

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/6594
IB/80561

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1985

**ISOLAMENTO E ANÁLISE GENÉTICA
DE MUTANTES COM ALTERAÇÃO
NA PRODUÇÃO DE AMIOGLICOSIDADE
EM ASPERGILLUS NIGER**

GISELA UMBUZEIRO VALENT

Este exemplar corresponde a redação final d
Tese defendida pela S^{ra} GISELA UMBUZEIRO Vale
e aprovada pela Comissão Julgadora.
Campinas, 18/09/1985

TÍTULO - Isolamento e análise genética de mutantes com
alteração na produção de amiloglicosidase em
Aspergillus niger.

ORIENTADOR: Prof. RENATO BONATELLI JR.

TESE apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas, área Genética.

CAMPINAS - SP

1985

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

lassif. T
utor V239
Ex.
ombo BC/ 6594-IB
640

3/80561
pc/6594

A

Meus pais, Paulo e Ilza

Meu esposo, Dante

dedico

AGRADECIMENTOS

Quero expressar meus agradecimentos às pessoas e instituições que contribuíram para realização deste trabalho em especial:

Ao Prof. Renato Bonatelli Jr. pelo apoio, amizade, orientação e presença constante.

Ao Diretor do Instituto de Biologia, Prof. Crodowaldo Pavan e ao Chefe do Departamento de Genética, Prof. Ivanhoê Baracho pelas facilidades concedidas durante a elaboração da tese.

Aos Professores João Lúcio de Azevedo, Aline Pizzirani-Kleiner e Cláudio Luis Messias pela leitura e valiosas sugestões dadas durante análise prévia desta tese.

Aos meus colegas do Curso de Pós Graduação de Genética na área de microrganismos, em especial à Maria Regina Calil, pelo estímulo e valiosa ajuda durante os trabalhos.

Pelo auxílio na parte estatística, ao Prof. Aquiles Piedrabuena.

Aos técnicos e auxiliares do Laboratório de Genética de Microrganismos pela colaboração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de Aperfeiçoamento e Pós Graduação, e, pelo auxílio através do Projeto Integrado de Genética (PIG).

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Biologia, especialmente à Sra Ana Gagliardi, Bibliotecária Chefe, pelas sugestões dadas na correção das referências bibliográficas.

Ao Edson José de Oliveira pela colaboração na elaboração dos desenhos.

A DIGITAL EQUIPMENT Comércio e Indústria LTDA, pela concessão do computador para edição desta tese.

Ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento (CPqD) da TELEBRAS, pela concessão do equipamento para impressão desta tese.

Ao meu esposo Dante, que com muito carinho me ajudou e estimulou durante todo o trabalho.

I N D I C E

1.0	INTRODUÇÃO	1
2.0	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	O fungo <u>Aspergillus niger</u> e o ciclo parassexual	3
2.2	A enzima Amiloglicosidase	5
2.3	A produção de Amiloglicosidase (AG) por <u>Aspergillus</u>	7
2.3.1	Seleção de linhagens.	7
2.3.2	Utilização de amilases na sacarificação de substratos para produção de álcool.	8
2.3.3	Otimização das condições ambientais para produção de amilase.	9
2.4	Alguns aspectos do melhoramento genético de microrganismos de interesse industrial	10
3.0	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	Linhagens utilizadas	18
3.2	Meios de cultura e soluções	19
3.2.1	Meio mínimo (MM) (PONTECORVO e <u>col.</u> , 1953b)	19
3.2.2	Meio completo (MC) (PONTECORVO e <u>col.</u> , 1953b)	19
3.2.3	Solução de vitaminas	20
3.2.4	Hidrolisado de ácidos nucleicos	20
3.2.5	Meio Mínimo líquido mais 4% de Meio Completo (BONATELLI JR., 1981)	20
3.2.6	Solução salina	21
3.2.7	Solução tween	21
3.2.8	Solução amido 1% em tampão citrato pH 4,0	21
3.2.9	Solução Benlate	21

3.2.10	Solução dextrina limite 1% em tampão citrato pH 4,0	21
3.2.11	Solução de inibidor	22
3.2.12	Meio de Fermentação (MAC)	22
3.3	Esterilização e incubação	22
3.4	Avaliação da atividade enzimática	23
3.4.1	Produção da enzima amiloglicosidase (<u>AG</u>)	23
3.4.2	Medida da atividade enzimática	24
3.5	Curva de acúmulo de <u>AG</u> da linhagem <u>HAP</u>	25
3.6	Produção de <u>AG</u> de linhagens sem alteração na produção da enzima.	25
3.7	Curva de acúmulo de <u>AG</u> da linhagem mutante <u>nic1olv3</u> no tempo	25
3.8	Atividade enzimática da linhagem <u>nic1olv3</u> na presença de inibidor específico com dextrina limite ou amido solúvel como substrato	26
3.9	Obtenção de mutantes para produção da enzima	26
3.9.1	Curva de sobrevivência da linhagem <u>nic1olv3</u>	26
3.9.2	Indução de mutantes para produção da enzima	27
3.9.3	Teste em frascos das colônias selecionadas em tubos	27
3.10	Obtenção de diplóides	28
3.10.1	Isolamento de diplóides	28
3.10.2	Caracterização dos diplóides	28
3.10.3	Manutenção dos diplóides	29
3.11	Obtenção de segregantes	30
3.11.1	Isolamento de segregantes	30
3.11.2	Caracterização dos segregantes	30
3.12	Mapeamento dos genes que alteram a produção	30
3.13	Análises estatísticas	31

3.13.1	Análise de variância e teste de médias	
	(Tukey)	31
3.13.2	Prova de Kolmogorov-Smirnov e Prova de	
	Kruskal-Wallis	31
4.0	RESULTADOS	32
4.1	Curva de acúmulo de <u>AG</u> da linhagem <u>HAP</u>	32
4.2	Produção de <u>AG</u> de linhagens e diplóides de	
	<u>A. niger</u>	35
4.3	Curva de acúmulo de <u>AG</u> da linhagem <u>niclolv3</u>	39
4.4	Atividade de <u>AG</u> da linhagem <u>niclolv3</u> na presença	
	de inibidor específico com dextrina limite ou	
	amido como substrato	42
4.5	Obtenção de mutantes para produção de <u>AG</u>	45
4.5.1	Curva de sobrevivência da linhagem <u>niclolv3</u>	45
4.5.2	Indução de mutantes para produção de <u>AG</u> e	
	teste em tubos	46
4.5.3	Teste em frascos das colônias selecionadas	
	em tubos	48
4.6	Obtenção de diplóides e sua produção de <u>AG</u>	49
4.6.1	Obtenção e caracterização de diplóides	49
4.6.2	Produção de <u>AG</u> dos diplóides	53
4.7	Obtenção de segregantes e sua produção de <u>AG</u>	55
4.7.1	Diplóide <u>map3//pabl⁺fwn1</u>	55
4.7.2	Diplóide <u>lap61//niclolv3</u>	60
4.7.3	Diplóide <u>lap38//pabl⁺fwn1</u>	66
4.7.4	Diplóide <u>lap73//pabl⁺fwn1</u>	72
5.0	DISCUSSÃO	73
5.1	Efeito de marcas genéticas e ploidia na produção	
	de <u>AG</u>	73
5.2	Curvas de acúmulo de amiloglicosidase.	75

5.3	Atividade de <u>AG</u> na presença de inibidor especí - fico com dextrina limite como substrato.	76
5.4	Obtenção de mutantes com produção alterada de <u>AG</u> . .	77
5.5	Teste de interação alélica e complementação em diplóides.	78
5.5.1	Teste de interação alélica	78
5.5.2	Teste de complementação	79
5.6	Segregantes.	80
5.6.1	Do diplóide <u>map3//pab1fwn1</u>	80
5.6.2	Do diplóide <u>lap61//nic1olv3</u>	81
5.6.3	Dos diplóides <u>lap38//pab1fwn1</u> e <u>lap73//pab1fwn1</u>	82
6.0	CONCLUSÕES	83
7.0	RESUMO	84
8.0	SUMMARY	86
9.0	BIBLIOGRAFIA	87
	APÊNDICE	102

LISTA DE TABELAS

TABELA

1	CURVA DE ACÚMULO DE <u>AG</u> DA LINHAGEM <u>HAP</u>	33
2	PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DE VÁRIAS LINHAGENS E DIPLÓIDES DE <u>A. NIGER</u>	36
3	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA 2	37
4	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DAS LINHAGENS DA TABELA 2	38
5	CURVA DE ACÚMULO DE <u>AG</u> DA LINHAGEM <u>nic1ol1v3</u>	40
6	ATIVIDADE DE <u>AG</u> DA LINHAGEM <u>nic1ol1v3</u> NA PRESENÇA DE INIBIDOR COM DEXTRINA LIMITE OU AMIDO COMO SUBSTRATO	43
7	CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DA LINHAGEM <u>nic1ol1v3</u> À LUZ ULTRAVIOLETA	45
8	PRODUÇÃO MÉDIA DE <u>AG</u> EM U/ML DOS MUTANTES E A DISTRIBUIÇÃO DAS REPETIÇÕES EM CLASSES DE UMA UNIDADE DE <u>AG</u>	48
9	CARACTERIZAÇÃO DE DIPLÓIDES	51
10	SÍMBOLOS DOS DIPLÓIDES	52
11	PRODUÇÃO MÉDIA DE <u>AG</u> DOS DIPLÓIDES E A DISTRIBUI- ÇÃO DAS REPETIÇÕES EM CLASSES DE UMA UNIDADE DE <u>AG</u>	54
12	MARCAS AUXOTRÓFICAS E MORFOLÓGICAS E PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DOS SEGREGANTES DO DIPLÓIDE <u>map3//pab1fwn1</u>	56
13	PRODUÇÃO DE <u>AG</u> EM U/ML DOS PARENTAIS DOS SEGRE- DA TABELA 12	57
14	ANÁLISE MITÓTICA DO DIPLÓIDE <u>map3//pab1fwn1</u>	59
15	TESTE DE KOLMOGOROV E SMIRNOV PARA OS SEGREGANTES DO DIPLÓIDE <u>map3//pab1fwn1</u>	59

16	MARCAS AUXOTRÓFICAS E MORFOLÓGICAS E PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DOS SEGREGANTES DO DIPLÓIDE <u>lap61//nic1olv3</u> . . .	61
17	PRODUÇÃO DE <u>AG</u> EM U/ML DOS PARENTAIS DOS SEGRE- GANTES DA TABELA 16	62
18	ANÁLISE MITÓTICA DO DIPLÓIDE <u>lap61//nic1olv3</u> . . .	64
19	TESTE DE KOLMOGOROV E SMIRNOV PARA OS SEGREGANTES DO DIPLÓIDE <u>lap61//nic1olv3</u>	64
20	MAPEAMENTO DO GENE <u>lap61</u> SEGUNDO MACDONALD e <u>col</u> . (1972)	65
21	MARCAS AUXOTRÓFICAS E PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DOS SEGRE- GANTES MARRONS (<u>fwn</u>) DO DIPLÓIDE <u>lap38//pab1fwn1</u>	67
22	PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DO PARENTAL <u>pab1fwn1</u> DOS SEGRE- GANTES DA TABELA 21	68
23	MARCAS AUXOTRÓFICAS E PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DOS SEGRE- GANTES VERDES (<u>olv</u>) DO DIPLÓIDE <u>lap38//pab1fwn1</u>	70
24	PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DO PARENTAL <u>pab1fwn1</u> DOS SEGRE- GANTES DA TABELA 23	70
25	PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DOS SEGREGANTES DO DIPLÓIDE <u>lap38//pab1fwn1</u>	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA

1	CURVA DE ACÚMULO DE <u>AG</u> DA LINHAGEM <u>HAP</u>	34
2	CURVA DE ACÚMULO DE <u>AG</u> DA LINHAGEM <u>nic1ol1v3</u>	41
3	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA AMILOGLI- COSIDASE EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DO INIBIDOR	44
4	DISTRIBUIÇÃO DA PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DAS COLONIAS SELE- CIONADAS EM TUDOS DE ENSAIO COMPARADAS COM A PARENTAL	47
5	DISTRIBUIÇÃO DA PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DOS SEGREGANTES E PARENTAIS DO DIPLÓIDE <u>map3//pab1fwn1</u>	58
6	DISTRIBUIÇÃO DA PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DOS SEGREGANTES E PARENTAIS DO DIPLÓIDE <u>lap61//nic1ol1v3</u>	63
7	DISTRIBUIÇÃO DA PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DOS SEGREGANTES MARRONS E PARENTAL <u>pab1fwn1</u> DO DIPLÓIDE <u>lap38//pab1fwn1</u>	69
8	DISTRIBUIÇÃO DA PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DOS SEGREGANTES VERDES E PARENTAL <u>pab1fwn1</u> DO DIPLÓIDE <u>lap38//pab1fwn1</u>	71

LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE

TABELA

A1	TESTE DE PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DE ALGUMAS COLÔNIAS SELECIONADAS EM TUBOS	103
A2	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA A1 . . .	104
A3	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS DADOS DA TABELA A1 . .	104
A4	TESTE DE PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DAS COLÔNIAS 66, 57, <u>lap38</u> E <u>nic1olv3</u>	105
A5	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA A4 . . .	105
A6	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS DADOS DA TABELA A4 . .	105
A7	TESTE DE PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DAS COLÔNIAS 81, 61 E <u>lap73</u> COMPARADAS COM AS PARENTAIS	106
A8	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA A7 . . .	106
A9	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS DADOS DA TABELA A7 . .	107
A10	TESTE DE PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DO DIPLÓIDE <u>map3//pab1fwn1</u> COMPARADO COM AS PARENTAIS	108
A11	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA A10 . .	108
A12	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS DADOS DA TABELA A10 . .	109
A13	TESTE DE PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DOS DIPLÓIDES <u>map100//pab1fwn1</u> e <u>map166//pab1fwn1</u> COMPARADOS COM AS PARENTAIS	110
A14	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA A13 . .	110
A15	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS DADOS DA TABELA A13 . .	111
A16	TESTE DE PRODUÇÃO DE <u>AG</u> DOS DIPLÓIDES <u>lap</u> COMPARADOS COM O DIPLÓIDE CONTROLE (<u>pab1fwn1//nic1olv3</u>) E AS PARENTAIS	112
A17	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA A16 . .	112
A18	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS DADOS DA TABELA A16 . .	113

1.0 INTRODUÇÃO

A amiloglicosidade (AG) acumulada por fungos filamentosos e leveduras é utilizada na sacarificação do amido de várias fontes, como por exemplo, a mandioca (BANKS e col., 1976).

Além do Aspergillus niger, várias espécies do gênero Aspergillus produzem amiloglicosidase (BANKS e col., 1976), além de Rhizopus sp (TAKAHASHI e col., 1978) e Saccharomyces diastaticus (YAMASHITA e FUKUI, 1984).

Muitos estudos tem sido realizados do ponto de vista bioquímico em A. niger, como por exemplo o de SVENSSON e col. (1982) e RAMANESH e col., (1982), e sobre a produção e utilização da enzima como os trabalhos de PARK e PAPINI (1970) e KVESITADZE e col. (1981a), porém poucos na área de genética (BALL e col., 1978).

Os trabalhos disponíveis visando melhoramento da produção de linhagens tem sido feitos, baseados em mutação e seleção e não existem relatos disponíveis sobre estudos dos genes envolvidos na produção de AG em Aspergillus niger, apesar do ciclo parassexual nesta espécie ter sido descrito em 1953(a) por PONTECORVO e col., e dos trabalhos posteriores conduzidos sobre parassexualidade, por LHOAS (1961, 1967), VAN TUYLL (1977) e BONATELLI JR. e col. (1983).

Levando-se em conta a importância da produção de álcool de substratos amiláceos e a relevância do fungo A. niger na produção da enzima AG, o presente trabalho tem como objetivos:

1. determinar uma metodologia para testar a produção de AG da linhagem HAP de A. niger em condições compatíveis com um estudo genético;
2. obter mutantes com alteração na produção de AG através do uso da luz ultravioleta como mutagênico;
3. obter diplóides entre os mutantes visando analisar a interação alélica e complementação dos genes envolvidos no cruzamento, e;
4. obter segregantes de alguns diplóides para mapeamento das mutações induzidas em relação às marcas auxotróficas e morfológicas disponíveis.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O fungo Aspergillus niger e o ciclo parassexual

O fungo Aspergillus niger é considerado por RAPER e FENNELL (1965) o organismo tipo do grupo niger. Ele apresenta colônias pretas quando cultivado em meio Czapek sólido evidenciando duas séries de esterigmas e seus conídios são globosos, com aspecto rugoso sem equinulações verdadeiras, medindo quando maduros aproximadamente 5 µm de diâmetro.

O Aspergillus niger não apresenta ou ainda não tem evidenciado o ciclo sexual sendo portanto um Deuteromiceto.

A alternativa de recombinação estudada em Deuteromicetos é o ciclo parassexual, que foi descrito por PONTECORVO e ROPER (1952) em A. nidulans, e em A. niger por PONTECORVO e col. (1953a). Ocorre também em outros gêneros de fungos filamentosos tendo sido demonstrado em cerca de 41 espécies (AZEVEDO, 1976; MESSIAS, 1979).

O ciclo parassexual é uma importante fonte de variabilidade e, permite o mapeamento genético (AZEVEDO, 1972, 1976), o estudo de interações alélicas ou não e, pode ser usado no melhoramento de características de interesse industrial (SERMONTI, 1969; BONATELLI JR, 1977; MESSIAS, 1977, 1979; BONATELLI JR, 1981).

O ciclo parassexual segundo PONTECORVO (1956) ocorre através da fusão de núcleos haplóides, formação de diplóides, recombinação e haploidização.

O processo de formação de diplóides ocorre após anastomose de hifas e heterocariose (CATEN e JINKS, 1966; DAVIS, 1966; TINLINE e MCNEILL, 1969). Durante o estágio de heterocariose, caracterizado por núcleos diferentes no mesmo citoplasma pode ocorrer a cariogamia originando um diplóide heterozigoto.

Em A. niger os diplóides diferem dos haplóides quanto ao diâmetro de conídios apresentando diâmetro de 1,1 a 1,3 vezes maior segundo PONTECORVO e ROPER (1952) e PONTECORVO e col. (1953a) o que também foi observado por LHOAS (1967, 1968), CHANG e col. (1974), DAS e ROY (1978) e BONATELLI JR e col. (1983). Contudo ROSIM e col. (1978) concluíram que o diâmetro de conídios dos diplóides não é critério confiável para sua caracterização. Outro critério para distinguir colônias diplóides das haplóides é a utilização do fungicida Benlate (UPSHALL e col., 1976) devido ao crescimento reduzido e irregular das colônias diplóides na presença do fungicida. Estas observações inicialmente feitas em A. nidulans e A. terreus foram utilizadas por BONATELLI JR (1981) e BONATELLI JR e col. (1983) para A. niger havendo plena concordância entre o critério diâmetro de conídios e o crescimento em Benlate. O Benlate foi inicialmente utilizado por HASTIE (1970) em A. nidulans para obter segregantes de diplóides e, devido ao seu baixo custo comparado com os demais agentes haploidizantes tem sido largamente utilizado (BONATELLI JR, 1981; BONATELLI JR e col., 1983).

A recombinação no ciclo parassexual pode ocorrer através da permuta mitótica que foi estudada em A. nidulans por ROPER e PRITCHARD (1955) e PONTECORVO e KAFFER (1958), os quais concluíram que o fenômeno é raro, ocorrendo uma permuta em 500 mitoses, forma produtos recíprocos e ocorre no estágio de quatro fios. Também podem ocorrer segregantes haplóides sem a ocorrência de permuta mitótica por perdas sucessivas de cromossomos (haploidização) como sugere KAFFER (1960, 1961).

Em A. niger foi constatada alta frequência de recombinação mitótica por LHOAS (1967) e, na linhagem 10V10 de A. niger a frequência parece ser ainda maior tendo sido sugerido o termo paramiose para denominar o fenômeno caracterizado pelo isolamento diretamente do heterocário de haplóides recombinantes e diplóides homozigotos para as marcas genéticas estudadas (BONATELLI JR e col., 1983).

LHOAS (1961, 1967, 1968) e VAN TUYLL (1977) sugerem que o A. niger possua 6 grupos de ligação.

2.2 A enzima Amiloglicosidase

A enzima amiloglicosidase ou glucoamilase (AG) (E.C. 3.2.1.3) hidroliza ligações alfa 1,4 e alfa 1,6 do amido, removendo unidades de glicose a partir das extremidades não redutoras das cadeias. Portanto a maltose, a amilose e a amilopectina são totalmente convertidas em glicose por esta enzima (DIXON e WEBB, 1962; BARMAN, 1969).

Em A. niger KERR e col. (1951) e PAZUR e ANDO (1959) estudaram a ação da AG em amilose e amilopectina demonstrando sua ação nas extremidades das moléculas de amido, liberando somente glicose como produto final.

Em 1962, PAZUR e KLEPPE purificaram a AG de A. niger determinando além de sua ação, o seu peso molecular aproximado que é de 97.000 mais ou menos 5%.

FLEMING e STONE (1965), LINEBACK (1968), FINCH e LEONARD (1978), SVENSSON e col. (1982), RAMANESH e col. (1982) estudaram a AG de A. niger mostrando duas formas, AG I e AG II, as quais segundo MANJUNATH e RAO (1980) são idênticas imunologicamente.

Em outras espécies, MOHSIN e col. (1979 a, b, c) estudaram a produção de AG de algumas espécies de Aspergillus e purificaram a AG de A. foetidus e A. awamori, fazendo fracionamento da enzima purificada.

