

JANAINA APARECIDA TEIXEIRA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES
DE *Penicillium griseoroseum* COM ALTA PRODUÇÃO DE PECTINA LIASE
E POLIGALACTURONASE

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção de título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

JANAINA APARECIDA TEIXEIRA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES
DE *Penicillium griseoroseum* COM ALTA PRODUÇÃO DE PECTINA LIASE
E POLIGALACTURONASE

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção de título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 12 de março de 2007

Prof^a Marisa Vieira de Queiroz
(Co-Orientadora)

Prof^a Flávia Maria Lopes Passos
(Co-Orientadora)

Prof^a Denise Mara Soares Bazzolli

Prof. Marcos Rogério Tótola

Prof^a Elza Fernandes de Araújo
(Orientadora)

A Deus, por tudo.

Aos meus amados pais Adebalde e Elza.

À minha querida irmã Jucilene.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade oferecida para realização deste curso.

Ao CNPq, à FAPEMIG e à CAPES, pelo apoio financeiro.

À professora Elza Fernandes de Araújo, pela orientação segura, pelo incentivo constante e pelo exemplo de profissionalismo.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pelos ensinamentos e conselhos durante a realização deste trabalho.

À professora Flávia Maria Lopes Passos, pelos conselhos e apoio.

Aos professores Denise Mara Soares Bazzolli e Marcos Rogério Tótola, pela participação na banca de defesa da dissertação.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial, Evandro, Danilo, “Toninho”, Paulo Rosa, Laura e Nilcéa, pela ajuda e pelo carinho.

Aos meus pais e à minha irmã, que são o meu porto seguro, sempre me apoiando e confortando nos momentos em que mais preciso.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, aos que se foram e aos atuais pela boa convivência: Daniel, João Batista, Ireninha, Patrícia, Jildete, Klédna, Rodrigo Barros, Tatiana, Swiany, Maycon, Ronney, Francis, Gilvan, Rafael, Guilherme,

Darlene, Júnio, Leandro, Ximena, Vivi, Mariana, Jorge, Lara Félix, Leonardo, Rodrigo Siqueira e Michelle.

Aos meus colegas de curso e amigos, Maria Andréia, Leonardo Almeida, Francielle Martins, Máfra Freire, Jaqueline Carlos, Juliana Ribeiro, José Carlos, Luiz Eduardo, Otávio (“Tavinho”), Marcelo Mafra, Lygia e Júlio pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos dos Laboratórios de Fisiologia, Micorrizas, Microbiologia de Alimentos, Petróleo, Café e Microbiologia Industrial.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

JANAINA APARECIDA TEIXEIRA, filha de Adebalde Teixeira e Elza Maria Teixeira, nasceu na cidade de Visconde do Rio Branco, MG, em 27 de abril de 1982.

Ingressou na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, em fevereiro de 2000, concluindo a graduação em Ciências Biológicas, como Bacharel e Licenciada, em janeiro de 2005.

Em março de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1. Microrganismos e plasmídeos	14
2.2. Extração de DNA plasmidial	15
2.3. Manutenção das culturas e preparo de inóculo	15
2.4. Meio de cultivo líquido	16
2.5. Obtenção de protoplastos da linhagem recombinante T105 de <i>P. griseoroseum</i>	16
2.6. Transformação de protoplastos da linhagem recombinante T105 de <i>P. griseoroseum</i>	16
2.7. Purificação monospórica e caracterização das linhagens recombinantes quanto à estabilidade mitótica	17
2.8. Avaliação da massa seca do micélio	18
2.9. Ensaio enzimáticos de pectina liase, poligalacturonase, protease e celulase	18
2.10. Extração de DNA total	19
2.11. Marcação das sondas utilizadas na hibridização	20

2.12. Análise por hibridização das linhagens de <i>P. griseoroseum</i>	20
2.13. Determinação de proteína total.....	21
2.14. Avaliação da produção de proteínas totais extracelulares por eletroforese em gel de poliacrilamida	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.1. Obtenção de linhagens recombinantes de <i>P. griseoroseum</i> com maior produção de poligalacturonase e pectina liase	23
3.2. Análise das linhagens recombinantes de <i>P. griseoroseum</i> quanto ao número de cópias dos genes <i>pgg2</i> e <i>plg1</i>	28
3.3. Produção de pectina liase e poligalacturonase pela linhagem recombinante R20 de <i>P. griseoroseum</i>	31
3.4. Avaliação da produção de proteínas totais extracelulares por eletroforese em gel de poliacrilamida	45
3.5. Avaliação das atividades celulolítica e proteolítica nas condições de cultivo da linhagem recombinante R20 de <i>P. griseoroseum</i>	47
4. CONCLUSÕES.....	51
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

RESUMO

TEIXEIRA, Janaina Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Obtenção e caracterização de linhagens recombinantes de *Penicillium griseoroseum* com alta produção de pectina liase e poligalacturonase.** Orientadora: Elza Fernandes de Araújo. Co-Orientadores: Marisa Vieira de Queiroz e Flávia Maria Lopes Passos.

Penicillium griseoroseum foi descrita como uma espécie promissora para a produção de poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL). No entanto, os genes que codificam estas enzimas em *P. griseoroseum* requerem indução por pectina e sofrem repressão catabólica na presença de glicose. Uma estratégia para aumentar a expressão destes genes é a substituição do promotor endógeno por um promotor forte e constitutivo. Desse modo, para se obter linhagens com alta produção de poligalacturonase e pectina liase, sem a necessidade de indução, foi feita a co-transformação da linhagem recombinante 105, que possui cópias adicionais do gene *plg1* sob controle do promotor do gene *gpd* de *A. nidulans*, utilizando-se os plasmídeos pAN52*pgg2* e pAN7.1. As linhagens recombinantes obtidas apresentaram, pelo menos, uma cópia do pAN52*pgg2* integrada no genoma. A linhagem mitoticamente estável, denominada recombinante R20 de *P. griseoroseum*, foi selecionada por apresentar a maior produção de PG e PL em comparação com as demais linhagens recombinantes obtidas. Esta linhagem apresentou uma elevada produção de poligalacturonase e pectina

liase, quando cultivada em presença de glicose, sacarose ou caldo de cana. Aumentos de 11 vezes na atividade de PG e de 45 vezes na atividade de PL ocorreram, quando a linhagem recombinante R20 foi cultivada em caldo de cana, em relação à linhagem selvagem cultivada em condições ótimas de produção. A maior produção de PG, PL e massa micelial seca pela linhagem recombinante R20 foi obtida, quando se utilizou inóculo de 10^6 conídios/mL, concentração de glicose 1% (p/v), volume de 200 mL de meio de cultivo em Erlenmeyers de 500 mL e tempo de cultivo de 72 a 96 horas, sob agitação de 150 RPM a 25°C. No perfil protéico da linhagem recombinante R20 evidenciou-se a presença de duas bandas de proteínas distintas com aproximadamente 38 e 36 kDa, que correspondem a PG e a PL, respectivamente. A linhagem apresentou baixa atividade de protease no período final de cultivo, enquanto a atividade celulolítica não foi detectada nas condições avaliadas. Além disso, a linhagem recombinante R20 teve uma secreção de 18 mg de proteína total/L em 120 horas de cultivo, sendo pectina liase e poligalacturonase preferencialmente secretadas. Os resultados são úteis para a condução de experimentos de otimização em larga escala e posterior aplicação da linhagem recombinante R20 na indústria de produção de pectinases.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Janaina Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March of 2007. **Obtainment and characterizing of recombinant strains of *Penicillium griseoroseum* with pectin lyase and polygalacturonase overproduction.** Adviser: Elza Fernandes de Araújo. Co-advisers: Marisa Vieira de Queiroz and Flávia Maria Lopes Passos.

Penicillium griseoroseum has been described as a promising species for polygalacturonase (PG) and pectin lyase (PL) production. However, the genes encoding these enzymes in this organism require induction by pectin and are repressed by glucose. One strategy to increase the expression of these genes is the replacement of original promoter by a strong constitutive one. Thus, in order to obtain PG and PL overproducing strains with no need of pectin induction, we performed the co-transformation of previously described recombinant T105, a strain that contains additional copies of *plg1* gene under the control of *gpdA* promoter from *Aspergillus nidulans*, using the plasmids pAN52*pgg2* and pAN7.1. The resulting strains showed at least one copy of pAN52*pgg2* into the genome. A genetically stable strain, named recombinant R20 was chosen for further characterization because of its high levels of PG and PL activity compared to the other recombinant strains obtained. This strain exhibited elevated production of both enzymes when cultivated in presence of glucose, sucrose or sugar cane juice. Increases of up to 11 times in PG activity and 45 times in PL activity were detected when

the recombinant R20 was cultivated in sugar cane juice, in comparison with the wild type strain grown in optimized production conditions. The maximum production of PG, PL, and dry mycelium mass by recombinant strain was observed in the following conditions: inoculum of 10^6 conidia.mL⁻¹, 1% glucose, 200 mL of culture medium in 500 mL Erlenmeyer flasks, and incubation time of 72 to 96 hours under agitation of 150 RPM at 25°C. Denaturing SDS-PAGE of the recombinant R20 culture filtrate revealed the presence of two protein bands of about 38 and 36 KDa corresponding to PG and PL, respectively. In addition, this strain secreted 18 mg of total protein per liter of culture medium in 120 hours of incubation, being PG and PL the main protein secreted. These results will be valuable for the setting of enzyme production experiments in large scale and ultimately in the application of R20 strain for industrial production of pectinases.

1. INTRODUÇÃO

A aplicação de fungos filamentosos como hospedeiros, visando à produção de proteínas homólogas e heterólogas, é baseada, principalmente, na sua eficiência em secretar grandes quantidades de proteínas para o meio de cultivo (Nevalainen *et al.*, 2005). No entanto, a escolha da linhagem hospedeira para produção de proteínas de interesse industrial não pode ser baseada, somente, nos rendimentos da produção. Características como o controle da expressão dos genes, que codificam as proteínas de interesse, têm um papel essencial nesta escolha (Punt *et al.*, 2002). Um dos problemas para a produção de proteínas heterólogas por microrganismos é a dificuldade de secreção destas para o meio extracelular. A secreção depende de fatores regulados, geneticamente, sendo que estes sofrem influência do meio de cultivo, culminando em uma cascata de sinais, que acarretam modificações tanto na estrutura da membrana da célula como na própria proteína que será secretada. Os fungos filamentosos, além de secretarem grande quantidade de proteínas, são organismos eucariotos capazes de realizar modificações pós-traducionais, como glicosilações e dissulfidações (Wang *et al.*, 2005).

O entendimento dos mecanismos genéticos e bioquímicos, que regulam a expressão gênica em fungos filamentosos, vem sendo construído há vários anos de pesquisas e aplicações industriais. Com o avanço da biotecnologia, os fungos têm sido amplamente empregados na indústria para

a produção de proteínas e outros metabólitos (Wang *et al.*, 2005). Espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* são consideradas hospedeiros eficientes para produção de proteínas recombinantes (Punt *et al.*, 2002; MacCabe *et al.*, 2002; Iwashita, 2002; Kanamasa *et al.*, 2003; Nevalainen *et al.*, 2005). Baracat *et al.* (1989) relataram, em um trabalho visando à seleção de isolados de fungos capazes de produzir pectinases sem a produção concomitante de celulases, que *Penicillium expansum* e *Penicillium griseoroseum* produziam pectinases associadas à baixa atividade de celulases. O isolado *P. griseoroseum* CCT6421 revelou-se promissor para a produção de pectinases. Posteriormente, outros trabalhos avaliaram o isolado *P. griseoroseum* CCT6421 quanto à produção das micotoxinas patulina, citrinina e ocratoxina A nas condições de cultivo para produção de pectinases (Ferreira, 2000; Vivan, 2002; Visôto, 2003). Esses autores relataram a ausência da síntese destas micotoxinas nas condições de cultivo para produção destas enzimas, revelando o potencial do isolado para aplicação na indústria alimentícia.

As enzimas pectinolíticas ou pectinases compreendem um complexo de enzimas, capazes de catalisar a quebra de substâncias pécticas e pectinas encontradas nas paredes celulares dos vegetais. De acordo com seu mecanismo de ação, as pectinases podem ser classificadas em enzimas de desesterificação (pectina esterases) ou despolimerização (poligalacturonases, pectato e pectina liases) (Figura 1). Também, com base na posição em que atuam na quebra das ligações glicosídicas, elas podem ser endopectinases (clivam aleatoriamente) ou exopectinases (clivam terminais) (Rombouts e Pilnik, 1980; Alkorta *et al.*, 1998; Gummadi e Panda, 2003). A pectina esterase (PE) catalisa a hidrólise de grupos metóxi na pectina, formando grupos carboxil livres e metanol. A poligalacturonase (PG) atua, preferencialmente, em ácidos pécticos por meio do mecanismo de hidrólise. A pectina liase (PL) catalisa a clivagem de ligações α -D-(1,4) glicosídicas da pectina por meio do mecanismo de β -eliminação, enquanto a pectato liase (PAL) cliva ligações α -D-(1,4) glicosídicas em ácido péctico, utilizando o mecanismo de β -eliminação (Alaña *et al.*, 1989; Lim, *et al.*, 1983; Kashyap *et al.*, 2001). Na degradação por β -eliminação, ocorre a clivagem

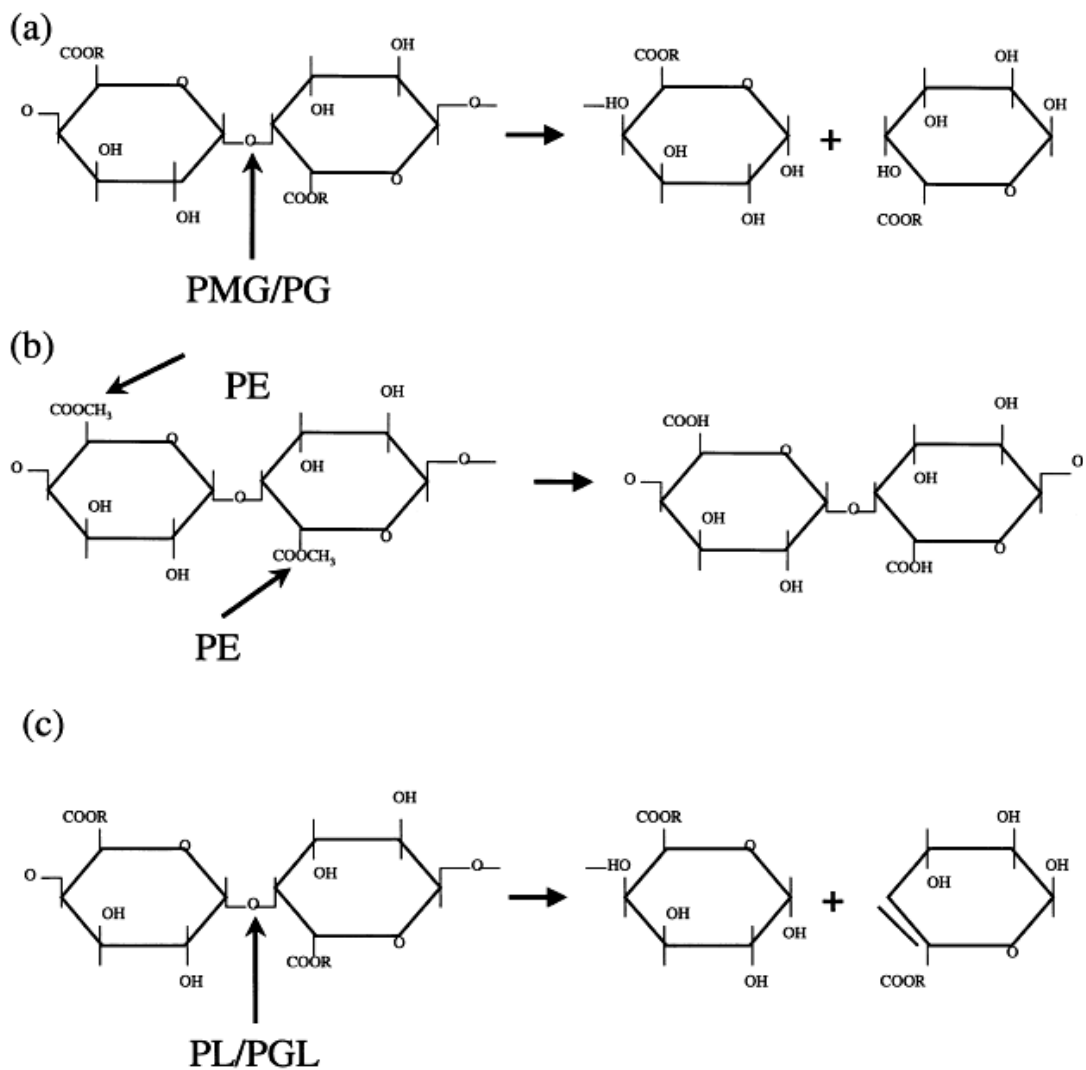


Figura 1. Modo de ação dos diferentes tipos de pectinases: (a) R=H para PG e CH₃ para PMG; (b) PE; e (c) R=H para PGL e CH₃ para PL. As setas indicam o local de atuação das pectinases nas cadeias pécnicas. PMG, polimetilgalacturonases; PG, poligalacturonases (EC 3.2.1.15); PE, pectina esterases (EC 3.1.1.11); PL, pectina liase (EC 4.2.2.10) (Gummadi e Panda, 2003).

das ligações da pectina, gerando uma dupla ligação entre C-4 e C-5 (Albersheim e Killias, 1962).

