis* e os 6 representantes da espécie *Rhodotorula rubra*, respectivamente. Um "cluster", denominado Major, apresentou-se heterogêneo reunindo linhagens das espécies *C. kefir* (24), *C. lusitaniae* (8), *C. guilhermondii* (3) e *Pichia strasburgensis* (2) confirmando a semelhança em relação às características morfológicas e bioquímicas observada na taxonomia convencional, na ausência das características relacionadas à reprodução sexuada. A estratégia de seleção utilizada compreendeu o teste do crescimento dos isolados em meios mínimo (YNB) e complexo (YEP) acrescidos de inulina em diferentes condições de pH e temperatura. Os dados de cinética de crescimento foram comparados e foram selecionadas 20 linhagens de *Candida kefir* com constante específica de crescimento ( $\mu_{\max}$ )  $\geq 0,50$  em meio mínimo (YNB) pH 4,0 e a temperatura de 50°C. Onze linhagens apresentaram atividade enzimática superior à obtida para a cultura referência *Cluyveromyces marxianus* CBS 6556 no menor tempo testado (12 horas). A linhagem *Candida kefir* A54a mostrou atividade inulolítica de 2,31 U a 12 horas de produção comparável à linhagem referência (2,64 U) em 18 horas de produção.

## SUMMARY

Aiming to obtain inulinase-producing yeasts with interesting biotechnological properties the isolation of yeasts from *Agave* juice and from sisal industry residues (substrates rich in inulin) was carried on. For the screening of low pH and high temperature tolerant strains an automated microtiter reader system was utilized to reduce time, cost and work. The taxonomic characterization was performed using conventional and chemotaxonomic and numerical approaches. Were isolated 79 yeast strains from four sampling places on selective condition (culture medium with inulin at high temperatures). The morphological and biochemical characterization together with the coenzyme-Q type determination were utilized for the identification of 73 ascomycetous yeasts in anamorph state that include: 42 strains of *Candida kefir* (sexual state *Kluyveromyces marxianus*); 11 strains of *Candida lusitaniae* (sexual state *Clavispora lusitaniae*); 6 strains of *Candida guilhermondii* (sexual state *Pichia guilhermondii*) and 14 isolates analogous to *Pichia strasburgensis* that did not show sexual reproduction and 6 deuteromycetous yeasts identified as *Rhodotorula rubra*. In the numerical analysis 58 phenotypic characters were utilized to calculate the similarity between isolates (simple matching and Jaccard coefficients) and clustering using X and NTSYS softwares. The yeasts were clustered on seven groups. The clusters Q<sub>6</sub>, Q<sub>7</sub> e Q<sub>10</sub> presented a good definition and grouped 18 strains of *C. kefir*, 10 strains of *P. strasburgensis*-like and 6 strains of *Rhodotorula rubra*, respectively. One cluster, defined Major, formed an heterogeneous group, clustering strains of *C. kefir* (24), *C. lusitaniae* (8), *C. guilhermondii* (3) e *P. strasburgensis* (2) that confirms the similarity of these species based on the morphological and biochemical characteristics as shown by conventional taxonomy on absence of sexual reproduction. The screening strategy used included growth test at minimal medium YNB and complex medium YEP with inulin 1% at different pH and temperature conditions. Kinetics data were compared and twenty strains were selected that presented specific growth constant ( $\mu_{max}$ ) values  $\geq 0,50 \text{ h}^{-1}$  at YNB pH 4,0 50°C condition. Of these, eleven strains of *Candida kefir* showed inulolitic activity greater than reference culture (*K. marxianus* CBS 6556) with 12 hours of production. The strain *C. kefir* A54a showed AE = 2,31 U (  $\mu\text{moles of fructose per minute}$ ) at 12 hours of production, this value was comparable to strain *K. marxianus* CBS 6556 at 18 hours (2,64 U).

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de frutose como adoçante natural apresenta inúmeras vantagens sobre a sacarose, em relação a aspectos de saúde humana, já que não é cariogênica e pode ser consumida por diabéticos; e também do ponto de vista de processo, uma vez que é um açúcar mais solúvel e de maior poder adoçante.

Xaropes com altos teores de frutose, utilizados pela indústria de alimentos, têm sido obtidos tradicionalmente a partir de amido de milho num processo envolvendo três etapas enzimáticas e uma onerosa etapa de separação da frutose. Uma forma alternativa, bem mais interessante, seria a obtenção de xaropes puros de frutose a partir da hidrólise enzimática de polifrutanas (inulinas) encontradas na natureza, em uma única etapa realizada pela inulinase. A hidrólise química da inulina apresenta desvantagens como a formação de subprodutos que conferem gosto amargo e coloração escura, além de problemas relacionados à etapa de neutralização.

A enzima inulinase pode ser encontrada em plantas, bactérias, fungos e leveduras. As leveduras têm sido indicadas como as mais promissoras para a produção de inulinase, particularmente, *Kluyveromyces marxianus*. As enzimas de origem microbiana apresentam potencial de aplicação em escala industrial e as leveduras possuem características que as tornam de maior aceitação pelos consumidores que fungos e bactérias. Neste sentido, torna-se relevante a pesquisa de novas leveduras produtoras de inulinases apresentando propriedades tecnológicas diversificadas.

A seleção ("screening") de linhagens produtoras de inulinases tem sido feito em amostras de solo da rizosfera e material vegetal em decomposição de plantas pertencentes às famílias Compositae e Gramineae, ricas em inulina (polímeros de frutose), como carboidrato de reserva ou em linhagens de coleções de culturas.

A pesquisa de leveduras produtoras de inulinas em plantas do gênero *Agave* justifica-se não só por ser rica em inulina, bem como pelo potencial de produção desta cultura já explorada no Brasil para a produção de sisal (fibras naturais).

O estudo de enzimas microbianas e suas aplicações é essencial para o desenvolvimento da biotecnologia. A procura de novas enzimas e novos microrganismos tem por objetivo não apenas a obtenção de elevadas atividades ou de linhagens com alta produtividade, mas também a busca de características qualitativas, tais como, a relação atividade/crescimento, tolerância ou estabilidade em condições definidas (pH, temperatura, pressão osmótica, concentração de etanol, etc.). Tais características são importantes, visto que não podem ser facilmente modificadas via genética clássica ou engenharia genética.

Neste trabalho, pretendeu-se o isolamento, a taxonomia e a seleção de leveduras inulolíticas a partir de agave e resíduos da produção de sisal com características de tolerância a valores de pH baixo e a elevadas temperaturas, utilizando uma nova metodologia de “screening” de microvolumes, que permite avaliar um grande número de amostras simultaneamente, visando reduzir custo, tempo e mão-de-obra.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Frutose: Uso e Produção**

A obtenção de xaropes com alta concentração de frutose a partir de inulina tem despertado bastante interesse para ser utilizado como adoçante na indústria de alimentos (FLEMING & GROOTWASSINK, 1979).

Os adoçantes são importantes na nutrição humana pelo paladar e pelo suprimento de energia. Os açúcares (principalmente a sacarose) são os adoçantes mais comumente utilizados, enquanto adoçantes de natureza não-carboidrato (aspartame, sacarina, ciclamato, etc.) ainda são utilizados em quantidades limitadas, devido a problemas do gosto amargo residual e principalmente pelos motivos bastante polêmicos de riscos da saúde humana (HALLFRISCH, 1990). Outro aspecto interessante é que estes adoçantes não-carboidrato apesar de conferir sabor doce ao produto, não substituem o açúcar em outras características como cor, aroma, textura e vida de prateleira.

A procura de adoçantes naturais vêm sendo intensificada nos últimos anos para a substituição da sacarose proveniente da cana de açúcar e beterraba, que apresenta inúmeras características indesejáveis como: propriedade cariogênica, contribuição para aterosclerose e obesidade devido ao seu alto valor calórico, quando consumida em excesso.

A utilização de frutose apresenta as vantagens de não ser cariogênica e de sua maior tolerância pelos diabéticos quando comparada com glicose e sacarose. Isto é devido a sua absorção em concentrações limitadas, sem requerer insulina (HALLFRISCH, 1990; GERRIT & TSALIKIAN, 1993). Por causa de sua maior solubilidade e menor tendência a cristalização, soluções de valor Brix elevado podem ser preparadas e utilizadas na preservação de alimentos doces (PAWAN, 1973).

A utilização de frutose tem se intensificado nas indústrias de bebidas carbonatadas ("soft drinks"), de produtos açucarados (geléias e sorvetes), de condimentos e pickles ("catchup", molhos, cerejas marasquino) e na indústria de panificação (FRUIN & SCALLET, 1975; BARKER, 1975; HANOVER & WHITE, 1993).

O emprego de frutose como adoçante tem despertado interesse notável devido, principalmente, às suas propriedades organolépticas. Na indústria alimentícia, os xaropes de frutose conferem melhor qualidade aos alimentos, menor tendência à cristalização, maior estabilidade microbiológica, menor higroscopicidade e menor custo de produção.

A frutose é um açúcar encontrado naturalmente nas frutas e no mel de abelhas, porém em quantidades pequenas, o que dificulta sua extração. Este açúcar tem um poder adoçante 2 a 3 vezes superior ao da glicose e 1,5 a 2 vezes maior que o da sacarose.

Frutose pode ser obtida diretamente de frutas ou por oxidação de manitol ou sorbitol (PILNIK, 1973) e pode também ser preparada pela inversão de sacarose ou isomerização da glicose. Nos dois últimos casos, uma mistura de glicose e frutose é obtida.

A produção de xaropes com altas concentrações de frutose tem sido feita tradicionalmente a partir do amido de milho, o chamado "High Fructose Corn Syrups"- HFCS, envolvendo pelo menos três etapas enzimáticas: a hidrólise com  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase para a obtenção de glicose e uma isomerização da glicose através da glicose isomerase (FRUIN & SCALLET, 1975). Os rendimentos deste processo são de no máximo 45% de frutose, decorrente do equilíbrio termodinâmico entre glicose e frutose (KIM & RHEE, 1989). Muitos esforços têm sido realizados para o aumento do rendimento como a separação da frutose por cromatografia de troca iônica, porém isto eleva em demasiado os custos do processo.

Os Estados Unidos da América é o maior produtor e consumidor de xaropes de frutose (HFS) (PARK & YETLEY, 1993). A maior parte do HFS é fabricado como HFS-42, o qual contém 42% de frutose ou como HFS-55 com 55% de frutose. Em 1990, os EUA produziram 70,8% do total de HFS mundial. Em 1989, os xaropes de frutose representaram somente 6,6% do

consumo total de açúcar do mundo, o que correspondeu a 6,4 bilhões de Kg em peso seco. Já em 1995, foram produzidos 8,2 bilhões de quilogramas (VUILLEUMIER, 1993)

O Brasil importou cerca de 90 toneladas de xarope de frutose em 1985 e em 1989 foram consumidos o equivalente a 200 toneladas de açúcar (ALVES, 1989)

A utilização da fermentação de resíduos agrícolas de plantas ricas em inulina para a produção de frutose tem se apresentado como alternativa ao processo convencional a partir do amido de milho (FLEMING & GROOTWASSINK, 1979; ZITTAN, 1981; HANSSSENS & KOERTS, 1988; GUIRAUD & GALZY, 1990; TANIS, 1990).

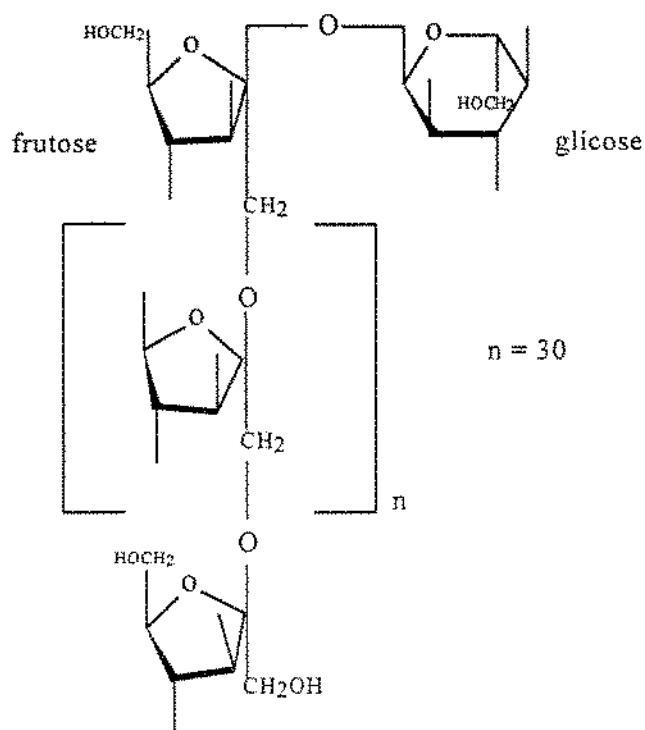
## 2.2. Inulina: Alternativa para a Produção de Frutose

A inulina e seus análogos são polifrutanas constituídas de múltiplas unidades de frutose e uma unidade de glicose terminal formando cadeias lineares através de ligações do tipo  $\beta$ -2,1, sendo o esquema da molécula apresentado na figura 1 (VANDAMME & DERYCKE, 1983; PONTIS, 1990).

As inulinas ou polifrutanas são polímeros de frutose que ocorrem como material de reserva em diversas plantas dicotiledôneas, particularmente, em plantas das famílias Compositae e Campanulaceae (BECK & PRAZNIK, 1986; PONTIS, 1990).

Algumas plantas da família Compositae como *Helianthus tuberosus*, *Cichorium intybus*, *Dahlia pinnata*, dentre outras, apresentam como principal carboidrato de reserva a inulina, que representa de 10 a 20% do peso total do vegetal (FLEMING & GROOTWASSINK, 1979; VANDAMME & DERYCKE, 1983; GUPTA *et alii*, 1988).

GUIRAUD & GALZY (1981) indicam também a inulina como material de reserva nas famílias de monocotiledôneas Gramineae, Lilliacae e Amarillideae.



**Figura 1:** Estrutura da molécula de inulina

O nome inulina parece ser derivado do gênero *Inula*, uma planta pertencente à família das compostas. *Helianthus tuberosus* ou “Jerusalem artichoke” ou, ainda “topinambur” tem sido amplamente reportada na literatura como fonte de inulina (BYUN & NAHM, 1978; HEILSCHER & FIEDLER, 1996). Trata-se de uma planta perene que produz rizomas na forma de tubérculos que contém inulina e apresentam um rendimento de até 12 toneladas/hectare. Tupinambur (*Helianthus tuberosus*) é uma planta nativa da América, sendo este nome de origem tupi-guarani. Porém é pouco conhecida no Brasil, sendo cultivada somente no Rio Grande do Sul como planta forrageira. Recebe outras denominações comuns como girassol-de-batata, batata-tupinambá, topinambur ou alcachofra-de-Jerusalém.

Dália (*Dahlia pinnata*), dentre as compostas, mostra rendimentos interessantes de 40 toneladas de tubérculo/hectare, no entanto, esta planta é sensível a condições climáticas adversas e os tubérculos são difíceis de colher.

KIM & BYUN (1982) e KIM & RHEE (1989) utilizaram extrato dos tubérculos de alcachofra-de-jerusalém como substrato para a produção de frutose, empregando enzima inulinase imobilizada de *Kluyveromyces fragilis* e *Aspergillus ficuum*, respectivamente.

Outros autores utilizaram alcachofra-de-jerusalém como substrato para a produção de proteína unicelular (“single cell protein”) e etanol, além da produção de frutose (BAJPAI & BAJPAI, 1991)

BHATIA & NANDRA (1979) estudando a enzima inulinase isolada a partir de *Agave americana*, destacaram que as plantas pertencentes ao gênero *Agave* apresentam várias polifrutanas.

De acordo com TANIS (1990), o açúcar predominante no extrato obtido a partir de *Agave tequilana* é uma polifrutana com grau de polimerização superior a 15. Esta espécie é cultivada no México para a produção de tequila, bebida destilada obtida a partir do caldo de agave fermentado (CEDENO, 1995). O uso de agave para produzir bebidas (“mezcal”, “pulque” e outras) no México data de um longo tempo atrás quando certas tribos indígenas usavam-na em cerimônias religiosas. A fabricação de tequila envolve quatro etapas: 1) cozimento da cabeça da *Agave tequilana* para a hidrólise dos polímeros, principalmente , de inulina com obtenção de frutose; 2) esmagamento para a extração do suco rico em açúcares fermentescíveis; 3) fermentação por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*; 4) destilação do mosto fermentado. Segundo TANIS (1990) o extrato de agave chega a conter entre 240-260 gramas de inulina/litro, assim, uma vez que a planta agave tem uma produtividade em média de 5 toneladas de matéria seca/hectare/ano, pode-se estimar um rendimento de 3 toneladas de inulina/hectare/ano.

As agaves são plantas monocotiledôneas da família das amarilidáceas (GUIRAUD & GALZY, 1990). Estas plantas formam um importante grupo de plantas tropicais agriculturáveis (NOBEL, 1988). Seu desenvolvimento em áreas áridas e semi-áridas, aliado ao seu alto rendimento, tornam-na uma cultura agrícola de interesse sócio-econômico em regiões semi-áridas, como o sertão nordestino brasileiro, onde aliás, são exploradas para a produção de fibras naturais (sisal).

O sisal se apresenta como uma cultura com amplas vantagens para o semi-árido, por ser um vegetal que se adequa ao clima. Sendo uma cultura permanente, cuja renovação do plantio é feita com um mínimo de 5 anos, não exige cuidados especiais, além de possibilitar nos primeiros anos a associação com outras culturas de curto ciclo vegetativo como o milho e o feijão.

O Brasil é um dos maiores produtores de sisal no mundo e sua produção representa em alguns estados do nordeste brasileiro (Paraíba e Bahia) uma importante fonte de geração de divisas e alternativa de emprego. Quanto à fibra, é utilizada ainda hoje para a fabricação de cordas, cabos marítimos e de “wrapping twines” (cordões para embalagem no comércio) dentre outros usos secundários como sacos, tapetes, estofamento e artesanatos em geral (FALCÃO, 1983; NOBEL, 1988). Outros usos como produção de papel (MACEDO, 1983), alimentação de animais e uso ornamental (NOBEL, 1988) e uso na indústria farmacêutica, através da obtenção de sapogeninas, para a fabricação de esteróides são também citados na literatura.(BLUNDEN *et alii*, 1975; CHEN *et alii*, 1985; INDRAYANTO *et alii*, 1993).

MONFORTE *et alii* (1987) relatam o uso de suco de *Agave fourcroides* (espécie também utilizada para a produção de fibras, conhecida como “henequen”) para a obtenção de proteases, como subproduto da indústria de fibras, já que, para cada quilograma de fibra produzido, são produzidos 17 quilogramas de suco de agave.

As polifrutanas provenientes de diferentes plantas em fases distintas de desenvolvimento apresentam variados graus de polimerização (DP - “degree of polymerization”). FLEMING & GROOTWASSINK (1985) classificam as polifrutanas com DP>30 como inulinas e os polímeros com DP inferiores como oligofrutanas. A inulina tem um peso molecular estimado de aproximadamente 5400 kDa, é insolúvel em água a temperatura ambiente e comercialmente está disponível a partir de tubérculo de dália.

HEWITT (1993) avaliando a introdução de adoçantes alternativos nos mercados dos Estados Unidos e da Europa, indica a utilização de inulina e oligofrutose como fibras dietéticas, uma vez que não são absorvidas pelo organismo, promovendo uma redução do colesterol e de lipíde na corrente sanguínea. ROBERFROID (1993) relata as vantagens do uso de inulina e

oligofrutose em relação a outros carboidratos como fibras dietéticas por ter efeito bifidogênico, isto é, permite o desenvolvimento das bifidobactérias que produzem substâncias que ajudam a estimular o sistema imunológico. O efeito de oligofrutose e inulina na flora intestinal com destaque para o favorecimento do gênero *Bifidobacterium* tem sido relatado por outros autores (WANG & GIBSON, 1993).

A inulina e a oligofrutose apresentam a vantagem de ter valor calórico 25% menor que o açúcar, possuir um sabor doce suave sem gosto residual e propriedades tecnológicas que permitem a substituição do açúcar em vários produtos alimentícios (HEWITT, 1993).

As oligofrutas podem ser produzidas a partir de sacarose, através de uma reação enzimática de transfrutoseilação ou a partir da inulina, através da hidrólise enzimática pelas endoinulinases. No primeiro caso, o processo de produção dos oligômeros (GF<sub>2</sub>, GF<sub>3</sub>, etc) foi desenvolvido no Japão (HIDAKA *et alii*, 1988) e o produto já é comercializado no Japão desde 1992. Trata-se de um açúcar líquido, não purificado, contendo resíduos de glicose e sacarose, o que limita a aplicação do produto, uma vez que tem calorias. Isto ocorre porque a taxa de conversão máxima de sacarose a fruto-oligossacarídeos é de 55-60% e a obtenção de um produto isento destes resíduos, exigiria o emprego de processos adicionais de purificação.

Na produção de oligofrutas a partir da hidrólise enzimática de inulina, pode-se obter açúcar (F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, etc) com maior grau de pureza, uma vez que a molécula de inulina apresenta apenas uma unidade de glicose terminal.

A inulina pode ser hidrolisada química e enzimaticamente. A hidrólise química pode ser feita utilizando ácido clorídrico ou sulfúrico sob condição de temperatura elevada. As desvantagens da hidrólise química são a formação de subprodutos indesejáveis (produtos de degradação) que alteram o sabor e a cor dos xaropes de frutose e os altos custos do processo de neutralização e eliminação de sais após a hidrólise, devido à utilização de resinas de troca iônica (FLEMING & GROOTWASSINK, 1979). Estes autores encontraram que após 8 horas de hidrólise ácida, 83% do total de açúcares redutores consiste de 58% de monossacarídeos e 25%

de dissacarídeos, enquanto após 6 horas de hidrólise enzimática de um total de 82%, 79% eram monossacarídeos e somente 3% dissacarídeos.

### 2.3. Microrganismos Capazes de Degradar Inulina

A hidrólise enzimática não apresenta os problemas da hidrólise ácida e pode ser feita pela enzima inulinase (2,1- $\beta$ -D-fruto-frutanolhidrolase, E.C 3.2.1.7.) que pode ser encontrada em plantas, fungos, bactérias e leveduras.

A enzima de origem vegetal atua sobre inulina, mas não sobre sacarose. As inulinases de origem microbiana, geralmente, possuem também atividade de inversão, agindo sobre a sacarose e a rafinose (VANDAMME & DERYCKE, 1983; GUIRAUD & GALZY, 1990).

Muitas enzimas microbianas são capazes de degradar frutanas. De acordo com o mecanismo catalítico podem ser classificadas como transferases (EC. 2.4.1.) com produção de difrutoseanidrido por transfrutossilacção e como hidrolases (EC.3.2.1.) capazes de endo ou exodegradação de polifrutanas. Estas últimas são capazes de clivar as ligações  $\beta$ -2 $\rightarrow$ 1-D-frutofuranosídicas da inulina e diferem amplamente quanto ao modo de acção (AZHARI *et alii*, 1989).

As exo-inulinases são enzimas capazes de hidrolisar a inulina a partir da extremidade não redutora do polímero, retirando unidades de frutose e produzindo um xarope com elevada concentração de frutose (95%) (VANDAMME & DERYCKE, 1983). As exo-inulinases são produzidas tanto por leveduras, como por bactérias e fungos filamentosos.

As endo-inulinases são enzimas capazes de quebrar a cadeia de inulina, hidrolisando ligações  $\beta$ -2,1 em diferentes pontos da molécula, liberando, assim, oligômeros chamados fruto-oligossacarídeos ou oligofrutanas e podem ser produzidas por bactérias (YOKOTA *et alii*, 1995) e fungos filamentosos, que também produzem exo-inulinases.

As enzimas inulinases podem ser encontradas em fungos filamentosos como *Aspergillus niger* (DERYCKE & VANDAMME, 1984; UHM *et alii*, 1987; HIDAKA *et alii*, 1988; NAKAMURA *et alii*, 1994; NAKAMURA *et alii*, 1995; ONGEN-BAYSAL, 1994; POORNA & KULKARNI, 1995); *A. ficuum* (ETTALIBI & BARATTI, 1987; ETTALIBI & BARATTI, 1990; CARNITI *et alii*, 1991); espécies de *Penicillium* (VANDAMME & DERYCKE, 1983; ONODERA & SHIOMI, 1988; ONODERA & SHIOMI, 1992); *Fusarium oxisporium* (GUPTA *et alii*, 1988); *Panaeolus papillonaceus* (MUKHERJEE & SENGUPTA, 1985); *Chrysosporium pannorum* (XIAO *et alii*, 1988); *Scybalidium acidophilum* (KIM *et alii*, 1994).

Uma linhagem mutante de *Aspergillus niger* hiperprodutora de inulinase (377 U/ml) foi recentemente indicada como promissora para a produção de HFS (VISWANATHAN & KULKARNI, 1995)

OHTA *et alii* (1993) e NAKAMURA *et alii* (1996) relataram a produção de etanol a partir de alcachofra-de-jerusalém utilizando uma combinação de microrganismos, isto é, *Aspergillus niger* para a hidrólise de inulina e *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação dos monossacarídeos.

A presença de inulinases tem sido estudada em algumas espécies de bactérias como *Arthrobacter globiformis* (HARAGUCHI *et alii*, 1988; SEKI *et alii*, 1988; SEKI *et alii*, 1989); *Arthrobacter* sp. (ELYACHIOUI *et alii*, 1992; KIM *et alii*, 1996); *Lactobacillus plantarum* (VANDAMME & DERYCKE, 1983); e *Flavobacterium multivorum* (ALLAIS *et alii*, 1986), mas as quantidades produzidas são relativamente pequenas.

Há trabalhos que citam a produção de inulinases termoestáveis por bactérias termófilas como *Bacillus* sp. (ALLAIS *et alii*, 1987); *B. subtilis* (VULLO *et alii*, 1991); *Clostridium acetobutylicum* (EFSTATHIOU *et alii*, 1986; LOOTEN *et alii*, 1987); e *C. thermoautotrophicum* (DRENT & GOTTSCHAL, 1991).

No entanto, os avanços mais significativos sobre o estudo e aplicação de inulinases microbianas apontam espécies de leveduras como as mais promissoras para a sua produção, uma

vez que, a quantidade produzida por leveduras é 200 vezes maior que a quantidade obtida a partir de bactérias (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

## 2.4. Leveduras Inulolíticas

Das 469 espécies de leveduras descritas por BARNETT *et alii* (1983), somente 10 espécies divididas em 7 gêneros *Debaryomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces* e *Schizosaccharomyces* são capazes de metabolizar inulina.

GUIRAUD & GALZY (1990) relacionam também outros gêneros de leveduras capazes de degradar inulina como *Brettanomyces*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium* e *Zygosaccharomyces*.

A espécie mais estudada para a produção de inulinase é *Kluyveromyces marxianus* (FUCHS *et alii*, 1985; ROUWENHORST *et alii*, 1988; ROUWENHORST *et alii*, 1990a; ROUWENHORST *et alii*, 1990b; MANZONI & CAVAZZONI, 1992; CRUZ-GURRERO *et alii*, 1995; HENSING *et alii*, 1994; HENSING *et alii*, 1995) e seu sinônimo *K. fragilis* (WORKMAN & DAY, 1983; TSANG & GROOTWASSINK, 1988a; TSANG & GROOTWASSINK, 1988b) ou estado anamórfico *C. kefir* (MANZONI & CAVAZZONI, 1988).

Dentre outras espécies de leveduras relatadas na literatura como produtoras de inulinase, podemos citar *Candida salmenticensis* (GUIRAUD *et alii*, 1980); *Debaryomyces cantarellii* (GUIRAUD *et alii*, 1982); *Candida pseudotropicalis*, *C. macedoniensis*, *Hansenula beijerinckii*, *Pichia guilhermondii* e *Schwanniomyces castellii* (GUIRAUD *et alii*, 1981a); *Pichia polymorpha*, *P. fermentan*, *Hansenula polymorpha* e *Debaryomyces castellii* (GUPTA *et alii*, 1994).

ROUWENHORST *et alii* (1990a), estudando a localização de inulinase em espécies do gênero *Kluyveromyces*, concluíram que a capacidade de utilização de inulina por algumas linhagens depende das condições de crescimento tais como pH e temperatura as quais diferem das condições utilizadas nos estudos de caracterização sistemática de leveduras, assim o número de

leveduras capazes de degradar inulina com certeza é maior, variando-se as condições de cultivo nos gêneros já citados e mesmo em outras espécies como *Saccharomyces kluyveri*.

A inulinase de *Kluyveromyces marxianus* variedade *marxianus* é a mais amplamente estudada e os vários autores descrevem a ação da enzima sobre inulina, sacarose e também rafinose e levana. Sua biossíntese é aumentada na presença de inulina, indicando seu caráter indutivo, mas é produzida também, constitutivamente, quando utiliza-se outros açúcares. A enzima tem sua produção controlada por repressão catabólica, especialmente, por frutose. As inulinases de diferentes linhagens de *Kluyveromyces marxianus* apresentam atividade ótima na faixa de pH de 4,5 e 5,5 e temperatura de 45 a 55°C (ROUWENHORST *et alii*, 1988; GUIRAUD & GALZY, 1990).

A atividade enzimática inulolítica em leveduras pode ser detectada no meio de cultura e na preparação após ruptura da célula (atividade extra e intracelular). Durante o crescimento celular, a excreção é limitada, sendo mais significativa durante a fase estacionária (GUIRAUD & GALZY, 1981). Uma porção considerável da enzima extracelular fica retida na parede celular pela barreira de permeabilidade, que é mantida por pontes dissulfeto (WORKMAN & DAY, 1984).

LAM & GROOTWASSINK (1985) estudaram um método de extração da exo-inulinase produzida por *Kluyveromyces fragilis*, localizada externamente à membrana celular na parede celular (espaço periplasmático) e no sobrenadante da cultura. O método de extração envolve basicamente pH, alta concentração de íons fosfato e cisteína capazes de promover um efeito iônico e redutor, respectivamente, que possivelmente, expande a parede celular, aumentando sua porosidade e permitindo que as moléculas de inulinase sejam capturadas na matriz da parede ou no espaço periplasmático para então difundir para fora.

As inulinases de leveduras mostram uma alta atividade também sobre sacarose e são muito semelhantes à clássica enzima invertase. Entretanto, as invertases mostram uma fraca ou nenhuma atividade sobre polímeros de frutose. Para distinguir entre invertase e inulinase, utiliza-se a chamada relação S/I (atividade sobre sacarose/atividade sobre inulina). Uma relação S/I inferior a 30 é indicativo de inulinase.

Independentemente de sua localização, a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* linhagem CBS 6556 tem uma relação S/I de  $15 \pm 3$  (ROUWENHORST *et alii*, 1988).

Ao contrário da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*, a maior concentração de inulinase pode ser secretada para o meio de cultura em *Kluyveromyces marxianus*. Na fase estacionária de sistemas do tipo batelada ("batch") mais que 75% de inulinase podem ser encontrados no sobrenadante (ROUWENHORST *et alii*, 1988).

A inulinase foi caracterizada como uma glicoproteína (ROUWENHORST *et alii*, 1990) e, de maneira semelhante a outras glicoproteínas extracelulares em leveduras, pode ser encontrada na parede celular e no sobrenadante da cultura. A distribuição da glicoproteína nestes locais depende da espécie de levedura ou da linhagem e das condições de cultivo.

A distribuição de inulinase entre sobrenadante, parede celular e fração ligada à célula depende da fonte de carbono, da taxa de diluição (em culturas contínuas) e da temperatura de crescimento. Durante crescimento em condições não repressoras aproximadamente 50% da enzima está presente no sobrenadante e 30% na parede celular. Em condições de repressão, maior quantidade da enzima encontra-se no sobrenadante (GUIRAUD & GALZY, 1990).

A temperatura de crescimento influencia a produção e distribuição de inulinase. A maior produção coincide com a temperatura ótima de crescimento de *K. marxianus* que encontra-se entre 37 e 42°C e a maior quantidade de enzima excretada (68%) ocorre a 35°C (ROUWENHORST *et alii*, 1988).

As inulinases do sobrenadante e da parede celular foram purificadas e analisadas por eletroforese (ROUWENHORST *et alii*, 1990b) e ambas apresentaram subunidades similares, consistindo de polipeptídeos de 64 kDa com variável concentração de carboidrato (26 -37% da massa molecular). Segundo os mesmos autores, a diferença de tamanho observada entre as duas frações refere-se à agregação das subunidades, isto é, enquanto a enzima do sobrenadante é um dímero (165 kDa), a enzima ligada à parede celular é um tetrâmero (350 kDa) e a retenção da enzima no espaço periplasmático pode ser causada por esta oligomerização.

Comparativamente, a quase totalidade da invertase produzida por *S. cerevisiae* permanece retida na parede em complexos octaméricos de 4 dímeros de invertase (800 kDa) que podem ser liberados para o sobrenadante pelo uso de agentes redutores sempre na forma de dímeros, uma glicoproteína de 270 kDa que contém aproximadamente 50% de carboidratos (ESMON *et alii*, 1987). No caso de *Kluyveromyces marxianus*, a parede celular parece menos resistente a tratamentos com agentes redutores, como cisteína, e ocorre a liberação do tetrâmero que também é uma forma estável (ROUWHENHORST *et alii*, 1990b).

Segundo ROUWHENHORST *et alii* (1991), não há mudanças significativas na produção e localização de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em cultura contínua relacionadas ao ciclo de reprodução assexuada, ao contrário de *S. cerevisiae* que apresenta oscilações na produção de invertase dependendo da fase do brotamento.

Estas oscilações na produção de proteínas heterólogas glicosiladas em leveduras são decorrentes do chamado efeito Crabtree. Assim, *Kluyveromyces marxianus* oferece a vantagem de ser uma levedura Crabtree negativa, proporcionando níveis constantes de produção de proteínas (GUIRAUD & GALZY, 1990).

Dentre as leveduras produtoras de inulinases, destaca-se a espécie *Kluyveromyces marxianus* que além da atividade enzimática, possui outras características que a elegem como organismo ideal para fins industriais tais como, a capacidade de crescimento em elevadas temperaturas (40-45°C), especificidade para o substrato e alta produtividade de inulinase. Além disso, *K. marxianus* possui um eficiente sistema de expressão e secreção de proteínas que podem ser explorados para a produção de proteínas heterólogas (VAN DER BERG *et alii*, 1990; KANG *et alii*, 1996; CHUNG *et alii*, 1996a; CHUNG *et alii*, 1996b).

A tabela 1 sumariza as vantagens na utilização de *Kluyveromyces marxianus* em relação a *Saccharomyces cerevisiae* para processos biotecnológicos e como microrganismo vetor para engenharia genética.

**Tabela 1:** Comparação de características fisiológicas de interesse biotecnológico entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*

| características                                | <i>S. cerevisiae</i> | <i>K. marxianus</i>  |
|------------------------------------------------|----------------------|----------------------|
| $\mu_{\text{máx}}$                             | 0,5 h <sup>-1</sup>  | 0,89 h <sup>-1</sup> |
| temperatura ótima de crescimento               | 30°C                 | 40°C                 |
| fontes de carbono utilizáveis                  | poucas               | muitas               |
| soro (lactose)                                 | -                    | +                    |
| hemicelulose (xilose)                          | -                    | +                    |
| melaço (sacarose, rafinose)                    | +                    | +                    |
| fontes de nitrogênio utilizáveis               | poucas               | muitas               |
| afinidade por açúcares                         | baixa                | alta                 |
| efeito Crabtree                                | +                    | -                    |
| floculação                                     | +                    | -                    |
| produção proteínas glicosiladas extracelulares | poucas               | muitas               |
| acessibilidade genética                        | +                    | -                    |

Fonte: GUIRAUD & GALZY, 1990

Alguns autores têm realizados estudos genéticos para aumentar a produção de inulinase em leveduras, especialmente relacionados com a obtenção de mutantes insensíveis à repressão catabólica ou clones hiperprodutores da enzima (GROOTWASSINK & HEWITT, 1983; BAJON *et alii*, 1984; BOURGI *et alii*, 1986; GUIRAUD *et alii*, 1988; TSANG & GROOTWASSINK, 1988a; TSANG & GROOTWASSINK, 1988b; CRUZ-GURRERO, *et alii*, 1995).

A clonagem e sequenciamento do gene da inulinase em *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424 foi realizada por LALOUX *et alii* (1991) que constataram 67% de similaridade com invertase.

Sabe-se que etanol pode ser produzido pela fermentação de diferentes culturas agrícolas. Assim, tem sido objeto de estudos a utilização de substratos ricos em inulina, principalmente extratos de alcachofra-de-Jerusalem, empregando espécies de *Kluyveromyces marxianus* capazes de hidrolisar diretamente inulina e produzir etanol (GUIRAUD *et alii*, 1981a ; GUIRAUD *et alii* 1981b; MARGARITIS & BAJPAI, 1982a; ROSA, *et alii*, 1987; PEJIN, *et alii*, 1993).

