

PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES EM

HAPLÓIDES, HETEROCÁRIOS E DIPLÓIDES

DE *Aspergillus nidulans*

Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida
pela candidata Irma de Lourdes Moscoso e aprovada pela
Comissão julgadora. *Ybommu*

PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES EM

HAPLÓIDES, HETEROCÁRIOS E DIPLÓIDES

DE *Aspergillus nidulans*

IRMA DE LOURDES MOSCOSO

Orientadora: Profa.Dra. YOKO BOMURA ROSATO

Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação de Genética, do IB, UNI
CAMP, para a obtenção do título
de Mestre.

CAMPINAS

Estado de São Paulo - Brasil

1987

UNICAMP

À minha família:

a criatura especial, que é o meu tio padre, Cônego
MILTON SANTANA;

minha mãe querida, NAIR, a verdadeira "super-mãe";

meu pai, DJALMA, sempre procurando me servir;

meu filho, SILVANO, pela paciência;

minha irmã, NADJA MARIA e seu marido, CELSO MAURY,
meus grandes incentivos;

SÉRGIO, meu irmão pelo coração;

e

à Dra. YOKO BOMURA ROSATO, por ter sido Ela a minha Orienta
dora e Amiga,

a todos esses entes amados, **dedico**, com carinho especial.

AGRADEÇO:

ã Profa.Dra. YOKO BOMURA ROSATO, pela competência, zelo, paciência e, sobretudo, pela dedicação toda especial, indo muito além das suas funções de Mestra e Orientadora;

ao Prof. Dr. IVANHOÉ RODRIGUES BARACHO, pela amizade e auxílio na execução da análise estatística;

ao Dr. DJALMA MOSCOSO - meu querido pai-pelo estímulo e pelo trabalho fotográfico;

ao saudoso Prof. Dr. JOSÉ PAES DE BARROS, mola propulsora do meu gosto pela Genética;

ã minha família, amigos, colegas e a todos enfim, que direta ou indiretamente, contribuíram com o seu apoio, na elaboração deste trabalho.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	01
2.	REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1.	Mutantes morfológicos em <i>Aspergillus nidulans</i>	03
2.2.	Enzimas hidrolíticas	06
2.2.1.	Lipases	07
2.2.2.	Amilases	09
2.2.3.	Proteases	12
2.2.4.	Fosfatases	13
2.2.5.	Ureases	15
2.3.	Uso do meio sólido nos ensaios sobre enzimas microbianas	17
3.	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1.	Linhagens	19
3.1.1.	Linhagens controle	19
3.1.2.	Mutantes morfológicos	21
3.2.	Meios de cultura e soluções	22
3.2.1.	Meio mínimo	22
3.2.2.	Meio completo	23
3.2.2.1.	Solução de vitaminas	23
3.2.2.2.	Hidrolisado de ácido Nucleico de leveduras	24
3.2.3.	Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo	24
3.2.4.	Meio para detecção de atividade lipolítica	24
3.2.5.	Meio para detecção de atividade amilolítica	25
3.2.6.	Meio para detecção de atividade proteolítica	26
3.2.7.	Meio para detecção de atividade de fosfatase	26
3.2.8.	Meio para detecção de atividade de urease	26

3.2.9. Suplementos adicionados aos meios de cultura	27
3.2.10. Solução de tween 80	27
3.2.11. Solução de lugol.....	27
3.2.12. Hidróxido de amônio	27
3.2.13. Sobrecamada para revelação de urease	28
3.2.14. Solução de benlate	28
3.2.15. Solução de lisol	28
3.3. Incubação	28
3.4. Obtenção dos heterocários	29
3.5. Obtenção e isolamento dos diplóides	29
3.6. Verificação da produção das enzimas extracelulares: lipase, amilase, protease, fosfatase e urease	30
3.6.1. Atividade de lipase	31
3.6.2. Atividade de amilase	31
3.6.3. Atividade de protease	31
3.6.4. Atividade de fosfatase	31
3.6.5. Atividade de urease	31
3.7. Índices enzimáticos	32
3.8. Análise estatística	33
3.9. Análise microscópica	33
4. RESULTADOS	36
4.1. Produção das enzimas extracelulares lipase, amilase e protease, nas linhagens haplóides, em heterocários e em diplóides	36
4.1.1. Produção de lipase	45
4.1.2. Produção de amilase	45
4.1.3. Produção de protease	46
4.2. Produção de fosfatase e urease nas linhagens haplóides e em heterocários e diplóides	50
4.2.1. Produção de fosfatase nas linhagens haplóides	50

4.2.2. Produção de urease nas linhagens haplóides	50
4.2.3. Produção de fosfatase e urease em diplóides e heterocá- rios	50
4.3. Observações microscópicas	52
5. DISCUSSÃO	55
5.1. Linhagens haplóides	55
5.2. Produção de enzimas extracelulares em diplóides e heterocários	59
6. LITERATURA CITADA	62
7. APÊNDICE	75

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
01. Linhagem padrão pp e linhagem compacta derivada da pp-6	21
02. Produção de LIPASE em haplóides, heterocários e diplóides	42
03. Produção de AMILASE em haplóides, heterocários e diplóides	43
04. Produção de PROTEASE em haplóides, heterocários e diplóides	44
05. Ensaio para AMILASE: Linhagem compacta	46
06. Linhagem compacta pp-6. Aspecto microscópico	53

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
01. Linhagens controle, marcadores genéticos e respectivos grupos de ligação	20
02. Mutantes morfológicos: origens, símbolos e respectivos grupos de ligação	22
03. Sumário das técnicas para verificação da produção enzimática de lipase, amilase, fosfatase, urease e protease	34
04. Diâmetros dos halos, das colônias e índices enzimáticos das linhagens haplóides	37
05. Diâmetros dos halos, das colônias e índices enzimáticos dos heterocários	38
06. Diâmetros dos halos, das colônias e índices enzimáticos dos diplóides	39
07. Análise de variância das linhagens haplóides, heterocários e diplóides para lipase	40
08. Análise de variância das linhagens haplóides, heterocários e diplóides para amilase	41
09. Análise de variância das linhagens haplóides, heterocários e diplóides para protease	41
10. Índices para LIPASE extracelular	42
11. Índices para AMILASE extracelular	43
12. Índices para PROTEASE extracelular	44
13. Produção de FOSFATASE e UREASE nas linhagens haplóides	51
14. Aspectos microscópicos característicos observados nas linhagens compactas	54

RESUMO

Linhagens haplóides, bem como heterocários e diplóides do fungo *Aspergillus nidulans* foram analisados quanto à produção das enzimas extracelulares lipase, amilase, protease, fosfatase e urease. Foram utilizados três linhagens normais e oito mutantes morfológicos, além de diferentes combinações entre ambos. Os ensaios foram efetuados em meios de cultura sólidos, contendo cada qual, um substrato específico. As linhagens morfológicas do tipo compacto foram também analisadas microscopicamente, e comparadas às demais, previamente descritas.

Pelos resultados obtidos, foi constatado que as colônias de crescimento reduzido em um ou mais meios de cultura foram sempre as mais alteradas também no aspecto enzimático, bem como no microscópico.

As compactas B-VIII e B-6, bem como os heterocários pp+M-32 e pp+M-35, destacaram-se por apresentar a maior produção de lipase, amilase, protease, enquanto que outras linhagens e heterocários mostraram maior produção em relação a apenas uma ou outra dessas enzimas. A linhagem compacta pp-6 constituiu uma ex

ção, já que não apresentou produção de protease, embora o heterocário MSE + pp-6 tenha produzido o mais alto nível de atividade dessa mesma enzima. Para fosfatase e urease ocorreu o inverso, isto é, as colônias de menores dimensões apresentaram evidências de menor atividade enzimática. Quanto aos diplóides, houve restauração do fenótipo enzimático original em ou pp em todos os casos.

As alterações aqui descritas foram discutidas, considerando-se a possibilidade de problemas de permeabilidade nos mutantes morfológicos utilizados.

SUMMARY

The production of extracellular enzymes such as lipase, amylase, protease, phosphatase and urease by haploids, heterocaryons and diploids of *A. nidulans* were analysed. Three normal strains, eight morphological mutants and different combinations among them were utilized. The enzymatic tests were carried out using solid culture medium containing specific substrate for each enzyme under assay.

The results showed that slow growing colonies in one or more culture medium showed also more alterations in the enzyme production. In general compact colonies (B-VIII and B-6) and some heterocaryons (pp+M-32 and pp+M-35) showed higher production of lipase, amylase and protease. For specific enzymes there are other strains and heterocaryons that must be considered. The strain pp-6 was a special compact strain showing no activity of protease at all; however in the heterocaryon MSE + pp-6 there was a strong interaction producing the highest level of protease activity. For phosphatase and urease the results were quite different, the smaller colonies having lower enzymatic activity. There were no differences in the diploids and the level of enzymes production returned to the

respective original strain bm ou pp.

All the alterations described, specially in haploids and heterocaryons were discussed considering permeability problems in the morphological mutants.

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Aspergillus nidulans*, da classe Ascomycetes, apresenta diversas características que o tornam adequado para estudos experimentais. A análise genética é relativamente facilitada, através do ciclo parassexual, sexual ou fusão de protoplastos, e, muitas linhagens com diversos marcadores genéticos são disponíveis atualmente. Seu crescimento é relativamente rápido e se desenvolve em diversos meios de cultura definidos e complexos. Apresenta estruturas de diferenciação relativamente simples, que se formam com alto grau de sincronia. Oferece, como alguns outros, a oportunidade de se comparar a interação entre genes, na condição diplóide ou na heterocariótica. Os principais estudos efetuados ao nível de nutrição, fisiologia, metabolismo e genética, podem ser vistos em CLUTTERBUCK (1974).

Os trabalhos sobre mutantes morfológicos de *A. nidulans* restringem-se, na maioria das vezes, às técnicas de isolamento, descrição e mapeamento genético. Muito pouco foi pesquisado sobre o aspecto bioquímico e fisiológico desses mu-

tantes, principalmente no que se refere à correlação entre morfologia alterada e à produção enzimática. As maiores contribuições foram provenientes do fungo do gênero *Neurospora*, onde as alterações morfológicas quase sempre foram acompanhadas por mudanças na composição da parede celular, afetando crescimento e atividade enzimática (MISHRA, 1977).

Por outro lado, a enzimologia tem despertado interesses crescentes, nas últimas décadas, sobretudo do ponto de vista tecnológico e da biologia molecular. Enzimas microbianas têm sido requeridas para a indústria de alimentos, para a farmacêutica, para processos biológicos, terapêuticos, etc. Linhagens microbianas mutantes, boas produtoras de enzimas, constituem problema extremamente urgente (OSTRIKOVA e KONOVALOV, 1978), assim como as interações genéticas e condições ambientais que favoreçam uma maior produção.

Assim sendo, mutantes morfológicos de *Aspergillus nidulans*, previamente isolados, foram utilizados com o objetivo de se detectar algumas diferenças entre eles, no que se refere à produção das enzimas extracelulares, lipase, amilase, protease, fosfatase e urease. A comparação foi efetuada entre as linhagens em condição haplóide, assim como na interação existente entre heterocários e diplóides heterozigotos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Diversos mutantes morfológicos têm sido descritos em *Aspergillus nidulans*, e uma rápida abordagem sobre o assunto constituirá a primeira parte desta revisão bibliográfica.

Em seguida, será feita uma introdução às enzimas hidrolíticas: lipase, amilase, protease, fosfatase e urease, procurando-se enfatizar mutantes enzimáticos em *A. nidulans*.

Da revisão constará, ainda, uma breve análise sobre o uso de meio sólido nos ensaios sobre enzimas microbianas, utilizados no presente trabalho.

2.1. Mutantes morfológicos em *Aspergillus nidulans*

Os mutantes morfológicos em *A. nidulans* têm sido empregados em estudos genéticos, desde o trabalho inicial apresentado por PONTECORVO (1953). Além de se constituírem marcadores genéticos bastante úteis, eles também foram utilizados para

o esclarecimento de aspectos sobre a morfogênese.

Em fungos filamentosos, a principal manifestação de diferenciação consiste na formação de esporos sexuais e assexuais. Assim sendo, *A. nidulans* apresenta características favoráveis a estudos desta natureza, principalmente por possuir uma estrutura conidial bem definida. A maioria dos mutantes morfológicos descritos foi analisada principalmente sob o aspecto genético. Uma revisão sobre o assunto pode ser vista em CLUTTERBUCK (1974) e BIAGI (1977). Esses mutantes podem ser enquadrados em três categorias principais:

- a) Mutantes que apresentam um único determinante genético responsável pela alteração morfológica (herança monogênica)

A maioria dos mutantes pertence a esse primeiro grupo. Eles apresentam alterações, principalmente na conidiação e no crescimento vegetativo. Há linhagens asporogênicas, bem como outras oligosporogênicas. Existe, também, uma variabilidade muito grande na pigmentação dos conídios (CLUTTERBUCK, 1974; BIAGI, 1977). Alguns mutantes possuem estruturas de diferenciação alteradas, como os esterigmas (KAUFER, 1958; CLUTTERBUCK, 1969), ou, mesmo, outras alterações gerais das colônias (CLUTTERBUCK, 1974; BIAGI, 1977 e ROSATO e AZEVEDO, 1983).

- b) Mutantes morfológicos com alterações genéticas mais complexas

Esses apresentam, também, alterações de crescimento vegetativo, de conidiação, de coloração do micélio, além de ou-

tras características gerais da colônia. No entanto, as alterações desse segundo grupo são atribuídas à existência de translocações (BAINBRIDGE, 1963; CLUTTERBUCK, 1970), de duplicações (BAINBRIDGE e ROPER, 1966; AZEVEDO e ROPER, 1970) ou de aneuploidias (UPSHALL e KAUFER, 1974).

c) Mutantes morfológicos devido a fatores citoplasmáticos

Os exemplos mais significativos foram relatados por ARLETT (1957), ARLETT e col. (1962) com os mutantes "red", e por ROSATO e AZEVEDO (1980), com um mutante compacto.

Apesar dos genes de mais de uma centena de mutantes morfológicos em *A. nidulans* estarem mapeados, pouco se conhece sobre as alterações bioquímicas correspondentes e, portanto, apenas alguns trabalhos foram feitos sobre o assunto.

Em *A. nidulans*, cada fase da esporulação é acompanhada pela síntese de uma fenol oxidase específica (lacase). Assim, na formação do pigmento conidial, ocorre síntese de lacase I (CLUTTERBUCK, 1972), enquanto que a lacase II ocorre nos cleistotécios jovens e nas células de hülle que os envolvem (HERMANN e col., 1983). Além dessa enzima, que constituiu um marcador do início da fase sexual, foi estudada a α -1,3 glucanase, de grande significado para o processo de frutificação (ZONNEVELD, 1972, 1973, 1974).

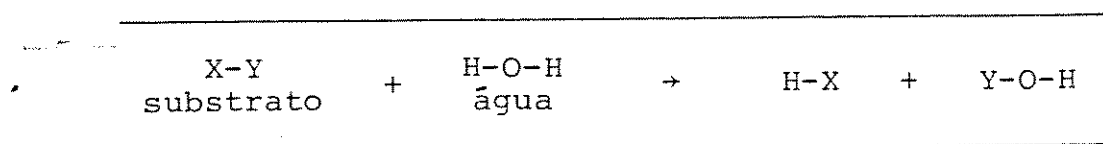
KOIDE e col. (1979) também estabeleceram relações entre morfogênese e algumas enzimas. Assim, os mutantes classificados em grupos, de acordo com anormalidades no aparelho conidial e maior formação de células de hülle, apresentaram, ao mesmo tempo, alterações de atividade enzimática extracelular de

protease, nuclease e invertase.

Alguns casos de mutações auxotróficas também foram correlacionados a alterações morfológicas. Linhagens deficientes para colina, na ausência dessa, produziram formações esféricas chamadas "balões" (MARKHAM e BAINBRIDGE, 1978, 1979). Mutantes deficientes para arginina em *A. nidulans*, produziram fenótipos aconidiais, aberrações do desenvolvimento sexual, e uma baixa eficiência de germinação conidial, conforme o meio de cultura utilizado (SERLUPI-CRESCENZI e col., 1983).