MAIA e UEDA (1977a, 1977b) encontraram tres formas de AG em A. oryzae: AG I, AG II e AG III; determinaram seus respectivos pesos moleculares: 76000, 38000 e 3800; além de estudarem sua ação em diferentes substratos.

SAHA e col. (1979) mostraram que essas formas aparecem na proporção de: 51(I) : 3(II) : 1(III), além de estudarem isoladamente a forma I. RAZZAQUE e UEDA (1978), estudando uma linhagem com alta produção de AG de A. oryzae, observaram que ela produzia também três formas de AG, porém diferentes dos tipos reportados anteriormente, apresentando baixa capacidade na digestão do amido cru.

TAKAHASHI e col. (1978) usando Rhizopus sp. purificaram também três formas de AG e estudaram suas propriedades.

Em 1982, HAYASHIDA e col. evidenciaram um sítio de afinidade para amido cru na AG I de A. awamori.

Em 1973, UEDA e KOBAYASHI descobriram um composto produzido por uma linhagem de Streptomyces sp no 280 capaz de inativar algumas amilases. Essa substância tinha um pequeno peso molecular e agia como inibidor de glucoamilase, alfa amilases pancreática e salivar e alfa amilase de bactéria. O inibidor mostrou um efeito acentuado sobre glucoamilase de Rhizopus, inibindo 72,2% da atividade, e sua ação em alfa amilase de Aspergillus atinge apenas 8,3% de inibição.

Em 1981, NAKANO e col. purificaram esse composto que se revelou complexo com pelo menos duas frações principais, uma que se comporta como oligossacarídeo com grupamento amino livre e outra, que é provavelmente um glicopeptídeo.

Em 1981, MEDDA e col., estudaram a ação do inibidor descrito acima contra glucoamilase I purificada de Aspergillus. Eles conseguem uma inibição de 97%, usando uma concentração de 1,6 µg de inibidor e 1,8 U da enzima.

2.3 A produção de Amiloglicosidase (AG) por Aspergillus.

2.3.1 Seleção de linhagens.

LE MENSE e col. (1947) testaram 278 culturas do gênero Aspergillus e encontraram o A. niger NRRL 337 como o melhor produtor da enzima dextrinizante (AG) além de estudarem os

fatores que afetavam a produção dessa linhagem. Em 1964, SMILEY e col. mostraram que a linhagem de A. awamori NRRL 3112 produzia mais AG que a NRRL 337 de A. niger. CADMUS e col. (1966) estudando três linhagens mostraram que A. awamori NRRL 3112 e A. niger NRRL 3122 tinham maior eficiência na digestão do amido que a NRRL 337 por apresentarem menor atividade de transglicosidase, enzima responsável pela polimerização de unidades de glicose em oligossacarídeos.

DENAULT e UNDERKOFER (1963) analisaram a conversão do amido utilizando uma preparação comercial obtida de A. niger.

PARK e DE LIMA (1972) examinaram 30 linhagens de fungos e concluíram que somente 7 eram produtoras de AG, sendo que só o A. niger NRRL 3122 e A. awamori NRRL 3112 produziram grandes quantidades.

KVESITADZE e col. (1981a) testaram 42 linhagens verdes e 111 pretas do gênero Aspergillus e observaram que somente as pretas produziram AG e que a maioria das boas produtoras eram linhagens de A. niger ou A. awamori.

2.3.2 Utilização de amilases na sacarificação de substratos para produção de álcool.

BANZON e col. (1949) mostram a mandioca como um bom substrato para obtenção de álcool e TEIXEIRA e col. (1950) utilizam com bons resultados o A. niger NRRL 337 na produção de álcool de mandioca, sendo depois confirmada, por CORMAN e TSUCHIYA (1951), sua potencialidade como cultura

para produção de AG na obtenção de álcool de vários substratos.

PARK e PAPINI (1970) utilizando A. niger NRRL 3122 e também A. awamori NRRL 3112 determinaram condições ótimas para produção de glicose do amido da mandioca.

UEDA (1982) e PARK e RIVIERA (1982) descreveram método para produção de álcool de extratos amiláceos sem pré cozimento através de enzimas amilolíticas.

2.3.3 Otimização das condições ambientais para produção de amilase.

ERB e col. (1948) estudaram fatores que afetavam a produção de AG por A. niger em cultura submersa. SHU e BLACKWOOD (1950) e SHU (1952) analisaram o efeito de fontes de carbono e nitrogênio e RAMACHANDRAN e col. (1978) determinaram ótimas condições de temperatura, pH e tampões para produção de enzimas amilolíticas por A. niger.

SINKAR e LEWIS (1980) conseguiram aumentar em 10 a 15 vezes a produção de AG utilizando um meio com ingredientes não sintéticos e LEWIS E SINKAR (1981) estudaram outros nutrientes que afetavam a produção de AG.

PAVLENISHVILI e KVACHADZE (1981) utilizaram um método matemático para encontrar o melhor meio para produção de amilase de A. niger estável em ácido para linhagem 147A, e este consistia de amido:5; farelo:5; NaNO_3 :0,34; KH_2PO_4 :0,28 e MgSO_4 :0,05%.

SOHN e PARK (1981) determinaram as condições ótimas de cultura e pH para produção de enzimas ácidas como AG, alfa amilase e proteases por A. niger.

KAMATA (1983) estudou o efeito de ácidos orgânicos na produção de amilase por A. niger.

Tentativas de mudança do estado do meio de cultura de líquido para sólido foram feitas por PARK e col. (1971) e ALAZARD e RAIMBAULT (1981).

2.4 Alguns aspectos do melhoramento genético de microrganismos de interesse industrial.

O melhoramento genético de microrganismos que produzem metabólitos de interesse industrial como antibióticos e enzimas principalmente, pode ser feito através de mutações e técnicas de recombinação.

Além do aspecto de aumento da produção em si é bastante relevante um estudo dos genes envolvidos na produção e dos produtos intermediários dos passos biossintéticos envolvidos e isso pode ser feito através de indução de mutantes com baixa ou nula produção do metabólito (EDWARDS e col., 1974) e recombinação entre eles.

Em estudos envolvendo o ciclo parassexual, o primeiro passo deve ser a obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos (PONTECORVO e col., 1953a) levando-se em conta que essas mutações podem causar ganho, diminuição ou não alteração da produção (BONATELLI JR. e col., 1982).

Com relação às enzimas amilolíticas principalmente, alguns estudos tem sido feitos, apesar de pouco frequentes.

Em 1969, GRATZNER e SHEEHAN isolaram um mutante de Neurospora crassa desreprimido para produção de amilase e invertase através de irradiação com ultravioleta.

CHANG e TERRY (1973) trabalhando com linhagens de A. foetidus analisaram a produção de amiloglicosidase de mutantes auxotróficos obtidos por ultravioleta e todos mostraram produção reduzida da enzima. Foram isolados diplóides entre os mutantes auxotróficos e eles recuperaram a produção de amiloglicosidase, ficando esta próxima da linhagem parental prototrófica.

YONEDA e MARUO (1975) após testarem 115.000 colônias conseguiram 15 mutantes (0,013 % de frequência) de Bacillus subtilis usando NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) como mutagênico, com produção duas a tres vezes maior de alfa amilase e cinco a dezesseis vezes maior de protease que a linhagem parental.

PARK e DE SANTI (1977) isolaram um mutante de Aspergillus awamori com produção 100% maior que a parental, usando NTG como mutagênico.

BALL e col. (1978) utilizando uma linhagem de Aspergillus niger com produção alta de AG (HT) fizeram um cruzamento com uma linhagem de baixa produção de AG (LT) da mesma genealogia. Após segregação, um recombinante foi superior, não em produção, mas em eficiência de filtração do meio e, também, apresentou um pico de atividade enzimática maior em 120 horas de fermentação que a parental HT.

Mutantes de Aspergillus awamori foram isolados por NEVALAINEN e PALVA (1979) através de vários mutagênicos, sendo obtidos pelo menos dois mutantes com produção significativamente maior de AG, 2,5 vezes maior que a linhagem parental NRRL 3112. Também a produção de alfa amilase foi aumentada nesses mutantes.

KVESITADZE e col. (1981b) na tentativa de obtenção de linhagens com alta produção de amiloglicosidase e alfa amilase estável em ácido testaram várias espécies de fungos, encontrando o A. niger 475 como um dos melhores produtores. Trataram então esta linhagem com diversos mutagênicos, sendo a luz ultravioleta o mais efetivo. De 200 colônias isoladas, 7 mutantes mostraram diminuição na atividade de alfa amilase estável em ácido (3,5%) e 1 mutante (0,5%), mostrou aumento na síntese da enzima. Eles conseguiram um mutante (147 A) que mostrou um aumento de dez vezes na produção de alfa amilase estável em ácido e mais de duas vezes na produção de amiloglicosidase, além de não apresentar atividade de transglicosidase. O pico de alfa amilase se dá em 72 horas e o de amiloglicosidase em 96 horas.

NEVALAINEN (1981) isolou um mutante de A. niger usando NTG e radiação gama com produção de tres a quatro vezes maior de beta galactosidase que a linhagem original.

HAYASHIDA e FLOR (1981) tentaram isolar uma linhagem de A. awamori var. kawachi, que tivesse menor produção de protease, visto que esta enzima, juntamente com glicosidase degrada a AG I (amiloglicosidase tipo I) em AG I' e AG II in vitro. Foram utilizados os mutagênicos NTG e luz

ultravioleta. Em 110 clones testados obtiveram um, com baixa produção de protease (0,9%) e um, com alta produção (0,9%). O mutante obtido apresentava uma redução de produção de protease e alta produção de AG I, isto é, a AG produzida tinha maior grau de adsorção e digestão do amido cru. O outro mutante obtido apresentava alta produção de protease e, conseqüentemente, uma limitada atividade de AG I.

YAMASHITA e FUKUI (1984) isolaram mutantes de Saccharomyces diastaticus que não produziam amiloglicosidase (amy-) através do mutagênico etilmetanosulfonato (EMS). As mutações pertenciam a dois grupos de complementação amy 1 e amy 2 e eram recessivas. As mutações amy 1 estavam localizadas no gene STA 1 (produtor de AG I). Para formação de diplóides foi usado o método de fusão de protoplastos.

Com relação à produção de ácido cítrico alguns autores mostraram que algumas mutações auxotróficas e morfológicas causaram diminuição ou não alteração da produção de ácido cítrico como os trabalhos de ILCZUK (1971), CHANG e TERRY (1973), SHCHERBAKOVA e RESVAYA (1978), DAS e ROY (1978), DAS (1980) e BONATELLI JR. e col. (1982).

Com relação a produção de antibióticos, através dos mutantes de baixa produção ou produção nula muitas observações foram feitas como a localização das mutações induzidas, testes de alelismo para análise de quantas marcas estavam envolvidas na produção do antibiótico e teste de recessividade e dominância, como podemos analisar nos trabalhos descritos abaixo.

CAGLIOTI e SERMONTI (1956) estudaram 4 mutantes não produtores de penicilina (p) de Penicillium chrysogenum. Sete diplóides foram sintetizados entre os 4 mutantes p e uma linhagem de produção normal (+). Os 4 mutantes p, quando cruzados entre si, os diplóides não recuperaram a produção normal, indicando que são mutações no mesmo gene. Foi também evidenciado que as mutações p eram recessivas. Foi observada uma ligação do gene p ao y e ao cy que pode ser deduzida dos dados da segregação somática do diplóide.

SERMONTI (1956) dando continuidade ao trabalho descrito acima, estudou mais 5 mutantes p (p5, p6, p7, p8, p9) e descobriu que os 4 primeiros mutantes eram alelos dos anteriormente descritos e que p9 era um outro gene que afetava a produção de penicilina. A mutação p9 diferia das outras, por existir um efeito na cor dos conídios e também por não suprimir totalmente a produção de penicilina.

EDWARDS e col. (1974) e HOLT e col. (1976) estudaram mutantes de Aspergillus nidulans incapazes de produzir penicilina. Nos testes de complementação realizados, 20 dos 28 mutantes pertenciam a um grupo de complementação e os 8 restantes à pelo menos outros 4 grupos. Todos os mutantes bloqueados na produção de penicilina que permaneceram sem alteração da morfologia eram do mesmo grupo de complementação e foram designados npé A. Análise de segregantes mostrou que npé A estava localizado no grupo de ligação VI.

Continuando essa linha de pesquisa MAKINS e col. (1983) mapearam mais 3 mutações npe B, C e D nos grupos de ligação III, IV e II respectivamente.

NORMANSELL e col. (1979) obtiveram 78 mutantes de Penicillium chrysogenum com diminuição de até 50% da produção normal e 12 deles, que produziam mais ou menos 10% do que a linhagem parental foram denominados npe e estudados com mais detalhes.

Análise dos diplóides formados entre eles mostrou a existência de pelo menos 5 grupos de complementação V, W, X, Y e Z e a maioria dos mutantes pertencia ao grupo Y.

RUDD e HOPWOOD (1979) obtiveram usando luz ultravioleta como mutagênico, 76 mutantes de Streptomyces coelicolor que não eram capazes de produzir o antibiótico "actinorhodin". Estes foram classificados em 7 classes fenotípicas com relação à síntese do antibiótico, acúmulo de pigmentos ou produtos precursores. Um membro de cada classe de mutante foi mapeado num pequeno segmento entre os loci his D e gua A sugerindo que os genes estruturais para a biossíntese da "actinorhodin" podem formar um "cluster" gênico.

Convém notar que todas as mutações que causaram bloqueio ou nula produção do metabólito se mostraram recessivas.

Com relação aos trabalhos com mutantes que tinham a produção de penicilina aumentada, MACDONALD e col. (1972) estudaram 3 mutações em A. nidulans, pen-01, pen-02 e pen-03, com produção de penicilina de 20, 12 e 20 U/ml respectivamente. Essas mutações foram mapeadas via análise

mitótica entre os mutantes e a linhagem testadora MSE com produção de 5 U/ml. O mapeamento mostrou que pen-01 estava no cromossomo VIII, pen-02 no III e pen-03 no IV, o que foi confirmado pela análise meiótica. O mutante pen-02 era morfológicamente anormal e essa alteração parecia ter um efeito pleitrópico, diminuindo a produção de penicilina de 20 U/ml para 12 U/ml.

MACDONALD (1972) confirma a localização de pen-01 no cromossomo VIII mostrando que esta era distal à marca cha A. DITCHBURN e col. (1976) observaram que pen-A1 (pen-01) era recessiva, pen-B2 (pen-02) era dominante e pen-C3 (pen-03) era semi-dominante. Investigações preliminares mostraram que pen-A1 era epistática a pen-B2 e pen-C3 era epistática à pen-B2.

BALL e HAMLYN (1982) conseguiram um recombinante, possivelmente haplóide, de Acremonium chrysogenum através da fusão de protoplastos, que apresentou um aumento de 40% na produção de cefalosporina C.

PAPA (1979) obteve 14 mutantes de Aspergillus flavus incapazes de produzir aflatoxina e denominados afl, com o uso de NTG. Testes de complementação em diplóides mostraram que a maioria das 14 mutações pertenciam à diferentes grupos de complementação. Um mutante afl 1 não complementava ou complementava parcialmente com os outros mutantes. Todos os mutantes se mostraram recessivos menos o afl 1. Diplóides heterozigotos foram sintetizados entre dois mutantes afl e linhagens teste (com marcas genéticas nos oito grupos de ligação). A haploidização dos diplóides mostrou ligação entre afl 4 e w+ e afl 1 e leu nos grupos II e VII

respectivamente. Parece que afl 1 está envolvido na regulação ou permeabilidade de excreção da toxina.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens utilizadas

As linhagens utilizadas neste trabalho foram:

- . nic1
- . nic1fwn4
- . nic1olv3
- . th1fwn3
- . th1pdx3olv2
- . pdx1
- . pdx1olv1
- . pur1
- . pab1fwn1
- . lap61 (pab1fwn1)
- . 81 (pab1fwn1)

Os símbolos utilizados significam:

nic - deficiência para nicotinamida

pab - deficiência para ácido para-aminobenzóico

pur - deficiência para purinas

pdx - deficiência para piridoxina

thi - deficiência para tiamina

fwn - conídios de coloração marron claro

olv - conídios de coloração verde oliva

lap - baixa produção de amiloglicosidase

(low amyloglucosidase production)

Todas as linhagens foram derivadas da linhagem 10V10 de Aspergillus niger, denominada neste trabalho HAP, que é utilizada na indústria para produção de ácido cítrico (para

maiores detalhes ver BONATELLI JR e col., 1982).

3.2 Meios de cultura e soluções

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

Nitrato de sódio (NaNO_3)	6,0 g
Fosfato dihidrogenado de potássio (KH_2PO_4)	1,5 g
Cloreto de Potássio (KCl)	0,5 g
Sulfato de magnésio x $7\text{H}_2\text{O}$ ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Sulfato de Ferro ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$)	traços
Sulfato de Zinco (ZnSO_4)	traços
Glicose	10,0 g
Água destilada	1 litro

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4%, ou HCl 1N;
quando sólido adicionou-se 15 g de ágar por litro.

3.2.2 Meio completo (MC) (PONTECORVO e col., 1953b)

Adicionou-se a 1 litro de Meio Mínimo:

Peptona	2,0 g
Caseína hidrolizada	1,5 g
Extrato de leveduras	0,5 g
Solução de vitaminas	1,0 ml
Ácido nucleico de levedura	2,5 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1N;
quando sólido adicionou-se 15 g de ágar por litro.

3.2.3 Solução de vitaminas

Biotina	0,2 mg
Ácido p-aminobenzóico	10,0 mg
Tiamina	50,0 mg
Piridoxina	50,0 mg
Ácido nicotínico	100,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Água destilada esterilizada	100,0 ml

Esterilizada em vapor fluente e guardada no refrigerador em frasco escuro sob clorofórmio.

3.2.4 Hidrolisado de ácidos nucleicos

Colocou-se 2 g de ácido nucleico de levedura em 15 ml de solução 1N de NaOH e 2 g de ácido nucleico de leveduras em 15 ml de solução de HCl 1N. As soluções foram aquecidas por 20 minutos à 100 °C, misturadas a quente e o pH ajustado para 6,0. A mistura foi filtrada e o volume completado para 40 ml, sendo então guardada no refrigerador sob clorofórmio.

3.2.5 Meio Mínimo líquido mais 4% de Meio Completo (BONATELLI JR., 1981)

A cada 4 ml de Meio Completo líquido adicionou-se 96 ml de Meio Mínimo líquido. Colocou-se 2,5 ml em cada tubo de ensaio que foram autoclavados em seguida.

3.2.6 Solução salina

8,5 g de Cloreto de Sódio foram dissolvidos em 1 litro de água destilada. 9 ml da solução foi colocada em frascos com tampa de baquelite e autoclavados em seguida.

3.2.7 Solução tween

A cada 0,1 ml de Tween 80 adicionou-se 99,9 ml de água destilada. Colocou-se 2,5 ml em tubos de ensaio que em seguida foram autoclavados.

3.2.8 Solução amido 1% em tampão citrato pH 4,0

Pesou-se 1 g de amido solúvel (marca ECIBRA) e dissolveu-se à quente em aproximadamente 40 ml de água destilada. Misturou-se 33 ml de uma solução 0,1 M de ácido cítrico com 17 ml de solução 0,1 M de citrato de sódio x 2H₂O (pH 4,0), adicionou-se então o amido dissolvido e completou-se o volume para 100 ml.

3.2.9 Solução Benlate

4 mg de Benlate (fungicida: Metil-1(butil-carmaboil)-2-Benzimidazol-carbamato) foi dissolvido em 100 ml de acetona p.a., e a solução guardada em frasco escuro.

3.2.10 Solução dextrina limite 1% em tampão citrato pH 4,0

Pesou-se 1 g de dextrina limite* e dissolveu-se à quente em aproximadamente 40 ml de água destilada. Misturou-se 33 ml de solução 0,1 M de ácido cítrico com 17 ml de solução 0,1 M de citrato de sódio x 2H₂O (pH 4,0),

juntou-se à solução de dextrina limite dissolvida anteriormente e completou-se o volume para 100 ml.

3.2.11 Solução de inibidor

22,8 mg do inibidor* (UEDA e KOBA, 1973) foi dissolvida em 100 ml de água destilada esterilizada. A partir desta solução estoque procedeu-se às diluições necessárias para obtenção das concentrações estudadas.

3.2.12 Meio de Fermentação (MAC)

(BONATELLI JR. e col., 1984)

Farinha integral de raspa de mandioca	20,0 g
Nitrato de sódio (NaNO_3)	2,0 g
Fosfato dihidrogenado de potássio (KH_2PO_4)	1,0 g
Sulfato de Magnésio x 7H ₂ O ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Água destilada	1,0 l

O pH foi ajustado para 5,5 com HCl 1N ou NaOH 4%. O meio foi distribuído em frascos erlenmeyers de 125 ml com 25 ml de MAC ou tubos de ensaio com 5 ml de MAC, e então procedeu-se a esterilização. Quando necessários foram acrescentados requisitos nutricionais de acordo com as linhagens auxotróficas em estudo na concentração de 5 µg/ml para as vitaminas e 25 µg/ml para bases nitrogenadas.

3.3 Esterilização e incubação

Todos os meios de cultura e soluções utilizadas neste

gentilmente doados pelo Prof. Seinosuke Ueda da Kyushu University, FUKUOKA, Japão.

trabalho foram esterilizadas em autoclave à 1 atm (120 °C) por 15 minutos.

A incubação foi feita em estufa regulada para 28 °C.