As espécies *Kluyveromyces marxianus*, *K. fragilis*, *Candida pseudotropicalis* e *Torulopsis coelliculosa* foram pesquisadas por ECHEVERRIGARAY & TAVARES (1985) para a fermentação de *Helianthus tuberosus* também para a produção de etanol.

APPAIRE *et alii*(citado por GUIRAUD & GALZY, 1990) e BAJPAI & BAJPAI (1991) têm investigado a produção de proteínas unicelulares ("single cell protein"- SCP) a partir de inulina utilizando com maior sucesso *Kluyveromyces marxianus*, *Candida salmanticensis* e *Lipomyces starkeyi*.

Vários autores têm realizados experimentos de imobilização da enzima inulinase ou das células de leveduras, visando a aplicação industrial da atividade inulolítica para a produção de frutose (KIM & BYUN, 1982; WORKMAN & DAY, 1984; KIM & RHEE, 1989 e GUPTA *et alii*, 1994).

## 2.5. Isolamento, Ecologia e Taxonomia de Leveduras

O termo levedura vem do latim "levere" e significa levantar, referindo-se à evolução de dióxido de carbono durante a fermentação. Levedura e fermentação sempre estiveram intimamente associados através da história devido ao uso dos processos fermentativos, mas ignorava-se a natureza destes microrganismos.

Sempre associou-se a presença de leveduras na natureza à sua capacidade fermentativa. Assim, acreditava-se que estes microrganismos só pudessem ser encontrados em habitats ricos em

açúcares fermentescíveis. No entanto, hoje já se sabe que o número de compostos de carbono fermentescíveis é relativamente limitado e que a maioria das leveduras consegue energia através do metabolismo oxidativo, utilizando uma grande variedade de substratos orgânicos como fonte de carbono que não são fermentescíveis.

Este potencial metabólico expande a capacidade destas leveduras de ocupar nichos ecológicos onde estão presentes compostos como: pentoses, treoses, álcoois primários, polióis, aminoaçúcares, ácidos orgânicos, ácidos urônicos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e compostos aromáticos. As hexoses, dissacarídeos e trissacarídeos são comumente utilizados pelas leveduras, entretanto polissacarídeos como amido e inulina são utilizados por poucas espécies (PHAFF, 1984).

A utilização destes compostos pelas leveduras é altamente seletiva e está frequentemente relacionada à especificidade do nicho, já que a maioria deles são produtos metabólicos de espécies particulares de plantas, ou ainda, compostos resultantes da degradação destas plantas por bactérias e fungos filamentosos.

Inicialmente, os estudos sobre substratos foram direcionados para produtos alimentícios submetidos à deterioração e ao estudo das chamadas "leveduras selvagens" que algumas vezes invadiam os processos industriais, tais como a fermentação do vinho e saquê, e a produção de cerveja, onde estas leveduras causavam alterações indesejáveis.

Recentemente, inúmeros estudos sobre outros substratos capazes de manter o crescimento de leveduras têm revelado que na natureza, as leveduras ou grupos de espécies têm habitats altamente especializados, o que torna possível o isolamento de leveduras específicas provenientes de substratos apropriados e em áreas geográficas onde estes substratos se encontram (PHAFF, 1986).

As leveduras geralmente vivem como saprófitas e são amplamente isoladas de folhas, flores, frutos, grãos de cereais, alimentos e exsudatos açucarados. São encontradas no solo, podendo também ser isoladas do ar, de água doce ou salgada, da superfície externa ou do

intestino de animais, incluindo insetos. Estes, juntamente com o vento e correntes de água, encarregam-se da disseminação do grupo (PHAFF, 1990).

Não é surpreendente que plantas, com sua habilidade fotossintética de produzir não somente açúcares simples e polissacarídeos, mas numerosos compostos de carbono, ofereçam uma grande variedade de substratos para o crescimento de leveduras. As plantas também oferecem os sais minerais necessários obtidos do solo bem como micronutrientes e vitaminas.

A superfície de folhas constitui um importante nicho para as leveduras pois é aí que ocorre a síntese de carboidratos através da fotossíntese. Leveduras não fermentativas são bastante comuns neste habitat como *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e espécies de *Candida* não fermentativas. Espécies fermentativas, algumas vezes estão associadas à exsudatos açucarados de folhas senescentes como por exemplo, *Torulaspora delbrueckii* e *Kluyveromyces thermotolerans*. Neste caso, o solo pode ser fonte de outras espécies de leveduras que irão colonizar folhas e também frutos caídos no solo (senescentes) (PHAFF & STARMER, 1987).

Algumas espécies de árvores têm a tendência de exsudar resinas a partir de lesões onde ocorrem vários microrganismos, incluindo leveduras. Algumas leveduras foram isoladas exclusivamente destes exsudatos como *Nadsonia elongata*, *Phaffia rhodozyma*, *Pichia pastoris*, *P. chambardii*, *P. rhodanensis*, *P. strasburgensis* dentre outras espécies (LACHANCE *et alii*, 1982). Outro habitat rico em leveduras altamente especializado é o tecido necrótico de cactus onde são encontradas *Pichia cactophila*, *P. kluyveri* dentre outras (STARMER *et alii*, 1982; STARMER & PHAFF, 1983; LACHANCE *et alii*, 1988).

Leveduras não representam uma entidade taxonômica natural. São fungos predominantemente unicelulares que possuem reprodução vegetativa por brotamento ou fissão e se encontram distribuídas nas classes Ascomycotina, Basidiomycotina e Deuteromycotina do reino Eumycota (Fungi), conforme apresentado na figura 2.

As leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas, ditas perfeitas ou teleomórficas, produzem esporos e apresentam ciclo sexual já descrito, enquanto as leveduras deuteromicéticas, também

conhecidas como imperfeitas ou anamórficas, não possuem ciclo sexual conhecido (KREGER-VAN RIJ, 1984; KURTZMAN, 1988; PHAFF, 1990). Atualmente, existem cerca de 550 espécies de leveduras descritas (BARNETT, *et alii*, 1990).

---

|                 |                          |
|-----------------|--------------------------|
| Ascomycotina    |                          |
| Hemiascomycetes |                          |
| Endomycetales   | Spermophthoraceae        |
|                 | Saccharomycetaceae       |
| Basidiomycotina |                          |
| Ustilaginales   | Filobasidiaceae          |
|                 | leveduras com teliosporo |
|                 |                          |
| Tremellales     | Sirobasidiaceae          |
|                 | Tremellaceae             |
| Deuteromycotina |                          |
| Blastomycetes   | Cryptococcaceae          |
|                 | Sporobolomycetaceae      |

---

Fonte: KREGER VAN RIJ (1984).

**Figura 2:** Classificação das leveduras no reino Eumycota

O primeiro esquema de classificação completo e acessível de leveduras esporulantes foi preparado por STELLING-DEKKER em 1931. Subsequentemente, LODDER em 1934 e DIDDENS & LODDER em 1941 publicaram estudos a respeito de leveduras não esporuladas. Em 1952, LODDER & KREGER-VAN RIJ escreveram a mais extensa publicação sobre taxonomia de leveduras, revisada por LODDER (1970) e KREGER-VAN RIJ (1984) e uma nova edição está sendo preparada por KURTZMAN & FELL (comunicação pessoal). O estudo sobre taxonomia de leveduras publicado por BARNETT *et alii* em 1983 e revisado em 1990, traz a descrição sistemática das espécies acompanhada de fotomicrografias. Em 1987, foi editado um programa de identificação de leveduras, para computadores, baseado nas publicações de BARNETT *et alii* (1983).

Muitas leveduras, embora não todas, são caracterizadas pela reprodução sexual envolvendo uma alternância de gerações com a formação de células características nas quais ocorre a meiose (divisão reducional). Nas leveduras ascosporogênicas, a meiose ocorre no asco dando origem a uma geração haplóide designada ascósporo.s, enquanto nas leveduras basidiosporogênicas, a meiose ocorre no basídio com formação dos chamados basidiosporos.

As leveduras ascomicéticas podem ser homotáticas ou heterotáticas, isto é, apresentarem um genoma igual em todas as células ou não, respectivamente. E as leveduras podem apresentar-se na forma vegetativa como haplóide possuindo metade dos cromossomas característicos da espécie ( $n$ ) ou como diplóide ( $2n$ ).

Em linhagens haplóides ocorre fusão de duas células vegetativas para a formação do zigoto, enquanto nas linhagens diplóides, ocorre meiose seguida da conjugação entre ascósporo.s num mesmo asco (célula diferenciada). Nas linhagens homotáticas, a formação do zigoto ocorre pela conjugação de ascósporo.s do mesmo indivíduo, enquanto em linhagens heterotáticas só ocorre formação de zigoto após o pareamento de duas linhagens “mating type” compatíveis.

A classificação das leveduras ascomicéticas é apresentada na figura 3, as quais compreendem a maioria dos gêneros já descritos.

Leveduras são tradicionalmente caracterizadas, identificadas e classificadas através de características morfológicas e fisiológicas. Para a identificação específica, estudos bioquímicos e de exigências nutricionais são mais relevantes que traços morfológicos e sexuais, os quais são importantes na determinação genérica.

Dentre as características morfológicas utilizadas podemos citar: morfologia das células vegetativas; tipo de reprodução vegetativa; morfologia da colônia em meio sólido: cor, textura, brilho, etc; característica de crescimento em meio líquido: formação de película, anel e/ou sedimento; esporulação: presença de asco ou basídio, forma destas estruturas, forma e número de esporos; presença ou ausência de conjugação; formação de pseudomicélio e/ou micélio verdadeiro; e formação de balistosporos.

|                    |                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Spermophthoraceae  |                           | <i>Coccidiascus</i><br><i>Metschnikowia</i><br><i>Nematospora</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Saccharomycetaceae | Schizosaccharomycetoideae | <i>Schizosaccharomyces</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                    | Nadsonioideae             | <i>Hanseniaspora</i><br><i>Nadsonia</i><br><i>Saccharomycodes</i><br><i>Wickerhamia</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                    | Lipomycetoideae           | <i>Lipomyces</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                    | Saccharomycetoideae       | <i>Ambrosiozyma</i><br><i>Arthroascus</i><br><i>Citeromyces</i><br><b><i>Clavispora</i></b><br><i>Cyniclomyces</i><br><i>Debaryomyces</i><br><i>Dekkera</i><br><i>Guilhermondella</i><br><i>Hansenula</i><br><i>Issatchenkia</i><br><b><i>Kluyveromyces</i></b><br><i>Lodderomyces</i><br><i>Pachysolen</i><br><i>Pachytichospora</i><br><b><i>Pichia</i></b><br><i>Saccharomyces</i><br><i>Schwanniomyces</i><br><i>Sporopachydermia</i><br><i>Stephanoascus</i><br><i>Torulaspora</i><br><i>Wickernamiella</i><br><i>Wingea</i><br><i>Zygosaccharomyces</i> |

Fonte: KREGER VAN RIJ (1984).

**Figura 3:** Classificação de leveduras ascosporogênicas

Na realidade, a identificação de leveduras difere enormemente dos parâmetros utilizados para fungos filamentosos, devido à escassez de critérios morfológicos. As leveduras são diferenciadas em grande parte por suas características fisiológicas de maneira semelhante à taxonomia de bactérias.

Segundo KREGER VAN RIJ (1984), a descrição padrão de uma espécie de levedura fornece as características pelas quais ela é identificada. Estas características são em geral similares para todas as espécies. O valor taxonômico dos caracteres descritivos depende (1) de sua capacidade de diferenciar e (2) de sua constância.

As propriedades fisiológicas utilizadas na identificação são: a utilização de fontes de carbono e nitrogênio; requerimento de vitaminas; crescimento a elevadas temperaturas e em meios com alta concentração de açúcares ou cloreto de sódio; a formação de metabólitos típicos e a susceptibilidade a certas drogas como cicloheximida.

A habilidade para fermentar açúcares varia entre as espécies de leveduras. Por exemplo, os gêneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulospora* e *Zygosaccharomyces* são caracterizados pela fermentação vigorosa da glicose, enquanto outros gêneros como: *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Sterigmatomyces* são estritamente não fermentativos. Encontramos ainda, dentro de um mesmo gênero, como *Candida*, espécies fermentativas e não fermentativas.

As leveduras podem ainda assimilar, através do metabolismo oxidativo, um grande número de fontes de carbono orgânico. Alguns açúcares simples como glicose, frutose e manose são assimilados por todas as espécies estudadas, enquanto que alguns oligossacarídeos, polissacarídeos, álcoois primários, polióis, ácidos orgânicos, pentoses, tetroses, hidrocarbonetos e lipídeos são utilizados seletivamente por algumas espécies (PHAFF, 1990).

As leveduras são capazes de utilizar diversas fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio como amônia, nitrato, nitrito, aminas ou alguns aminoácidos. Muitos gêneros são caracterizados pela incapacidade de utilizar nitrato como *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Debaryomyces*, enquanto que nos gêneros *Hansenula*, *Pachysolen*, *Citeromyces* e *Wickerhamiella* todas as espécies utilizam o nitrato. Entre as leveduras imperfeitas podem ocorrer linhagens

nitrato-positivo e nitrato-negativo como nos gêneros *Candida* e *Trichosporon* (VAN DER WALT & YARROW, 1984).

Além dos testes de assimilação e fermentação, a descrição-padrão das espécies inclui outros critérios de importância geral e outros que são úteis somente para certos grupos ou gêneros. A descrição-padrão de todas as espécies inclui: crescimento em meio sem vitaminas (VFB), crescimento a 37°C, crescimento em 50% de glicose ou em 10% de NaCl. O teste de coloração de Diazonium blue B (DBB) e o teste de urease são utilizados também na descrição-padrão e são importantes para a distinção entre leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas. Leveduras que hidrolisam uréia e têm um resultado positivo para o teste de DBB são leveduras basidiomicéticas ou seus anamorfos.

Outros critérios encontrados na descrição-padrão de importância secundária são: produção de compostos amilóides extracelulares, produção de ácido a partir de glicose e resistência a cicloheximida.

A sistemática e caracterização das leveduras estão em constante alteração, através da descoberta de novos gêneros e espécies e também através da descoberta das formas sexuadas de alguns fungos imperfeitos.

Hoje, técnicas modernas de quimiotaxonomia, como análises químicas dos componentes celulares, hibridização de DNA, ribotipagem, entre outros, auxiliam na busca de uma classificação mais natural, baseada na filogenia.

Ao invés de observarmos apenas caracteres morfológicos, fisiológicos e comportamento em cultura, é possível estudar a origem molecular dos fenômenos observados e determinar as relações filogenéticas dos organismos utilizando caracteres relativamente conservados (proteínas, RNA ribossômico). Os microrganismos são identificados na prática pelas diferenças entre seus fenótipos que são expressões do genótipo.

Diversos métodos atualmente podem ser utilizados para a investigação direta da informação taxonômica a nível genotípico como, por exemplo, através da análise de sequências

gênicas do DNA e polimorfismos (RFLP). Algumas destas técnicas possibilitam diferenciar linhagens a nível de gênero ou espécies, outras discriminam organismos a nível subespecífico ou mesmo supragenérico. O grau de especificidade da análise depende da metodologia empregada e do grau de conservação da região genômica analisada.

Segundo MEYER (1991), a taxonomia molecular de leveduras fornecerá as informações necessárias para a descoberta e avaliação de parentescos e para a determinação de agrupamentos naturais. O conhecimento do parentesco genético entre linhagens e espécies, obtido por técnicas de reassociação de DNA e eletroforese de proteínas resultará numa maior compreensão da evolução das leveduras e propiciará uma taxonomia geneticamente relacionada.

Algumas técnicas de taxonomia molecular de leveduras utilizadas atualmente, são: conteúdo de guanina e citosina do DNA nuclear (% G + C) (NAKASE & KOMAGATA, 1970; NAKASE & KOMAGATA, 1971), homologia de DNA (PRICE *et alii*, 1978; SMITH *et alii*, 1990); análise do RNA ribossomal (YAMADA *et alii*, 1989; LACHANCE, 1989; YAMADA *et alii*, 1989; YAMADA *et alii*, 1990a; YAMADA *et alii*, 1990b; FELL & KURTZMAN, 1990; KURTZMAN & ROBNETT, 1991; KURTZMAN, 1993), determinação da sequência de aminoácidos de enzimas (SMITH *et alii*, 1990), eletroforese de proteínas (VANCANNEYT *et alii*, 1991; GUILLAMÓN *et alii*, 1993), análises de ácidos graxos da parede celular (COTTRELL *et alii*, 1985; KOCK *et alii*, 1985; KOCK *et alii*, 1986; BRONDZ *et alii*, 1989; AUGUSTYN *et alii*, 1990; BENDOVÁ *et alii*, 1991; BOTHÁ *et alii*, 1993) e determinação do tipo de coenzima-Q (YAMADA *et alii*, 1973a; YAMADA *et alii*, 1973b; YAMADA *et alii*, 1976).

KURTZMAN & PHAFF (1987) em uma revisão da composição de DNA de leveduras, mencionaram que leveduras ascomicéticas apresentam uma percentagem de G + C abaixo de 50% (entre 27 - 50%), enquanto as basidiomicéticas acima deste valor (entre 50 e 70%). A determinação da composição das bases do DNA é valiosa na descrição de novas espécies de leveduras. O conteúdo de G + C entre espécies de um mesmo gênero geralmente apresenta uma variação de 10%.

Os estudos de homologia rRNA-DNA têm-se mostrados fundamentais para demonstrar distâncias intergenéricas e relações mais distantes entre espécies de leveduras devido ao alto grau de conservação das sequências de DNA que codificam o rRNA. Gêneros, famílias e, possivelmente, ordens de leveduras têm sido definidas pela homologia da subunidade 25S rRNA e características fenotípicas correlacionadas (OLSEN, 1990)

Algumas metodologias de “DNA fingerprinting” (identificação de sequências genômicas) envolvem o uso de sondas para a detecção de polimorfismos genéticos ou sequências que ocorrem em múltiplas cópias no genoma (sequências repetidas, sequências de inserção ou sequências palindrômicas).

As técnicas moleculares mais modernas de caracterização de microrganismos envolvem o uso de PCR, reação em cadeia da polimerase. PCR consiste em uma reação enzimática de polimerização do DNA, a qual é conduzida durante vários ciclos, duplicando sequências alvo de DNA. A reação utiliza “primers” (oligonucleotídeos sintéticos) complementares a regiões das extremidades da sequência de DNA alvo. O ciclo padrão de PCR consiste de: 1) desnaturação térmica do DNA alvo; 2) anelamento dos “primers” às sequências de flanco sob temperatura controlada (especificidade); 3) polimerização de novas fitas de DNA complementares pela enzima *Taq* DNA polimerase; e 4) desnaturação dos duplexos recém-formados, retornando à primeira etapa do ciclo. As sequências de DNA alvo são duplicadas a cada ciclo, resultando na síntese exponencial de novas cópias após cada ciclo (amplificação).

A metodologia de RAPD (DNA polimórfico amplificado com “primers” aleatórios) é uma variação da metodologia clássica de PCR que oferece grande potencial para a caracterização molecular de linhagens de microrganismos. As reações de RAPD são bastante rápidas e fáceis de serem preparadas, eliminando a necessidade de purificação extensiva de DNA, o qual é extraído de colônias através do método de lise rápida. Apenas um “primer” é utilizado para as reações de PCR, e os fragmentos amplificados são de baixo peso molecular, correspondendo a sequências cujas extremidades apresentam maior homologia com o “primer”.

Os produtos de amplificação de RAPD são visualizados por eletroforese em gel de agarose corados com brometo de etídio. A presença de perfis semelhantes de bandas de amplificação reflete similaridades genômicas e, conseqüentemente, fortes indícios de identidade entre linhagens-espécies, o que deve ser comprovado repetindo-se a reação com outros “primers”, comparando outras regiões do genoma. (LEHMANN *et alii*, 1992). A análise de perfis de RAPD permite a tipificação de linhagens dentro de uma mesma espécie com precisão e rapidez maior que em outras técnicas de homologia de DNA.

A determinação do tipo de Coenzima-Q permite a separação entre gêneros de leveduras. Geralmente, espécies de um mesmo gênero de leveduras têm o mesmo sistema Q, mas existem exceção no gênero *Pichia* (OLSEN, 1990). A coenzima-Q varia de acordo com o tamanho da cadeia (número de unidades isopreno) de Q<sub>6</sub> a Q<sub>10</sub>, e são conhecidas como ubiquinonas, devido à sua presença nas células de animais e microrganismos. A coenzima-Q funciona comoceptor de elétrons na cadeia respiratória recuperando o poder redutor das flavoproteínas.

PHAFF (1984) indica que os estudos do sistema de Coenzima-Q de leveduras asporogênicas são úteis na correlação de leveduras imperfeitas com certos grupos de gêneros de leveduras perfeitas. A apresentação de variações quanto ao tipo de coenzima-Q presente no gênero *Pichia* pode significar que espécies atípicas deste gênero têm uma afinidade próxima a espécies de outros gêneros.

O alto poder de resolução da técnica de eletroforese combinada com análises computacionais de perfis de proteínas têm sido usados com sucesso na identificação de bactérias. É uma ferramenta prática e útil para a seleção de múltiplos isolados para identificação e para verificar a autenticidade de linhagens quando padrões de referência são disponíveis (PRIEST & AUSTIN, 1993).

VAN VUUREN & VAN DER MEER (1987) e GUILLAMÓN *et alii* (1993) realizaram estudos de identificação de linhagens de *Saccharomyces* utilizadas na indústria vinícola empregando a técnica de eletroforese de proteínas totais. VANCANNEYT *et alii* (1991) realizaram SDS-PAGE para a tipificação de espécies e linhagens de *Candida*. As leveduras

intimamente relacionadas podem ser distinguidas (“fingerprinting”) de acordo com seus perfis de bandas e agrupadas em “clusters” por análise numérica computacional dos eletroforogramas.

Segundo OLSEN (1990) deve-se intensificar o uso de métodos quimiotaxonômicos na classificação e identificação de leveduras, uma vez que eles proporcionam critérios precisos, reprodutíveis e objetivos para a sistemática de leveduras.

Microbiologistas estudaram a taxonomia de leveduras por todo um século, mas apesar do considerável progresso, a tarefa de desenvolvimento de um sistema de classificação ideal está longe de ser completada. Identificações fidedignas são necessárias para propiciar tratamentos adequados de infecções, para entender as interações de espécies na natureza e para a seleção de organismos adequados para a produção de alimentos e fermentação industrial. Se um esquema de classificação fidedigno pudesse ser desenvolvido tendo sua base na filogenia, então a classificação assumiria uma importância adicional, porque permitiria prever similaridades genéticas, incluindo vias metabólicas e mecanismos de controle destas vias. Tal sistema filogenético seria de particular interesse para biotecnologistas, que têm a necessidade de combinar diversas capacidades metabólicas e, se estas habilidades estivessem estreitamente relacionadas às espécies, sua chance de integração e expressão em um único organismo seria muito maior (KURTZMAN, 1988).

As características obtidas partir de metodologias tradicionais ou moleculares resultam na identificação através do emprego de chaves dicotômicas descritas nos manuais de classificação (KREGER VANRIJ, 1984 e BARNETT *et alii*, 1983) ou através da taxonomia numérica que apresenta a vantagem de conferir grau de importância igual para todas as características.

A taxonomia numérica ou a classificação com o auxílio do computador é a classificação por métodos numéricos das unidades taxonômicas (linhagens) em taxa baseada em caracteres compartilhados (SNEATH & SOKAL citado por GOODFELLOW, 1985). O objetivo primário é agrupar as linhagens individuais em grupos homogêneos usando um grande número de dados fenotípicos que vão desde características morfológicas até propriedades bioquímicas e

fisiológicas. Muitos métodos, compreendendo técnicas hierárquicas e não-hierárquicas podem ser utilizadas para analisar os dados derivados dos estudos de taxonomia numérica.

Os métodos hierárquicos são geralmente mais utilizados devido a sua simplicidade e a facilidade com que os dados são manipulados por programas computacionais simplificados. A primeira etapa nestes métodos é o cálculo das similaridades e diferenças entre as linhagens, as unidades operacionais taxonômicas ("operational taxonomic units" - OTUs), usando coeficientes de similaridade. Vários coeficientes podem ser calculados como Jaccard ( $S_J$ ), "simple matching" ( $S_{SM}$ ), "Euclidean distance" ( $d$ ), "Gower" ( $S_G$ ) e "pattern difference" ( $D_P$ ) (SACKIN & JONES, 1993; GOODFELLOW, 1995). Os grupamentos resultantes da taxonomia numérica, ou taxospecies, são definidos por agrupamento em função dos valores de similaridade pela análise de "clusters" e são representados em dendogramas.

Os "clusters" taxonômicos são representações imparciais de relações naturais entre as linhagens, embora a composição do grupo possa ser influenciada pela escolha das linhagens e testes, procedimentos experimentais, a taxa de erro inerente de cada teste e o método estatístico utilizado (GOODFELLOW, 1995). Por isso, a taxonomia numérica precisa ser complementada por informações obtidas a partir de outros métodos taxonômicos como técnicas quimiotaxonômicas e moleculares.

Os dados fenéticos numéricos são frequentemente armazenados e manipulados por sistemas computacionais através de softwares especializados (CLUSTAN, MVSP, NTSYS, TAXON, X; CANHOS *et alii*, 1993; SACKIN & JONES, 1993; CHUN, 1995) e precisam ser baseados em um elevado número de OTUs e caracteres.

## 2.6. Leveduras Associadas às Agaves

LACHANCE (1995), estudando as comunidades de leveduras associadas à fermentação natural de tequila (*Agave tequilana*) no México, identificou 7 espécies de *Candida* dentre elas, *C. guilhermondii*, 5 biotipos de *Kluyveromyces marxianus*, baseado na presença e forma dos ascósporos e utilização de  $\beta$ -glicosídeos; 4 biotipos de *Torulaspora delbrueckii*; 3 biotipos de *Pichia membranefaciens* e várias outras espécies de leveduras, dentre as quais descreveu uma nova espécie, *Metschnikowia agaveae* (LACHANCE, 1993b).

Num tipo peculiar de “podridão” que se desenvolve na base das folhas de agave as espécies dominantes foram *Clavispora lusitaniae* e *Metschnikowia agaveae*, além de *Candida guilhermondii*, *K. marxianus*, *Rhodotorula* spp. e *Pichia membranaefaciens* (LACHANCE, 1993b).

As espécies de leveduras do suco de agave fresco, aquelas associadas ao equipamento de “crushing” (esmagamento) e as linhagens isoladas do mosto cozido compreenderam uma biota bastante similar sendo dominada por *Schizosaccharomyces pombe* e em menor número por *K. marxianus* no mosto cozido, enquanto nas etapas anteriores havia uma maior diversificação com a presença de algumas espécies como *T. delbrueckii*, *Hanseniaspora* sp. e linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (LACHANCE, 1995).

Na fermentação, propriamente dita, encontrou-se um predomínio de *Saccharomyces cerevisiae*, porém espécies de *T. delbrueckii*, *Hanseniaspora* e *Brettanomyces* também estavam presentes. (LACHANCE, 1995).

Das espécies de leveduras encontradas por LACHANCE (1995) associadas a fermentação natural de tequila, isto é, associada a planta agave, somente *Candida guilhermondii* e *Kluyveromyces marxianus* são capazes de hidrolisar inulina.

Segundo os estudos de LACHANCE (1993 e 1995), a espécie *Kluyveromyces marxianus* está presente nos vários pontos da fabricação de tequila e as leveduras da podridão do agave são

claramente distintas das que estão presentes em outras etapas de fabricação da tequila. Os maiores componentes desta comunidade *Clavispora lusitaniae*, *Metschnikowia agaveae* e *Candida guilhermondii* compartilham características comuns de serem moderadamente fermentativas e de utilizarem um relativamente grande número de compostos como fonte de carbono. Em particular, todas as três espécies crescem bem em hexadecanos, sugerindo a possibilidade que as ceras de agave e outros lipídeos possam ser importantes fatores na definição da composição desta microflora.

TANIS (1990) estudou a utilização de agave para a produção de xarope de frutose e sugeriu a ocorrência natural de *Kluyveromyces marxianus* como o agente da fermentação de suco de agave para a produção de tequila. A autora comparou a hidrólise ácida e enzimática do extrato de agave e propôs a utilização de agave como fonte de inulina e da levedura imobilizada para a produção de xaropes com alto teor de frutose como atividade econômica viável para o México.

GUEGUEN *et alii* (1994) estudaram uma linhagem de *Candida entomophila* isolada a partir de suco de agave fermentado com atividade de  $\beta$ -glicosidase. Esta levedura apresenta potencial para a produção de compostos aromatizantes que têm aplicação principalmente nas indústrias de vinhos e sucos de frutas. Mais recentemente, outra levedura *Zygosaccharomyces bailii* também isolada de suco de agave fermentado foi investigada para a produção de  $\beta$ -glicosidase pelo mesmo grupo de pesquisadores (GUEGUEN *et alii*, 1995)

## 2.7. Isolamento e Seleção de Microrganismos Inulolíticos

O isolamento de microrganismos produtores de inulinases tem sido feito comumente em amostras de solo coletado ao redor das raízes (rizosfera) e do material em decomposição de plantas da família Compositae ricas em inulina (VANDAMME & DERYCKE, 1983). VULLO *et alii* (1991) procederam o isolamento de bactérias produtoras de inulinases a partir de amostras do solo da rizosfera e material em decomposição de plantas da família Compositae: dália e dente-

de-leão (“dandelion”) em diferentes regiões da Argentina e de *Vernonia herbacea* no Brasil, na qual a inulina representa 50% do peso seco da planta.

Além do isolamento de microrganismos da natureza, vários trabalhos selecionam leveduras com atividade inulolítica a partir de linhagens de coleções de culturas (ROUWENHORST, *et alii*, 1988; MANZONI & CAVAZZONI, 1988; HERMAN & GUIRAUD, 1990; GUPTA, *et alii*, 1994 e PASSADOR-GURGEL *et alii*, 1996). FUCHS *et alii*(1985) faz uma revisão de várias bactérias e leveduras produtoras de inulinases citados na literatura (Anexo 1)

Os procedimentos de “screening” são baseados na utilização de inulina como única fonte de carbono. ALLAIS *et alii* (1988) utilizaram técnicas de enriquecimento das amostras de solo através de tratamento com solução de inulina por um período de duas semanas.

Existem poucos estudos sistemáticos sobre as condições de cultivo de organismos produtores de inulinases, com exceção de investigações sobre assimilação de fontes de carbono. VANDAMME & DERYCKE (1983) esclarecem alguns pontos sobre o requerimento de nitrogênio e íons metálicos, condições de pH, temperatura e outros fatores importantes na produção destas enzimas. ROUWENHORST *et alii* (1990) sugerem a importância das condições de cultivo na seleção de linhagens de *Kluyveromyces marxianus* como pH, temperatura e aeração. Em vários estudos, tem-se procurado microrganismos capazes de produzir enzimas termoestáveis (ROUWENHORST *et alii*, 1988; VULLO *et alii*, 1991; DRENT & GOTTSCHAL, 1991).

## 2.8. Metodologias de Microvolumes em Microbiologia

Os procedimentos convencionais para a triagem microrganismos exigem uma grande demanda de trabalho, tempo e material o que dificulta a manipulação de grande número de isolados.

Nas últimas décadas, vem-se aperfeiçoando técnicas simples, rápidas e automatizadas para a rotina microbiológica tais como “kits” para a identificação de microrganismos e determinação de resistência a antibióticos, dentre outros.

A utilização de microplacas para testes de identificação bacteriana vem sendo intensificada nos últimos anos através do sistema “Biolog” (BOCHNER, 1989). Os autores CARNAHAN *et alii* (1989) utilizaram o sistema Biolog para a identificação de linhagens de *Aeromonas* através da determinação do perfil de oxidação de diferentes fontes de carbono.

QUEROL *et alii* (1992) compara diferentes métodos para a identificação de leveduras. LIN & FUNG (1987) fazem uma revisão dos métodos convencionais e rápidos para a identificação de leveduras.

HEARD & FLEET (1990) empregaram microplacas para simplificar e reduzir os custos na identificação de leveduras, através de testes de assimilação de fontes de carbono, nitrogênio, de resistência a cicloheximida, de crescimento em meio sem vitaminas, etc.

PICK (1986) e KUENG *et alii* (1989) utilizaram microplacas para monitorar a atividade de macrófagos e quantificar culturas de células, respectivamente.

O estudo de enzimas microbianas e suas aplicações biocatalíticas é essencial para o desenvolvimento da biotecnologia (CHEETHAM, 1987), e, para tanto, é fundamental o “screening” de novos agentes biocatalíticos aproveitando a biodiversidade natural.

A procura de novas enzimas e novos microrganismos tem por objetivo, não apenas a obtenção de elevadas atividades ou de linhagens com alta produtividade, mas também a busca de características qualitativas, tais como, a relação atividade/crescimento, tolerância ou estabilidade em condições definidas (pH, temperatura, pressão osmótica, concentração de etanol, etc.). Tais características são importantes, visto que não podem ser facilmente modificadas via genética clássica ou engenharia genética por, geralmente, envolverem vários genes. Para selecionar microrganismos e enzimas com diferentes propriedades, métodos rápidos e com custo e tempo reduzidos são fundamentais.

Leitores automáticos de microplacas ("microtiter readers") acoplados ou não a microprocessadores podem ser utilizados na caracterização e "screening" de microrganismos para diferentes finalidades. A utilização destes equipamentos destaca-se pela praticidade e velocidade com que produz um enorme volume de resultados. O "microtiter reader" é um espectrofotômetro capaz de realizar 96 medidas de absorbância simultaneamente em volumes de aproximadamente 200 µl, utilizando um tempo de aproximadamente 30 segundos.

Estes equipamentos, originalmente desenvolvidos para testes imunológicos através da técnica de ELISA, têm sido adaptados para outras medidas espectrofotométricas. Reações colorimétricas decorrentes de ensaios enzimáticos têm sido realizadas em "MT-Readers (FRYER *et alii*, 1986; CRIBB *et alii*, 1989; FLORINI, 1989)

A técnica de microvolumes em leitores de microplacas para "screening" tem sido recentemente utilizada na triagem de microrganismos para biorremediação (STRONG-GUNDERSON & PALUMBO, 1994; GORDEN *et alii*, 1993) e microrganismos produtores de enzimas (ASHOUR *et alii*, 1987; BUTLER *et alii*, 1988; PASSADOR-GURGEL *et alii*, 1996). Os vários autores atestam as vantagens do sistema "MT-Reader", especialmente, no que refere-se à redução do tempo e custos requeridos para a realização de um número elevado de testes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção das Leveduras Inulolíticas a partir de Agave

##### 3.1.1. Coleta de Amostras

Foram feitas 4 coletas de amostras de extrato (suco) de *Agave sisalana* a partir de folhas verdes, maduras (em decomposição) e resíduos da produção de sisal em locais diferentes conforme descrição na tabela 2. As folhas foram esmagadas (manualmente “batendo” em pedras), passando em moenda ou nas máquinas de desfibramento. Os resíduos de sisal (folhas de agave trituradas) são acumuladas no campo próximo à máquina de desfibramento e permanecem com grandes quantidades de suco que é facilmente liberado pela compressão deste material.

**Tabela 2:** Descrição das coletas de material para o isolamento de leveduras

| Coleta | Local                                                    | Material<br><i>Agave sisalana</i> | Meio (agar)       | Temperatura<br>(°C) |
|--------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|
| 1      | Cachoeiro do Brumado MG -<br>Produção artesanal de sisal | folhas verdes e<br>maduras        | YM Inulina<br>2%  | 30                  |
| 2      | Campinas SP<br>Fazenda IAC                               | folhas verdes e<br>maduras        | YM Inulina<br>2%  | 30, 37              |
| 3      | Sete Lagoas -MG- Cerrado                                 | folhas verdes e<br>maduras        | YNB Inulina<br>1% | 30, 37, 42          |
| 4      | Monteiro -PB<br>Fazenda EMBRAPA                          | folhas verdes 17<br>variedades    | YNB Inulina<br>1% | 37,42,48            |
|        | Monteiro -PB<br>2 fazendas                               | resíduos des-<br>fibramento       | YNB Inulina<br>1% | 37,42,48            |
|        | Cuité - PB<br>3 fazendas                                 | resíduos des-<br>fibramento       | YNB Inulina<br>1% | 37,42,48            |
|        | Barra de Santa Rosa fazenda<br>Sta Celina                | resíduos des-<br>fibramento       | YNB Inulina<br>1% | 37,42,48            |
|        | Barra de Santa Rosa                                      | secagem das fibras                | YNB Inulina<br>1% | 37,42,48            |
|        | Remigio                                                  | secagem das fibras                | YNB Inulina<br>1% | 37,42,48            |

Uma coleta foi feita no estado da Paraíba em três regiões produtoras de sisal. Ao sul do estado na cidade de Monteiro foram obtidas amostras na fazenda experimental da Empresa Brasileira de Agricultura e Pecuária -EMBRAPA - a partir de variedades de *Agave* e em duas outras fazendas particulares durante a etapa de desfibramento (processo manual). Foi feita coleta de amostras na região central do estado em duas cidades: Barra de Santa Rosa e Remígio durante a etapa de secagem das fibras, e em Barra de Santa Rosa também em uma fazenda (Santa Celina), um dos poucos exemplos de desfibramento automático. Na cidade de Cuité, ao norte do estado também foram obtidas amostras de três fazendas durante a etapa de desfibramento que utilizavam o processo manual. A figura 4 mostra os locais de coleta na Paraíba.