2.2. Enzimas hidrolíticas

Enzimas hidrolíticas, ou, simplesmente hidrolases, um grande grupo de 211 enzimas, constituem a classe 3 no sistema E.C., isto é, segundo a classificação enzimática da Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica. O critério adotado é baseado no tipo de reação química catalisada. Assim sendo, as hidrolases têm, em comum, o envolvimento de água na formação do produto. Essas, por sua vez, são classificadas com base no tipo de ligação sobre a qual atuam. A reação geral para essas enzimas pode ser esquematizada como na equação abaixo (Equação I), onde ocorre a transferência de um dos componentes do substrato para a água (WHITAKER, 1972).



Equação I

2.2.1. Lipases

As lipases (E.C. 3.1.1.3.) pertencem ao grupo das esterases, enzimas de ampla distribuição na natureza. As lipases hidrolisam ligações éster-carboxílicas desdobrando ésteres em ácidos graxos e glicerol (WHITAKER, 1972).

Os fungos filamentosos sintetizam lipases extracelulares em grande quantidade. Essas têm encontrado usos crescentes. Conseqüentemente, o interesse na pesquisa para novos produtores e a elucidação das condições de biossíntese de lipase são bastante significativos (VOLKOVA e LEBEDEVA, 1979).

Os trabalhos de investigação sobre as lipases microbianas têm sido, no entanto, bastante dificultados pelo uso de grande número de substratos, pelas condições de ensaio e métodos empregados. O grande problema reside na falta de conhecimentos sobre os substratos naturais da lipase e seu papel fisiológico. Geralmente, o princípio usado é o da estimativa de ácidos graxos liberados de triglicérides, após certo tempo de incubação (LLOYD e col., 1971).

A necessidade de um componente lipídico no meio de cultura, para a produção de lipase extracelular foi demonstrada por vários autores. Assim, a farinha de soja, por exemplo, foi pesquisada como um componente inseparável de muitos meios nutrientes para microrganismos industriais, que produzem antibióticos e enzimas, incluindo lipases. Contudo, a complexidade de composição de tais meios, dificulta o isolamento dos produtos de biossíntese microbiana. A determinação dos componentes da farinha de soja, necessários à síntese de lipase, permitiriam uma simplificação do meio e, talvez, um aumento do seu efei

to indutor. Não há dúvida de que a fração lipídica da farinha de soja estimula a biossíntese da lipase extracelular em fungos. Resultados diferentes são, no entanto, encontrados para cada caso. Em *Aspergillus*, por exemplo, a atividade lipolítica em meios com farinha de soja é, na maioria dos casos, fraca ou ausente. De 35 espécies de *Aspergillus* estudadas, *A. nidulans* apresentou o maior índice de produção de lipase, nessas condições. Em *Geotrichum asteroides*, os componentes da farinha de soja de natureza lipídica são indutores da lipase extracelular. Presume-se que, nesse caso, o estímulo seja através de ácido oleico. Já em *Rhizopus cohnii*, a síntese de lipase é realizada na presença de componentes lipídicos e não lipídicos. Existem, portanto, indutores suplementares para a produção da enzima (VOLKOVA e LEBEDEVA, 1979).

Os tweens também são bem conhecidos pelo seu efeito estimulante para o crescimento de microrganismos, bem como para a produção de enzimas lipolíticas. Há, no entanto, informações sobre a inibição desta mesma ação em certos microrganismos. A função do tween sobre a síntese de lipase é evidentemente devida ao seu conteúdo de ácido oleico. Vários tipos de tweens foram ensaiados em *Oospora lactis*, quanto à produção de lipase extracelular. Os melhores resultados foram obtidos ao se adicionar tween 80 a um meio contendo óleo de semente de algodão. Todos os tweens utilizados, ao mesmo tempo que estimulam a biossíntese de lipase, além de uma determinada concentração, passam a ser inibidoras da ação dessa mesma enzima. A capacidade dos tweens aumentarem a produtividade das culturas é explicada pelo fato de que, além de poderem ser usados como fonte de carbono suplementares e servirem como emulsificadores de óleos e gorduras (TABAK e SHCHELOKOVA, 1979), também poderem promover uma ex

creção de lipase extracelular, devido a uma alteração na permeabilidade da parede celular (SALTON, 1951; BROWN e WINSLEY, 1969).

A necessidade da presença de lípidos no meio de crescimento para a síntese de lipase extracelular, foi demonstrada também em *Geotrichum candidum*, isolado de farelo de arroz (IWAI e col., 1973).

Nos fungos termofílicos *Humicola grisea*, *Mucor pusillus*, *Talaromyces thermophilus* e *Thermoascus crustaceus*, a presença de lípidos também aumenta a produção da enzima. No entanto, a deficiência dos mesmos não interfere na sua síntese. Então, nesse caso, a lipase não é do tipo indutivo (OGUNDERO, 1980).

2.2.2. Amilases

Genericamente, as amilases são hidrolases que atuam sobre amido, glicogênio e polissacarídeos derivados, hidrolisando as ligações glicosídicas α -1,4. As amilases compreendem: α -amilase (E.C. 3.2.1.1.) que hidrolisam endoliticamente o substrato, de uma maneira teoricamente ao acaso, embora um certo número delas, particularmente as de microrganismos, exibam uma certa regularidade de ação. β -amilases (E.C. 3.2.1.2.) e glucoamilases (E.C. 3.2.1.3.) que hidrolisam unidades de maltose e de glicose respectivamente, da extremidade terminal não redutora do substrato. As glucoamilases, embora, preferencialmente hidrolisem as ligações α -1,4, podem, muito mais lentamente, hidrolisar também as ligações α -1,6. As β -amilases são encontradas somente em plantas superiores, enquanto que as α e glucoamilases têm sido encontradas em bactérias e fungos (WHITAKER, 1972).

As α -amilases, também conhecidas como amilases fúngicas, são das mais antigas enzimas microbianas comerciáveis e muito usadas em indústrias têxteis, de papel, de adesivos e de alimentos. É produzida, principalmente, através de *Aspergillus oryzae*, embora também seja constatada em outros tipos de microrganismos. Já a glucoamilase, conhecida também como amiloglicosidase, é obtida, principalmente, através de vários membros de *Aspergillus niger* (BARBESGAARD, 1977). A glucoamilase acumulada por fungos filamentosos e leveduras é utilizada na sacarificação do amido de várias fontes. Além de *A. niger*, várias espécies do gênero *Aspergillus* produzem glucoamilases (BANKS e col., 1976). MOHSIN e col. (1979a,b,c) estudaram a produção de glucoamilase em algumas espécies de *Aspergillus* e purificaram a enzima de *A. foetidus* e *A. awamori*.

Alguns mutantes de fungos cuja síntese de amilase apresentou-se alterada foram estudados e, em alguns deles, foi verificada a alteração simultânea de duas ou mais enzimas. Em mutantes de *A. oryzae* foram encontrados altos níveis de α -amilase extracelular (OSTRIKOVA e KONOVALOV, 1978). Em *A. niger*, LE MENSE e col. (1947) e PARK e DE LIMA (1972) estudaram mutantes com altos níveis de glucoamilase e KVESITADZE e col. (1981a) com α -amilase e glucoamilase simultaneamente. Analogamente, em mutantes de *A. awamori*, uma grande produção de glucoamilase foi encontrada por SMILEY e col. (1964), NEVALAININ e PALVA (1979) e PARK e DE LIMA (1972), enquanto que PARK e DE SANTI (1977) e KVESITADZE e col. (1981b) descreveram mutantes com maior quantidade de α -amilase e glucoamilase simultaneamente. Por outro lado, mutantes com produção diminuída de glucoamilase foram encontrados também em *A. niger*, onde as mutações foram recessivas. A produ-

ção de glucoamilase foi atribuída pelo menos a 2 genes nesse fungo: lap₆₁ e lap₃₈ e/ou lap₇₃. Através da análise de segregantes pôde-se evidenciar a ligação entre os genes (VALENT, 1985). Em *Neurospora crassa* uma mutação aumentou a produção de α -amilase, glucoamilase, além de outras enzimas (GRATZNER, 1972). Uma outra mutação, ainda em *Neurospora*, causou redução de glucoamilase no micélio e no meio de cultura, ao lado de outros efeitos fenotípicos: aumento de fosfatase ácida extracelular, resistência ao efeito da sorbose, sensibilidade à alta osmolaridade do meio de cultura e pobre crescimento (MURAYAMA e ISHIKAWA, 1973). Em ambos os casos foi sugerida uma mutação que causasse primariamente uma alteração na estrutura da parede, e como efeito pleiotrópico secundário, ocorressem alterações enzimáticas ou outros efeitos fenotípicos. LAMPEN (1965) propôs um modelo para a inclusão de uma função regulatória no sistema de glucoamilase em *Neurospora*. Esse autor propôs a existência de sítios de ligação para a enzima, na parede celular, que, quando preenchidos, reprimiriam a síntese ulterior da enzima. Dessa maneira, uma mutação afetando a parede, afetaria, também, a regulação enzimática.

O estudo das amilases fúngicas também contribuiu para a taxonomia de *Aspergillus*. Assim, as linhagens de *A. nidulans* puderam ser distinguidas de espécies similares, num estudo de 94 linhagens por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida. Esses resultados foram confirmados pela analogia com zimogramas de esterases e pela produção de cleiostotécios férteis nos diversos cruzamentos (KURZEJA e GARBER, 1973).

2.2.3. Proteases

A classificação das enzimas proteolíticas (E.C. 3.4.) apresenta problemas, mesmo para os taxonomistas bioquímicos. A comissão sobre nomenclatura enzimática em 1972, reconheceu três grupos: as exopeptidases, as hidrolases dipeptídicas e as endo-hidrolases peptídicas. Somente o terceiro grupo, no entanto, chamado genericamente de "proteases", foi relevantemente estudado em *Aspergillus*. Esse grupo de enzimas compreende as proteases alcalinas (E.C. 3.4.2.1.), as tiol proteases (E.C. 3.4.2.2.), as proteases ácidas (E.C. 3.4.2.3.) e as neutras (E.C. 3.4.2.4.), geralmente dependentes de um íon metálico. A maioria dos fungos é capaz de sintetizar uma ou mais dentre essas proteases (COHEN, 1977).

A. nidulans sintetiza três proteases neutras e alcalinas extracelulares α , γ e ϵ , além de uma estritamente intracelular, β , quando crescido em meio contendo proteína como única fonte de nitrogênio. As quatro proteases são individualmente distinguíveis por eletroforese, sensibilidade a inibidores, preferência aos substratos, pH ótimo de ação, etc. (COHEN, 1973a). Foram isolados, nesses fungos, mutantes deficientes para as proteases extracelulares e definidos três loci correspondentes, xprA, xprB e xprC, nos grupos de ligação VIII, VII e VIII, respectivamente. Essas mutações mostraram-se recessivas no heterocário e no diplóide (COHEN, 1972a). Uma outra mutação, monogênica, recessiva, pleiotrópica, no locus xprC₁, envolve a perda simultânea de todas as proteases (COHEN, 1972a, 1973a).

A excreção das proteases extracelulares de *A. nidulans* é reprimida por amônia ou por outras fontes de nitrogênio (CO-

HEN, 1972a,b, 1973a e PATEMAN e col., 1973), de enxofre ou de carbono de baixo peso molecular. Se o meio for deficiente para qualquer um desses elementos, a protease é excretada (COHEN, 1973b, 1981).

A protease intracelular também está sujeita ao sistema de repressão dependendo da presença desses mesmos elementos citados, ou mesmo, de moléculas de baixo peso molecular contendo fósforo. Os sistemas de repressão são, no entanto, independentes (COHEN, 1973b). O mutante xprD, dentre outros, foi selecionado, por mostrar-se totalmente insensível à repressão pela amônia, no que se refere à produção de protease, e também de nitrato redutase, xantina desidrogenase e absorção de glutamato. É parcialmente dominante no diplóide heterozigoto (COHEN, 1972b; PATEMAN e col., 1973; ARST e COVE, 1973).

A regulação de proteases em *A. nidulans* é feita, portanto, por um sistema de repressão. A indução de protease, por uma proteína exógena, não ocorre (COHEN, 1973b, 1981) diferentemente de *Neurospora*, onde os dois tipos de sistemas se complementam (DRUCKER, 1972; COHEN e col., 1975).

2.2.4. Fosfatases

As fosfatases (E.C. 3.1.3.), bem como as lipases, pertencem ao grupo das esterases. As fosfatases atuam em ligações éster-fosfato. Para cada variedade de organismo existe um certo número de fosfatases, caracterizadas, sobretudo, por diferentes pHs ótimos de ação. Assim, elas são chamadas genericamente de fosfatases ácidas (E.C. 3.1.3.2.) ou fosfatases alcalinas (E.C. 3.1.3.3.), dependendo do pH (WHITAKER, 1972).

As fosfatases alcalinas foram extensivamente estudadas em *Escherichia coli*, o que tem contribuído para estudos em organismos mais complexos, como *Aspergillus*, por exemplo (DORN, 1965a).

A. nidulans produz, em meio com baixo teor de fosfato, cinco isoenzimas de fosfomonoesterases, facilmente distinguíveis eletroforéticamente. Elas foram designadas por P-I, P-II, P-III, P-IV (DORN, 1965a,b, 1967 e 1968 e DORN e RIVERA, 1966) e P-V (HARSANYI e DORN, 1972). As duas primeiras, P-I e P-II são alcalinas, não tendo nenhuma atividade apreciável abaixo de pH 5. O íon Mg parece ser essencial para a total atividade dessas duas enzimas. As demais, P-III, P-IV e P-V, são ácidas. Os pHs ótimos de ação correspondentes a cada uma dessas cinco enzimas são 8 e 10; 9,5; 4,8; 4,8 e 6,1, respectivamente. Em meios com altos níveis de fosfato, somente duas delas que são constitutivas, as chamadas P-II e P-IV, são produzidas. As demais são, então, reprimidas. Ainda que essas fosfatases alcalinas apresentem as mesmas propriedades básicas que as de *E. coli*, seu sistema enzimático é mais complexo. A característica mais marcante se refere ao maior número de variantes enzimáticas em *A. nidulans*, bem como ao grande número de loci correspondentes ao controle de suas atividades. A fosfatase P-I, por exemplo, possui 10 genes responsáveis pelo seu funcionamento, enquanto que para a P-V foram designados um mínimo de 19 loci.

A análise genética das fosfatases em *A. nidulans* indicaram relacionamento complexo entre elas. Assim, mutações únicas em vários casos, puderam ser associadas à perda de várias fosfatases. Por outro lado, alterações mutacionais múltiplas, levaram somente à perda de uma fosfatase. Além disso, um supres-

sor genético de um mutante deficiente para fosfatase alcalina, restaura sua atividade com perda concomitante de um componente de fosfatase ácida. Um outro supressor produz uma restauração parcial da atividade de fosfatase alcalina. Foi sugerido que as fosfatases representam proteínas heteromultiméricas, cada uma constituída por duas ou mais cadeias polipeptídicas, com diferentes seqüências de aminoácidos, e que algumas dessas, são comuns a duas ou mais dessas enzimas. Portanto, uma alteração mutacional de um subunidade comum, conduziria à inativação de mais de uma fosfatase. Por outro lado, uma alteração de uma subunidade pertencendo a uma só fosfatase levaria à inativação de somente aquela fosfatase.

Os dados obtidos por SINGH e SINHA (1979) diferem dos obtidos pelos autores anteriormente citados, no que se refere à seqüência das isoenzimas na eletroforese. Entretanto, há concordância que duas delas atuam em pH ótimo alcalino e as outras três, em pH ácido e, que, tanto no primeiro, como no segundo caso, apenas uma das enzimas é de natureza constitutiva.

2.2.5. Ureases

A urease (E.C. 3.5.1.5.) é uma hidrolase que age sobre a uréia produzindo dióxido de carbono e amônia. Foi a primeira enzima a ser cristalizada, por SUMNER (1926), da Universidade de Cornell, USA, que recebeu, por esse motivo, o prêmio Nobel em 1946. Esse fato foi de profunda importância em pesquisa enzimológica e, logo, foi constatada também, a ampla distribuição da enzima em diversos organismos. Apesar disso, poucos estudos de ordem genética foram feitos sobre urease (HAYSMAN e HOWE

Jr., 1971).