3.4 Avaliação da atividade enzimática

3.4.1 Produção da enzima amiloglicosidase (AG)

A fermentação foi feita em frascos ou tubos em meio MAC (item 3.2.12):

- a) Frascos: Conídios com 7 dias de crescimento em MC ou MM para as colonias diplóides foram suspensos em tween (item 3.2.7) e contados num hematímetro. O ajuste da concentração foi feito com salina (item 3.2.6) para $10E+6$ conídios/ml, e 1 ml desta suspensão foi inoculada em frascos contendo MAC (item 3.2.12).
- b) Tubos: Conídios com 4 a 7 dias de crescimento em MC foram coletados com auxílio de uma alça de níquel-cromo e diretamente inoculados nos tubos contendo MAC (item 3.1.12). Inoculou-se uma "alçada" por tubo.

Os frascos ou tubos foram incubados sem agitação por 96 horas, a menos que seja especificado de outra maneira no item.

Após o tempo de fermentação o meio foi filtrado e guardado no refrigerador (4 °C) quando necessário, por no máximo 7 dias.

3.4.2 Medida da atividade enzimática

O filtrado foi diluído convenientemente: 1:60 para frascos e 1:40 para tubos e 0,5 ml do filtrado diluído foi incubado com 0,5 ml da solução de amido 1% em tampão citrato (item 3.2.8) por 60 minutos em banho maria à 60 °C (condições adaptadas dos trabalhos de PARK E PAPINI, 1970 E BANKS e col., 1976.

Após a incubação as amostras foram retiradas do banho maria e levadas ao banho de água fervente por 3 minutos para inativação da enzima.

Procedeu-se então a medida da quantidade de açúcares redutores liberada após a hidrólise do amido pela amiloglicosidase.

A quantidade de açúcares presente no filtrado após a fermentação foi também estimada e denominada Glicose Residual.

Os açúcares redutores foram medidos pelo método da ortotoluidina, utilizando-se kits para determinação de glicose marca LABTEST ou DOLLES. O espectrofotômetro utilizado foi da marca COLEMAN modelo 295 e as medidas feitas em comprimento de onda de 630 nm ou 625 nm conforme o kit.

A quantidade de açúcares redutores é expressa em mg/100ml e cada 1000mg/100ml corresponde a uma unidade (U) de AG.

Considera-se a quantidade de açúcares redutores medida após hidrólise do amido menos a "Glicose Residual" correspondente, para o cálculo da unidade de enzima.

3.5 Curva de acúmulo de AG da linhagem HAP

Uma curva foi realizada com a linhagem original HAP (item 3.1).

Foram feitas medidas da atividade enzimática (item 3.4) no 2º, 3º, 4º, 5º e 6º dia de fermentação em frascos (item 3.4.1a) com 4 repetições para cada dia.

3.6 Produção de AG de linhagens sem alteração na produção da enzima.

Mutantes auxotróficos e ou morfológicos sem mutação específica para a enzima AG, 5 diplóides e 2 segregantes foram selecionados para uma prévia avaliação da produção de AG.

Conduziu-se a fermentação das linhagens em frascos (item 3.4.1a) com 5 repetições para cada linhagem. As amostras foram filtradas e ensaiadas para produção de AG (item 3.4.2).

3.7 Curva de acúmulo de AG da linhagem mutante nic10lv3 no tempo

O mutante nic10lv3 foi ensaiado para produção de AG, e medidas da atividade enzimática (item 3.4.2) e pH foram feitas do primeiro dia (24 horas) ao sétimo dia (168 horas) de fermentação em frascos (item 3.4.1a). Foram feitas 4

repetições para cada tempo de fermentação.

3.8 Atividade enzimática da linhagem niclolv3 na presença de inibidor específico com dextrina limite ou amido solúvel como substrato

Após a fermentação em frascos (item 3.4.1a) da linhagem niclolv3 por 96 h e 120 h, 1 ml do filtrado foi incubado por 10 minutos à 60 °C com 1 ml de solução de inibidor nas concentrações de 0; 6,84; 11,4; 15,96; e 22,8 µg. Foram feitas 5 repetições da linhagem niclolv3.

De cada tubo tratado com o inibidor foi retirado 0,5 ml e a aliquota retirada incubada com 0,5 ml de solução de amido (item 3.2.8) ou 0,5 ml de dextrina limite (item 3.2.10), este último, substrato mais específico para AG (UEDA, 1980). As medidas da atividade enzimática foram feitas normalmente conforme item 3.4.2.

3.9 Obtenção de mutantes para produção da enzima

3.9.1 Curva de sobrevivência da linhagem niclolv3

Suspensão preparada conforme item 3.4.1a foi irradiada com luz ultravioleta (Mineral light - Multi Band - UV SL.25 da Ultraviolet Products INC., San Gabriel, California) na intensidade de 300 microwatts/cm² no comprimento de onda de 2537 Å nos tempos de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; e 15 minutos, de uma distância de 13 cm da placa contendo a suspensão de conídios até a lâmpada.

Antes da irradiação retirou-se para controle, aliquotas de 1 ml que foram convenientemente diluídas em salina (aprox. 100 conídios/0,1 ml), sendo semeados 0,1 ml por placa em 3 placas de MC e 3 de MM mais nicotinamida.

Após cada um dos tratamentos aliquotas de 1 ml foram retiradas e também convenientemente diluídas em salina (aprox. 100 conídios/0,1 ml) e 0,1 ml da solução semeada em cada uma das 3 placas de MC. As placas foram incubadas e após 3 a 4 dias as colônias foram contadas.

3.9.2 Indução de mutantes para produção da enzima

As suspensões de conídios da linhagem niclolv3 preparadas conforme o item 3.4.1a foram irradiadas com luz ultravioleta por 10 min.

Após a semeadura em 30 placas de MC e incubação por 3 a 4 dias foram isoladas 268 colônias e feito o teste para a produção de enzima em tubos (item 3.4.1b), juntamente com 32 repetições da linhagem original niclolv3.

3.9.3 Teste em frascos das colônias selecionadas em tubos

As colônias que apresentaram pelo menos uma unidade acima da média da produção da linhagem niclolv3 (controle) e com produção quase nula de AG foram retestadas quanto sua marca auxotrófica. Confirmada sua deficiência para ácido nicotínico procedeu-se os testes em frascos.

A produção da enzima e a medida da atividade enzimática foram feitas conforme itens 3.4.1a e 3.4.2.

Utilizou-se 4 ou 5 repetições de cada possível mutante e 4 ou 5 repetições da nic10lv3 dependendo de cada experimento.

3.10 Obtenção de diplóides

3.10.1 Isolamento de diplóides

Os diplóides foram sintetizados pelo método de Roper (1952) modificado.

Foram feitas suspensões de conídios de cada uma das linhagens selecionadas para cruzamento em tubos de MM + 4% de MC líquido (item 3.2.5). Misturadas as duas suspensões de conídios estas foram incubadas por 7 dias. As películas desenvolvidas foram cortadas em 4 partes com auxílio da alça de níquel-cromo e transferidas para placas contendo MM.

Estas películas se desenvolviam durante 7 dias evidenciando o heterocário e, os conídios deste após coletados em tween foram diluídos em solução salina (1:10) e semeados em MM, para isolamento dos possíveis diplóides.

As colônias isoladas, crescidas em MM, foram purificadas através de estrias novamente em MM e caracterizadas.

3.10.2 Caracterização dos diplóides

Os critérios para caracterização dos diplóides foram os seguintes:

1. Prototrofia: cruzando-se linhagens com marcas auxotróficas diferentes espera-se a complementação das marcas, obtendo-se assim colônias que crescem em MM.
2. Coloração de conídios: se as linhagens envolvidas no cruzamento apresentavam coloração de conídios diferentes espera-se uma colônia de coloração selvagem (preta).
3. Diâmetro de conídios: o diâmetro de conídios das linhagens parentais e dos possíveis diplóides com 5 dias de crescimento em MM ou, quando necessário, MM mais requisitos nutricionais foi medido com uma objetiva micrométrica (PONTECORVO e col., 1953a) em montagem em lâmina com lisol. Foram feitas no mínimo 15 medidas de cada linhagem. Espera-se que o diâmetro dos conídios das linhagens diplóides sejam maiores que o das haplóides parentais (BONATELLI JR. e col., 1983)
4. Teste com Benlate (HASTIE, 1970 , UPSHALL e col., 1976): os possíveis diplóides eram inoculados por ponto em placas de Meio Completo contendo de 0,7 a 1,0 $\mu\text{g/ml}$ de Benlate (item 3.2.9). O controle era feito em MC sem Benlate. Os diplóides devem formar setores e apresentar crescimento reduzido em relação às parentais haplóides no meio de cultura com Benlate.

3.10.3 Manutenção dos diplóides

Todos os diplóides foram mantidos em tubos de Meio Mínimo inclinado que após 7 dias de crescimento foram guardados no refrigerador.

3.11 Obtenção de segregantes

3.11.1 Isolamento de segregantes

Os segregantes foram obtidos inoculando-se os diplóides por ponto em placas de MC ou MM mais requisito nutricional, mais Benlate (item 3.2.9) na concentração de 0,7 a 1,0 µg/ml. Após a incubação de 5 a 6 dias os setores que apareceram nas colônias diplóides foram purificados por estrias em placas de MC e estocados em MC inclinado.

3.11.2 Caracterização dos segregantes

Os segregantes foram classificados quanto a coloração dos conídios, auxotrofia e produção de AG.

3.12 Mapeamento dos genes que alteram a produção

O método a seguir foi descrito por MACDONALD e col. (1972) e utilizado para mapeamento, via ciclo parassexual, de mutações que afetavam a produção de penicilina em A. nidulans, tendo sido já utilizado também por MACDONALD (1972).

Se um alelo mutante específico da linhagem testadora segrega independentemente da marca de produção baixa "lap" então a média da produção de AG dos segregantes com o alelo

mutante da linhagem testadora devem ser similares a média da produção de AG dos segregantes com o alelo selvagem, a não ser que o alelo mutante da linhagem testadora afete a produção de AG. Isso ocorre porque metade dos segregantes com o alelo mutante da linhagem testadora devem carregar a marca lap e a outra metade o alelo selvagem. Similarmente metade dos segregantes com o alelo selvagem da linhagem testadora devem carregar o lap e a outra metade não.

Por outro lado quando o alelo mutante da linhagem testadora está localizado no homólogo do cromossomo que carrega lap, a média de produção de AG dos segregantes com o alelo mutante da linhagem testadora deve diferir da média da produção de AG daqueles com o alelo selvagem.

Para comparação das médias de produção de AG utilizamos um teste não paramétrico denominado prova de KRUSKAL-WALLIS (item 3.13.2).

3.13 Análises estatísticas

3.13.1 Análise de variância e teste de médias (Tukey).

Foram feitos baseados em PIMENTEL GOMES (1966).

3.13.2 Prova de Kolmogorov-Smirnov e Prova de Kruskal-Wallis.

Foram feitas segundo SIEGEL (1975).

4.0 RESULTADOS

4.1 Curva de acúmulo de AG da linhagem HAP

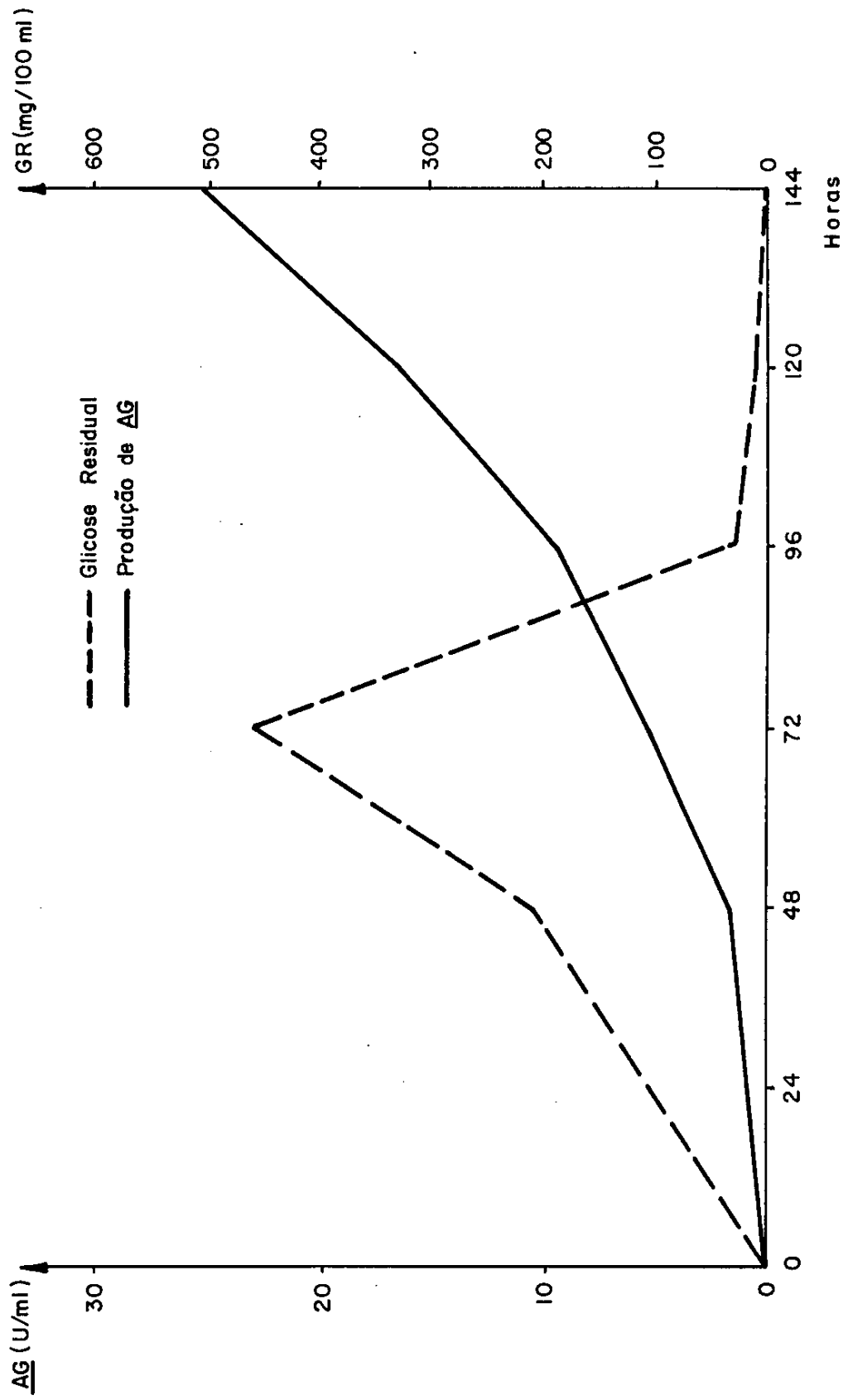
Os resultados obtidos das medidas da produção de AG conforme descrito no item 3.6 estão na TABELA 1 e FIGURA 1.

A produção de AG chegou até a 25,3 U/ml no sexto dia. Do terceiro para o quarto dia ocorreu uma acentuada redução da "Glicose Residual", de 460 mg/100 ml para 30 mg/100 ml, no meio da fase exponencial de acúmulo da enzima.

TABELA 1 - CURVA DE ACÚMULO DE AG DA LINHAGEM HAP

HORAS	U <u>AG</u> /ml	Glicose Residual (mg/100ml)
48	1,8	210
72	5,3	460
96	9,5	30
120	16,4	10
144	25,3	0

FIGURA 1 – Curva de Acúmulo de AG da Linhagem HAP



4.2 Produção de AG de linhagens e diplóides de A. niger

A produção das linhagens determinada de acordo com o item 3.6, está resumida na TABELA 2, a análise de variância na TABELA 3 e o teste de médias na TABELA 4.

Analisando a Tabela 4 observamos que a maioria dos mutantes não diferiram da linhagem original HAP, somente os mutantes pdx1olv1 e pur1 tiveram produção significativamente menor.

Quanto aos diplóides, o nic1//pablfwn1 apresentou produção maior que a linhagem HAP e, o diplóide pdx1olv1//pur1 recuperou a produção em relação aos parentais (pur1 e pdx1olv1) o mesmo ocorrendo com o diplóide th1lfwn3//pablfwn2. Já o diplóide pdx1olv1//pablfwn1 teve sua produção igual aos parentais (pdx1olv1 e pablfwn1) e significativamente menor que a linhagem HAP.

TABELA 2 - PRODUÇÃO DE AG DE VÁRIAS LINHAGENS E DIPLÓIDES DE A. niger

LINHAGENS	REPETIÇÕES (U/ML)			
	I	II	III	IV
<u>nic1</u> // <u>pab1fwn1</u>	13,78	16,67	11,56	14,70
<u>pdx1olv1</u> // <u>pur1</u>	13,28	11,13	12,42	13,78
<u>nic1</u>	12,68	11,02	11,82	11,45
<u>thilfwn3</u> // <u>pab1fwn2</u>	12,85	12,42	12,42	8,73
<u>nic1fwn4</u>	11,02	11,65	12,25	11,82
S32 *	11,02	10,65	12,19	11,45
S04 **	11,02	10,28	9,91	10,28
HAP	9,53	10,32	10,32	9,90
<u>thilfwn3</u> // <u>pdx1olv1</u>	10,33	10,70	12,40	6,52
<u>thilpdx3olv2</u>	10,65	9,53	9,53	9,16
<u>thilfwn3</u>	8,37	8,01	8,37	8,01
<u>pdx1</u>	7,64	6,90	8,01	7,64
<u>pab1fwn1</u>	7,64	7,27	6,90	8,01
<u>nic1olv3</u>	7,40	7,78	6,76	7,40
<u>pdx1olv1</u>	6,21	6,21	5,90	6,21
<u>pdx1olv1</u> // <u>pab1fwn1</u>	6,21	4,82	4,49	5,17
6 ***	3,57	3,57	3,57	3,26
<u>pur1</u>	0,73	1,32	0,64	1,12

* S32- setor pab-nic- do cruzamento nic1//pab1fwn1

** S04- setor pdx-fwn- do cruzamento pdx1olv1//pur1

*** 6 - Linhagem haplóide tipo AS do cruzamento thilfwn3//pdx1olv1

TABELA 3 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA 2

TESTE DE F

CAUSA DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
Tratamento	17	788,235	46,367	42,482**
Resíduo	54	58,938	1,091	
Total	71	847,173		

** significativo à 1%

TABELA 4 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DAS LINHAGENS DA TABELA 2

LINHAGEM	MÉDIA (U/ML)	
<u>nic1</u> // <u>pablfwn1</u>	14,18	a**
<u>pdx1olvl1</u> // <u>pur1</u>	12,65	a b
<u>nic1</u>	11,74	a b c
<u>th1lfwn3</u> // <u>pablfwn2</u>	11,61	a b c d
<u>nic1fwn4</u>	11,44	b c d e
S32*	11,34	b c d e f
S04*	10,37	b c d e f g
HAP	10,02	b c d e f g h
<u>th1lfwn3</u> // <u>pdx1olvl1</u>	9,99	b c d e f g h i
<u>th1lpdx3olvl2</u>	9,72	c d e f g h i j
<u>th1lfwn3</u>	8,19	g h i j k
<u>pdx1</u>	7,55	h i j k l
<u>pablfwn1</u>	7,45	h i j k l m
<u>nic1olvl3</u>	7,34	h i j k l m n
<u>pdx1olvl1</u>	6,13	k l m n o
<u>pdx1olvl1</u> <u>pablfwn1</u>	5,01	l m n o p
6*	3,49	o p q
<u>pur1</u>	0,95	q

DMS à 5% = 2,69

* - para símbolos das linhagens ver TABELA 2.

** Linhagens com a mesma letra não diferem significativamente à nível de 5% pelo teste de Tukey.

4.3 Curva de acúmulo de AG da linhagem niclolv3

A linhagem niclolv3 foi escolhida para ser irradiada visando a obtenção de mutantes para enzima (item 4.5) por sua produção não diferir significativamente da linhagem HAP (Tabela 4) e por ela já apresentar duas marcas genéticas (nicl e olv3).