Uma outra coleta foi realizada no estado de São Paulo a partir de algumas variedades de *Agave* plantadas na fazenda experimental do Instituto Agrônomo de Campinas -IAC.

Duas outras coletas foram feitas no estado de Minas Gerais: uma em região de produção artesanal de sisal (Cachoeiro do Brumado) próximo à cidade de Ouro Preto e uma em região de cerrado onde algumas plantas de agave com finalidade ornamental foram encontradas, próximo à cidade de Sete Lagoas.

As amostras foram acondicionadas em frascos estéreis e armazenadas em gelo durante o transporte até o laboratório (até 72 horas).

### **3.1.2. Isolamento, Purificação e Preservação**

O isolamento foi feito pelo plaqueamento em superfície, tomando alíquotas de 1 mL de amostra nos meios YM ágar (0,3% de extrato de levedura - DIFCO, 0,3% de extrato de malte - DIFCO, 0,5% de peptona - DIFCO e 2,0% de ágar - DIFCO) e YNB (Yeast Nitrogen Base - DIFCO - 0,67%, 2,0% de ágar) acrescidos de 1,0% de inulina e incubados em diferentes temperaturas (30, 37, 42 e 48°C) conforme indicado na tabela 2.



(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 4:** Plantas de *Agave sisalana* e resíduos da indústria de sisal. (a) Plantação de variedades de *Agave sisalana* - Fazenda Experimental da EMBRAPA; (b) Processo manual de desfibramento das folha de agave (1a. etapa na produção das fibras de sisal); (c) Máquina de desfibramento semi-automática; (d) Acúmulo de resíduos do desfibramento.

Após incubação por até 72 horas, colônias morfologicamente distintas foram assepticamente transferidas para o meio de GYP “Sabouraud” ágar (2,0% de glicose - DIFCO, 0,5% de extrato de levedura, 1,0% de peptona e 2,0% de ágar) em tubo inclinado para manutenção.

Foi feita a purificação das culturas em placas de GYP agar pelo método de estrias de esgotamento, contendo tetraciclina 1% quando necessário. A pureza das culturas foi constatada através do exame microscópico em preparação de lâmina à fresco após crescimento em caldo GYP por 24 horas a 27°C. As culturas puras foram codificadas e encaminhadas para liofilização (método de KIRSOP & SNELL, 1984) e depositadas na Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello.

Estas culturas também foram mantidas por repique e armazenamento a 4°C, em tubos inclinados contendo GYP “Sabouraud” ágar. Estas culturas foram reativadas periodicamente para realização dos testes de identificação e de seleção.

### **3.2. Caracterização Taxonômica**

O estudo taxonômico tradicional das leveduras foi feito utilizando-se a metodologia recomendada por KREGER-VAN RIJ (1984); BARNETT *et alli.* (1983) e BARNETT *et alli.* (1990) que baseia-se em características morfológicas, culturais, fisiológicas e bioquímicas.

As leveduras foram caracterizadas também através de técnica quimiotaxonômica de determinação de quinonas, segundo método modificado de YAMADA *et alli.* (1973a) tomando-se todos os cuidados analíticos.

As características fenotípicas foram analisadas utilizando-se os programas computacionais X (CHUN, 1995) para geração da base de dados e NTSYS (ROHLF, 1992) para análise de similaridade (UPGMA - “unweighed pair group method with arithmetic averages”) utilizando os coeficientes de similaridade “simple matching” e Jaccard e foram

construídos dendogramas para estabelecer as relações de similaridade entre as linhagens estudadas (GOODFELLOW, 1985; PRIEST & AUSTIN, 1993; GOODFELLOW, 1995).

### **3.2.1. Caracterização Morfológica e Cultural**

Os testes de caracterização morfológica e cultural compreenderam as seguintes observações: morfologia das células vegetativas; tipo de reprodução vegetativa; morfologia da colônia em meio sólido: cor, textura, brilho, viscosidade, forma, etc.; característica de crescimento em meio líquido: formação de película, anel e/ou sedimento; esporulação: presença de asco ou basídio, forma destas estruturas, forma e número de ascósporos e basidiósporos; presença ou ausência de conjugação; formação de pseudomicélio ou micélio verdadeiro; formação de balistosporos.

As culturas foram crescidas em GYP caldo a 27°C por 24 horas e o arranjo, forma das células e o tipo da divisão celular foram observados através de análise microscópica em preparações a fresco. Características do crescimento em meio líquido como formação de anel, película e sedimento também foram observados após incubação por 7, 14 e 21 dias.

As características da colônia: coloração, brilho, forma, superfície, margem e elevação foram observadas após crescimento em placas contendo meio GYP ágar a 30°C por 48-72 horas, através de microscópio estereoscópico.

A capacidade de formar pseudomicélios, micélios verdadeiros e artrósporos foi observada através de microscopia óptica, após o crescimento das culturas utilizando a técnica de microcultivo. Esta técnica consiste no inóculo das culturas em placas contendo meio CMA (Corn Meal Agar - DIFCO) na forma de um risco e cobertas com laminulas previamente esterilizadas. As placas foram incubadas a 27°C por 7 dias.

A formação de balistosporos foi verificada utilizando-se a técnica de dois fundos de placas de Petri unidas com fita adesiva, uma contendo meio pobre (CMA) e outra contendo meio rico (GYP ágar). As culturas foram inoculadas no meio CMA e incubadas a 27°C por 3 a

4 semanas, com o meio CMA voltado para a baixo, para que, na presença de balistosporos, estes sejam descarregados no meio GYP ágar e então possam ser observados através do crescimento nas culturas neste último meio.

Para a observação das estruturas de reprodução sexuada, as culturas foram inoculadas nos meios de Acetato ágar (0,5% de acetato de sódio trihidratado - SINTH, 2,0% de ágar, pH= 6,5~7,0), YM ágar e CMA em placas de Petri. Após incubação a 27°C por 5 a 7 dias, foi verificada a produção de esporos, número e forma ao microscópio óptico em preparação a fresco.

### **3.2.2. Caracterização Fisiológica e Bioquímica**

Foi utilizada a técnica de "replica plate" (replicação múltipla) para os testes de assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, resistência a cicloheximida, crescimento em meio sem vitaminas, osmotolerância a 50% de glicose e 10% de cloreto de sódio, produção de ácido a partir de glicose, crescimento a temperatura de 37°C, teste de urease e reação de "Diazonium Blue" B (DBB).

A técnica de "replica plate" consiste na replicação simultânea de 25 linhagens diferentes contidas em uma placa matriz com o auxílio de um multinoculador. Este sistema foi desenvolvido no Laboratório de Taxonomia e Ecologia Microbiana do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro -UFRJ (HAGLER, 1978).

O inóculo utilizado para estes testes foi preparado a partir de culturas crescidas em GYP ágar por 48 horas, que foram transferidas para tubos com YNB (DIFCO) contendo 0,1% de glicose incubados a 27°C por 5 dias para depleção de suas reservas endógenas. Posteriormente, alíquotas de cerca de 0,3 mL desta suspensão celular foram transferidas assepticamente para os orifícios da placa matriz do multinoculador.

A partir desta placa matriz, as culturas foram repicadas em outras placas contendo diferentes meios de cultura estéreis de acordo com o teste realizado. Estas placas foram então incubadas por 21 dias a 27°C em estufa BOD. Foi feita a observação de crescimento com 7, 15 e 21 dias de incubação.

Para o teste de assimilação de compostos de carbono os seguintes compostos foram utilizados: (1) hexoses: glicose, frutose, galactose, L-ramnose; pentoses: D-xilose, L-arabinose e D-ribose; (2) dissacarídeos: sacarose, lactose, maltose, celobiose, trealose e melibiose; (3) trissacarídeos: rafinose e melezitose; (4) polissacarídeos: amido solúvel e inulina; (5) álcoois: eritritol, ribitol, D-manitol e inositol; (6) ácidos orgânicos: ácido cítrico.

Os carboidratos (DIFCO e SIGMA) foram preparados em soluções estoque a 6%, com exceção da rafinose a 12% e esterilizados por filtração em membranas de celulose de 0,22 µm de porosidade (MILLIPORE).

As leveduras foram testadas quanto a capacidade de fermentar diferentes carboidratos. As culturas que demonstraram capacidade em fermentar glicose foram em seguida testadas quanto a capacidade em fermentar: galactose, sacarose, maltose, lactose, rafinose e inulina.

Os testes de fermentação foram feitos em tubos de ensaio 13 X100 mm com tubos de Durham invertidos, contendo 2,0 mL de Meio Basal (0,45% de extrato de levedura, 0,75% de peptona e solução de azul de bromotimol - VETEC até a coloração verde-garrafa) acrescido de 1,0 mL do carboidrato a ser testado. Os tubos foram inoculados com 0,1 mL de uma suspensão celular densa de culturas de 24 horas a 27°C crescidas em GYP ágar preparadas em água estéril. As leituras foram feitas diariamente observando-se a produção de ácido através da mudança de coloração do meio para amarelo e a formação de gás capturado no tubo de Durham. As observações foram feitas por um período máximo de 21 dias.

### 3.2.3. Caracterização Quimiotaxonômica - Determinação de Quinonas

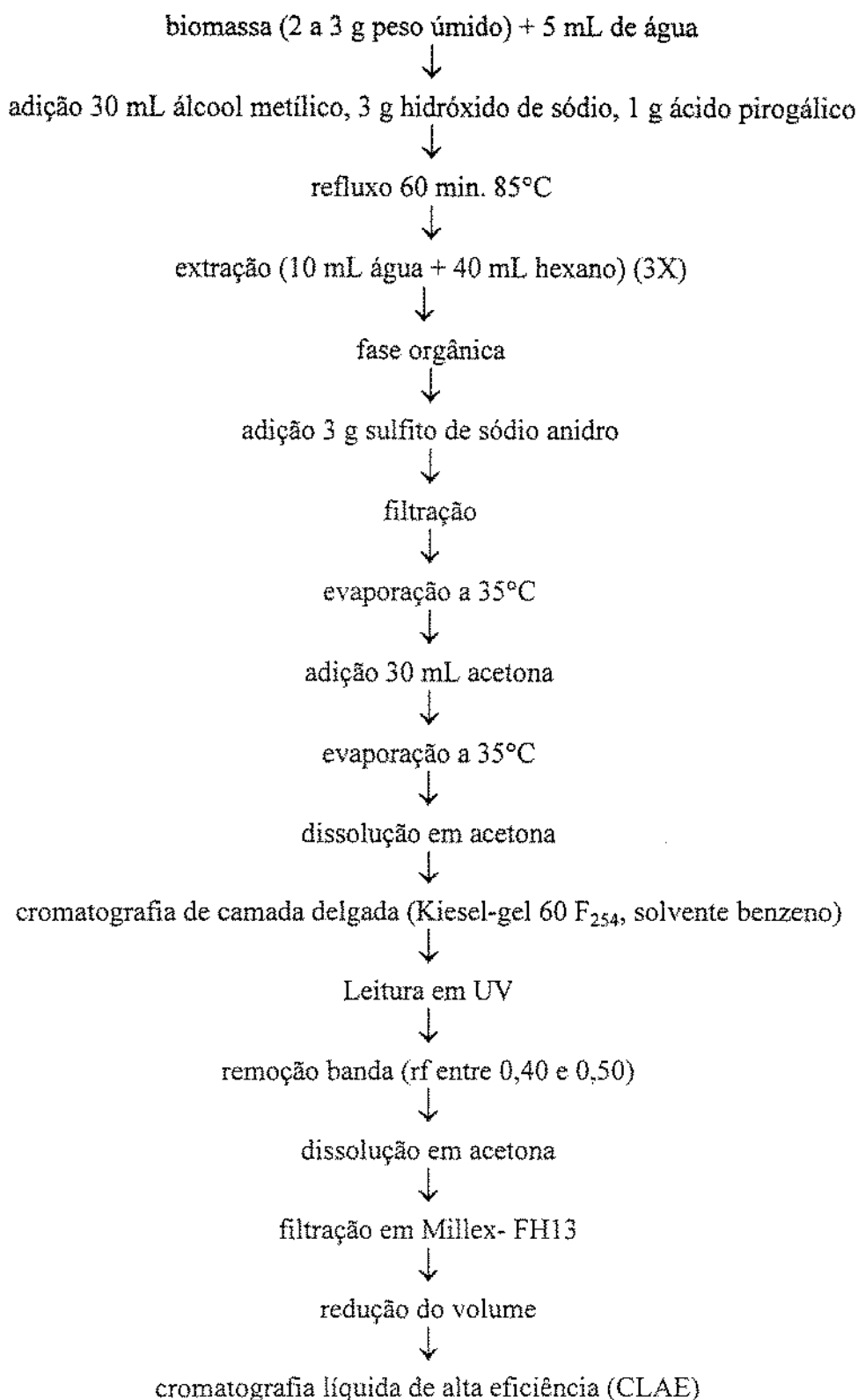
As culturas de leveduras foram cultivadas em 100 mL de YM caldo em frascos erlenmeyer de 250 mL em duplicata sob agitação em incubador rotatório (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC) a 100 rpm a 30°C por 48 horas, utilizando como inóculo 1% de uma cultura de 24 horas cultivada em tubo contendo 5 mL de YM caldo a 30°C.

As células foram centrifugadas e lavadas 3 vezes com água destilada a 8000g por 10 minutos em centrífuga Himac CR21 (HITACHI). Determinou-se o peso úmido e a biomassa obtida foi estocada em freezer.

A figura 5 mostra resumidamente as etapas realizadas para a determinação das quinonas. Os reagentes utilizados (MERCK) possuíam pureza analítica (p.a). ou cromatográfica ("lichrosolv"). Cuidados foram observados quanto a exposição à luz do material durante a execução da análise devido à fotossensibilidade das ubiquinonas.

Para a extração de ubiquinonas, a biomassa obtida (2 a 3 g de peso úmido) foi ressuspensa em 5 mL de água destilada e transferida para um balão para refluxo. Adicionou-se 30 mL de álcool metílico, 3 g de hidróxido de sódio (SINTH) e 1 g de ácido pirogálico (VETEC). Refluxou-se por 60 minutos em banho de água (EYELA SB-11) a 85°C.

A mistura reacional após resfriar à temperatura ambiente foi transferida para um funil de separação, onde procedeu-se a extração das ubiquinonas por meio da adição de 10 mL de água destilada e 40 mL de hexano. Este procedimento foi repetido por 3 vezes, separando-se, após cada adição, a parte aquosa em outro funil de separação, no qual ao término desta etapa adicionou-se 10 mL de água destilada e 40 mL de hexano. Feito isso, desprezou-se a fase aquosa e a fase orgânica foi transferida para o primeiro funil, onde procedeu-se a lavagem por 3 ou 4 vezes com 10 mL de água destilada, desprezando-se sempre a fase aquosa.



**Figura 5:** Esquema utilizado na determinação de quinonas em leveduras

À fase orgânica obtida foram adicionados 3 g de sulfito de sódio anidro (RIEDEL-DE HAEN), o qual foi posteriormente removido por filtração em papel qualitativo Whatman n.1 (MERCK). O extrato orgânico obtido foi evaporado em evaporador rotativo (EYELA) a 35° C. O material obtido foi dissolvido em 30 mL de acetona e evaporado novamente. Procedeu-se a filtração do extrato para remoção de partículas insolúveis em acetona.

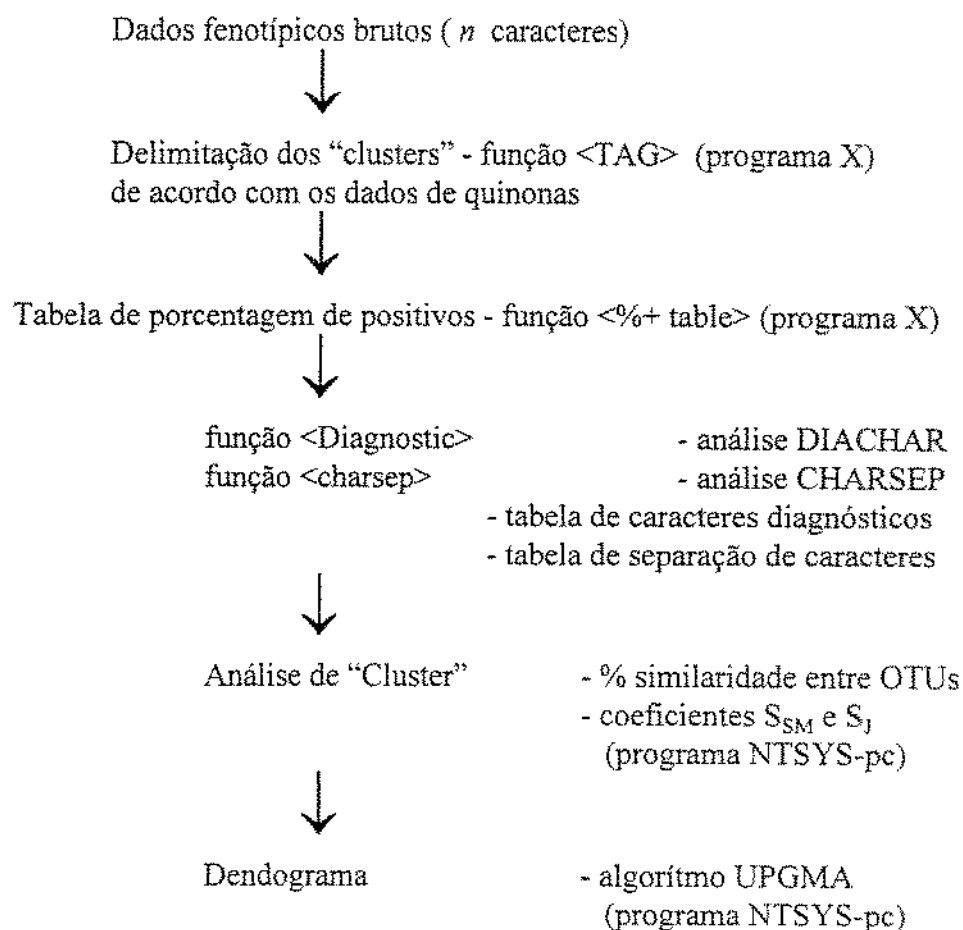
Posteriormente, o material obtido foi dissolvido em acetona e aplicado em placa para cromatografia de camada delgada Kiesel-gel 60 F<sub>254</sub>, espessura de 0,25 mm, dimensões de 10 X 10 cm (MERCK). A cromatografia foi desenvolvida utilizando-se benzeno como solvente. A placa foi seca e as ubiquinonas (rf entre 0,40 e 0,50) foram visualizadas sob luz U.V.

Removeu-se a banda identificada e o material foi dissolvido em acetona e posteriormente, filtrado em Millex - FH 13 (MILLIPORE). O volume da amostra foi reduzido com fluxo de nitrogênio e esta foi estocada em geladeira para subsequente análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Foi utilizado o cromatógrafo a líquido SL-6A System (SHIMADZU) e seguidas as seguintes condições cromatográficas: fase móvel - álcool metílico-álcool isopropílico (3:1 v/v); vazão - 1 mL/min; volume injetado - 1 µL; coluna - ZORBAX ODS, 25 cm X 4,6 mm; detector - U.V. 270 nm. A mistura de padrões utilizada consistiu de ubiquinonas Q<sub>6</sub>, Q<sub>7</sub>, Q<sub>9</sub> e Q<sub>10</sub> (SIGMA), foram utilizadas linhagens de leveduras sabidamente produtoras de um tipo específico de ubiquinona também como referência como *Kluyveromyces marxianus* para Q<sub>6</sub>, *Pichia strasburgensis* para Q<sub>7</sub>; *Pachysolen tannophilus* para Q<sub>8</sub>; e *Candida guilhermondii* para Q<sub>9</sub>. No sistema integrador através do software CHROMATOPAC C-R4A foram processados e armazenados os dados obtidos.

### 3.2.4. Taxonomia Numérica

Os procedimentos utilizados para analisar os dados fenotípicos são apresentados na figura 6. Os dados foram armazenados e analisados utilizando o software X descrito por CHUN (1995). Cinco “testsets” foram definidos para 58 caracteres fenotípicos em morfológicos, culturais, assimilação, fermentação e outras propriedades que incluem testes de resistência a antibiótico, teste de resistência a pressão osmótica, crescimento a 37°C, crescimento em meio sem vitaminas, reação DBB e urease (Anexo 1).



**Figura 6:** Esquema de procedimentos utilizados na análise de dados fenotípicos binários.

Fonte: MANFIO (1995)

Basicamente, os dados foram arranjados em uma matriz de testes “t” por linhagens “n”, os resultados dos testes (“unit characters”) foram codificados em três dígitos e listados em colunas, e as OTUs codificadas em cinco dígitos e listados em fileiras. A tabela contendo os dados binários brutos usados na análise dos caracteres fenotípicos pode ser encontrada no Anexo 2. As unidades taxonômicas (OTUs) e os caracteres foram classificados em “clusters” e “testsets” utilizando as funções de agrupamento do software X.

A análise dos dados fenotípicos foram realizados empregando-se as rotinas de manipulação de dados no software X. O programa permite a seleção (“tagging”) de organismos, “clusters”, testes e “testsets” para análise como é apresentado na figura 7.

A análise de “clusters” foi realizada utilizando o software NTSYS-pc (ROHLF, 1992), empregando os coeficientes “simple matching” e Jaccard. Os dendogramas foram construídos utilizando o algoritmo (UPGMA).

### 3.3. Seleção de Leveduras Inulolíticas

As leveduras isoladas foram testadas no sistema “Microtiter Reader” quanto à capacidade de crescer em inulina em diferentes condições. Foi utilizado o equipamento “Microtiter Reader” 340 ATTC (SLT) acoplado a um microprocessador, utilizando-se o software EASYKIN para armazenamento e manipulação de dados cinéticos.

Foi verificado o crescimento das leveduras em meio basal YNB e em meio complexo YEP (0,2% de peptona, 1,0% de extrato de levedura) acrescidos de 1,0% de inulina (FLUKA) e frutose (REAGEN), ajustados para valores de pH 4,0, 5,0 e 6,0 e incubados em temperaturas de 37, 42 e 45°C.

| <i>- Function modules:</i> |                |              |            |            |                 |           |
|----------------------------|----------------|--------------|------------|------------|-----------------|-----------|
| =                          | VIEW           | NEW          | TAG        | RESULT     | ANALYSIS        | NTSYS     |
| About                      | Matrix         | Matrix       | Organism   | Keyboard   | %+ table        | Run       |
| Editor                     | Organism       | Cluster      | Test       |            | Plus Table      | Export    |
| DOS Shell                  | Test           | Testset      | Cluster    |            | Test Error      | Batch     |
| Quit                       | Cluster        | Test Memo    | Testset    |            | Centrortype     |           |
|                            | Testset        |              |            |            | Charsep         |           |
|                            | Test Memo      |              |            |            | Diagnostic      |           |
|                            |                |              |            |            | Overmat         |           |
|                            |                |              |            |            | HMO             |           |
|                            |                |              |            |            | Identification  |           |
|                            |                |              |            |            | Clustan         |           |
|                            |                |              |            |            | Intracluster    |           |
|                            |                |              |            |            | Strain Activity |           |
| <i>- Functions</i>         |                |              |            |            |                 |           |
| -info, DOS                 | -viewing of    | -addition of | -tagging/  | raw data   | -numerical      | -NTSYS-pc |
| commands,                  | data matrix    | new OTUs,    | definition | input from | analyses        | cluster   |
| ASCII                      | OTUs,          | clusters     | of OTUs,   | keyboard   | functions       | analysis  |
| editor and                 | clusters, unit | unit         | clusters,  |            |                 | functions |
| exit                       | characters,    | characters,  | unit       |            |                 |           |
|                            | testsets and   | testsets and | characters |            |                 |           |
|                            | test names     | test names   | and        |            |                 |           |
|                            |                |              | testsets   |            |                 |           |

Fonte: MANFIO (1995).

**Figura 7:** Menus de funções do software X (CHUN, 1995) usado na análise dos dados fenotípicos

Os meios de cultura foram distribuídos em microplaca estéril (NUNC), 200 µL por "well" (poço), em câmara de fluxo laminar através de pipetador automático multicanal (COSTAR e SLT) apropriado de acordo com a figura 8 apresentada a seguir.

Culturas em YNB com 1% de frutose como fonte de carbono, incubadas por aproximadamente 18 horas a 37°C, foram utilizadas como inóculo. Foram transferidos 20 µL por "well" na microplaca. As microplacas foram incubadas em agitador Vibrax MT4 (IKA) ajustado para velocidade 800 em estufa incubadora (FANEM) em temperatura previamente determinada.

| cultura | 1      | 2   | 3   | 4   | 5      | 6   | 7   | 8   | 9      | 10  | 11  | 12  |
|---------|--------|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|
| A       |        |     |     |     |        |     |     |     |        |     |     |     |
| B       |        |     |     |     |        |     |     |     |        |     |     |     |
| C       |        |     |     |     |        |     |     |     |        |     |     |     |
| D       |        |     |     |     |        |     |     |     |        |     |     |     |
| E       |        |     |     |     |        |     |     |     |        |     |     |     |
| F       |        |     |     |     |        |     |     |     |        |     |     |     |
| G       |        |     |     |     |        |     |     |     |        |     |     |     |
| H       |        |     |     |     |        |     |     |     |        |     |     |     |
|         | FRU    | INU | FRU | INU | FRU    | INU | FRU | INU | FRU    | INU | FRU | INU |
|         | YNB    |     | YEP |     | YNB    |     | YEP |     | YNB    |     | YEP |     |
|         | pH 4,0 |     |     |     | pH 5,0 |     |     |     | pH 6,0 |     |     |     |

**Figura 8:** Diagrama esquemático de distribuição das leveduras em meios YNB e YEP nas microplacas.

Foram feitas leituras de turbidez ( $\lambda = 550$  nm) a intervalos de 1 hora pelo MT-Reader. Foram calculadas as velocidades máxima específica de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) nos diferentes meios como parâmetro para a seleção de linhagens promissoras.

As culturas, selecionadas na primeira etapa ( $\mu_{\text{máx}} > 0,50$  em YNB Inulina pH 4,0 a 37°C), foram novamente avaliadas quanto ao crescimento, exclusivamente em YNB Inulina 1%, em duplicatas em diferentes pHs (pH 4,0; 5,0 e 6,0) e temperaturas (37, 42, 45, 47 e 50°C), alterando-se as condições de obtenção do pré-inóculo.

Primeiramente, as culturas foram crescidas em YNB Glicose 0,5% por 24 horas a 37°C, em seguida, as culturas foram transferidas em YNB Inulina 0,5% por 18 horas a 37°C. Este cultivo foi utilizado como inóculo na microplaca.

O esquema de distribuição das culturas na microplaca é apresentado na figura 9. Foram seguidas as mesmas condições do procedimento descrito previamente, com exceção do intervalo de leitura que foi de 30 minutos.

| cultura | 1      | 2 | 3      | 4 | 5      | 6 | cultura | 7      | 8 | 9      | 10 | 11     | 12 |
|---------|--------|---|--------|---|--------|---|---------|--------|---|--------|----|--------|----|
| A       | A      | A | A      | A | A      | A | I       | I      | I | I      | I  | I      | I  |
| B       |        |   |        |   |        |   | J       |        |   |        |    |        |    |
| C       |        |   |        |   |        |   | L       |        |   |        |    |        |    |
| D       |        |   |        |   |        |   | M       |        |   |        |    |        |    |
| E       |        |   |        |   |        |   | N       |        |   |        |    |        |    |
| F       |        |   |        |   |        |   | O       |        |   |        |    |        |    |
| G       |        |   |        |   |        |   | REF*    |        |   |        |    |        |    |
| H       |        |   |        |   |        |   | BR**    |        |   |        |    |        |    |
|         | pH 4,0 |   | pH 5,0 |   | pH 6,0 |   |         | pH 4,0 |   | pH 5,0 |    | pH 6,0 |    |

\* cultura de referência *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556

\*\* branco controle do experimento

**Figura 9:** Diagrama esquemático de distribuição das leveduras em meio YNB Inulina 1% nas microplacas.

### 3.4. Determinação da Atividade Enzimática

As leveduras selecionadas foram cultivadas em meio YNB inulina 1% a 37°C em incubador rotatório (150 rpm) por 12, 18 e 24 horas. Após a incubação as culturas foram centrifugadas para a separação das células (8000g por 10 minutos). O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra no teste enzimático.

As células das culturas centrifugadas foram tratadas com uma solução de cisteína MERCK) 16 mM preparada em tampão fosfato 0,1M pH 7,0, por uma hora à temperatura ambiente para extração da enzima ligada à parede.

Utilizou-se o teste da Hexoquinase/Glicose-6-fosfodesidrogenase (BEUTLER, 1984) para quantificar a atividade inulolítica das leveduras selecionadas. Os testes enzimáticos foram realizados em duas etapas descritas a seguir:

1a. ETAPA: Reação enzimática

Preparou-se uma solução a 10g/L de inulina em tampão acetato (SINTH) 0,1 M, pH 5,0. Distribuiu-se 800  $\mu$ L desta solução em tubos 13 X 120 mm e colocou-se em banho de água (EYELA SB-11 ou SB-650) ajustado a 50°C, juntando-se após 2-3 minutos 200  $\mu$ L do caldo enzimático. Deixou-se reagir por 30 minutos.

Para cada amostra, preparou-se um branco, fervendo-se o caldo enzimático por 5 minutos. Após este período, procedeu-se a reação com o caldo enzimático inativado, como descrito acima.

2a. ETAPA: Determinação da Glicose/Frutose

Preparou-se uma solução denominada MIX (estoque) constituída por tampão imidazol (MERCK) 200mM, pH 7,6, acrescido de cloreto de magnésio 0,1 g/L, nicotinamida adenina dinucleotídeo - NAD (BOEHRINGER MANNHEIM GmbH) 0,48 g/L e adenosina trifosfato - ATP (BOEHRINGER MANNHEIM GmbH) 2,4 g/L. Esta solução foi utilizada durante o teste diluída 1:3.

Em tubos 13 X 120 mm, foram colocados 2,9 mL de MIX (diluído 1:3) e 0,1 mL de amostra (resultante da 1a. etapa). Fez-se uma primeira leitura em espectrofotômetro (BAUSCH & LOMB SPECTRONIC) a 340 nm, a qual chamamos  $E_0$ .

Os tubos foram colocados em banho de água ajustados a 37°C e acrescidos de 20 $\mu$ L de uma solução de Hexoquinase - HK 280 U/mL (BOEHRINGER MANNHEIM GmbH) e Glicose-6-fosfodesidrogenase - G6P-DH a 180 U/mL (BOEHRINGER MANNHEIM GmbH) preparada em tampão imidazol 200 mM. Procedeu-se a segunda leitura ( $E_1$ ), após quinze minutos de reação. A seguir, adicionou-se : 20 $\mu$ L de uma solução de Fosfoglicoseisomerase -

PGI a 700 U/mL (BOEHRINGER MANNHEIM GmbH). Após quinze minutos de reação, procedeu-se a terceira leitura denominada ( $E_2$ ).

A partir dos valores de absorbância, foram calculadas as concentrações de glicose e frutose, segundo as fórmulas (1) e (2), respectivamente:

$$(1) \quad [G] = \text{amostra } (E_1 - E_0) - \text{branco } (E_1 - E_0)$$

$$(2) \quad [F] = \text{amostra } (E_2 - E_1) - \text{branco } (E_2 - E_1)$$

Uma unidade (U) de atividade enzimática de inulinase foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar um  $\mu\text{mol}$  de frutose por minuto nas condições do teste já descritas.

### 3.5. Determinação do Modo de Ação da Enzima Inulinase

Foi verificado o modo de ação da enzima, isto é, ação exoinulolítica ou endo-inulolítica através da determinação do tipo de produto obtido (frutose - monômero e oligofrutas - oligômeros) após ação da enzima através de cromatografia descendente de papel (CHAPLIN, 1986), utilizando a fase móvel (reagentes MERCK, p.a.): etil acetato:píridina:água na proporção 8:2:1. O papel utilizado foi Whatman número 1 (MERCK) e a revelação envolveu três etapas: 1) solução saturada de nitrato de prata (AVI-CENNA) em acetona; 2) solução alcoólica saturada de hidróxido de sódio (SINTH); 3) solução de tiosulfato de sódio (CARLO ERBA) a 10%; com lavagem nos intervalos com água corrente e posterior secagem em temperatura ambiente.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Isolamento e Preservação das Leveduras

Foi isolado um total de 88 leveduras a partir do suco de *Agave sisalana* em diferentes temperaturas, conforme apresentado na tabela 3. Houve perda de 9 destas, restando 79 isolados os quais foram liofilizados e depositados na Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, em Campinas, S.P.

**Tabela 3:** Código das leveduras isoladas de agave, número de depósito na Coleção de Culturas Tropical e temperatura de isolamento

| Isolado | CCT  | T(°C) | Isolado | CCT  | T(°C) | Isolado | CCT  | T(°C) |
|---------|------|-------|---------|------|-------|---------|------|-------|
| A1      | 3481 | 30    | A40     | 3331 | 42    | A66     | 3356 | 37    |
| A2      | 3487 | 30    | A41     | 3482 | 37    | A67     | 3355 | 37    |
| A3      | 3503 | 30    | A42     | 3511 | 37    | A68     | 3354 | 37    |
| A4      | 3519 | 30    | A43     | 3512 | 37    | A70     | 3352 | 37    |
| A6      | 3524 | 30    | A44     | 3517 | 37    | A71     | 3351 | 37    |
| A7      | 3522 | 30    | A45     | 3506 | 37    | A72     | 3350 | 37    |
| A8      | 3455 | 30    | A46     | 3486 | 37    | A74     | 3348 | 37    |
| A9      | 3525 | 30    | A47     | 3509 | 37    | A75     | 3347 | 37    |
| A10     | 3488 | 30    | A48     | 3510 | 37    | A76     | 3346 | 37    |
| A11     | 3485 | 30    | A49     | 3514 | 37    | A77     | 3345 | 37    |
| A12     | 3484 | 30    | A50     | 3515 | 37    | A78     | 3344 | 37    |
| A13     | 3442 | 30    | A51     | 3483 | 37    | A81     | 3449 | 37    |
| A14     | 3454 | 37    | A52     | 3507 | 37    | A82     | 3307 | 42    |
| A15     | 3453 | 37    | A53     | 3502 | 37    | A87     | 3308 | 42    |
| A17     | 3456 | 30    | A54a    | 3513 | 37    | A88     | 3306 | 42    |
| A19     | 3523 | 37    | A54b    | 3480 | 37    | A90     | 3327 | 42    |
| A20     | 3518 | 37    | A55     | 3508 | 37    | A91     | 3330 | 42    |
| A21b    | 3444 | 30    | A56     | 3504 | 37    | A92     | 3325 | 48    |
| A23     | 3443 | 37    | A57     | 3516 | 37    | A93     | 3326 | 42    |
| A24     | 3450 | 37    | A58     | 3505 | 37    | A94     | 3329 | 42    |
| A26     | 3448 | 37    | A59     | 3373 | 37    | A96     | 3333 | 48    |
| A29     | 3445 | 37    | A60     | 3372 | 37    | A97     | 3332 | 48    |
| A30     | 3446 | 37    | A62     | 3360 | 37    | A100    | 3340 | 48    |
| A32     | 3451 | 37    | A63     | 3359 | 37    | A101a   | 3341 | 48    |
| A33     | 3337 | 42    | A64a    | 3358 | 37    | A101b   | 3374 | 48    |
| A35     | 3334 | 42    | A64b    | 3501 | 37    |         |      |       |
| A39     | 3335 | 42    | A65     | 3357 | 37    |         |      |       |

## 4.2. Identificação das Leveduras Isoladas de Agave

Os resultados obtidos a partir da taxonomia tradicional, isto é, caracterização morfológica e bioquímica, foram semelhantes para a maioria dos isolados, com exceção dos isolados identificados como *Rhodotorula rubra*.

*Rhodotorula* é um gênero de leveduras deuteromicéticas que apresentam pigmento carotenóide vermelho, não fermentativas, reação DBB e urease positivas.

A presença da espécie *Rhodotorula rubra* é esperada, pois esta espécie é encontrada em superfícies de folhas, uma vez que são estritamente oxidativas (PHAFF & STARMER, 1987).

LACHANCE (1993) isolou leveduras pertencentes ao gênero *Rhodotorula* associada à *Agave tequilana* “in natura”.