Em várias espécies de fungos e bactérias foram isolados mutantes para urease. Em *Neurospora crassa*, por exemplo, embora a ocorrência da enzima tenha sido conhecida desde 1944 (SRB e HOROWITZ, 1944) a existência de mutantes deficientes para a urease, foi relatada muito mais tarde (KOLMARK, 1965; STACHOW e SANWAL, 1967). Nesse organismo, a enzima mostrou-se de natureza constitutiva e quatro loci em dois grupos de ligação diferentes estão envolvidos na atividade da mesma (KOLMARK, 1969a,b e HAYSMAN e HOWE Jr., 1971).

Aspergillus nidulans pode utilizar uréia como única fonte de nitrogênio, mas não de carbono (PATEMAN e KINGHORN, 1976). Existem quatro loci envolvidos na utilização de uréia, conhecidos por ureA, ureB, ureC e ureD. O locus ureA é conhecido como responsável pela absorção de uréia (DUNN e PATEMAN, 1972). O ureB, está intimamente relacionado ao anterior e, talvez, o ureB seja o gene estrutural para a urease. As funções do ureC e ureD, ainda não estão de todo esclarecidas. Todos os mutantes conhecidos para qualquer um desses loci, são, no entanto, deficientes para urease e não se desenvolvem completamente quando a uréia é fornecida como única fonte de nitrogênio (PATEMAN e KINGHORN, 1977).

MACKAY e PATEMAN (1980) trabalhando com uma linhagem mutante para o locus ureD, conseguiram restabelecer, "in vivo", ao menos em parte, a atividade enzimática e a capacidade de crescimento em meio com uréia como única fonte de carbono, com a adição de íons níquel. A resposta do mutante foi específica para níquel a um ótimo de concentração (dosagens maiores mostraram-se tóxicas). Estes trabalhos sugerem, que o ureD possa de algum modo estar envolvido na produção ou incorporação de um co

fator níquel, essencial à atividade de urease. Apesar dos mutantes para o locus ureC não apresentarem resposta semelhante àqueles para o locus ureD, existe a possibilidade do locus em ques-tão, ter também algum papel concernente ao íon níquel.

Efeitos paralelos são encontrados em um outro tipo de mutante de *A. nidulans*, onde a adição de molibdênio aumenta as atividades de nitrato redutase e xantina desidrogenase, alteradas por mutação do locus denominado cnxE. No entanto, outros loci, cnxA, B, C, D, F e H parecem estar também, de várias maneiras, envolvidos na produção e incorporação do cofator molibdênio (KINGHORN e PATEMAN, 1977).

O sistema de absorção de uréia em *A. nidulans* é específico e repressível por amônia. Mutantes que são insensíveis para outros sistemas de repressão de amônia, tais como nitrato redutase e absorção de ácido glutâmico, o são também quanto à absorção de uréia (DUNN e PATEMAN, 1972).

2.3. Uso do meio sólido nos ensaios sobre enzimas microbianas

Os ensaios sobre enzimas microbianas envolvem uma série de dificuldades. A produção enzimática por fungos é, usualmente, investigada em extratos de micélio ou em filtrados da cultura. Muitos métodos são facilmente afetados por tampões e pela degradação de produtos normalmente encontrados em cultura microbiana (LAWRENCE e col., 1967). Além disso, em culturas mantidas por muitos dias em meios complexos, o que é freqüente, torna-se ainda mais difícil a distinção biológica entre enzimas estritamente intracelulares das que são capazes de serem excretadas extracelularmente ou mesmo periplásmicas (POLLOCK, 1962). É difícil

saber se a enzima foi excretada ou simplesmente foi liberada como conseqüência da autólise, em determinadas condições. A presença da enzima no extrato micelial não define adequadamente a enzima intracelular, já que as extracelulares podem ser encontradas dentro da célula ou em trânsito, através das paredes, durante a fase de secreção ativa (COHEN, 1977).

O uso do meio sólido para a detecção da produção(síntese e atividade) enzimática permite um rápido discernimento de enzimas específicas em grandes populações de fungos e maior facilidade de pesquisa para variantes genéticas. Tal meio pode também ser utilizado em estudos ecológicos, onde as capacidades enzimáticas de fungos podem ser comparadas com outros organismos (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975).

As condições de validade matemática de ensaios de difusão em ágar, puderam ser comprovadas em um método específico para lipases microbianas extracelulares, desenvolvido em *Micrococcus freudenreichii* (LAWRENCE e col. 1967). Assim, foi obtida uma relação linear quando o logaritmo das diluições da lipase foram relacionados com os diâmetros das zonas de hidrólise produzidas pela enzima.

Além disso, os ensaios em meio sólido são semiquantitativos, já que a grandeza da produção enzimática pode ser estimada pela medida do diâmetro das zonas de hidrólise no ágar, correspondente à ação enzimática, relacionada com o tamanho da colônia. Desse modo, a atividade enzimática de variantes da mesma espécie, pode ser determinada (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens

Foram utilizadas três linhagens controle do fungo *Aspergillus nidulans*, com marcadores genéticos conhecidos, procedentes de Glasgow, Escócia e, oito mutantes morfológicos, derivados dessas linhagens iniciais.

3.1.1. Linhagens controle

As linhagens controle foram biA₁; methG₁; Master Strain E (Mc CULLY e FORBES, 1965) e proA₁; pabaA₆; yA₂. Para designá-las serão utilizados os símbolos abreviados bm, MSE e pp respectivamente, no decorrer do trabalho. As linhagens, seus marcadores genéticos e respectivos grupos de ligação encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 - Linhagens controle, marcadores genéticos e respectivos grupos de ligação.

Linhagens	Marcadores genéticos e respectivos grupos de ligação
bm	$\underline{biA}_1$ (I); $\underline{methG}_1$ (IV).
MSE	$\underline{suA}_1\underline{adE}_{20}$ (I); $\underline{YA}_2$ (I); $\underline{adE}_{20}$ (I); $\underline{wA}_3$ (II); $\underline{gala}_1$ (III); $\underline{pyroA}_4$ (IV); $\underline{facA}_{303}$ (V); $\underline{sB}_3$ (VI); $\underline{nicB}_8$ (VII); $\underline{riboB}_2$ (VIII).
pp	$\underline{proA}_1$ (I); $\underline{pabaA}_6$ (I); $\underline{YA}_2$ (I).

$\underline{adE}_{20}$, $\underline{biA}_1$, $\underline{methG}_1$, $\underline{nicB}_8$, $\underline{pabaA}_6$, $\underline{proA}_1$, $\underline{pyroA}_4$, $\underline{riboB}_2$, $\underline{sB}_3$, designam requisitos nutricionais para adenina, biotina, metionina, ácido nicotínico, ácido p-amino benzóico, prolina, piridoxina, riboflavina, tiosulfato, respectivamente; $\underline{facA}_{303}$ e $\underline{gala}_1$, incapacidade de crescer em meios de acetato e galactose, como fontes de carbono, respectivamente; $\underline{suA}_1\underline{adE}_{20}$, supressor de $\underline{adE}_{20}$; $\underline{wA}_3$ e $\underline{YA}_2$, confídios brancos e amarelos, respectivamente.

3.1.2. Mutantes Morfológicos

Foram utilizados oito mutantes morfológicos, sendo cinco obtidos por BIAGI (1977) e três, do tipo compacto, por ROSATO e AZEVEDO (1983). A tabela 2 mostra os símbolos empregados para esses mutantes, indicando as linhagens originais, bem como os respectivos grupos de ligação envolvidos com o determinante morfológico.

A figura 1 mostra uma das linhagens controle (pp) bem como a sua derivada compacta (pp-6).

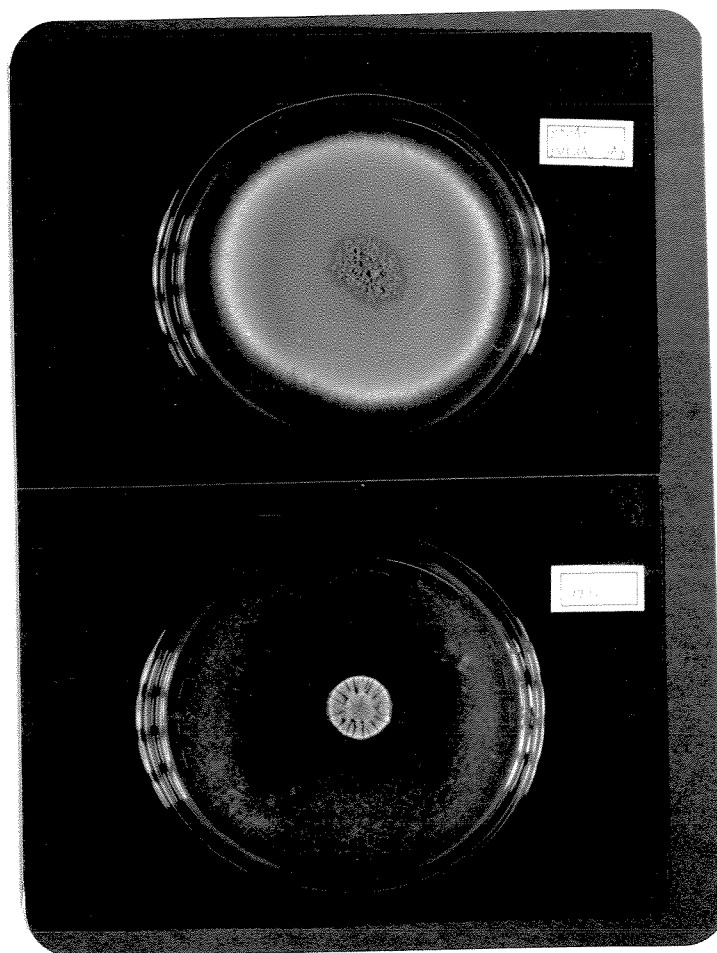


Figura 1 - Linhagem padrão pp (acima) e linhagem compacta derivada pp-6 (abaixo).

Tabela 2 - Mutantes morfológicos: origens, símbolos e respectivos grupos de ligação.

Origem	Símbolo	Grupo de ligação
bm	B - 9	VI
	B - 23	I
	B - 24	VII
	B - VIII*	VII
	B - 6*	I
MSE	M - 32	IV
	M - 35	II
pp	pp-6*	V

* Linhagens compactas

3.2. Meios de cultura e soluções

3.2.1. Meio mínimo (PONTECORVO e col., 1953)

NaNO_3	6,00 g
KH_2PO_4	1,50 g
KCL	0,50 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,50 g
FeSO_4	0,01 g

ZnSO_4 0,01 g
 Glicose.....10,00 g
 Água destilada.....1000 ml
 pH ajustado para 6,8 com NaOH 1N ou HCl 1N

Para obtenção de meio sólido, foi acrescentado ágar na concentração de 2%.

3.2.2. Meio completo (PONTECORVO e col., 1953, modificado por AZEVEDO e COSTA, 1973).

Meio mínimo (item 3.2.1.) adicionado de:

Peptona..... 2,00 g
 Caseína hidrolisada..... 1,50 g
 Extrato de levedura..... 0,50 g
 Solução de vitaminas..... 1,00 ml
 Hidrolisado de ácido nucléico de leveduras... 2,50 ml
 pH ajustado para 6,8 com NaOH 1N ou HCl 1N

3.2.2.1. Solução de vitaminas

Ácido nicotínico..... 100,00 mg
 Ácido p-aminobenzóico..... 10,00 mg
 Biotina..... 0,20 mg
 Piridoxina..... 50,00 mg
 Riboflavina.....100,00 mg
 Tiamina..... 50,00 mg
 Água destilada esterilizada.....100,00 ml

A solução foi aquecida em banho-maria a 100°C, por 15 minutos. Depois foi guardada em frasco escuro, no refrigerador à 4°C, sob clorofórmio.

3.2.2.2. Hidrolisado de ácido nucleico de leveduras

Ácido nucleico de leveduras - 2 g em 15 ml de solução
1N de HCL

Ácido nucleico de leveduras - 2 g em 15 ml de solução
1N de NaOH

Ambas as soluções foram aquecidas a 100°C por 20 minutos, e então, misturadas. o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 1N ou HCl 1N. Após filtração da mistura, o volume foi completado para 40 ml. Foi guardada no refrigerador à 4°C, em frascos escuros.

3.2.3. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo

Ao meio mínimo líquido (item 3.2.1.), foi adicionado 2% de meio completo também líquido (item 3.2.2.). 2,5 ml da solução resultante foi distribuída em cada tubo de ensaio.

3.2.4. Meio para detecção de atividade lipolítica (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975)

Peptona (Difco).....	10,00 g
NaCl.....	5,00 g

CaCl ₂ . 2H ₂ O.....	0,10 g
Ágar.....	20,00 g
Água destilada.....	1000 ml

pH ajustado para 6,0 com NaOH 1N ou HCl 1N

Como substrato foi usado 1% (v/v) de monolaurato de Sorbitan (Tween 20), que foi autoclavado separadamente e adicionado ao meio estéril e resfriado, no momento precedente ao uso.

3.2.5. Meio para detecção de atividade amilolítica (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975)

Ágar Nutriente (NA)

Extrato de carne.....	3,00 g
Peptona.....	5,00 g
NaCl.....	1,00 g
Ágar.....	15,00 g
Água destilada.....	1000 ml

O meio foi dissolvido em banho-maria a 100°C. O pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 1N ou HCl 1N.

Como substrato, foi acrescentada ao meio, solução aquosa de amido solúvel na concentração final de 0,2%. A mistura, foi, então autoclavada.

3.2.6. Meio para detecção de atividade proteolítica (COHEN, 1972b)

Meio mínimo sólido (item 3.2.1.) sem NaNO_3 .

pH ajustado para 6,0 com NaOH 1N ou HCl 1N.

Como substrato, 0,1% de solução de leite em pó desnatado à 10% (p/v) foi adicionado ao meio.

3.2.7. Meio para detecção de atividade de fosfatase (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975)

Plate Count Agar (Difco - PCA)

pH ajustado para 6,0 com NaOH 1N ou HCl 1N

Como substrato, 2% de solução de difosfato de fenol-ftaleína 0,01N, recém-preparada, foi adicionada ao meio, já estéril e resfriado, no momento precedente ao uso.

3.2.8. Meio para detecção da atividade de urease (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975)

Plate Count Agar (Difco - PCA)

pH ajustado para 6,0 com NaOH 1N ou HCl 1N

Como substrato, 1% de solução recém-preparada de uréia de 0,50 g/ml foi acrescentada ao meio, já estéril, e resfriada à aproximadamente 48°C, no momento precedente ao uso.

3.2.9. Suplementos adicionados aos meios de cultura

Foram preparadas soluções estoque concentradas que foram aquecidas em banho-maria por 15 minutos e conservadas no refrigerador a 4°C.

Substância	Concentração final no meio de cultura (µg/ml)
Ácido nicotínico	0,50
Ácido p-aminobenzóico	0,25
Biotina	0,20
Metionina	50,00
Piridoxina	0,25
Prolina	50,00
Riboflavina	0,50
Tiossulfato de sódio	100,00

3.2.10. Solução de tween 80

Solução de 0,1% de tween 80 em água destilada (v/v) e distribuída 2,5 ml por tubo.

3.2.11. Solução de lugol

Solução de 50% de lugol em água destilada (v/v)

3.2.12. Hidróxido de amônio (vapores)

3.2.13. Sobrecamada para revelação de urease (preparada no momento precedente ao uso)

Tampão fosfato 0,01M, pH = 6.....	100,00 ml
Ágar.....	1,50 g
Uréia.....	1,00 g
Solução de azul de bromotimol a 1%.....	0,50 ml

A uréia foi adicionada à mistura ágar-tampão, liquefeita e resfriada, a 48°C aproximadamente, para evitar a hidrólise.

A solução de azul de bromotimol, foi, então, adicionada.

3.2.14. Solução de Benlate

Foi preparada uma solução estoque em água destilada, aquecida em banho-maria a 100°C, por 15 minutos e conservada no refrigerador a 4°C. A concentração final no meio de cultura foi de 1,5 µg/ml.

3.2.15. Solução de lisol

Lisoform em água destilada a 10%.

3.3. Incubação

A incubação foi feita sempre à temperatura de 37°C.