Anteriormente, a pectina liase foi descrita como uma transeliminase, pois, a reação eliminava grupos de ácido galacturônico insaturados por meio de transeliminação e, em decorrência da conjugação da dupla ligação com a carbonila dos grupos metil éster liberados na reação, os produtos podiam ser detectados utilizando a absorvância de 235 nm (Albersheim e Killias, 1962).

O interesse pelas pectinases vem aumentando, pois, estas têm alta especificidade pelo substrato. Além disso, reduzem os problemas de poluição química no ambiente e nos produtos, principalmente nas indústrias têxteis, quando se compara a desengomagem das fibras, utilizando-se produtos químicos não biodegradáveis, que podem ser tóxicos (MacCabe *et al.*, 2002). Um outro fator é que as pectinases, principalmente as de origem microbiana, têm aplicação em processos industriais alimentícios de produção de sucos e vinhos, podendo ser empregadas nas etapas de preparação das frutas, como maceração ou extração de suco e na clarificação de vinhos e sucos (Kashyap *et al.*, 2001; Hoondal *et al.*, 2002; Gummadi e Panda, 2003; Jayani *et al.*, 2005).

Entre as pectinases mais usadas na clarificação de sucos, encontram-se as pectina liases e as poligalacturonases. Segundo, Grassin e Fauquembergue (1996), a atuação das pectinases é muito importante nesses processos, sendo que a PG atua sobre o ácido péctico com grau de metilação abaixo de 60%, enquanto a pectina liase atua sobre compostos pécticos com alto grau de metilação.

Nas indústrias alimentícias, são utilizadas preparações enzimáticas contendo misturas das enzimas do complexo pectinolítico. Algumas dessas enzimas promovem, além da quebra da pectina, a sua desesterificação, como é o caso da pectina esterase (Alaña *et al.*, 1990; Lang e Dörnenburg, 2000). Esta desesterificação pode acarretar a produção de metanol e conseqüente volatilização dos ésteres responsáveis pelo sabor, sendo estas características indesejáveis para a indústria. A utilização de uma preparação enzimática composta preferencialmente por PL tem sido uma alternativa, uma vez que a PL é a única enzima, do complexo pectinolítico, capaz de clivar, sem ação prévia de outras enzimas, a ligação α -1,4-glicosídica de

pectinas altamente esterificadas (Forgaty e Kelly, 1983; Alaña *et al.*, 1989). No entanto, para produtos alimentícios destinados ao consumo infantil, a PG é a mais indicada. A preparação de sucos de cenoura requer um tratamento mais brando, a maceração, ou seja, a separação de células inteiras. O tratamento enzimático mantém as células intactas, sendo que as vitaminas, a cor e o aroma são preservados e o conteúdo celular é protegido da oxidação (Lang e Dörnenburg, 2000; Gummadi e Panda, 2003).

Embora algumas pectinases sejam indicadas para propósitos específicos, como a PL e PG mencionados anteriormente, algumas situações requerem que as enzimas pectinolíticas sejam combinadas. O uso de enzimas exógenas pode melhorar a estabilidade da opacidade nos néctares, assim como tornar eficiente a concentração de purês. Preparações de enzimas como Rapidase LIQ⁺ (Gist-Brocades), Pectinex Ultra SP (Novo Nordisk) ou Rohapect TF (Rohm), que têm alta atividade de PG e PL combinadas com celulasas e hemicelulasas, diminuem a viscosidade, mantendo a estabilidade da opacidade (Kashyap *et al.*, 2001). Além disso, a produção de várias enzimas por uma mesma linhagem é interessante, pois, evita problemas de contaminação, facilita a manipulação da cultura e permite a produção das enzimas, favorecendo a produção de uma ou outra enzima em maior quantidade. Preparações, contendo preferencialmente PG ou PL, são obtidas por purificações de extratos de pectinases microbianas, ou por meio de linhagens que produzam estas enzimas em grandes quantidades, mas não as outras pectinases (Lang e Dörnenburg, 2000).

Melhoramento genético de fungos filamentosos tem sido realizado, com o objetivo de aumentar a produção de pectinases. A obtenção de linhagens superprodutoras de pectinases pode ser realizada por meio da manipulação do genoma do fungo, utilizando-se diversas estratégias como a mutação e a recombinação, seguidas de seleção (Leuchtenberger e Mayer, 1991; Fernandes-Salomão *et al.*, 1996; Solís *et al.*, 1997; Hadj-Taieb *et al.*, 2002; Varavallo *et al.*, 2007) e a manipulação de genes visando o aumento do número de cópias e ao aumento da expressão dos mesmos (Kusters-Van Someren *et al.*, 1991; Bussink *et al.*, 1992; Ribeiro, 2001; Cardoso, 2004, Lopes *et al.*, 2004; Daly e Hearn, 2005; Ribeiro, 2005).

A escolha da melhor estratégia para o melhoramento dependerá de quantos e quais genes estão envolvidos na regulação e expressão de uma determinada enzima. O cruzamento entre espécies de fungos é apropriado, para casos em que vários fatores estão envolvidos para obtenção do fenótipo desejável. No entanto, quando se visa aumentar o número de cópias de um gene no genoma, a clonagem e a transformação são as estratégias mais adequadas para aumentar a expressão do gene de interesse. Neste sentido, faz-se necessário um sistema de transformação eficiente, sendo que um grande número de trabalhos foi realizado, visando ao estabelecimento de sistemas de transformação em fungos filamentosos. Foi realizada a transformação homóloga do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* com o gene *nia*, que codifica a nitrato redutase (Diolez *et al.*, 1993). Queiroz *et al.* (1998) desenvolveram um sistema de transformação heteróloga de um mutante de *P. griseoroseum* para a assimilação de nitrato com o gene *nia* de *F. oxysporum*. Também foi feita a transformação de *P. expansum* com um gene, que confere resistência ao benomil (Dias *et al.*, 1999). Kitamoto *et al.* (2001) realizaram a transformação homóloga de um mutante *niaD* de *A. oryzae* KBN616-39 com um gene *pel1*. Pereira *et al.* (2004) executaram um trabalho, no qual foi feita a transformação homóloga do mutante PG63 de *P. griseoroseum* com o gene *niaD*.

Além disso, características tanto das proteínas codificadas quanto da expressão dos genes devem ser consideradas, para que estes possam ser utilizados na obtenção de linhagens recombinantes. Em *P. griseoroseum* CCT6421, a expressão do gene *plg1* apresenta grande quantidade do transcrito, quando induzido por pectina cítrica, enquanto o gene *plg2* apresenta baixa expressão, sendo detectado somente por RT_PCR (Bazzolli *et al.*, 2006). Outro ponto importante é a particularidade de cada enzima. A PLG1, codificada pelo gene *plg1*, possui massa molecular deduzida semelhante à de PLG2, codificada pelo gene *plg2*. No entanto, a PLG1 possui um ponto isoelétrico (pI) calculado de 9,4, enquanto a PLG2 possui um pI de 5,5, sendo interessante a aplicação de enzimas com alto pI nas indústrias de sucos cítricos. O gene *pgg2* mantém sua expressão constante ao longo do tempo de cultivo, sendo que seu transcrito foi detectado quando pectina ou sacarose foram utilizadas como fonte de carbono, ao contrário da

expressão do gene *pgg1*, cujo o transcrito foi detectado, somente, a partir de 76 horas de cultivo apenas em pectina (Ribon et al., 2002a). Ribeiro (2005), analisando a inativação do gene *pgg2*, observou que este é responsável por 90% da atividade de PG produzida por *P. griseoroseum*. Os genes *pgg1* e *pgg2* codificam, respectivamente, as proteínas PGG1 e PGG2 com massas moleculares deduzidas semelhantes. Entretanto, a PGG2 possui um pI de 8,3, enquanto a PGG1 possui um pI de 5,3.

O aumento do número de cópias de genes de interesse no genoma tem sido utilizado com êxito, para melhoramento da produção de enzimas em diversos fungos. Bussink *et al.* (1991) demonstraram que é possível a expressão heteróloga do gene *pgal1* de *Aspergillus niger* em *Aspergillus tubigenensis*, produzindo altos níveis do transcrito. Kusters-Van Someren *et al.* (1991) relataram a obtenção de transformantes de *A. niger* com múltiplas cópias do gene *peIA* com aumento do nível de transcritos, quando estes eram cultivados em meio contendo pectina, como única fonte de carbono. Rutkowski *et al.* (1991) relataram a transformação de *Aspergillus awamori* com o gene, que codifica poligalacturonase em *A. niger*, sendo que cerca de 90% dos transformantes apresentaram aumento de duas a seis vezes na atividade enzimática. Também foram obtidos transformantes de *A. niger* com aumento de dez vezes na produção de poligalacturonase, quando o gene homólogo *pgal1* teve o seu número de cópias aumentado (Bussink *et al.*, 1992). Khanh *et al.* (1992) realizaram a transformação de *A. niger* com o gene homólogo, que codifica pectina metil esterase, obtendo transformantes com atividade enzimática 20 vezes superior à da linhagem selvagem. Van den Hombergh *et al.* (1997) transformaram linhagens mutantes deficientes em protease de *Aspergillus nidulans* com o gene *peIB*, obtendo linhagens com produção de pectina liase durante 60 horas de cultivo, enquanto, na linhagem selvagem, a pectina liase foi degradada entre 20 e 40 horas de cultivo. Kitamoto *et al.* (2001) isolaram e caracterizaram o gene *peI1*, que codifica pectina liase de *Aspergillus oryzae* KBN616. Esses autores transformaram linhagens de *A. oryzae* KBN616 com o gene *peI1*, obtendo linhagens nas quais a pectina liase foi a proteína predominante no sobrenadante da cultura, quando analisado em gel de poliacrilamida-SDS, enquanto na linhagem controle não foi detectada a proteína no gel. Cardoso

(2004) transformou a linhagem mutante *niaD* de *P. griseoroseum* PG63 com o gene *plg1*, que codifica pectina liase em *P. griseoroseum*, obtendo linhagens com aumento na atividade da enzima de 1 a 3 vezes em relação à linhagem selvagem.

Embora os transformantes tenham aumento no número de cópias do gene no genoma, o aumento na atividade enzimática nem sempre é observado. Na literatura, tem sido verificado que a expressão de genes, que codificam enzimas pectinolíticas em *A. niger*, é regulada em nível transcricional por condições ambientais, como fontes de carbono e pH, ocorrendo a indução por pectina e compostos pécicos e a repressão por glicose (Kusters Van Someren *et al.*, 1991). Ribon *et al.* (1999 e 2002b) relataram o isolamento e caracterização de dois genes, que codificam PG em *P. griseoroseum*. O gene *pgg1* é expresso a partir de 72 horas de crescimento e, apenas, quando pectina é a fonte de carbono. O gene *pgg2* apresenta expressão, em todos os tempos estudados, a partir de 24 horas, tanto em pectina como em sacarose e extrato de levedura. Bazzolli *et al.* (2006) isolaram e caracterizaram dois genes, que codificam pectina liase em *P. griseoroseum*, *plg1* e *plg2*. Foi verificado com esse trabalho que a expressão de ambos é induzida por pectina.

A substituição da região reguladora original de um gene, cuja expressão é induzida por uma região que seja forte e constitutiva, pode ser uma alternativa para aumentar a produção de enzimas, como as pectinases. A estratégia de substituição do promotor original por um, que seja mais freqüentemente e eficientemente ativado, tem mostrado bons resultados em vários fungos filamentosos. Alguns promotores fortes e constitutivos, que vêm sendo utilizados, são o promotor do gene que codifica a piruvato quinase (*pk1*) em *A. niger* (Kusters Van Someren *et al.*, 1992), o promotor do gene que codifica a celulase (*cbh1*) em *Trichoderma reesei* (Margolles-Clark *et al.*, 1996) e o promotor do gene que codifica a histona H4 em *Penicillium funiculosum* (Belshaw *et al.*, 2002).

Uma outra região reguladora, que tem sido usada com sucesso em cassetes de expressão, é o promotor do gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) de *A. nidulans*. Kolar *et al.* (1988) realizaram a transformação de *Penicillium chrysogenum*, utilizando o plasmídeo pAN5-

41B, que continha o gene *lacZ* de *Escherichia coli* sob o controle do promotor *gpd* de *A. nidulans*. A expressão do gene *lacZ* nos transformantes de *P. chrysogenum* mostrou-se eficiente, sendo a atividade de β -galactosidase aumentada três vezes nos transformantes, que apresentaram mais de uma cópia do pAN5-41B, em comparação com a linhagem controle, que continha apenas uma única cópia do pAN5-41B integrada no genoma. Mikkelsen *et al.* (2003), em estudo de ecologia e interação fúngica, utilizaram um vetor contendo o gene da proteína vermelha fluorescente (DsRed) sob o controle do promotor *gpd* de *A. nidulans*. Foi observada a expressão do gene, que codifica a proteína vermelha fluorescente em todos os três gêneros de ascomicetos estudados: *Trichoderma*, *Gliocladium* e *Penicillium*. Lopes *et al.* (2004) obtiveram transformantes de *P. griseoroseum*, utilizando um plasmídeo, que continha o gene da proteína verde fluorescente (*gfp*) sob o controle do promotor *gpd* de *A. nidulans*. Os autores observaram que a integração de, apenas, uma cópia do gene foi suficiente para que GFP fosse expressa em nível detectável.

Após a obtenção das linhagens recombinantes, torna-se necessária a realização de análises genéticas para verificar a estabilidade e o número de cópias do plasmídeo integrado. Para que as linhagens modificadas possam ser usadas na indústria, a utilização de plasmídeos integrativos e estáveis é essencial para produção da proteína de interesse. Em estudo visando o desenvolvimento de ferramentas genéticas para manipulação de plasmídeos em *Penicillium nalgiovense*, Fierro *et al.* (2004) compararam a estabilidade entre plasmídeos integrativos e replicativos. Os autores observaram que 68 a 84% dos conídios conservaram o plasmídeo replicativo, após uma geração sem pressão seletiva. No entanto, o plasmídeo integrativo mostrou maior estabilidade (96,9%), a qual foi atribuída ao fato de que este se integra no genoma. Em várias pesquisas com microrganismos, em que se objetiva à produção de algum metabólito secundário ou proteínas, é comum a opção por vetores integrativos, como uma forma de tornar mais estáveis as modificações feitas no genoma (Kolar *et al.*, 1988; Van den Hombergh *et al.*, 1997; Belshaw *et al.*, 2002; Daly e Hearn, 2005).

A tecnologia do DNA recombinante tornou-se uma ferramenta, para o melhoramento genético de linhagens fúngicas promissoras para produção de

enzimas de interesse industrial. Visando à obtenção de linhagens melhoradas para aumentar a produção das enzimas pectinolíticas, Cardoso (2004) construiu um vetor de expressão, contendo a região codificadora do gene *plg1* sob controle do promotor forte e constitutivo de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) e a região de terminação do gene *trpC* de *A. nidulans* e transformou a linhagem mutante *niaD* de *P. griseoroseum* PG63 (Pereira et al., 2004). A linhagem superprodutora obtida foi denominada recombinante de *P. griseoroseum* T105, sendo, então, caracterizada quanto à estabilidade mitótica e padrão de integração do vetor, apresentando alta estabilidade genética.

Uma vez obtida a linhagem recombinante e confirmada sua estabilidade genética, outro aspecto a ser levado em consideração é a produção e secreção de enzimas extracelulares. Em muitos microrganismos, principalmente em fungos filamentosos, as condições de cultivo são fatores determinantes do melhor rendimento do produto desejado, pois, o crescimento e produção são afetados por uma variedade de parâmetros, incluindo meio de cultivo, inóculo, pH, temperatura, aeração e agitação, dentre outros (Wang et al., 2005). A composição do meio de cultivo é o primeiro fator a ser observado, pois, ela afeta diretamente o pH do meio e, conseqüentemente, altera a morfologia do micélio, interferindo, assim, na secreção da enzima (Braun e Vecht-Lifshitz, 1991). Um outro ponto relacionado ao meio de cultivo é a fonte de carbono ou indutores suplementados ao meio. A escolha da fonte de carbono e, ou indutores pode ou não afetar a expressão dos genes relacionados à produção da enzima de interesse, interferindo, diretamente, nos níveis de produção.

De acordo com a literatura, muitos genes que codificam enzimas pectinolíticas em *Aspergillus* e *Penicillium* são regulados, em nível transcricional, por seus indutores naturais, como a pectina (Kusters Van Someren et al., 1991; Ribon et al., 2002a; Bazzolli et al., 2006; Trigui-Lahiani e Gargouri, 2007). No entanto, o uso de outras fontes de carbono alternativas à pectina é interessante, pois, pode reduzir os custos de produção das enzimas pectinolíticas. Brumano et al. (1993) relataram que *P. griseoroseum* produz pectina liase em meio contendo sacarose, como única fonte de carbono suplementado com extrato de levedura. Baracat-Pereira et

al. (1994) e Minussi *et al.* (1996) observaram que *P. griseoroseum* produziu pectina liase, quando cultivado em sacarose como fonte de carbono e adicionando extrato de chá ou cafeína, ou extrato de levedura como indutores. Além disso, esses autores constataram que a atividade de pectina liase na presença de extrato de chá e sacarose é maior do que na presença de pectina, o indutor natural. Minussi *et al.* (1997) observaram que *P. griseoroseum* produziu pectina liase na presença de substâncias derivadas de xantinas, em meio de cultivo contendo sacarose, enquanto em sacarose sem indutores não houve produção. Os autores relataram que substâncias como as metil-xantinas são indutores da síntese de pectina liase, em substituição à pectina. Fawole e Odunfa (2003) avaliaram alguns fatores, que afetam a produção de pectinases em *A. niger*. Esses autores observaram que, quando diferentes concentrações de glicose foram adicionadas ao meio contendo pectina, a produção de pectinases foi inibida em altas concentrações de glicose, mas foi estimulada em baixas concentrações de glicose.