Não foi possível observar as estruturas relacionadas à reprodução sexuada dos isolados obtidos. Isto pode ser devido ao não isolamento de linhagens compatíveis ou à perda destas linhagens compatíveis pelos repiques sucessivos.

KREGER VAN RIJ (1984) esclarece que a classificação das leveduras ditas imperfeitas, na ausência de caracteres taxonomicamente importantes da reprodução sexual, é deficiente naquele gênero que pode incluir o estado imperfeito de espécies de vários gêneros. A diferenciação entre espécies imperfeitas e gêneros que são análogos a espécies perfeitas é, geralmente, impossível. Estas leveduras que não apresentam reprodução sexual podem ser heterotáticas haplóides para as quais os “mating types” não foram encontrados ou elas podem ser leveduras haplóides ou diplóides com condições desconhecidas de esporulação.

A impossibilidade de observação das características morfológicas associadas à reprodução sexuada dificultou o trabalho de identificação porque estas características são fundamentais para a diferenciação entre gêneros. Inicialmente, utilizou-se a chave dicotômica descrita por KREGER VAN RIJ (1984) baseada apenas em testes bioquímicos.

Os isolados se enquadravam entre as espécies *Kluyveromyces marxianus* e *Pichia strasburgensis*. Aqueles identificados como semelhante a *Kluyveromyces marxianus* foram denominados pelo estado anamórfico *Candida kefir*, e como na literatura, não há descrição de estado anamórfico ou assexual de *Pichia strasburgensis*, os isolados assim identificados, foram denominados *Pichia strasburgensis* "like". No entanto, a identificação não foi conclusiva para vários isolados.

Para tentar solucionar as dificuldades encontradas na taxonomia clássica, procedeu-se a análise do sistema de coenzima Q. Os resultados obtidos pela técnica quimiotaxonômica de determinação de quinonas foram fundamentais para concluir a identificação dos isolados.

Vários autores (YAMADA *et alii*, 1976; KREGER VAN RIJ, 1980; OLSEN, 1990) consideram o tipo de Coenzima-Q como uma característica de valor genérico, isto é, para a diferenciação entre os gêneros de leveduras.

No manual de KREGER VAN RIJ (1984) define-se que as características mais importantes para distinguir entre os vinte e quatro (24) gêneros da sub-família Saccharomycetoideae das leveduras ascomicéticas são a produção de micélio verdadeiro e estrutura de septo; a forma e estrutura dos ascósporos; a liberação dos ascósporos dos ascos; a assimilação de nitrato; o tipo de coenzima-Q; e são consideradas de menor importância o número de esporos no asco; a ploidia das células vegetativas e a capacidade de fermentação.

Os isolados não apresentaram micélio verdadeiro e não assimilaram nitrato, o que os situa entre os doze gêneros desta sub-família que na ausência das características diferenciais relacionadas à forma e liberação do ascósporos, foram diferenciadas pelo tipo de Co-Q apresentado.

De acordo com os resultados obtidos exclusivamente a partir da taxonomia clássica, a espécie *Candida guilhermondii*, estado anamórfico de *Pichia guilhermondii*, não foi identificada. Esta espécie foi diferenciada a partir da determinação de quinonas. Enquanto *Candida kefir* apresenta Q<sub>6</sub>, *C. guilhermondii* apresenta Q<sub>9</sub>, e *P. strasburgensis* "like" possui Q<sub>7</sub>.

Também a espécie *Candida lusitaniae*, estado anamórfico de *Clavispora lusitaniae*, não foi determinada pelas chaves dicotômicas. De acordo com o resultado obtido na determinação de quinonas, verificou-se que 11 isolados apresentaram Q<sub>8</sub>, um tipo de quinona raro entre leveduras. Investigando o manual de KREGER VAN RIJ (1984), constatou-se a semelhança entre *Kluyveromyces marxianus* e *Clavispora lusitaniae* quanto as características bioquímicas e a diferenciação entre estas duas espécies é devido ao tipo de coenzima-Q. *Clavispora* é um dos 24 gêneros da sub-família Saccharomycetaceae nitrato negativo apresentando as espécies *Cl. lusitaniae* e *Cl. opuntiae*.

As espécies *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia guilhermondii*, *Clavispora lusitaniae* e *Pichia strasburgensis* são leveduras ascomicéticas heterotáticas, isto é, a reprodução sexuada ocorre após a conjugação de linhagens "mating type" compatíveis e podem se apresentar como haplóides ou diplóides, com exceção de *Clavispora lusitaniae* que é uma levedura haplóide. Este fato explica a não observação das estruturas relacionadas à reprodução sexual.

Os isolados foram considerados como leveduras deuteromicéticas ou imperfeitas e para confirmar os resultados encontrados através da análise de quinonas, pesquisou-se as chaves para os vários grupos do gênero *Candida*. Conforme as chaves dicotômicas extraídas de KREGER VAN RIJ (1984), os isolados enquadraram-se nos seguintes grupos do gênero *Candida*: Grupo VI (DBB -, inositol -, nitrato -, eritritol -, maltose + e rafinose +); Grupo VII (DBB -, inositol -, nitrato -, eritritol -, maltose + e rafinose -); Grupo VIII (DBB -, inositol -, nitrato -, eritritol -, maltose - e manitol -); Grupo IX (DBB -, inositol -, nitrato -, eritritol -, maltose +, manitol + e galactose +).

As espécies *Candida lusitaniae* e *Candida guilhermondii* têm sido identificadas como pertencentes aos grupos VI e VII, respectivamente. Enquanto a espécie *Candida kefir* pode ser identificada pelas chaves dos grupos VIII e IX.

As demais características bioquímicas são semelhantes entre estas espécies. Nota-se que a diferenciação entre elas envolve testes-chave como assimilação de maltose e rafinose que são testes fundamentais para diferenciar os grupos de *Candida*.

A Tabela 4 mostra as características diferenciais entre *Candida kefir*, *Candida guilhermondii*, *Candida lusitanae* e *Pichia strasburgensis*, segundo KREGER VAN RIJ (1984).

Alguns testes importantes na identificação de *Candida kefir* não foram reproduzidos quando utilizou-se culturas referências de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, DSM 70343 e DSM 70292, como assimilação de maltose +, ramnose +, ribitol + e melezitose +.

Conforme trabalho recente, em termos do sistema de coenzima-Q, o gênero *Kluyveromyces* é considerado homogêneo, apresentando o tipo Q<sub>6</sub> (MOLNÁR *et alii*, 1996), reforçando a importância da utilização deste critério para a definição deste taxon neste estudo.

**Tabela 4:** Características diferenciais entre *Candida kefir*, *Candida guilhermondii*, *Candida lusitanae* e *Pichia strasburgensis*.

| característica     | <i>Candida kefir</i> | <i>C. guilhermondii</i> | <i>C. lusitanae</i> | <i>P. strasburgensis</i> |
|--------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|
| assimilação        |                      |                         |                     |                          |
| maltose            | -                    | +                       | +                   | +                        |
| lactose            | +                    | -                       | -                   | -                        |
| rafinose           | +                    | +                       | -                   | +                        |
| ribitol            | -                    | +                       | +                   | +(s) <sup>1</sup>        |
| ramnose            | -                    | v <sup>2</sup>          | +                   | +                        |
| melezitose         | -                    | +                       | +                   | +                        |
| crescimento emVFB* | -                    | -                       | +(w) <sup>3</sup>   | -                        |
| quinona            | Q <sub>6</sub>       | Q <sub>9</sub>          | Q <sub>8</sub>      | Q <sub>7</sub>           |

(1) s significa lento; (2) v significa variável; (3) w significa fraco; e (\*) "vitamin free base"

Foram identificadas as seguintes espécies de leveduras: *Rhodotorula rubra* (6), levedura *Pichia strasburgensis* "like" (14), *Candida guilhermondii* (6), *Candida lusitanae* (11) e *Candida kefir* (42). A Tabela 5 apresenta a descrição das espécies identificadas de acordo com o local de coleta.

**Tabela 5:** Distribuição das espécies de leveduras isoladas de Agave nos diferentes locais de coleta

| Local de coleta                               | Espécie                                  | Código CCT                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Produção artesanal de<br>sisal - Minas Gerais | <i>Rhodotorula rubra</i> (2)             | 3442, 3522                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                               | <i>Pichia strasburgensis</i> "like" (3)  | 3455, 3487, 3488                                                                                                                                                                                                                                           |
|                                               | <i>Candida guilhermondii</i> (3)         | 3519, 3524, 3525                                                                                                                                                                                                                                           |
|                                               | <i>Candida lusitanae</i> (2)             | 3481, 3485                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                               | <i>Candida kefyr</i> (2)                 | 3484, 3503                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Variedades de Agave                           | <i>Rhodotorula rubra</i> (1)             | 3456                                                                                                                                                                                                                                                       |
| IAC - São Paulo                               | <i>Candida lusitanae</i> (2)             | 3518, 3523                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Agave - Cerrado                               | <i>Rhodotorula rubra</i> (1)             | 3444                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                               | <i>Pichia strasburgensis</i> "like" (10) | 3331, 3334, 3335, 3337, 3445, 3446, 3448, 3450,<br>3451, 3453                                                                                                                                                                                              |
|                                               | <i>Candida guilhermondii</i> (2)         | 3443, 3454                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                               | <i>Rhodotorula rubra</i> (2)             | 3359, 3480                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Variedades de Agave                           | <i>Pichia strasburgensis</i> "like" (1)  | 3511                                                                                                                                                                                                                                                       |
| EMBRAPA                                       | <i>Candida guilhermondii</i> (1)         | 3510                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Produção de sisal                             | <i>Candida lusitanae</i> (7)             | 3345, 3482, 3507, 3512, 3514, 3515, 3517                                                                                                                                                                                                                   |
| Paraitiba                                     | <i>Candida kefyr</i> (41)                | 3306, 3307, 3308, 3325, 3326, 3327, 3329, 3330,<br>3332, 3333, 3340, 3341, 3344, 3346, 3347, 3348,<br>3350, 3351, 3352, 3354, 3355, 3356, 3357, 3358,<br>3360, 3372, 3373, 3374, 3449, 3483, 3486, 3501,<br>3502, 3504, 3505, 3506, 3508, 3509, 3513, 3516 |

Os cromatogramas apresentados a seguir são exemplos dos resultados obtidos na determinação de quinonas para as leveduras isoladas. A figura 10 mostra os resultados obtidos para algumas leveduras identificadas como *Candida kefir* que possui Q<sub>6</sub> e a cultura referência *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556.

Algumas culturas que apresentaram quinona do tipo Q<sub>7</sub> identificadas como *Pichia strasburgensis* “like” e a cultura referência *Pichia strasburgensis* CCT 4474 estão representadas na figura 11.

As figuras 12 e 13 mostram os cromatogramas representativos de leveduras identificadas como *Candida lusitanae* e *Candida guilhermondii* que apresentaram coenzima-Q do tipo Q<sub>8</sub> e Q<sub>9</sub>, respectivamente. As culturas referências utilizadas foram *Pachysolen tannophilus* CCT 2380 (Q<sub>8</sub>) e *Candida guilhermondii* CCT 2492 (Q<sub>9</sub>).

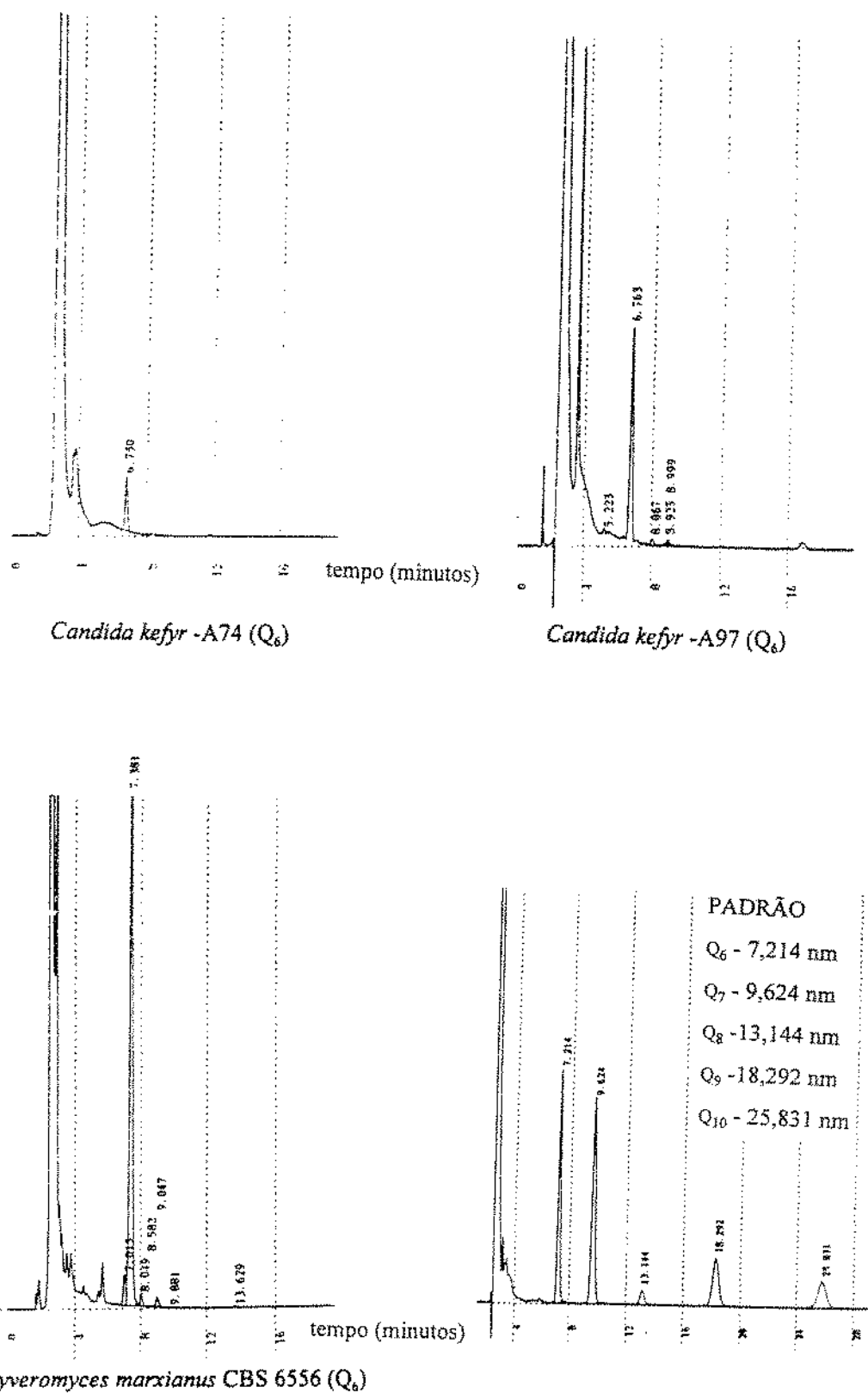
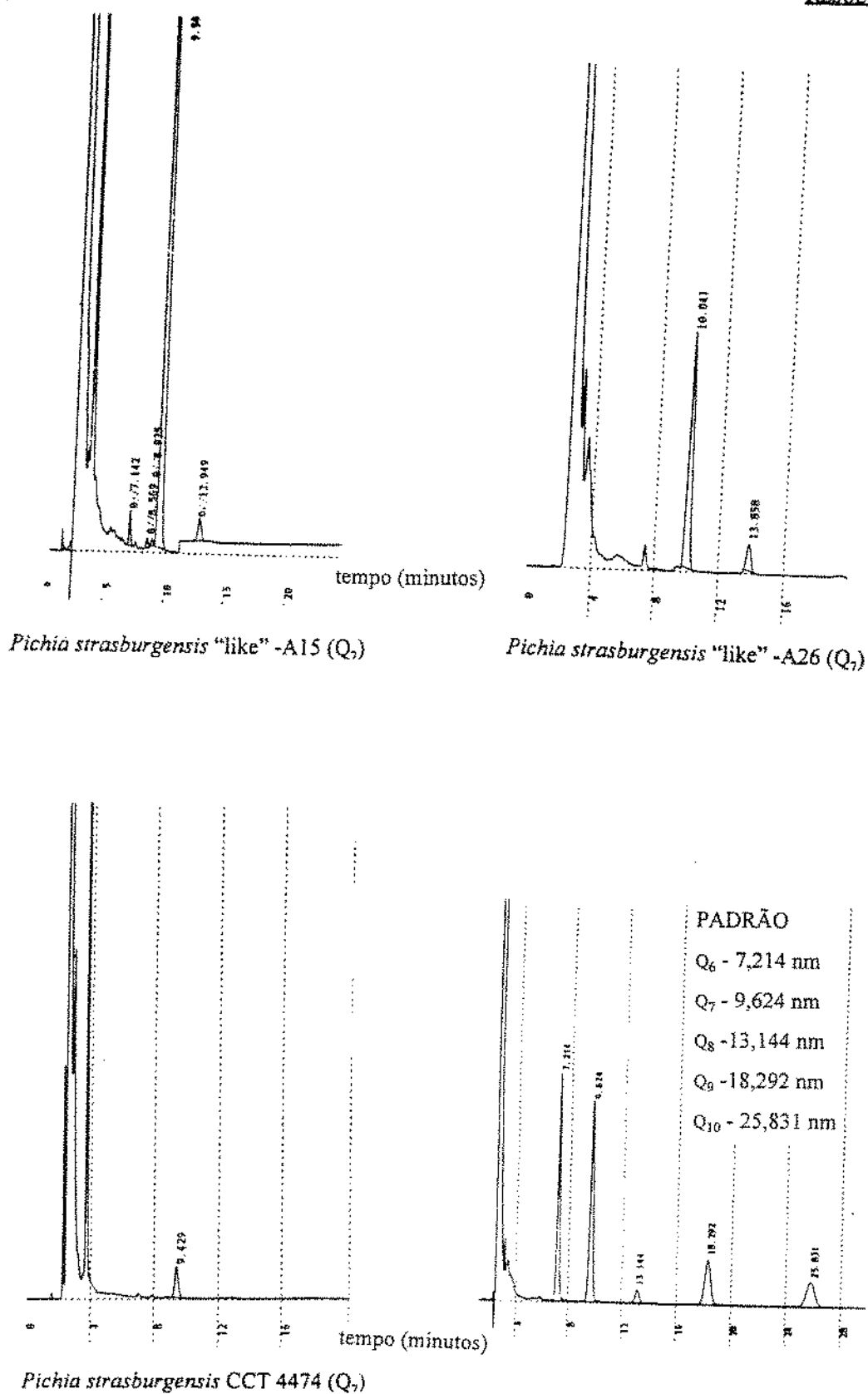
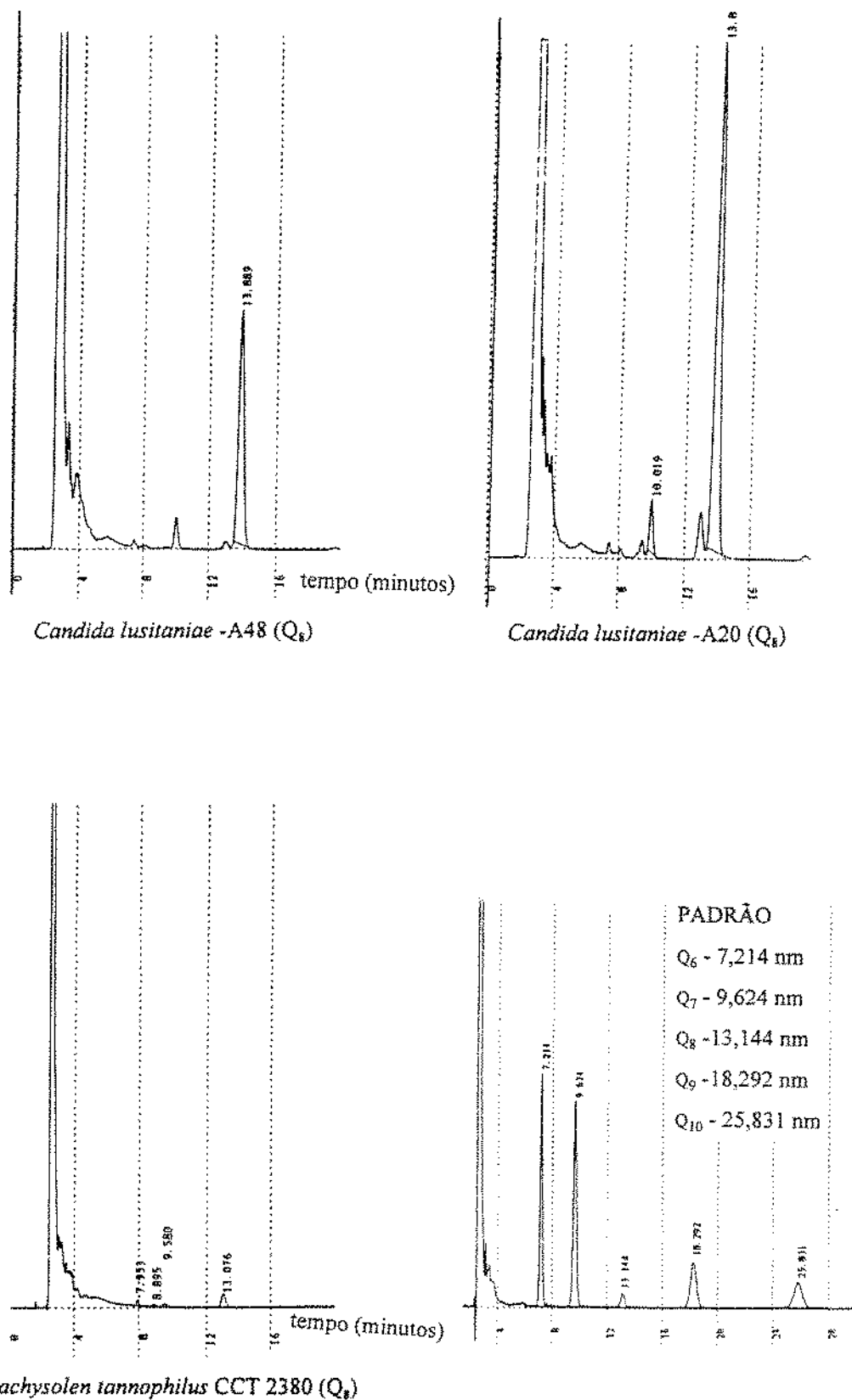


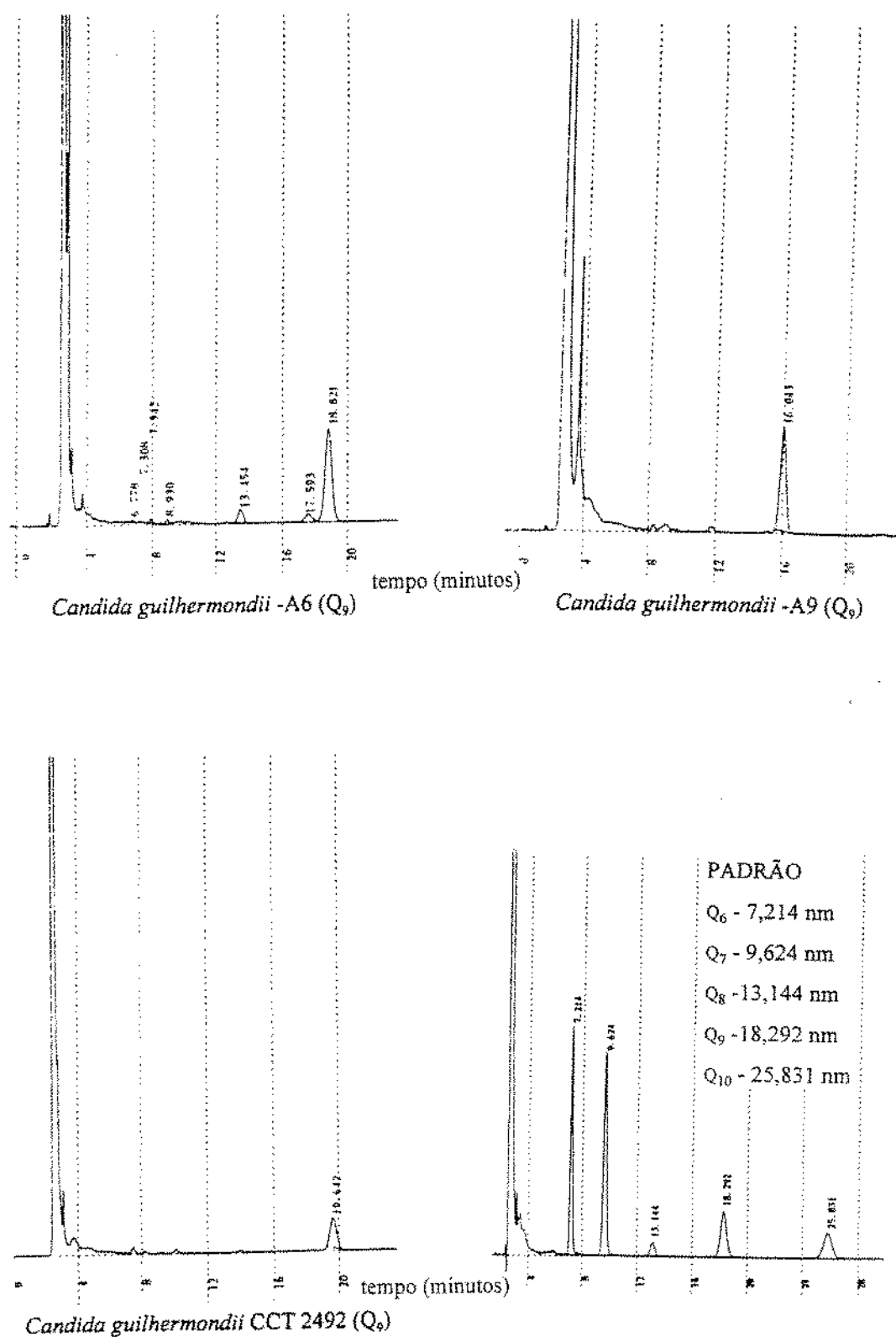
Figura 10: Cromatogramas referentes à determinação de quinona Q<sub>6</sub> da espécie *Candida kefyr* e cultura referência *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556.



**Figura 11:** Cromatogramas referentes à determinação de quinona Q<sub>7</sub> da espécie *Pichia strasburgensis* "like" e cultura referência *Pichia strasburgensis* CCT 4474.



**Figura 12:** Cromatogramas referentes à determinação de quinona  $Q_8$  da espécie *Candida lusitanae* e cultura referência *Pachysolen tannophilus* CCT 2380.



**Figura 13:** Cromatogramas referentes à determinação de quinona Q<sub>9</sub> da espécie *Candida guilhermondii* e cultura referência *Candida guilhermondii* CCT 2492.

Sete (7) dos onze (11) isolados identificados como *Candida lusitaniae* diferem da descrição para a espécie (KREGER VAN RIJ, 1984) no que se refere à capacidade de assimilação de rafinose (rafinose positivo); três (3) isolados diferem também em relação à incapacidade de assimilar ribose (ribose negativo). Dois (2) outros isolados diferem somente em relação à capacidade de assimilar inulina, isto é, são inulina positivo.

Os quatorze (14) isolados identificados como *Pichia strasburgensis* "like" apresentaram discrepâncias entre os resultados obtidos e a descrição da espécie. A maioria (13 isolados) não foram capazes de fermentar sacarose, oito (8) isolados também não assimilam celobiose, dez (10) não assimilam ribitol e xilose, onze (11) são manitol negativo, oito (8) não assimilam l-arabinose, dois (2) fermentam galactose e seis (6) são capazes de assimilar inulina.

Em relação aos seis (6) isolados identificados como *Candida guilhermondii*, dois (2) apresentaram concordância quanto aos testes realizados frente a descrição da espécie, três (3) isolados, no entanto, diferiram não apresentando capacidade de fermentar sacarose e quatro (4) não fermentaram rafinose e são capazes de assimilar melibiose.

Os quarenta e dois (42) isolados identificados como *Candida kefir* foram capazes de assimilar maltose ao contrário da descrição da espécie. O mesmo ocorreu com as três (3) culturas de *Kluyveromyces marxianus* utilizadas como referência (CBS 6556, DSM 70292, DSM 70343). Também a assimilação de ribitol e melezitose foi encontrada na maioria dos isolados (40) em desacordo com a descrição, vinte e oito isolados (28) apresentaram capacidade de assimilar ramnose, outros vinte e sete (27) não fermentam inulina, dezesseis (16) não fermentaram sacarose, cinco (5) não fermentaram galactose, e outros cinco (5) não assimilaram lactose.

As discrepâncias observadas nos isolados identificados como *Candida kefir*, particularmente referentes à assimilação de maltose, ribitol, melezitose, ramnose e lactose são as principais características diferenciais entre esta espécie, *Candida guilhermondii*, *Candida lusitaniae* e *Pichia strasburgensis* como pode ser visto na Tabela 4.

Esta constatação, indica a importância da determinação de quinonas como teste diferencial entre estas espécies na ausência da observação das estruturas da reprodução sexuada.

Independente do local ou tipo de material coletado, foram encontradas um número restrito de espécies de leveduras semelhantes associadas à agave. A espécie *Candida kefir*, isto é, o estado anamórfico de *Kluyveromyces marxianus*, foi a espécie dominante especialmente encontrada nos resíduos da produção de sisal (suco de agave “fermentado”), na Paraíba. Neste local de coleta, as demais espécies foram isoladas a partir do suco das variedades de agave da fazenda experimental da EMBRAPA.

As espécies de leveduras encontradas neste trabalho relacionadas à agave e à produção de sisal têm similaridade com a comunidade leveduriforme descrita por LACHANCE (1993) associada à espécie *Agave tequilana*, matéria-prima na fabricação de tequila, com exceção de *Pichia strasburgensis* “like”.

Deve-se considerar, no entanto, que as condições de isolamento foram seletivas, isto é, utilizou-se meio contendo inulina como única fonte de carbono. Assim, o número relativamente pequeno de espécies pode ser justificado por este fator de seleção.

A presença de espécies descritas, classicamente, como incapazes de metabolizar inulina como *Rhodotorula rubra*, *Candida lusitaniae* e *Pichia strasburgensis* nas condições de laboratório, pode estar relacionada com a utilização dos açúcares simples decorrentes da ação dos microrganismos inulolíticos no próprio habitat ou na placa de isolamento, ou até, utilização de extrato de levedura como fonte de carbono no meio YM agar. Entretanto, entre os isolados identificados como *Candida lusitaniae* e *Candida guilhermondii*, observou-se a ocorrência de isolados capazes de assimilar inulina, dois (2) e cinco (5), respectivamente.

Observa-se que a temperatura de isolamento também pode ter influência no tipo de comunidade leveduriforme recuperada durante o isolamento. Assim, na Paraíba, onde o clima é mais quente, foi obtido um número significativo de *Candida kefir*, sabidamente uma espécie tolerante a altas temperaturas.

No isolamento feito no estado de São Paulo, durante a primavera, região de clima mais ameno, não foi constatada a presença de *Candida kefyr* e *Candida guilhermondii*. Dentre os habitats relacionados para esta duas espécies, encontra-se folhas de sisal conforme descrição de KREGER VAN RIJ (1984) e BARNETT *et alii* (1983).

Espécies de *Kluyveromyces*, devido a sua característica de fermentadoras vigorosas são encontradas em exudatos açucarados de folhas e frutos senescentes como *Kluyveromyces thermotolerans*. A espécie *K. marxianus* está associada à fermentação natural de tequila (TANIS, 1990).

Os isolados identificados como *Pichia strasburgensis* "like" foram encontradas principalmente na região de cerrado no estado de Minas Gerais e podem constituir uma espécie importante associada à agave neste tipo de região. Como não foi possível observar a reprodução sexual e não há descrição de estado assexual para esta espécie de levedura, a taxonomia destes isolados deve ser complementada com outros métodos, especialmente técnicas moleculares e testes de cruzamento inter-linhagens (reprodução sexuada) para melhor caracterizar tais linhagens.

A espécie *Pichia strasburgensis* já foi isolada de resinas decorrentes de lesões em árvores (LACHANCE, 1982). Na descrição de BARNETT *et alii* (1983), a ocorrência desta espécie restringe-se a couro.

As leveduras isoladas de agave foram submetidas à análise por taxonomia numérica para estabelecer relações de similaridade entre as espécies encontradas, utilizando os softwares X e NTSYS. O Anexo 2 apresenta a descrição dos 58 testes empregados para a análise de similaridade.

Um dos produtos dos procedimentos de taxonomia numérica é a geração de uma base de dados que contém extensa informação sobre o perfil bioquímico, nutricional, fisiológico e de tolerância de um determinado taxa. Estes dados organizados em tabelas podem fornecer informações importantes para trabalhos de biotecnologia, especialmente designando meios para isolamento seletivo de organismos a partir de habitats naturais para programas de

“screening” industrial (GOODFELLOW & O'DONNELL, 1989). O Anexo 2 apresenta os dados dos 58 testes referentes à caracterização das 79 leveduras isoladas do agave.

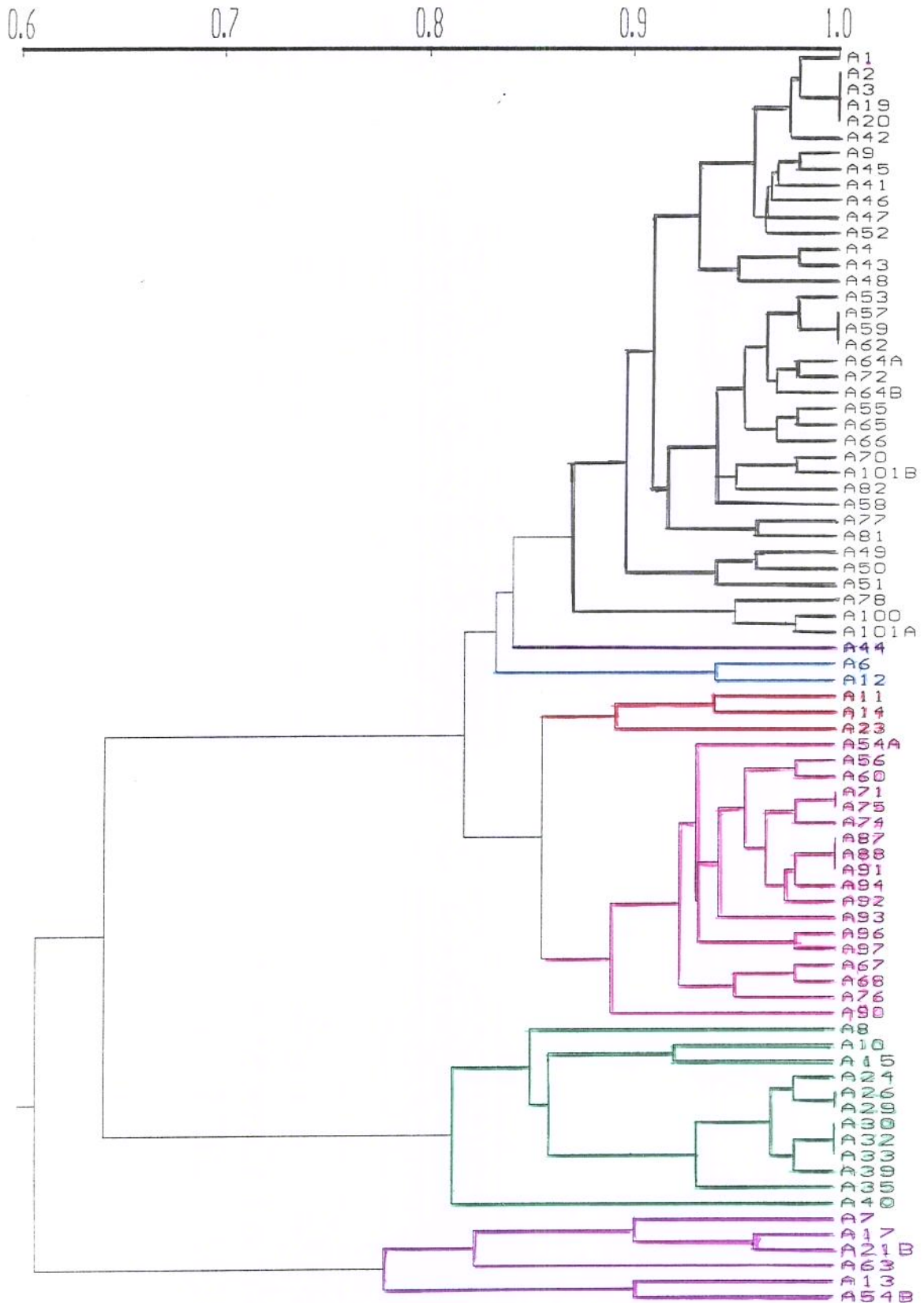
Os dendrogramas construídos a partir da análise de similaridade utilizando os coeficientes “simple matching” ( $S_{SM}$ ) e Jaccard ( $S_J$ ) são mostrados nas figuras 14 e 15, respectivamente. Observou-se a formação de 7 grupos (“clusters”), designados como  $Q_{10}$ ,  $Q_7$ ,  $Q_6$ , Major, Min1, Min2 e Sm1. Utilizou-se a descrição do tipo de coenzima Q como guia para as análises de “clusters”.