3.4. Obtenção dos heterocários

Os heterocários foram obtidos a partir de pares de linhagens que diferiram sempre nos seus requisitos nutricionais, envolvendo sempre uma das linhagens controle, de acordo com a técnica descrita por PONTECORVO e col. (1953). Para isso, foram inoculados conídios em 2,5 ml de meio mínimo líquido enriquecido com 2% de meio completo, o que permitiu um crescimento inicial e subsequente anastomose das hifas. Após 4-6 dias de incubação, a película micelial formada foi suficiente para sua utilização. Os heterocários serão designados utilizando-se o sinal + entre os símbolos das linhagens haplóides que os originaram.

3.5. Obtenção e isolamento dos diplóides

Foram preparados heterocários, segundo o item 3.4., para posterior obtenção dos diplóides. Cada película micelial heterocariótica foi cortada em quatro partes, que foram colocadas em placas de Petri contendo meio mínimo, em pontos aproximadamente equidistantes. A incubação foi feita por mais 5-7 dias. Por meio de alças de platina, conídios de regiões tipicamente heterocarióticas foram transferidas para tubos contendo solução de tween 80. As suspensões foram homogeneizadas e, em seguida, 0,1 ml das mesmas foi semeado em placas com meio mínimo, afim de possibilitar a seleção dos diplóides (ROPER, 1952). A incubação foi feita em 3-4 dias. Os diplóides heterozigotos foram reconhecidos pelo crescimento em meio mínimo e pela coloração complementar dos conídios. Os diplóides foram purificados por estrias e(ou) por colônias isoladas.

Para confirmação do estado diplóide, foi verificado se as colônias eram capazes de produzir setores haplóides. Como agente haploidizante foi utilizado benlate (HASTIE, 1970). As linhagens foram, então, inoculadas em placas de Petri em quatro pontos, e, após aproximadamente 6-8 dias de incubação, os resultados foram obtidos. Também foi feita a medição dos conídios em microscópio óptico com ocular micrométrica, tomando-se cadeias de cinco ou mais conídios, em lâminas com lisol.

Os diplóides foram conservados em meio mínimo sólido inclinado, em refrigerador a 4°C aproximadamente.

Para designar os diplóides será utilizado o sinal // entre o símbolo das linhagens haplóides que os originaram.

3.6. Verificação da produção das enzimas extracelulares: lipase, amilase, protease, fosfatase e urease

A verificação da produção das enzimas extracelulares, lipase, amilase, protease, fosfatase e urease, foi analisada em haplóides, diplóides e heterocários. Os ensaios sobre a atividade de lipase, amilase, fosfatase e urease, foram feitas de acordo com a técnica de HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1975) e para o caso da protease, a de COHEN (1972b). Foram utilizados meios sólidos específicos em placas de Petri, acrescidos de substratos igualmente específicos, para cada caso. Aos meios para verificação de lipase e protease, foram adicionadas soluções suplementares de aminoácidos e vitaminas, conforme as exigências nutricionais de cada linhagem. Sobre cada meio de cultura, com auxílio de uma alça de platina, foi feita a inoculação, por pontos, dos haplóides e diplóides. Os heterocários tiveram sua película micelial

cortada em círculos de 6 mm de diâmetro, que foram aplicados cuidadosamente sobre os diversos meios sólidos. Para cada caso, foram feitas quatro repetições. A produção de enzimas foi verificada após 3-6 dias de incubação.

3.6.1. Atividade de lipase

Pôde ser observada devido à formação de um precipitado de cristais de sal de cálcio do ácido láurico liberado pela enzima, facilmente visível em torno das colônias.

3.6.2. Atividade de amilase

O critério utilizado nesse caso, foi a habilidade de degradação do amido pela enzima. Após a incubação, uma solução de lugol, revelou as áreas em que o amido ainda estava presente, contrastando com aquelas onde o mesmo fora consumido.

3.6.3. Atividade de protease

A atividade de protease em geral, foi analisada por observação direta de halos transparentes, contrastando com a opacidade do meio de cultura.

3.6.4. Atividade de fosfatase

A revelação, neste caso, foi feita através da adição

de algumas gotas, ou simplesmente vapores de NH_4OH , sobre as colônias, que tornaram vermelhas as áreas correspondentes à atividade enzimática.

3.6.5. Atividade de urease

Após o crescimento das colônias, foi vertida sobre elas uma sobrecamada de uréia contendo um indicador de pH (item 3.2.13). Após alguns minutos, as áreas correspondentes à atividade enzimática, tornaram-se de diferentes tonalidades de azul.

3.7. Índices Enzimáticos

Nos ensaios para lipase, amilase e protease, a formação de um halo, em torno da colônia, indicando a extensão da área cujo substrato foi degradado pela enzima, tornou o método semi-quantitativo. Foram medidos os diâmetros dos halos (incluindo as colônias), bem como o das colônias. Foi estabelecida uma relação entre ambos, indicando quantas vezes os primeiros são maiores que os segundos. Essa relação foi chamada de ÍNDICE ENZIMÁTICO, que corresponde, portanto, à relação halo/colônia.

No caso da fosfatase e urease, não houve a formação de halos, mas, sim, coloração das colônias e de áreas difusas em torno das mesmas. Não obstante, puderam ser feitas comparações, devido a diferenças acentuadas quanto às tonalidades de coloração obtidas, e também, quanto ao tempo aproximado necessário para sua revelação. As linhagens foram, então, classifica

das em três grupos quanto à produção enzimática: as de reação intensa, simbolizado pelo sinal +, as de reação intermediária, por $\pm$, e aquelas de fraca intensidade de reação, por - .

A tabela 5 reúne os principais dados referentes às técnicas para a verificação da produção de cada uma dessas enzimas.

3.8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada apenas nos ensaios para a verificação das enzimas lipase, amilase e protease, por meio de delineamento de blocos casualizados. Foram considerados trinta e um tratamentos, correspondentes a onze linhagens haplóides, dez heterocários e dez diplóides, com quatro repetições em cada caso. As diversas comparações entre as médias dos índices foram realizadas através do teste de Tukey, ao nível de 5%.

3.9. Análise microscópica

As linhagens compactas foram analisadas microscopicamente, segundo a técnica de cultivo em lamínula (BIAGI, 1977). Para isso, lamínulas esterilizadas foram colocadas em placas de Petri contendo meio completo sólido. A seguir, as linhagens foram semeadas em volta das lamínulas, a uma distância aproximada de 0,5 cm das mesmas. Após 3-4 dias de incubação, as lamínulas, com micélio aderente às bordas, foram colocadas em lâminas de microscopia para observação a fresco. As linhagens foram, então, foto

Tabela 3 - Sumário das técnicas para verificação da produção enzimática. Lipase, Amilase, Fosfatase e Urease (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975). Protease (COHEN, 1972b).

ENZIMAS	LIPASE	AMILASE	PROTEASE	FOSFATASE	UREASE
Meios de cultura	específico	NA*	meio mínimo (sem NaNO_3)	PCA* *	PCA**
Substrato	1% de tween 20	0,2% de amido solúvel	0,1% de leite desnatado	2% difosfato de fenolftaleína	1% de uréia
Revelação	Observação direta halo (precipitado)	Iugol diluído (halo claro)	Observação direta (halo transparente)	NH_4OH (Coloração vermelha)	sobrecamada de uréia e azul de bromotolol (coloração azul)
Dias de incubação	Haplóide	4	3	4	4
	Heterocário	3	3	3	3
	Diplóide	4	3	3	3

* NA = nutrient agar

**PCA = plate count agar

grafadas e comparadas com aquelas de crescimento normal ou quase normal descritas por BIAGI (1977).

4. RESULTADOS

Para lipase, amilase e protease, a verificação da atividade enzimática foi calculada através de índices. Para fosfatase e urease, os métodos foram mais subjetivos, não tendo sido possível uma associação numérica (item 3.7). Assim sendo, os resultados, quanto à produção enzimática, serão divididos em duas partes, conforme se trate das três primeiras enzimas acima referidas, ou das duas últimas.

4.1. Produção das enzimas extracelulares lipase, amilase e protease, nas linhagens haplóides e em heterocários e diplóides

A estimativa das médias, obtidas de 4 repetições, dos índices enzimáticos para lipase, amilase e protease, bem como, dos halos formados e diâmetros das colônias em haplóides, heterocários e diplóides, constam das tabelas 4, 5 e 6, respectivamente.

Tabela 4 - Diâmetros (em milímetros) dos halos (H_m) e das colônias (C_m) e índices enzimáticos (I_m) das linhagens HAPLÓIDES*.

Linhagens Haplóides	Lipase			Amilase			Protease		
	H_m	C_m	I_m	H_m	C_m	I_m	H_m	C_m	I_m
bm	51,50	41,50	1,25	34,75	30,00	1,16	35,75	32,50	1,07
B - 9	45,00	35,00	1,29	32,50	27,25	1,20	36,50	33,00	1,11
B - 23	56,00	47,50	1,19	27,50	11,00	2,54	24,75	20,00	1,25
B - 24	42,25	42,25	1,00	27,50	22,00	1,25	35,75	33,25	1,08
B - 6	32,00	13,00	2,47	19,00	6,00	3,17	31,00	16,75	1,87
B - VIII	23,25	8,00	2,89	13,00	3,75	3,67	12,00	5,75	2,09
MSE	18,25	7,75	2,35	31,00	21,25	1,46	32,38	31,88	1,02
M - 32	12,75	6,25	2,04	31,50	23,00	1,37	26,50	22,25	1,20
M - 35	21,50	8,00	2,75	39,00	34,25	1,14	32,25	31,00	1,04
pp	49,50	33,25	1,50	30,25	24,75	1,22	30,75	28,25	1,10
pp - 6	20,50	10,25	2,00	13,25	5,00	2,69	6,50	6,50	1,00

*Média de 4 repetições.

Tabela 5 - Diâmetros (em milímetros) dos halos (H_m) e das colônias (C_m) e índices enzimáticos (I_m) dos HETEROCÁRIOS*.

Heterocários	Lipase			Amilase			Protease		
	H_m	C_m	I_m	H_m	C_m	I_m	H_m	C_m	I_m
MSE + bm	43,00	41,25	1,04	34,75	27,25	1,28	43,50	36,75	1,19
MSE + B - 9	31,00	20,00	1,56	30,25	18,00	1,68	44,25	20,75	2,14
MSE + B - 23	45,00	42,50	1,06	33,50	23,75	1,49	35,25	19,25	1,85
MSE + B - 24	36,75	30,25	1,22	36,25	25,00	1,60	34,25	29,50	1,18
MSE + B - 6	35,25	23,75	1,52	38,50	32,00	1,21	33,75	18,75	1,80
MSE + B - VIII	41,50	35,00	1,19	36,00	26,25	1,37	35,25	33,25	1,06
MSE + pp	43,25	35,75	1,23	38,25	29,00	1,33	35,00	16,50	2,19
MSE + pp - 6	45,00	37,00	1,22	33,75	20,50	1,73	39,25	16,50	2,38
pp + M - 32	33,75	13,25	2,55	36,50	11,50	3,18	37,00	17,00	2,21
pp + M - 35	31,75	16,00	1,99	34,75	11,00	3,17	27,75	11,75	2,36

* Média de 4 repetições.

Tabela 6 - Diâmetros (em milímetros) dos halos (H_m) e das colônias (C_m) e índices enzimáticos (I_m) dos DIPLÓIDES*.

Diplóides	Lipase			Amilase			Protease		
	H_m	C_m	I_m	H_m	C_m	I_m	H_m	C_m	I_m
MSE // bm	29,00	25,25	1,15	48,50	44,00	1,10	37,00	35,00	1,06
MSE // B - 9	27,25	26,50	1,03	50,00	45,00	1,11	29,50	27,50	1,07
MSE // B - 23	40,25	30,75	1,31	41,00	35,75	1,15	36,00	31,00	1,16
MSE // B - 24	38,00	30,25	1,26	38,00	36,00	1,06	37,50	32,00	1,18
MSE // B - 6	41,75	30,50	1,38	35,75	34,00	1,05	40,25	35,25	1,14
MSE // B - VIII	34,00	29,00	1,18	35,25	33,50	1,05	41,75	35,50	1,18
MSE // pp	27,25	25,00	1,09	51,25	45,75	1,12	38,50	37,75	1,02
MSE // pp - 6	24,00	21,25	1,13	39,75	35,25	1,13	31,00	28,25	1,10
pp // M - 32	46,25	42,00	1,10	51,25	46,75	1,10	42,00	40,00	1,05
pp // M - 35	41,50	33,25	1,25	37,50	36,00	1,05	37,00	33,50	1,11

* Média de 4 repetições.

Os índices enzimáticos, em relação aos diâmetros das colônias, de haplóides, heterocários e diplóides, separadamente, são ilustrados nas figuras 2, 3 e 4, respectivamente para lipase, amilase e protease.

Comparando-se os índices de todas essas linhagens e diferentes combinações, como um todo, através de análises de variância para cada uma dessas enzimas, constatou-se que eles não são iguais entre si, em nenhum dos três casos (tabelas 7, 8 e 9).

Tabela 7 - Análise de variância das linhagens e combinações, para a lipase

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	3	0,0219		
Tratamentos	30	37,1813	1,2394	78,44*
Resíduo	90	1,4257	0,0158	
Total	123	38,6289		

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 8 - Análise de variância das linhagens e combinações, para a amilase

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	3	0,0908		
Tratamentos	30	70,6286	2,3543	43,44*
Resíduo	90	4,8805	0,0542	
Total	123	75,5999		

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 9 - Análise de variância das linhagens e combinações, para a protease

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	3	0,0639		
Tratamentos	30	27,0198	0,9007	90,98*
Resíduo	90	0,8876	0,0099	
Total	123	27,9713		

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

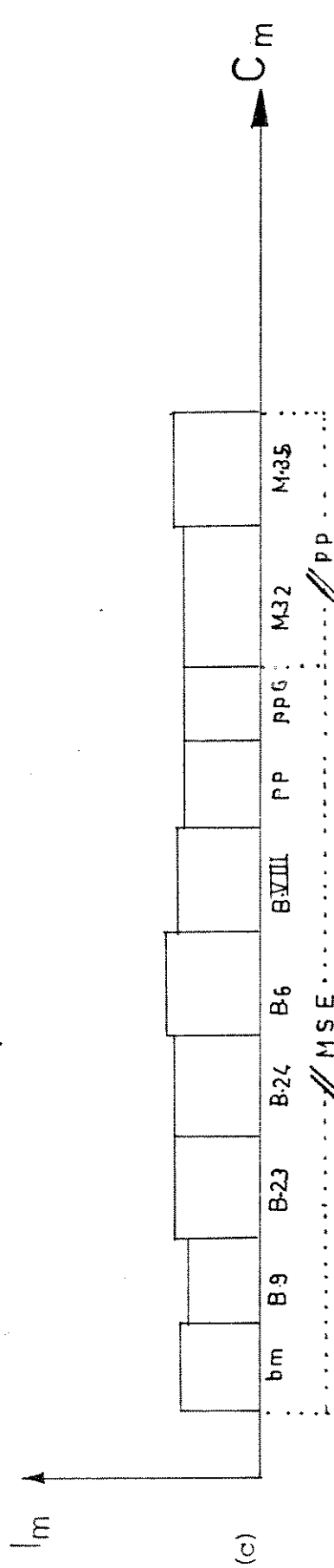
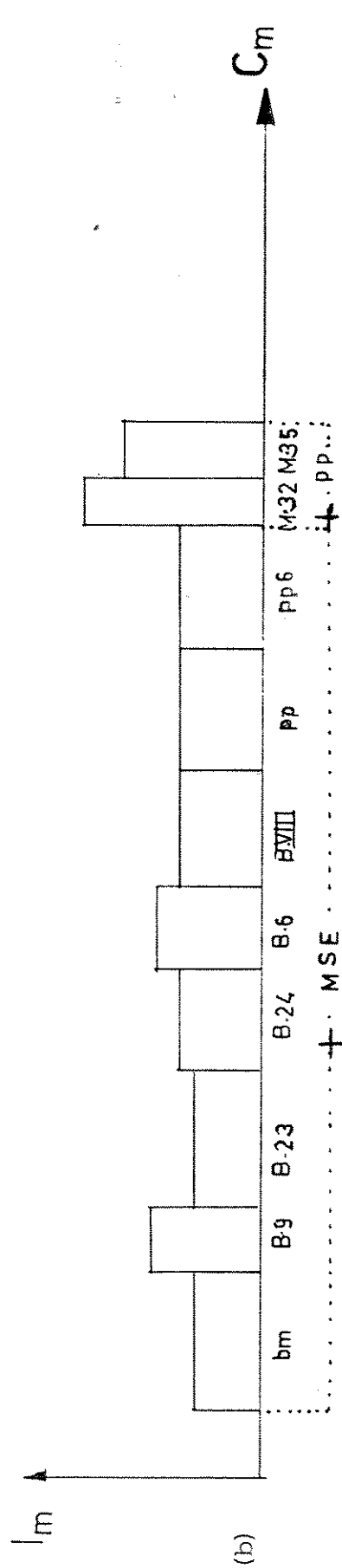
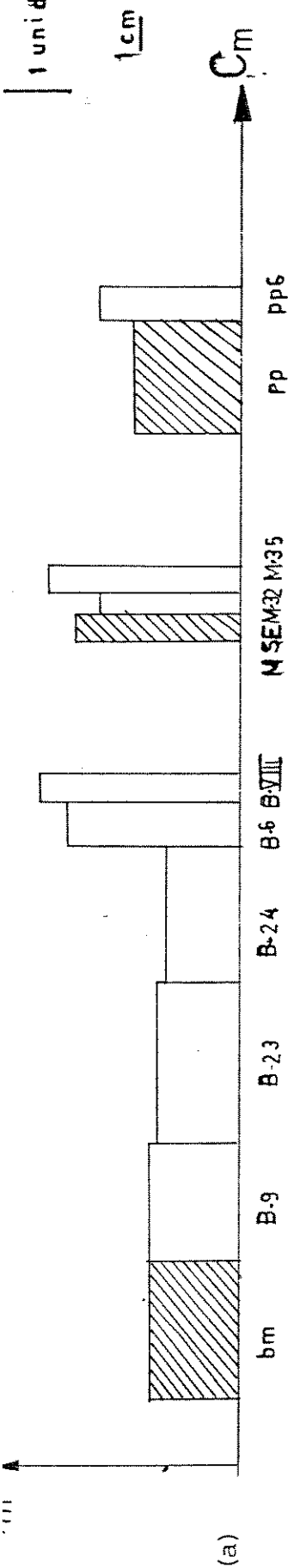


FIGURA 2. Produção de LIPASE em haplóides (a), heterocários (b) e diplóides (c). l_m indica a média dos índices enzimáticos, C_m , a média dos diâmetros das colônias e /// as linhas padrões.