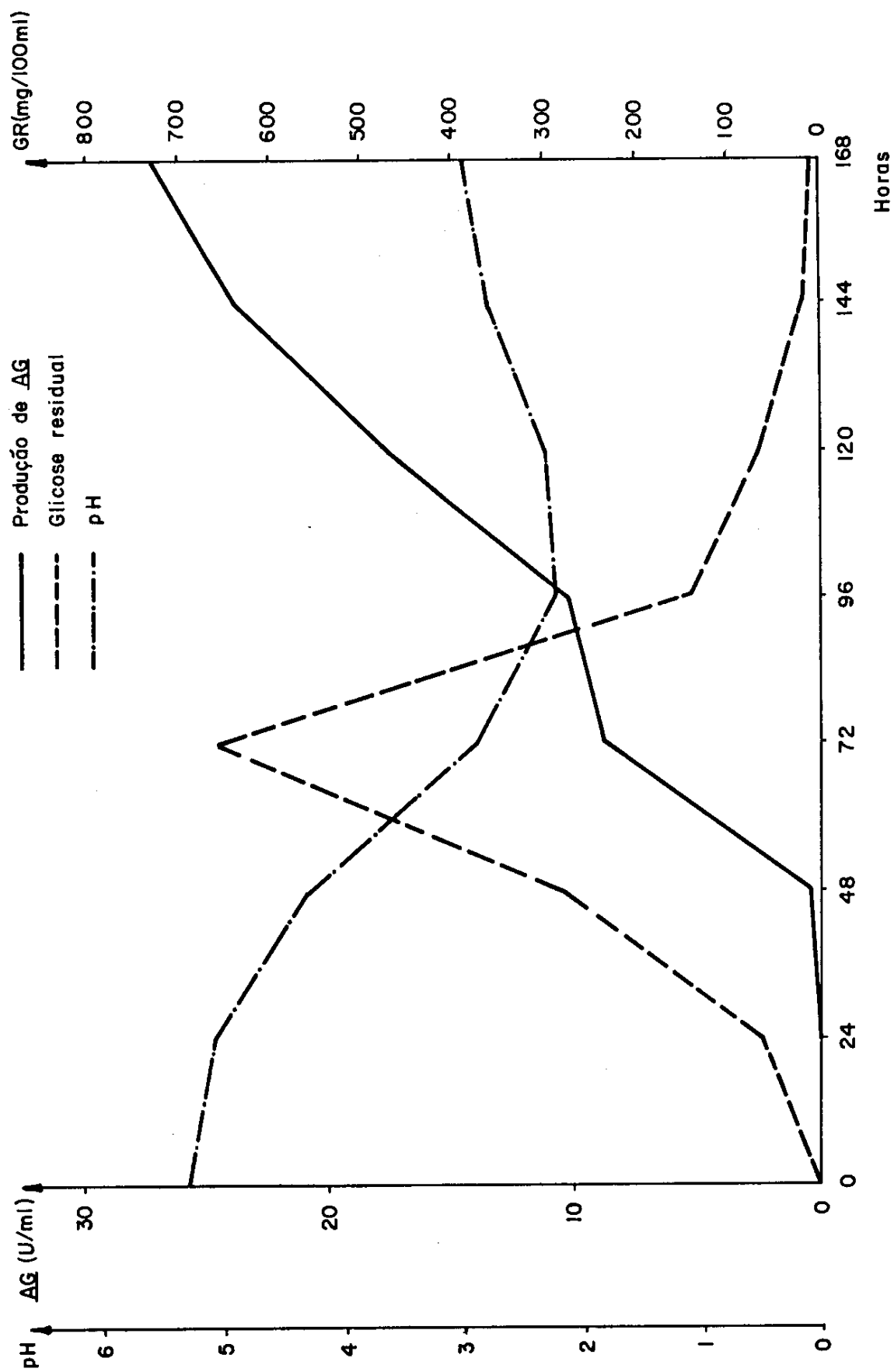
Os dados da curva realizada encontram-se na TABELA 5 e FIGURA 2. Pela curva vemos um platô com 7 dias com 24,7 U/ml de produção de AG. A "Glicose Residual" teve seu pico com 72 horas (660,2 mg/100 ml), decrescendo para 138,4 mg/100 ml com 96 horas, coincidindo com a metade da fase exponencial de acúmulo de AG, que atinge 10,12 U/ml com 96 horas.

O pH inicial de 5,5 caiu gradativamente até 2,3 com 96 horas e atingiu 3,1 no último dia de fermentação.

TABELA 5 - CURVA DE ACÚMULO DE AG DA LINHAGEM nic101v3

HORAS	U <u>AG</u> /ml	Glicose Residual (mg/100ml)	pH
0	0,00	0,0	5,5
24	0,00	66,7	5,3
48	0,44	281,7	4,5
72	8,76	660,2	3,0
96	10,12	138,4	2,3
120	17,45	67,3	2,4
144	23,63	16,9	2,9
168	24,68	10,7	3,1

FIGURA 2 – Curva de Acúmulo de AG da Linhagem Nic₁olv₃



4.4 Atividade de AG da linhagem nic10lv3 na presença de inibidor específico com dextrina-limite ou amido como substrato.

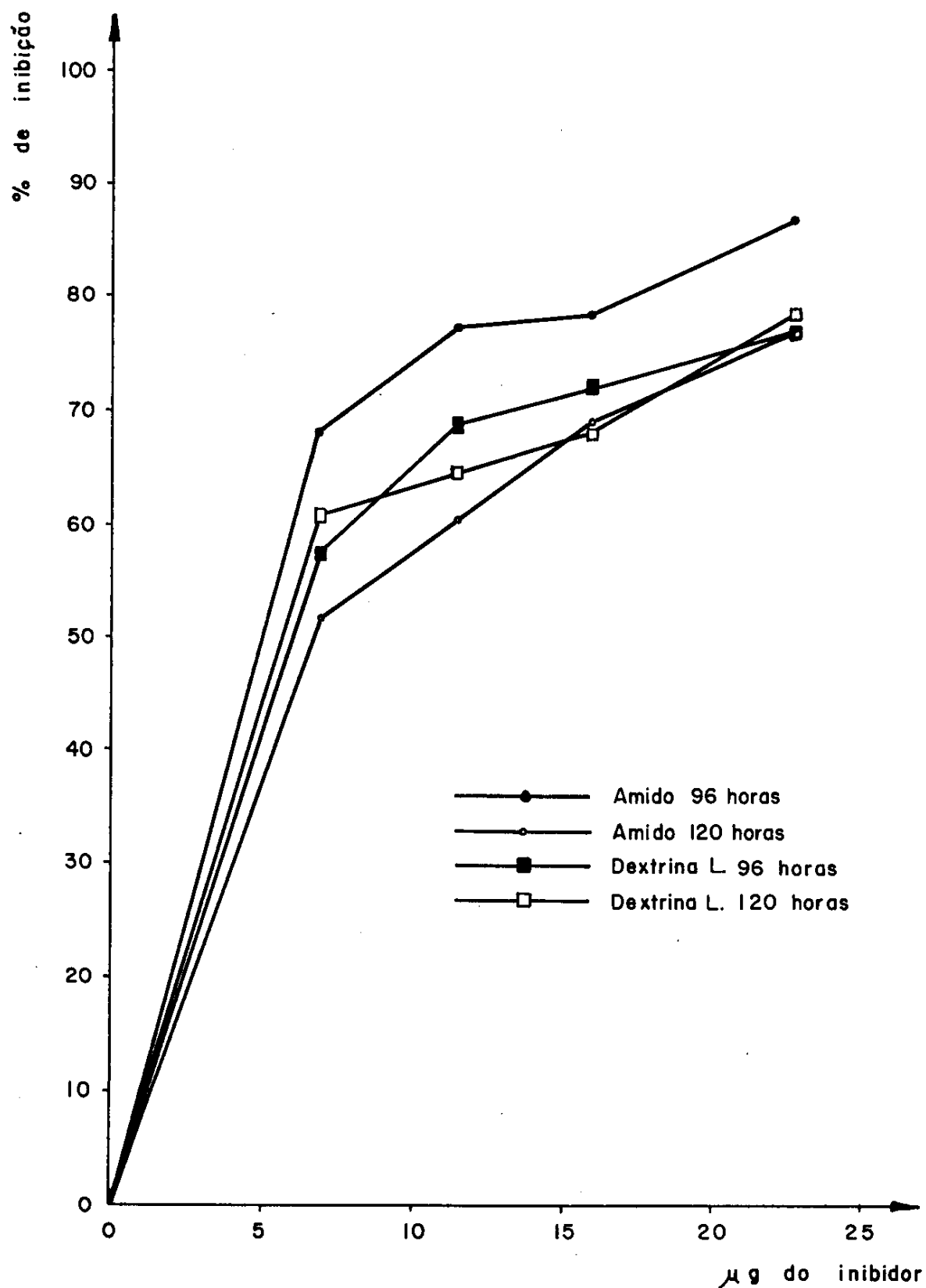
As medidas de AG foram feitas conforme o item 3.8 e as porcentagens de inibição estão na TABELA 6 e FIGURA 3.

Não foi observada variação significativa da porcentagem de inibição entre os tempos de fermentação e o máximo de inibição foi de 86,6% em amido e 78,2% em dextrina limite.

TABELA 6 - ATIVIDADE DE AG DA LINHAGEM niclolv3 NA PRESENÇA DO INIBIDOR COM DEXTRINA LIMITE OU AMIDO COMO SUBSTRATO

CONCENTRAÇÃO DO INIBIDOR (ug)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO							
	96H				120H			
	AMIDO		DEXTRINA L.		AMIDO		DEXTRINA L.	
	AG U/ml	% de inib.	AG U/ml	% de inib.	AG U/ml	% de inib.	AG U/ml	% de inib.
0,00	4,57	-	3,86	-	8,98	-	9,71	-
6,84	1,45	68,3	1,65	57,3	4,37	51,4	3,80	60,
11,40	1,04	77,2	1,21	68,7	3,57	60,3	3,46	64,
15,96	1,00	78,1	1,09	71,8	2,82	68,6	3,13	67,
22,80	0,61	86,6	0,89	76,9	2,11	76,5	2,12	78,

FIGURA 3 — Porcentagem de Inibição da Atividade da Amiloglucosidade em Várias Concentrações do Inibidor.



4.5 Obtenção de mutantes para produção de AG

4.5.1 Curva de sobrevivência da linhagem nic1olv3

A curva de sobrevivência foi realizada conforme metodologia descrita no item 3.9.1. Os dados estão na TABELA 7.

A porcentagem de germinação foi de 17,5% em meio completo sem tratamento com mutagênico. Não houve diferença na porcentagem de germinação em meio completo e em meio mínimo mais nicotinamida.

TABELA 7 - CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DA LINHAGEM nic1olv3
À LUZ ULTRAVIOLETA

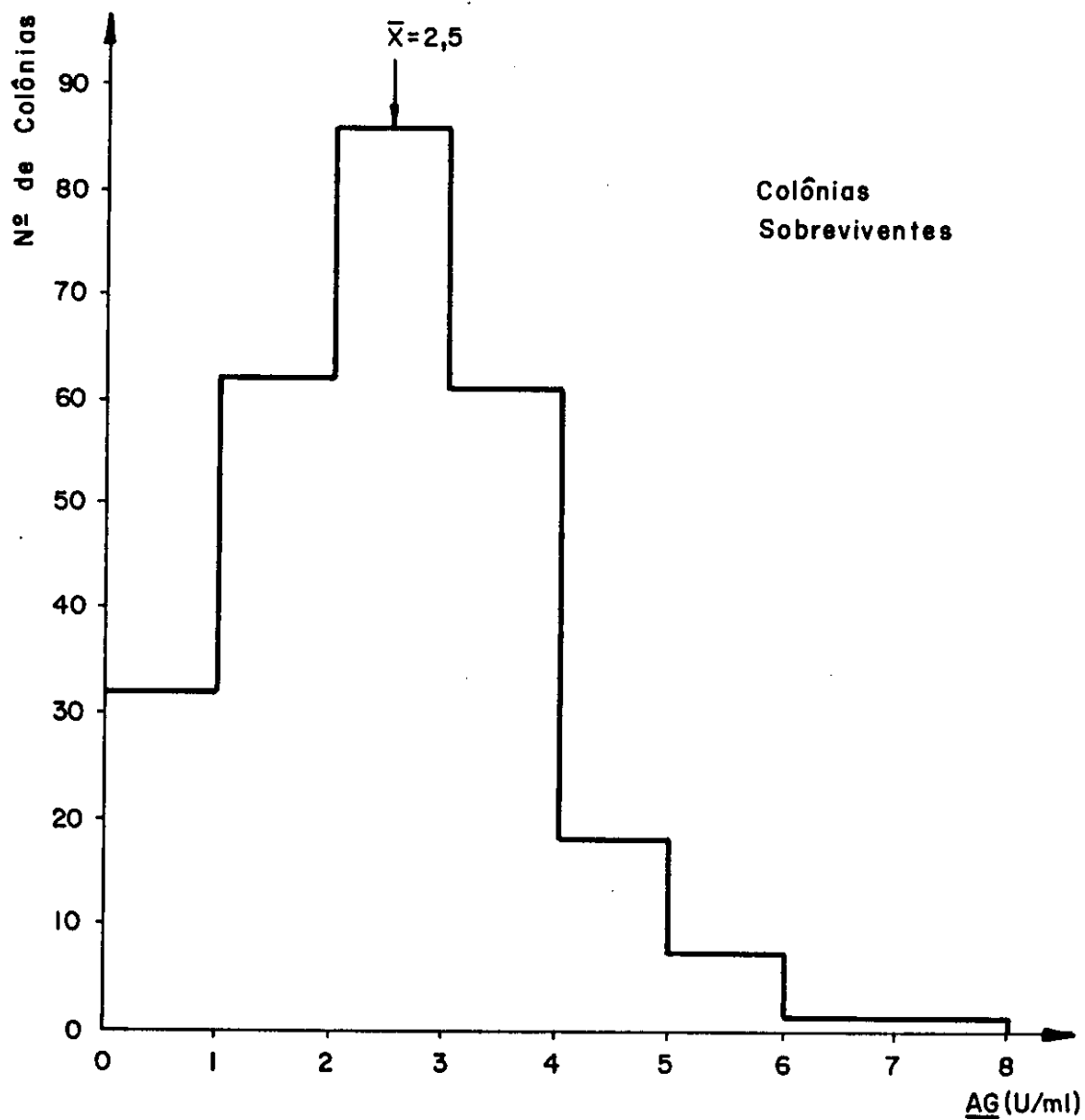
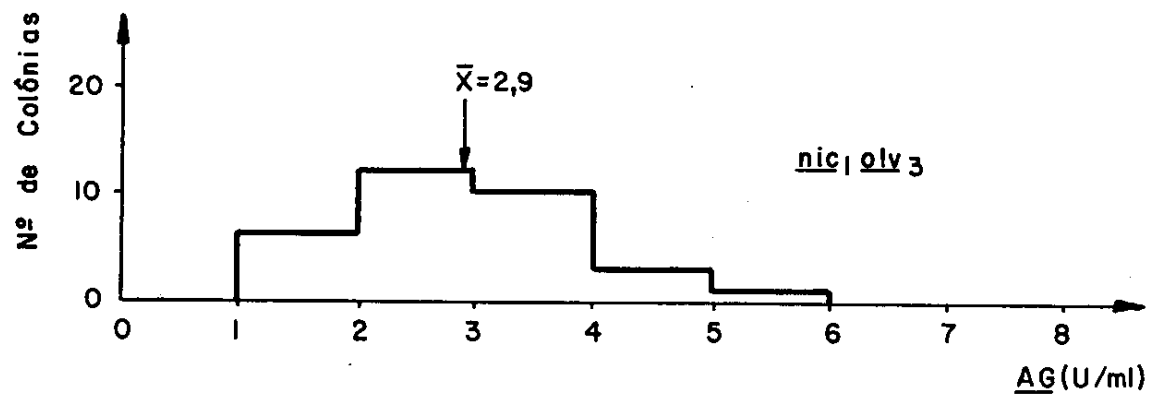
TEMPO DE TRATAMENTO (EM MINUTOS)	MÉDIA DO Nº DE COLÔNIAS x 100	% SOBREVIVÊNCIA
0 (MC)	35,00	100,00
0 (MM + <u>nic</u>)	36,00	100,00
2,5	26,30	75,10
5,0	17,79	50,60
7,5	4,10	11,70
10,0	1,17	3,34
12,5	0,80	2,34
15,0	0,21	0,63

4.5.2 Indução de mutantes para produção de AG e teste em tubos.

Os colônias foram obtidas e testadas conforme metodologia descrita no item 3.9.2.

Na FIGURA 4 vemos a distribuição das 268 colônias ensaiadas juntamente com a distribuição das 32 repetições da niclolv3. A média geral das colônias testadas foi de 2,5 U/ml e a média obtida para as 32 repetições da niclolv3 foi 2,9 U/ml.

FIGURA 4 — Distribuição da Produção de AG das Colônias Testadas em Tubos de Ensaio Comparadas com a Parental.



4.5.3 Teste em frascos das colônias selecionadas em tubos.

As colônias selecionadas pelo critério descrito no item 3.9.3 foram testadas em frascos.

As análises de variância e testes de médias realizados com estas colônias encontram-se no Apêndice de Tabelas (tabelas A1 até A12). Os mutantes obtidos encontram-se na TABELA 8 que mostra a média da produção de AG de cada uma delas e a distribuição das repetições realizadas.

TABELA 8 - PRODUÇÃO MÉDIA DE AG EM U/ml DOS MUTANTES SELECIONADOS E A DISTRIBUIÇÃO DAS RÉPETIÇÕES EM CLASSES DE 1 UNIDADE DE AG

LINHAGEM	MÉDIA U/ml	0 I I	5 I I	10 I I	15 I I	20 I I	25 I I
<u>nic1ol1v3</u>	11,3			. 2.3.1.6.4.	. 3.3.1.1.		
<u>pab1fwn1</u>	14,4			. 1. . 4.4.4.	. 1.2.1.	. . . 1.	 1
<u>map3</u>	7,0		. 1.1.3.				
<u>map100</u>	5,9	 1.	. 4.2.2.				
<u>map111</u>	6,5	 1.	. 1.1.1.	. 1.			
<u>map166</u>	7,2		. 3.4.2.				
<u>map199</u>	6,1	 1.	. 1.2. . 1				
<u>lap33</u>	0,0	. 5.					
<u>lap38</u>	2,0	. 3.1.8.1					
<u>lap61</u>	0,3	10.					
<u>lap73</u>	1,5	. 5.6. . 4.					

Os mutantes lap (low amyloglucosidase production) apresentam entre 0 a 18% da produção de AG da linhagem parental.

Os mutantes map (medium amyloglucosidase production) apresentam 52 a 65% da produção de AG da linhagem parental.

Os mutantes lap 33, 38 e 73 (que correspondem às colônias 33, 38 e 73) e os map 3, 100, 111, 166 e 199 (que correspondem às colônias 3, 100, 111, 166 e 199) derivam da linhagem niclolv3 e o mutante lap61 (colônia 61) deriva da linhagem pablfwnl. Dentre os mutantes obtidos apenas o lap38 mostrou alterações morfológicas e, concomitantemente, problemas de crescimento e esporulação. A colônia no 3, apesar de se mostrar como mutante de baixa produção no primeiro teste (TABELA A1 à A3), posteriormente foi retestada, sendo um mutante de média produção (map3) (TABELAS A10 à A12).

Algumas colônias testadas em frascos, apesar da diferença de produção apresentada em tubos, não foram significativamente diferentes da niclolv3 (TABELAS A3, A6 E A9).

4.6 Obtenção de diplóides e sua produção de AG

4.6.1 Obtenção e caracterização de diplóides

Alguns mutantes, lap38, 73 e 61 e map3, 100 e 166 foram escolhidos para cruzamento com linhagens de produção normal e no caso dos mutantes lap, foram realizados cruzamentos entre eles.

Os diplóides obtidos foram caracterizados segundo metodologia descrita no item 3.10 e estão relacionados na TABELA 9. Na TABELA 10 estão as siglas utilizadas para os diplóides.

TABELA 9 - CARACTERIZAÇÃO DOS DIPLÓIDES

LINHAGENS HAPLÓIDES	COLORAÇÃO DE CONÍDIOS	SEGREGAÇÃO EM BENLATE*	DIÂMETRO DE CONÍDIOS(um)*	RELAÇÃO 2n/PARENTAIS		
1. <u>pab1fwn1</u>	marron claro	-	3,97			
2. <u>nic1ol1v3</u>	verde oliva	-	4,40			
3. <u>lap73</u>	verde oliva	-	4,24			
4. <u>lap38</u>	verde oliva	-	4,05			
5. <u>map3</u>	verde oliva	-	3,93			
6. <u>map100</u>	verde oliva	-	4,09			
7. <u>map166</u>	verde oliva	-	4,24			
8. <u>lap61</u>	marron claro	-	4,15			
CRUZAMENTOS				primeira parental	segunda parental	
1 x 2 **	preta	+	5,31	1,34	-	1,21
3 x 1	preta	+	4,92	1,16	-	1,24
4 x 1	preta	+	4,68	1,16	-	1,18
5 x 1	preta	+	5,28	1,34	-	1,33
6 x 1	preta	+	4,80	1,17	-	1,21
7 x 1	preta	+	5,08	1,20	-	1,28
8 x 2	preta	+	5,55	1,34	-	1,26
3 x 8	preta	+	5,35	1,26	-	1,29
4 x 8	preta	+	5,35	1,32	-	1,29

* para condições ver item 3.10.2

** para símbolo dos diplóides ver TABELA 10.

TABELA 10 - SÍMBOLOS DOS DIPLÓIDES

CRUZAMENTOS	SÍMBOLO DO DIPLÓIDE
1 x 2	<u>pablfwn1</u> // <u>niclolv3</u>
3 x 1	<u>lap73</u> // <u>pablfwn1</u>
4 x 1	<u>lap38</u> // <u>pablfwn1</u>
5 x 1	<u>map3</u> // <u>pablfwn1</u>
6 x 1	<u>map100</u> // <u>pablfwn1</u>
7 x 1	<u>map166</u> // <u>pablfwn1</u>
8 x 2	<u>lap61</u> // <u>niclolv3</u>
3 x 8	<u>lap73</u> // <u>lap61</u>
4 x 8	<u>lap38</u> // <u>lap61</u>

4.6.2 Produção de AG dos diplóides

Na TABELA 11 vemos a produção de AG dos diplóides. Para comparação com os mutantes envolvidos no cruzamento e com os parentais ver TABELA 8.

As análises de variância e testes de médias realizados encontram-se no Apêndice de Tabelas (A10 até A18). Todos os mutantes mostraram-se recessivos pois, quando cruzados com as linhagens de produção normal, a produção dos diplóides foi semelhante à das linhagens parentais respectivas. O cruzamento dos mutantes lap38 e lap73 com o lap61 foi possível devido às marcas auxotróficas e morfológicas complementares e, os diplóides entre eles também tiveram produção normal.