Alguns microrganismos têm a capacidade de sintetizar pectinases, na ausência de indutores. Schmidt *et al.* (1995) relataram que *A. niger* produz enzimas pectinolíticas, sob condições de fermentação submersa em batelada, quando cultivado em meio contendo, apenas, sacarose como fonte de carbono. Minussi *et al.* (1998) estudaram a possibilidade de uso do caldo de cana-de-açúcar para a produção de pectina liase por *P. griseoroseum*. Os autores constataram que a substituição da pectina por caldo de cana-de-açúcar ao meio de cultivo promoveu maior atividade de pectina liase e maior crescimento micelial, não sendo verificada a presença de celulases no meio extracelular. Phutela *et al.* (2005), avaliando a produção de pectinases e poligalacturonase de uma linhagem de *A. fumigatus*, relataram a ocorrência de aumentos na produção das enzimas, quando se utilizou farelo de trigo como substrato. Os autores relataram ainda que, quando se utilizou sacarose, a atividade pectinolítica foi aumentada.

Além da influência de indutores e das fontes de carbono, muitos trabalhos evidenciaram que a quantidade do inóculo é um fator, que afeta a produção de enzimas pectinolíticas. Friedrich *et al.* (1990) notaram que a influência da densidade do inóculo de *A. niger* na produção de pectinases

ocorre de forma distinta para PG, PE e PL, quando cultivados em frascos Erlenmeyer sob agitação. Brumano *et al.* (1993), em um estudo com *P. griseoroseum*, avaliaram a produção de pectina liase em função da quantidade de inóculo e concluíram que a produção máxima da enzima ocorreu, quando foram utilizados 10^4 conídios por mililitro. Piccoli-Valle (1996), em um estudo com *P. griseoroseum*, verificou a influência da concentração de esporos na produção de pectina liase e avaliou diferentes concentrações de esporos, sendo que, ao final de 60 horas, foi constatado que a melhor concentração a ser usada para os demais experimentos foi de 5×10^4 conídios por mililitro.

Outros fatores estudados são a agitação e aeração, que afetam diretamente tanto a morfologia do micélio como a produtividade da enzima de interesse. Vários relatos sobre a influência da velocidade de agitação e intensidade da aeração na produção de enzimas por fungos filamentosos estão disponíveis na literatura, pois, cada sistema, cultura e biorreator são específicos e requerem ajustes individuais e otimizações das condições de cultivo (Viesturs e Leite, 1997). Palma *et al.* (1996) cultivaram *Penicillium janthinellum* em bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado, utilizando um fermentador de quatro litros. Os autores determinaram a influência da aeração e agitação na produção de xilanase. Foi observado que a atividade da enzima diminuiu, quando a razão de aeração era maior que 0,2-0,6 vvm e associada à agitação de 100 RPM. Entretanto, para a agitação de 300 RPM, a atividade apresentada foi independente do aumento da razão de aeração. Quando foram utilizados 400 RPM na agitação, observou-se menor atividade da enzima. Piccoli-Valle (1996), estudando o efeito da agitação e aeração na produção de pectina liase de *P. griseoroseum* em biorreatores de 200 mL, obteve a maior produção da enzima após 65 horas de fermentação com aeração de $5 \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ e agitação de 500 RPM nas primeiras 35 horas de cultivo e posterior alteração do fluxo de ar para $10 \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, mantendo-se a mesma agitação.

Considerando o sucesso de nosso grupo na obtenção da linhagem 105, uma linhagem recombinante de *P. griseoroseum* que apresenta alta produção de PL, bem como o interesse industrial de preparações pectinolíticas específicas contendo PL e PG, o presente trabalho foi

conduzido com os seguintes objetivos: obter linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* com alta produção de PL e PG, utilizando fontes de carbono de baixo custo; caracterizar as linhagens obtidas, quanto ao número de cópias do gene *p_{gg2}* e quanto à produção de PL e PG em meio líquido; avaliar as condições de cultivo, que afetam a produção dessas enzimas; e verificar a produção de celulasas e proteases, nos sobrenadantes de cultivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

2.1. Microrganismos e plasmídeos

Utilizou-se a linhagem selvagem de *Penicillium griseoroseum* CCT6421, isolada na Universidade Federal de Viçosa, bem como a linhagem mutante PG63 *nia⁻* de *P. griseoroseum* obtida por Pereira *et al.* (2004), que possui uma deleção de 120 pb no gene *niaD*, que codifica a nitrato redutase. A linhagem mutante PG63 foi utilizada para obtenção das linhagens recombinantes T105 e T146 (Cardoso, 2004; Ribeiro 2005), sendo usado como marcador de seleção o plasmídeo pNPG1 (9,1Kb) contendo o gene de nitrato redutase (*niaD*) de *P. griseoroseum* (Pereira *et al.*, 2004), que restaura o fenótipo selvagem por complementação da mutação no gene *niaD*. A linhagem recombinante de *P. griseoroseum* T105, obtida por Cardoso (2004), contém cópias adicionais do gene *plg1*, que codifica pectina liase, sob o controle do promotor forte e constitutivo do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) e a região de terminação do gene da triptofano sintetase (*trpC*) de *A. nidulans* (Cardoso, 2004). A linhagem recombinante de *P. griseoroseum* T146, obtida por Ribeiro (2005), contém cópias adicionais do gene *pgg2*, que codifica poligalacturonase, sob

o controle do promotor forte e constitutivo do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) e a região de terminação do gene da triptofano sintetase (*trpC*) de *A. nidulans* (Ribeiro, 2005).

Para a transformação da linhagem recombinante de *P. griseoroseum* T105, foram utilizados os plasmídeos pAN7.1 (Punt *et al.*, 1987) e pAN52*pgg2* (Ribeiro, 2005). O plasmídeo pAN7.1 contém o gene *hph*, que codifica a proteína higromicina B fosfotransferase, a qual confere resistência à higromicina B. Esse plasmídeo foi utilizado para a seleção, uma vez que a linhagem recombinante 105 teve o genótipo *niaD*⁺ restaurado por complementação. O pAN52*pgg2* contém o gene *pgg2*, isolado por Ribon *et al.* (1999), que codifica poligalacturonase de *P. griseoroseum* sob o controle do promotor do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) e a região de terminação do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans* (Ribeiro, 2005). A bactéria *Escherichia coli* DH5 α (Sambrook *et al.*, 1989) foi usada na manipulação dos plasmídeos.

2.2. Extração de DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi realizada segundo a técnica de lise alcalina, descrita por Sambrook *et al.* (1989).

2.3. Manutenção das culturas e preparo de inóculo

A linhagem mutante PG63 de *P. griseoroseum* foi cultivada a 25°C durante sete dias, em placas de Petri contendo meio completo sólido-MC (Pontecorvo *et al.*, 1953). As linhagens selvagem e recombinantes foram cultivadas a 25°C durante 7 dias, em placas de Petri contendo meio mínimo sólido-MM (Pontecorvo *et al.*, 1953). Após o crescimento, foi feita uma suspensão de conídios em solução de Tween 80 a 0,2% (v/v), em água estéril. Para produção de massa micelial, foram inoculados conídios em placas de Petri, contendo papel celofane sobre a superfície do meio e, em seguida estas foram incubadas durante 48 horas para a extração de DNA e por 18-20 horas para obtenção de protoplastos a 25°C.

2.4. Meio de cultivo líquido

As linhagens foram cultivadas em meio mínimo mineral tamponado contendo K_2HPO_4 6,98 g L⁻¹; KH_2PO_4 5,44 g L⁻¹; $(NH_4)_2SO_4$ 1,0 g L⁻¹, pH 6,8, suplementados com $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,1 g L⁻¹. O meio mineral tamponado também foi suplementado com várias fontes de carbono, como: glicose variando de 0,5 – 3,0% (p/v); sacarose 1% (p/v); sacarose 1% (p/v) e extrato de levedura 0,06% (p/v); sacarose comercial 1% (p/v); caldo de cana 1% (p/v) e pectina cítrica P-9135 (SIGMA®) 0,3% (p/v) e extrato de levedura 0,06% (p/v) para cultivo das linhagens *P. griseoroseum* selvagem, mutante PG63, recombinantes T146, T105 e R20 em um volume de 50 mL em Erlenmeyer de 125 mL ou 200 mL de meio em Erlenmeyer de 500 mL. A concentração de sacarose considerada no caldo de cana foi 17% (p/v).

2.5. Obtenção de protoplastos da linhagem recombinante T105 de *P. griseoroseum*

A obtenção de protoplastos foi baseada no método de Dias *et al.* (1999), com modificações. A linhagem foi inoculada em meio mínimo, contendo papel celofane na superfície, sendo, então, incubadas a 25°C durante 18-20 horas. O micélio foi coletado e transferido para Erlenmeyer de 125 mL, ao qual foram adicionados 5 mL de KCl a 0,6 mol. L⁻¹ tampão fosfato 10 mmol. L⁻¹ e 30 mg de “Lysing Enzymes” L1412 (SIGMA®) para 800 mg de micélio, sendo, em seguida, incubado a 30°C sob agitação de 80 RPM durante 3 a 4 horas. Os protoplastos foram separados dos fragmentos de hifas por filtração em gaze e lavados 3 vezes em Sorbitol 1 M, Tris-HCl 100 mM e $CaCl_2$ 50 mM (STC) por centrifugação a 2300 g durante 5 minutos a cada lavagem. O sedimento, contendo os protoplastos, foi ressuspensionado em STC para obtenção de uma quantidade final de 10⁷ protoplastos.mL⁻¹ na suspensão.

2.6. Transformação de protoplastos da linhagem recombinante T105 de *P. griseoroseum*

A transformação baseou-se na metodologia estabelecida por Queiroz *et al.* (1998). Foram misturados 200 µL da solução de 10⁷ protoplastos.mL⁻¹

a 5 µg de DNA do plasmídeo pAN7.1 e 5 µg de DNA do plasmídeo recombinante pAN52pgg2 e 50 µL de polietilenoglicol (PEG) 6000 a 50% (p/v). A mistura foi incubada no gelo durante 20 minutos, seguindo-se a adição de 0,5 mL da solução de PEG a 50% (p/v), sendo mantida a 25°C durante 20 minutos. Os protoplastos foram plaqueados em meio mínimo com estabilizador osmótico e incubados a 25°C durante 24 horas. Após a incubação, foram adicionados 5 mL de meio mínimo semi-sólido contendo 200 µg. mL⁻¹ de higromicina B sobre os protoplastos na placa, que foram incubados durante mais 5 dias a 25°C.

2.7. Purificação monospórica e caracterização das linhagens recombinantes quanto à estabilidade mitótica

Antes da avaliação de estabilidade mitótica e realização das demais análises de linhagens recombinantes, procedeu-se à purificação monospórica das linhagens recombinantes. Para isso, realizou-se a semeadura de 100µL de suspensão de conídios diluída em meio mínimo (MM) e após, o período de crescimento, a transferência de uma colônia isolada, proveniente de um único conídio, para uma nova placa de Petri contendo MM.

Para avaliar a estabilidade mitótica das linhagens recombinantes, quanto ao gene que codifica poligalacturonase, as linhagens foram analisadas durante um período de 10 meses quanto à atividade enzimática de PG. Quanto à estabilidade do gene que codifica PL, a atividade de PL vem sendo analisada na linhagem recombinante T105 há mais de 24 meses e foi analisada durante mais 10 meses nas novas linhagens recombinantes. Para avaliar a estabilidade mitótica dos transformantes quanto ao gene *hph*, que codifica a proteína higromicina B fosfotransferase, as linhagens foram repicadas em meio mínimo e, em seguida, transferidas para meio mínimo contendo higromicina. As placas foram incubadas a 25°C durante sete dias. A estabilidade mitótica foi avaliada, baseando-se na manutenção do gene *hph* após as passagens pelo meio mínimo sem higromicina.

2.8. Avaliação da massa seca do micélio

A produção de massa micelial foi quantificada, coletando-se o micélio em peneira de 400 malhas/pol² (37 µm de poro), o qual foi colocado em cadinhos de papel-alumínio e submetido a secagem a 105°C (Calam, 1969) até obtenção de massa constante.

2.9. Ensaio enzimáticos de pectina liase, poligalacturonase, protease e celulase

Os sobrenadantes das culturas da(s) linhagem(s) mutante PG63, selvagem e recombinantes de *P. griseoroseum* foram utilizados para dosagem da atividade de pectina liase (PL), poligalacturonase (PG), protease e celulase.

A atividade de PL foi determinada, medindo-se a absorvância a 235 nm, conforme descrito por Albersheim e Killias (1962). A mistura de reação continha 1 mL de pectina cítrica P-9135 (SIGMA[®]) a 2,5% (p/v) em tampão KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM, pH 6,8 e 1,5 mL do sobrenadante da cultura mantida a 40°C. Alíquotas de 0,5 mL da mistura de reação foram retiradas nos tempos 0 e 30 minutos de incubação e adicionadas em 4,5 mL de HCl 0,01 N, para interrupção da reação. Uma unidade de atividade de PL foi definida como nanomoles de $\Delta^{4,5}$ galacturonídeo por minuto, utilizando-se o coeficiente de extinção molar 5550 M⁻¹ cm⁻¹ para o cálculo (Albersheim, 1966).

A atividade de PG foi determinada, baseando-se na dosagem de açúcar redutor, segundo o método do DNS (ácido dinitrossalicílico) descrito por Miller (1959). A mistura de reação continha 1,5 mL de ácido poligalacturônico 1,3% P-3889 (SIGMA[®]) (p/v) em tampão acetato de sódio e NaCl 2,5 M, pH 4,8 e 0,5 mL do sobrenadante da cultura mantida a 40°C. Nos tempos 0 e 20 minutos, alíquotas de 0,125 mL foram retiradas e adicionadas em 0,5 mL de DNS, para interromper a reação. Ácido galacturônico foi utilizado para obtenção da curva padrão. Uma unidade de atividade de PG foi definida como micromoles de ácido galacturônico, liberados por minuto de reação.

A atividade de protease foi medida, utilizando-se azocaseína de acordo com Rajmohan *et al.* (2002), com modificações. A mistura de reação continha 0,1 mL do sobrenadante da cultura adicionado a 0,5 mL de solução de azocaseína a 0,5% (p/v) em tampão citrato 0,1M, pH 6,0. Após incubação a 37°C durante 2 horas e 30 minutos, a reação foi interrompida com 1,0 mL de ácido tricloroacético a 10% (p/v), seguindo-se incubação no gelo durante 15 minutos. As amostras foram clarificadas por centrifugação a 5000 g durante 10 minutos e a absorvância lida a 366 nm. O controle da reação foi realizado com azocazeína e tampão citrato. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como o aumento na absorvância a 366 nm por minuto de reação, sob as condições descritas. Como controle da atividade proteolítica foi construída uma curva-padrão, utilizando-se Protease P-5147 (SIGMA®) concentração-estoque 20mg/mL.

Para avaliação da produção de celulasas nas condições de cultivo, utilizadas para produção de pectinases, foram utilizadas tiras de papel de filtro 3x1 cm, que foram colocadas em tubos de ensaio individuais, juntamente com 4 mL de sobrenadante da cultura, seguindo-se incubação a 40°C durante 22 horas. Alíquotas de 0,125 mL foram adicionadas a 0,5 mL de DNS nos tempos 0 e 22 horas, segundo o método do DNS (ácido dinitrossalicílico) descrito por Miller (1959). Glicose foi utilizada para obtenção da curva-padrão.

2.10. Extração de DNA total

O DNA total das linhagens *P. griseoroseum* selvagem, mutante PG63 e recombinantes foram extraídos, conforme a metodologia descrita a seguir (Specht *et al.*, 1982, com modificações).

Para obtenção do micélio, uma solução de conídios de cada linhagem foi inoculada em placa de Petri, contendo meio completo sólido com papel celofane na superfície. Após incubação a 25°C durante 48 horas, os micélios foram coletados, transferidos para cadinho de porcelana e triturados em nitrogênio líquido. O pó obtido foi transferido para um tubo de centrifuga Eppendorf, contendo 400 µL de tampão de extração (Tris 50mM pH 8,0; EDTA 20mM pH 8,0; NaCl 250 mM; SDS 1%), previamente mantido em

banho-maria a 70°C. Após homogeneização, a preparação foi incubada a 70°C durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 350 µL de acetato de potássio 5 M, invertendo-se o tubo lentamente e colocando-o em banho de gelo durante 30 minutos. A seguir, a solução foi centrifugada a 9300 *g* durante 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionando-se o mesmo volume de fenol-clorofórmio. O tubo foi homogeneizado cuidadosamente durante 5 minutos, mantido no gelo após cada agitação e centrifugado a 13400 *g* durante 5 minutos. Esse passo foi repetido, utilizando-se clorofórmio e adicionando um volume igual ao do sobrenadante. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 13400 *g* durante 5 minutos e a fase superior foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado igual volume de isopropanol. A mistura foi colocada em repouso a -20°C durante 2 horas ou até o dia seguinte. Após a precipitação dos ácidos nucleicos, a mistura foi centrifugada a 13400 *g* durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento (ácidos nucleicos) lavado com álcool 70%. O sedimento foi ressuspensionado em 50 ou 30 µL de água miliQ autoclavada, sendo-lhe adicionados, em seguida, 2 µL de RNase (10mg/mL concentração-estoque) e incubado a 37°C durante 30 minutos.

2.11. Marcação das sondas utilizadas na hibridização

As sondas utilizadas para análise do número de cópias dos genes *pgg2* e *plg1* nas linhagens recombinantes foram as regiões codificadoras dos genes *pgg2* e *plg1* (Ribon *et al.*, 2002b; Bazzolli *et al.*, 2006). As sondas foram marcadas com o kit “Gene Images random prime labelling module” da Amersham Pharmacia Biotech, seguindo-se as instruções do manual do fabricante.