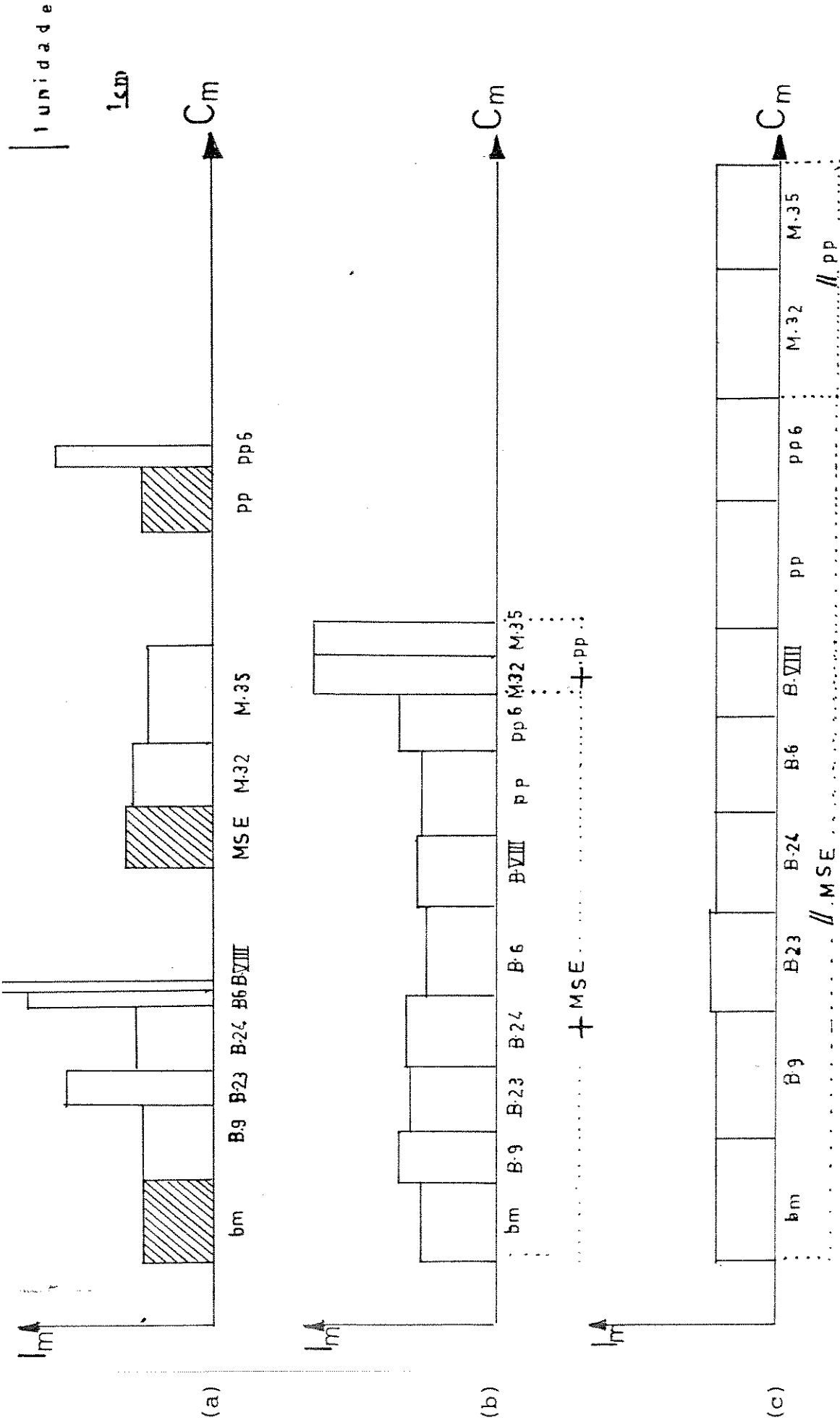
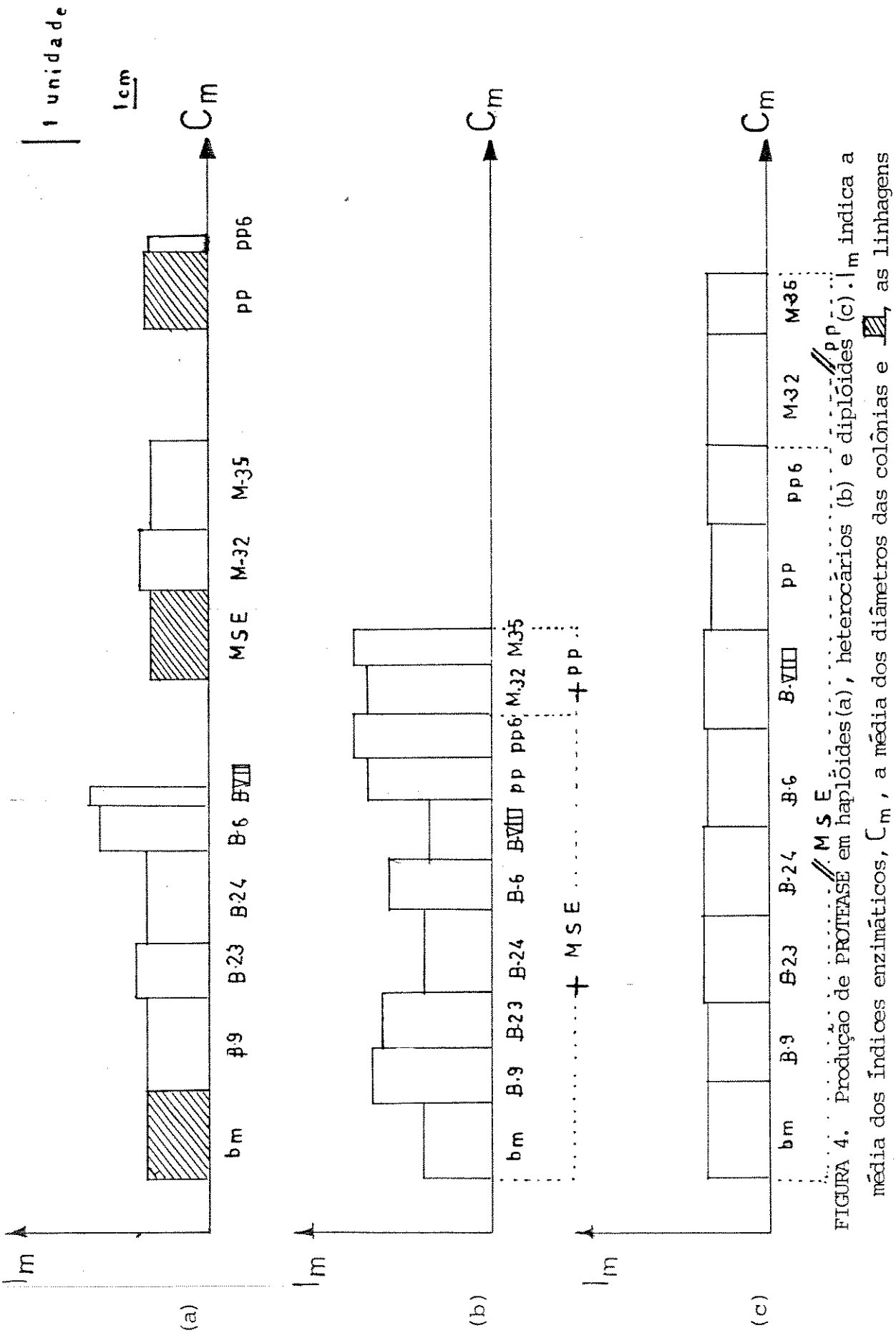


FIGURA 3. Produção de AMILASE em haplóides (a), heterocários (b) e diplóides (c). l_m indica a média dos índices enzimáticos, C_m , a média dos diâmetros das colônias e l_m , as linhas padrões.



As médias de todos os índices foram, então, ordenadas em ordem decrescente e comparadas segundo o teste de Tukey (tabelas de número 10, 11 e 12, para lipase, amilase e protease, respectivamente).

4.1.1. Produção de lipase

Pela análise da tabela 10 e da figura 2, para lipase, pôde-se verificar que os índices enzimáticos mais elevados foram os das linhagens compactas, os da série MSE, bem como os dos heterocários pp + M-32 e pp + MM-35. Essas colônias foram as de menor diâmetro, no meio de cultura para verificação de lipase. Resultados intermediários foram encontrados para os heterocários MSE + B-9, MSE + B-6 e para a linhagem haplóide pp. Nos demais casos, não se observaram grandes diferenças.

4.1.2. Produção de amilase

A tabela 11 e a figura 3, para amilase, mostraram que os maiores índices, nesse caso, foram os das linhagens compactas, dos heterocários pp + M-32 e pp + M-35, além da linhagem B-23, de menor crescimento nesses ensaios. Os demais resultados apresentaram-se quase iguais entre si.

A figura 5 mostra o resultado de um ensaio para amilase em uma linhagem compacta. Nessa, vê-se claramente um

halo visivelmente grande em relação ao tamanho da colônia.

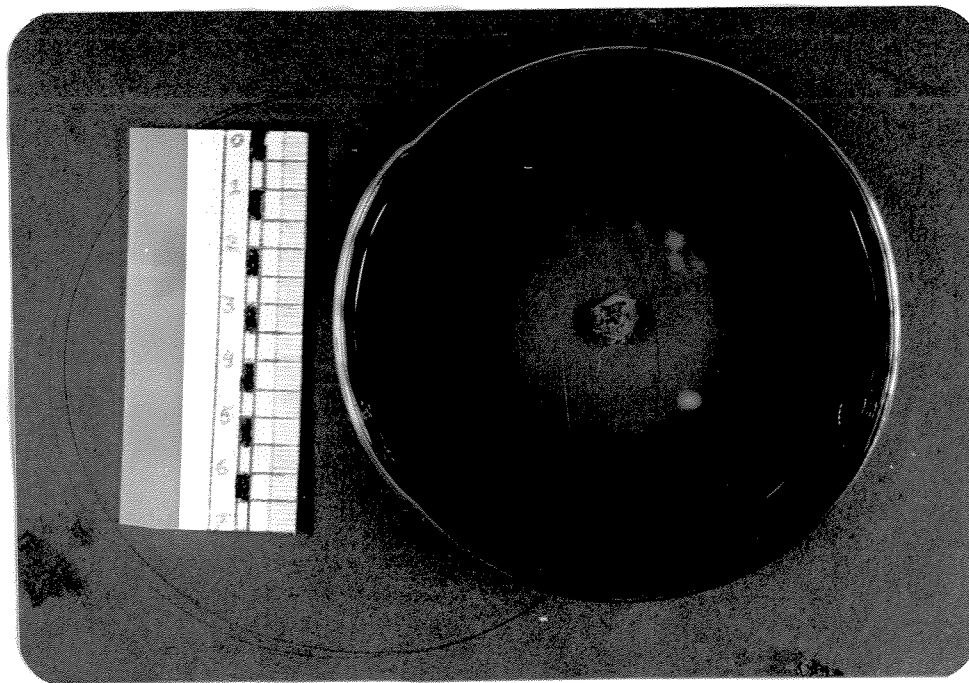


Fig. 5 - Ensaio para amilase. Linhagem compacta.

4.1.3. Produção de protease

Para protease, o maior resultado foi o do heterocário MSE + pp-6, o que foi surpreendente, já que a linhagem pp-6 não apresentou formação de halo. Índices igualmente altos ou intermediários também foram encontrados nos heterocários pp + M-35, pp + M-32, MSE + pp, MSE + B-9, nas compactas B-VIII e B-6, e, ainda, nos heterocários MSE + B-23 e MSE + B-6. Para os demais casos, os resultados foram iguais.

Tabela 10 - Índices para LIPASE extracelular em ordem decrescente (I_m)

Linhagens	I_m	
B - VIII	2,89	a
M - 35	2,75	a b
pp + M - 32	2,55	a b c
B - 6	2,47	b c
MSE	2,35	c d
M - 32	2,04	d e
pp - 6	2,00	d e
pp + M - 35	1,99	e
MSE + B - 9	1,56	f
MSE + B - 6	1,52	f g
pp	1,50	f g h
MSE // B - 6	1,38	f g h i
MSE // B - 23	1,31	f g h i j
B - 9	1,29	f g h i j
MSE // B - 24	1,26	f g h i j
pp // M - 35	1,25	f g h i j
bm	1,25	f g h i j
MSE + pp	1,23	f g h i j
MSE + B - 24	1,22	f g h i j
MSE + pp - 6	1,22	f g h i j
B - 23	1,19	g h i j
MSE + B - VIII	1,19	g h i j
MSE // B - VIII	1,18	g h i j
MSE // bm	1,15	h i j
MSE // pp - 6	1,13	i j
pp // M - 32	1,10	i j
pp // MSE	1,09	i j
MSE + B - 23	1,06	i j
MSE + bm	1,04	i j
MSE // B - 9	1,03	i j
B - 24	1,00	j

Índices seguidos pelas mesmas letras não diferem ao nível de 5%.
 $\Delta 5\%$ (TUKEY) $\approx 0,35$

Tabela 11 - Índices para AMILASE extracelular em ordem decrescente (I_m)

Linhagens	I_m			
B - VIII	3,67	a		
pp + M - 32	3,18	a	b	
pp + M - 35	3,17	a	b	
B - 6	3,17	a	b	
pp - 6	2,69		b	
B - 23	2,54		b	
MSE + pp - 6	1,73			c
MSE + B - 9	1,68			c d
MSE + B - 24	1,60			c d
MSE + B - 23	1,49			c d
MSE	1,46			c d
MSE + B - VIII	1,37			c d
M - 32	1,37			c d
MSE + pp	1,33			c d
MSE + bm	1,28			c d
B - 24	1,25			c d
pp	1,22			c d
MSE + B - 6	1,21			c d
B - 9	1,20			c d
bm	1,16			c d
MSE // B - 23	1,15			c d
M - 35	1,14			c d
MSE // pp - 6	1,13			c d
pp // MSE	1,12			c d
MSE // B - 9	1,11			c d
MSE // bm	1,10			c d
pp // M - 32	1,10			c d
MSE // B - 24	1,06			d
MSE // B - 6	1,05			d
MSE // B - VIII	1,05			d
pp // M - 35	1,05			d

Índices seguidos pelas mesmas letras não diferem ao nível de 5%.
 $\Delta 5\%$ (TUKEY) $\approx 0,65$

Tabela 12 - Índices para PROTEASE extracelular em ordem decrescente (I_m)

Linhagens	I_m				
MSE + pp - 6	2,38	a			
pp + M - 35	2,36	a	b		
pp + M - 32	2,21	a	b		
MSE + pp	2,19	a	b		
MSE + B - 9	2,14	a	b	c	
B - VIII	2,09	a	b	c	d
B - 6	1,87			c	d
MSE + B - 23	1,85				d
MSE + B - 6	1,80				d
B - 23	1,25				e
M - 32	1,20				e
MSE + bm	1,19				e
MSE + B - 24	1,18				e
MSE + B - VIII	1,18				e
MSE // B - 24	1,18				e
MSE // B - 23	1,16				e
MSE // B - 6	1,14				e
pp // M - 35	1,11				e
B - 9	1,11				e
MSE // pp - 6	1,10				e
pp	1,10				e
B - 24	1,08				e
bm	1,07				e
MSE // B - 9	1,07				e
MSE + B - VIII	1,06				e
MSE // bm	1,06				e
pp // M - 32	1,05				e
M - 35	1,04				e
MSE	1,02				e
MSE // pp	1,02				e
pp - 6	1,00				e

Índices seguidos pelas mesmas letras não diferem ao nível de 5%.
 $\Delta 5\%$ (TUKEY) $\cong$ 0,28

4.2. Produção de fosfatase e urease nas linhagens haplóides e em heterocários e diplóides

4.2.1. Produção de fosfatase nas linhagens haplóides

As linhagens haplóides compactas, bem como a B-23, apresentaram reações de fraca intensidade em 1 ou 2 minutos. Naquelas de crescimento normal, usadas como controle, bem como em uma das mutantes, a B-9, as reações foram intensas e de pronto. Nas demais, os resultados foram intermediários (tabela 13).