A tabela 6. apresenta a distribuição dos 79 isolados nos “clusters”. Estes grupos foram definidos em nível de similaridade de 80% para  $S_{SM}$  e 70% para  $S_J$ , os quais agruparam 72 (91,13 %) linhagens em nível de similaridade igual ou superior a 90% para  $S_{SM}$  e 62 (78,48 %) linhagens para  $S_J$ .

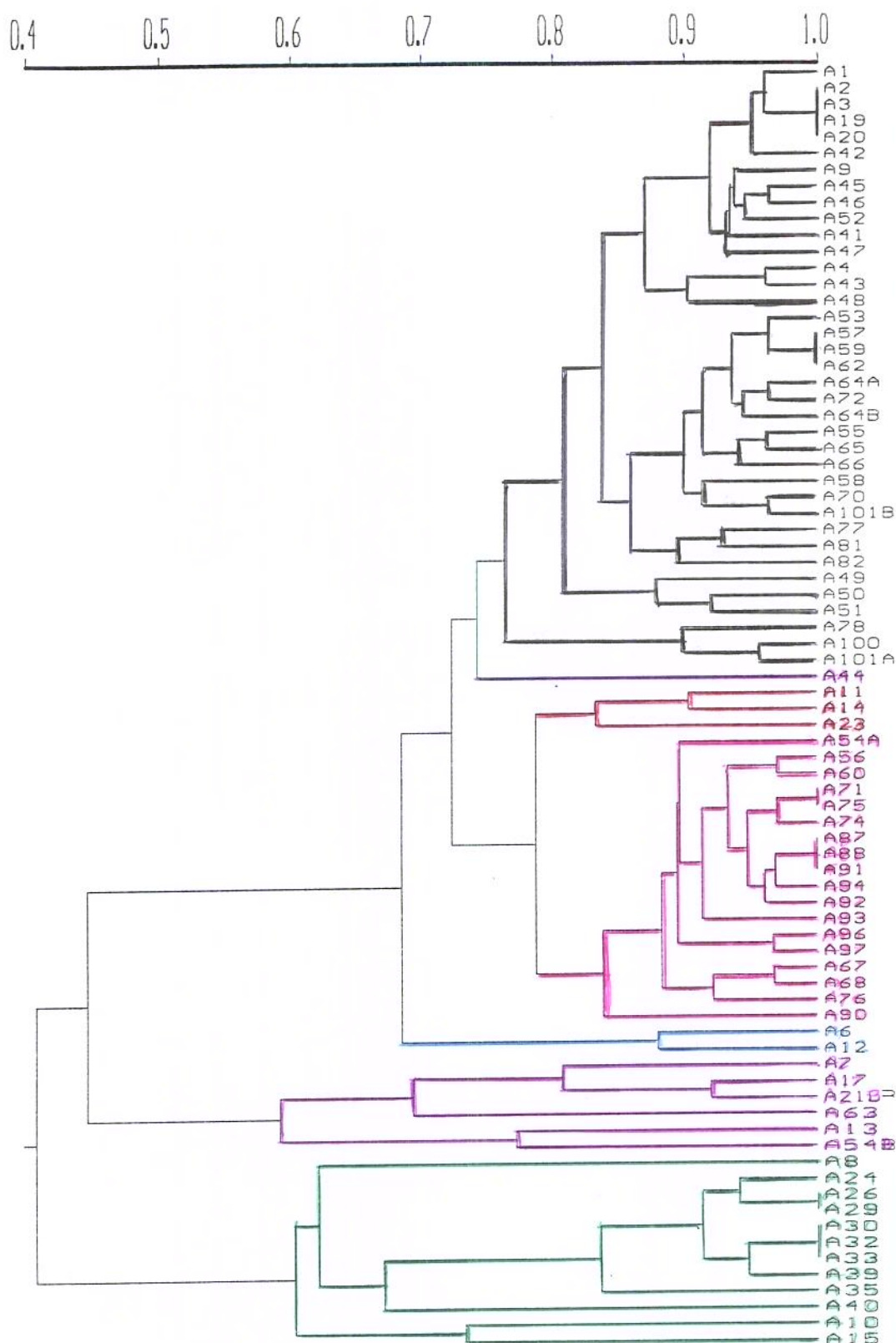
Os “clusters”  $Q_{10}$ ,  $Q_7$  e  $Q_6$  apresentaram uma melhor definição e coincidem com os isolados identificados como *Rhodotorula rubra*, *Pichia strasburgensis* “like” e *Candida kefir*, respectivamente. O “cluster”  $Q_6$  agrupa 18 (42,85 %) das linhagens identificadas como *Candida kefir* que são capazes de fermentar inulina, característica associada à espécie *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*.

O “cluster” denominado Major é um grupo heterogêneo que inclui 37 (46,83 %) do total de leveduras isoladas as quais foram identificadas como *Candida kefir* (24), *Candida guilhermondii* (3), *Candida lusitanae* (8) e *Pichia strasburgensis* “like” (2). Este fato está de acordo com a semelhança das características fenotípicas e consequente dificuldade de distinção entre estas espécies já discutida anteriormente.

Os “clusters” menores designados Min1 e Min2 compreendem poucos isolados e o “cluster” Sm1 inclui um único representante.



**Figura 14:** Dendrograma representando as relações de similaridade (“simple matching”/UPGMA) entre as linhagens de leveduras isoladas de agave baseado na análise de 58 características fenotípicas (vide Anexo 2).



**Figura 15:** Dendrograma representando as relações de similaridade (Jaccard / UPGMA) entre as linhagens de leveduras isoladas de agave baseado na análise de 58 características fenotípicas (vide Anexo 2).

Tabela 6.: Distribuição dos isolados nos "clusters"

|                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| cluster Q10 -<br><i>Rhodotorula rubra</i> (6)*                                                                                                                           | A7, A13, A17, A21b, A54b, A63                                                                                                                                                                      |
| cluster Q7 -<br><i>Pichia strasburgensis</i> "like" (12)                                                                                                                 | A8, A10, A15, A24, A26, A29, A30,<br>A32, A33, A35, A39, A40                                                                                                                                       |
| "cluster" Q6 -<br><i>Candida kefyr</i> (18)                                                                                                                              | A54a, A56, A60, A67, A68, A71, A74, A75, A76, A87, A88, A90,<br>A91, A92, A93, A94, A96, A97                                                                                                       |
| "cluster" Major - Miscelânea:<br><i>Candida guilhermondii</i> (3), <i>Candida kefyr</i> (24),<br><i>Candida lusitanae</i> (8), <i>Pichia strasburgensis</i><br>"like"(2) | A1, A2, A3, A4, A9, A19, A20, A41, A42, A43, A45, A46,<br>A47, A48, A49, A50, A51, A52, A53, A55, A57, A58, A59, A62,<br>A64a, A64b, A65, A66, A70, A72, A77, A78, A81, A82, A100,<br>A101a, A101b |
| "cluster" Min1 -<br><i>Candida guilhermondii</i> (2)                                                                                                                     | A6, A12                                                                                                                                                                                            |
| "cluster" Min2 -<br><i>C. guilhermondii</i> (2), <i>C. lusitanae</i> (1)                                                                                                 | A11, A14, A23                                                                                                                                                                                      |
| "cluster" Sml -<br><i>Candida lusitanae</i> (1)                                                                                                                          | A44                                                                                                                                                                                                |

\* número entre parênteses refere-se ao número de isolados identificados

A distribuição em porcentagem das 58 características fenotípicas entre os “clusters” Q<sub>10</sub>, Q<sub>7</sub>, Q<sub>6</sub>, Major, Min1, Min2 e Sm1 é mostrada na tabela 7.

**Tabela 7:** Distribuição em porcentagem das 58 características fenotípicas entre os “clusters”

|                     | “Clusters”<br>Testes/Organismos | Q10<br>6 | Q7<br>12 | Q6<br>18 | Major<br>37 | Min1<br>2 | Min2<br>3 | Sm1<br>1 |
|---------------------|---------------------------------|----------|----------|----------|-------------|-----------|-----------|----------|
| <b>MORFOLÓGICOS</b> |                                 |          |          |          |             |           |           |          |
| OVO                 | Célula ovóide                   | 100      | 8        | 100      | 89          | 100       | 67        | 100      |
| BRU                 | Brotamento unipolar             | 100      | 0        | 0        | 0           | 0         | 0         | 100      |
| BRB                 | Brotamento bipolar              | 17       | 0        | 0        | 0           | 0         | 0         | 0        |
| BRM                 | Brotamento multilateral         | 0        | 100      | 100      | 100         | 100       | 100       | 0        |
| <b>CULTURAIS</b>    |                                 |          |          |          |             |           |           |          |
| SAB                 | Sedimento abundante             | 67       | 100      | 100      | 100         | 100       | 100       | 100      |
| SFL                 | Floculento                      | 33       | 0        | 0        | 3           | 0         | 0         | 100      |
| ANE                 | Formação de anel                | 33       | 0        | 0        | 3           | 0         | 0         | 0        |
| PEL                 | Formação de película            | 67       | 92       | 0        | 5           | 100       | 67        | 0        |
| BRA                 | Cor branca                      | 0        | 0        | 0        | 0           | 0         | 0         | 0        |
| BCR                 | Cor branco-creme                | 0        | 0        | 94       | 100         | 100       | 100       | 100      |
| CRE                 | Cor creme                       | 0        | 100      | 6        | 0           | 0         | 0         | 0        |
| VER                 | Cor vermelha                    | 100      | 0        | 0        | 0           | 0         | 0         | 0        |
| LIS                 | Superfície lisa                 | 100      | 58       | 100      | 100         | 100       | 100       | 100      |
| BRI                 | Superfície brilhante            | 100      | 8        | 100      | 100         | 100       | 100       | 100      |
| ELE                 | Colônia elevada                 | 0        | 100      | 0        | 0           | 0         | 0         | 0        |
| CVE                 | Colônia convexa                 | 100      | 0        | 100      | 100         | 100       | 100       | 100      |
| PMI                 | Pseudomicélio                   | 0        | 83       | 94       | 35          | 50        | 33        | 100      |
| <b>FERMENTAÇÃO</b>  |                                 |          |          |          |             |           |           |          |
| FGL                 | Fermentação de glicose          | 0        | 100      | 100      | 100         | 100       | 100       | 100      |
| FGA                 | Fermentação de galactose        | 0        | 8        | 94       | 86          | 50        | 100       | 100      |
| FSA                 | Fermentação de sacarose         | 0        | 0        | 100      | 59          | 0         | 100       | 100      |
| FMA                 | Fermentação de maltose          | 0        | 0        | 0        | 0           | 0         | 0         | 100      |
| FLA                 | Fermentação de lactose          | 0        | 0        | 72       | 0           | 0         | 0         | 0        |
| FRA                 | Fermentação de rafinose         | 0        | 0        | 89       | 0           | 0         | 67        | 0        |
| FIN                 | Fermentação de inulina          | 0        | 0        | 83       | 0           | 0         | 0         | 0        |

Tabela 7: continuação

|     | "Clusters"                           | Q10 | Q7  | Q6  | Major | Min1 | Min2 | Sm1 |
|-----|--------------------------------------|-----|-----|-----|-------|------|------|-----|
|     | Testes/Organismos                    | 6   | 12  | 18  | 37    | 2    | 3    | 1   |
|     | ASSIMILAÇÃO                          |     |     |     |       |      |      |     |
| MAL | Assimilação de maltose               | 83  | 100 | 100 | 100   | 100  | 100  | 100 |
| CEL | Assimilação de celobiose             | 50  | 25  | 100 | 100   | 0    | 100  | 100 |
| TRE | Assimilação de trealose              | 67  | 83  | 83  | 100   | 100  | 100  | 100 |
| LAC | Assimilação de lactose               | 33  | 0   | 100 | 51    | 0    | 0    | 0   |
| RAF | Assimilação de rafinose              | 100 | 100 | 100 | 92    | 100  | 100  | 100 |
| AMI | Assimilação de amido                 | 0   | 0   | 0   | 0     | 0    | 0    | 0   |
| XIL | Assimilação de xilose                | 100 | 17  | 100 | 97    | 100  | 100  | 100 |
| ARA | Assimilação de L-arabinose           | 100 | 8   | 100 | 84    | 100  | 100  | 100 |
| RIB | Assimilação de ribose                | 83  | 0   | 89  | 32    | 0    | 100  | 100 |
| RAM | Assimilação de ramnose               | 50  | 25  | 33  | 92    | 0    | 67   | 100 |
| ERI | Assimilação de eritríol              | 0   | 0   | 0   | 0     | 0    | 0    | 0   |
| ADO | Assimilação de adonitol              | 67  | 17  | 100 | 100   | 100  | 100  | 100 |
| MAN | Assimilação de manitol               | 83  | 8   | 100 | 100   | 100  | 100  | 100 |
| CIT | Assimilação de citrato               | 67  | 100 | 89  | 100   | 50   | 100  | 100 |
| INO | Assimilação de inositol              | 0   | 0   | 0   | 0     | 0    | 0    | 0   |
| MEL | Assimilação de melibiose             | 0   | 0   | 6   | 0     | 0    | 33   | 0   |
| MEZ | Assimilação de melezitose            | 83  | 83  | 100 | 100   | 100  | 100  | 100 |
| INU | Assimilação de inulina               | 50  | 75  | 100 | 62    | 0    | 67   | 0   |
| NO3 | Assimilação de nitrato               | 0   | 0   | 6   | 0     | 0    | 0    | 0   |
|     | RESISTÊNCIA                          |     |     |     |       |      |      |     |
| CY1 | Resistência a cicloheximida 100 ppm  | 33  | 0   | 100 | 0     | 100  | 100  | 0   |
| CY2 | Resistência a cicloheximida 1000 ppm | 0   | 0   | 94  | 0     | 0    | 100  | 0   |
| VFB | Crescimento em VFB                   | 83  | 75  | 17  | 49    | 100  | 100  | 100 |
| 37C | Crescimento a 37°C                   | 0   | 100 | 100 | 100   | 100  | 100  | 100 |
| DBB | Reação em DBB                        | 100 | 0   | 0   | 0     | 0    | 0    | 0   |
| URE | Urease                               | 100 | 0   | 0   | 0     | 0    | 0    | 0   |
| PAC | Produção de ácido de glicose         | 0   | 92  | 100 | 97    | 100  | 100  | 100 |
| G5O | Crescimento em glicose 50%           | 100 | 75  | 100 | 100   | 100  | 100  | 100 |

A tabela 8 apresenta os valores de similaridade “intraclusters” e a linhagem que melhor representa cada “cluster”, a linhagem centro-tipo (“center type”) e o HMO - “Hypothetic Mean Organism”. No “cluster” Q<sub>6</sub> encontramos uma variação no coeficiente S<sub>SM</sub> de 89,04 a 96,19% e para o S<sub>J</sub> de 83,85 a 94,10% e os isolados que melhor representam este grupo são A87, A88, A91 (*Candida kefyr*). No “cluster” Major, o coeficiente “simple matching” apresentou variação de 86,55% a 93,63% e o Jaccard variou de 75,04% a 88,31%, enquanto o isolado A64a (*Candida kefyr*) foi considerada a linhagem centro-tipo deste grupo. O “cluster” Q<sub>7</sub> apresentou valores mais baixos de similaridade, sendo de 81,28 a 93,40% para S<sub>SM</sub> e 62,10 a 73,39% para S<sub>J</sub>, tendo A30, A32 e A33 (*Pichia strasburgensis* “like”) como melhores representantes e o “cluster” Q<sub>10</sub> que apresentou os mais baixos níveis de similaridade, apresentou valores de S<sub>SM</sub> variando de 78,82 a 86,67% para o S<sub>SM</sub> e 59,71 a 73,95% para o S<sub>J</sub> e tendo o isolado A7 (*Rhodotorula rubra*) como melhor representante.

**Tabela 8:** Análise do “CenterType”, Médias dos coeficientes “Simple matching”, Jacard e Desvio Padrão, Similaridade do “Hypothetic Mean Organism”

**Análise do “Cluster” Q6**

|                 | SM    | SJ    | DP    | HMO(SM) |
|-----------------|-------|-------|-------|---------|
| “Intra-cluster” | 93.76 | 90.45 | 4.85  | 96.41   |
| A87             | 96.19 | 94.10 | 2.53  | 100.00  |
| A88             | 96.19 | 94.10 | 2.53  | 100.00  |
| A91             | 96.19 | 94.10 | 2.53  | 100.00  |
| A75             | 95.50 | 93.16 | 1.85  | 98.04   |
| A71             | 95.50 | 93.16 | 1.85  | 98.04   |
| A92             | 95.27 | 92.60 | 3.52  | 98.04   |
| A60             | 94.81 | 92.15 | 2.94  | 98.04   |
| A94             | 94.58 | 91.56 | 4.21  | 98.04   |
| A74             | 94.12 | 91.03 | 4.90  | 96.08   |
| A97             | 93.19 | 89.41 | 4.65  | 96.08   |
| A68             | 92.96 | 89.24 | 6.24  | 94.12   |
| A56             | 92.96 | 89.34 | 6.58  | 96.08   |
| A76             | 92.73 | 88.88 | 6.56  | 94.12   |
| A54A            | 92.50 | 88.53 | 6.94  | 94.12   |
| A93             | 92.50 | 88.67 | 7.15  | 96.08   |
| A96             | 91.81 | 87.20 | 4.72  | 94.12   |
| A67             | 91.58 | 87.07 | 6.90  | 92.16   |
| A90             | 89.04 | 83.85 | 10.72 | 92.16   |

Tabela 8: Continuação

## Análise do “cluster” Major

|                 | SM    | SJ    | DP    | HMO(SM) |
|-----------------|-------|-------|-------|---------|
| “Intra-cluster” | 91.63 | 84.62 | 6.57  | 93.80   |
| A64A            | 93.63 | 88.17 | 5.10  | 100.00  |
| A57             | 93.57 | 88.31 | 4.30  | 98.04   |
| A62             | 93.57 | 88.31 | 4.30  | 98.04   |
| A59             | 93.57 | 88.31 | 4.30  | 98.04   |
| A65             | 93.25 | 87.28 | 5.26  | 98.04   |
| A55             | 93.19 | 87.39 | 5.68  | 96.08   |
| A1              | 93.08 | 86.82 | 4.65  | 96.08   |
| A20             | 93.03 | 87.09 | 5.76  | 94.12   |
| A2              | 93.03 | 87.09 | 5.76  | 94.12   |
| A19             | 93.03 | 87.09 | 5.76  | 94.12   |
| A3              | 93.03 | 87.09 | 5.76  | 94.12   |
| A70             | 93.03 | 87.33 | 4.69  | 98.04   |
| A72             | 92.92 | 87.13 | 5.13  | 98.04   |
| A52             | 92.81 | 87.04 | 4.99  | 94.12   |
| A42             | 92.65 | 86.09 | 5.23  | 92.16   |
| A47             | 92.37 | 85.84 | 6.58  | 94.12   |
| A45             | 92.32 | 86.13 | 6.43  | 92.16   |
| A58             | 92.27 | 86.45 | 0.75  | 94.12   |
| A64B            | 92.16 | 85.38 | 6.63  | 98.04   |
| A53             | 92.10 | 85.56 | 7.02  | 96.08   |
| A43             | 92.05 | 85.23 | 7.07  | 90.20   |
| A101B           | 91.45 | 84.43 | 7.43  | 96.08   |
| A66             | 91.34 | 83.67 | 6.60  | 96.08   |
| A4              | 91.34 | 84.29 | 7.72  | 88.24   |
| A41             | 90.96 | 83.45 | 8.18  | 90.20   |
| A51             | 90.90 | 82.92 | 7.66  | 92.16   |
| A9              | 90.85 | 83.31 | 8.31  | 90.20   |
| A50             | 90.80 | 82.74 | 7.69  | 92.16   |
| A82             | 90.74 | 83.55 | 7.51  | 94.12   |
| A48             | 90.52 | 81.97 | 6.97  | 90.20   |
| A46             | 90.41 | 83.20 | 7.85  | 90.20   |
| A81             | 90.14 | 82.82 | 6.88  | 92.16   |
| A77             | 89.49 | 81.24 | 9.59  | 92.16   |
| A78             | 88.51 | 78.94 | 10.29 | 92.16   |
| A101A           | 88.02 | 77.86 | 9.72  | 90.20   |
| A49             | 87.53 | 76.45 | 9.36  | 88.24   |
| A100            | 86.55 | 75.04 | 10.22 | 88.24   |

Tabela 8: Continuação

## Análise do “cluster” Q7

|                 | SM    | SJ    | DP    | HMO(SM) |
|-----------------|-------|-------|-------|---------|
| “Intra-cluster” | 89.69 | 74.73 | 5.58  | 93.95   |
| A30             | 93.40 | 83.39 | 3.20  | 100.00  |
| A33             | 93.40 | 83.39 | 3.20  | 100.00  |
| A32             | 93.40 | 83.39 | 3.20  | 100.00  |
| A26             | 93.05 | 82.27 | 3.40  | 98.04   |
| A29             | 93.05 | 82.27 | 3.40  | 98.04   |
| A39             | 92.34 | 81.05 | 3.34  | 98.04   |
| A24             | 91.98 | 79.12 | 3.54  | 96.08   |
| A35             | 89.48 | 75.58 | 3.50  | 94.12   |
| A10             | 85.56 | 60.69 | 2.13  | 86.27   |
| A15             | 84.85 | 62.43 | 12.75 | 86.27   |
| A8              | 84.49 | 61.11 | 13.26 | 86.27   |
| A40             | 81.28 | 62.10 | 12.05 | 84.31   |

## Análise do “cluster” Q10

|                 | SM    | SJ    | DP    | HMO(SM) |
|-----------------|-------|-------|-------|---------|
| “Intra-cluster” | 82.48 | 67.56 | 15.97 | 91.32   |
| A7              | 86.67 | 73.95 | 12.29 | 100.00  |
| A17             | 84.31 | 71.14 | 14.77 | 93.75   |
| A21B            | 82.75 | 68.92 | 16.47 | 91.67   |
| A54B            | 81.96 | 66.05 | 16.65 | 87.50   |
| A63             | 80.39 | 65.58 | 17.61 | 89.58   |
| A13             | 78.82 | 59.71 | 18.04 | 85.42   |

### 4.3. Leveduras Inulolíticas Seleccionadas

Para reduzir as dificuldades da caracterização encontradas na técnica tradicional de “screening”, utilizou-se o sistema “microtiter reader” associado a um programa computacional. O leitor de placas (plate reader) é um espectrofotômetro capaz de fazer 96 medidas de absorbância em volumes de aproximadamente 200µl em 5 segundos. Estes equipamentos foram utilizados, primariamente, para ensaios de ELISA, mas têm sido adaptados para outras medidas espectrofotométricas (PICK, 1986; FRYER *et alii*, 1986; FLORINI, 1989; KUENG *et alii*, 1989). A utilização deste sistema reduz o tempo e os custos requeridos para a realização de um número elevado de testes (BUTLER *et alii*, 1988; ASHOUR *et alii*, 1987).

Utilizou-se como critério de “screening”, o crescimento em temperaturas elevadas e pHs 4,0, 5,0 e 6,0, assim os 79 isolados foram testados a 37°C primeiramente. Aqueles que apresentaram bom crescimento, nesta temperatura, isto é,  $\mu_{\text{máx}} \geq 0,50 \text{ h}^{-1}$ , foram testados a 42°C e os que apresentaram  $\mu_{\text{máx}} \geq 0,50 \text{ h}^{-1}$  nesta temperatura foram testados a 45°C. O Anexo 3 mostram as curvas de crescimento das leveduras em diferentes meios e condições de pH e temperatura para as microplacas, utilizando o software EASYKIN.

A Tabela 9 mostra os valores de  $\mu_{\text{máx}} \text{ h}^{-1}$  das linhagens testadas em meio YNB Inulina nas diferentes condições de pH e temperatura utilizados para a seleção das leveduras capazes de degradar inulina para os futuros testes.

Nesta tabela, podemos verificar a seleção dos isolados promissores considerando a condição de pH 4,0 nas diferentes temperaturas. A partir destes dados, constatamos que de um total de 76 linhagens com crescimento a 37°C, 42 (55,3%) apresentaram  $\mu_{\text{máx}} \geq 0,50 \text{ h}^{-1}$  a 37°C, 22 (28,9%) em 42°C e 22 (28,9%) em 45°C. Estas últimas 22 linhagens apresentaram crescimento comparável ou melhor em 45°C, que as linhagens de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* CBS 6556 e ATCC 36907.

**Tabela 9:** Valores de  $\mu_{\max}$  h<sup>-1</sup> das linhagens em meio YNB Inulina 1% em diferentes pHs e temperaturas

| Linhagens                        | pH 4,0 |         |         | pH 5,0 | pH 6,0  |
|----------------------------------|--------|---------|---------|--------|---------|
|                                  | 37°C   | 42°C    | 45°C    | 45°C   | 45°C    |
| <i>Pichia strasburgensis</i> A26 | 0,50   | <       | <       | <      | <       |
| <i>Pichia strasburgensis</i> A35 | 0,64   | <       | <       | <      | <       |
| <i>Pichia strasburgensis</i> A39 | 0,54   | <       | <       | <      | <       |
| <i>Candida lusitaniae</i> A41    | 0,50   | <       | -       | -      | -       |
| <i>Candida lusitaniae</i> A43    | 0,59   | <       | <       | <      | <       |
| <i>Candida kefir</i> A47         | 0,72   | 0,63    | 0,61    | 0,61   | 0,52    |
| <i>Candida guilhermondii</i> A48 | 0,66   | 0,61    | 0,61    | 0,70   | 0,50    |
| <i>Candida lusitaniae</i> A49    | 0,60   | 0,53    | <       | <      | <       |
| <i>Candida lusitaniae</i> A50    | 0,58   | <       | -       | -      | -       |
| <i>Candida lusitaniae</i> A52    | 0,50   | <       | -       | -      | -       |
| <i>Candida kefir</i> A53         | 0,66   | <       | -       | -      | -       |
| <i>Candida kefir</i> A54a        | 0,69   | 0,61    | 0,55    | 0,62   | <(0,46) |
| <i>Candida kefir</i> A56         | 0,74   | 0,64    | 0,61    | 0,62   | 0,58    |
| <i>Candida kefir</i> A57         | 0,67   | 0,53    | 0,58    | 0,52   | <(0,47) |
| <i>Candida kefir</i> A59         | 0,63   | <       | -       | -      | -       |
| <i>Candida kefir</i> A60         | 0,73   | 0,63    | 0,58    | 0,56   | 0,55    |
| <i>Candida kefir</i> A62         | 0,59   | <       | -       | -      | -       |
| <i>Rhodotorula rubra</i> A63     | 0,70   | 0,66    | 0,59    | 0,63   | 0,55    |
| <i>Candida kefir</i> A64a        | 0,72   | 0,60    | <       | <      | <       |
| <i>Candida kefir</i> A64b        | 0,73   | 0,63    | <       | <      | <       |
| <i>Candida kefir</i> A67         | 0,67   | 0,60    | 0,60    | 0,52   | <(0,49) |
| <i>Candida kefir</i> A68         | 0,73   | 0,62    | 0,65    | 0,61   | 0,55    |
| <i>Candida kefir</i> A70         | 0,55   | <       | <       | <      | <       |
| <i>Candida kefir</i> A71         | 0,74   | 0,50    | 0,58    | 0,59   | 0,52    |
| <i>Candida kefir</i> A72         | 0,50   | <       | <       | <      | <       |
| <i>Candida kefir</i> A74         | 0,69   | <(0,48) | 0,50    | 0,50   | <(0,49) |
| <i>Candida kefir</i> A75         | 0,70   | <(0,49) | 0,57    | 0,57   | 0,56    |
| <i>Candida kefir</i> A76         | 0,64   | <(0,48) | <(0,49) | 0,55   | 0,50    |
| <i>Candida kefir</i> A78         | 0,51   | <       | <       | <      | <       |
| <i>Candida kefir</i> A87         | 0,63   | 0,66    | 0,57    | 0,59   | <(0,48) |
| <i>Candida kefir</i> A88         | 0,64   | 0,70    | 0,55    | 0,57   | <(0,49) |
| <i>Candida kefir</i> A90         | 0,64   | 0,63    | 0,73    | 0,77   | 0,93    |
| <i>Candida kefir</i> A91         | 0,62   | 0,65    | 0,91    | 0,87   | 0,87    |
| <i>Candida kefir</i> A92         | 0,65   | 0,72    | 0,84    | 0,82   | 0,84    |
| <i>Candida kefir</i> A93         | 0,68   | 0,69    | 0,83    | 0,82   | 0,90    |
| <i>Candida kefir</i> A94         | 0,60   | 0,76    | 0,87    | 0,80   | 0,83    |
| <i>Candida kefir</i> A96         | 0,66   | 0,65    | 0,87    | 0,84   | 0,86    |
| <i>Candida kefir</i> A97         | 0,64   | 0,67    | 0,88    | 0,87   | 0,82    |
| <i>Candida kefir</i> A100        | 0,54   | <(0,48) | <(0,49) | 0,50   | <(0,48) |
| <i>Candida kefir</i> A101a       | 0,52   | <(0,49) | <(0,48) | 0,54   | <       |
| <i>Candida kefir</i> A101b       | 0,52   | <(0,47) | 0,52    | 0,59   | <(0,47) |
| <i>K. marxianus</i> CBS 6556     | 0,63   | 0,60    | 0,91    | 0,84   | 0,86    |
| <i>K. marxianus</i> ATCC 36907   | 0,62   | 0,60    | 0,51    | 0,50   | <(0,48) |

Quanto a comparação do crescimento nos diferentes valores de pH na temperatura de 45°C, podemos observar, que de modo geral, as linhagens que cresceram bem em pH 4,0 também tiveram o mesmo comportamento nos valores de pH maiores (5,0 e 6,0).

Os valores de  $\mu_{\max}$  h<sup>-1</sup> em YNB Inulina em pH 6,0 foram menores que os valores obtidos em pH 4,0 e 5,0. Isto está de acordo com a literatura que relata a forte influência do pH e em menor intensidade da temperatura na capacidade de utilizar inulina por leveduras. Como exemplo podemos citar que, somente em baixos valores de pH, *K. marxianus* var. *drosophilarium* e *K. marxianus* var. *vanudenii* são capazes de consumir inulina devido à localização da enzima, isto é, em pH ácido, a inulinase é secretada permitindo a utilização da inulina (ROUWENHORST *et alii.*, 1990; GUIRAUD & GAUZY 1990). Estes autores também indicam a influência do substrato e da composição do meio no processo de secreção da enzima.

ROUWENHORST *et alii.*(1988) constataram que a mais alta produção de inulinase encontra-se na faixa de temperatura entre 37 e 42°C para *K. marxianus* var. *marxianus* CBS 6556. Estes autores indicam que a faixa de temperatura ótima de produção da enzima corresponde à temperatura ótima de crescimento para este microrganismo. Os resultados obtidos neste trabalho, para esta mesma linhagem, são comparáveis aos já citados na literatura em condições semelhantes.

A tabela 10 mostra os resultados obtidos em meio complexo YEP acrescido de inulina nas diferentes condições de pH e temperatura. Pode-se notar que, tanto quantitativa como qualitativamente, o meio complexo foi menos apropriado para o cultivo destes isolados. Assim, somente 35 (46,0%) alcançaram  $\mu_{\max} \geq 0,50$  h<sup>-1</sup> em YEP Inulina pH 4,0 a 37°C, 20 (26,3%) a 42°C e 16 (21,0%) a 45°C. Mesmo nos valores de pH maiores (5,0 e 6,0), os resultados foram significativamente inferiores ao meio basal YNB Inulina.

Comportamento semelhante foi também observado por ROUWENHORST *et alii.* (1988) que constataram que, a utilização de meio complexo foi menos favorável à produção de inulinase que o meio mineral definido para *Kluyveromyces marxianus* e sugeriram que isto foi causado pela

ausência de uma verdadeira limitação de carbono quando extrato de levedura foi utilizado como fonte de nitrogênio e vitaminas.

**Tabela 10:** Valores de  $\mu_{\text{máx}}$  h<sup>-1</sup> em YEP Inulina 1% em diferentes pH e temperaturas

| Linhagens                         | pH 4,0 |      |         | pH 5,0  | pH 6,0  |
|-----------------------------------|--------|------|---------|---------|---------|
|                                   | 37°C   | 42°C | 45°C    | 45°C    | 45°C    |
| <i>Candida kefyr</i> A29          | 0,57   | <    | -       | -       | -       |
| <i>Candida kefyr</i> A32          | 0,51   | <    | -       | -       | -       |
| <i>Pichia strasburgensis</i> A35  | 0,59   | <    | -       | -       | -       |
| <i>Candida kefyr</i> A39          | 0,50   | <    | -       | -       | -       |
| <i>Candida lusitaniae</i> A41     | 0,67   | <    | -       | -       | -       |
| <i>Candida kefyr</i> A47          | 0,63   | 0,56 | 0,62    | 0,55    | 0,53    |
| <i>Candida guilhermondii</i> -A48 | 0,66   | 0,57 | 0,60    | 0,55    | 0,51    |
| <i>Candida lusitaniae</i> A49     | 0,52   | 0,51 | 0,57    | <(0,48) | <(0,42) |
| <i>Candida kefyr</i> A53          | 0,54   | <    | -       | -       | -       |
| <i>Candida kefyr</i> A54a         | 0,51   | 0,58 | 0,50    | 0,50    | 0,50    |
| <i>Candida kefyr</i> A56          | 0,63   | 0,62 | 0,57    | 0,57    | <(0,48) |
| <i>Candida kefyr</i> A57          | 0,60   | <    | <       | <       | <       |
| <i>Candida kefyr</i> A60          | 0,55   | 0,59 | 0,60    | 0,56    | <(0,45) |
| <i>Candida kefyr</i> A62          | 0,65   | <    | -       | -       | -       |
| <i>Rhodotorula rubra</i> A63      | 0,60   | 0,60 | <(0,43) | 0,51    | <(0,47) |
| <i>Candida kefyr</i> A64a         | 0,62   | 0,60 | <       | <       | <       |
| <i>Candida kefyr</i> A64b         | 0,60   | 0,58 | <       | <       | <       |
| <i>Candida kefyr</i> A67          | 0,63   | 0,59 | <       | <       | <       |
| <i>Candida kefyr</i> A68          | 0,65   | 0,57 | 0,53    | 0,53    | 0,51    |
| <i>Candida kefyr</i> A71          | 0,60   | <    | 0,53    | 0,52    | 0,53    |
| <i>Candida kefyr</i> A74          | 0,66   | <    | <(0,47) | 0,50    | <(0,46) |
| <i>Candida kefyr</i> A75          | 0,67   | 0,51 | <       | <       | <       |
| <i>Candida kefyr</i> A76          | 0,56   | <    | 0,52    | 0,53    | 0,50    |
| <i>Candida kefyr</i> A87          | 0,59   | 0,58 | <       | <       | <       |
| <i>Candida kefyr</i> A88          | 0,63   | 0,62 | <       | <       | <       |
| <i>Candida kefyr</i> A90          | 0,61   | 0,55 | 0,96    | 0,93    | 0,87    |
| <i>Candida kefyr</i> A91          | 0,60   | 0,58 | 0,82    | 0,83    | 0,79    |
| <i>Candida kefyr</i> A92          | 0,61   | 0,50 | 0,96    | 0,91    | 0,83    |
| <i>Candida kefyr</i> A93          | 0,65   | <    | 0,95    | 0,95    | 0,90    |
| <i>Candida kefyr</i> A94          | 0,58   | 0,61 | 0,84    | 0,84    | 0,82    |
| <i>Candida kefyr</i> A96          | 0,61   | 0,57 | 0,83    | 0,81    | 0,78    |
| <i>Candida kefyr</i> A97          | 0,60   | 0,55 | 0,84    | 0,81    | 0,74    |
| <i>Candida kefyr</i> A100         | 0,54   | <    | <       | <       | <       |
| <i>Candida kefyr</i> A101a        | 0,55   | <    | <       | <       | <       |
| <i>Candida kefyr</i> A101b        | 0,57   | <    | <       | <       | <       |
| <i>K. marxianus</i> CBS 6556      | 0,56   | 0,57 | 0,83    | 0,87    | 0,79    |
| <i>K. marxianus</i> -ATCC36907    | 0,55   | 0,52 | <       | <       | <       |

É interessante também observar que o crescimento em meio YNB acrescido do monômero frutose, foi menos intenso que no polímero inulina (tabela 11), possivelmente devido a ocorrência de repressão catabólica induzida pela frutose (ROUWENHORST *et alii.*, 1990).