2.12. Análise por hibridização das linhagens de *P. griseoroseum*

Para analisar a integração dos genes, que codificam poligalacturonase e pectina liase, o DNA total extraído das linhagens selvagem e recombinantes foi clivado com a enzima de restrição *EcoRI*, a qual não cliva a região codificadora do gene *pgg2* nem a região codificadora do gene *plg1*. Em seguida, os fragmentos de DNA foram separados por

eletroforese em gel de agarose a 0,8%. O gel foi tratado, seqüencialmente, com solução de desnaturação (NaCl 1,5 M; NaOH 0.5 M) e de neutralização (Tris-HCl 0.5 M pH7.0; NaCl 1,5 M) durante 1 hora, seguindo-se transferência do DNA para membrana de náilon (Duralon-UVTM, Stratagene), onde permaneceu durante 24 horas. Em seguida, realizou-se a hibridização com as sondas, contendo as respectivas regiões codificadoras (Southern, 1975). A hibridização foi feita durante 18 horas a 65°C. A membrana foi lavada duas vezes em SSC 2X e SDS 0,1% durante 20 minutos e 2 vezes em SSC 1X e SDS 0,1% durante 10 minutos a 65°C. A detecção foi feita, utilizando-se o kit IlluminatorTM Non-radioactive Detection System (Stratagene), conforme manual do fabricante. A membrana foi colocada em contato com filme XOMAT K (Kodak^R), seguindo-se a revelação em solução reveladora durante 2 minutos e solução fixadora durante 2 minutos.

2.13. Determinação de proteína total

A quantificação de proteína total foi realizada por meio do método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino para a construção da curva padrão.

2.14. Avaliação da produção de proteínas totais extracelulares por eletroforese em gel de poliacrilamida

Para avaliar a produção de proteínas totais presentes no sobrenadante da cultura, foi feito um gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). O gel de separação (12,5% acrilamida; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,06% persulfato de amônio; 0,05% TEMED) e o gel empilhador (4% de acrilamida; 140 mM de Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% persulfato de amônio; 0,05% TEMED) foram feitos, segundo Laemmli (1970). Tampão (Tris-HCl 60 mM pH 6,8; glicerol 10%; SDS 2,3%; 2% β-mercaptoetanol; 1% azul de bromofenol) foi adicionado às amostras, aquecendo-se a mistura durante 10 minutos a 100°C antes de serem aplicadas ao gel. Foi realizada uma corrida de 60 volts, durante 4 horas em tampão de corrida (Tris-HCl 72 mM pH 8,5; glicina 576 mM; SDS 0,24%). O gel foi corado (metanol 45%; ácido acético 9%; Coomassie Brilliant Blue R-

250 0,1%) durante 2 horas e descorado (ácido acético 7,5%; metanol 25%) durante 12 horas à temperatura do ambiente. As amostras foram concentradas, utilizando-se três volumes de acetona para um volume da amostra. Após 12 horas, prosseguiu-se a centrifugação a 10000 *g* e o precipitado foi ressuspensionado em 50 μ L de água deionizada autoclavada. A quantidade de proteína total do sobrenadante da cultura, que foi aplicado ao gel, foi de 5 μ g, aproximadamente. Como marcador de massa molecular de proteínas, foram aplicados 3,5 μ g do marcador médio (14,4-97,4 KDa) da Promega (0,5 mg.mL⁻¹).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção de linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* com maior produção de poligalacturonase e pectina liase

A linhagem recombinante T105 de *P. griseoroseum*, que possui cópias adicionais do gene *plg1* sob controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans*, foi utilizada nos experimentos de transformação. Visando à obtenção de linhagens com alta produção de pectina liase e de poligalacturonase, foi realizada a co-transformação da linhagem T105 com os plasmídeos pAN52*pgg2* (Ribeiro, 2005) e pAN7.1 (Punt et al., 1987), este último contendo o gene *hph* para a seleção dos transformantes. Foram selecionados 525 transformantes para resistência à higromicina B, com uma eficiência de transformação de 105 transformantes por micrograma do DNA plasmídial (pAN7.1). Esta eficiência foi semelhante àquela relatada por Kolar *et al.* (1988), que obtiveram 80-120 transformantes por µg de DNA, quando realizaram uma co-transformação de *Penicillium chrysogenum*. Segundo Fincham (1989), quando as células receptoras são tratadas com dois plasmídeos diferentes, a possibilidade da incorporação de ambos é bastante alta.

Nas transformações relatadas na literatura, a eficiência varia muito e, portanto, parece ser dependente tanto do organismo quanto das condições utilizadas. Fierro *et al.* (2004) transformaram *Penicillium nalgiovense*, usando-se um plasmídeo integrativo e um plasmídeo de replicação

autônoma. Os autores utilizaram, como marca de seleção, o gene *pyrG* que codifica a orotidina monofosfato decarboxilase, que foi usada para os dois tipos de plasmídeos. A eficiência de transformação foi muito diferente para cada plasmídeo, pois, o plasmídeo auto-replicativo apresentou uma eficiência de transformação de 45000 (± 7000) transformantes/ μg de DNA, enquanto, para o plasmídeo integrativo, a eficiência foi de 749 (± 216) transformantes/ μg de DNA (Fierro *et al.*, 2004). Embora na co-transformação da linhagem recombinante *P. griseoroseum* T105 não se obteve uma eficiência de transformação tão elevada quanto àquela obtida por Fierro *et al.* (2004), não há limitação para o uso da técnica, visto que essa eficiência foi satisfatória.

Após obtenção dos transformantes, 203 linhagens foram escolhidas aleatoriamente e cultivadas em meio mineral líquido tamponado e suplementado com glicose 1% (p/v), sendo avaliados quanto à produção de PG. As linhagens que apresentaram alta produção de PG (Tabela 1) também foram avaliadas para produção de PL, a fim de confirmar a manutenção da alta produção de PL, anteriormente, constada para a linhagem recombinante *P. griseoroseum* T105. Do total de transformantes analisados, 16 transformantes apresentaram alta produção de PG e PL (Tabela 1). Obteve-se uma eficiência de co-transformação de 8 co-transformantes, para cada 100 transformantes analisados.

Na literatura, vem sendo relatado que o aumento do número de cópias de genes de interesse no genoma tem sido utilizado com êxito, para aumento da produção de enzimas em diversos fungos (Bussink *et al.*, 1991 e 1992; Kusters-Van Someren *et al.*, 1992; Van den Hombergh *et al.*, 1997; Kitamoto *et al.*, 2001; Cardoso, 2004). No entanto, o aumento no número de cópias nem sempre leva a aumentos na produção da proteína, principalmente devido à necessidade de indução em alguns desses genes. Várias transformações, nas quais se utilizou o gene de interesse sob controle do promotor endógeno, resultaram em aumento da produção da proteína, mas houve necessidade de indução do gene (Kusters-Van Someren *et al.*, 1992).

Tabela 1. Atividade de poligalacturonase, pectina liase e massa seca das linhagens *P. griseoroseum* selvagem, mutante PG63, recombinantes T105 e T146, e 16 linhagens transformantes (R) cultivadas durante 48 horas. Os resultados representam as médias aritméticas \pm desvio-padrão de três repetições

Linhagens	Atividade de PG (U/mL)	Atividade de PL (U/mL)	Massa micelial seca (g/L)
<i>P. griseoroseum</i> ^P	167,30 \pm 30,30	77,60 \pm 13,80	1,60 \pm 0,00
PG63 ^P	186,04 \pm 58,10	90,01 \pm 11,10	1,50 \pm 0,40
<i>P. griseoroseum</i> ^G	102,82 \pm 81,82	3,94 \pm 1,80	6,61 \pm 2,29
PG63 ^G	104,14 \pm 27,89	3,24 \pm 1,90	4,59 \pm 0,90
T105 ^G	139,64 \pm 92,97	1543,54 \pm 179,40	5,47 \pm 0,41
T146 ^G	2199,99 \pm 5,58	4,17 \pm 3,50	4,97 \pm 1,92
R07 ^G	2278,88 \pm 210,12	1505,50 \pm 234,30	5,00 \pm 2,32
R09 ^G	390,77 \pm 83,68	Nd*	3,70 \pm 1,98
R10 ^G	2628,62 \pm 485,32	1373,37 \pm 508,10	5,64 \pm 1,60
R12 ^G	1597,79 \pm 1931,98	1301,30 \pm 392,20	5,00 \pm 0,31
R15 ^G	2608,90 \pm 524,37	1239,24 \pm 278,20	5,01 \pm 1,31
R20 ^G	2410,36 \pm 232,43	1499,49 \pm 204,70	6,18 \pm 2,38
R33 ^G	2222,34 \pm 44,63	1493,49 \pm 311,10	5,14 \pm 1,24
R45 ^G	2466,90 \pm 7,44	1175,17 \pm 711,80	5,48 \pm 1,96
R49 ^G	2548,42 \pm 502,05	1063,06 \pm 150,50	4,64 \pm 1,27
R52 ^G	2171,06 \pm 109,71	930,93 \pm 244,80	5,52 \pm 1,95
R58 ^G	2576,03 \pm 388,63	890,89 \pm 259,70	5,93 \pm 2,39
R70 ^G	2565,51 \pm 132,02	1795,79 \pm 655,10	5,20 \pm 1,72
R74 ^G	2468,21 \pm 507,63	Nd*	5,68 \pm 1,48
R76 ^G	346,07 \pm 336,56	Nd	3,92 \pm 1,67
R106 ^G	2434,03 \pm 459,29	592,59 \pm 398,80	4,69 \pm 1,44
R139 ^G	2552,36 \pm 459,29	1049,05 \pm 246,90	5,01 \pm 1,03

As linhagens *P. griseoroseum* selvagem, mutante PG63, T105 e T146, foram utilizadas como controle.

Nd* – linhagem eliminada, por apresentar baixa atividade de PG.

Nd – linhagem para a qual não foi detectada atividade de PL.

P – Meio de cultivo contendo pectina cítrica 0,3% (p/v) + extrato de levedura 0,06% (p/v).

G – Meio de cultivo contendo glicose 1% (p/v).

Muitos autores têm utilizado a estratégia de substituição do promotor original por um que seja mais eficientemente ativado, o que tem apresentado bons resultados para vários fungos filamentosos (Kolar *et al.*, 1988; Kusters Van Someren *et al.*, 1992; Belshaw *et al.*, 2002; Mikkelsen *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2004). Na Tabela 1, os resultados evidenciam a eficiência da estratégia em substituir o promotor original do gene por um que seja forte e constitutivo e, desta forma, obter alta atividade da enzima, utilizando-se fontes de carbono alternativas como sacarose, caldo de cana e outras de baixo custo.

Após a seleção preliminar das linhagens promissoras com alta produção de PG e PL, foram realizados testes para verificar a estabilidade mitótica. As linhagens foram transferidas para meio mínimo sólido, onde permaneceram durante cinco semanas, sendo repicadas uma vez, semanalmente e avaliadas para estabilidade do plasmídeo, que contém o gene *hph*, sendo que todas se mostraram estáveis para este gene. Posteriormente, as linhagens foram cultivadas em meio líquido e analisadas quanto à estabilidade dos genes *pgg2* e *plg1* inseridos no genoma, por meio da detecção das atividades de PG e PL. Dentre as 16 linhagens avaliadas, sete se mostraram instáveis quanto à produção de PG ou PL e, portanto, foram eliminadas das próximas análises. A utilização de plasmídeos integrativos e estáveis é interessante para produção de proteínas, uma vez que o objetivo é a aplicação das linhagens modificadas nas indústrias, sendo a estabilidade mitótica essencial. Estes plasmídeos, ao se integrarem no genoma, tornam sua permanência estável e preservam as seqüências codificadoras. Fierro *et al.* (2004), ao avaliar e comparar a estabilidade entre plasmídeos integrativos e autônomos em *Penicillium nalgiovense*, observaram maior permanência do plasmídeo integrativo, sem necessidade do uso de meios seletivos. É desejável que se evite o uso de meios contendo substâncias para seleção dos plasmídeos, principalmente nas indústrias de produção de enzimas extracelulares, pois, assim agiliza-se o processo de purificação do produto e os custos operacionais diminuem.

Dentre as linhagens estáveis, nas quais foi detectada maior atividade de PG e PL, cinco foram selecionadas (Tabela 2). Para determinar a linhagem que apresentava a maior produção de PG e PL, foram coletadas

nove colônias, provenientes de nove conídios da segunda purificação monospórica de cada linhagem, as quais foram avaliadas quanto à atividade de PG e PL (Tabela 2). As linhagens denominadas R10 e R20 mostraram considerável produção de PG e PL, sendo a R20 selecionada para ser caracterizada em diferentes condições de cultivo para produção destas enzimas.

Tabela 2. Linhagens recombinantes para as quais foram detectados os maiores valores de atividade de poligalacturonase e pectina liase. Os resultados representam as médias aritméticas \pm desvio padrão de nove repetições experimentais

Linhagens	Atividade de PL (U/mL)*	Atividade de PG (U/mL)*
R07	1961 \pm 812 ^{bc}	3241 \pm 652 ^{ab}
R10	2292 \pm 681 ^{ab}	3490 \pm 380 ^a
R20	2981 \pm 820 ^a	3286 \pm 295 ^a
R33	998 \pm 381 ^c	2790 \pm 921 ^{ab}
R70	1763 \pm 890 ^{bc}	2369 \pm 877 ^b

*Cultivo 48h

a, b, c - Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem significativamente segundo o teste Tukey ($\alpha=0,05$).

3.2. Análise das linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* quanto ao número de cópias dos genes *pgg2* e *plg1*

A análise de integração do gene *pgg2* sob controle do promotor *gpd* de *A. nidulans* no genoma das linhagens recombinantes mostrou a integração de, pelo menos, uma cópia do gene no genoma (Figura 2). O resultado indicou que todas as linhagens recombinantes apresentaram integrações em diferentes sítios, uma vez que os genes endógenos *pgg2* e *plg1* são cópias únicas no genoma de *P. griseoroseum* (Ribon *et al.*, 2002b; Bazzolli *et al.*, 2006), e não foram observados eventos de integração homóloga. Todas as linhagens recombinantes (R) foram derivadas da linhagem recombinante T105. A linhagem recombinante 105 possui cópias adicionais do gene *plg1*, sob controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans* e foi utilizada para análise das integrações do gene *plg1* (Figura 2A). A linhagem recombinante T146 possui cópias adicionais do gene *pgg2*, sob controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans* e foi utilizada como controle nas análises de integrações do gene *pgg2* (Figura 2B). A linhagem recombinante R70 pode ser resultante da inativação de genes que codificam proteínas repressoras, que controlam a expressão do gene *pgg2*, uma vez que este recombinante não apresentou nenhum evento de integração ectópica ou homóloga para o gene *pgg2*.

Segundo Verdões *et al.* (1995), a introdução de cópias adicionais de um gene de interesse no genoma de um organismo resulta em considerável aumento na produção da proteína codificada por este gene, sendo, na maioria das vezes, correlacionados o número de cópias do gene e a atividade da enzima. No entanto, de acordo com Fincham (1989), o aumento no número de cópias de uma seqüência no genoma pode gerar instabilidade genética, pois, com o aumento das regiões de homologia, a ocorrência de recombinação pode ser favorecida, possibilitando rearranjos ou perda de fragmentos de DNA cromossomal.

Houve um aumento de, pelo menos, 10 vezes na atividade de PG e um aumento de, pelo menos, 30 vezes na atividade de PL, detectadas para as linhagens recombinantes em relação à linhagem *P. griseoroseum* selvagem, sem a necessidade de indução por pectina. Este resultado sugere

uma promissora utilização do promotor *gpd* de *A. nidulans* para a expressão de genes, que codificam pectinases e outras proteínas heterólogas. Além disso, o promotor do gene *gpd* de *A. nidulans* foi compatível com os fatores basais de transcrição, envolvidos na expressão gênica em *P. griseoroseum*, uma vez que foi detectado um aumento tanto da produção de PG quanto de PL.