4.2.2. Produção de urease nas linhagens haplóides

As linhagens haplóides compactas, seguidas pela B-23, apresentaram as reações mais fracas do grupo, demorando mesmo, de alguns até mais de 30 minutos, para a sua verificação. As demais, apresentaram reação intensa, demonstrável pela coloração forte e rapidez de resultados, que foram de imediato (tabela 13).

4.2.3. Produção de fosfatase e urease em diplóides e heterocários

Em todos os casos, tanto heterocários como diplóides, apresentaram resultados positivos para ambas as enzimas. Até onde os métodos empregados permitiram, não foram observadas diferenças entre as linhagens, quanto ao aspecto em questão.

4.3. Observações microscópicas

Como uma complementação, algumas observações microscópicas foram feitas, afim de se verificar se alterações estruturais acompanharam as enzimáticas. Apesar de se constituírem apenas um esboço preliminar, sem se realizarem medições ou análises estatísticas, diversas anormalidades foram observadas.

As linhagens compactas foram examinadas ao microscópio óptico e comparadas às demais, previamente descritas por BIAGI (1977). Várias alterações estruturais foram observadas, microscopicamente, indicando um desenvolvimento anômalo. Hifas sinuosas com formações globosas intercaladas às células normais foram encontradas nas linhagens B-23, B-24, M-32 e pp-6. Hifas retorcidas e conidióforos curtos e também retorcidos foram encontrados nas compactas e na M-32. Os conidióforos das compactas B-6 e pp-6, apresentaram-se, às vezes, sem vesículas e(ou) esterigmas aparentes, formando duas fileiras de conídios (figura 6). Na compacta B-VIII, as extremidades das hifas mostraram-se arredondadas, às vezes, dando a impressão de que os conídios brotaram diretamente das mesmas. Além disso, os conídios foram abundantes na B-6, escassos na pp-6 e raros na linhagem B-VIII. As principais características observadas nas linhagens compactas, podem ser vistas na tabela 14.

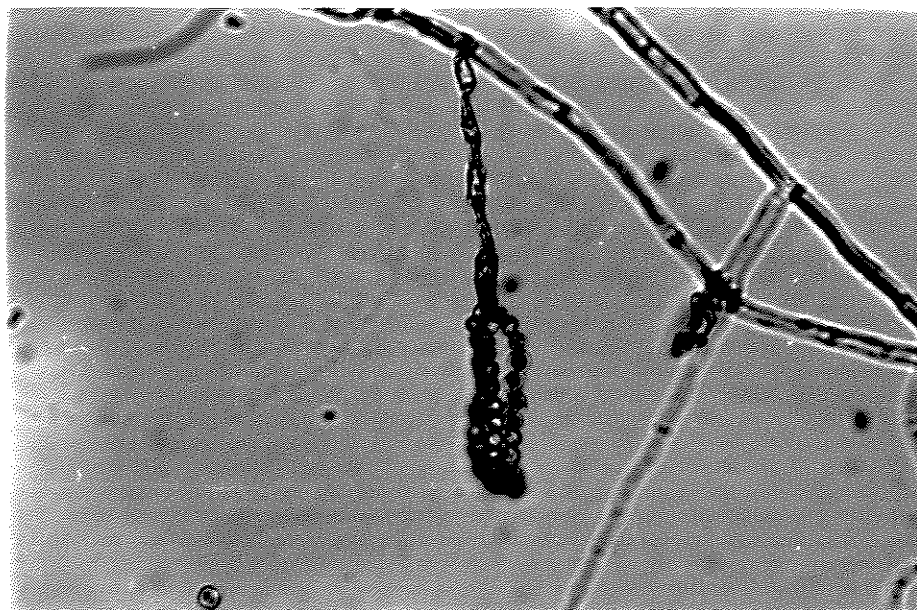


Fig. 6 - Linhagem compacta pp-6. Aumento 1200 x.

Em ordem decrescente de severidade de alterações microscópicas colocaram-se as compactas, bem como a B-23, em primeiro lugar, seguidas pela B-24 e M-32, e, finalmente, a B-9 e a M-35, que se aproximaram dos padrões utilizados.

Tabela 14 - Aspectos microscópicos característicos observados nas linhagens compactas

Linhagem	Micélio	Conidióforo	Conídios
B - 6	pouco ramificado células pequenas hifas finas extremidades <u>afi</u> ladas	curtos retorcidos células largas e escuras falta de vesícu- la e (ou) este- rigma	abundantes
B - VIII	muito ramificado células pequenas hifas largas retorcido extremidades <u>arre</u> dondadas	curtos abundantes falta de vesícu- la e(ou) esterig ma	raros
pp - 6	células pequenas estruturas glo <u>bo</u> sas extremidades <u>afi</u> ladas	curtos finos retorcidos falta de vesícu- la e(ou) esterig ma	escassos

5. DISCUSSÃO

5.1. Linhagens haplóides

Os mutantes utilizados no presente trabalho apresentaram grandes diferenças de crescimento (figura 1) e, algumas vezes, colônias de uma mesma linhagem mostraram dimensões diferentes, conforme o meio de cultura empregado. A própria MSE, uma das linhagens controle, apresentou crescimento reduzido em meio para verificação de lipase (tabela 10 e figura 2). As linhagens de menor crescimento foram também as mais alteradas enzimaticamente. Essas apresentaram os maiores índices enzimáticos para lipase, amilase e protease, além dos resultados, de modo geral, terem sido marcadamente nítidos e rápidos, em relação às demais. A única exceção foi a compacta pp-6, que não apresentou formação de halo para protease. Quanto às outras duas enzimas, fosfatase e urease, ocorreu o inverso, isto é, essas mesmas linhagens de dimensões reduzidas, apresentaram respostas fracas e demoradas aos ensaios, indicando pequena quantidade de enzima extracelular (ta

bela 13). Nesses ensaios para fosfatase e urease, não se efetuaram medições das dimensões das colônias, já que as técnicas empregadas não o exigiram (item 3.7.). Apesar disso, parece não haver dúvida de que a linhagem B-23 teve um crescimento menor, nesses casos, analogamente ao que ocorreu em meio para amilase. E, mais uma vez, seu comportamento se aproximou daquele das compactas (itens 4.2.1. e 4.2.2.).

Ao microscópio óptico, as alterações estruturais mais severas corresponderam a duas das linhagens compactas, bem como a B-23 (tabela 14 e figura 6). Mesmo nos casos em que as alterações de crescimento e de índice enzimático foram pequenas para serem consideradas significativas estatisticamente, sua ordem de grandeza foi bastante coincidente com a ordem de severidade das alterações observadas na análise microscópica, sugerindo uma correlação entre esses fatos (tabelas 10, 11, 12 e 14).

O mutante compacto B-6 talvez mereça uma análise mais profunda em estudos posteriores, já que sua resposta foi, por vezes, duvidosa. Nesse, as alterações enzimáticas foram grandes, como nos demais compactos. Macro e microscopicamente, seu aspecto variou, mostrando-se em algumas vezes bastante anômalo e, em outras, quase normal. ROSATO (1982) constatou nesta linhagem, anormalidades no metabolismo de nitrogênio. Desde que esse elemento é essencial para a célula, outras alterações fisiológicas decorrentes seriam esperadas.

Os fatores determinantes das diferenças e semelhanças observadas em cada caso, são difíceis de serem precisados, dada a natureza complexa do problema. Na verdade eles ultrapassam os objetivos do presente trabalho. Seriam necessárias novas pesquisas nesse sentido. Entretanto, algumas hipóteses podem ser esboçadas a respeito. É possível, que mais de uma se aplique a cada

caso.

O problema da atividade enzimática alterada pode envolver a síntese e(ou) a excreção da enzima. Quanto à síntese, poder-se-ia pensar, à primeira vista, que, colônias pequenas, porém, com uma massa micelial densa, intensamente ramificada, compactada, com hifas retorcidas, sinuosas, células globosas, (tabela 14), poderiam apresentar maior número de núcleos por unidade de área. Tal situação poderia levar a uma produção enzimática maior do que seria de se esperar, proporcionalmente ao tamanho da colônia. Essa idéia se aplicaria aos casos onde houve maior atividade de lipase, amilase e protease extracelulares, no entanto, não explicaria a redução de fosfatase e urease, nesses mesmos casos. Além disso, uma vez que as mutações são monogênicas e deve haver vários "loci" envolvidos na produção de cada enzima, parece mais razoável supor-se ser outra a causa. O problema talvez não seja diretamente com a síntese da enzima e, sim, com algum fator comum que possa afetar a excreção enzimática. O fator comum, então, que conduziria a excreção de uma, ou várias enzimas, simultaneamente, poderia ser a perda ou alteração de uma proteína da membrana ou de algum precursor da parede. Desta maneira, a fisiologia da parede se modificaria, inclusive no que diz respeito à sua permeabilidade. É o que foi atribuído a *Neurospora crassa* (GRATZNER, 1972; MURAYAMA e ISHIKAWA, 1973) e *Bacillus subtilis* (YONEDA e col., 1973; AYUSAWA e col., 1975), onde mutações monogênicas afetaram características de crescimento e de enzimas extracelulares. No caso de *B. subtilis*, assim como no presente trabalho, aos aumentos de amilase extracelular corresponderam também aumentos de protease extracelular. Por outro lado, no trabalho referido sobre *Neurospora*, as linhagens que produziram mais amilase, produziram menos fosfata

se, analogamente ao que ocorreu no presente trabalho.

Além da possibilidade de proteínas estruturais da parede celular estarem envolvidas com o processo de secreção, uma alteração em um dos sistemas enzimáticos da membrana também afetaria a permeabilidade da parede. Assim, alterações para permeases, de funções específicas no transporte de uma ou de um grupo de substâncias, explicaria a alteração do transporte de uma ou de um grupo de enzimas especificamente. No basidiomiceto *Ustilago violacea*, por exemplo, dois "loci" complementares estão envolvidos na atividade de urease, sendo um deles estrutural, e o outro, relacionado à permease (BAIRD e GARBER, 1981).

Em *Aspergillus oryzae*, foram postulados sítios de ligação para alfa-amilase, na parede do micélio (TONOMURA e col., 1963; YABUKI e FUKUI, 1970), e analogamente, sugeridos para *Neurospora crassa* (GRATZNER, 1972). Nesses casos, a quantidade de enzima excretada não pode se exceder à capacidade de ligação da enzima à parede celular (YABUKI e FUKUI, 1970). Então, no presente trabalho, poder-se-ia pensar em uma mutação em um desses sítios, alterando a quantidade de enzima liberada.

A mutação em questão, poderia também afetar genes, que determinem enzimas concernentes a algum aspecto metabólico relacionado ao sistema de energia acoplado ao transporte (KINGHORN e PATEMAN, 1977).

Embora não se possa precisar o ponto chave da questão, parece haver uma causa comum, para as várias alterações apresentadas. O problema deve, de alguma maneira, estar relacionado à parede celular, analogamente ao que ocorre em mutantes morfológicos de *Neurospora* (MISHRA, 1977).

5.2. Produção de enzimas extracelulares em diplóides e heterocários

Desde a descoberta do ciclo parassexual em fungos (ROPER, 1952), a técnica da heterocariose e a da formação de diplóides tem sido usada por vários pesquisadores para a análise genética e para a produção de linhagens melhoradas, especialmente com microrganismos importantes industrialmente. Dessa forma, a interação entre muitos genes, na condição de diplóide ou na de heterocário, pode ser comparada em muitos fungos.

No presente trabalho, em todos os diplóides obtidos em diferentes combinações, foi restabelecido o fenótipo enzimático das linhagens bm ou pp, utilizadas como padrão, para todas as enzimas analisadas. As mutações devem, então, ser recessivas. A linhagem MSE, uma das controle utilizadas, apresentou índices maiores do que as outras padrões bm e pp, para a lipase. No diplóide formado por essa linhagem haplóide MSE, com qualquer uma das outras haplóides, normais ou não, o fenótipo enzimático das padrões bm ou pp, mais uma vez, foi restabelecido (tabela 10 e figura 2).

Os heterocários apresentaram índices enzimáticos iguais ou maiores do que as linhagens padrões, haplóides, em quase todos os casos. Os únicos, dentre todos os heterocários, que apresentaram índices enzimáticos menores do que os dois haplóides correspondentes, foram, quanto à lipase, quando se combinou a linhagem MSE, de índice alto nesse caso, com as compactas, de índices igualmente altos. Digno de nota, é que um dos maiores índices dentro todos os heterocários analisados, foi o da combinação MSE + pp-6, para protease, já que a linhagem compacta pp-6 não apresentou formação de halo para protease.

Depois desse heterocário, as combinações pp + M 35 e pp + M-32, foram as de maior índice enzimático para as enzimas, lipase, amilase e protease, além de MSE + pp e MSE + B-9 no caso da protease.

Discrepâncias entre o fenótipo produzido por um genótipo idêntico nestas diferentes organizações celulares, heterocário e diplóide, eram esperadas. Existem alguns registros na literatura. Assim, mutações recessivas em *Aspergillus flavus* para produção de aflatoxina (PAPA, 1980) e em *A. nidulans*, para utilização de fluoroacetato (APIRION, 1966) o fenótipo original do selvagem foi restaurado no diplóide heterozigoto, mas, não no heterocário. Talvez a grande heterogeneidade das hifas heterocarióticas, com sua diversidade de taxas e modelos de distribuições nucleares, seja senão a única, pelo menos uma das grandes responsáveis pelas diferenças entre heterocário e diplóide (CLUTTERBUCK e ROPER, 1966). Essas diferenças entre o modelo de complementação no diplóide heterozigoto e no heterocário devem ocorrer se o produto de um gene regulador somente exercer seu efeito sobre um gene estrutural situado dentro do mesmo núcleo. Se o produto de um gene regulador for sintetizado em quantidades limitadas, a distribuição desigual dos núcleos nos heterocários poderia fazer com que a concentração do produto fosse muito baixa, perto de núcleos de outro genótipo, para que seu efeito normal pudesse se fazer sentir (COVE, 1977). Por outro lado, os produtos gênicos poderiam ser subunidades de uma proteína, formada no citoplasma. No heterocário, os RNA, codificando para diferentes subunidades, poderiam levar a formação de cadeias polipeptídicas muito distantes umas das outras, para permitir uma interação eficiente (PONTECORVO, 1963).