TABELA 11 - PRODUÇÃO MÉDIA DE AG EM U/ML DOS DIPLÓIDES E A DISTRIBUIÇÃO DAS REPETIÇÕES EM CLASSES DE 1 UNIDADE DE AG

[illegible]

4.7 Obtenção de segregantes e sua produção de AG.

4.7.1 Diplóide map3//pab1fwn1

Os 52 segregantes obtidos através da metodologia descrita no item 3.11 foram testados quanto à produção de AG em tubos segundo a metodologia descrita no item 3.4, juntamente com 15 repetições da linhagem parental map3 e 15 repetições da pab1fwn1.

A TABELA 12 mostra as marcas auxotróficas e morfológicas dos segregantes e sua produção de AG em U/ml. A TABELA 13 mostra a produção de AG dos parentais do cruzamento.

Através dos dados da TABELA 12, foi feita uma análise mitótica (TABELA 14) mostrando que os genes olv, nic e fwn devem estar no mesmo grupo de ligação.

A FIGURA 5 mostra um histograma com a distribuição da produção de AG dos segregantes e 15 repetições de cada linhagem parental e o Teste de Kolmogorov e Smirnov realizado (TABELA 15) confirma que a linhagem map3 e a pab1fwn1 diferem significativamente entre si e mostra que os segregantes são significativamente diferentes tanto de map3 como de pab1fwn1, mas quando as repetições de map3 são somadas com as de pab1fwn1 a soma não difere da população de segregantes.

TABELA 12 - MARCAS AUXOTRÓFICAS E MORFOLÓGICAS E PRODUÇÃO DE AG
DOS SEGREGANTES DO DIPLÓIDE map3//pab1fwn1

Segre- gante	<u>pab</u>	<u>nic</u>	<u>cor</u>	U AG/ml	segre- gante	<u>pab</u>	<u>nic</u>	<u>cor</u>	U AG/ml
1	+	+	<u>fwn</u>	3,25	27	-	+	<u>fwn</u>	3,03
2	-	+	<u>fwn</u>	2,74	28	+	+	<u>fwn</u>	3,38
3	-	+	<u>fwn</u>	3,60	29	-	+	<u>fwn</u>	3,69
4	-	+	<u>fwn</u>	1,85	30	+	+	<u>fwn</u>	2,25
5	-	+	<u>fwn</u>	0,88	31	-	+	<u>fwn</u>	2,99
6	-	+	<u>fwn</u>	2,39	32	+	+	<u>fwn</u>	4,25
7	-	+	<u>fwn</u>	2,10	33	+	+	<u>fwn</u>	2,47
8	-	+	<u>fwn</u>	4,15	34	+	+	<u>fwn</u>	3,94
9	+	+	<u>fwn</u>	3,80	36	+	+	<u>fwn</u>	3,61
10	-	+	<u>fwn</u>	4,77	37	-	+	<u>fwn</u>	2,76
11	-	+	<u>fwn</u>	2,57	38	+	+	<u>fwn</u>	3,41
12	-	+	<u>fwn</u>	3,73	40	+	+	<u>fwn</u>	2,83
13	-	+	<u>fwn</u>	1,66	42	+	+	<u>fwn</u>	2,56
14	-	+	<u>fwn</u>	2,58	44	+	+	<u>fwn</u>	3,07
15	+	+	<u>fwn</u>	3,87	45	+	+	<u>fwn</u>	2,60
16	+	+	<u>fwn</u>	3,89	46	+	+	<u>fwn</u>	3,41
17	-	-	<u>olv</u>	4,55	48	-	+	<u>fwn</u>	3,59
18	-	+	<u>fwn</u>	3,07	49	-	+	<u>fwn</u>	6,86
19	-	-	<u>olv</u>	9,36	50	-	+	<u>fwn</u>	3,94
20	-	+	<u>fwn</u>	7,05	51	+	+	<u>fwn</u>	3,46
21	-	+	<u>fwn</u>	3,85	52	-	+	<u>fwn</u>	3,68
22	-	+	<u>fwn</u>	3,85	53	-	+	<u>fwn</u>	3,44
23	-	+	<u>fwn</u>	3,07	58	+	+	<u>fwn</u>	2,27
24	-	+	<u>fwn</u>	3,48	59	-	+	<u>fwn</u>	2,14
25	-	+	<u>fwn</u>	4,21	60	+	+	<u>fwn</u>	3,72
26	-	+	<u>fwn</u>	2,42	61	+	-	<u>olv</u>	0,50

TABELA 13 - PRODUÇÃO DE AG EM U/ML DOS PARENTAIS
DOS SEGREGANTES DA TABELA 12

REPETIÇÕES	map3	pabl fwnl
1	1,68	4,44
2	1,98	3,47
3	1,33	5,80
4	1,07	4,04
5	3,19	4,09
6	1,12	1,24
7	3,80	5,30
8	1,37	4,11
9	4,24	4,69
10	2,00	2,89
11	0,97	3,80
12	2,43	4,41
13	1,30	4,22
14	1,51	3,23
15	1,07	3,86

FIGURA 5 – Distribuição da Produção de AG dos Segregantes e Parentais do Diplóide map3// pab₁ fwn₁

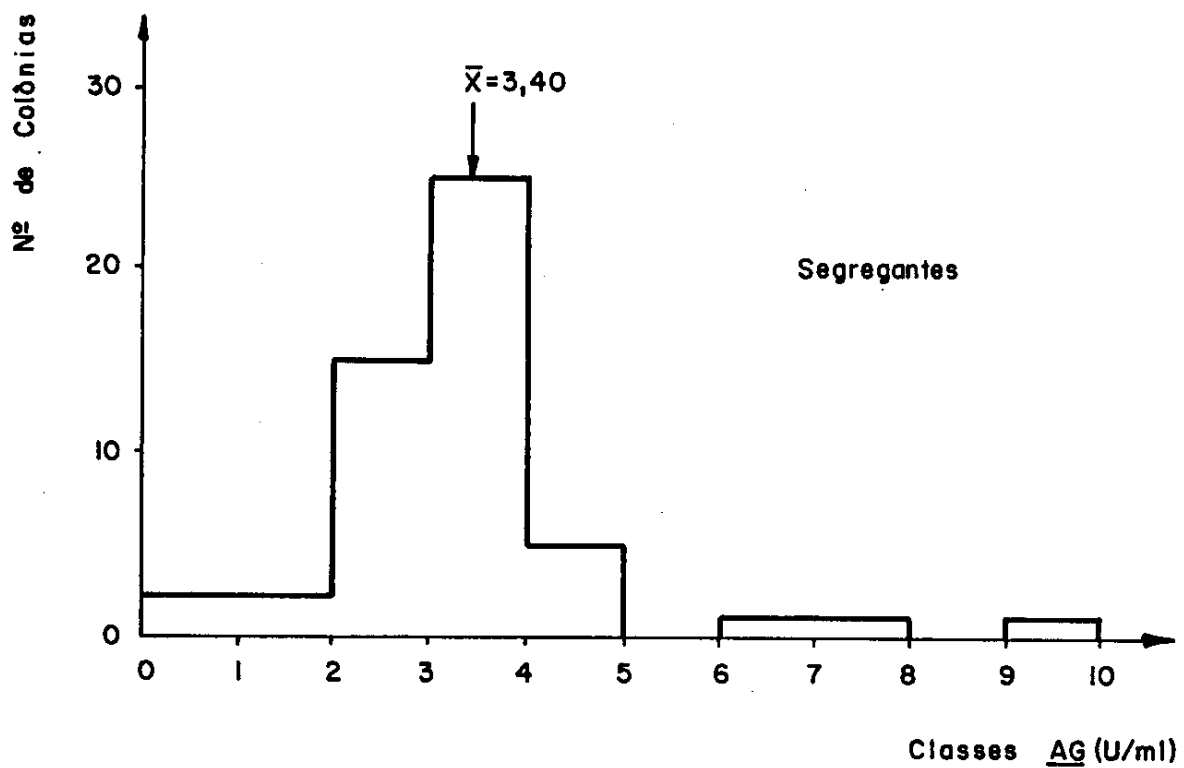
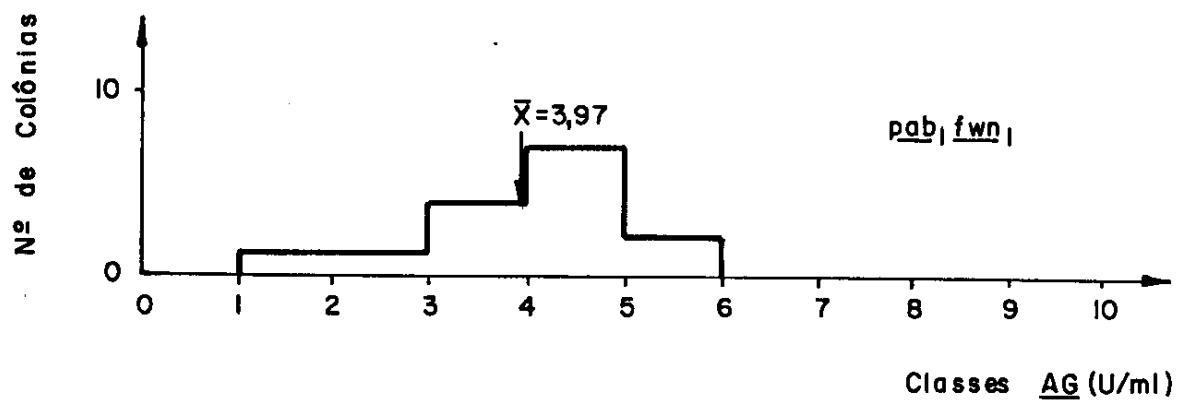
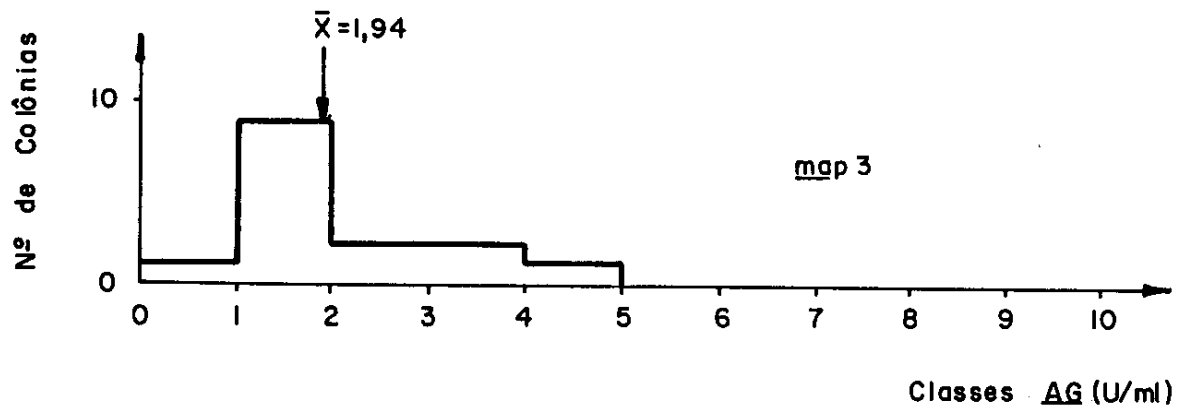


TABELA 14 - ANÁLISE MITÓTICA DO DIPLÓIDE map3//pab1fwn1

Parentais: map3 = pab+ nic- fwn+ olv- map-
pab1fwn1 = pab- nic+ fwn- olv+ map+

	<u>nic+</u>	<u>nic-</u>
<u>pab+</u>	19	1
<u>pab-</u>	30	2

	<u>fwn+</u>	<u>fwn-</u>
<u>pab+</u>	1	19
<u>pab-</u>	2	30

	<u>olv-</u>	<u>olv+</u>
<u>nic+</u>	0	49
<u>nic-</u>	3	0

Total de segregantes= 52

TABELA 15 - TESTE DE KOLMOGOROV E SMIRNOV PARA OS SEGREGANTES DO DIPLÓIDE map3// pab1fwn1

LINHAGENS	<u>map3</u>	Segregantes
<u>map3</u>	-	0,3986 (D5%) < 0,5898*
<u>pab1fwn1</u>	0,4966 (D5%) < 0,6667*	0,3986 (D5%) < 0,4461*
<u>map3</u> + <u>pab1fwn1</u>	-	0,3118 (D5%) > 0,2898ns

* - significativo à 5%

ns - não significativo.

4.7.2 Diplóide lap61//nic1olv3

Dos 50 segregantes obtidos através da metodologia do item 3.11, 49 foram testados quanto a produção de AG em tubos (item 3.4) juntamente com 15 repetições de cada linhagem parental, lap61 e nic1olv3.

A TABELA 16 resume as marcas auxotróficas e morfológicas dos 50 segregantes obtidos e a produção de AG em U/ml dos segregantes analisados. A TABELA 17 mostra a produção de AG dos parentais do cruzamento.

Foi feita uma análise mitótica (TABELA 18) envolvendo tanto marcas auxotróficas e morfológicas, mostrando novamente a ligação entre fwn, nic e olv, como também envolvendo as marcas lap+/lap-, que condicionam produção normal e produção baixa de AG respectivamente.

A FIGURA 6 apresenta um histograma mostrando a distribuição da produção de AG dos segregantes e das linhagens parentais e na TABELA 19 o teste de Kolmogorov e Smirnov realizado confirmando a diferença entre a produção de AG da lap61 (baixa) e da nic1olv3 (normal) e mostrando que a população de segregantes difere quanto à produção de AG tanto do parental lap61 como da nic1olv3, porém é semelhante a soma das 15 repetições de cada uma das parentais.

Na TABELA 20, observamos que a média de produção de AG dos segregantes pab- difere significativamente da média dos segregantes pab+, indicando que a marca lap61 pode estar localizada no grupo de ligação que contém o gene pab.

TABELA 16 - MARCAS AUXOTRÓFICAS E MORFOLÓGICAS E PRODUÇÃO DE AG
DOS SEGREGANTES DO DIPLÓIDE lap61//nic1olv3

Segre- gante	<u>pab</u>	<u>nic</u>	<u>cor</u>	<u>lap</u>	U AG/ml	Segre- gante	<u>pab</u>	<u>nic</u>	<u>cor</u>	<u>lap</u>	U AG/ml
1	+	+	<u>fwn</u>	-	0,84	26	+	+	<u>fwn</u>	+	8,09
2	+	+	<u>fwn</u>	+	6,93	27	-	-	<u>olv</u>	+	1,46
3	-	+	<u>fwn</u>	-	0,82	28	+	+	<u>olv</u>	+	3,21
4	-	+	<u>fwn</u>	-	0,74	29	+	-	<u>olv</u>	+	5,18
5	+	+	<u>fwn</u>	-	0,68	30	+	-	<u>olv</u>	+	6,75
6	+	+	<u>fwn</u>	+	4,79	31	+	-	<u>olv</u>	+	3,57
7	+	+	<u>fwn</u>	+	9,09	32	+	-	<u>olv</u>	+	4,91
8	+	+	<u>fwn</u>	+	5,42	33	+	-	<u>olv</u>	+	2,77
9	-	+	<u>fwn</u>	-	0,55	34	+	-	<u>olv</u>	+	5,23
10	+	+	<u>fwn</u>	+	3,95	35	+	-	<u>olv</u>	+	4,52
11	+	+	<u>fwn</u>	+	5,09	36	+	-	<u>olv</u>	+	3,33
12	+	+	<u>fwn</u>	+	7,31	37	+	-	<u>olv</u>	+	5,43
13	-	+	<u>fwn</u>	-	0,61	38	+	-	<u>olv</u>	+	5,93
14	+	+	<u>fwn</u>	+	5,25	39	-	-	<u>olv</u>	+	1,63
15	+	+	<u>fwn</u>	-	0,50	40	-	-	<u>olv</u>	+	2,06
16	+	+	<u>fwn</u>		N.D.	41	+	-	<u>olv</u>	+	5,20
17	+	+	<u>fwn</u>	+	4,29	42	+	-	<u>olv</u>	-	0,60
18	+	+	<u>fwn</u>	-	0,36	43	+	-	<u>olv</u>	+	2,46
19	-	+	<u>fwn</u>	-	0,62	44	+	-	<u>olv</u>	+	4,93
20	+	+	<u>fwn</u>	+	5,21	45	+	-	<u>olv</u>	-	0,75
21	-	+	<u>fwn</u>	-	0,71	46	+	-	<u>olv</u>	+	3,19
22	+	+	<u>fwn</u>	-	0,35	47	-	-	<u>olv</u>	-	0,85
23	-	+	<u>fwn</u>	-	0,26	48	-	-	<u>olv</u>	+	1,23
24	-	+	<u>fwn</u>	-	0,42	49	+	-	<u>olv</u>	+	1,39
25	-	+	<u>fwn</u>	-	0,40	50	+	+	<u>fwn</u>	+	3,06

N.D. = não determinada.

TABELA 17 - PRODUÇÃO DE AG EM U/ML DOS PARENTAIS
DOS SEGREGANTES DA TABELA 16

REPETIÇÕES	<u>lap61</u>	<u>nic1ol1v3</u>
1	0,60	4,66
2	0,23	5,68
3	0,30	7,46
4	0,37	4,38
5	0,52	1,04
6	0,41	4,68
7	0,30	4,98
8	0,47	6,34
9	0,31	4,90
10	0,25	5,89
11	0,26	3,84
12	0,32	5,68
13	0,30	4,06
14	0,46	4,96
15	0,37	3,98

FIGURA 6 – Distribuição da Produção de AG dos Segregantes e Parentais do Diplóide lap 6l // nic₁ olv₃

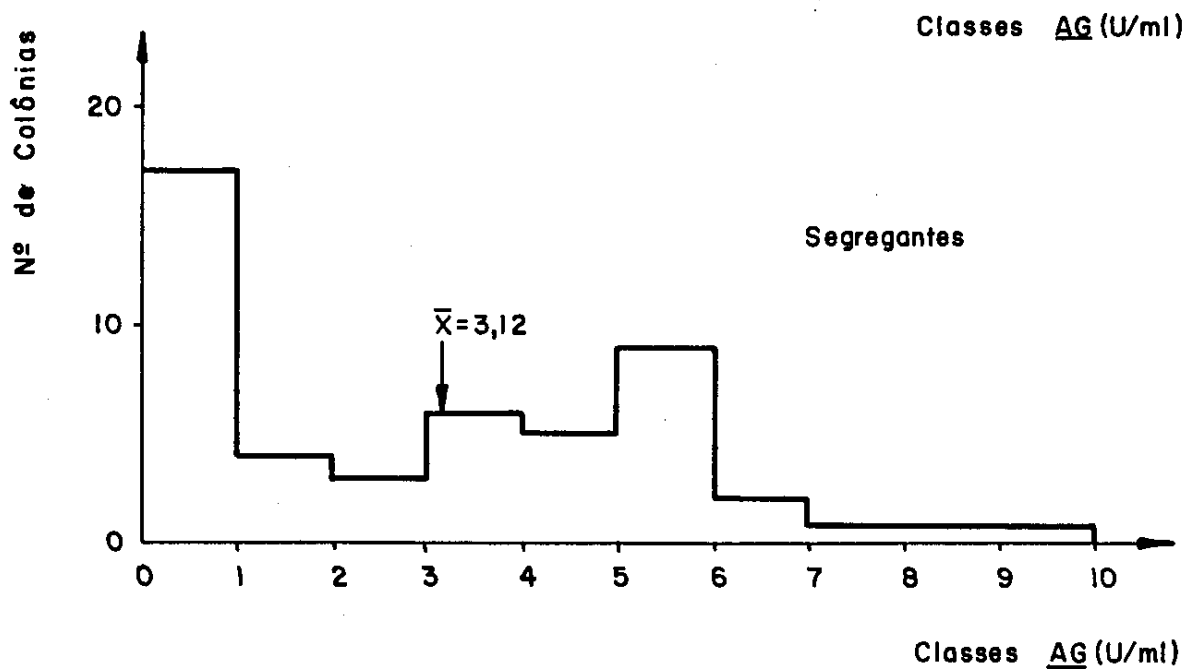
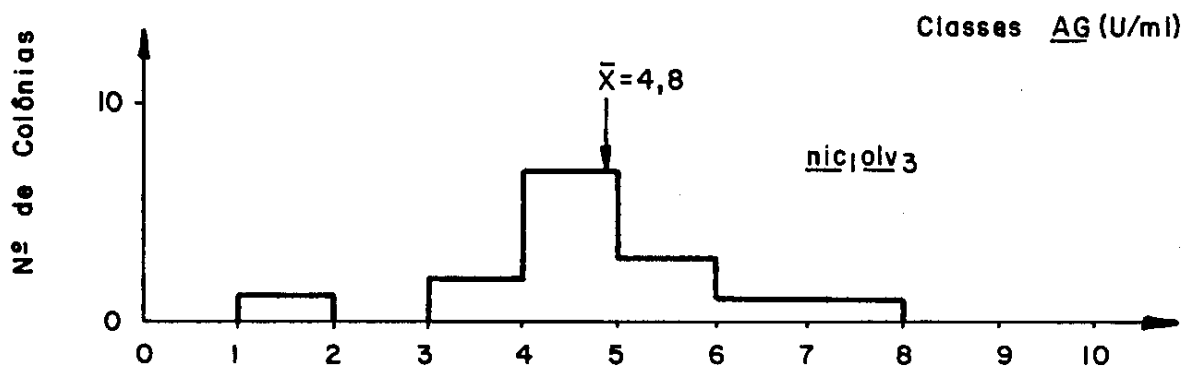
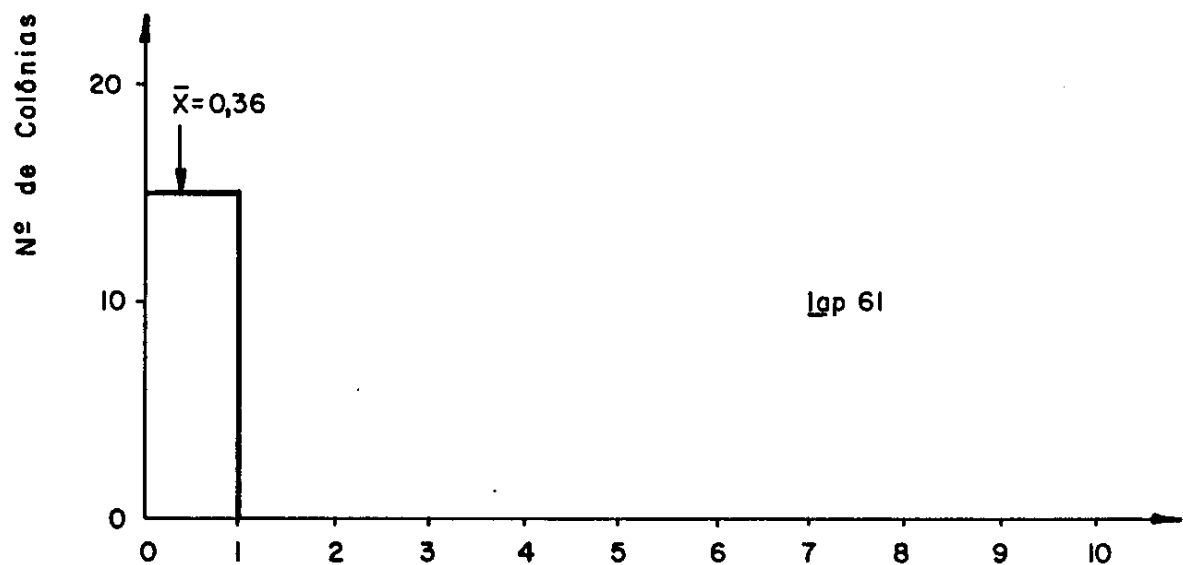


TABELA 18 - Análise Mitótica do diplóide lap61//nic1olv3

Parentais: lap61 = pab- nic+ fwn- olv+ lap-
nic1olv3 = pab+ nic- fwn+ olv- lap+

	<u>lap+</u>	<u>lap-</u>
<u>pab+</u>	28	7
<u>pab-</u>	4	10

	<u>nic+</u>	<u>nic-</u>
<u>pab+</u>	19	17
<u>pab-</u>	9	5

	<u>lap+</u>	<u>lap-</u>
<u>nic+</u>	13	14
<u>nic-</u>	19	3

	<u>olv-</u>	<u>fwn-</u>
<u>pab+</u>	18	18
<u>pab-</u>	5	9

	<u>lap+</u>	<u>lap-</u>
<u>fwn-</u>	20	3
<u>olv-</u>	12	14

	<u>olv-</u>	<u>fwn-</u>
<u>nic+</u>	1	27
<u>nic-</u>	22	0

Total de segregantes= 49

Total de segregantes= 50

Nota: Somente foram considerados 49 segregantes na análise envolvendo a marca lap, pois a produção de AG de um deles não foi determinada.