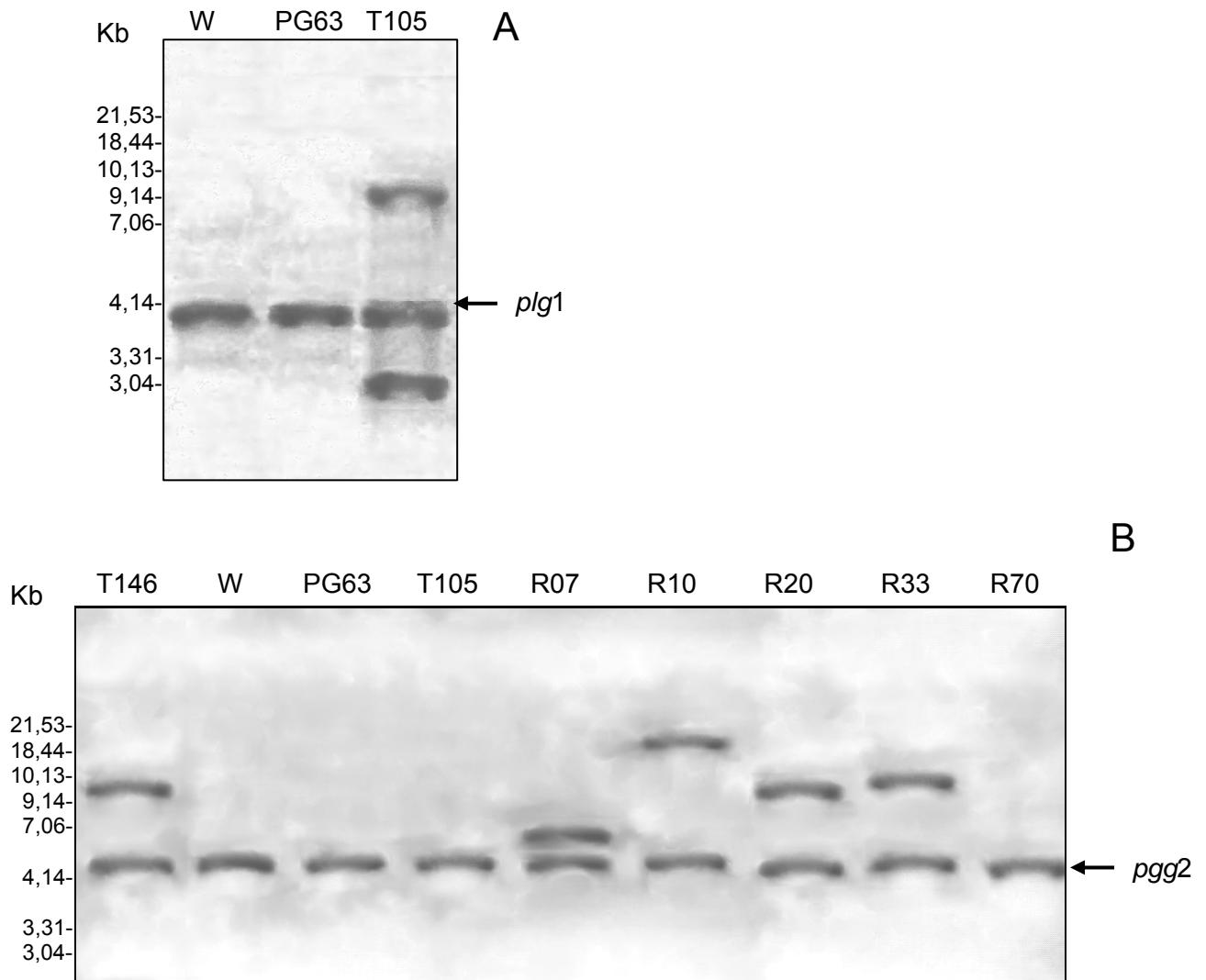


Figura 2. Análise das linhagens recombinantes quanto ao número de cópias do gene *plg1* e *pgg2*. Auto-radiografia da hibridização do DNA total das linhagens recombinantes (R), T105 e T146, das linhagens de *P. griseoroseum* selvagem (W) e mutante PG63. O DNA total foi digerido com a enzima *EcoRI* e hibridizado com o fragmento de DNA correspondente à região codificadora do gene *plg1* (A) e *pgg2* (B) de *P. griseoroseum*, marcado com dUTP-fluoresceína. As bandas, assinaladas pela seta, correspondem à cópia do gene *plg1* (A) e do gene *pgg2* (B) sob controle do promotor endógeno. As demais bandas correspondem às cópias adicionais dos genes *plg1* e *pgg2* sob o controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans*. As linhagens recombinantes (R) são derivadas da linhagem recombinante T105, que tem cópias do gene *plg1* sob controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans*.

3.3. Produção de pectina liase e poligalacturonase pela linhagem recombinante R20 de *P. griseoroseum*

Após a obtenção da linhagem recombinante geneticamente estável, é necessário avaliar as condições de cultivo que influenciam a produção da enzima. Um dos parâmetros estudados, que afeta a produção da enzima pela linhagem recombinante de *P. griseoroseum* R20, é a concentração inicial do inóculo. A Figura 3 representa as atividades de PG (Figura 3A) e PL (Figura 3B) das linhagens selvagem, mutante PG63 e recombinantes T146, T105 e R20, utilizando-se diferentes concentrações iniciais de inóculo. Para a linhagem recombinante R20, foi detectada maior atividade de PG (4695 ± 1323 U/mL), quando se utilizou 10^6 conídios/mL. Por outro lado, a maior atividade de PL (2568 ± 448 U/mL) foi detectada, quando se utilizou 10^7 conídios/mL, sendo este resultado semelhante ao obtido para a linhagem parental recombinante T105.

Os resultados obtidos neste estudo diferem dos reportados por Brumano *et al.* (1993) em um estudo com a linhagem selvagem de *P. griseoroseum*. Os autores avaliaram a produção de pectina liase utilizando diferentes concentrações de inóculo e concluíram que a produção máxima da enzima foi detectada quando 10^4 conídios/mL foram utilizados, sendo detectada baixa atividade com inóculos maiores que 10^5 conídios/mL. O efeito da concentração de inóculo inicial nas atividades de PG e PL já havia sido relatado para *A. niger* por Friedrich *et al.* (1990). Segundo os autores, a influência da concentração do inóculo de *A. niger* na produção de pectinases ocorre de forma distinta para PG, PE e PL quando cultivados em frascos Erlenmeyers sob agitação. Foi observado por estes autores que a atividade de PG diminuía com o aumento do inóculo e a atividade de PL tinha um aumento gradual com aumento da concentração de inóculo. Além disso, os autores mostraram que o efeito da concentração de inóculo na atividade das enzimas pécticas, em frascos Erlenmeyer, não correspondem aos experimentos conduzidos em fermentadores.

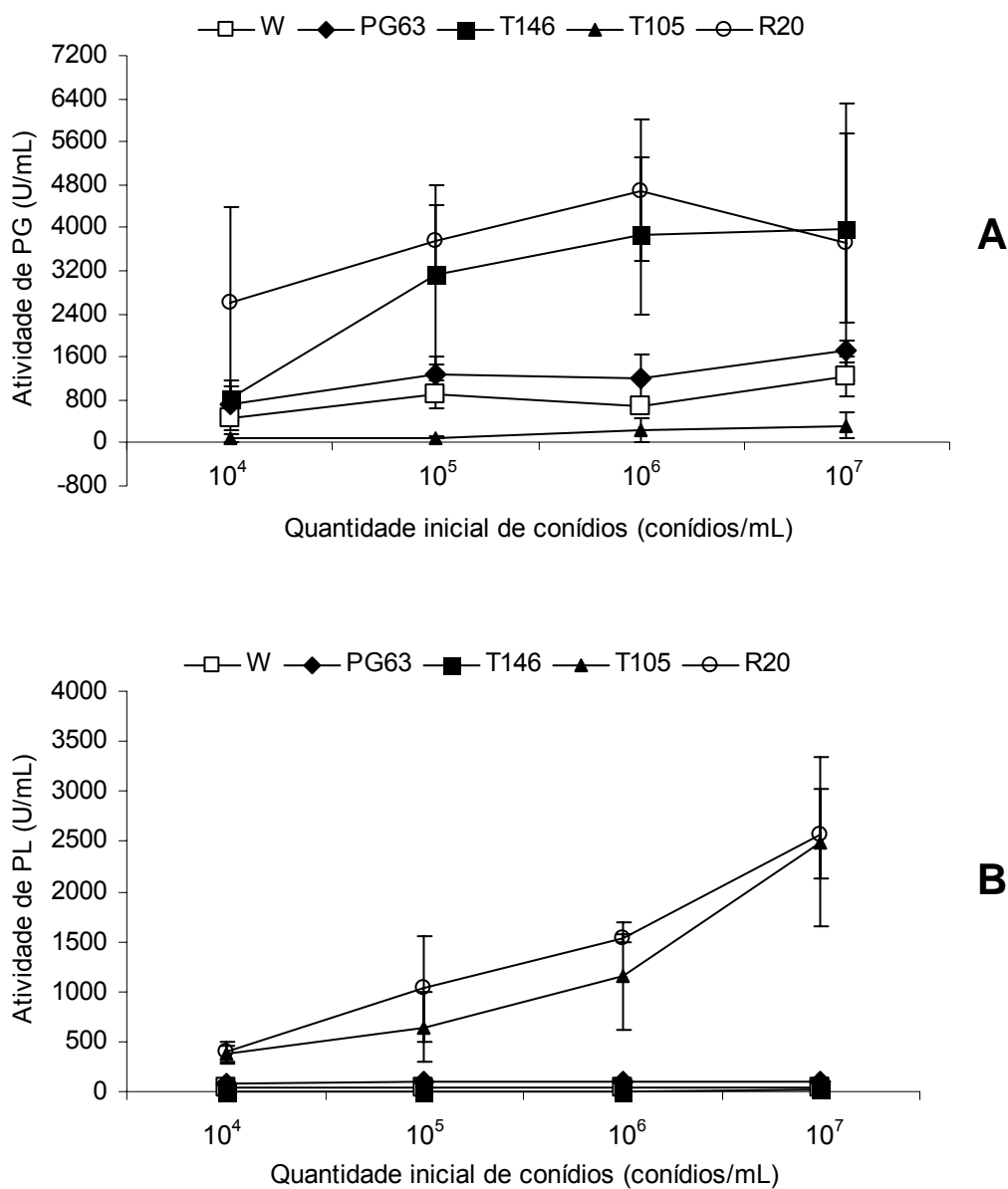


Figura 3. Efeito da quantidade inicial de inóculo na produção de PG e PL. Atividades de PG (A) e PL (B) das linhagens de *P. griseoroseum* selvagem (W) e mutante PG63, cultivadas em pectina cítrica 0,3% (p/v) acrescida de extrato de levedura 0,06% (p/v), e das linhagens recombinantes T146, T105 e R20, cultivadas em glicose 1% (p/v) por 48 horas. Os resultados representam as médias aritméticas de três repetições.

Avaliou-se, também, o efeito da concentração de glicose, suplementada ao meio de cultivo, na produção de PG e PL. A Figura 4 apresenta as atividades de PG (Figura 4A) e PL (Figura 4B) das linhagens *P. griseoroseum*, mutante PG63, recombinante T146, T105 e R20 cultivadas em diferentes concentrações iniciais de glicose. A maior atividade de PG (6528 ± 1750 U/mL) na linhagem recombinante R20 foi detectada, quando se utilizou uma concentração de glicose 1% (p/v), sendo observado o mesmo padrão para a linhagem recombinante T146. Nesta concentração também foi detectada maior atividade de PL (2362 ± 680 U/mL), produzida pela linhagem recombinante R20. A linhagem parental recombinante T105 apresentou igual padrão de resposta à concentração de glicose, quanto à atividade de PL. Cardoso (2004) e Ribeiro (2005) avaliaram o efeito da concentração de glicose, no meio de cultura, na produção de PL e PG, respectivamente, por linhagens recombinantes. Ambos relataram que a maior atividade dessas enzimas foi detectada, quando se utilizou a concentração de glicose 1% (p/v). Ribeiro (2005) observou ainda que, apesar da massa micelial ter aumentado de forma quase linear com o aumento na concentração de glicose, não houve aumentos na atividade de PG, utilizando concentrações de glicose acima de 1% (p/v).

A possibilidade de uso de fontes de carbono alternativas à pectina é desejável, pois, possibilita reduzir os custos de produção das enzimas pectinolíticas. Por isso, além da glicose, testaram-se a sacarose, sacarose acrescida de extrato de levedura, sacarose comercial, caldo de cana e pectina acrescida de extrato de levedura para o cultivo das linhagens *P. griseoroseum*, mutante PG63, recombinante T146, T105 e R20 (Tabelas 3 e 4). Foi observado que, para cada linhagem, ocorreram respostas distintas às várias fontes de carbono avaliadas. A maior atividade de PG (15065 ± 1280 U/mL) foi detectada, quando o meio de cultivo foi suplementado com caldo de cana 1% (p/v). Caldo de cana também proporcionou maior atividade de PL (3485 ± 171 U/mL) para esta linhagem. Um resultado semelhante foi obtido, quando sacarose acrescida de extrato de levedura foi utilizada como fonte de carbono, tanto para a produção de PG quanto para PL.

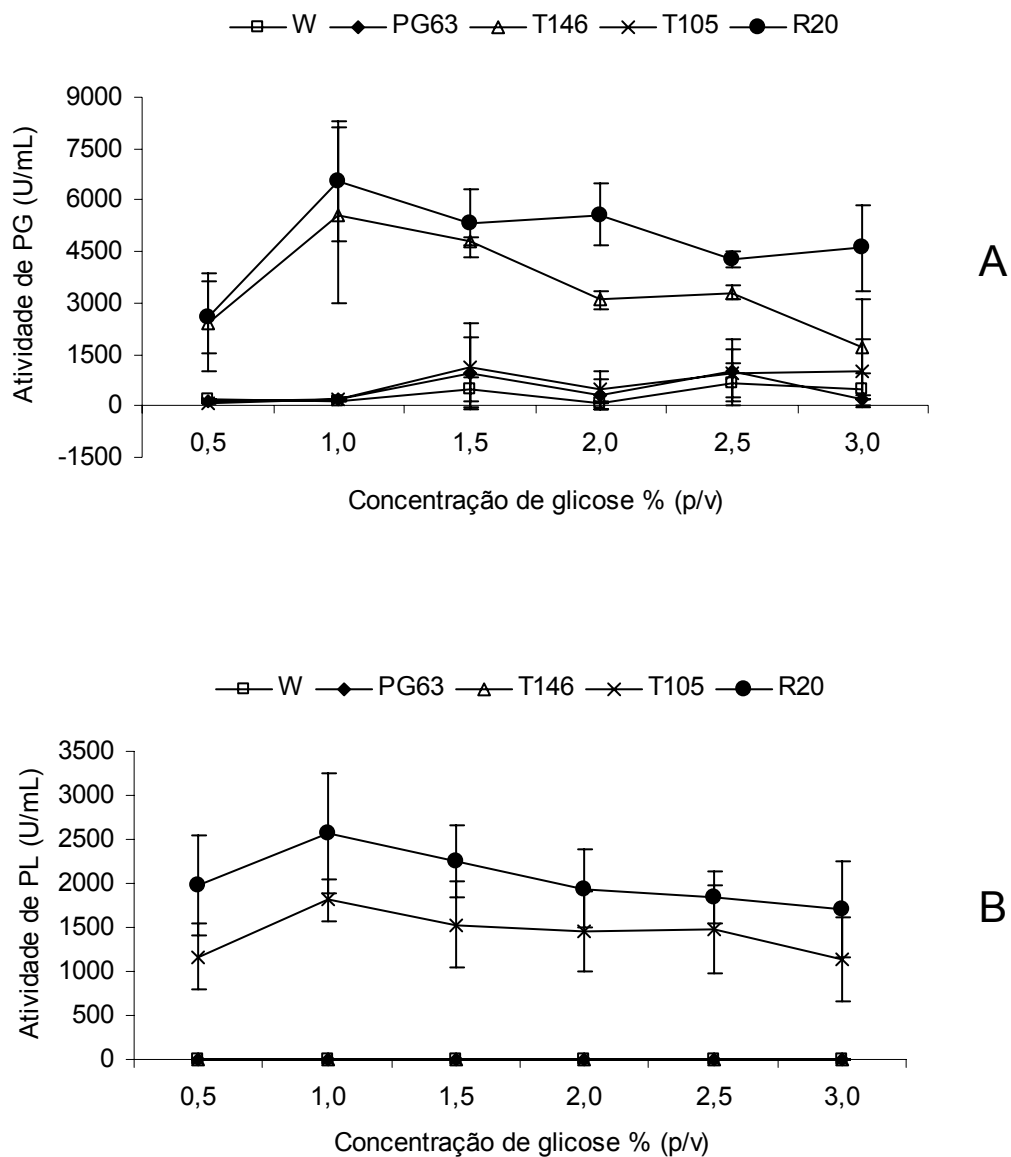


Figura 4. Efeito da concentração inicial de glicose na produção de PG e PL. Atividades de PG (A) e PL (B) das linhagens *P. griseoroseum* selvagem, mutante PG63 e recombinantes T146, T105 e R20, utilizando-se um inóculo de 10^6 conídios/mL com tempo de cultivo de 48 horas. Os resultados representam as médias aritméticas de três repetições.

Tabela 3. Produção de PG, massa micelial seca e proteína total das linhagens *P. griseoroseum* selvagem, mutante PG63 e recombinantes T146, T105 e R20 em diferentes fontes de carbono. Os resultados representam as médias aritméticas \pm desvio padrão de três repetições

	Atividade de PG (U/mL)					Massa micelial seca (g/L)					Proteína total (mg/L)				
	W	PG63	T146	T105	R20	W	PG63	T146	T105	R20	W	PG63	T146	T105	R20
Glicose	137 \pm 30	186 \pm 58	3228 \pm 827	191 \pm 28	6528 \pm 1750	6,1 \pm 2,3	4,3 \pm 0,9	2,9 \pm 1,5	3,1 \pm 2,0	3,7 \pm 0,6	1,4 \pm 0,4	1,4 \pm 0,5	5,4 \pm 1,3	6,2 \pm 0,5	5,8 \pm 0,3
Sacarose	392 \pm 150	353 \pm 101	9023 \pm 2723	357 \pm 166	10567 \pm 5093	5,2 \pm 1,0	3,7 \pm 0,4	3,9 \pm 0,2	4,9 \pm 0,9	3,4 \pm 1,5	3,7 \pm 0,7	2,2 \pm 0,9	6,7 \pm 0,1	6,3 \pm 0,6	6,6 \pm 1,1
Sacarose Comercial	407 \pm 114	360 \pm 71	11341 \pm 4985	341 \pm 184	9256 \pm 4048	5,1 \pm 0,7	4,5 \pm 0,6	4,2 \pm 0,4	4,5 \pm 0,6	3,6 \pm 0,3	3,7 \pm 2,09	2,6 \pm 1,9	5,3 \pm 2,8	6,4 \pm 1,7	7,6 \pm 1,1
Sacarose + EL	580 \pm 143	519 \pm 152	7878 \pm 562	546 \pm 36	8423 \pm 483	7,9 \pm 1,1	6,1 \pm 0,5	6,0 \pm 0,2	6,2 \pm 0,2	7,0 \pm 0,3	6,0 \pm 3,0	3,5 \pm 2,3	10,9 \pm 0,2	9,4 \pm 0,3	10,8 \pm 1,0
Caldo de Cana	1313 \pm 150	1304 \pm 293	16730 \pm 7144	2188 \pm 465	15065 \pm 1280	8,6 \pm 0,7	6,4 \pm 0,6	6,3 \pm 0,5	6,7 \pm 0,6	5,4 \pm 0,4	5,5 \pm 0,5	4,2 \pm 2,7	8,4 \pm 0,2	8,2 \pm 1,9	10,1 \pm 0,8
Pectina + EL	1349 \pm 93	1389 \pm 221	2628 \pm 195	1306 \pm 77	2802 \pm 383	1,6 \pm 0,0	1,5 \pm 0,4	1,3 \pm 0,0	1,3 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2	1,1 \pm 2,7	1,0 \pm 0,6	5,2 \pm 0,1	4,4 \pm 0,2	4,9 \pm 0,4

W – *P. griseoroseum* selvagem

Glicose 1% (p/v); sacarose 1% (p/v); sacarose comercial 1% (p/v); caldo de cana 1% (p/v); pectina cítrica 0,3% (p/v).