**Tabela 11:** Valores de  $\mu_{\text{máx}} \text{ h}^{-1}$  em YNB Frutose 1% em diferentes pH e temperatura

| Cultura                          | pH 4,0 |       |       | pH 5,0   | pH 6,0   |
|----------------------------------|--------|-------|-------|----------|----------|
|                                  | 37 °C  | 42 °C | 45 °C | 45 °C    | 45 °C    |
| <i>Pichia strasburgensis</i> A29 | 0,57   | <     | -     | -        | -        |
| <i>Pichia strasburgensis</i> A32 | 0,51   | <     | -     | -        | -        |
| <i>Pichia strasburgensis</i> A35 | 0,59   | <     | -     | -        | -        |
| <i>Pichia strasburgensis</i> A39 | 0,50   | <     | -     | -        | -        |
| <i>Candida lusitaniae</i> A41    | 0,67   | <     | -     | -        | -        |
| <i>Candida kefir</i> A47         | 0,63   | 0,56  | 0,62  | 0,55     | 0,53     |
| <i>Candida guilhermondii</i> A48 | 0,66   | 0,57  | 0,60  | 0,55     | 0,51     |
| <i>Candida lusitaniae</i> A49    | 0,52   | 0,51  | 0,57  | < (0,48) | < (0,42) |
| <i>Candida kefir</i> A53         | 0,54   | <     | -     | -        | -        |
| <i>Candida kefir</i> A54a        | 0,51   | 0,58  | 0,50  | 0,50     | 0,50     |
| <i>Candida kefir</i> A56         | 0,63   | 0,62  | 0,57  | 0,57     | <        |
| <i>Candida kefir</i> A57         | 0,60   | <     | -     | -        | -        |
| <i>Candida kefir</i> A60         | 0,55   | 0,59  | 0,60  | 0,56     | <        |
| <i>Candida kefir</i> A62         | 0,65   | <     | -     | -        | -        |
| <i>Candida kefir</i> A64a        | 0,59   | 0,63  | 0,51  | <        | <        |
| <i>Candida kefir</i> A64         | 0,60   | 0,58  | <     | 0,64     | 0,59     |
| <i>Candida kefir</i> A67         | 0,63   | 0,59  | <     | <        | <        |
| <i>Candida kefir</i> A68         | 0,65   | 0,57  | 0,53  | 0,53     | 0,51     |
| <i>Candida kefir</i> A71         | 0,60   | <     | 0,53  | 0,52     | 0,53     |
| <i>Candida kefir</i> A74         | 0,66   | <     | <     | 0,50     | <        |
| <i>Candida kefir</i> A75         | 0,67   | 0,51  | <     | <        | <        |
| <i>Candida kefir</i> A76         | 0,56   | <     | 0,52  | 0,53     | 0,50     |
| <i>Candida kefir</i> A87         | 0,59   | 0,58  | <     | <        | <        |
| <i>Candida kefir</i> A88         | 0,63   | 0,62  | <     | <        | <        |
| <i>Candida kefir</i> A90         | 0,61   | 0,55  | 0,68  | 0,60     | 0,68     |
| <i>Candida kefir</i> A91         | 0,60   | 0,58  | 0,78  | 0,77     | 0,74     |
| <i>Candida kefir</i> A92         | 0,61   | 0,52  | 0,86  | 0,70     | 0,72     |
| <i>Candida kefir</i> A93         | 0,65   | <     | 0,78  | 0,77     | 0,72     |
| <i>Candida kefir</i> A94         | 0,58   | 0,61  | 0,71  | 0,81     | 0,71     |
| <i>Candida kefir</i> A96         | 0,61   | 0,57  | 0,79  | 0,80     | 0,77     |
| <i>Candida kefir</i> A97         | 0,60   | 0,55  | 0,79  | 0,77     | 0,72     |
| <i>Candida kefir</i> A100        | 0,52   | 0,55  | 0,60  | 0,51     | 0,50     |
| <i>Candida kefir</i> A101a       | 0,54   | 0,56  | 0,67  | 0,50     | <        |
| <i>Candida kefir</i> A101b       | 0,55   | 0,51  | <     | <        | <        |
| <i>K. marxianus</i> CBS 6556     | 0,56   | 0,57  | 0,73  | 0,78     | 0,73     |
| <i>K. marxianus</i> ATCC 36907   | 0,55   | 0,52  | <     | <        | <        |

A tabela 12 mostra os valores de  $\mu_{\max}$   $h^{-1}$  para as leveduras selecionadas previamente conforme tabela 9. O Anexo 3 apresentam figuras que ilustram as curvas de crescimento das leveduras nas microplacas referentes a estratégia de seleção nesta segunda etapa.

**Tabela 12:** Valores de  $\mu_{\max}$   $h^{-1}$  das linhagens em meio YNB Inulina 1% pH 4,0 em diferentes temperaturas

| Linhagens                         | 37°C | 42°C | 45°C | 47°C | 50°C |
|-----------------------------------|------|------|------|------|------|
| <i>Pichia strasburgensis</i> A26  | 0,58 | 0,72 | <    | -    | -    |
| <i>Pichia strasburgensis</i> A35  | 0,44 | 0,70 | <    | -    | -    |
| <i>Pichia strasburgensis</i> A39  | 0,53 | 0,57 | <    | -    | -    |
| <i>Candida lusitaniae</i> A43     | 0,54 | 0,58 | <    | -    | -    |
| <i>Candida kefyr</i> A47          | 0,50 | 0,70 | 0,63 | 0,60 | 0,63 |
| <i>Candida guilhermondii</i> -A48 | 0,42 | 0,54 | <    | -    | -    |
| <i>Candida lusitaniae</i> A49     | 0,52 | 0,64 | <    | -    | -    |
| <i>Candida lusitaniae</i> A52     | 0,56 | 0,74 | 0,50 | <    | -    |
| <i>Candida kefyr</i> A53          | 0,57 | 0,62 | <    | -    | -    |
| <i>Candida kefyr</i> A54a         | 0,69 | 0,77 | 0,60 | 0,57 | 0,78 |
| <i>Candida kefyr</i> A56          | 0,72 | 0,91 | 0,70 | 0,66 | 0,70 |
| <i>Candida kefyr</i> A57          | 0,50 | 0,58 | <    | -    | -    |
| <i>Candida kefyr</i> A59          | 0,53 | 0,69 | <    | -    | -    |
| <i>Candida kefyr</i> A60          | 0,69 | 0,83 | 0,65 | 0,56 | 0,73 |
| <i>Candida kefyr</i> A62          | 0,52 | 0,69 | 0,50 | 0,67 | 0,64 |
| <i>Candida kefyr</i> A64a         | 0,61 | 0,74 | 0,65 | 0,58 | 0,79 |
| <i>Candida kefyr</i> A64b         | 0,56 | 0,67 | <    | -    | -    |
| <i>Candida kefyr</i> A67          | 0,56 | 0,69 | 0,70 | 0,51 | 0,74 |
| <i>Candida kefyr</i> A68          | 0,60 | 0,77 | 0,65 | 0,73 | 0,81 |
| <i>Candida kefyr</i> A70          | 0,49 | 0,60 | <    | -    | -    |
| <i>Candida kefyr</i> A71          | 0,58 | 0,78 | 0,56 | <    | -    |
| <i>Candida kefyr</i> A72          | 0,58 | 0,57 | <    | -    | -    |
| <i>Candida kefyr</i> A74          | 0,60 | 0,89 | 0,71 | <    | -    |
| <i>Candida kefyr</i> A75          | 0,67 | 0,86 | 0,55 | 0,54 | 0,70 |
| <i>Candida kefyr</i> A76          | 0,47 | 0,80 | 0,64 | 0,62 | 0,79 |
| <i>Candida kefyr</i> A78          | 0,46 | 0,50 | <    | -    | -    |
| <i>Candida kefyr</i> A82          | 0,49 | 0,63 | <    | -    | -    |
| <i>Candida kefyr</i> A87          | 0,69 | 0,72 | 0,69 | 0,54 | 0,80 |
| <i>Candida kefyr</i> A88          | 0,56 | 0,75 | 0,75 | 0,71 | 0,72 |
| <i>Candida kefyr</i> A90          | 0,70 | 0,79 | 0,66 | 0,77 | 0,74 |
| <i>Candida kefyr</i> A91          | 0,58 | 0,58 | 0,65 | 0,63 | 0,73 |
| <i>Candida kefyr</i> A92          | 0,68 | 0,68 | 0,56 | 0,63 | 0,65 |
| <i>Candida kefyr</i> A93          | 0,61 | 0,87 | 0,76 | 0,60 | 0,69 |
| <i>Candida kefyr</i> A94          | 0,51 | 0,80 | 0,76 | 0,58 | 0,76 |
| <i>Candida kefyr</i> A96          | 0,53 | 0,67 | 0,82 | 0,56 | 0,90 |
| <i>Candida kefyr</i> A97          | 0,52 | 0,66 | 0,77 | <    | 0,77 |
| <i>Candida kefyr</i> A100         | 0,50 | 0,60 | <    | -    | -    |
| <i>Candida kefyr</i> A101a        | 0,46 | 0,65 | 0,63 | 0,56 | 0,60 |
| <i>Candida kefyr</i> A101b        | 0,46 | 0,54 | <    | -    | -    |
| <i>K. marxianus</i> CBS 6556      | 0,70 | 0,84 | 0,75 | 0,66 | 0,75 |

Das 39 linhagens selecionadas, 20 (51,3%) apresentaram um crescimento considerável na maior temperatura testada (50°C). Os valores da constante específica de crescimento variaram de 0,63 a 0,90 h<sup>-1</sup>, estes valores são comparáveis e até melhores que o valor encontrado para a linhagem *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 que foi de 0,75 h<sup>-1</sup>.

Estes resultados indicam estas 20 linhagens como promissoras para a produção da enzima inulinase.

#### **4.4. Atividade de Inulinase das Leveduras Selecionadas**

Foram realizados os testes de atividade enzimática para as 20 linhagens que apresentaram crescimento significativo a 50°C. Utilizou-se como meio de produção YNB acrescido de 1% de inulina pH 5,5, esterilizado por filtração (MILLIPORE - 0,22 µm) e como inóculo 1% de cultura, após duas passagens no mesmo meio. A atividade enzimática foi expressa em unidades que correspondem a quantidade de enzima capaz de hidrolizar 1 µmol de frutose por minuto, nas condições de ensaio.

Oito (8) das vinte (20) linhagens selecionadas não apresentaram crescimento no meio YNB Inulina 1% esterilizado por filtração. Uma possível explicação para este fato é que o processo de esterilização por filtração não ocasiona hidrólise parcial da inulina, enquanto na esterilização por autoclavagem pode ocorrer hidrólise do polímero com liberação de moléculas menores que podem ser mais facilmente utilizadas por estas linhagens que não cresceram nesta nova condição.

A tabela 13 mostra os resultados obtidos para a atividade de inulinase no sobrenadante da cultura após o período de incubação indicado e também a atividade inulolítica resultante do tratamento das células, indicada como enzima ligada à parede.

**Tabela 13:** Atividade de inulinase encontrada no sobrenadante e da enzima ligada à parede das leveduras em 12, 18 e 24 horas de cultivo em meio YNB Inulina 1% pH 5,5 a temperatura de 37°C.

| Linhagens                      | 12 h   |      | 18 h |      | 24 h |      |
|--------------------------------|--------|------|------|------|------|------|
|                                | s*     | p*   | s    | p    | s    | p    |
| <i>K. marxianus</i> CBS 6556   | 0,76** | 0    | 0,07 | 2,55 | 0    | 1,40 |
| <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 | 0,05   | 0    | 0,44 | 0,28 | 0,13 | 0,26 |
| <i>Candida kefyr</i> A54a      | 0,76   | 1,54 | 0,09 | 1,60 | 0    | 0,67 |
| <i>Candida kefyr</i> A56       | 0,76   | 1,02 | 0,09 | 1,25 | 0    | 0,83 |
| <i>Candida kefyr</i> A60       | 0,67   | 1,02 | 0,09 | 1,65 | 0    | 0,97 |
| <i>Candida kefyr</i> A68       | 0,67   | 0,85 | 0,03 | 0,97 | 0    | 0,44 |
| <i>Candida kefyr</i> A71       | 0      | 0,74 | 0,09 | 0,70 | 0    | 0,40 |
| <i>Candida kefyr</i> A87       | 0,81   | 0,20 | 0,42 | 1,22 | 0    | 0,55 |
| <i>Candida kefyr</i> A88       | 0,79   | 0,34 | 0,28 | 1,32 | 0    | 0    |
| <i>Candida kefyr</i> A90       | 0,67   | 1,11 | 0,03 | 0,72 | 0    | 0,32 |
| <i>Candida kefyr</i> A92       | 0,65   | 0,65 | 0,07 | 0,61 | 0    | 0,26 |
| <i>Candida kefyr</i> A93       | 0,63   | 0,97 | 0,03 | 0,61 | 0    | 0,42 |
| <i>Candida kefyr</i> A94       | 0,63   | 1,17 | 0,03 | 0,83 | 0    | 0,92 |
| <i>Candida kefyr</i> A97       | 0,79   | 0,74 | 0,09 | 1,00 | 0    | 0    |

\* “s” enzima do sobrenadante; “p” enzima ligada à parede

\*\* valores expressos em unidades de inulinase (U)

As linhagens CBS 6556 e ATCC 36907 de *Kluyveromyces marxianus* foram utilizadas como referência. No entanto, a linhagem ATCC 36907 apresentou valores de atividade muito baixos nas condições testadas. A linhagem CBS 6556 apresentou boa atividade, principalmente, a fração ligada à parede em 18 e 24 horas de cultivo.

As doze linhagens de *Candida kefyr* isoladas de agave apresentaram valores, proporcionalmente, significativos de enzima tanto no sobrenadante como a enzima ligada à parede, especialmente, com 12 horas de cultivo, com exceção da linhagem A71 que não apresentou atividade detectável no sobrenadante. Com 18 horas de cultivo, a atividade enzimática é predominantemente devido à fração enzima ligada à parede, enquanto, em 24 horas de cultivo, praticamente, o total da atividade observada refere-se à esta fração. No Anexo 4 é apresentada graficamente a performance das leveduras quanto a atividade enzimática de inulinase.

Na tabela 14, são mostrados os valores de atividade de inulinase total, isto é, o somatório da fração do sobrenadante e a fração ligada à parede para as mesmas linhagens. O Anexo 4 apresenta os valores de atividade enzimática calculados por volume de meio de produção (U/mL).

**Tabela 14:** Atividade de inulinase total em unidades das leveduras em 12, 18 e 24 horas de cultivo em meio YNB Inulina 1% pH 5,5 a 37°C

| Linhagens                      | 12 h | 18 h | 24 h |
|--------------------------------|------|------|------|
| <i>K. marxianus</i> CBS 6556   | 0.76 | 2,63 | 1,40 |
| <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 | 0.05 | 0.72 | 0.40 |
| <i>Candida kefyr</i> A54a      | 2.31 | 1.69 | 0.68 |
| <i>Candida kefyr</i> A94       | 1.80 | 0.87 | 0.93 |
| <i>Candida kefyr</i> A56       | 1.79 | 1.34 | 0.83 |
| <i>Candida kefyr</i> A90       | 1.79 | 0.76 | 0.32 |
| <i>Candida kefyr</i> A60       | 1.74 | 1.75 | 0.97 |
| <i>Candida kefyr</i> A93       | 1.61 | 0.65 | 0.42 |
| <i>Candida kefyr</i> A97       | 1.53 | 1.09 | 0.72 |
| <i>Candida kefyr</i> A68       | 1.53 | 1.01 | 0.44 |
| <i>Candida kefyr</i> A92       | 1.31 | 0.68 | 0.26 |
| <i>Candida kefyr</i> A88       | 1.12 | 1.61 | 0    |
| <i>Candida kefyr</i> A87       | 1.01 | 1.64 | 0.55 |
| <i>Candida kefyr</i> A71       | 0.74 | 0.79 | 0.40 |

As linhagens de *Candida kefyr* testadas apresentaram valores de atividade enzimática inferiores à linhagem CBS 6556 para 18 e 24 horas de cultivo. Entretanto, com apenas 12 horas de cultivo, a maioria (11 linhagens) mostraram atividade superior ao valor encontrado para a cultura referência CBS 6556 neste período.

A linhagem A54a apresentou atividade de 2,31 U, considerada significativa e comparável à atividade citada pela literatura para esta linhagem CBS 6556 com 24 horas de cultivo.

Todas as linhagens testadas apresentaram ação exoinulolítica, isto é, o produto da reação enzimática foi exclusivamente frutose verificado pela realização de cromatografia descendente em papel.

Estes resultados preliminares indicam estas linhagens como promissoras para a produção de inulinase devido ao menor tempo de produção. No entanto, as condições de cultivo e estratégias de otimização da produção devem ser investigadas. Estas linhagens que já naturalmente apresentam crescimento significativo utilizando inulina como fonte de carbono em pH 4,0 e temperatura de 50°C podem também ser melhoradas geneticamente quanto à produtividade e eficiência de secreção da enzima inulinase.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. Foram isoladas 79 leveduras a partir de suco de *Agave* e resíduos da indústria de sisal em condições seletivas (meio contendo inulina como fonte de carbono e temperaturas elevadas);
2. Foram identificadas cinco espécies de levedura que não apresentaram reprodução sexuada: 42 linhagens de *Candida kefir*, 14 de leveduras semelhantes a *Pichia strasburgensis*, 11 de *Candida lusitanae*, 6 de *Candida guilhermondii* e 6 de *Rhodotorula rubra*;
3. A determinação do tipo de coenzima-Q (quinona), técnica quimiotaxonômica, foi importante para a definição dos gêneros na ausência da observação das características da reprodução sexuada;
4. A utilização da taxonomia numérica proporcionou a observação de grupos apresentando coenzimas Q<sub>6</sub> que reuniu 18 linhagens de *Candida kefir* que fermentaram inulina; Q<sub>7</sub> que reuniu 12 linhagens identificadas como semelhantes à *Pichia strasburgensis* e Q<sub>10</sub> que agrupou as 6 linhagens identificadas como *Rhodotorula rubra*;
5. A utilização das chaves dicotômicas convencionais e a taxonomia numérica revelaram a semelhança entre as várias espécies, com exceção de *Rhodotorula rubra*, quanto às características fenotípicas (morfológicas e bioquímicas) entre as espécies *Candida kefir*, *Candida guilhermondii*, *Candida lusitanae* e *Pichia strasburgensis* “like” que foram agrupadas com 80% de similaridade num “cluster” denominado Major;
6. A realização da seleção das linhagens promissoras foi bem sucedida tanto pela utilização do sistema “MT-reader” acoplado ao microprocessador, como pela estratégia utilizada, isto é, crescimento em temperatura elevada e diferentes valores de pH;

7. Foram selecionadas 20 linhagens de leveduras que apresentaram constante específica de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ )  $\geq 0,50$  em meio mínimo YNB Inulina 1% pH 4,0 a 50°C;
8. Onze linhagens de *Candida kefyr* apresentaram produção de inulinase maior que a cultura referência *Kl. marxianus* CBS 6556 com 12 horas de cultivo;
9. A linhagem *Candida kefyr* A54a apresentou atividade enzimática de 2,31 U em tempo menor (12 horas) comparável ao melhor resultado obtido para *Kl. marxianus* CBS 6556 de 2,63 U em 18 horas de cultivo, colocando esta linhagem com potencial de aplicação;
10. Mais estudos de caracterização taxonômica devem ser realizados especialmente com os isolados semelhantes a *Pichia strasburgensis*;
11. Vários estudos de otimização da produção de inulinase, bem como caracterização bioquímica da enzima e melhoramento genético devem ser realizados com as onze linhagens promissoras.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLAIS, J.J.; KAMMOUN, S.; BLANC, P.; GIRARD, C. ; BARATTI, J.C . Isolation and Characterization of Bacterial Strains with Inulinase Activity. Applied Environmental Microbiology, Washington, v. 52, n. 5, p.1086-1090, nov. , 1986.
2. ALLAIS, J.J.; HOYOS-LOPEZ, G.; KAMMOUN, S. ; BARATTI, J.C. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacterial Strains with Inulinase Activity. Applied Environmental Microbiology, Washington, v. 53, n. 4, p. 942-945, abr. , 1987.
3. ALVES, M.I.C. Processo de Produção de Xarope de Frutose a partir de Alcachofra Jerusalém. Fortaleza, 1989. 67p. Monografia (Especialização em Processos Químicos).- Universidade Federal do Ceará.
4. ASHOUR, M-B. A., GEE, S.J. ; HAMMOCK, B.D. Use of a 96-well Microplate Reader for Measuring Routine Enzyme Activities. Analytical Biochemistry, San Diego, v. 166, n. 2, p. 353-360, nov., 1987.
5. AUGUSTYN, O.P.H.; KOCK, J.L.F. ; FERREIRA, D. Differentiation between Yeast Species and Strains within a Species by Cellular Fatty Acid Analysis. 3. *Saccharomyces sensu lato*, *Arxiozyma* and *Pachytichospora*. Systematic and Applied Microbiology, Stuttgart, v. 13, n.1, p. 44-55, jan. , 1990.
6. AZHARI, R.; SZLAK, A.M.; ILAN, E.; SIDEMAN, S. ; LOTAN, N. Purification and Characterization of Endo- and Exo-Inulinase. Biotechnological and Applied Microbiology, v. 11, p. 105-117, 1989.
7. BAJPAI, P. ; BAJPAI, P.K. Cultivation and Utilization of Jerusalem Artichoke for Ethanol, Single Cell Protein and High-fructose Syrup Production. Enzyme Microbial Technology, Nova York, v. 13, n. 4, p. 359-362, abr. , 1991.

8. BAJON, A.M. Isolation of an Inulinase Derepressed Mutant of *Pichia polymorpha* for the Production of Fructose. Biotechnological and Bioengineering, Nova York, v. 26, n. 2, p. 128-133, fev. , 1984.
9. BARKER, S.A. High Fructose Syrups - New Sweeteners in the Food Industry. Process Biochemistry, v. 10, p. 39-42, 1975.
10. BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W ; YARROW, D. Yeasts, Characteristics and Identification. 1 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1983. 811 p.
11. BARNETT, J.A. PAYNE, R.W. ; YARROW, D. Yeasts, Characteristics and Identification. 2 ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1990. 1002 p.
12. BECK, R.H.F. ; PRAZNIK, W. Inulinhaltige Pflanzenals Rohstoffquelle, Biochemische und Pflanzenphysiologische Aspekte. Starch/Starke, Weinheim, v. 38, n. 11,p. 391-394, nov., 1986.
13. BENDOÁ, O.; RICHTER, V.; JANDEROVÁ, B. ; HAUSTER, J. Identification of Industrial Yeast Strains of *Saccharomyces cerevisiae* by Fatty Acid Profiles. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlim, v. 35, n. 6, p. 810-812, set., 1991.
14. BEUTLER, H.O. Frutose. In: BERGMAYER, H.U. Methods of Enzymatic Analysis. 3 ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1984. v. 6, p. 321-327.
15. BHATIA, I.S. ; NANDRA, K.S. Studies on Fructosyl Transferase from *Agave americana*. Phytochemistry, v. 18, p. 923-927, 1979.
16. BLUNDEN, G.; CULLING, C. ; JEWERS, K. Steroidal Sapogenins, a Review of Actual and Potential Plant Sources. Tropical Science, Londres, v. 17, n.3, p. 139-154, 1982.
17. BOCHNER,B.R. Sleuting Out Bacterial Identities. Nature, v. 339, n. 6220, p. 157-158, 1989.

18. BOTHA, A. ; KOCK, J.L.F. Application of Fatty Acid Profiles in the Identification of Yeasts. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 39-51, jun., 1993.
19. BOURGI, J.; GUIRAUD, J.P. ; GALZY, P. Isolation of a *Kluyveromyces fragilis* Derepressed Mutant Hyperproducer of Inulinase for Ethanol Production from Jerusalem Artichoke. Journal of Fermentation and Technology, Osaka, v. 64, n. 3, p. 239-243, jun. , 1986.
20. BRONDZ, I. ; OLSEN, I. ; SJOSTROM, M. Gas Chromatographic Assessment of Alcoholized Fatty Acids from Yeasts, A New Chemotaxonomic Method. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 27, n. 12, p. 2815-2819, dez., 1989.
21. BUTLER, E.G., GILL, R. ; GARYCH, A. A semiautomated System for Measurement of 96 Simultaneous Spectrophotometric Enzyme Assays. Analytical Biochemistry, San Diego, v. 170, n. 2, p. 402-408, mai. , 1988.
22. BYUN, M. ; NAHN, B.H. Production of Fructose from Jerusalem Artichoke by Enzymatic Hydrolysis. Journal of Food Science, Chicago, v. 43, p. 1871-1873, 1978.
23. CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P.; BLAINE, L.D. Software Tools and Databases for Bacterial Systematics and their Dissemination Via Global Networks. Antonie van Leeuwenhoek, Dordrecht, v. 64, p. 205-229, 1993.
24. CARNAHAN, A.M.; JOSEPH, S.W.; JANDA, J.M. Species Identification of *Aeromonas* Strains Based on Carbon Substrate Oxidation Profiles. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 27, n. 9, p. 2128-2129, set., 1989.
25. CARNITI, P.; BELTRAME, P. L.; GUARDIONE, D.; FOCHER, B. ; MARZETTI, A. Hydrolysis of Inulin, A Kinetic Study of the Reaction Catalyzed by an Inulinase from *Aspergillus ficuum*. Biotechnology and Bioengineering, Nova York, v. 37, n. 3, p. 575-579, mar. , 1991.
26. CEDENO, C.M. Tequila Production. Critical Reviews in Biotechnology, Boca Raton, v. 15, n. 1, p. 1-11, mar., 1995.

27. CHAPLIN, M.F. Monossaccharides. In: CHAPLIN, M.F.; KENNEDY, J.F.  
Carbohydrate Analysis, a practical approach. 1 ed. Oxford: IRL Press, 1986.  
p. 1-36. (Practical Approach Series).
28. CHEETHAM, P.S.J. Screening for Novel Biocatalysts. Enzyme Microbial  
Technology, Nova York, v. 9, n.4, p. 194-213, abr. , 1987.
29. CHEN, P.K.; HALL, A.C.; WHEELER, E.E.; CHORGHAD, M.S.; HAMMER, C.F.  
Steroids Production by *Agave sisalana* Tissue Culture. Plant Physiology, v. 77, n. 4,  
Suppl., p. 13-16, 1985.
30. CHUN, J. Computer-assisted Classification and Identification of Actinomycetes.  
Newcastle upon Tyne, 1995. 187 p. Tese (Doctor of Philosophy) - Department of  
Microbiology, The Medical School Newcastle upon Tyne, Inglaterra, Reino Unido.
31. CHUNG, B.H.; KIM, M.B.; NAM, S.W. The Use of Inulinase Pre-pro Leader Peptide for  
Secretion of Heterologous Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnological  
Letters, Londres, v. 18, n. 6, p. 627-632, jun. , 1996a.
32. CHUNG, B.H.; NAM, S.W.; KIM, B.M.; PARK, Y.H. Highly Efficient Secretion of  
Heterologous Proteins from *Saccharomyces cerevisiae* Using Inulinase Signal  
Peptides. Biotechnology and Bioengineering, Nova York, v. 49, n. 4, p. 473-479,  
fev. , 1996b.
33. COTTRELL, M.; KOCK, J.L.F.; LATEGAN, P.M.; BOTES, P.J ; BRITZ, T.J. The  
Long-Chain Fatty Acid Compositions of Species Representing the genus  
*Kluyveromyces*. FEMS Microbiological Letters, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 373-376,  
dez. , 1985.
34. CRIBB, A.E.; LEEDER, J.S.; SPIELBERG, S.P. Use of a Microplate Reader in an  
Assay of Glutathione Reductase Using 5,5' Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid).  
Analytical Biochemistry, San Diego, v. 183, n. 1, p. 195-196, nov., 1989.

35. CRUZ-GURRERO, A.; GARCIA-PENA, I.; BARZANA, E.; GARCIA-GARIBAY, M.; GOMEZ-RUIZ, L. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278, a Wild Inulinase Hyperproducing Strain. Journal of Fermentation and Bioengineering, Osaka, v. 80, n. 2, p. 159-163, mar., 1995.
36. DERYCKE, D.G. ; VANDAMME, E.J. Production and Properties of *Aspergillus niger* Inulinase EC 3.2.1.7. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Cambrigde, v. 34, n.1, p. 45-51, jan., 1984.
37. DRENT, W.J. ; GOTTSCHAL, J.C. Fermentation of Inulin by a New Strain of *Clostridium thermoautotrophicum* Isolated from *Dahlia* Tubers. FEMS Microbiological Letters, Amsterdam, v. 78, n. 2/3, p. 285-292, mar., 1991.
38. ECHEVERRIGARAY, S. ; TAVARES, F.C.A. Atividade da Inulinase em Leveduras e Fermentações de Extratos de *Helianthus tuberosus* L. Revista de Microbiologia, São Paulo, v. 16, p. 127-131, 1985.
39. EFSTATHIOU, I.; REYSSET, G. ; TRUFFAUT, N. A Study of Inulinase Activity in the *Clostridium acetobutylicum* Strain ABKn8. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlim, v. 25, n.2, p. 143-149, nov., 1986.
40. ELYACHIOUI, M.; HORNEZ, J.P.; TAILLIEZ, R. General Properties of Extracellular Bacterial Inulinase. Journal Applied of Bacteriology, Oxford, v. 73, n. 6., p. 514-519, dez., 1992.
41. ESMON, B.O.; SCHAMER, I.E.; TAYLOR, A. ; SCHEKMAN, R. Structure, Assembly and Secretion of Octameric Invertase. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 262, n.9, p.4387-4394, mar., 1987.
42. ETTALIBI, M. ; BARATTI, J.C. Molecular and Kinetic Propeties of *Aspergillus ficuum* Inulinases. Agricultural and Biological Chemistry, Tóquio, v. 54, n. 1, p. 61-68, jan., 1990.

43. ETTALIBI, M. ; BARATTI, J.C. Purification, Properties and Comparison of Invertase, Exoinulinases and Endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlim, v. 26, n.1, p. 13-20, abr., 1987.
44. FALCÃO, J.E. Forragem de Sisal. Alternativa no Semi-Árido. João Pessoa, 1983. 124p. Tese (Mestrado em Engenharia de Produção).- Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba.
45. FELL, J.W. ; KURTZMAN, C.P. Nucleotide Sequence Analysis of a Variable Region of the Large Subunit rRNA for Identification of Marine Occurring Yeasts. Current Microbiology, Nova York, v. 21, n.5, p. 295-300, nov., 1990.
46. FLEMING, S.E. ; GROOTWASSINK, J.W.D. Preparation of High-fructose Syrups from the Tubers of the Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, v. 12, n. 1, p. 1-28, fev., 1979.
47. FLORINI, J.R. Assay of Creatine Kinase in Microtiter Plates Using Thio-NAD to Allow Monitoring at 405 nm. Analytical Biochemistry, San Diego, v. 182, n.2, p.399-404, nov., 1989.
48. FRUIN, J.C. ; SCALLET, B.L. Isomerized Corn Syrups in Food products. Food Technology, Chicago, v. 11, p. 40-45, nov., 1975.
49. FRYER, H.J.L.; DAVIS, G.E.; MANTHORPE, M. ; VARON, S. Lowry Protein Assay Using an Automatic Microtiter Plate Spectrophotometer. Analytical Biochemistry, San Diego, v.153, n. 2, p. 262-266, mar., 1986.
50. FUCHS, A.; DE BRUUN, J.M. ; NIEDEVELD, C.J. Bacteria and Yeasts as Possible Candidates for the Production of Inulinases and Levanases. Antonie van Leeuwenhoek, Dordrecht, v. 51, n.3, p. 333-343, nov., 1985.

51. GERRITS,P.M.; TSALIKIAN,E. Diabetes and Fructose Metabolism. American Journal of Clinical Nutrition, v. 58(suppl.), p. 796S-799S, 1993.
52. GOODFELLOW,M.; JONES,D.; PRIEST,F.G. Computer-assisted Bacterial Systematics. 1 ed. Academic Press, Londres, 1985. 443 p.
53. GOODFELLOW, M. Numerical Taxonomy. *In: Biology of the Procaryotes*. SCHLEGEL, H.G. & LENGELER, .W. Georg Thieme Verlag, Sttugart, 1995.
54. GORDEN,R.W.; HAREN,T.C.; FLIERMANS,C.B. Rapid Screening for Bacteria Capable of Degrading Toxic Organic Compounds. Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 18, n. 4, p. 339-347, dez., 1993.
55. GROOTWASSINK, J.W.D. ; HEWITT, G.M. Inducible and Constitutive Formation of  $\beta$ -fructofuranosidase (Inulase) in Batch and Continuous Cultures of the Yeast *Kluyveromyces fragilis*. Journal of General Microbiology, Londres, v. 129, n. 1, p. 31-41, jan., 1983.
56. GUEGUEN, Y.; CHEMARDIN, P.; ARNAUD, A.; GALZY, P. Comparative Study of Extracellular and Intracellular Beta-glucosidases of a New Strain of *Zygosaccharomyces bailii* Isolated from Fermenting Agave Juice. Journal of Applied Bacteriology, Cambridge, v. 78, n. 3, p. 270-280, mar., 1995.
57. GUEGUEN, Y.; CHEMARDIN, P.; ARNAUD, A.; GALZY, P. Purification and Characterization of the Endocellular Beta-glucosidase of a New Strain of *Candida entomophila* Isolated from Fermenting Agave (*Agave* sp) Juice. Biotechnology and Applied Biochemistry, Londres, v. 20, n. 2, p. 185-198, out., 1994.
58. GUILLAMÓN, J.M.; QUEROL, A.; JIMÉNEZ, M. ; HUERTA, T. Phylogenetic Relationships Among Wine Yeast Strains Based on Electrophoretic Whole-cell Protein Patterns. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 18, n.2, p. 115-125, mar., 1993.

59. GUIRAUD, J.P.; BERNIT, C. ; GALZY, P. Study of Inulinase of *Debaryomyces cantarellii*. Folia Microbiologica, Praga, v. 27, n. 1, p. 19-24, 1982.
60. GUIRAUD, J.P.; DAURELLES, J. ; GALZY, P. Alcohol Production from Jerusalem Artichoke Using Yeasts with Inulinase Activity. Biotechnology and Bioengineering, Nova York, v. 23, n. 7, p. 1461-1465, jul., 1981a.
61. GUIRAUD, J.P.; DEVILLE-DUC, T. ; GALZY, P. Selection of Yeast Strains for Ethanol Production from Inulin. Folia Microbiologica, Praga, v. 26, n. 2, p. 147-150, 1981b.
62. GUIRAUD, J.M. ; GALZY, P. Inulin Conversion by Yeasts. In: VERACHTERT, H. ; DEMOT, R. Yeast Biotechnology and Biocatalysis. Nova York : Marcell Dekker Inc., 1990. p.255-296.
63. GUIRAUD, J.P.; MOVILLET, D.; BOURGI, J.; CLAISSE, M. ; GALZY, P. Impairment of Inulin Assimilation and  $\beta$ -fructosidase Activity due to a Petit Mutation in *Kluyveromyces marxianus*. Antonie van Leeuwenhoek, Dordrecht, v. 54, n. 2, p. 127-138, mar., 1988.
64. GUIRAUD, J.P.; VIARD-GAUDIN, C. ; GALZY, P. Etude de L'inulinase de *Candida salmenticens* van Uden et Buckley. Agricultural and Biological Chemistry, Tóquio, v. 44, n. 6, p. 1245-1252, jun., 1980.
65. GUPTA, A.K.; GILL,A.; KAUR,N.; SINGH,R. High Thermal Stability of Inulinase from *Aspergillus* Species. Biotechnological Letters, Londres, v. 16, n. 7, p. 733-734, jul., 1994.
66. GUPTA, A.K.; NAGPAL, B.; KAUR, N. ; SINGH, R. Mycelial and Extracellular Inulinases from *Fusarium oxysporum* Grown on Aqueous Extract of *Cichorium intybus* Roots. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Cambridge, v. 42, n. 1, p. 69-76, 1988.

67. GUPTA, A.K.; SINGH, D.P.; KAUR, N.; SINGH, R. Production, Purification and Immobilization of Inulinase from *Kluyveromyces fragilis*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Cambridge, v. 59, n. 4, p. 377-385, 1994.
68. HAGLER, A.N. Ecologia e Taxonomia de Leveduras em um Estuário Poluído e Ambientes Marinhos do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1978. 440 p. Tese (Doutorado em Microbiologia).- Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
69. HALLFRISCH, J. Metabolic Effects of Dietary Fructose. Faseb Journal, Lancaster, v. 4, n. 9, p. 2652-2660, jun., 1990.
70. HANOVER, L.M.; WHITE, J.S. Manufacturing, Composition and Application of Fructose. American Journal of Clinical Nutrition, v. 58(suppl.), p. 724S-732S, 1993.
71. HANSSSENS, T.R. ; KOERTS, K. Ultrafiltration Used in a Novel Flexible Process to Produce High Fructose Syrup from Different Raw Material. In: CLARCKE, M. ; GODSHALL, M.A. Chemistry and Processing of Sugarbeet and Sugarcane. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1988. p.127-138.
72. HARAGUCHI, K.; KISHIMOTO, M.; SEKI, K.; HAYASHI, K.; KOBAYASHI, S. ; KAINUMA, K. Purification and Properties of Inulin Fructotransferase (Depolymerizing) from *Arthrobacter globiformis* C11-1. Agricultural and Biological Chemistry, Tóquio, v. 52, n. 1, p. 291-292, jan., 1988.
73. HEARD, G.M. ; FLEET, G.H. A. Convenient Microtiter Tray Procedure for Yeast Identification. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, v. 68, n. 5, p. 447-451, mai., 1990.
74. HENSING, M.C.M.; VROUWENVELDER, J.S.; HELLINGA, C.; BAARTMANS, R. DIJKEN, H. Production of extracellular Inulinase in High-cell-density fed-batch Cultures of *Kluyveromyces marxianus*. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlim, v.42, n. 5, p. 516-521, jan., 1994.