TABELA 19 - TESTE DE KOLMOGOROV E SMIRNOV PARA OS SEGREGANTES DO DIPLÓIDE lap61//nic1olv3

LINHAGENS	<u>nic1olv3</u>	Segregantes
<u>nic1olv3</u>	-	0,4013 (D5%) < 0,4231*
<u>lap61</u>	0,4966 (D5%) < 1,0000*	0,4013 (D5%) < 0,6531*
<u>nic1olv3</u> + <u>lap61</u>	-	0,3153 (D5%) > 0,1531ns

* - significativo à 5%.

ns - não significativo.

TABELA 20 - MAPEAMENTO DO GENE lap61 SEGUNDO MACDONALD E COL. (1972)

	no de segreg. com alelo mutante (-)	média AG U/ml	no segreg. com alelo selvagem	média AG U/ml	Significância*
<u>pab</u>	14	0,88	35	4,02	15,170***
<u>nic</u>	22	3,33	27	2,95	1,868ns
<u>olv</u>	23	3,33	26	2,94	1,911ns
<u>fwn</u>	26	2,94	23	3,33	1,911ns

* - Teste para significância entre as médias de produção de AG, pela prova de KRUSKAL-WALLIS.

*** - significativo à nível de 0,1%.

ns - não significativo.

4.7.3 Diploide lap38//pablfwn1

Foram obtidos 59 segregantes de acordo com o item 3.11 sendo, 41 segregantes marrons e 18 verdes. Eles foram testados quanto à produção de AG em tubos (item 3.4) com 10 repetições da linhagem parental pablfwn1, em cada teste. A linhagem parental lap38 não foi incluída neste teste pois não pode ser recuperada dos estoques provavelmente devido aos problemas relatados no item 4.5.3.

Na TABELA 21 estão as marcas auxotróficas e a produção de AG em U/ml dos segregantes marrons, e na TABELA 22 a produção de AG das 10 repetições da parental pablfwn1. A distribuição dos valores de produção está no histograma da FIGURA 7. O valor obtido pelo teste de Kolmogorov e Smirnov para a distribuição foi 0,2366 n.s. (valor calculado para 5% é 0,4797), o que indica que os segregantes não diferem da linhagem parental.

Para os segregantes verdes os dados estão nas TABELAS 23 e 24 e FIGURA 8 e, o valor obtido pelo teste de Kolmogorov e Smirnov para a distribuição foi de 0,4556 n.s. (valor calculado para 5% é 0,5364) o que também indica que os segregantes não diferem da linhagem parental.

TABELA 21 - MARCAS AUXOTRÓFICAS E PRODUÇÃO DE AG
DOS SEGREGANTES MARRONS (fwn-) DO
DIPLÓIDE lap38//pab1fwn1

Segre- gante	<u>pab</u>	<u>nic</u>	U <u>AG/ml</u>	Segre- gante	<u>pab</u>	<u>nic</u>	U <u>AG/ml</u>
1	+	+	2,31	21	+	+	3,43
2	+	+	5,75	22	+	+	3,95
3	+	+	2,29	23	+	+	3,64
4	-	+	7,67	24	-	+	7,33
5	+	+	6,22	25	-	+	10,11
6	+	+	6,83	26	+	+	4,33
7	+	+	6,92	27	-	+	6,29
8	+	+	7,53	28	-	+	8,08
9	+	+	5,68	29	-	+	6,31
10	+	+	7,73	30	+	+	7,14
11	+	+	1,45	31	-	+	8,23
12	+	+	6,89	32	+	+	8,36
13	+	+	8,25	33	+	+	2,41
14	+	+	5,89	34	-	+	4,76
15	+	+	2,90	35	-	+	5,09
16	-	+	6,55	36	+	+	7,38
17	+	+	6,28	37	+	+	12,16
18	+	+	4,78	38	+	+	2,66
19	+	+	7,91	39	-	+	2,95
20	+	+	3,54	40	+	+	1,66
				41	-	+	7,90

TABELA 22 - PRODUÇÃO DE AG DO PARENTAL pab1fwn1
DOS SEGREGANTES DA TABELA 21

REPETIÇÕES	U AG/ml
1	5,16
2	3,20
3	9,57
4	3,32
5	1,57
6	6,80
7	4,64
8	4,00
9	11,06
10	5,28

FIGURA 7 – Distribuição da Produção de AG dos Segregantes Marrons e Parental pab₁fwn₁ do Diplóide lap 38//pab₁fwn₁

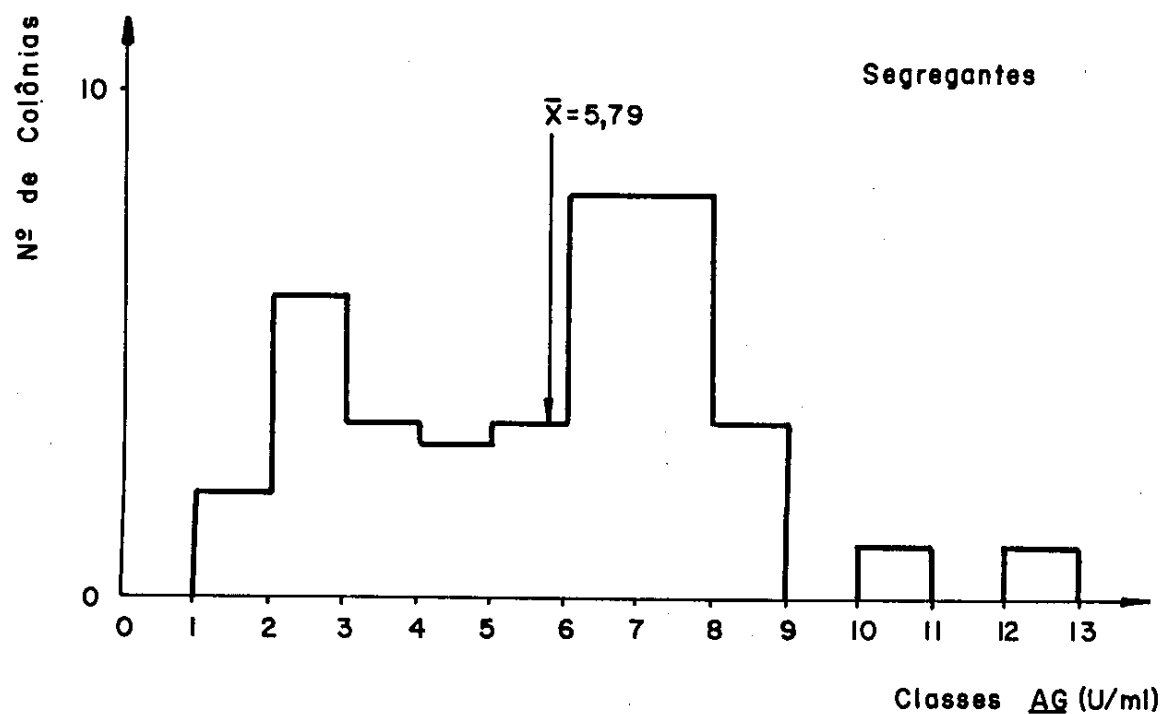
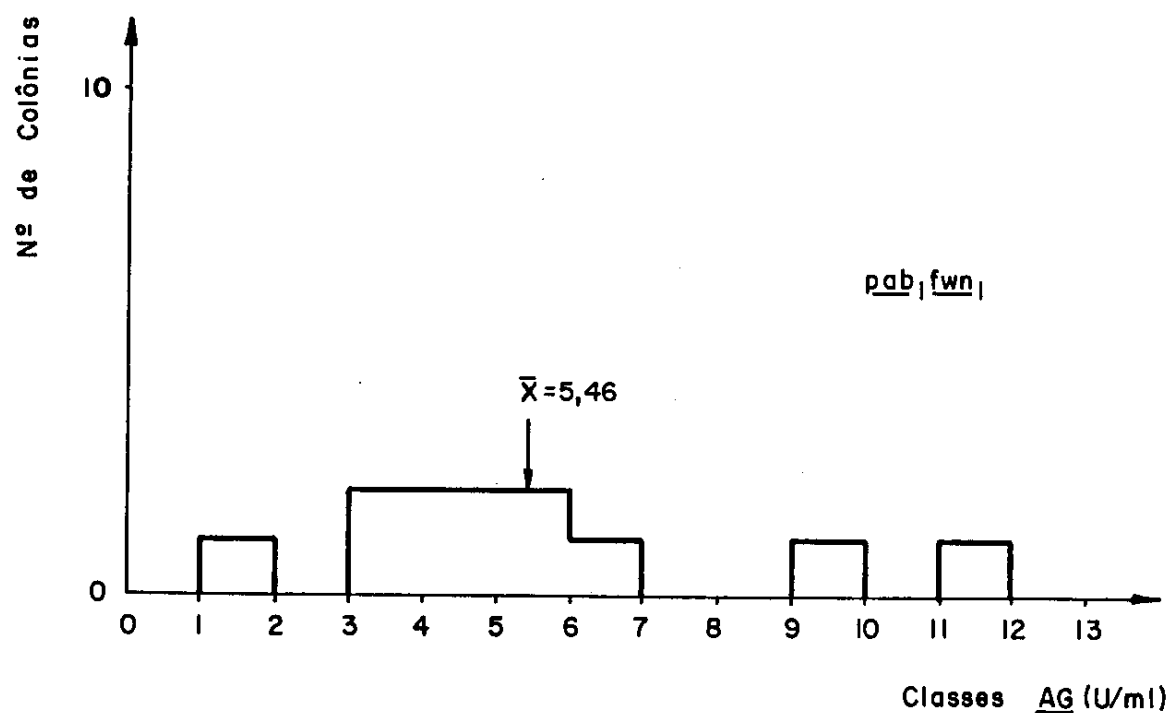


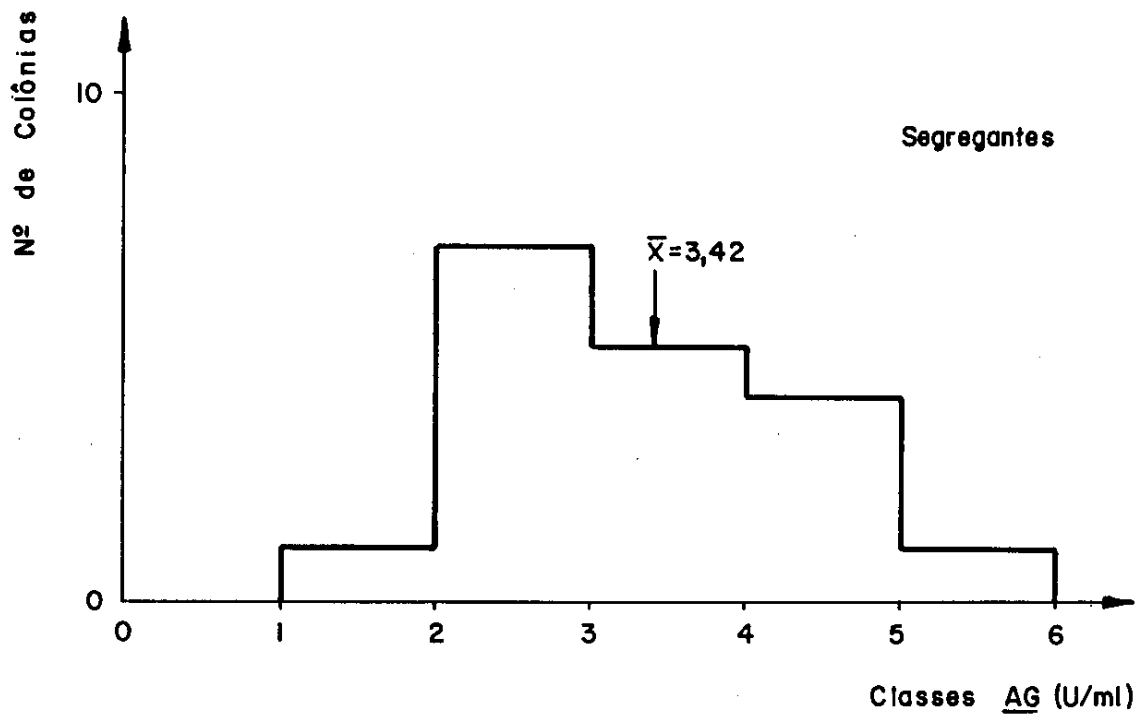
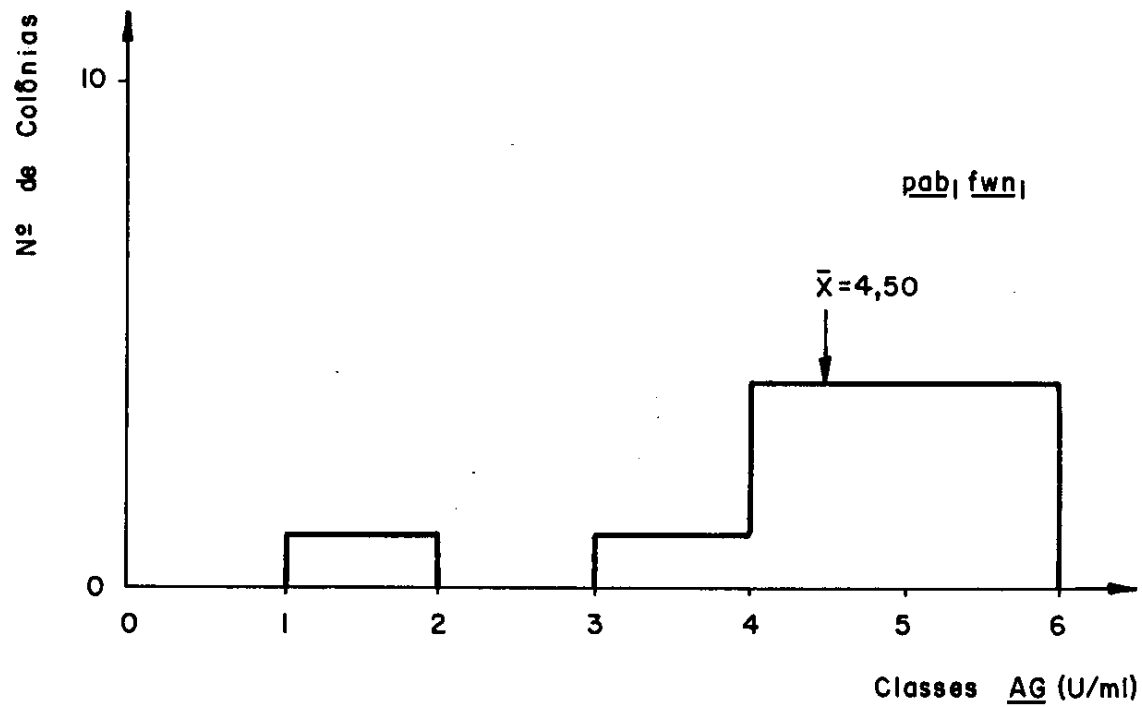
TABELA 23 - MARCAS AUXOTRÓFICAS E PRODUÇÃO DE AG
DOS SEGREGANTES VERDES (olv-) DO
DIPLÓIDE lap38//pab1fwn1

Segre- gante	<u>pab</u>	<u>nic</u>	U AG/ml	Segre- gante	<u>pab</u>	<u>nic</u>	U AG/ml
1	+	-	1,63	10	+	-	3,95
2	+	-	2,23	11	+	-	5,50
3	+	-	4,45	12	-	-	4,60
4	+	-	2,99	13	+	-	3,86
5	+	-	2,70	14	+	-	4,12
6	+	-	2,26	15	+	-	3,76
7	+	-	3,38	16	+	-	2,76
8	-	-	2,32	17	+	-	4,99
9	+	-	2,32	18	+	-	3,65

TABELA 24 - PRODUÇÃO DE AG DO PARENTAL pab1fwn1
DOS SEGREGANTES DA TABELA 24

REPETIÇÕES	U AG/ML
1	4,45
2	3,98
3	4,83
4	5,93
5	4,45
6	4,11
7	5,72
8	5,17
9	1,11
10	5,27

FIGURA 8 – Distribuição da Produção de AG dos Segregantes Verdes e Parental pab₁fwn₁, do Diplóide lap38//pab₁fwn₁.



4.7.4 Diplóide lap73//pablfwn1

Deste diplóide foram obtidos 7 segregantes verdes, todos nic- e olv-, os quais foram testados quanto a produção de AG, com 4 repetições para cada linhagem, inclusive das parentais nic1olv3 e a pablfwn1. A produção medida em U/ml está na TABELA 25.

Para comparação com a linhagem parental lap73 ver TABELA 8, que apresenta média de produção de AG de 1,5 U/ml (15 repetições).

TABELA 25 - PRODUÇÃO DE AG DOS SEGREGANTES
DO DIPLÓIDE lap38//pablfwn1

Linhagem	Média (U/ml)
<u>pablfwn1</u>	9,19
<u>nic1olv3</u>	8,40
Segregante 1	0,01
2	8,04
3	0,07
4	8,99
5	0,04
6	0,00
7	1,78

5.0 DISCUSSÃO

5.1 Efeito de marcas genéticas e ploidia na produção de AG.

Na TABELA 4 observamos que a maioria dos mutantes não apresenta alteração significativa da produção de AG em relação à linhagem parental HAP. CHANG e TERRY (1973) que obtiveram vários mutantes auxotróficos e morfológicos de A. foetidus, observaram que a produção de AG foi sempre inferior à linhagem parental, porém, BALL e col. (1978), trabalhando com A. niger, constataram que, dos mutantes auxotróficos e morfológicos obtidos, somente um, met-, apresentou uma diminuição de 50% na produção de AG.

Os mutantes pur1 e pdx1olvl apresentam produção de AG significativamente inferior à linhagem parental HAP, o que também ocorreu para produção de ácido cítrico (BONATELLI JR. e col., 1982), sugerindo efeito pleiotrópico dessas marcas. Quando pur1 foi cruzado com pdx1olvl, o diplóide pdx1olvl//pur1 (TABELA 4) mostrou produção igual à parental HAP. Este resultado suporta a hipótese de efeito pleiotrópico pois na diploidização existe complementação das marcas auxotróficas e morfológicas pelos alelos selvagens. Visando confirmar esta hipótese revertentes das marcas com suposto efeito pleiotrópico deveriam ser obtidos e testados com relação à produção da enzima, de maneira similar ao que foi feito com a produção de penicilina por MACDONALD e col. (1963) e de ácido cítrico (BONATELLI JR. e col., 1982).