EL – Extrato de levedura 0,06% (p/v).

Tabela 4. Produção de PL, massa micelial seca e proteína total das linhagens *P. griseoroseum* selvagem, mutante PG63 e recombinantes T146, T105 e R20 em diferentes fontes de carbono. Os resultados representam as médias aritméticas \pm desvio padrão de três repetições

	Atividade de PL (U/mL)					Massa Micelial seca (g/L)					Proteína Total (mg/L)				
	W	PG63	T146	T105	R20	W	PG63	T146	T105	R20	W	PG63	T146	T105	R20
Glicose	4,7 \pm 1,8	3,2 \pm 1,9	6,6 \pm 2,5	1346,6 \pm 190,9	1361,0 \pm 29,5	6,1 \pm 2,3	4,3 \pm 0,9	2,9 \pm 1,5	3,1 \pm 2,0	3,7 \pm 0,6	1,4 \pm 0,4	1,4 \pm 0,5	5,4 \pm 1,3	6,2 \pm 0,5	5,8 \pm 0,3
Sacarose	7,7 \pm 4,0	14,7 \pm 0,5	23,0 \pm 4,7	1946,1 \pm 125,9	1672,1 \pm 393,7	5,2 \pm 1,0	3,7 \pm 0,4	3,9 \pm 0,2	4,9 \pm 0,9	3,4 \pm 1,5	3,7 \pm 0,7	2,2 \pm 0,9	6,7 \pm 0,1	6,3 \pm 0,6	6,6 \pm 1,1
Sacarose Comercial	3,4 \pm 2,5	13,4 \pm 2,7	16,6 \pm 4,5	1967,4 \pm 70,6	1445,6 \pm 283,2	5,1 \pm 0,7	4,5 \pm 0,6	4,2 \pm 0,4	4,5 \pm 0,6	3,6 \pm 0,3	3,7 \pm 2,09	2,6 \pm 1,9	5,3 \pm 2,8	6,4 \pm 1,7	7,6 \pm 1,1
Sacarose + EL	15,9 \pm 6,0	52,3 \pm 4,6	28,2 \pm 1,2	1125,9 \pm 281,1	2571,2 \pm 197,8	7,9 \pm 1,1	6,1 \pm 0,5	6,0 \pm 0,2	6,2 \pm 0,2	7,0 \pm 0,3	6,0 \pm 3,0	3,5 \pm 2,3	10,9 \pm 0,2	9,4 \pm 0,3	10,8 \pm 1,0
Caldo de Cana	13,1 \pm 3,5	35,3 \pm 3,7	35,7 \pm 3,1	2880,7 \pm 177,7	3485,5 \pm 171,1	8,6 \pm 0,7	6,4 \pm 0,6	6,3 \pm 0,5	6,7 \pm 0,6	5,4 \pm 0,4	5,5 \pm 0,5	4,2 \pm 2,7	8,4 \pm 0,2	8,2 \pm 1,9	10,1 \pm 0,8
Pectina + EL	77,6 \pm 13,8	90,0 \pm 11,1	67,2 \pm 4,3	465,7 \pm 126,3	576,8 \pm 198,9	1,6 \pm 0,0	1,5 \pm 0,4	1,3 \pm 0,0	1,3 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2	1,1 \pm 2,7	1,0 \pm 0,6	5,2 \pm 0,1	4,4 \pm 0,2	4,9 \pm 0,4

W – *P. griseoroseum* selvagem.

Glicose 1% (p/v); sacarose 1% (p/v); sacarose comercial 1% (p/v); caldo de cana 1% (p/v); pectina cítrica 0,3% (p/v).

EL – Extrato de levedura 0,06% (p/v).

É interessante ressaltar que a expressão de pectina liase na linhagem recombinante T105 se manteve na linhagem recombinante R20, não havendo diminuição na produção de PL.

O cultivo das linhagens recombinantes de *P. griseoroseum*, em todas as fontes de carbono alternativas à pectina, propiciou a obtenção de altas atividades de PG e PL, como também maior massa micelial seca (Tabelas 3 e 4). Para a linhagem recombinante R20, a atividade de PG em caldo de cana foi, aproximadamente, 11 vezes maior do que a atividade de PG detectada para a linhagem de *P. griseoroseum* selvagem, em suas condições ótimas de produção. Entretanto, a atividade de PL da linhagem recombinante R20, quando cultivada em caldo de cana, foi 45 vezes maior que a atividade de PL da linhagem selvagem. Além da obtenção de maior atividade e massa micelial seca, a secreção de proteínas extracelulares mostrou-se bastante eficiente, sendo obtidos cerca de 10 mg de proteína total, por litro de meio de cultivo, para a linhagem recombinante R20 (Tabelas 3 e 4). Também foi obtida maior atividade específica de PL (345,0 U/ μ g) e de PG (1491,6 U/ μ g) para a linhagem recombinante R20, quando cultivada em meio contendo caldo de cana 1% (p/v) (Tabela 5). Estes resultados indicam a potencialidade do uso de caldo de cana para produção industrial destas enzimas por linhagens de *P. griseoroseum*, geneticamente, modificadas. O caldo de cana clarificado pode ser também utilizado, pois, possibilitará a aplicação do extrato bruto sem a necessidade de clarificar o sobrenadante, para ser usado nas indústrias alimentícias.

A estratégia de produção de pectinases, utilizando-se fontes de carbono de baixo custo e outras substâncias em substituição ao indutor natural, pectina, tem sido usada por vários pesquisadores (Brumano *et al.*, 1993; Baracat *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1995; Minussi *et al.*, 1996; Fawole e Odunfa, 2003; Patil e Dayanand, 2006). Entretanto, poucos obtiveram grande sucesso, uma vez que, entre os genes que codificam as pectinases em fungos filamentosos, muitos são regulados e induzidos pelos substratos das enzimas que estes codificam como, por exemplo, os compostos pécnicos. A substituição do promotor endógeno dos genes, que codificam pectinases em *P. griseoroseum* por um promotor forte e constitutivo como o promotor do gene de *gpd* de *A. nidulans* mostrou bons resultados na

produção de PG e PL, suprimindo a necessidade de indução da síntese destas enzimas por pectina. Além disso, esta estratégia elimina o problema da repressão catabólica, que tem sido considerado um dos maiores obstáculos para a produção de pectinases, quando se utilizam fontes de carbono alternativas, como glicose e sacarose (Kusters Van Someren *et al.*, 1991; Bazzolli *et al.*, 2006; Trigui-Lahiani e Gargouri, 2007).

Tabela 5. Atividade específica de pectina liase (PL) e poligalacturonase (PG) das linhagens *P. griseoroseum* selvagem, mutante PG63 e recombinantes T146, T105 e R20 em diferentes fontes de carbono

	Atividade específica de PL (U/μg)					Atividade específica de PG (U/μg)				
	W	PG63	T146	T105	R20	W	PG63	T146	T105	R20
Glicose	3,4	2,3	1,2	217,2	234,7	97,8	132,9	597,7	30,8	1125,5
Sacarose	2,1	6,7	3,4	308,9	253,3	105,9	160,5	1074,1	56,6	1601,0
Sacarose Comercial	0,9	5,2	3,1	307,4	190,2	110,0	138,5	2139,8	53,3	1218,1
Sacarose + EL	2,6	14,9	2,6	119,7	238,1	96,7	148,3	722,7	55,9	779,9
Caldo de Cana	2,4	8,4	4,3	351,3	345,0	238,7	310,5	2497,0	266,8	1491,6
Pectina + EL	70,5	90	12,9	105,8	117,5	1226,4	1389	505,4	296,8	571,8

W – *P. griseoroseum* selvagem.

Glicose 1% (p/v); sacarose 1% (p/v); sacarose comercial 1% (p/v); caldo de cana 1% (p/v); pectina cítrica 0,3% (p/v).

EL – Extrato de levedura 0,06% (p/v).

Além das fontes de carbono, foram avaliados diferentes volumes de cultivo em Erlenmeyers, para verificar se o volume de trabalho interfere na produção de PG e PL. Foi observado que o aumento de quatro vezes no volume de cultivo proporciona aumento nas atividades de PG e PL (Figura 5). Houve aumento, em torno de 1,2 a 1,8 vezes, das atividades de PG e PL, quando se utilizou o volume de 200 mL de meio em Erlenmeyer de 500 mL, em relação ao volume de 50 mL em Erlenmeyer de 125 mL, para a linhagem recombinante R20 e para as demais linhagens controle (Figura 5A e 5B). Houve aumentos de 3,6 a 5,4 vezes na massa micelial (Figura 5C), indicando que não há uma relação direta entre a quantidade de massa micelial seca e a atividade enzimática detectada. Este resultado sugere que o aumento no volume de trabalho ocasiona aumento na produção da enzima, ou seja, o aumento da razão superfície por volume resulta em aumento na produção, indicando que a produção pode ser ampliada em larga escala de trabalho. Alguns autores, como Friedrich *et al.* (1990) e Viesturs e Leite (1997) relatam que as condições dos experimentos, conduzidos em Erlenmeyers, não correspondem às mesmas condições em fermentadores, uma vez que cada organismo, fungo ou bactéria são específicos e requerem ajustes individuais para melhorar a produção e secreção de proteínas.

Outro fator, que afeta a produção, é o período de cultivo durante a fermentação. A Figura 6 mostra a influência dos tempos de cultivo da linhagem recombinante R20 na produção de PG e PL, bem como na produção de massa micelial seca, durante um período de 120 horas. Foram detectadas maiores atividades de PG nos tempos de cultivo entre 48 a 96 horas, sendo a maior atividade detectada (8551 ± 825 U/mL) em 72 horas de cultivo (Figura 6A). Este resultado foi semelhante ao obtido por Ribeiro (2005) para a linhagem recombinante T146 que, assim como a linhagem recombinante R20, possui cópias adicionais do vetor de expressão pAN52pgg2 e tem alta produção de PG. Por outro lado, a maior atividade de PL foi detectada em 96 horas de cultivo (Figura 6B), tanto para a linhagem recombinante R20 (3380 ± 814 U/mL) quanto para a linhagem recombinante 105 (2172 ± 971 U/mL), mostrando que a produção de PG e PL são distintas ao longo do período de fermentação.

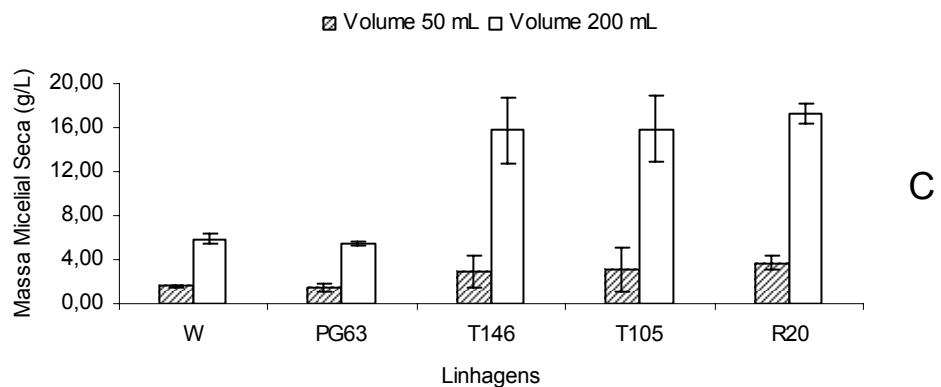
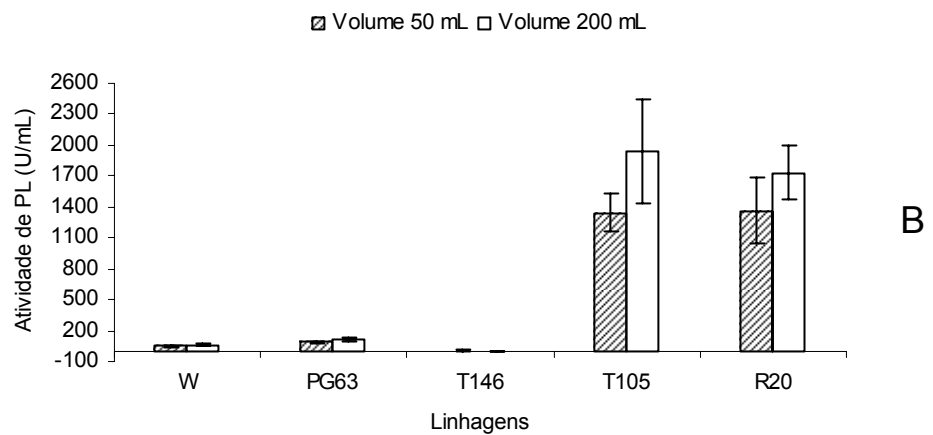
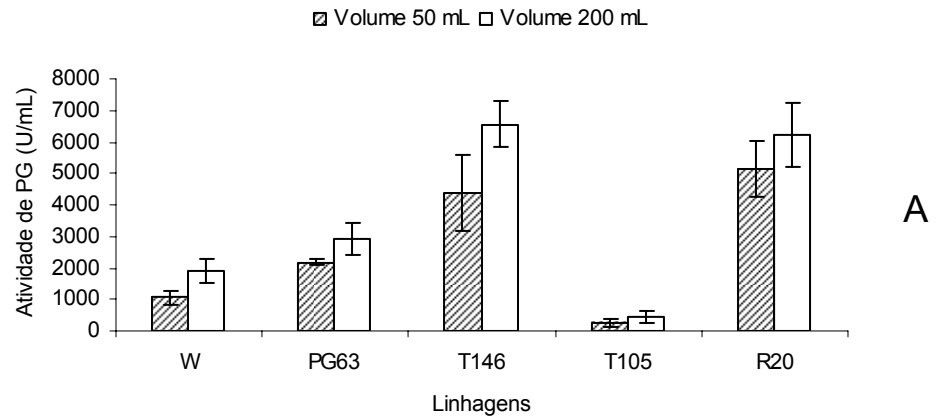


Figura 5. Efeito de diferentes volumes de meio de cultivo na produção de PG e PL. Atividades de PG (A), PL (B) e massa micelial seca (C) tanto das linhagens *P. griseoroseum* selvagem e mutante PG63, cultivadas em pectina cítrica 0,3% (p/v) acrescida de extrato de levedura 0,06% (p/v) quanto das linhagens recombinantes T146, T105 e R20, cultivadas em glicose 1% (p/v) durante 48 horas, utilizando-se um inóculo de 10^6 conídios/mL. Os resultados representam as médias aritméticas de três repetições.