75. HENSING, M.C.M.; VROUWENVELDER, J.S.; HELLINGA, C.; DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Use of Chemostat Data for Modeling Extracellular-inulinase Production by *Kluyveromyces marxianus* in a High-cell-density Fed-batch Process. Journal of Fermentation and Bioengineering, Osaka, v. 79, n. 1, p. 54-58, jan., 1995.
76. HERMAN, L.P. ; GUIRAUD, J.M. Production de Sirops Enrichis en Fructose par Fermentation d'Extraits de Topinambur. Belgian Journal of Food, Chemistry and Biotechnology, Bruxelas, v. 45, n. 3, p. 92-97, jun., 1990.
77. HEWITT, L. Digesting the Sweetner Factor. Food Manufacture, Londres, v. 68, n. 1, , p. 19-21, jan., 1993.
78. HEWITT, G.M.; GROOTWASSINK, J.W.D. Simultaneous Production of Inulinase and Lactase in Batch and Continuous of *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme Microbial Technology, Nova York, v. 6, n. 6, p. 263-270, jun., 1984.
79. HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M. ; SEMI, N. A Fructooligosaccharide-producing Enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. Agricultural and Biological Chemistry, Tóquio, v. 52, n. 5, p. 1181-1187, mai., 1988.
80. HIECHTER, A.; FUHRMANN, G.F.; KAPPELI, O. Regulation of Glucose Metabolism in Growing Yeast Cells. In: ROSE, A.H.; MORRIS, J.G. Advances in Microbial Physiology, Londres: Academic Press, 1981. v. 22, p. 123-183.
81. INDRAYANTO, G.; RAHAYU, L.; RAHMAN, A.; NOERAENI, P.E. Effect of Calcium, Strontium and magnesium Ions on the Formation of Phytosteroids in Callus Cultures of *Agave amaniensis*. Planta-Medicine, v. 59, n. 1, p. 97-98, 1993.
82. ISON, R.W. A Revised Method for the Application of API 50 CH Carbohydrate Kits to Yeasts. Letters in Applied Microbiology, Oxford, v. 4, n. 1, p. 9-11, jan., 1987.

83. KANG, H.A.; NAM, S.W.; KWON, K.S.; CHUNG, B.H.; YU, M.H. High-level Secretion of Human Alpha1-antitrypsin from *Saccharomyces cerevisiae* Using Inulinase Signal Sequence. Journal of Biotechnology, Amsterdam, v. 48, n. 1/2, p. 15-24, jun., 1996.
84. KIM, W.; BYUN, S.M.; UHM, T.B. Hydrolysis of Inulin from Jerusalem Artichoke by Inulinase Immobilized on Aminoethylcellulose. Enzyme Microbial Technology, Nova York, v. 4, n. 4, p. 239-244, jul., 1982.
85. KIM, K.Y.; KANG, S.I.; KIM, S.I. Production of a Novel Endo-inulinase from *Arthrobacter* sp. S37. Agricultural Chemistry and Biotechnology, Tóquio, v. 59, n. 2, p. 99-103, fev., 1996.
86. KIM, M.K.; KIM, Y.H.; KIM, H.R.; KIM, B.I.; BYUN, S.M.; UHM, T.B. Thermal Stability of an Acidic Inulinase from *Scystaldidium acidophilum*. Biotechnological Letters, Londres, v. 16, n. 9, p. 965-966, set., 1994.
87. KIM, C.H. ; RHEE, S.K. Fructose Production from Jerusalem Artichoke by Inulinase Immobilized on Chitin. Biotechnological Letters, Londres, v. 11, n. 3, p. 201-206, mar., 1989.
88. KIRSOP, B.E; SNELL, J.J.S. Maintenance of Microorganisms, A Manual of Laboratory Methods. Londres: Academic Press, 1984. 207p.
89. KOCK, J.L.F.; LATEGAN, P.M.; BOTES, P.J. ; VILJOEN, B.C. Developing a Rapid Statistical Identification Process for Different Yeast Species. Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 4, n.2, p. 147-154, out., 1985.
90. KOCK, J.L.F.; COTTRELL, M. ; LATEGAN, P.M. A Rapid Method to Differentiate Between Species of the Genus *Kluyveromyces*. Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 4, n. 4, p.299-302, dez., 1986.

91. KREGER-VAN RIJ, N.J.W. Generic Differentiation in Yeasts. In: SKINNER, PASSMORE; DAVENPORT. Biology and Activities of Yeasts. 1 ed. Londres. Academic Press, 1980. p.29-52
92. KREGER-VAN RIJ, N.J.W. The Yeasts - A Taxonomic Study, 3 ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1984. 1082 p.
93. UENG, W.; SILBER, E. ; EPPENBERGER, U. Quantification of Cells Cultured on 96-Well Plates. Analytical Biochemistry, San Diego, v. 182, n. 1, p. 16-19, out., 1989.
94. KURTZMAN, C.P. Identification and Taxonomy. In: KIRSOP, B.E. ; KURTZMAN, C.P. Living Resources for Biotechnology Yeasts. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 99- .
95. KURTZMAN, C.P. Systematics of the Ascomycetous Yeasts Assessed by Ribosomal RNA Sequence Divergence. Antonie van Leeuwenhoek, Dordrecht , v. 63, n. 2, p. 165-174, fev., 1993.
96. KURTZMAN, C.P. ; PHAFF, H.J. Molecular Taxonomy. In: ROSE, A.H. ; HARRRISON, J.S. The Yeasts, Biology of Yeasts. Londres: Academic Press,1987. v.1, p. 63-94.
97. KURTZMAN, C.P. ; ROBNETT, C.J. Phylogenetic Relationships Among Species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwanniomyces* Determined from Partial Ribosomal RNA Sequences. Yeasts, Chichester, v. 7, n. 1, p. 61-72, jan., 1991.
98. LACHANCE, M.A. *Kluyveromyces*, Systematics since 1970. Antonie van Leeuwenhoek, Dordrecht . v. 63, n. 2, p. 95-104, fev., 1993a.

99. LACHANCE, M.A. *Metschnikowia agaveae* sp. nov., a Heterothallic Haploid Yeast from Blue Agave. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v. 39, n. 6, p. 562-566, jun., 1993b.
100. LACHANCE, M.A. Yeast Communities in a Natural Tequila Fermentation. Antonie van Leeuwenhoek, Dordrecht, v. 68, n. 2, p. 151-160, ago., 1995.
101. LACHANCE, M.A.; METCALF, B.J.; STARMER, W.T. Yeasts from Exudates of *Quercus*, *Ulmus*, *Populus* and *Pseudotsaga*, New Isolations and Elucidation of Some Factors Affecting Ecological Specificity. Microbial Ecology, v. 8, p. 191-198, 1982.
102. LACHANCE, M.A.; STARMER, W.T.; PHAFF, H.J. Identification of Yeasts Found in Decaying Cactus Tissue. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v. 34, n. 9, p. 1025-1036, set., 1988.
103. LALOUX, O.; CASSART, J.P.; DELCOUR, J.; BECUMEN, J.V.; VANDENHAUTE, J. Cloning and Sequencing of the Inulinase Gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424. FEBS Letters, Amsterdam, v. 289, n. 1, p. 64-68, set., 1991.
104. LAM, K.S.; GROOTWASSINK, J.W.D. Efficient, non-Killing Extraction of  $\beta$ -D-fructofuranosidase (an Exo-inulase) from *Kluyveromyces fragilis* at High Cell Density. Enzyme Microbial Technology, Nova york, v. 7, n. 5, p. 239-242, mai., 1985.
105. LEHMANN, P.F.; LIN, D.; LASKER, B.A. Genotypic Identification and Characterization of Species and Strains within the Genus *Candida* by Using Random Amplified Polymorphic DNA. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 30, n. 12, p. 3249-3254, dez., 1992.
106. LIN, C.C.S.; FUNG, D.Y.C. Conventional and Rapid Methods for Yeast Identification. CRC, Critical Reviews in Microbiology, Boca Raton, v. 14, n. 4, p. 273-289, mai., 1987.

- 107.LODDER, J. The Yeasts -A Taxonomic Study. Amsterdam: North-Holland, 1970. 1385p.
- 108.LOGAN. N.A. Bacterial Systematics. Blackwell Scientific Publications, 1994.
- 109.LOOTEN, P.; BLANCHET, D. ; VANDECASTEELE, J.P. The  $\beta$ -fructofuranosidase Activities of a Strain of *Clostridium acetobutylicum* Grown on Inulin. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 25, n. 5, p. 419-425, fev., 1987.
- 110.MACEDO, S.M. Production of Cellulosic Pulp for the Paper Industry Using Tequila-Yielding Maguey (*Agave azul tequilana*) as Raw Material. UNEP, v. 6, p. 23-24, 1983.
- 111.MANFIO, G.P. Towards Minimal Standards for the Description of *Streptomyces* Species. Newcastle upon Tyne, 1995. 243 p. Tese (Doctor of Philosophy) - Department of Microbiology, The Medical School Newcastle upon Tyne, Inglaterra Reino Unido.
- 112.MANZONI, M. ; CAVAZZONI, V. Extracellular Inulinase from Four Yeasts. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, Londres, v. 21, n. 5, p. 271-274, out., 1988.
- 113.MANZONI, M. ; CAVAZZONI, V. Hydrolysis of Topinambur (Jerusalem Artichoke) Fructans by Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* var *bulgaricus*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Cambridge, v. 54, n.4, p. 311-315, 1992.
- 114.MARGARITIS, A. ; BAJPAI, P. Continuous Ethanol Production from Jerusalem Artichoke Tubers. Biotechnology and Bioengineering, Nova York, v. 24, n. 7, p. 1473-1482, jul., 1982a.

- 115.MARGARITIS, A. ; BAJPAI, P. Ethanol Production from Jerusalem Artichoke Tubers Using *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces rosei*. Biotechnology and Bioengineering, Nova York, v. 24, n.4, p. 941-953, abr., 1982b.
  
- 116.MEYER, S.A. DNA Reassociation and Protein Electrophoresis Useful Tools to Evaluate Yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; MEYER, S.A.; SCHENBERG, A.C.G.; HAGLER, A.N.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; EGUCHI, S.Y.; CANHOS, V.P. Leveduras para Biotecnologia. (apostila), Campinas, 1991. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello". p. .
  
- 117.MOLNÁR, O.; PRILLINGER, H.; LOPANDIC, K.; WEIGANG, F.; STAUDACHER, E. Analysis of Coenzyme Q Systems, Monosaccharide Patterns of Purified cell Walls and RAPD-PCR Patterns in the Genus *Kluyveromyces*. Antonie van Leeuwenhoek, Dordrecht, v. 70, p. 67-78, 1996.
  
- 118.MONFORTE, M; CEDENO, M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Partial Purification and Characterization of 2 Proteases from *Agave fourcroydes*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 15, n. 3, p. 245-254, 1987.
  
- 119.MUKHERJEE, K. ; SENGUPTA, S. The Production of Constitutive Invertase and Inulinase by the Mushroom *Panaeolus papillonaceus* in Submerged Culture. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v. 31, n. 9, p. 773-777, set., 1985.
  
- 120.NAKAMURA,T.; NAGATOMO,Y. HAMADA,S.; NISHINO,Y.; OHTA,K. Occurence of Two Forms of Extracellular Endoinulinase from *Aspergillus niger* Mutant 817. Journal of Fermentation and Bioengineering, Osaka, v. 78, n.2, p. 134-139, 1994.
  
- 121.NAKAMURA, T.; OGATA,Y.; HAMADA, S.; OHTA, K. Ethanol Production from Jerusalem Artichoke Tubers by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Fermentation and Bioengineering, Osaka, v. 81, n. 6, p. 564-566, 1996.

- 122.NAKAMURA, T.; OGATA,Y.; SHITARA,A.; NAKAMURA,A.; OHTA,K.  
Continuous Production of Fructose Syrups from Inulin by Immobilized from  
*Aspergillus niger* Mutant 817. Journal of Fermentation and Bioengineering, Osaka,  
v. 80, n. 2, p. 164-169, 1995.
- 123.NAKASE, T. ; KOMAGATA, K. Significance of DNA Base Composition in the  
Classification of Yeast Genus *Pichia*. Journal of General and Applied  
Microbiology, Tóquio, v. 16, n. 6, p. 511-521, dez., 1970.
- 124.NAKASE, T. ; KOMAGATA, K. Significance of DNA Base Composition in the  
Classification of Yeast Genus *Saccharomyces*. Journal of General and Applied  
Microbiology, Tóquio, v. 17, n. 3, p. 227-238, jun., 1971.
- 125.NOBEL, P.S. Environmental Biology of Agaves and Cacti. Cambridge: Cambridge  
University Press, 1988.
- 126.OHTA,K.; HAMADA,S.; NAKAMURA,I. Production of High Concentrations of  
Ethanol from Inulin by Simultaneous Saccharification and Fermentation Using  
*Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Environmental  
Microbiology, Washington,, v. 59, n. 3, p. 729-733, mar., 1993.
- 127.OLSEN, I. Chemotaxonomy of Yeasts. Acta Odontologica Scandinavica, v. 48,  
p. 19-25, 1990.
- 128.ONGEN-BAYSAL,G.; SUKAN,S.S.; VASSILEV,N. Production and Properties of  
Inulinase from *Aspergillus niger*. Biotechnological Letters, Nova York, v. 16, n. 3,  
p. 275-280, mar., 1994.
- 129.ONODERA,S.; SHIOMI,N. Purification and Subsite Affinities of Exo-inulinase from  
*Penicillium trzebinskii*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 56, n. 9,  
p.1443-1447, 1992.

130. ONODERA, S. ; SHIOMI, N. Purification and Substrate Specificity of Endo-type Inulinase from *Penicillium purpurogenum*. Agricultural and Biological Chemistry, Tóquio, v. 52, n. 10, p. 2569-2576, out., 1988.
131. PARK, Y.K.; YETLEY, E.A. Intakes and Food Sources of Fructose in the United States. American Journal of Clinical Nutrition, v. 58(suppl.), p. 737S-747S, 1993.
132. PASSADOR-GURGEL, G.C.; FURLAN, S.A.; MELLER, J.K.; JONAS, R. Application of Microtiter Reader System for Screening of Inulinase Producing Yeasts. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlim, v. 45, n. 1/2, p. 158-161, mar., 1996.
133. PAWAN, G.L.S. Fructose. In: BRICH, G.C.; GREEN, L.F. Molecular Structure and Function of Food Carbohydrates. Londres: Applied Science, 1973. p. 65-80.
134. PEJIN, D.; JAKOVLJEVIC, J.; RAZMOUSKI, R.; BERENJI, J. Some Possibilities for the Cultivation and Processing of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). Journal of Fermentation and Bioengineering, Osaka, v. 75, n. 1, p. 79-81, 1993.
135. PHAFF, H.J. Ecology of Yeasts with Actual and Potential Value in Biotechnology. Microbial Ecology, v. 12, p. 31-42, 1986.
136. PHAFF, H.J. Isolation of Yeasts from Natural Sources. In: LABEDA, D.P. Isolation of Biotechnological Organisms from Nature. Nova York: McGraw-Hill Publishing Company, 1990. p. 53-79.
137. PHAFF, H.J.; STARMER, W.T. Specificity of Natural Habitats for Yeasts and Yeast-like Organisms. In: SKINNER; PASSMORE; DAVENPORT. Biology and Activities of Yeasts 1 ed. Londres: Academic Press., 1980. p. 79-102.
138. PHAFF, H.J.; STARMER, W.T. Yeasts Associated with Plants, Insects and Soils. In: ROSE, A.H. ; HARRISON, J.S. The Yeasts, , Londres: Academic Press, 1987. v. 1/2, p. 123-176.

- 139.PICK, E. Microassays for Superoxide and Hydrogen Peroxide Production and Nitroblue Tetrazolium Reduction Using an Enzyme Immunoassay Microplate Reader. Methods in Enzimology ,v. 132, p. 407-421, 1986.
- 140.PILNIK, W. Food Additives. Gordian, v. 73, p. 208-214, 1973; Apud: VERACHTERT, H. ; DEMOT, R. Yeast Biotechnology and Biocatalysis. New York; Marcell Dekker Inc., 1990. p.255-296.
- 141.PONTIS, H.G. Fructans. In: DEY, P.M. Methods in Plant Biochemistry , Carbohydrates. Londres: Academic Press Limited, 1990. v. 2, p. 353-369.
- 142.POORNA-VISWANATHAN; KULKARNI, P.R. Properties and Applications of Inulinase Obtained by Fermentation of Costus (*Saussurea iappa*) Root Powder with *Aspergillus niger*. Die Nahrung Food , Weinheim, v. 39, n. 4, p. 288-294, 1995.
- 143.PRICE, C. W.; FUSON, G. B. ; PHAFF, H. J. Genome Comparison in Yeast Systematics, Delimitation of Species Within the Genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* and *Pichia*. Microbiological Reviews, Washington, v. 42, p. 161-193, 1978.
- 144.PRIEST, F. ; AUSTIN, B. Modern Bacterial Taxonomy. 2 ed., Londres: Chapman Hall, 1993. 228 p.
- 145.QUEROL, A.; BARRIO, E. ; RAMÓN, D. A. Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. Systematic and Applied Microbiology, v. 15, p. 439-446, 1992.
- 146.ROBERFROID, M. Dietary Fiber, Inulin and Oligofructose, a Review Comparing their Physiological Effects. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, v. 33, n. 2, p. 103-148, abr., 1993.
- 147.ROHLF, F.J. NTSYS-pc - Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Nova york: Exeter Publishing, Ltd, 1988.

148. ROSA, M.F.; SÁ CORREIA, A.I.; NOVAIS, J.M. Production of Ethanol at High Temperatures in the Fermentation of Jerusalem Artichoke Juice and a Simple Medium by *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnological Letters, Nova York, v. 9, n. 6, p. 441-444, jun., 1987.
149. ROUWENHORST, R.J.; RITMEESTER, W.S.; SCHEFFERS, W.A. ; VAN DUKEN, J.P. Localization of Inulinase in *Kluyveromyces* species. Applied Environmental Microbiology, Washington, v. 56, n. 11, p. 3329-3336, nov., 1990a.
150. ROUWENHORST, R.J.; VISSER, L.E.; VAN DER BRAN, A.A.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DUKEN, J.P. Production, Distribution and Kinetic Properties of Inulinase in Continuous Cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. Applied Environmental Microbiology, Washington, v. 54, n. 5, p. 1131-1137, mai., 1988.
151. ROUWENHORST, R.J.; VAN DER BRAN, A.A.; SCHEFFERS, W.A. ; VAN DUKEN, J.P. Production and Localization of  $\beta$ -fructosidase in Asynchronous and Synchronous Chemostat Cultures of Yeasts. Applied Environmental Microbiology, Washington, v. 57, n. 2, p. 557-562, fev., 1991.
152. ROUWENHORST, R.J.; HENSING, M.; VERBAKEL, J.; SCHEFFERS, W.A. ; VAN DUKEN, J.P. Structure and Properties of the Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. Applied Environmental Microbiology, Washington, v. 56, n. 11, p. 3337-3345, nov., 1990b.
153. SACKIN, M.J. ; JONES, D. Computer-assisted Classification. In GOODFELLOW, M.; O'DONNELL, A.G. Handbook of New Bacterial Systematics. 1 ed. Londres, Academic Press Ltda, 560 p. 1993
154. SEKI, K.; HARAGUCHI, K.; KISHIMOTO, M.; KOBAYASHI, S. ; KAINUMA, K. Production of a Novel Inulin Fructotransferase (DFAI producing) by *Arthrobacter globiformis* S14-3. Starch/Starke, Weinheim, v. 40, n. 11, p. 440-442, nov., 1988.

155. SEKI, K.; HARAGUCHI, K.; KISHIMOTO, M.; KOBAYASHI, S. ; KAINUMA, K.  
Purification and Properties of a Novel Inulin Fructotransferase (DFAI producing) by  
*Arthrobacter globiformis* S14-3. Agricultural and Biological Chemistry, Tóquio,  
v. 53, n. 8, p.2089-2094, ago., 1989.
156. SMITH, M.T.; YAMAZAKI, M. ; PROOT, G.A. *Dekkera, Brettanomyces* and  
*Eeniella*, Electrophoretic Comparison of Enzymes and DNA-DNA Homology.  
Yeasts, Chichester, v. 6, n. 4, p. 299-310, jul/ago., 1990.
157. SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. Numerical Taxonomy. 1 ed. São Francisco: Freeman,  
1973. Apud: GOODFELLOW, M.; JONES, D.; PRIEST, F.G. Computer-assisted  
Bacterial Systematics. 1 ed. Academic Press, Londres, 1985.
158. STARMER, W.T. ; PHAFF, H.J. Analysis of the Community Structure of Yeasts  
Associated with the Decaying Stems of Cactus II. *Opuntia* Species. Microbial  
Ecology, v. 9, p. 247-259, 1983.
159. STARMER, W.T.; PHAFF, H.J., MIRANDA, N.; MILLER, M.W. ; HEED, W.B. The  
Yeast Flora Associated with the Decaying Stems of Columnar cacti and *Drosophila* in  
North America. Evolutionary Biology, Nova York, v. 14, p. 269-295, 1982.
160. STRONG-GUNDERSON, J.M.; PALUMBO, A.V. Alternative Method for Rapidly  
Screening Microbial Isolates for their Potential to Degrade Volatile Contaminants.  
Journal of Industrial Microbiology, Amsterdam, v. 13, p. 361-366, 1994.
161. TANIS, P. The Production of High-fructose Syrup from *Agave* Juice in Mexico. In:  
PROCEEDINGS OF THE THIRD SEMINAR ON INULIN. 1990, .NRLO Report  
NR 90/28.

162. TSANG, E.W.T.; GROOTWASSINK, J.W.D. Extraordinarily Rapid Appearance of a  $\beta$ -Fructofuranosidase (Exo-inulase)- hyperproducing Mutant in Continuous Culture of *Kluyveromyces fragilis*. Journal of General Microbiology, Londres, v. 134, n. 3, p. 679-688, mar., 1988a.
163. TSANG, E.W.T.; GROOTWASSINK, J.W.D. Stability of Exo-inulase Production on Lactose in Batch and Continuous Culture of a *Kluyveromyces fragilis* Hyperproducing Mutant. Enzyme Microbial Technology, Nova York, v. 10, n. 5, p. 297-301, mai., 1988b.
164. UHM, T.B.; JEON, D.Y.; BYUN, S.M.; HONG, J.S. ; GROOTWASSINK, J.W.D. Purification and Properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger*. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 926, n.2, p. 119-126, nov., 1987.
165. VANCANNEYT, M.; POT, B.; HENNEBERT, G. ; KEESTERS, K. Differentiation of Yeast Species Based on Electrophoretic Whole-cell Protein Patterns. Systematic and Applied Microbiology, Stuttgart, v. 14, n. 1, p. 23-32, jan., 1991.
166. VANDAMME, E.J. ; DERYCKE, D.G. Microbial Inulinases, Fermentation Process, Properties and Applications. Advances in Applied Microbiology, Nova York, v. 29, p. 139-176, 1983.
167. VAN DER WALT, J.P. ; YARROW, D. Methods for Isolation, Maintenance, Classification and Identification of Yeasts. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. The Yeasts, a Taxonomy Study. 3 ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1984. p. 45-104.
168. VAN VUUREN, H.J.J. ; VAN DER MEER, L. Fingerprinting of Yeasts by Protein Electrophoresis. American Journal of Enology and Viticulture, Davis, v. 38, n. 1, p. 49-53, fev., 1987.
169. VISWANATHAN, P.; KULKARNI, P.R. Enhancement of Inulinase Production by *Aspergillus niger* van Teighem. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, v. 78, n. 4, p. 384-386, abr., 1995.

176. YAMADA, Y.; NAKAGAWA, Y.; BANNO, I. The Molecular Phylogeny of the Q<sub>10</sub> Equipped Species of the Heterobasidiomycetous Yeast Genus *Rhodospiridium* Banno Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal Ribonucleic Acids. Journal of General and Applied Microbiology, Tóquio, v. 36, n.6, p. 435-444, dez., 1990b.
177. YAMADA, Y.R.; OKADA, T.; UESHIMA, O. ; KONDÔ, K. Coenzyme Q System in the Classification of Ascosporeogenous Yeast Genera *Hansenula* and *Pichia*. Journal of General and Applied Microbiology, Tóquio, v. 19, n. 2, p. 189-208, mar., 1973b.
178. YAMADA, Y.R.; NOJIRI, M.; MATSUYAMA, M. ; KONDÔ, K. Coenzyme Q System in the Classification of Ascosporeogenous Yeast Genera *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and *Endomycopsis*. Journal of General and Applied Microbiology, Tóquio, v. 22, n. 6, p. 325-337, dez., 1976.
179. YOKOTA, A.; YAMAUCHI, O.; TOMITA, F. Production of Inulotriose from Inulin by Inulin-degrading Enzyme from *Streptomyces rochei* E87. Letters of Applied Microbiology, Oxford, v. 21, n. 5, p. 330-333, nov., 1995.
180. WANG, X. ; GIBSON, G.R. Effects of the in vitro Fermentation of Oligofructose and Inulin by Bacteria growing in the Human Large Intestine. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, v. 75, n. 4, p. 373-380, out., 1993.
181. WORKMAN, W.E.; DAY, D.F. Enzymatic Hydrolysis of Inulin to Fructose by Glutaraldehyde Fixed Yeast Cells. Biotechnology and Bioengineering, Nova York, v. 26, n. 8, p. 905-910, Ago., 1984.
182. WORKMAN, W.E. ; DAY, D.F. Purification and Properties of the  $\beta$ -Fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*. FEBS Letters, Amsterdam, v. 160, n.1, p. 16-20, ago., 1983.

- 170.VUILLEUMIER,S. World Production of High-fructose Syrup and Crystalline Fructose. American Journal of Clinical Nutrition, v. 58(suppl.), p. 733S-736S, 1993.
- 171.VULLO, D.L., COTO, C.E. ; SINERIZ, F. Characteristics of an Inulinase Produced by *Bacillus subtilis* 430A, a Strain Isolated from the Rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell Rusby). Applied Environmental Microbiology, Washington, v. 57, n. 8, p. 2392-2394, ago., 1991.
- 172.XIAO, R.; TANIDA, M. ; TAKAO, S. Inulinase from *Chrysosporium pannorum*. Journal of Fermentation Technology, Osaka, v. 66, n. 5, p. 553-558, 1988.
- 173.YAMADA, Y.R. ; KONDÔ, K. Coenzyme Q System in the Classification of the Yeast Genera *Rhodotorula* and *Cryptococcus*, and the yeast-like genera *Sporobolomyces* and *Rhodospiridium*. Journal of General and Applied Microbiology, Tóquio, v. 19, n. 1, p. 59-77, jan., 1973a.
- 174.YAMADA, Y.; NAGAHAMA, T.; HAWASAKI, H. ; BANNO, I. The Phylogenetic Relationship of the Genera *Phaffia* Miller, Yoneyama et Soneda and *Cryptococcus* Kuetzing emend. Phaff et Spencer (Crytococcaceae) Based on Partial Sequences of 18S and 26S Ribossomal Ribonucleic Acids. Journal of General and Applied Microbiology, Tóquio, v. 36, n. 6, p. 403-414, dez., 1990a.
- 175.YAMADA, Y.; NAKAGAWA, Y.; BANNO, I. The Phylogenetic Relationship of the Q<sub>9</sub> Equipped Species of the Heterobasidiomycetous Yeast Genera *Rhodospiridium* and *Leucosporidium* Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribossomal Ribonucleic Acids, The Proposal of a New Genus *Kondsa*. Journal of General and Applied Microbiology, Tóquio, v. 35, n. 5, p. 377-385, out., 1989.

183. ZITTAN, L. Enzymatic Hydrolysis of Inulin- An Alternative Way to Fructose Production. Starch/Starke, v. 33, p. 373-377, 1981.

## 7. ANEXOS

**ANEXO 1:** Relação de microrganismos produtores de inulinases de acordo com revisão da literatura.

**TABELA 1:** Bactérias e leveduras capazes de degradar inulina

| Bactérias *                     | Leveduras                         |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Actinomyces naeslundii</i>   | <i>Candida kefyr</i>              |
| <i>Actinomyces viscosus</i>     | <i>C. membranaefaciens</i>        |
| <i>Arthrobacter globiformes</i> | <i>C. salmanticensis</i>          |
| <i>Azotobacter chroococcum</i>  | <i>Debaryomyces polymorphus</i>   |
| <i>Bacillus subtilis</i>        | <i>Debaryomyces. sp.</i>          |
| <i>Enterobacter cloacae</i>     | <i>Hansenula beyernkii</i>        |
| <i>Pseudomonas caryophylli</i>  | <i>H. jadinii</i>                 |
| <i>Streptococcus mutans</i>     | <i>H. lynferdii</i>               |
| <i>Streptococcus sp.</i>        | <i>Kluyveromyces marxianus</i>    |
|                                 | <i>Lipomyces kononenkoae</i>      |
|                                 | <i>Picha guilhermondii</i>        |
|                                 | <i>Rhodotorula sp.</i>            |
|                                 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>   |
|                                 | <i>Torulaspora delbrueckii</i>    |
|                                 | <i>Shizosaccharomyces pombe</i>   |
|                                 | <i>Schwanniomyes occidentalis</i> |

\* geralmente com ação predominante sobre levanas

FONTE: resumida do artigo de FUCHS *et alii*, (1985)

## ANEXO 2: Dados relativos à taxonomia numérica

TABELA 2: Testes utilizados na caracterização fenotípica das leveduras isoladas de agave.

|     |                          |     |                                      |
|-----|--------------------------|-----|--------------------------------------|
| OVO | Célula ovóide            | SAC | Assimilação de sacarose              |
| BRU | Brotamento unipolar      | MAL | Assimilação de maltose               |
| BRB | Brotamento bipolar       | CEL | Assimilação de celobiose             |
| BRM | Brotamento multilateral  | TRE | Assimilação de trealose              |
| SES | Sedimento escasso        | LAC | Assimilação de lactose               |
| SAB | Sedimento abundante      | RAF | Assimilação de rafinose              |
| SFL | Sedimento floculento     | AMI | Assimilação de amido                 |
| ANE | Formação de anel         | XIL | Assimilação de xilose                |
| PEL | Formação de película     | ARA | Assimilação de L-arabinose           |
| BRA | Cor branca               | RIB | Assimilação de ribose                |
| BCR | Cor branco-creme         | RAM | Assimilação de ramnose               |
| CRE | Cor creme                | ERI | Assimilação de eritritol             |
| VER | Cor vermelha             | ADO | Assimilação de adonitol              |
| RED | Forma redonda            | MAN | Assimilação de manitol               |
| LIS | Superfície lisa          | CIT | Assimilação de citrato               |
| BRI | Superfície brilhante     | INO | Assimilação de inositol              |
| TCR | Textura cremosa          | MEL | Assimilação de melibiose             |
| ELE | Colônia elevada          | MEZ | Assimilação de melezitose            |
| CVE | Colônia convexa          | INU | Assimilação de inulina               |
| PMI | Pseudomicélio            | CY1 | Resistência a cicloheximida 100 ppm  |
| FGL | Fermentação de glicose   | CY2 | Resistência a cicloheximida 1000 ppm |
| FGA | Fermentação de galactose | NAC | Crescimento em NaCl 10%              |
| FSA | Fermentação de sacarose  | NO3 | Assimilação de nitrato               |
| FMA | Fermentação de maltose   | VFB | Crescimento em VFB                   |
| FLA | Fermentação de lactose   | 37C | Crescimento a 37°C                   |
| FRA | Fermentação de rafinose  | DBB | Reação em DBB                        |
| FIN | Fermentação de inulina   | URE | Urease                               |
| GLI | Assimilação de glicose   | PAC | Produção de ácido de glicose         |
| GAL | Assimilação de galactose | G50 | Crescimento em 50% glicose           |



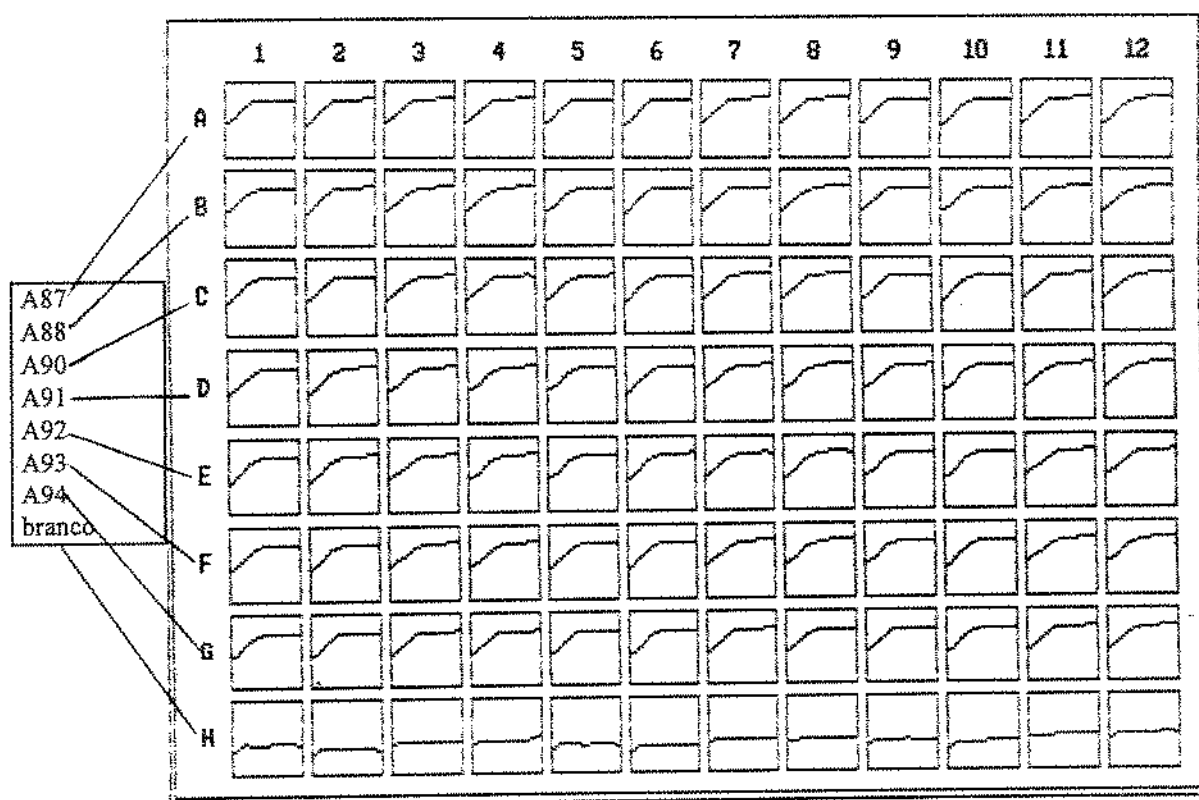


**Tabela 4:** Distribuição em valores absolutos das 58 características fenotípicas entre os “clusters”

| “Cluster”         | Q10 | Q7 | Q6 | Major | Min1 | Min2 | Sml |
|-------------------|-----|----|----|-------|------|------|-----|
| Testes/Organismos | 6   | 12 | 18 | 37    | 2    | 3    | 1   |
| OVO               | 6   | 1  | 18 | 33    | 2    | 2    | 1   |
| BRU               | 6   | 0  | 0  | 0     | 0    | 0    | 1   |
| BRB               | 1   | 0  | 0  | 0     | 0    | 0    | 0   |
| BRM               | 0   | 12 | 18 | 37    | 2    | 3    | 0   |
| SAB               | 4   | 12 | 18 | 37    | 2    | 3    | 1   |
| SFL               | 2   | 0  | 0  | 1     | 0    | 0    | 1   |
| ANE               | 2   | 0  | 0  | 1     | 0    | 0    | 0   |
| PEL               | 4   | 11 | 0  | 2     | 2    | 2    | 0   |
| BRA               | 0   | 0  | 0  | 0     | 0    | 0    | 0   |
| BCR               | 0   | 0  | 17 | 37    | 2    | 3    | 1   |
| CRE               | 0   | 12 | 1  | 0     | 0    | 0    | 0   |
| VER               | 6   | 0  | 0  | 0     | 0    | 0    | 0   |
| LIS               | 6   | 7  | 18 | 37    | 2    | 3    | 1   |
| BRI               | 6   | 1  | 18 | 37    | 2    | 3    | 1   |
| ELE               | 0   | 12 | 0  | 0     | 0    | 0    | 0   |
| CVE               | 6   | 0  | 18 | 37    | 2    | 3    | 1   |
| PMI               | 0   | 10 | 17 | 13    | 1    | 1    | 1   |
| FGL               | 0   | 12 | 18 | 37    | 2    | 3    | 1   |
| FGA               | 1   | 1  | 17 | 32    | 1    | 3    | 1   |
| FSA               | 0   | 0  | 18 | 22    | 0    | 3    | 1   |
| FMA               | 0   | 0  | 0  | 0     | 0    | 0    | 1   |
| FLA               | 0   | 0  | 13 | 0     | 0    | 0    | 0   |
| FRA               | 0   | 0  | 16 | 0     | 0    | 2    | 0   |
| FIN               | 0   | 0  | 15 | 0     | 0    | 0    | 0   |
| MAL               | 5   | 12 | 18 | 37    | 2    | 3    | 1   |
| CEL               | 3   | 3  | 18 | 37    | 0    | 3    | 1   |
| TRE               | 4   | 10 | 15 | 37    | 2    | 3    | 1   |
| LAC               | 2   | 0  | 18 | 19    | 0    | 0    | 0   |
| RAF               | 6   | 12 | 18 | 34    | 2    | 3    | 1   |
| AMI               | 0   | 0  | 0  | 0     | 0    | 0    | 0   |
| XIL               | 6   | 2  | 18 | 36    | 2    | 3    | 1   |
| ARA               | 6   | 1  | 18 | 31    | 2    | 3    | 1   |
| RIB               | 5   | 0  | 16 | 12    | 0    | 3    | 1   |
| RAM               | 3   | 3  | 6  | 34    | 0    | 2    | 1   |
| ERI               | 0   | 0  | 0  | 0     | 0    | 0    | 0   |
| ADO               | 4   | 2  | 18 | 37    | 2    | 3    | 1   |
| MAN               | 5   | 1  | 18 | 37    | 2    | 3    | 1   |
| CIT               | 4   | 12 | 16 | 37    | 1    | 3    | 1   |
| INO               | 0   | 0  | 0  | 0     | 0    | 0    | 0   |
| MEL               | 0   | 0  | 1  | 0     | 0    | 1    | 0   |
| MEZ               | 5   | 10 | 18 | 37    | 2    | 3    | 1   |
| INU               | 3   | 9  | 18 | 23    | 0    | 2    | 0   |
| CY1               | 2   | 0  | 18 | 0     | 2    | 3    | 0   |
| CY2               | 0   | 0  | 17 | 0     | 0    | 3    | 0   |
| NO3               | 0   | 0  | 1  | 0     | 0    | 0    | 0   |
| VFB               | 5   | 9  | 3  | 18    | 2    | 3    | 1   |
| 37C               | 0   | 12 | 18 | 37    | 2    | 3    | 1   |
| DBB               | 6   | 0  | 0  | 0     | 0    | 0    | 0   |
| URE               | 6   | 0  | 0  | 0     | 0    | 0    | 0   |
| PAC               | 0   | 11 | 18 | 36    | 2    | 3    | 1   |
| G50               | 6   | 9  | 18 | 37    | 2    | 3    | 1   |