No trabalho ora em questão, houve, então, restauração do fenótipo enzimático das linhagens padrões bm e pp em todos os casos de diplóides e de alguns heterocários. Nesses últimos, embora os resultados tenham sido heterogêneos, aqueles de maior índice enzimático foram praticamente os mesmos para as diversas enzimas analisadas.

6. LITERATURA CITADA

- APIRION, D. 1966. Recessive mutants at unlinked loci which complement in diploids but not in heterokaryons of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 53: 935-941.
- ARLETT, C.F. 1957. Induction of cytoplasmatic mutants in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, London 179: 1250-1251.
- ARLETT, C.F., M. GRINDLE e J.L. JINKS. 1962. The red cytoplasmatic variant of *Aspergillus nidulans*. *Heredity* 17: 197-209.
- ARST, H.N., JR. e COVE, D.J. 1973. Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics* 126: 111-141.
- AYSAWA, D., Y. YONEDA, K. YAMANE e B. MARUO. 1975. Pleiotropic phenomena in autolytic enzyme(s) content, flagellation, and simultaneous hyperproduction of extracellular α -amylase and protease in a *Bacillus subtilis* mutant. *Journal of Bacteriology* 124: 459-469.

- AZEVEDO, J.L. e S.O.P. COSTA. 1973. *Exercícios práticos de Genética*. 288p., Companhia Editora Nacional, São Paulo, SP.
- AZEVEDO, J.L. e J.A. ROPER. 1970. Mitotic non-conformity in *Aspergillus*: successive and transposable genetic changes. *Genetical Research* 16: 79-93.
- BAINBRIDGE, B.W. 1963. Study of a translocation affecting morphology. *Aspergillus News Letter* 4: 20-21.
- BAINBRIDGE, B.W. e J.A. ROPER. 1966. Observations on the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 42: 417-424.
- BAIRD, M.L. e E.D. GARBER. 1981. The genetics and biochemistry of urease in *Ustilago violacea*. *Biochemical Genetics* 19: 1101-1114.
- BANKS, G.T., F.BINNS e R.L. CUTCLIFFE. 1976. Recent developments in the production and industrial applications of amylolytic enzymes derived from filamentous fungi. *Progress in Industrial Microbiology* 6: 95-139.
- BARBESGAARD, P. 1977. Industrial enzymes produced by members of the genus *Aspergillus*. In: *Genetics and physiology of Aspergillus*. Editado por J.E.Smith e J.A. Pateman, p.391-404. Academic Press, London.
- BIAGI, C.M.R. 1977. Mutantes morfológicos induzidos por 8-metoxipsoralen e luz ultra-violeta em *Aspergillus nidulans*. (Dissertação de Mestrado). 150 p. ESALQ/USP. Piracicaba, SP.

- BROWN, M.R.W. e B.E.WINSLEY. 1969. Effect of polysorbate 80 on cell leakage and viability of *Pseudomonas aeruginosa* exposed to rapid changes of pH, temperature and tonicity. *Journal of General Microbiology* 56, 99-107.
- CLUTTERBUCK, A.J. 1969. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63: 317 - 327.
- CLUTTERBUCK, A.J. 1970. A variegated position effect in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research* 16: 303-315.
- CLUTTERBUCK, A.J. 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 70: 423-435.
- CLUTTERBUCK, A.J. 1974. *Aspergillus nidulans*. In: *Handbook of Genetics I*. Editado por R.C. King. p. 447-510. Plenum Press, New York.
- COHEN, B.L. 1972a. Genetics of proteases in *Aspergillus nidulans*. *Heredity* 29: 131.
- COHEN, B.L. 1972b. Ammonium repression of extracellular protease in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 71: 293-299.
- COHEN, B.L. 1973a. The neutral and alkaline proteases of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 77: 521-528.
- COHEN, B.L. 1973b. Regulation of intracellular and extra-cellular neutral and alkaline proteases in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 79: 311-320.

- COHEN, B.L. 1977. The proteases of *Aspergilli*. In: *Genetics and physiology of Aspergillus*. Editado por J.E. Smith e J.A. Pateman, p. 281-291. Academic Press, London.
- COHEN, B.L. 1981. Regulation of protease production in *Aspergillus*. *Transaction of the Britttish mycological society* 76: 447-450.
- COHEN, B.L., J.E. MORRIS e H. DRUCKER. 1975. Regulation of two extracellular proteases of *Neurospora crassa* by induction and by carbon-nitrogen and sulfur-metabolite repression. *Arquives of Biochemistry and Biophysics* 169: 324-330.
- COVE, D.J. 1977. The genetics of *Aspergillus nidulans*. In: *Genetics and physiology of Aspergillus*. Editado por J. E. Smith e J.A. Pateman. p. 81-95, Academic Press. London.
- DORN, G. 1965a. Genetic analysis of the phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research* 6: 13-26.
- DORN, G. 1965b. Phosphatase mutants in *Aspergillus nidulans*. *Science* 150: 1183-1184.
- DORN, G.L. 1967. Purification of two alkaline phosphatases from *Aspergillus nidulans*. *Biochimica Biophysica Acta* 132 : 190-193.
- DORN, G.L. 1968. Purification and characterization of phosphatase I from *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Biological Chemistry* 243: 3500-3506.
- DORN, G. e W. RIVERA. 1966. Kinetics of fungal growth and phosphatase formation in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 92:1618 - 1622.

DRUCKER, H. 1972. Regulation of exocellular proteases in *Neurospora crassa*: Induction and repression of enzyme synthesis. *Journal of Bacteriology* 110: 1041-1049.

DUNN, E. e J.A. PATEMAN. 1972. Urea e thiourea uptake in *Aspergillus nidulans*. *Heredity* 29: 129.

GRATZNER, H.G. 1972. Cell wall alterations associated with the hyperproduction of extracellular enzymes in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* 111: 443-446.

HANKIN, L. e S.L. ANAGNOSTAKIS. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67: 597-607.

HARSANYI, Z. e G.L. DORN. 1972. Purification and characterization of acid phosphatase V from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 110: 246-255.

HASTIE, A.C. 1970. Benlate - Induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature* 226: 77.

HAYSMAN, P. e H.B. HOWE, JR. 1971. Some genetic and physiological characteristics of urease-defective strains of *Neurospora crassa*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 13: 256-269.

HERMANN, T.E., M.B. KURTZ e S.P. CHAMPE. 1983. Laccase localized in hulle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 154: 955-964.

- IWAI, M., Y. TSUJISAKA, Y. OKAMOTO e J. FUKUMOTO. 1973. Lipid requirement for the lipase production by *Geotrichum candidum* Link. *Agricultural and Biological Chemistry* 37: 929-931.
- KAFER, E. 1958. An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* 9: 105-145.
- KINGHORN, J.R. e J.A. PATEMAN. 1977. Nitrogen metabolism. In *Genetics and Physiology of Aspergillus*. Editado por J.E. Smith e J.A. Pateman, p. 147-202, Academic Press, London.
- KOIDE, Y., H. YAMAGATA e S. UDAKA. 1979. Relationship between morphological differentiation and extracellular enzyme formation in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Applied Microbiology* 25: 161-168.
- KOLMARK, H.G.. 1965. Ureaseless mutants in *Neurospora crassa*. *Neurospora Newsletter* 8: 6-7.
- KOLMARK, H.G. 1969a. Genetic studies of ureases mutants in *Neurospora crassa*. *Mutation research* 8: 51-63.
- KOLMARK, H.G. 1969b. Urease defective mutants in *Neurospora crassa*. *Molecular General Genetics* 104: 219-234.
- KURZEJA, K.C. e E.D. GARBER. 1973. A genetic study of electrophoretically variant extracellular amylolytic enzymes of wild-type strains of *Aspergillus nidulans*. *Canadian Journal of Genetic and Cytology* 15: 275-286.

KVESITADZE, G.I., L.L. KVACHADZE, M.D. PAVLENISHVILI e V.V.

KORIDZE. 1981a. Selection of microscopic fungi producing acid-stable α -amylase and glucoamylase. *Microbiology* 50: 598-602.

KVESITADZE, G.I., N.N. VORONTSOVA, O.N. GONCHAROVA, V.V.

KORIDZE, E.A. DVATSATOVA e L.L. KVACHADZE. 1981b. Microbiology glucoamylases of molds of the genus *Aspergillus*. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* 17: 569-574.

LAMPEN, J.O. 1965. Secretion of enzymes by microorganisms. In

Function and structure of microorganisms. Editado por M. R. Pouak e M.H. Richmond. 15th Symposium of Society for Microbiology, p. 115-133. The University Press, Cambridge.

LAWRENCE, R.C., T.F. FRYER e B. REITER. 1967. Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. *Nature* 25: 1264-1265.

LE MENSE, E.H., J. CORMAN, J.M. VAN LANEN e A.F. LANGLYKKE.

1947. Production of mold amylases in submerged culture. *Journal of Bacteriology* 54: 149-159.

LLOYD, G.I., E.O. MORRIS e J.E. SMITH. 1971. A study of the esterases and their function in *Candida lipolytica*, *Aspergillus niger* and a yeast-like fungus. *Journal of General Microbiology* 63: 141-150.

MACKAY, E.M. e J.A. PATEMAN. 1980. Nickel requirement of a urease-deficient mutant in *Aspergillus nidulans* *Journal of General Microbiology* 116: 249-251.

MARKHAM, P. e B.W. BAINBRIDGE. 1978. A morphological lesion (ballooning) related to a requirement for of choline in mutants of *Aspergillus nidulans*. *Proceedings Society of General Microbiology* 5: 65.

MARKAM, P. e B.W. BAINBRIDGE. 1979. An analysis of the ballooning phenotype exhibited by choline auxotrophs of *Aspergillus nidulans*. *Heredity* 43: 449-450.

Mc CULLY, K.S. e E.FORBES. 1965. The use of p-phenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research* 6: 352-359.

MISHRA, N.C. 1977. Genetics and biochemistry of morphogenesis in *Neurospora*. *Advances in Genetics* 19: 341-405.

MOHSIN, S.M., E.T. EL-ASHWAH, M.S. RAOUF, M.KHAIRY e S.MORSI. 1979a. Glucoamylase. Part I. Production of glucoamylase by *Aspergillus* species. *Egyptian Journal of Microbiology* 12: 79-88.

MOHSIN, S.M., E.T. EL-ASHWAH, M.S. RAOUF, M. KHAIRY e S.MORSI. 1979b. Glucoamylase. Part II. Purification of the enzyme. *Egyptian Journal of Microbiology* 12: 89-99.

MOHSIN, S.M., E.T. EL-ASHWAH, M.S. RAOUF, M.KHAIRY e S.MORSI. 1979c. Glucoamylase. Part III. Fractionation and kinetics of purified glucoamylase. *Egyptian Journal of Microbiology* 12: 100-114.

- MURAYAMA, T. e T.ISHIKAMA. 1973. Mutation in *Neurospora crassa* affecting some of the extracellular enzymes and several growth characteristics. *Journal of Bacteriology* 115: 796-804.
- NEVALAINEN, K.M.H. e E.T. PALVA. 1979. Improvement of amyloglucosidase production of *Aspergillus awamori* by mutagenic treatments. *Journal of Chemical Technology Biotechnology* 29: 390-395.
- OGUNDERO, V.W. 1980. Lipase activities of thermophilic fungi from mouldy groundnuts in Nigeria. *Mycologia* 72: 118-126.
- OSTRIKOVA, N.A. e S.A. KONOVALOV. 1978. Production of mutants with elevated synthesis of α -amylase. *Mikrobiologiya* 47:722-727.
- PAPA, K.E. 1980. Dominant aflatoxin mutant of *Aspergillus flavus*. *Journal of General Microbiology* 118: 279-282.
- PARK, Y.K. e D.C. DE LIMA. 1972. Produção de amiloglicosidase fúngica por fermentação submersa e sua purificação. *Revista Brasileira de Tecnologia* 3: 67-64.
- PARK, Y.K. e M.S.S. DE SANTI. 1977. Induction of high amyloglucosidase production mutant from *Aspergillus awamori*. *Journal of Fermentation Technology* 55: 193-195.
- PATEMAN, J.A. e J.R. KINGHORN. 1976. Nitrogen metabolism. In *The Filamentous Fungi*. Editado por J.E. Smith e D.Berry, vol.2, p. 159-237. Edward Arnold, London.
- PATEMAN, J.A. e J.R.KINGHORN. 1977. Genetic regulation of nitrogen metabolism. In *Genetic and Physiology of Aspergillus*. Editado por J.E.Smith e J.A.Pateman, p. 203-241.

PATEMAN, J.A., J.R. KINGHORN, E.DUNN e E.C. FORBES. 1973.

Ammonium regulation in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 114: 943-950.

POLLOCK, M.R. 1962. *The bacteria*. Editado por I.C.Gunsalus e R.Y. Stanier, p. 121-178. Academic Press, London.

PONTECORVO, G. 1963. Microbial genetics retrospect and prospect. *Proceedings of the Royal Society, London, Series B* 158: 1-23.

PONTECORVO, G., J.A.ROPER, L.M. HEMMONS, K.D. Mc.DONALD e A.W.J. BUFTON. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* 5: 141-238.

ROPER, J.A. 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia* 8: 14-15.

ROSATO, Y.B. 1982. Alteração do metabolismo de nitrogênio em um mutante compacto de *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Cultura* 34: 766.

ROSATO, Y.B. e J.L. AZEVEDO. 1980. A compact variant of cytoplasmic origin in *Aspergillus nidulans*. *Transaction of the British Mycological Society* 75: 313-315.

ROSATO, Y.B. e J.L. AZEVEDO. 1983. Genetic analysis of compact mutants of *Aspergillus nidulans*. *Revista Brasileira de Genética* 6: 199-210.

SALTON, M.R.J. 1951. The adsorption of cetyltrimethyl-ammonium bromide by bacteria, its action in releasing cellular constituents and its bactericidal effects. *Journal of General Microbiology* 5: 201-204.

- SERLUPI-CRESCENZI, O., M.B.KURTZ e S.P.CHAMPE. 1983. Development defects resulting from arginine auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 129: 3535-3544.
- SINGH, M.e U.SINHA. 1979. Mode of Action of p-fluorophenylalanine in *Aspergillus nidulans*: Effect on the synthesis and activity of phosphatase isoenzymes. *Journal of General Microbiology* 115: 101-110.
- SMILEY, K.L., M.C. CADMUS, D.E. HENSLEY e A.A.LAGODA.1964. High potency amyloglucosidase producing mold of the *Aspergillus niger* group. *Applied Microbiology* 12: 455.
- SRB, A.M. e N.H. HOROWITZ. 1944. The ornithine cycle in *Neurospora* and its genetic control. *Journal of Biological Chemistry* 154: 129-139.
- STACHOW, C. e SANWAL, B.D. 1967. Regulation, purification and some properties of the NAD-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora* *Biochimica et Biophysica Acta* 139: 294-307.
- SUMNER, J.B., 1926. The isolation and crystalization of the enzyme urease. *Journal of Biological Chemistry* 69:435-441.
- TABAK, M.Ya. e S.S. SHCHELOKOVA. 1979. Influence of tweens on the lipase activity of *Oospora lactis*. *Mikrobiologiya* 48: 658-662.
- TONOMURA, K., F. FUTAI e O.TANABE. 1963. Binding of α -amylase to the cell wall of *Aspergillus oryzae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 78: 802-805.

- UPSAHLL, A. e E.KÄFER. 1974. Detection and identification of translocations by increased specific nondisjunction in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 76: 19-31.
- VALENT, G.U. 1985. Isolamento e análise genética de mutantes com alteração na produção de amiloglucosidase em *Aspergillus niger*. Tese de Mestrado. 113p. UNICAMP, I.B.Campinas, SP.
- VOLKOVA, I.M. e Zh.D.LEBEDEVA. 1979. Influence of the lipid component of the medium on lipase biosynthesis by fungi. *Mikrobiologiya* 48: 653-657.
- WHITAKER, J.R. 1972. Principles of enzymology for the food sciences. Editado por M.Dekker Incorporation. 636p. New York.
- YABUKI, M. e S.FUKUI. 1970. Presence of binding site for α -amylase and of masking protein for this site on mycelial cell wall of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Bacteriology* 104: 138-144.
- YONEDA, Y., K.YAMANE e B.MARUO. 1973. Membrane mutation related to the production of extracellular α -amilase and protease in *Bacillus subtilis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 50: 765-770.
- ZONNEVELD, B.J.M. 1972. The significance of α -1,3 glucan of the cell wall and α -1,3 glucanase for cleistothecium development. *Biochimica et Biophysica Acta* 273:174-184.