Quanto à produção de AG dos diplóides (TABELA 4) podemos observar 3 classes em relação à linhagem parental HAP:

1. a do diplóide nic1//pablfwn1, que apresentou produção significativamente superior.
2. a dos diplóides thilfwn3//pablfwn2, thilfwn3//pdx1olv1 e pdx1olv1//pur1 que apresentaram produção igual.
3. a do diplóide pdx1olv1//pablfwn1 que mostrou produção significativamente inferior.

Esta constatação sugere que exista heterogeneidade entre os diplóides obtidos nos vários cruzamentos feitos e, é similar ao relatado por DAS e ROY (1978) que estudando a produção de ácido cítrico de diplóides de Aspergillus niger provenientes de 3 cruzamentos diferentes, verificaram que, 2 cruzamentos originaram diplóides cuja produção não diferia da parental selvagem e, do outro, foram isolados diplóides com produção significativamente maior. Convém ressaltar que todos os mutantes utilizados provieram de uma única linhagem parental, como é o caso do presente trabalho.

No caso da linhagem HAP os trabalhos conduzidos visando estabelecer as características do ciclo parassexual evidenciaram que os diplóides são heterogeneos com relação à segregação das marcas genéticas envolvidas no cruzamento (BONATELLI JR. e col., 1983). Existem diplóides que segregam todas as marcas esperadas e outros, que segregam apenas algumas, o que sugere que exista homozigose para o alelo selvagem dos genes que não são recuperados. Esta heterogeneidade poderia estar relacionada com a observada para produção, tendo em vista que o diplóide pdx1olv1//pablfwn1 segrega apenas as marcas provenientes de

uma das linhagens parentais. Os demais são normais com respeito à segregação estudada, mas, como não foram feitos estudos que estabeleçam com segurança o número de grupos de ligação presentes na linhagem HAP, e pela existência de sugestão de 6 grupos de ligação para A. niger (LHOAS, 1967; VAN TUYLL, 1977), a homozigose de um ou mais grupos de ligação poderia ainda ser responsável pela heterogeneidade.

Evidentemente esta interpretação teria que ser convenientemente testada pois poderiam existir efeitos de linhagens ou de combinação de linhagens, tendo em vista que foi estudado apenas um diplóide de cada cruzamento, bem como, as linhagens não foram cruzadas de todas as alternativas possíveis.

Ainda com relação à utilização da diplodização no melhoramento, os resultados de CHANG e TERRY (1973) indicam que os diplóides obtidos em A. foetidus são todos similares à linhagem parental na produção de amiloglicosidase o que não concorda com os resultados aqui apresentados.

De qualquer maneira, os resultados com diplóides parecem ser promissores e, uma melhor avaliação deveria ser conduzida em trabalhos posteriores, para determinar a aplicação de tal procedimento no melhoramento genético.

5.2 Curvas de acúmulo de amiloglicosidase.

As duas linhagens testadas, HAP (TABELA 1 e FIGURA 1) e nic10lv3 (TABELA 5 e FIGURA 2), são similares quanto aos valores de atividade enzimática constatadas nos experimentos o que confirma os resultados da TABELA 4, discutida no item

anterior, aonde não foi constatada diferença significativa entre as mesmas.

O platô da curva foi atingido na linhagem niclolv3 após 144 horas e, o fato de não ser constatado na linhagem HAP possivelmente deve-se à interrupção do ensaio de fermentação com 144 horas. Tendo sido possível observar o platô na linhagem niclolv3, o tempo de 96 horas foi escolhido para os ensaios de produção por representar aproximadamente a metade da fase exponencial.

Em A. niger, CADMUS e col. (1966) observaram que a metade da fase exponencial de produção de AG ocorre com 96 horas e, o platô, ao redor de 168 horas, o que é similar ao relatado no presente trabalho. Já KVESITADZE e col. (1981b) estudando outra linhagem, o mutante 147A, verificaram que a atividade máxima ocorre com 96 horas.

Em A. awamori NRRL 3112, a metade da fase exponencial pode ocorrer entre 50 e 120 horas (PARK e DE LIMA, 1972; PARK e DE SANTI, 1977; ANDRZEJCZUK e col., 1978) o que provavelmente reflete diferenças nas condições de cultivo e/ou composição do meio de fermentação.

5.3 Atividade de AG na presença de inibidor específico com dextrina limite ou amido como substrato.

A utilização da dextrina limite e do inibidor visaram avaliar se a metodologia de medida de enzima estava refletindo, pelo menos em parte substancial, a atividade da amiloglicosidase (AG).

As razões para o uso de tais compostos são:

1. A dextrina limite é obtida como produto da digestão exaustiva do amido comum com alfa amilase, digestão esta, que é terminada com a observação que açúcares redutores não são mais produzidos. Este produto pode ser hidrolizado pela amiloglicosidase em condições normais de reação (UEDA, 1980).
2. O inibidor obtido de Streptomyces sp no 280 por UEDA e Koba (1973) inibe acentuadamente a amiloglicosidase obtida tanto de Aspergillus (MEDDA e col., 1981) como de Rhizopus e, por outro lado, inibe apenas 8,3% da atividade da alfa amilase de Aspergillus (UEDA e Koba, 1973).

Pelos resultados expostos na TABELA 6 e FIGURA 3, podemos supor que, nas condições utilizadas no presente trabalho, as medidas de atividade enzimática refletem principalmente a ação da amiloglicosidase.

5.4 Obtenção de mutantes com produção alterada de AG.

Todos os mutantes obtidos apresentaram produção de AG diminuída, não tendo sido isolado nenhum mutante de alta produção.

A frequência de mutantes foi de 3,0%, sendo 1,1% de baixa produção (lap) e 1,9% de média produção (map), indicando que a ultravioleta foi um mutagênico eficaz na indução destes tipos de mutantes. KVESITADZE e col., (1981b) utilizando também A. niger, estudaram outros

mutagênicos como o nitrosometilurea, nitrosoetilurea, etilenimina além da luz ultravioleta. Concluíram que a luz ultravioleta é mais eficiente na indução de mutantes com produção diminuída de alfa amilase estável em ácido, e, a frequência relatada, 3,5%, foi similar a observada no presente trabalho.

O fato de não ter sido selecionado nenhum mutante de alta produção neste trabalho, deve-se ao método de pré seleção em tubos de ensaio (item 3.4.1.b). Com uso de frascos de salina de 30 ml na pré-seleção e, as demais condições de ensaio sem alteração, mutantes de alta produção da enzima foram isolados numa frequência similar à relatada acima, para mutantes com produção diminuída de AG (CALIL e BONATELLI JR., dados não publicados).

5.5 Teste de interação alélica e complementação em diplóides.

Todos os diplóides obtidos, neste trabalho (TABELA 9) segregaram todas as marcas auxotróficas e morfológicas presentes nas parentais, sendo portanto do tipo CSI (BONATELLI JR. e col., 1983).

5.5.1 Teste de interação alélica

Os diplóides obtidos entre as linhagens de produção normal e os mutantes escolhidos (item 4.6) apresentaram produção normal, indicando que as mutações induzidas são recessivas (TABELA 11).

Um possível efeito da diploidização sobre a produção de AG pode ser descartado pois o diplóide controle pabl_{fwn1}//nicl_{olv3} apresentou produção normal (TABELA 11).

Os mutantes com produção diminuída ou nula, obtidos por PAPA (1979) no estudo da produção de aflatoxina por A.flavus; por MAKINS e col. (1983) para produção de penicilina, em A. nidulans; por CAGLIOTI e SERMONTI (1956) para produção de penicilina por P. chrysogenum e por YAMASHITA e FUKUI (1984) para acúmulo de amiloglicosidase por Saccharomyces diastaticus, também se mostraram recessivos, o que concorda com os resultados acima relatados.

5.5.2 Teste de complementação

Os diplóides obtidos entre os mutantes lap com marcas auxotróficas e morfológicas diferentes apresentaram produção normal de AG (TABELA 11) indicando que a mutação lap61 é diferente das presentes em lap38 e lap73. Com isto podemos sugerir que pelo menos 2 genes estariam envolvidos na produção de AG.

Um cruzamento a ser realizado seria entre os mutantes lap38 e lap73 o que a princípio necessitaria de segregante de baixa produção de um dos mutantes com marcas nutricionais compatíveis para o cruzamento. Esta tentativa foi conduzida com o diplóide lap38//pabl_{fwn1}, visando isolar segregante lap38 pab-fwn- pois a linhagem lap38 foi perdida (item 4.5.3 e 4.7.3). Pelos resultados descritos no item 4.7.3 não houve evidência de segregação da marca o que impossibilitou o cruzamento planejado (ver item 5.6.3).

Como sugestão para trabalhos posteriores poderiam ser isolados mais mutantes lap e que testes de complementação fossem feitos visando elucidar o número de genes envolvidos na produção de AG em A. niger.

5.6 Segregantes

5.6.1 Do diplóide map3//pablfwn1

Observa-se que a marca map3 segregou, além das outras marcas envolvidas no cruzamento, pois a FIGURA 5 e a TABELA 15 mostram que a população de segregantes tem uma distribuição da produção de AG que difere significativamente da distribuição de cada uma das parentais map3 e pablfwn1, porém é semelhante à distribuição obtida da soma das duas parentais.

Através da análise mitótica, apresentada na TABELA 14, foi possível evidenciar a ligação entre os genes nic, fwn e olv.

A classificação dos segregantes map- e map+ é difícil considerando que a marca é quantitativa, o que impede a tentativa de mapeamento do gene ou genes responsáveis pela característica da maneira como é usual na análise parassexual. Outro fator que torna ainda mais difícil outras tentativas é a baixa frequência de segregantes olv- (5,8%). Como sugestão para ser contornado o problema da baixa frequência de segregantes olv- poderia ser usado meio mínimo (MM) adicionado de ácido nicotínico mais Benlate, devido à ligação entre o gene para cor e a marca nic (TABELA 14).

5.6.2 Do diplóide lap61//nic1olv3

Observamos que a marca lap61 segregou, além das outras marcas envolvidas no cruzamento, pois a FIGURA 6 e a TABELA 19 mostram que a população de segregantes tem uma distribuição da produção de AG que difere significativamente de cada uma das parentais, lap61 e nic1olv3, porém é semelhante à distribuição obtida da soma das duas parentais.

Através da análise mitótica apresentada na TABELA 18, vemos confirmada a ligação dos genes nic, fwn e olv, sugerida no item 5.6.1.

Como parece ser possível a identificação de lap- e lap+ na população de segregantes, foi feita uma tentativa de mapeamento do gene em relação às marcas auxotróficas e morfológicas usadas. Os resultados da TABELA 18 indicam, porém, não haver ligação. Considerando no entanto, o fato que a característica estudada é quantitativa, o teste que parece ser mais indicado é o proposto por MACDONALD e col. (1972) descrito no item 3.12 utilizado para estudar a produção de penicilina em A. nidulans. Com o uso deste teste é possível sugerir ligação entre a marca lap61 e o gene pab1, devido à diferença significativa existente entre a média de produção dos segregantes pab- e pab+ (TABELA 20).

Um fato que dá confiabilidade à sugestão de ligação é que a amostra de segregantes é mais representativa pois tem alta frequência de segregantes olv- (46%). Esta frequência foi obtida pelo uso de Meio Mínimo mais ácido nicotínico mais Benlate como o sugerido no item 5.6.1 para o diplóide map3, pois forçando-se a seleção para nic- estaríamos

forçando o aparecimento do gene olv-.

O teste para mapeamento acima citado poderia ser empregado num ensaio posterior no caso do mutante map3, desde que a frequência de segregantes olv- fosse aumentada.

5.6.3 Dos diplóides lap38//pablfwn1 e lap73//pablfwn1

No diplóide lap38//pablfwn1 foi possível constatar que as marcas morfológicas segregaram como o esperado evidenciando novamente a ligação entre os genes nic, fwn e olv (TABELAS 21 e 23). No caso do gene lap38 não houve evidência de segregação (FIGURAS 7 e 8 e, TABELAS 21 e 23) o que poderia sugerir homozigose para a marca lap+. Outra explicação que parece mais provável, é que a marca lap38 tenha efeito pleitrópico determinando também as alterações morfológicas descritas no item 4.5.3 e como todos os segregantes tem morfologia normal, não pode ser constatada a sua segregação.

Estudos posteriores devem ser realizados com técnicas que permitam isolar segregantes morfollogicamente alterados visando esclarecer este impasse, os quais poderiam inclusive ser utilizados para o teste de complementação entre mutantes como foi discutido no item 5.5.2.

No diplóide lap73//pablfwn1 foi possível mostrar que o gene lap73 está presente em heterozigose (item 4.7.4), o que reforça a hipótese de que o problema de recuperação encontrado com o lap38 seja devido à sua morfologia alterada.

6.0 CONCLUSÕES

1. A metodologia empregada na avaliação da atividade enzimática mede preferencialmente a atividade da amiloglicosidase.
2. A luz ultravioleta foi um mutagênico eficaz para obtenção de mutantes com produção diminuída de AG para a linhagem HAP de A. niger.
3. Todas as mutações induzidas se mostraram recessivas em relação ao alelo selvagem que condiciona produção normal de AG, e parecem existir pelo menos dois genes envolvidos na produção de AG, o lap61 e lap38 e/ou lap73.
4. Através da análise de segregantes pode ser evidenciada a ligação entre os genes olv, fwn e nic, e entre o gene pab e lap61.

7.0 RESUMO

Este trabalho teve por objetivo o isolamento e análise genética de mutantes com produção alterada de amiloglicosidase (AG) na linhagem HAP de Aspergillus niger.

Foram estudados mutantes auxotróficos e morfológicos quanto à produção da enzima, observando-se que a maioria não apresentava alteração na produção de AG com relação à linhagem original HAP, com exceção das linhagens pdx1olvl e purl que apresentaram produção significativamente menor.

Teste para avaliação da atividade enzimática na presença de inibidor específico para AG e dextrina limite como substrato mostrou que as medidas realizadas durante o trabalho referem-se principalmente à AG.

A utilização da luz ultravioleta como mutagênico para obtenção de mutantes com produção diminuída de AG foi satisfatória, tendo sido obtida uma frequência total de mutantes de 3,0%.

Pela metodologia de pré-seleção empregada não foi conseguido nenhum mutante de produção aumentada.

Testes de interação alélica mostraram que todas as mutações induzidas eram recessivas.

No teste de complementação pelo menos dois genes que afetam a produção de AG parecem ter sido revelados, o lap61 e lap73 e/ou lap38.

Análise mitótica dos segregantes mostrou ligação entre os genes nic, fwn e olv e também evidenciou ligação entre o gene pab e o lap61.

8.0 SUMMARY

The claims of this work were isolation and genetical analysis of altered amyloglucosidase production mutants using the HAP strain of Aspergillus niger.

Enzyme production was studied in auxotrophs and morphological mutants and most of them do not show AG production alterations, except pdx1olvl and purl strains showed significant decreased production comparing with the original strain HAP.

Tests to evaluate enzymatic activity in presence of AG specific inhibitor and using limit dextrin as substrate showed that the activity measured during this work was mainly the AG activity.

The use of ultraviolet light as mutagenic to obtain decreased AG production mutants was satisfactory, and the total frequency of mutants was 3,0%.

Pre-selection methodology was not efficient to obtain increased AG production mutants.

Allelic interaction tests showed that all the induced mutations were recessives.

Complementation test showed at least two genes involved in AG production, lap61 and lap73 and/or lap38.

Mitotic analysis demonstrated linkage between the genes nic, fwn and olv, and between pab and lap61.

9.0 BIBLIOGRAFIA

- ANDRZEJCZUK-HYBEL, J., K. BARTOSZWICZ, J. KACZOWSKI, M. KUJAWSKI, K. PILLER, M. RYKALA-ZIOBRO e A. ZALAC, 1978. Glucoamylase synthesis by Aspergillus awamori NRRL 3112 in the microtechnical scale. Acta Alimentaria Polonica, 4: 381 - 390.
- ALAZARD, D. e M. RAIMBAULT, 1981. Comparative studies of amylolytic enzymes production by Aspergillus niger. European Journal Applied Microbiology Biotechnenology, 12: 113 - 117.
- AZEVEDO, J.L., 1972. O ciclo parassexual em fungos. Revista de Microbiologia, 3: 157 - 168.
- AZEVEDO, J.L., 1976. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. Summa Phytopathologica, 2: 3 - 15.
- BALL, C., A.J. LAWRENCE, J.M. BUTLER e K.B. MORRISON, 1978. Improvement in amyloglucosidase production following genetic recombination of Aspergillus niger strains. European Journal Applied Microbiology Biotechnology, 5: 95 - 102.
- BALL, C. e P.F. HAMLYN, 1982. Genetic recombination studies with Cephalosporium acremonium related to the production of the industrially important antibiotic cephalosporin C. Revista Brasileira de Genética, 5: 1 - 14.

- 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.
- BANZON, J.R, E.I. FULMER e L.A. UNDERKOFER, 1949. Fermentative utilization of cassava: the production of ethanol. Iowa State College Journal of Science, 23: 219 - 235.
- BARMAN, T.E., 1969. Enzyme Handbook. Berlin Springer Verlag. v.2, p. 564 - 565.
- BONATELLI JR., R., 1977. Estabilidade e produção de ácido cítrico em Aspergillus niger. Piracicaba, ESALQ/USP. 126 p. (Tese de Mestrado)
- BONATELLI JR., R., 1981. Parassexualidade e produção de ácido cítrico em Aspergillus niger. Piracicaba, ESALQ/USP. 91 p. (Tese de Doutorado).
- BONATELLI JR., R., J.L. AZEVEDO e G.U. VALENT, 1982. Citric acid production by Aspergillus niger mutants. Revista Brasileira de Genética, 5: 483 - 492.
- BONATELLI JR., R., J.L. AZEVEDO e G.U. VALENT, 1983. Parassexuality in a citric acid producing strain of Aspergillus niger. Revista Brasileira de Genética, 6: 399 - 405.

- BONATELLI JR., R., G.U. VALENT, M. MASIERO, A. VIALTA e M.R. CALIL, 1984. Genetics of amyloglucosidase production in Aspergillus niger and Aspergillus awamori. In: Japan-Brazil Symposium on Science and Technology, 4. Rio de Janeiro. v.2, p. 34 - 41.
- CADMUS, M.C., L.G. JAYKO, D.E. HENSLEY, H. GASDORF e K.L. SMILEY, 1966. Enzymatic production of glucose syrup from grains and its use in fermentation. Cereal Chemistry, 43: 658 - 669.
- CAGLIOTI, M.T. e G. SERMONTI, 1956. A study of the genetics of penicillin-producing capacity in Penicillium chrysogenum. Journal of General Microbiology, 14: 38 - 46.
- CATEN, C.E. e J.L. JINKS, 1966. Heterokaryosis: its significance in wild homothallic ascomycetes and fungi imperfect. Transactions of the British Mycological Society, 49: 81 - 93.
- CHANG, L.T. e C.A. TERRY, 1973. Intergenic complementation of glucoamylase and citric acid production in two species of Aspergillus. Applied Microbiology, 25: 890 - 895.
- CHANG, L.T., C. TERRY e R.W. TUVESON, 1974. The influence of heterokaryotic conidia on the selective recovery of somatic diploids in Aspergillus niger. Mycologia. 66: 67 - 72.

- CORMAN, J. e H.M. TSUCHIYA, 1951. Utilization of fungal amylase for alcohol production. Cereal Chemistry, 28: 280 - 288.
- DAS, A. e P. ROY, 1978. Improved production of citric acid by a diploid strain of Aspergillus niger. Canadian Journal of Microbiology, 24: 622 - 625.
- DAS, A., 1980. Parasexual hybridisation and citric acid production by Aspergillus niger. European Journal of Applied Microbiology, 9: 117 - 119.
- DAVIS, R.H., 1966. Mechanisms of inheritance. 2-Heterokaryosis. In: AINSWORTH, G.C. e A.S. SUSSMAN ed. The Fungi, New York, Academic. v.2, 805 p.
- DENAULT, L.J. e L.A. UNDERKOFER, 1963. Conversion of starch by microbial enzymes for production of syrups and sugars. Cereal Chemistry, 40: 618 - 629.
- DITCHBURN, P., G. HOLT e K.D. MACDONALD, 1976. The genetic location of mutation increasing penicillin yield in Aspergillus nidulans. In: MACDONALD, K.D. ed. Proceedings of the International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, 2. New York, Academic. p. 213 - 227.
- DIXON, M. e E.C. WEBB, 1962. Enzymes. London, Longmans. 193 p.
- EDWARDS, G.F.StL., G. HOLT e K.D. MACDONALD, 1974. Mutants of Aspergillus nidulans impaired in penicillin biosynthesis. Journal of General Microbiology, 84: 420 - 422.

- ERB, N.M., R.T. WISTHOFF e W.L. JACOBS, 1948. Factors affecting the production of amylase by Aspergillus niger strain NRRL 337, when grown in submerged culture. Journal of Bacteriology, 55: 813 - 821.
- FINCH, P. e P.A. LEONARD, 1978. Comparative studies on glucoamylases isolated from a strain of Aspergillus. Starch, 30: 341 -345.
- FLEMING, I.D. e B.A. STONE, 1965. Fractionation of Aspergillus niger amylo-glucosidase. The Biochemical Journal, 97: 13
- GRATZNER, H. e D.N. SHEEAN, 1969. Neurospora mutant exhibiting hyperproduction of amylase and invertase. Journal of Bacteriology, 97: 544 - 549.
- HASTIE, A.C., 1970. Benlate-induced instability of Aspergillus diploids. Nature, 226: 77.
- HAYASHIDA, S. e P.Q. FLOR, 1981. Raw-starch-digestive glucoamylase productivity of protease-less mutant from Aspergillus awamori var. Kawachi. Agricultural Biological and Chemistry, 45: 2675 - 2681.
- HAYASHIDA, S., S. KUNISAKI, M. NAKAO e P.Q. FLOR, 1982. Evidence for raw-starch affinity site on Aspergillus awamori glucoamylase I. Agricultural and Biological Chemistry, 46: 83 - 89.