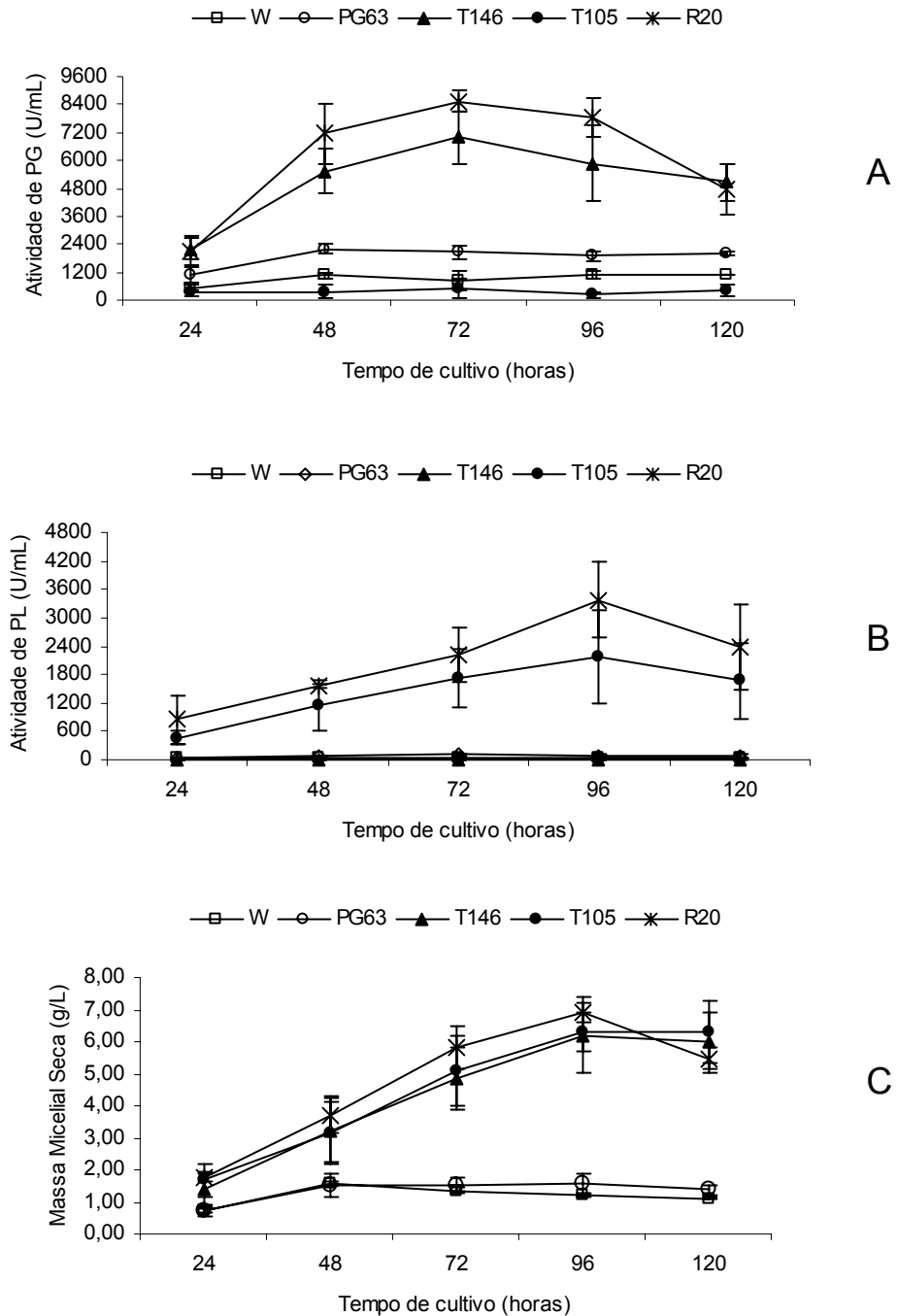


Figura 6. Efeito do tempo de cultivo na produção de PG, PL e massa micelial seca. Atividades de PG (A), PL (B) e massa micelial seca (C) tanto das linhagens *P. griseoroseum* selvagem e mutante PG63, cultivadas em pectina cítrica 0,3% (p/v) acrescida de extrato de levedura 0,06% (p/v) quanto das linhagens recombinantes T146, T105 e R20, cultivadas em glicose 1% (p/v), utilizando-se um inóculo de 10^6 conídios/mL. Os resultados representam as médias aritméticas de três repetições.

Em frascos Erlenmeyers, um tempo intermediário entre 72 e 96 horas (~84 horas) seria o ideal para obtenção de uma alta produção de ambas enzimas (PG e PL) produzidas pela linhagem recombinante R20. No entanto, para a produção de PL e PG, este tempo de cultivo, pode sofrer alterações, quando a linhagem recombinante R20 for cultivada em condições de fermentação em larga escala. Também foi observada maior massa micelial seca no tempo de 96 horas de cultivo (Figura 6C), ocorrendo um decréscimo na massa micelial seca após esse tempo, sugerindo a ocorrência de autólise do micélio devido ao esgotamento dos nutrientes no meio de cultivo.

O decréscimo nas atividades de PG e PL, após 96 horas de cultivo, juntamente com o decréscimo observado na massa micelial seca, assemelha-se ao resultado obtido por Schmidt *et al.* (1995). Investigando a síntese de enzimas pectinolíticas, em fermentação submersa por *A. niger*, esses autores concluíram que a diminuição do crescimento micelial ocasionava diminuição na produção das enzimas. De acordo com Patil e Dayanand (2006), o período de fermentação depende da natureza do meio de cultivo, do organismo e das concentrações dos nutrientes. Os autores relataram que, em meio sintético, o período de fermentação geralmente varia de 48 a 72 horas. Muitas fermentações em escala industrial são processadas em forma de cultura contínua, o que pode possibilitar o prosseguimento da fermentação durante um período maior que 72 horas, podendo levar a aumento na produção (Wang *et al.*, 2005). No entanto, embora a cultura contínua apresente vantagens sobre o cultivo em batelada, este apresenta menor risco de contaminação, além de se ter o produto concentrado em um volume fixo (Shuler e Kargi, 1992 citado por Wang *et al.*, 2005). Dependendo do interesse, várias são as alternativas para prolongar o período de fermentação e obter maior rendimento do produto.

Além dessas condições, verificou-se variação no pH do meio de cultivo, durante um período de 120 horas, para a linhagem mutante PG63 e as linhagens recombinantes T105 e R20. Foi observado que as linhagens recombinantes T105 e R20 promovem uma redução no pH do meio, de 6,8 para pH variando entre 4,0 e 5,0, durante 24 horas de cultivo (Figura 7). O pH do meio de cultivo das linhagens recombinantes apresentou um posterior aumento para pH 6,0, no período de 72 horas e se manteve estável até 120

horas. Alonso *et al.* (2005), estudando as condições de cultivo de *Yarrowia lipolytica* para produção de lipase, observaram que ocorria diminuição do pH do meio no tempo inicial de cultivo. Os autores observaram que, após a diminuição inicial, a estabilização do pH ocorria, quando os nutrientes eram metabolizados pelas células. De acordo com relatos disponíveis na literatura, as variações no pH do meio podem interferir no crescimento do organismo e na produção de enzimas pectinolíticas, sendo necessária a manutenção do pH para se obter uma produção e secreção eficientes das enzimas extracelulares (Brumano *et al.*, 1993; Fawole e Odunfa, 2003; Patil e Dayanand, 2006). Wang *et al.* (2005) sugerem que o controle de pH pode diminuir a atividade de protease extracelular, aumentando-se, assim, o rendimento na produção de outras proteínas.

Considerando a peculiaridade de cada linhagem e suas distintas respostas às condições de cultivo, é interessante avaliar a linhagem recombinante R20 em escalas de produção industrial, bem como otimizar as condições de cultivo para produção de PG e PL.

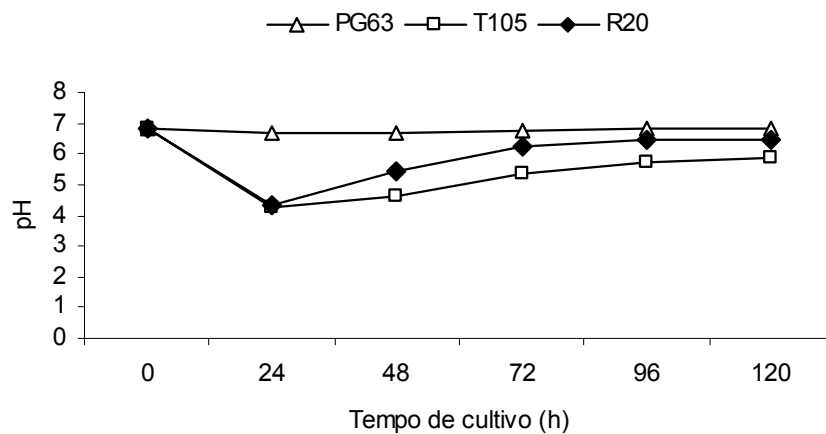


Figura 7. Variação do pH do meio de cultura, durante o período de cultivo tanto da linhagem mutante PG63, cultivada em pectina cítrica 0,3% (p/v) acrescida de extrato de levedura 0,06% (p/v) quanto das linhagens recombinantes T105 e R20, cultivadas em glicose 1% (p/v). Os resultados representam as médias aritméticas de três repetições.

3.4. Avaliação da produção de proteínas totais extracelulares por eletroforese em gel de poliacrilamida

O perfil protéico da linhagem recombinante R20 apresentou duas bandas distintas, sendo uma de aproximadamente 38 kDa e outra de aproximadamente 36 kDa (Figura 8). As linhagens recombinantes 105 e 146 foram utilizadas, como controle, para a produção de PL e PG, respectivamente. Foi observado que a banda de 38 kDa corresponde à PG, sendo detectada também no sobrenadante da cultura da linhagem recombinante T146, que tem alta produção de PG. A banda de 36 kDa corresponde à PL, detectada no sobrenadante da cultura da linhagem recombinante T105, que tem alta produção de PL. A produção de PG e PL pela linhagem recombinante R20, evidenciada no perfil protéico, mostra que, uma vez ocorrida a síntese dessas proteínas, elas se mantêm no sobrenadante durante até 120 horas de cultivo. As bandas correspondentes a PG e PL não foram observadas no sobrenadante da cultura da linhagem PG63 com a mesma intensidade, uma vez que a produção destas enzimas é induzida por pectina nesta linhagem.

Ribon *et al.* (2002b) isolaram e caracterizaram os genes, que codificam PG em *P. griseoroseum* e estimaram as massas moleculares das proteínas correspondentes a cada gene em 38,4 kDa para a PGG1, codificada pelo gene *pgg1* e 38,3 kDa para a PGG2, codificada pelo gene *pgg2*, com base na seqüência de nucleotídeos. Bazzolli *et al.* (2006) estimaram, com base na seqüência de nucleotídeos, as massas moleculares das proteínas correspondentes aos genes, que codificam pectina liase em *P. griseoroseum*. Foi estimada a massa molecular em 40,1 kDa para a PLG1, codificada pelo gene *plg1* e 40,5 kDa para a PLG2, codificada pelo gene *plg2*. Na Figura 8, os resultados confirmam as massas moleculares estimadas por Ribon *et al.* (2002b) e Bazzolli *et al.* (2006). No entanto, a proteína PLG1 tem massa molecular um pouco menor do que a estimada, sendo de aproximadamente 36 kDa. A diferença entre a massa molecular estimada e a massa observada para a PLG1 pode ser devida a modificações pós-traducionais, que ocorrem nesta proteína e não podem ser detectadas com base na seqüência nucleotídica.

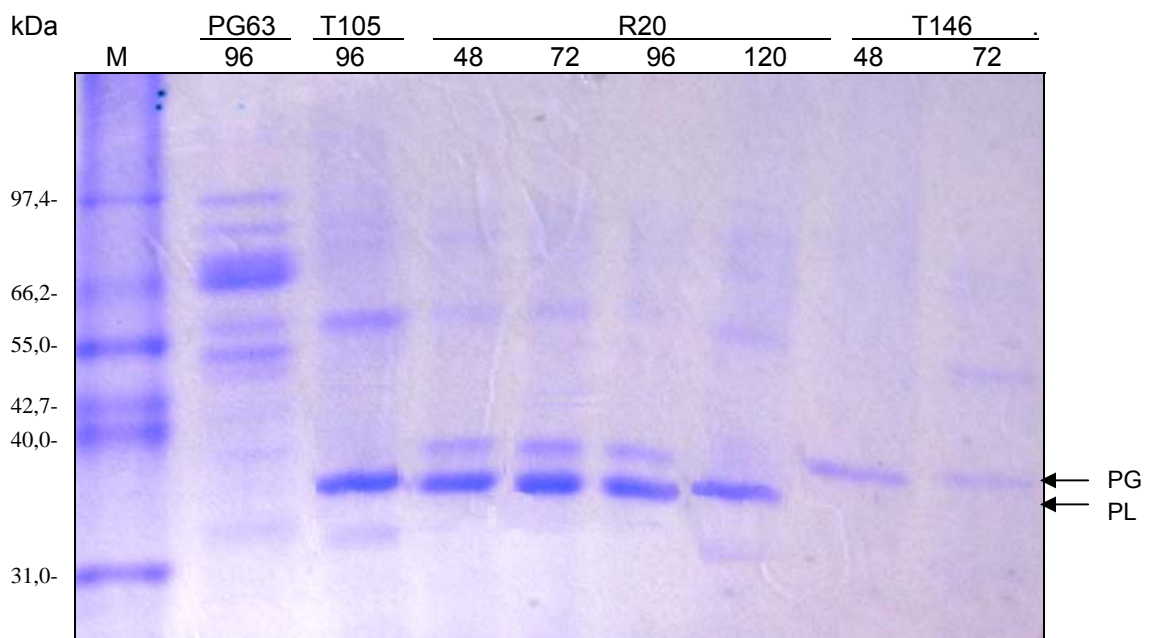


Figura 8. Perfil de proteínas extracelulares da linhagem PG63 e das linhagens recombinantes T105, R20 e T146. PG63 (96 horas de cultivo) e recombinantes T105 (96 horas de cultivo), recombinante R20 (48-120 horas de cultivo) e T146 (48-72 horas de cultivo) por SDS-PAGE. Os sobrenadantes das culturas foram concentrados e aplicados em gel desnaturante de poliacrilamida 12,5%. O gel foi corado com Coomassie Blue R-250. M – marcador de massa molecular protéica médio da Promega (3,5 μ g). As setas indicam a posição das proteínas PG- poligalacturonase (~38 kDa) e PL-pectina liase (~36 kDa).

3.5. Avaliação das atividades celulolítica e proteolítica nas condições de cultivo da linhagem recombinante R20 de *P. griseoroseum*

A linhagem recombinante 20 de *P. griseoroseum* foi cultivada, durante um período de 120 horas, enquanto o sobrenadante da cultura foi avaliado para as atividades de celulase e protease. A linhagem apresentou baixa atividade de protease, somente no tempo de 120 horas de cultivo, não sendo detectada atividade celulolítica nas condições avaliadas (Tabela 6). Os resultados confirmam o que Baracat *et al.* (1989) já haviam determinado para a linhagem selvagem de *P. griseoroseum*, ou seja, que esta não apresenta atividade de celulases, e portanto, tem o potencial para aplicação na indústria têxtil.

Tendo em vista que algumas enzimas fúngicas extracelulares são indesejáveis em processos industriais, é interessante que a linhagem recombinante não produza e secrete tais enzimas, durante o processo de fermentação. A presença de enzimas, como celulases e proteases, no sobrenadante de cultivo podem comprometer o processamento e a qualidade final do produto, sendo ideal a ausência ou baixa quantidade destas enzimas nos sobrenadante de cultivo. Na aplicação de pectinases na indústria têxtil, a presença de celulases pode enfraquecer as fibras e a presença de proteases pode reduzir a estabilidade da enzima de interesse (Punt *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005). Um fato a ser considerado é que a secreção de proteases pode está relacionada à morte celular, devido à ausência de nutrientes essenciais, como fonte de carbono ou nitrogênio, para o crescimento do fungo. De acordo com a morfologia do micélio em cultivo submerso, o micélio muito compacto pode sofrer autólise, devido à limitação na transferência de massa de oxigênio para a região central de micélios muito grandes (Wang *et al.*, 2005). Portanto, é importante conhecer o momento, em que ocorre secreção de proteases, como consequência da morte celular para, assim, identificar o momento exato em que a fermentação deve ser interrompida.

A Tabela 6 mostra a ocorrência de aumento na concentração de proteína total ao longo do tempo de cultivo, tanto para a linhagem recombinante R20 quanto para as linhagens controle, recombinante T105 e

mutante PG63. A linhagem recombinante R20 teve uma produção de, aproximadamente, 18 mg de proteína total por litro de meio de cultivo em 120 horas de cultivo, enquanto a linhagem mutante PG63 teve uma produção de 9 mg. L⁻¹ no mesmo período. Este resultado é interessante, uma vez que a linhagem recombinante R20 foi cultivada em glicose, que é uma fonte de carbono alternativa à pectina e que torna a fermentação mais viável economicamente. O aumento na quantidade de proteína total leva a inferir que a biossíntese de proteínas, bem como sua secreção para o meio extracelular, estão sendo eficientes, ressaltando-se o potencial de aplicação da linhagem recombinante R20 de *P. griseoroseum*, como hospedeira, para produção e secreção de proteínas heterólogas na indústria.

Além das características que a linhagem recombinante R20 possui, é necessário considerar que as enzimas PL e PG codificadas pelos genes *plg1* e *pgg2*, parcialmente caracterizadas por Cardoso (2004) e Ribeiro (2005), atuam em ampla faixa de pH, apresentam alta estabilidade térmica e podem ser armazenadas durante um período de, pelo menos, dois meses sem perda da atividade enzimática. Estas enzimas tiveram seu pI calculado em 9,4 e 8,4, para PL e PG, respectivamente (Ribon, 2002b; Bazzolli, 2006). Para a indústria, conhecer o ponto isoelétrico (pI) de uma enzima é de extrema importância, pois, quando o pI de uma enzima coincide com o pH de atuação da mesma, tende a ocorrer sua precipitação, com conseqüente diminuição na atividade enzimática. Estas particularidades indicam que as enzimas PG e PL, produzidas pela linhagem recombinante 20, são promissoras para aplicação no processo industrial de clarificação de sucos de frutos com pH tendendo à faixa acídica, como tomate, laranja, maçã e manga.

Considerando a alta produção de PG e PL pela linhagem recombinante R20 de *P. griseoroseum* em fontes de carbono alternativas à pectina, assim como a ausência de celulasas, baixa atividade de proteases e as características físico-químicas destas enzimas, pode-se inferir que esta linhagem apresenta grande potencial de aplicação tanto na indústria de produção de enzimas pectinolíticas quanto na aplicação destas pectinases nas indústrias alimentícias e têxteis. Todavia, são necessários experimentos

em escala industrial e otimização das condições de cultivo, para a produção de PG e PL.