ZONNEVELD, B.J.M. 1973. Inhibitory effect 2-deoxyglucose on cell walls α -1,3 glucan synthesis and cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. *Developmental Biology* 34: 1-8.

ZONNEVELD, B.J.M. 1974. α -1,3 glucan synthesis correlated with α -1,3 glucanase synthesis, conidiation and fructification in morphogenetic mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 81: 445-451.

7. APÊNDICE

Para LIPASE, AMILASE E PROTEASE extracelulares, os diâmetros dos halos, das colônias e os índices enzimáticos (item 3.7), bem como as respectivas médias, são mostrados em quatro repetições, no presente apêndice. As tabelas A_1 , A_2 e A_3 referem-se aos dados de linhagens haplóides, heterocários e diplóides, respectivamente, para lipase. Analogamente, para amilase, os dados encontram-se nas tabelas A_4 , A_5 e A_6 e, para protease, nas tabelas A_7 , A_8 e A_9 .

Tabela A₁ - Produção de lipase nas linhagens haplóides.

Linhagem HAPLÓIDE	Halo*	Colônia*	Índice enzimático
bm	45	35	1,29
	49	38	1,29
	57	47	1,21
	55	46	1,20
média	51,50	41,50	1,25
B - 9	45	35	1,29
	45	34	1,32
	45	36	1,25
	45	35	1,29
média	45,00	35,00	1,29
B - 23	54	44	1,23
	55	50	1,10
	58	45	1,29
	57	51	1,12
média	56,00	47,50	1,19
B - 24	42	42	1,00
	40	40	1,00
	45	45	1,00
	42	42	1,00
média	42,25	42,25	1,00
B - 6	32	13	2,46
	28	11	2,55
	37	14	2,64
	31	14	2,21
média	32,00	13,00	2,47

continua

Tabela A₁ - (Continuação)

Linhagem HAPLÓIDE	Halo*	Colônia*	Índice enzimático
B - VIII	23	8	2,88
	22	8	2,75
	19	7	2,71
	29	9	3,22
média	23,25	8,00	2,89
MSE	22	10	2,20
	12	6	2,00
	19	7	2,71
	20	8	2,50
média	18,25	7,75	2,35
M - 32	14	7	2,00
	15	7	2,14
	12	6	2,00
	10	5	2,00
média	12,75	6,25	2,03
M - 35	25	10	2,50
	18	6	3,00
	25	10	2,50
	18	6	3,00
média	21,50	8,00	2,75
pp	50	30	1,67
	49	35	1,40
	49	35	1,40
	50	33	1,52
média	49,50	33,25	1,50
pp - 6	20	10	2,00
	20	10	2,00
	22	11	2,00
	20	10	2,00
média	20,50	10,25	2,00

* Medições em milímetros.

Tabela A₂ - Produção de lipase em heterocários.

HETEROCÁRIO	Halo	Colônia	Índice enzimático
MSE + bm	45	42	1,07
	40	39	1,03
	43	43	1,00
	44	41	1,07
média	43,00	41,25	1,04
MSE + B - 9	30	18	1,67
	35	23	1,52
	27	17	1,59
	32	22	1,45
média	31,00	20,00	1,56
MSE + B - 23	46	41	1,12
	47	43	1,09
	42	41	1,02
	45	45	1,00
média	45,00	42,50	1,06
MSE + B - 24	36	29	1,24
	37	31	1,19
	38	33	1,15
	36	28	1,29
média	36,75	30,25	1,22
MSE + B - 6	34	24	1,42
	37	27	1,37
	36	26	1,38
	34	18	1,89
média	35,25	23,75	1,52
continua			

Tabela A₂ - (Continuação)

HETEROCÁRIO	Halo	Colônia	Índice enzimático
MSE + B - VIII	45	37	1,22
	42	38	1,11
	39	32	1,22
	40	33	1,21
média	41,50	35,00	1,19
MSE + pp	42	36	1,17
	46	33	1,39
	42	31	1,35
	43	43	1,00
média	43,25	35,75	1,23
MSE + pp - 6	45	35	1,29
	45	38	1,18
	45	37	1,22
	45	38	1,18
média	45,00	37,00	1,22
pp + M - 32	32	12	2,67
	36	14	2,57
	35	14	2,50
	32	13	2,46
média	33,75	13,25	2,55
pp + M - 35	32	15	2,13
	28	16	1,75
	34	17	2,00
	33	16	2,06
média	31,75	16,00	1,99

Tabela A₃ - Produção de lipase em diplóides.

DIPLÓIDE	Halo	Colônia	Índice enzimático
MSE // bm	30	25	1,20
	32	28	1,14
	27	24	1,13
	27	24	1,13
média	29,00	25,25	1,15
MSE // B - 9	27	27	1,00
	27	27	1,00
	27	25	1,08
	28	27	1,04
média	27,25	26,50	1,03
MSE // B - 23	41	32	1,28
	44	34	1,29
	32	26	1,23
	44	31	1,42
média	40,25	30,75	1,31
MSE // B - 24	39	30	1,30
	42	34	1,24
	32	26	1,23
	39	31	1,26
média	38,00	30,25	1,26
MSE // B - 6	42	29	1,45
	41	29	1,41
	40	29	1,38
	44	35	1,26
média	41,75	30,50	1,38

continua

Tabela A₃ - (Continuação)

DIPLÓIDE	Halo	Colônia	Índice enzimático
MSE // B - VIII	38	32	1,19
	33	29	1,14
	33	29	1,14
	32	26	1,23
média	34,00	29,00	1,18
MSE // pp	26	25	1,04
	28	25	1,12
	28	25	1,12
	27	25	1,08
média	27,25	25,00	1,09
MSE // pp - 6	25	22	1,14
	25	22	1,14
	23	20	1,15
	23	21	1,10
média	24,00	21,25	1,13
pp // M - 32	47	42	1,12
	47	42	1,12
	44	40	1,10
	47	44	1,07
média	46,25	42,00	1,10
pp // M - 35	41	34	1,21
	41	33	1,24
	42	35	1,20
	42	31	1,35
média	41,50	33,25	1,25

Tabela A₄ - Produção de amilase nas linhagens haplóides.

HAPLÓIDE	Halo	Colônia	Índice enzimático
bm	34	30	1,13
	35	30	1,17
	35	30	1,17
	35	30	1,17
média	34,75	30,00	1,16
B - 9	37	32	1,16
	39	34	1,15
	29	23	1,26
	25	20	1,25
média	32,50	27,25	1,20
B - 23	26	11	2,36
	26	11	2,36
	30	13	2,31
	28	9	3,11
média	27,50	11,00	2,54
B - 24	27	22	1,23
	28	22	1,27
	27	22	1,23
	28	22	1,27
média	27,50	22,00	1,25
B - 6	22	7	3,14
	17	6	2,83
	16	5	3,20
	21	6	3,50
média	19,00	6,00	3,17

continua

Tabela A₄ - (Continuação)

HAPLÓIDE	Halo	Colônia	Índice enzimático
B - VIII	19	6	3,17
	12	3	4,00
	9	2	4,50
	12	4	3,00
média	13,00	3,75	3,67
MSE	33	22	1,50
	31	21	1,48
	30	21	1,43
	30	21	1,43
média	31,00	21,25	1,46
M - 32	33	24	1,38
	30	22	1,36
	33	25	1,32
	30	21	1,43
média	31,50	23,00	1,37
M - 35	36	32	1,13
	39	34	1,15
	39	34	1,15
	42	37	1,14
média	39,00	34,25	1,14
pp	30	25	1,20
	29	23	1,26
	30	25	1,20
	32	26	1,23
média	30,25	24,75	1,22
pp - 6	14	5	2,80
	11	5	2,20
	13	4	3,25
	15	6	2,50
média	13,25	5,00	2,69

Tabela A₅ - Produção de amilase em heterocários.

HETEROCÁRIO	Halo	Colônia	Índice enzimático
MSE + bm	34	26	1,31
	35	27	1,30
	36	30	1,20
	34	26	1,31
média	34,75	27,25	1,28
MSE + B - 9	31	18	1,72
	30	18	1,67
	30	18	1,67
	30	18	1,67
média	30,25	18,00	1,68
MSE + B - 23	33	25	1,32
	33	20	1,65
	33	17	1,94
	35	33	1,06
média	33,50	23,75	1,49
MSE + B - 24	32	15	2,13
	38	34	1,12
	40	20	2,00
	35	31	1,13
média	36,25	25,00	1,60
MSE + B - 6	39	31	1,26
	38	32	1,19
	38	32	1,19
	39	33	1,18
média	38,50	32,00	1,21

continua

Tabela A₅ - (Continuação)

HETEROCÁRIO	Halo	Colônia	Índice enzimático
MSE + B - VIII	37	26	1,42
	37	26	1,42
	35	26	1,35
	35	27	1,30
média	36,00	26,25	1,37
MSE + pp	38	28	1,36
	38	26	1,46
	38	31	1,23
	39	31	1,26
média	38,25	29,00	1,33
MSE + pp - 6	34	15	2,27
	34	26	1,31
	33	23	1,43
	34	18	1,89
média	33,75	20,50	1,73
pp + M - 32	37	11	3,36
	38	12	3,17
	36	12	3,00
	35	11	3,18
média	36,50	11,50	3,18
pp + M - 35	35	11	3,18
	35	11	3,18
	35	12	2,92
	34	10	3,40
média	34,75	11,00	3,17

Tabela A₆ - Produção de amilase em diplóides.

DIPLÓIDE	Halo	Colônia	Índice enzimático
MSE // bm	47	43	1,09
	50	45	1,11
	49	44	1,11
	48	44	1,09
média	48,50	44	1,10
MSE // B - 9	51	45	1,13
	50	45	1,11
	50	46	1,09
	49	44	1,11
média	50	45	1,11
MSE // B - 23	38	33	1,15
	42	36	1,17
	46	40	1,15
	38	34	1,12
média	41	35,75	1,15
MSE // B - 24	37	35	1,06
	37	35	1,06
	40	39	1,03
	38	35	1,09
média	38	36	1,06
MSE // B - 6	32	32	1,00
	40	36	1,11
	38	36	1,06
	33	32	1,03
média	35,75	34	1,05

continua

Tabela A₆ - (Continuação)

DIPLÓIDE	Halo	Colônia	Índice enzimático
MSE // B - VIII	35	33	1,06
	36	34	1,06
	35	34	1,03
	35	33	1,06
média	35,25	33,50	1,05
MSE // pp	50	43	1,16
	50	47	1,06
	53	48	1,10
	52	45	1,16
média	51,25	45,75	1,12
MSE // pp - 6	40	35	1,14
	39	34	1,15
	39	35	1,11
	41	37	1,11
média	39,75	35,25	1,13
pp // M - 32	50	46	1,09
	53	48	1,10
	49	46	1,07
	53	47	1,13
média	51,25	46,75	1,10
pp // M - 35	40	39	1,03
	39	38	1,03
	36	34	1,06
	35	33	1,06
média	37,50	36,00	1,05

Tabela A₇ - Produção de protease nas linhagens haplóides.

HAPLÓIDE	Halo	Colônia	Índice enzimático
bm	35	32	1,09
	36	32	1,00
	35	31	1,13
	37	35	1,06
média	35,75	32,50	1,07
B - 9	37	33	1,12
	35	31	1,13
	37	34	1,09
	37	34	1,09
média	36,50	33,00	1,11
B - 23	22	16	1,38
	25	19	1,32
	26	22	1,18
	26	23	1,13
média	24,75	20,00	1,25
B - 24	36	34	1,06
	34	31	1,10
	37	34	1,09
	36	34	1,06
média	35,75	33,25	1,08
B - 6	31	15	2,07
	28	15	1,87
	31	17	1,82
	34	20	1,70
média	31,00	16,75	1,87

continua

Tabela A₇ - (Continuação)

HAPLÓIDE	Halo	Colônia	Índice enzimático
B - VIII	15	7	2,14
	11	5	2,20
	8	4	2,00
	14	7	2,00
média	12,00	5,75	2,09
MSE	36	36	1,00
	30	29	1,03
	31,5	31	1,02
	32	31,5	1,02
média	32,38	31,88	1,02
M - 32	27	25	1,08
	28	22	1,27
	26	21	1,24
	25	21	1,19
média	26,50	22,25	1,20
M - 35	31	28	1,11
	34	34	1,00
	32	31	1,03
	32	31	1,03
média	32,25	31,00	1,04
pp	36	34	1,06
	35	33	1,06
	35	31	1,13
	17	15	1,13
média	30,75	28,25	1,10
pp - 6	6	6	1,00
	7	7	1,00
	7	7	1,00
	6	6	1,00
média	6,50	6,50	1,00

Tabela A₈ - Produção de protease em heterocários.

HETEROCÁRIO	Halo	Colônia	Índice enzimático
MSE + bm	44	38	1,16
	44	38	1,16
	42	35	1,20
	44	36	1,22
média	43,50	36,75	1,19
MSE + B - 9	45	20	2,25
	45	20	2,25
	44	23	1,91
	43	20	2,15
média	44,25	20,75	2,14
MSE + B - 23	35	18	1,94
	35	17	2,06
	34	19	1,79
	37	23	1,61
média	35,25	19,25	1,85
MSE + B - 24	32	29	1,10
	36	33	1,09
	39	34	1,12
	31	22	1,41
média	34,25	29,50	1,18
MSE + B - 6	34	19	1,79
	32	18	1,78
	35	19	1,84
	34	19	1,79
média	33,75	18,75	1,80

continua

Tabela A₈ - (Continuação)

HETEROCÁRIO	Halo	Colônia	Índice enzimático
MSE + B - VIII	39	37	1,05
	33	31	1,06
	38	36	1,06
	31	29	1,07
média	35,25	33,25	1,06
MSE + pp	34	18	1,89
	36	17	2,12
	35	19	1,84
	35	12	2,92
média	35,00	16,50	2,19
MSE + pp - 6	39	17	2,29
	40	17	2,35
	39	17	2,29
	39	15	2,60
média	39,25	16,50	2,38
pp + M - 32	38	18	2,11
	34	19	1,79
	38	17	2,24
	38	14	2,71
média	37,00	17,00	2,21
pp + M - 35	28	12	2,33
	28	12	2,33
	25	11	2,27
	30	12	2,50
média	27,75	11,75	2,36

Tabela A₉ - Produção de protease em diplóides.

DIPLÓIDE	Halo	Colônia	Índice enzimático
MSE // bm	37	35	1,06
	37	35	1,06
	37	35	1,06
	37	35	1,06
média	37,00	35,00	1,06
MSE // B - 9	30	28	1,07
	30	28	1,07
	29	27	1,07
	29	27	1,07
média	29,50	27,50	1,07
MSE // B - 23	38	32	1,19
	34	30	1,13
	34	30	1,13
	38	32	1,19
média	36,00	31,00	1,16
MSE // B - 24	38	32	1,19
	38	32	1,19
	37	32	1,16
	37	32	1,16
média	37,50	32,00	1,18
MSE // B - 6	40	35	1,14
	40	35	1,14
	41	36	1,14
	40	35	1,14
média	40,25	35,25	1,14

continua

Tabela A₉ - (Continuação)

DIPLÓIDE	Halo	Colônia	Índice enzimático
MSE // B - VIII	41	35	1,17
	44	38	1,16
	41	34	1,21
	41	35	1,17
média	41,75	35,50	1,18
MSE // pp	39	38	1,03
	40	39	1,03
	39	38	1,03
	36	36	1,00
média	38,50	37,75	1,02
MSE // pp - 6	28	25	1,12
	28	26	1,08
	36	32	1,13
	32	30	1,07
média	31,00	28,25	1,10
pp // M - 32	43	41	1,05
	40	38	1,05
	41	39	1,05
	44	42	1,05
média	42,00	40,00	1,05
pp // M - 35	37	34	1,09
	37	33	1,12
	37	32	1,16
	37	35	1,06
média	37,00	33,50	1,11