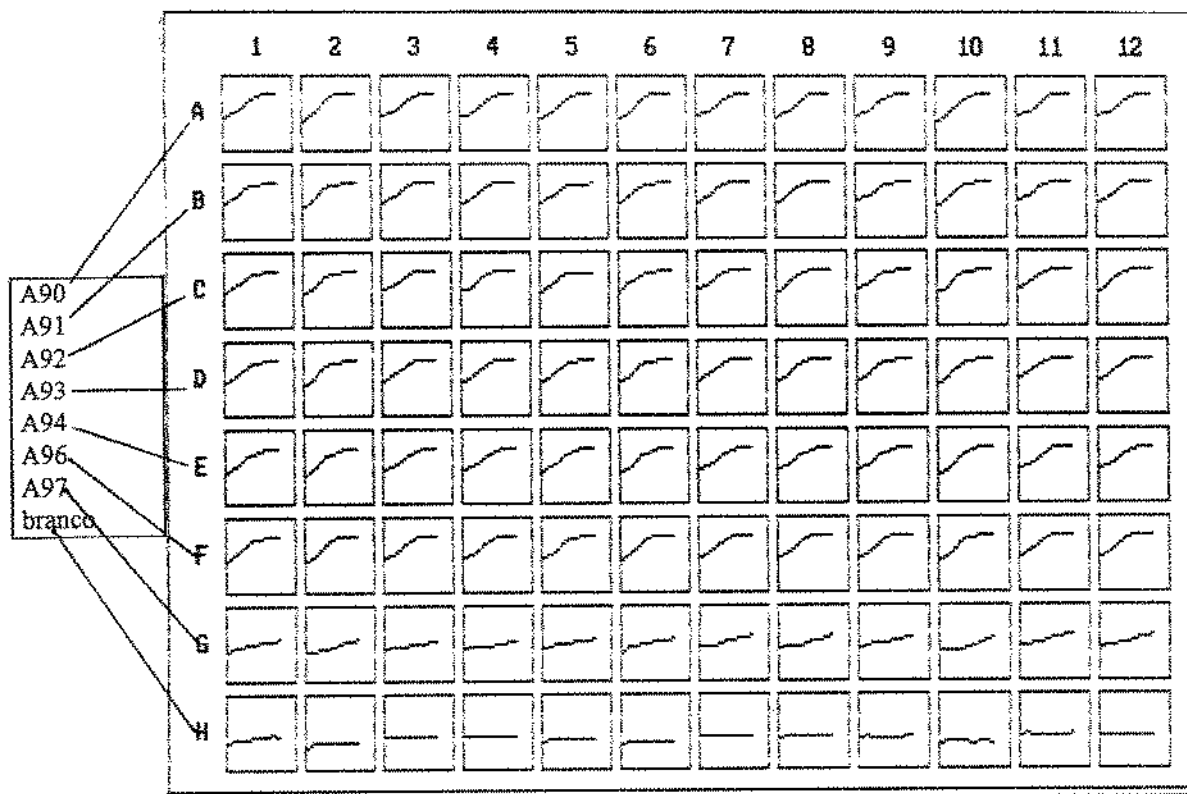
**ANEXO 3:** Dados referentes à seleção das linhagens de leveduras produtoras de inulinas

| pH 4,0 |     |     |     | pH 5,0 |     |     |     | pH 6,0 |     |     |     |
|--------|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|
| YNB    |     | YEP |     | YNB    |     | YEP |     | YNB    |     | YEP |     |
| FRU    | INU | FRU | INU | FRU    | INU | FRU | INU | FRU    | INU | FRU | INU |



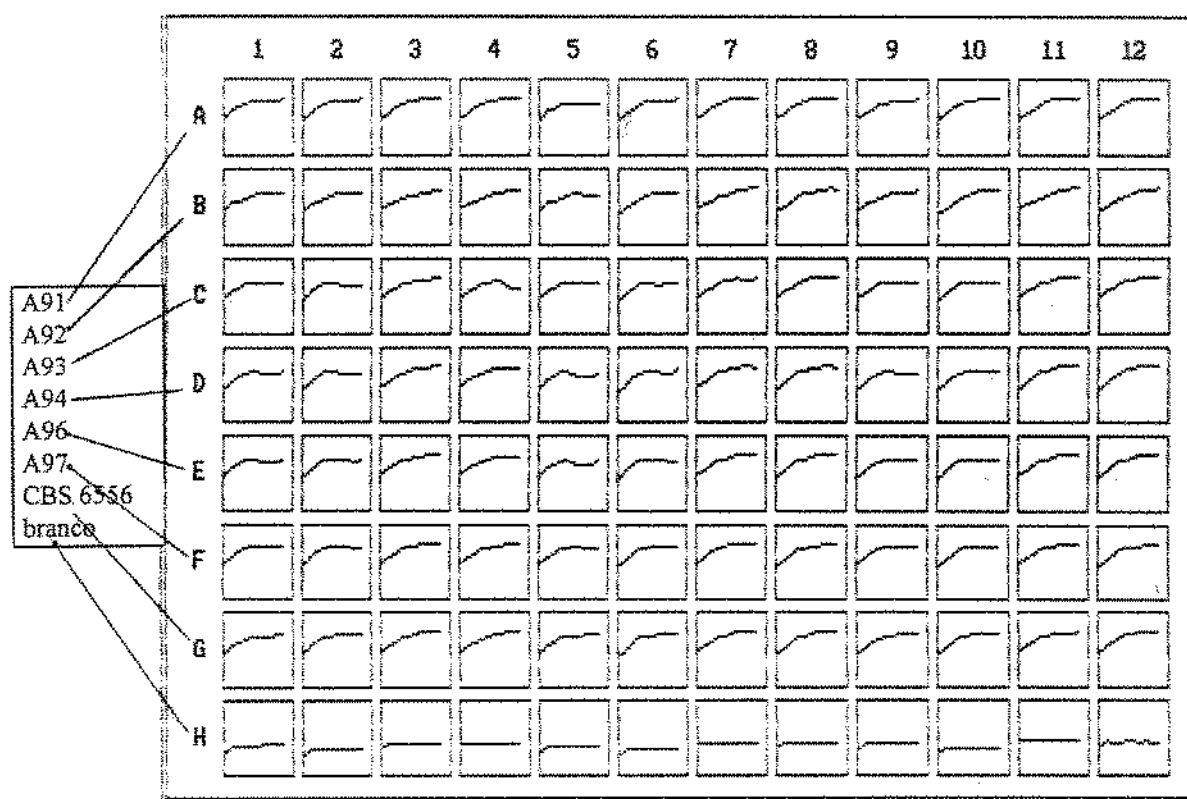
**Figura 1:** Curvas de crescimento de algumas leveduras isoladas de agave na primeira etapa do “screening” na temperatura de 37°C distribuídas nas microplacas, conforme descrito na figura 8.

| pH 4,0 |     |     |     | pH 5,0 |     |     |     | pH 6,0 |     |     |     |
|--------|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|
| YNB    |     | YEP |     | YNB    |     | YEP |     | YNB    |     | YEP |     |
| FRU    | INU | FRU | INU | FRU    | INU | FRU | INU | FRU    | INU | FRU | INU |

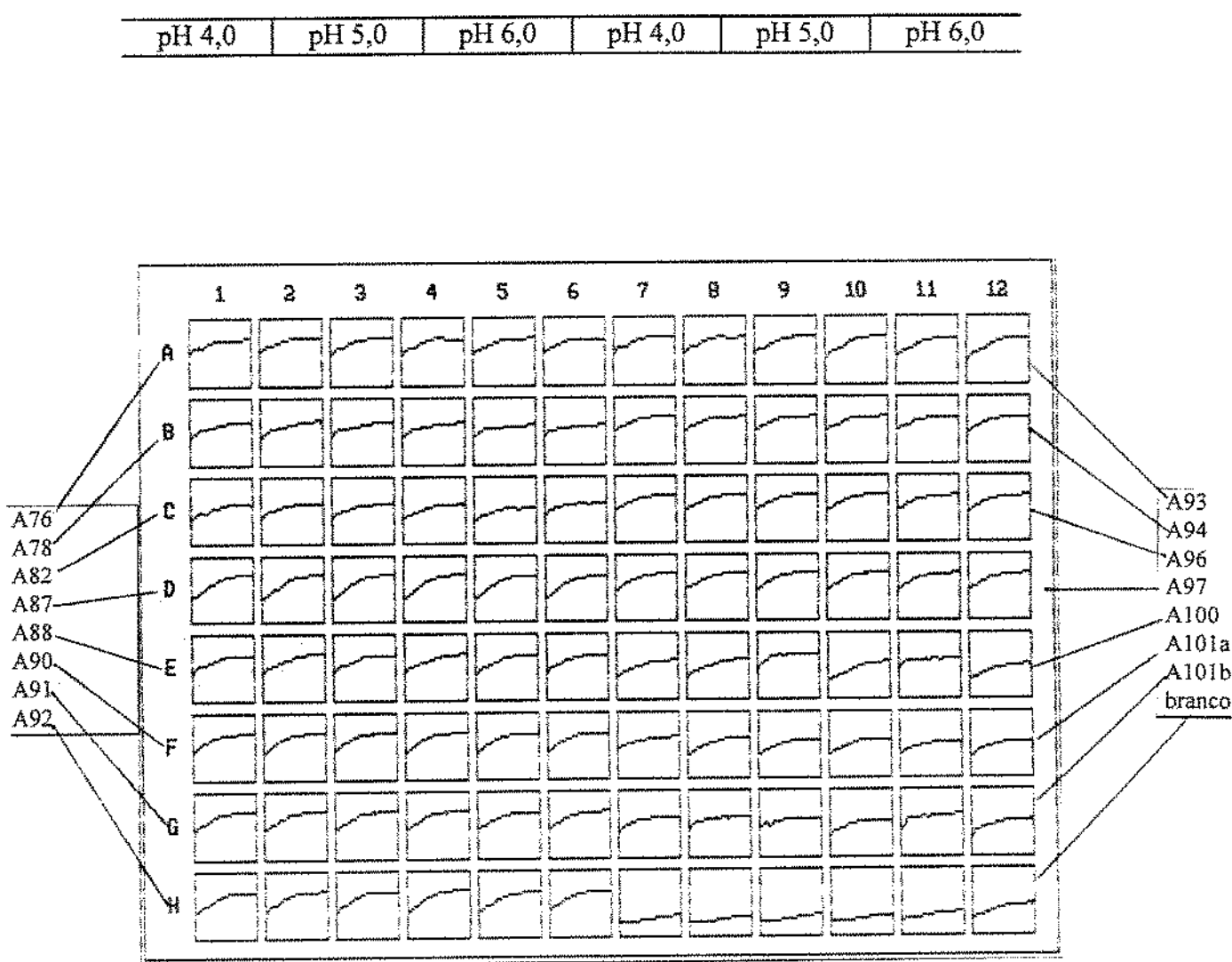


**Figura 2:** Curvas de crescimento de algumas leveduras isoladas de agave na primeira etapa do “screening” na temperatura de 42°C distribuídas nas microplacas conforme descrito na figura 8.

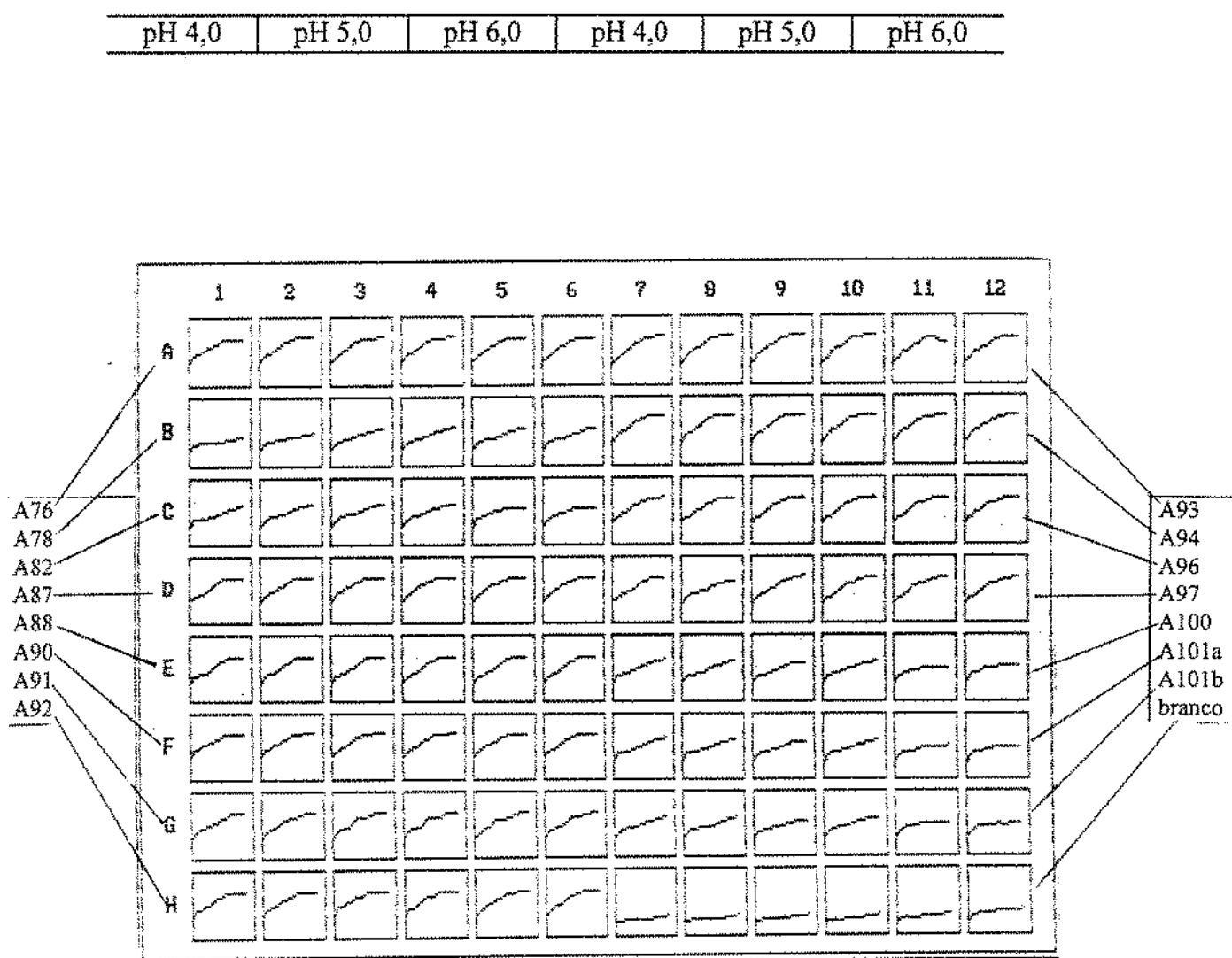
| pH 4,0 |     |     |     | pH 5,0 |     |     |     | pH 6,0 |     |     |     |
|--------|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|
| YNB    |     | YEP |     | YNB    |     | YEP |     | YNB    |     | YEP |     |
| FRU    | INU | FRU | INU | FRU    | INU | FRU | INU | FRU    | INU | FRU | INU |



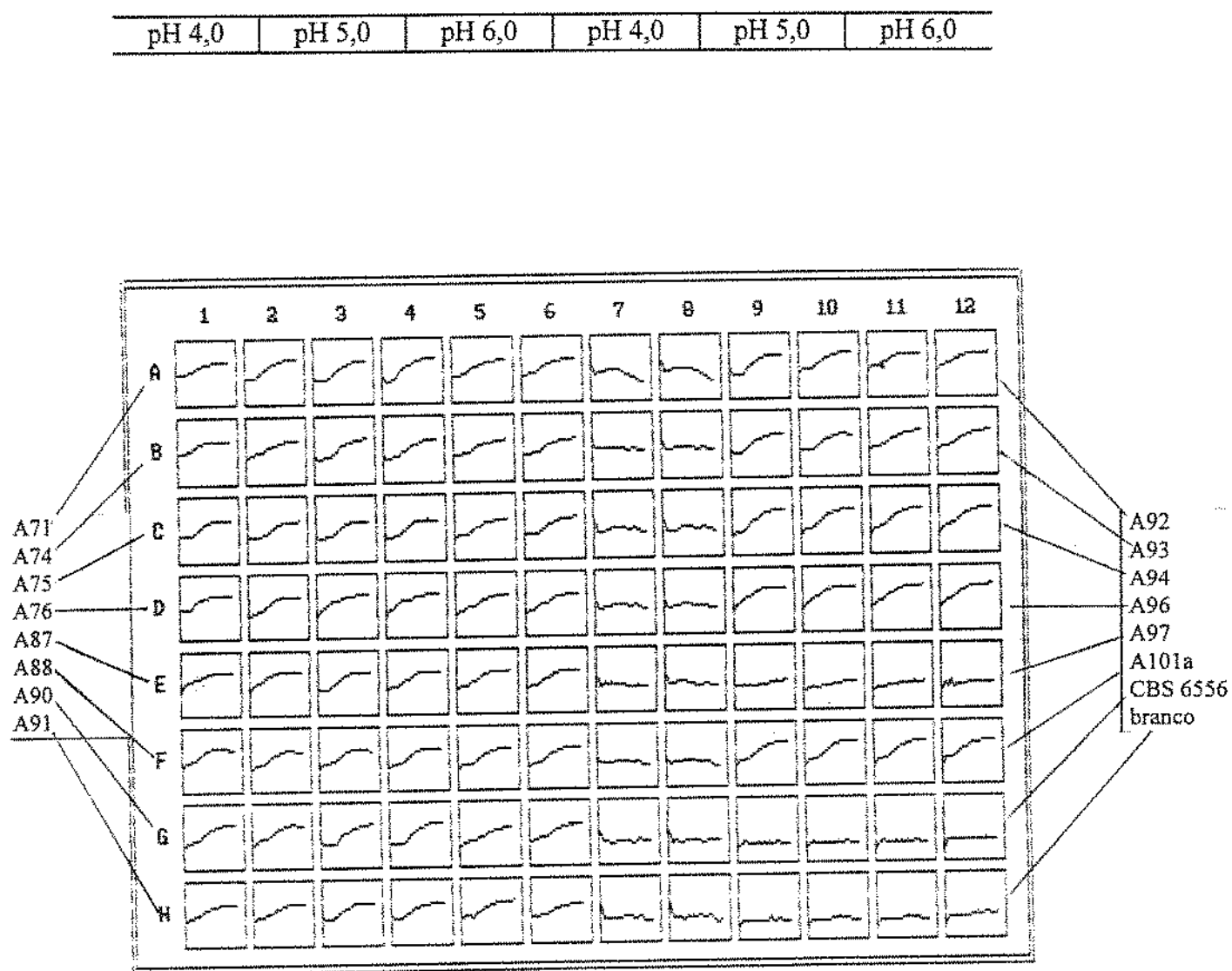
**Figura 3:** Curvas de crescimento de algumas leveduras isoladas de agave na primeira etapa do “screening” na temperatura de 45°C distribuídas nas microplacas conforme descrito na figura 8.



**Figura 4:** Curvas de crescimento de algumas leveduras selecionadas na primeira etapa do “screening” na temperatura de 37°C distribuídas nas microplacas em meio YNB inulina 1%, conforme descrito na figura 9.

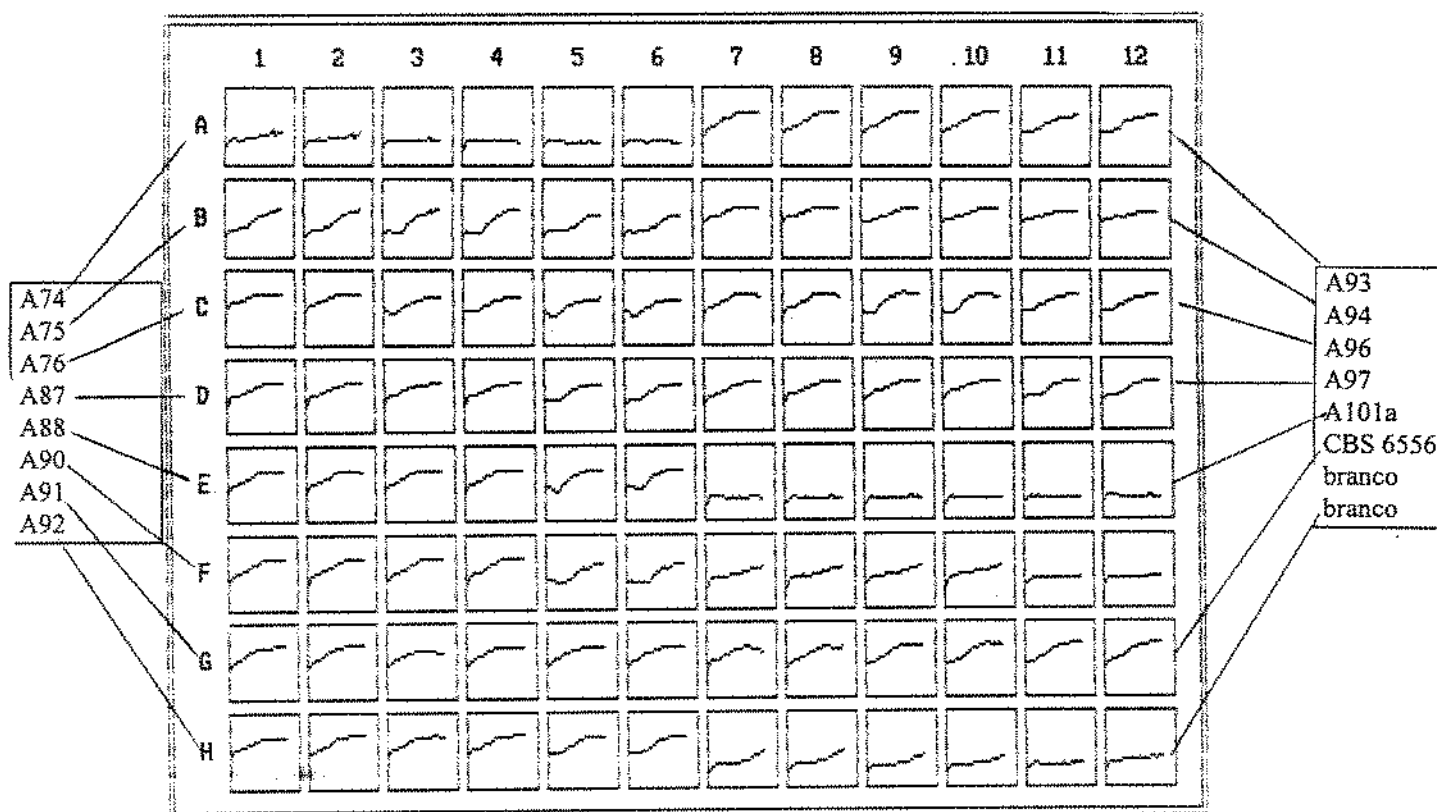


**Figura 5:** Curvas de crescimento de algumas leveduras selecionadas na primeira etapa do “screening” na temperatura de 42°C distribuídas nas microplacas em meio YNB inulina 1%, conforme descrito na figura 9.

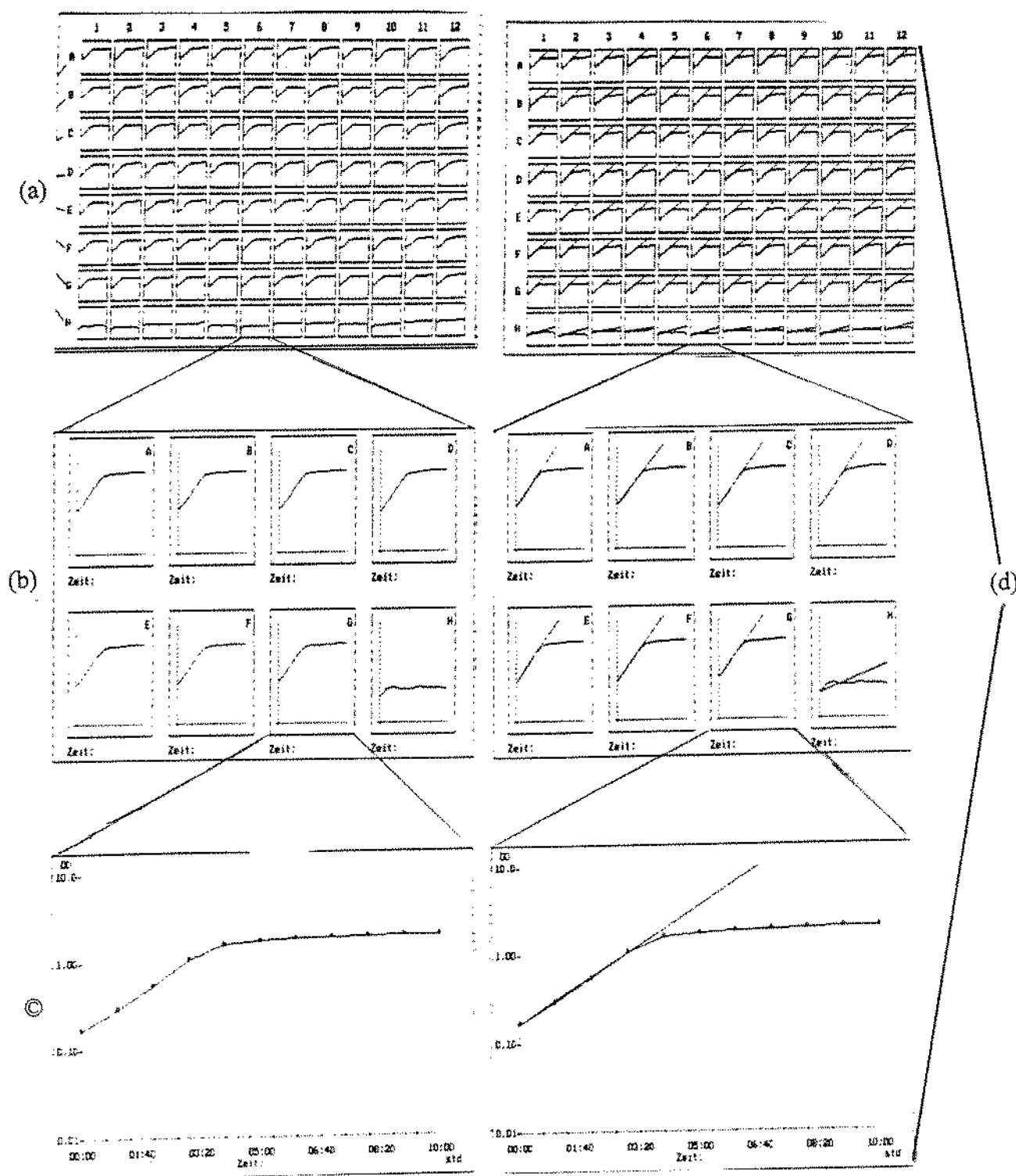


**Figura 6:** Curvas de crescimento de algumas leveduras selecionadas na primeira etapa do “screening” na temperatura de 45°C distribuídas nas microplacas em meio YNB inulina 1%, conforme descrito na figura 9.

| pH 4,0 | pH 5,0 | pH 6,0 | pH 4,0 | pH 5,0 | pH 6,0 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|



**Figura 7:** Curvas de crescimento de algumas leveduras selecionadas na primeira etapa do "screening" na temperatura de 47°C distribuídas nas microplacas em meio YNB inulina 1%, conforme descrito na figura 9.

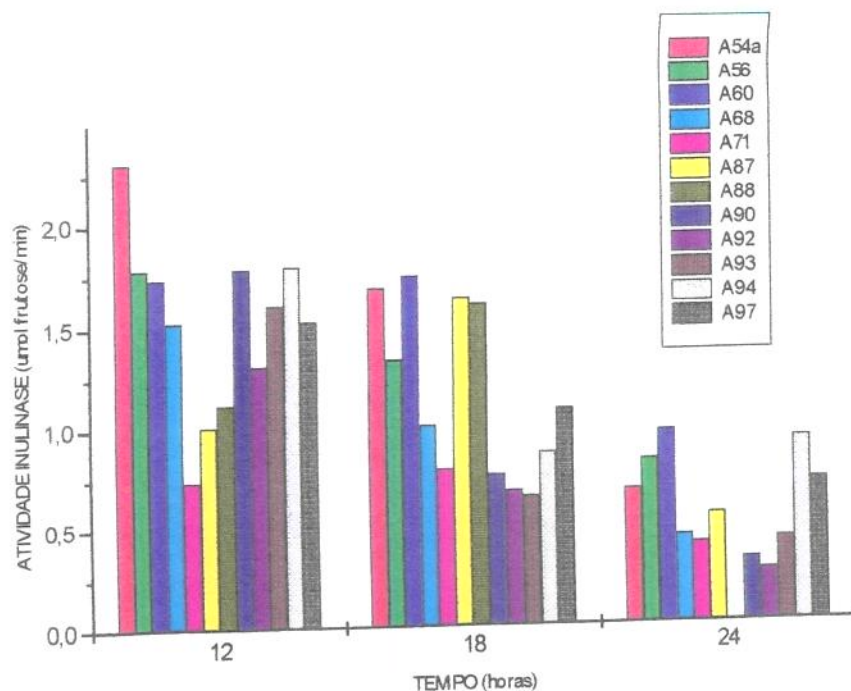


**Figura 9** Recursos do software EASYKIN para visualização dos resultados. (a) visualização da microplaca; (b) visualização de uma coluna; (c) visualização de uma cubeta ("well"); (d) visualização da velocidade máxima de crescimento calculada.

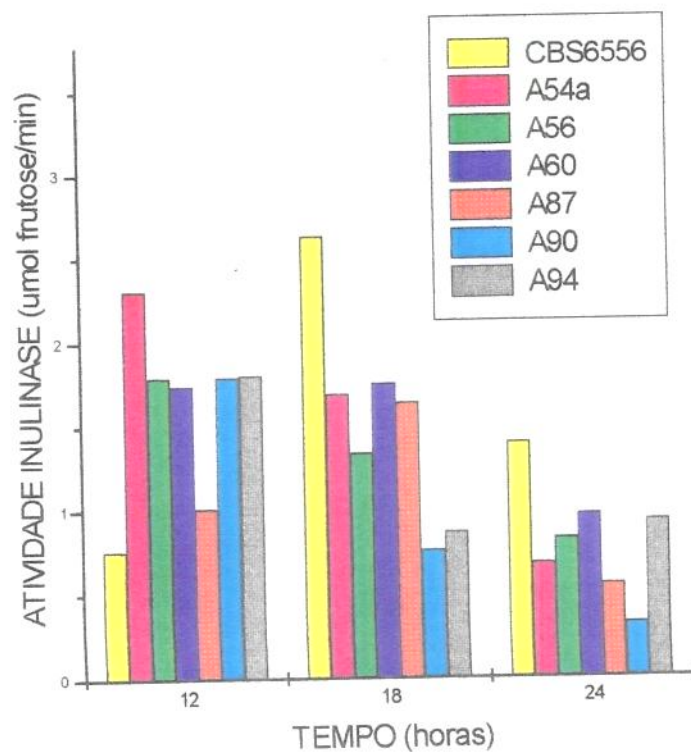
**ANEXO 4:** Dados referentes à atividade enzimática de inulinase das leveduras selecionadas**Tabela 5:** Atividades enzimáticas de inulinase em unidades por volume de meio de produção (U/mL) em 12, 18 e 24 horas de cultivo (meio YNB Inulina 1% a 37°C)

| Culturas                       | 12 h         | 18 h        | 24 h        |
|--------------------------------|--------------|-------------|-------------|
| <i>K. marxianus</i> CBS 6556   | 38.0         | 174.5       | 111.0       |
| <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 | 2.5 (0.06)*  | 36.0 (0.20) | 20.0 (0.18) |
| <i>Candida kefyr</i> A54a      | 115.5 (3.04) | 84.5 (0.48) | 34.0 (0.31) |
| <i>Candida kefyr</i> A56       | 89.5 (2.35)  | 67.0 (0.38) | 41.5 (0.37) |
| <i>Candida kefyr</i> A60       | 87.0 (2.29)  | 87.5 (0.50) | 48.5 (0.44) |
| <i>Candida kefyr</i> A68       | 76.5 (2.01)  | 50.5 (0.29) | 22.0 (0.20) |
| <i>Candida kefyr</i> A71       | 37.0 (0.97)  | 39.5 (0.22) | 20.0 (0.18) |
| <i>Candida kefyr</i> A87       | 50.5 (1.33)  | 82.0 (0.47) | 27.5 (0.25) |
| <i>Candida kefyr</i> A88       | 56.0 (1.47)  | 80.5 (0.46) | 0           |
| <i>Candida kefyr</i> A90       | 89.5 (2.35)  | 38.0 (0.22) | 16.0 (0.14) |
| <i>Candida kefyr</i> A92       | 65.5 (1.72)  | 34.0 (0.19) | 13.0 (0.12) |
| <i>Candida kefyr</i> A93       | 80.5 (2.12)  | 32.5 (0.18) | 21.0 (0.19) |
| <i>Candida kefyr</i> A94       | 90.0 (2.37)  | 43.5 (0.25) | 46.5 (0.41) |
| <i>Candida kefyr</i> A97       | 76.5 (2.01)  | 54.5 (0.31) | 36.0 (0.32) |

(\*) o número entre parênteses indica a fração calculada utilizando a cultura CBS 6556 como referência.



**Figura 10:** Histograma representando as atividades de inulinase total das linhagens de *Candida kefyr* isoladas de agave.



**Figura 11:** Histograma representando as atividades de inulinase total de linhagens de *Candida kefyr* isoladas de agave e a cultura referência *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556.