Tabela 6. Atividade enzimática de celulase, protease e proteína total das linhagens mutante PG63 cultivada em pectina cítrica 0,3% (p/v) acrescido de extrato de levedura 0,06% (p/v), e recombinantes T105 e R20 cultivadas em glicose 1% (p/v). Os resultados representam a média aritmética \pm desvio padrão de três repetições experimentais

Tempo de cultivo (horas)	Atividade de celulase (U/mL)			Atividade de protease (U/mL)			Proteína total (mg/L)		
	PG63	T105	R20	PG63	T105	R20	PG63	T105	R20
24	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	0,28 \pm 0,07	0,32 \pm 0,58
48	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	0,02 \pm 0,58	4,35 \pm 3,12	5,75 \pm 0,30
72	Nd	Nd	Nd	5,74 \pm 4,13	Nd	Nd	3,49 \pm 0,54	9,95 \pm 2,72	11,02 \pm 1,38
96	Nd	Nd	Nd	6,53 \pm 2,69	1,33 \pm 1,36	Nd	7,90 \pm 3,16	12,05 \pm 5,46	14,25 \pm 3,56
120	Nd	Nd	Nd	6,95 \pm 1,28	2,04 \pm 1,04	0,96 \pm 1,70	9,38 \pm 0,23	13,45 \pm 3,8	17,80 \pm 3,24

Nd – Não detectada.

4. CONCLUSÕES

A estratégia de transformação utilizada, para co-transformar a linhagem recombinante T105 de *P. griseoroseum* com os plasmídeos pAN52*pgg2* e pAN7.1, resultou na obtenção de linhagens mitoticamente estáveis com elevada produção de poligalacturonase e pectina liase em relação à linhagem selvagem. Houve integração ectópica de pelo menos uma cópia do gene *pgg2*, sob controle do promotor forte e constitutivo de *gpd* de *A. nidulans*.

O uso de fontes de carbono alternativas à pectina, como caldo de cana e sacarose, para o cultivo da linhagem recombinante R20, resultou em aumento na produção de PG e PL. Este aumento da produção de PG e PL indica uma promissora utilização do promotor *gpd* de *A. nidulans*, para a expressão de genes, que codificam pectinases e outras proteínas heterólogas, bem como elimina a resposta de repressão catabólica, suprimindo a necessidade de indução dos genes, que codificam PG e PL, pela pectina.

A análise do perfil de proteínas, secretadas no sobrenadante da cultura da linhagem recombinante R20, por SDS-PAGE, evidenciou a presença de duas bandas fortes. Estas bandas correspondem as proteínas codificadas pelos genes *pgg2* e *plg1*, ambos sob controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans*.

Os sobrenadantes da cultura, da linhagem recombinante R20 de *P. griseoroseum*, contendo PG e PL não possuem atividade detectável de celulase ou protease, durante 120 horas de cultivo. Além disso, a linhagem recombinante R20 teve uma secreção de 18 mg de proteína total/L em 120 horas de cultivo, sendo pectina liase e poligalacturonase preferencialmente secretadas. Portanto, esta linhagem apresenta grande potencial de aplicação tanto na indústria de produção de enzimas pectinolíticas quanto na aplicação destas pectinases nas indústrias alimentícias e têxteis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaña, A., Alkorta, I., Llama, M.J., Serra, J.L. (1990) Pectin lyase in a *Penicillium italicum* strain. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, p.3755-3759.
- Alaña, A., Gabilondo, A., Hernando, F., Moragues, M.D., Dominguez, J.B., Llama, M.J., Serra, J.L. (1989) Pectin lyase production by *Penicillium italicum* strain. **Applied Environmental Microbiology**, v.55 (6), p.1612-1616.
- Albersheim, P. (1966) Pectin lyase from fungi. **Methods in Enzymology**, v.8, p.628-635.
- Albersheim, P., Killias, U. (1962) Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. **Achieves of Biochemistry and Biophysics**, v.97 (1), p.107-115.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M.J., Serra, J.L. (1998) Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, p.21-28.
- Alonso, F.O.M.; Oliveira, E.B.L.; Dellamora-Ortiz, G.M.; Pereira-Meirelles, F.V. (2005) Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.22 (1), p.9-18.
- Baracat, M.C., Valentim, C., Muchovej, J.J., Silva, D.O. (1989) Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. **Biotechnology Letters**, v.11 (12), p.899-902.
- Baracat-Pereira, M.C., Coelho, J.L.C., Silva, D.O. (1994) Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose and yeast extract for degumming of natural fibers. **Letters in Applied Microbiology**, v.18, p.127-129.

- Bazzolli, D.S.; Ribon, A.O.; Queiroz, M.V.; Araújo, E.F. (2006) Molecular characterization and expression profile of pectin-lyase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.52 (11), p. 1070-1077.
- Belshaw, N.J.; Haigh, N.P.; Fish, N.M.; Archer, D.B.; Alcocer, M.J. (2002) Use of a histone H4 promoter to drive the expression of homologous and heterologous proteins by *Penicillium funiculosum*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.60 (4), p.455-60.
- Bradford, M.M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytic Biochemistry**, v.72, p.248-254.
- Braun, S., Vecht-Lifshitz, S.E. (1991) Mycelial morphology and metabolite production. **Trends in Biotechnology**, v.9, p.63-68.
- Brumano, M.H.N., Coelho, J.L.C., Araújo, E.F., Silva, D.O. (1993) Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* as a function of the inoculum and culture conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.9, p.225-228.
- Bussink, H. J. D.; Buxton, F. P. e Visser, J. (1991) Expression and sequence comparison of the *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubigensis* genes encoding polygalacturonase II. **Current Genetics**, v.19, p.467-474.
- Bussink, H. J. D.; Van Den Hombergh, J. P. T. W.; Van Den Ijssel, P. R. L. A. e Visser, J. (1992) Characterization of polygalacturonase-overproducing *Aspergillus niger* transformants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.37, p.324-329.
- Calam, C.T. (1969) The evaluation of micelial growth. In: Norris, J.B., Ribbons, D.W. (Eds.) **Methods in Microbiology**. London: Academic Press, v.1, p.567-591.
- Cardoso, P.G. (2004) **Organização do gene de pectina liase em *Penicillium expansum* e obtenção de linhagens recombinantes de *Penicillium griseoroseum* com alta produção de pectina liase**. Viçosa, MG: UFV, 2004 - 127p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa.
- Daly, R.; Hearn, M.T. (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, V.18 (2), p.119-138.
- Dias, E. S.; Queiroz, M. V.; Cardoso, P. G.; Barros, E. G. e Araújo, E. F. (1999) Transformation of *Penicillium expansum* with a heterologous gene which confers resistance to benomyl. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.15, p.513-514.

- Diolez, A.; Langin, T.; Gerlinger, C.; Brygoo, Y. e Daboussi, M. J. (1993) The *nia* gene of *Fusarium oxysporum*: isolation, sequence and development of a homologous transformation system. **Gene**, v.131, p.61-67.
- Fawole, O.B.; Odunfa, S.A. (2003) Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.52 (4), p. 223-227.
- Fernandes-Salomão, T. M.; Amorim, A. C. R.; Chaves-Alves, V. M.; Coelho, J. L. C.; Silva, D. O. e Araújo, E. F. (1996) Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. **Revista de Microbiologia**, v.27 (1), p.33-36.
- Ferreira, G. (2000) **Produção de patulina por *Penicillium* spp.** Viçosa, MG: UFV, 2000 - 54p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa.
- Fierro, F., Laich, F., García-Rico, R.O., Martín, F.J. (2004) High efficiency transformation of *Penicillium nalgiovense* with integrative and autonomously replicating plasmids. **International Journal of Food Microbiology**, v.90, p.237-248.
- Fincham, J.R.S. (1989) Transformation in fungi. **Microbiological Reviews**, v.53, p.148-170.
- Fogarty, W.M. and Kelly, C.T. (1983) Pectin enzymes. In. **Microbial Enzymes and Biotchnology**, p. 131-182.
- Friedrich, J., Cimermam, A., Steiner, W. (1990) Production of pectnolytic enzymes by *Aspergillus niger*. effect of inoculum size and potassium hexacyanoferrate II – trihydrate. **Applied. Microbiology. Biotechnology**, v.33, p.377-381.
- Grassin, C., Fauquembergue, P. (1996) Fruit juices. In: Godfrey T, West S (Eds.) **Industrial Enzymology**. London: Macmillan Press, p.225-264.
- Gummadi, S.N. and Panda, T. (2003) Purification and biochemical properties of microbial pectinases – a review. **Process Biochemistry**, v.38, p.987-996.
- Hadj-Taieb, N., Ayadi, M.; Trigui, S.; Bouabdallah, F.; Gargouri, A. (2002) Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CTI) of *Penicillium occitanis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p.662-666.
- Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N., Beg, Q.K. (2002) Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.59, p.409-418.
- Iwashita K. (2002) Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.94 (6), p.530-535.

- Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R. (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v.40, p.2931-2944.
- Kanamasa, S.; Mochizuki, M.; Takada, G.; Kawaguchi, T.; Sumitani, J.; Arai, M. (2003) Overexpression of *Aspergillus aculeatus* cellobiohydrolase I in *Aspergillus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.95 (6), p.627-629.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., Tewari, R. (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v.77 (3), p.215-227.
- Khanh, N.Q., Leidinger, K., Albrecht, H., Ruttkowski, E., Gottschalk, M. (1992) Effects of promoters on the enhancement of pectin methyl esterase expression in *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v.14, p.1047-1052.
- Kitamoto, N., Yoshino-Yasuda, S., Ohmiya, K., Tsukagoshi, N. (2001) Sequence analysis and overexpression of a pectin lyase gene (*pel1*) from *Aspergillus oryzae* KBN616. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.65, p.209-212.
- Kolar, M.; Punt, P. J.; Van Den Hondal, C. A. M. J. J. e Schwab, H. (1988) Transformation of *Penicillium chrysogenum* using dominant selection markers and expression of an *Escherichia coli* lacZ fusion gene. **Gene**, v.62, p.127-134.
- Kusters-Van Somerem, M., Flipphi, M. Graaf, L., Van Den Broeck, H. Kester, H., Hinnen, A., Visser, J. (1992) Characterization of the *Aspergillus niger pelB* gene: structure and regulation of expression. **Molecular and General Genetics**, v.234, p.113-120.
- Kusters-Van Someren, M., Harmsen, J.A.M., Kester, H.C.M., Visser, J. (1991) Structure of the *Aspergillus niger pelA* gene and its expression in *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*. **Current Genetics**, v.20, p.293-299.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685.
- Lang, C.; Dörnenburg, H. (2000) Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.53, p.366-375.
- Leuchtenberger, A. e Mayer, G. (1991) Synthesis of different pectinases by filamentous growing *Aspergillus niger* mutants. **Folia Microbiologica**, v.36, p.362-366.
- Lim, J.Y., Fujio, Y., Ueda, S. (1983) Purification and characterization of pectinesterase and pectin lyase from *Aspergillus oryzae* A3. **Applied Biochemistry**, v.5, p.91-98.

- Lopes, F. J. F.; Araújo, E. F. e Queiroz, M. V. (2004) Easy detection of green fluorescent protein multicopy transformants in *Penicillium griseoroseum*. **Genetics and Molecular Research**, v.3 (4), p.449-455.
- MacCabe, A.P., Orejas, M., Tamayo, E.N., Villanueva, A., Ramón, D. (2002) Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. **Journal of Biotechnology**, v.96, p.43-54.
- Margolles-Clark, E., Harman, G. E. e Pentilã, M. (1996) Enhanced expression of endochitinase in *Trichoderma harzianum* with the *cbh1* promoter of *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.2152-2155.
- Mikkelsen, L.; Sarrocco, S.; Lubeck, M.; Jensen, D. F. (2003) Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v.223 (1), p.135-139.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analyses Chemicals**, v.31, p.426-428.
- Minussi, R.C., Baracat-Pereira, M.C., Coelho, J.L.C., Silva, D.O. (1997) Methylxantines as inducers of pectin lyase in *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. **Letters in Applied Microbiology**, v.24, p.369-372.
- Minussi, R.C., Coelho, J.L.C., Baracat-Pereira, M.C., Silva, D.O. (1996) Pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum*: effect of tea extract, caffeine, yeast extract, and pectin. **Biotechnology Letters**, v.18 (11), p.1283-1286.
- Minussi, R.C., Soares-Ramos, J.R.L., Coelho, J.L.C., Silva, D.O. (1998) Sugar-cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*. **Revista de Microbiologia**, v.29, p.246-250.
- Nevalainen, H.K.M., Teó, V.S.J., Bergquist, P.L. (2005) Heterologous protein expression in filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v.23 (9), p.468-474.
- Palma, M.B., Milagres, A.M.F., Prata, A.M.R., Mancilha, I.M. (1996) Influence of aeration and agitation rate on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*. **Process Biochemistry**, v.31 (2), p.141-145.
- Patil, S.R.; Dayanand, A. (2006) Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, V.97(16), p. 2054-2058.
- Pereira JF, de Queiroz MV, Lopes FJ, Rocha RB, Daboussi MJ, de Araujo EF. (2004) Characterization, regulation, and phylogenetic analyses of the *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase gene and its use as selection marker for homologous transformation. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50 (11), p.891-900.

- Phutela, U.; Dhuma, V.; Sandhu, S.; Chadha, B.S. (2005) Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36 (1), p.63-69.
- Piccoli-Valle, R.H. (1996) **Influência das condições de cultivo na produção de pectina liase por *Penicillium griseoroseum* em biorreatores**. Viçosa: UFV, 1996. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa.
- Piccoli-Valle, R.H., Passos, F. J. V., Brandi, I.V., Peternelli, L.A, Silva, D.O. (2003) Influence of different mixing and aeration and regimens on pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum*. **Process Biochemistry**, 38:849-854.
- Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; Hemmons, L.M.; Macdonald, K.D. e Bufton, A.W.J. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v.5, p.141-238.
- Punt, P. J.; Oliver, R. P.; Dingemans, M. A.; Pouwels, P. H. e Van Den Hondal, C. A. M. J. J. (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. **Gene**, v.59, p.117-124.
- Punt, P.J., Biezen, N.V., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J., Hondel, C.V.D. (2002) Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. **Trends in Biotechnology**, v.20 (5), p.200-206.
- Queiroz, M. V.; Barros, A. O.; Barros, E. G.; Guimarães, W. V. e Araújo, E. F. (1998) Transformation of *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase mutant with the *nia* gene from *Fusarium oxysporum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.1-3.
- Rajmohan, S., Dodd, C.E.R., Waites, W.M. (2002) Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.205-213.
- Ribeiro, J.B. (2001) **Isolamento e caracterização de genes que codificam poligalacturonase e transformação de *Penicillium expansum***. Viçosa, MG, UFV, 2001 - 57p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa.
- Ribeiro, J.B. (2005) **Produção de poligalacturonase por linhagens recombinantes de *Penicillium griseoroseum***. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2005 - 106p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa.
- Ribon, A. O. B., Queiroz, M. V., Coelho, J. L. C. e Araújo, E. F. (2002a) Differential expression of polygalacturonase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum*

- in different carbon sources. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.29, p.145-148.
- Ribon, A. O. B.; Coelho, J. L. C.; Barros, E. G. e Araújo, E. F. (1999) Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Penicillium griseoroseum*. **Biotechnology Letters**, v.21, p.395-399.
- Ribon, A.O.B.; Queiroz, M.V.; Araújo, E.F. (2002b) Structural organization of polygalacturonase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum*. **Genetics and Molecular Biology**, v.25 (4), p.489-493.
- Rombouts, F.M., Pilnik, W. (1980) Pectic enzymes. In: **Economic Microbiology**. Rose, A.H. (Ed). London: Academic, v.5, p.227-282.
- Ruttkowski, E., Khanh, N.Q., Wientjes, F.J.; Gottschalk, M. (1991) Characterization of a polygalacturonase gene of *Aspergillus niger* RH5344. **Molecular Microbiology**, v.5, p.1353-1361.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) **Molecular cloning. A laboratory manual**. 2 ed. Cold spring harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory, s.n.p.
- Schmidt, O., Angermann, H., Frommhold-Treu, I., Hoppe, K. (1995) Experimental and theoretical investigation of submerged fermentation and synthesis of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.43, p.424-430.
- Shuler, M.L.; Kargi, F. (1992) **Bioprocess Engineering – Basic concepts**. Englewood Cliffs (NJ): Prentice-Hall. p. 148, 234.
- Solís, S.; Flores, M.E.; Huitrón, C. (1997) Improvement of pectinase production by interspecific hybrids of *Aspergillus strains*. **Letters in Applied Microbiology**, v.24, p77-81.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v.98, p.503-517.
- Specht, C.A., Dirusso, C.C., Novotny, C.P., Ullrich, R.C. (1982) A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytical Biochemistry**, v.119, n.1, p.158-163.
- Trigui-Lahiani, H.; Gargouri, A. (2007) Cloning, genomic organisation and mRNA expression of a pectin lyase gene from a mutant strain of *Penicillium occitanis*. **Gene**, v.388, p. 54-60.
- Van den Hombergh, J.P.; Fraissinet-Tachet, L.; van de Vondervoort, P.J.; Visser, J. (1997) Production of the homologous pectin lyase B protein in six genetically

defined protease-deficient *Aspergillus niger* mutant strains. **Current Genetics**, v.32 (1), p.73-81.

Varavallo, M.A.; Queiroz, M.V.; Lana, T.G.; Brito, A.T.R.; Gonçalves, D.B.; Araújo, E.F. (2007) Isolation of recombinant strains with enhanced pectinase production by protoplast fusion between *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 1-6.

Verdões, J.C., Punt, P.J., Van Den Hondel, C.A.M.J.J. (1995) Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.43, p.195-205.

Viesturs, U., Leite, M. (1997) Certain new biotechnological processes and equipment for their implementation. **Applied Biochemistry and microbiology**, v.33, p.213-225.

Visôto, L. E. (2003) **Produção de ocratoxina A por fungos filamentosos isolados de café e por fungos produtores de pectinases**. Viçosa, MG: UFV, 2003 - 43p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa.

Vivan, J. (2002) **Produção da micotoxina citrinina por *Penicillium* spp.** Viçosa, MG: UFV, 2002 - 42p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa.

Wang, L., Ridgway, D., Gu, T., Moo-Young, M. (2005) Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v.23, p.115-129.