- HOLT, G., G.F.StL. EDWARDS e K.D. MACDONALD, 1976. The genetics of mutants impaired in the biosynthesis of penicillin. In: MACDONALD, K.D ed. Proceedings of the International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, 2. New York, Academic. p. 199 - 211.
- ILCZUK, Z., 1971. Genetyczne aspekty selekcji szczepów Aspergillus niger przydatnych w procesie syntezy kwasu cytrynowego. Przemysł Fermentacyjny i Rolny, 7: 15 - 19.
- KAFFER, E., 1960. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in Aspergillus nidulans. Nature, 186: 619 - 620.
- KAFFER, E., 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of Aspergillus nidulans. Genetics, 46: 1581 - 1609.
- KAMATA, S. 1983. Effect of organic acids on the production of amylase by A. niger. Kinki Daigaku Nogakubu, Kiyo, 16: 119 - 124.
- KERR, R.W., F.C. CLEVELAND e W.J. KATZBECK, 1951. The action of amylo-glucosidase on amylose and amilopectin. Journal of the American Chemical Society, 73: 3916 - 3921.
- KVESITADZE, G.I., N.N. VORONTSOVA, O.N. GONCHAROVA, V.V. KORIDZE, E.A. DVADTSATOVA e L.L. KVACHADZE, 1981a. Exogenous glucoamylases of molds of the genus Aspergillus. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya, 17: 569 - 574.

- KVESITADZE, G.I., L.L. KVACHADZE, M.D. PAVLENISHVILI e V.V. KORIDZE, 1981b. Selection of microscopic fungi producing acid-stable alfa amylase and glucoamylase. Microbiology, 50: 598 - 602.
- 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.
- LEWIS, N.F. e V.P. SINKAR, 1981. Optimization of nutrients and cultivation conditions in glucoamylase production. Journal of Food Biochemistry, 5: 69 - 77.
- LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidization by treatment of Aspergillus niger diploids with p-fluorophenylalanine. Nature, 190: 744.
- LHOAS, P., 1967. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in Aspergillus niger. Genetical Research, 10: 45 - 61.
- LHOAS, P., 1968. Growth rate and haploidization of Aspergillus niger on medium containing p-fluorophenylalanine. Genetical Research, 12: 305 - 315.
- LINEBACK, D.R., 1968. The carbohydrate-polypeptide linkages in a fungal glucoamylase. Carbohydrate Research, 7: 106 - 108.
- MACDONALD, K.D., J.M. HUTCHINSON e W.A. GILLET, 1963. Isolation of auxotrophs mutants of Penicillium chrysogenum and their penicillin yields. Journal of General Microbiology, 33: 365 - 374.

- MACDONALD, K.D., 1972. Genetics of penicillin production in P. chrysogenum e A. nidulans. In: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN, ed. Genetics of Industrial Microorganisms. Amsterdam, Elsevier. v.1, p. 255 - 264.
- MACDONALD, K.D., G. HOLT e P. DITCHBURN, 1972. The genetics of penicillin production. Proc. IV. IFS: Fermentation Technology. Today. p. 251 - 257.
- MAKINS, J.F., G. HOLT e K.D. MACDONALD, 1983. The genetic location of three mutantions impairing penicillin production in Aspergillus nidulans. Journal of General Microbiology, 129: 3027 - 3033.
- MANJUNATH, P. e M.R.R. RAO, 1980. Immunochemical relationship between glucoamylases I and II of Aspergillus niger. Journal of Bioscience, 2: 163 - 169.
- MEDDA, S., B.C. SAHA e S. UEDA, 1981. Raw starch adsorption and elution behavior of glucoamulase I of Black Aspergillus and its modification by alkaline protease. In: Annual Reports of International Center of Cooperative Research and Development in Microbial Engineering, 4. Japan. p. 211 - 229.
- MESSIAS, C.L., 1977. Parassexualidade e produção de aflatoxina em Aspergillus flavus, Link. Piracicaba, ESALQ/USP. 75 p. (Tese de Mestrado).
- MESSIAS, C.L., 1979. Parassexualidade em Metarhizium anisopliae (Metsch) Sorokin, Piracicaba, ESALQ/USP. 73 p. (Tese de Doutorado).

- MIAH, M.N.N. e S. UEDA, 1977a. Multiplicity of glucoamylase of Aspergillus oryzae. Part I. Starch, 29: 191 - 196.
- MIAH, M.N.N. e S. UEDA, 1977b. Multiplicity of glucoamylase of Aspergillus oryzae. Part II. Starch, 29: 235 - 239.
- 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.
- NAKANO, H., T. TAJIRI, Y. KOBAYASHI e S. UEDA, 1981. Some properties of amylase inhibitor A produced by Streptomyces sp no 280. Agricultural and Biological Chemistry, 45: 1053 - 1060.
- 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.

- NEVALAINEN, K.M.H., 1981. Induction, isolation and characterization of Aspergillus niger mutant strains producing elevated levels of Beta-galactosidase. Applied and Environmental Microbiology, 41: 593 - 596.
- NORMANSELL, P.J.M., I.D. NORMANSELL e G. HOLT, 1979. Genetic and biochemical studies of mutants of Penicillium chrysogenum impaired in penicillin production. Journal of General Microbiology, 112: 113 - 126.
- PAPA, K.E., 1979. Genetic of Aspergillus flavus: complementation and mapping of aflatoxin mutants. Genetical Research, Cambridge 34: 1 - 9.
- PARK, Y.K. e R.S. PAPINI, 1970. Produção de xarope de glicose do amilo de mandioca pelo método enzima-enzima. Revista Brasileira de Tecnologia, 1: 13 - 16.
- PARK, Y.K., R.S. PAPINI, W.H. BAR e P. VITTI, 1971. Produção de amilase fúngica por fermentação sumersa, por cultura em meio semi-sólido e seu uso em panificação. Revista Brasileira de Tecnologia, 2: 181 - 185.
- 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 - 74.
- PARK, Y.K. e M.S.S. DE SANTI, 1977. Induction of high amyloglucosidase producing mutant from Aspergillus awamori. Journal of Fermentation Technology, 55: 193 - 195.

- PARK, Y.K. e B.C. RIVIERA, 1982. Alcohol production from various enzyme converted starches with or without cooking. Biotechnology and Bioengineering, 24: 495 - 500.
- PAVLENISHVILI, M.D. e L.L. KVACHADZE, 1981. Use of mathematical experiment design methods for optimization of the medium in order to raise the level of biosynthesis of acid stable alfa amylase. Izvestiya Akademii Nauk Gruzinskoi, SSR, Seriya Biologicheskaya, 7: 431 - 435.
- PAZUR, J.H. e T. ANDO, 1959. The action of an amyloglucosidase of Aspergillus niger on starch and malto-oligosaccharides. The Journal of Biological Chemistry, 234: 1966 - 1970.
- PAZUR, J.H. e K. KLEPPE, 1962. The hydrolysis of L-D-glucosides by amyloglucosidase from Aspergillus niger. The Journal of Biological Chemistry, 237: 1002 - 1005.
- PIMENTEL GOMES, F.P., 1966. Curso de Estatística Experimental. Gráfica Benetti, São Paulo. 430 p.
- PONTECORVO, G. e J.A. ROPER, 1952. Genetic analysis without sexual reproduction by means of poliploidy in Aspergillus nidulans. Journal of General Microbiology, 6: 7.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER e E. FORBES, 1953a. Genetic recombination without reproduction in Aspergillus niger. Journal of General Microbiology, 8: 198 - 210.

- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONS, K.D. MACDONALD e A.W.J. BUFTON, 1953b. The genetic of Aspergillus nidulans. Advances in Genetics, 5: 141 - 238.
- PONTECORVO, G., 1956. The parasexual cycle in fungi. Annual Review of Microbiology, 10: 393 - 400.
- PONTECORVO, G. e E. KAFFER, 1958. Genetic analysis based on mitotic recombination. Advances in Genetics, 9: 71 - 104.
- RAMACHANDRAN, N., K.R. SREEKANTIAH e V.S. MURTHY, 1978. Studies on the thermophilic amylolytic enzymes of a strain of Aspergillus niger. Starch, 30: 272 - 275.
- RAMANESH, N., K.R. SREEKANTIAH, e V.S. MURTHY, 1982. Studies of two forms of amyloglucosidase of Aspergillus niger Van Tieghen. Starch, 34: 346 - 351.
- RAPER, K.B. e D.I. FENNELL, 1965. The genus Aspergillus. Baltimore, Williams e Wilkins. 686 p.
- RAZZAQUE, A. e S. UEDA, 1978. Glucoamylase of Aspergillus oryzae. Journal of Fermentation Technology, 56: 296 - 302.
- ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. Experientia, 8: 14 - 15.
- ROPER, J.A. e R.H. PRITCHARD, 1955. Recovery of complementary products of mitotic crossing-over. Nature, 175: 639.

- ROSIM, R.T., O. GARCIA JR., e I.R. BARACHO, 1978. Tamanho dos conídios e núcleos em linhagens haplóides e diplóides de Aspergillus niger. Ciência e Cultura, 30: 487 - 492.
- RUDD, B.A.M. e D.A. HOPWOOD, 1979. Genetic of actinorhodin biosynthesis by Streptomyces coelicolor A3(2). Journal of General Microbiology, 114: 35 - 43.
- SAHA, B.C., T. MITSUE e S. UEDA, 1979. Glucoamylase produced by submerged culture of Aspergillus oryzae. Starch, 31: 307 - 314.
- SERMONTI, G., 1956. Complementary genes which affect penicillin yields. Journal of General Microbiology, 15: 599 - 608.
- SERMONTI, G., 1969. Genetics of antibiotic-producing microorganisms. London, John Wiley. 398 p.
- SHCHERBAKOVA, E. Ya. e M.N. RESVAYA, 1978. Formation of diploids in Aspergillus niger and their biosynthesis of citric acid. Mikrobiologiya, 46: 1064 - 1069.
- SHU, P. e A.C. BLACKWOOD, 1950. Studies on carbon and nitrogen sources for production on amylolytic enzymes by submerged culture by Aspergillus niger. Canadian Journal of Botany, 29: 113 - 124.
- SHU, P., 1952. Further studies on the nitrogen source for the production of amylolytic enzymes by submerged culture of Aspergillus niger. Canadian Journal of Botany, 30: 331 - 337.

- SIEGEL, S., 1975. Estatística não paramétrica para as Ciências do Comportamento. São Paulo, Mc Graw Hill do Brasil. 350 p.
- SINKAR, V.P. E N.F. LEWIS, 1980. Increased glucoamylase production using agricultural products. Journal of Food Biochemistry, 4: 159 - 168.
- 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.
- SOHN, C.B. e Y.J. PARK, 1981. Studies on the production of acid digestive enzymes. Isolation and characterization of a fungal strain which produces acid enzymes. Hanguk Sikp'un Kwahakhoe Chi, 13: 241 - 246.
- SVENSSON, B., T.G. PEDERSEN, I. SVENDSEN, T. SAKAI e M. OTTESEN, 1982 Characterization of two formas of G.A. from Aspergillus niger. Carlsberg Research Communications, 47: 55 -59.
- TAKAHASHI, T., Y. TSUCHIDA e M. IRIE, 1978. Purification and some properties of three forms of glucoamylase from a Rhizopus species. Journal of Biochemistry, 84: 1183 - 1194.
- TEIXEIRA, C., A.A. ANDREASEN e P. KOLACHOV, 1950. Ethyl alcohol from cassava. Industrial and Engineering Chemistry, 42: 1781 - 1783.

- TINLINE, R.D. E B.H. MCNEILL, 1969. Parasexuality in plant pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology, 7: 147 - 170.
- UEDA, S. e Y. KOBAYASHI, 1973. Some properties of amylase inhibitor produced by Streptomyces sp no 280. Agricultural and Biological Chemistry, 37: 2025 - 2030.
- UEDA, S., 1980. Raw starch digestion by mold glucoamylases and debranching enzymes. In: MARSHALL, J.J. ed. Mechanisms of saccharide polymerization and depolymerization. Miami, Academic. p. 55 - 72.
- UEDA, S., 1982. Ethanol fermentation of starch material without cooking. Dempun Kagaku, 29: 123 - 130.
- UPSHALL, A., B. GIDDINGS e I.D. MORTIMORE, 1976. The use of Benlate for distinguishing between haploid and diploid strains of Aspergillus nidulans and Aspergillus terreus. Journal of General Microbiology, 100: 413 - 418.
- VAN TUYLL, J.M., 1977. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. Netherland, Mededelingen Landbouwhogeshool Wageningen. 136 p.
- YAMASHITA, I. e S. FUKUI, 1984. Isolation of glucoamylase-non-producing mutants in the yeast Saccharomyces diastaticus. Agricultural and Biological Chemistry, 48: 131 - 135.
- YONEDA, Y. e B. MARUO, 1975. Mutation of Bacillus subtilis causing hyperproduction of alfa amylase and protease, and its synergistic effect. Journal of Bacteriology, 124: 48 - 54.

A P Ê N D I C E

TABELA A1 - TESTE DE PRODUÇÃO DE AG DE ALGUMAS
COLÔNIAS SELECIONADAS EM TUBOS

LINHAGENS	REPETIÇÕES					U/ML
	I	II	III	IV	V	
89	8,20	14,77	17,53	13,16	15,21	
21	11,42	12,24	18,41	9,74	13,79	
<u>nic10lv3</u>	11,40	15,20	14,09	10,32	13,32	
70	8,59	8,33	7,38	8,96	9,44	
166	7,26	7,11	6,64	8,27	8,46	
111	6,39	9,59	7,29	3,98	5,17	
199	6,57	3,43	5,90	8,29	6,34	
100	5,40	5,76	5,05	5,08	3,14	
38	0,18	0,69	0,77	-	-	
73	0,36	0,03	0,02	0,00	0,00	
3	0,10	0,00	0,02	0,32	0,00	
33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

nota: (-) significa que a repetição foi perdida.

TABELA A2 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA A1

TESTE DE F

CAUSA DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
Tratamento	10	1231,86	123,19	35,01**
Resíduo	42	147,80	3,52	
Total	52	1379,66		

** Significativo à 1%

Observação: A linhagem 33 não entrou nos cálculos da análise de variância por apresentar produção de AG igual à zero U/ml.

TABELA A3 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS DADOS DA TABELA A1

LINHAGENS	MÉDIA DE PRODUÇÃO DE <u>AG</u> (U/ML)		
89	13,77	a*	
21	13,12	a	
<u>níclolv3</u>	12,86	a	
70	8,54	a	b
166	7,55		b
111	6,48		b
199	6,11		b
100	4,89	b	c
38	0,55		c
73	0,10		c
3	0,09		c
33	0,00		c

DMS à 5% = 4,03 U/ml.

* As linhagens com as mesmas letras não diferem significativamente à nível de 5% pelo Teste de Tukey.

TABELA A4 - TESTE DE PRODUÇÃO DE AG DAS COLÔNIAS
66, 57, lap38 E niclolv3

LINHAGENS	REPETIÇÕES (U/ML)				
	I	II	III	IV	V
<u>niclolv3</u>	8,43	10,20	8,80	7,26	9,19
<u>66</u>	9,44	10,00	6,32	8,18	9,88
<u>57</u>	8,41	9,83	9,34	9,05	7,24
<u>lap38</u>	2,09	2,15	1,92	2,49	2,95

TABELA A5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA A4

TESTE DE F

CAUSA DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
Tratamento	3	156,07	52,02	44,21**
Resíduo	16	18,83	1,18	
Total	19	174,90		

** Significativo à 1%.

TABELA A6 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS DADOS DA
TABELA A4

LINHAGEM	MÉDIA DE PRODUÇÃO DE AG (U/ML)
<u>niclolv3</u>	8,78 a*
<u>66</u>	8,77 a
<u>57</u>	8,76 a
<u>lap38</u>	2,32 b

DMS à 5% = 1,96 U/ml

* Linhagens com a mesma letra não diferem significativamente à nível de 5% pelo Teste de Tukey.

TABELA A7 - TESTE DE PRODUÇÃO DE AG DAS COLÔNIAS 81, 61 E lap73
COMPARADAS COM AS PARENTAIS

LINHAGENS	REPETIÇÕES (U/ML)				
	I	II	III	IV	V
<u>pablfwn1</u>	16,40	12,70	26,10	13,80	12,00
81	17,60	13,00	13,50	25,10	16,50
61	0,92	0,42	0,45	0,35	0,38
<u>nic1olv3</u>	13,80	10,40	11,60	16,40	14,20
<u>lap73</u>	1,80	3,00	3,20	3,20	3,30

TABELA A8 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA A7

TESTE DE F

CAUSA DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
Tratamento	4	1203,81	300,95	23,902**
Resíduo	20	251,82	12,59	
Total	24	1455,63		

** Significativo à 1%.

TABELA A9 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS DADOS DA
TABELA A7

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ML)
81	17,14 a*
<u>pablfwn1</u>	16,20 a
<u>niclolv3</u>	13,28 a
<u>lap73</u>	2,90 b
61	0,50 b

DMS à 5% = 6,73 U/ml.

* Linhagens com a mesma letra não diferem significativamente à nível de 5% pelo Teste de Tukey.

TABELA A10 - TESTE DE PRODUÇÃO DE AG DO DIPLÓIDE map//pablfwn1
COMPARADO COM AS PARENTAIS

LINHAGENS	REPETIÇÕES (U/ML)				
	I	II	III	IV	V
<u>nic1olv3</u>	13,04	14,21	10,46	10,13	10,14
<u>lap73</u>	1,29	1,47	1,63	1,34	1,47
<u>map3</u>	5,74	7,56	7,75	7,26	6,63
<u>pablfwn1</u>	21,75	12,09	16,77	12,77	17,75
<u>map3</u> // <u>pablfwn1</u>	14,63	9,07	9,64	9,36	9,65

TABELA A11 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA A10

TESTE DE F

CAUSA DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
Tratamento	4	601,78	150,45	30,11**
Resíduo	20	99,93	5,00	
Total	24	701,72		

** Significativo à 5%.

TABELA A12 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS DADOS DA
TABELA A10.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ML)	
<u>pablfwn1</u>	16,13	a*
<u>nic101v3</u>	11,60	b
<u>map3//pablfwn1</u>	10,47	b
<u>map3</u>	6,99	c
<u>lap73</u>	1,44	d

DMS à 5% = 4,24.

* Linhagens com a mesma letra não diferem
significativamente à nível de 5% pelo
Teste de Tukey.

TABELA A13 - TESTE DE PRODUÇÃO DE AG DOS DIPLÓIDES
map100//pablfwn1 e map166//pablfwn1
 COMPARADOS COM AS PARENTAIS

LINHAGENS	REPETIÇÕES (U/ML)			
	I	II	III	IV
<u>niclolv3</u>	8,37	11,96	7,26	11,75
<u>pablfwn1</u>	13,42	15,42	13,79	12,66
<u>map100//pablfwn1</u>	12,29	14,16	10,60	13,80
<u>map166//pablfwn1</u>	14,19	18,66	14,21	19,23

TABELA A14 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA A13

TESTE DE F

CAUSA DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
Tratamento	3	93,27	31,09	7,23**
Resíduo	12	51,63	4,30	
Total	15	144,89		

** Significativo à 1%.

TABELA A15 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS DADOS DA
TABELA A13

LINHAGENS	MÉDIAS DE PRODUÇÃO DE AG
<u>māp166//pāb1fwn1</u>	16,57 a*
<u>pāb1fwn1</u>	13,82 a b
<u>māp100//pāb1fwn1</u>	12,71 a b
<u>nic1o1v3</u>	9,83 b

DMS à 5% = 5,61 U/ml.

* Linhagens com a mesma letra não diferem
significativamente à nível de 5% pelo
Teste de Tukey.

TABELA A16 - TESTE DE PRODUÇÃO DE AG DOS DIPLÓIDES lap COMPARADOS COM O DIPLÓIDE CONTROLE (pablfwn1//nic1olv3) E AS PARENTAIS

LINHAGENS	REPETIÇÕES (U/ML)				
	I	II	III	IV	V
<u>lap38</u>	2,39	3,33	2,56	2,16	2,75
<u>lap61</u>	0,00	0,11	0,02	0,16	0,02
<u>pablfwn1</u>	11,28	11,34	9,88	13,06	11,33
<u>lap38</u> // <u>pablfwn1</u>	14,75	13,79	14,24	12,66	10,32
<u>lap38</u> // <u>lap61</u>	13,39	9,85	9,58	10,09	10,71
<u>lap73</u> // <u>pablfwn1</u>	15,17	12,03	13,87	12,35	9,39
<u>lap73</u> // <u>lap61</u>	7,97	8,19	10,49	11,37	8,19
<u>lap61</u> // <u>nic1olv3</u>	9,39	12,72	11,38	8,43	9,39
<u>pablfwn1</u> // <u>nic1olv3</u>	10,77	9,41	11,19	9,92	9,39

TABELA A17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA A16

TESTE DE F

CAUSA DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
Tratamento	8	806,62	100,83	51,70**
Resíduo	36	70,21	1,95	
Total	44	876,83		

** Significativo à 1%.

TABELA A18 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS DADOS DA
TABELA A16

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG
<u>lap38</u> // <u>pabl</u> fwn1	13,15 a*
<u>lap73</u> // <u>pabl</u> fwn1	12,56 a b
<u>pabl</u> fwn1	11,38 a b
<u>lap38</u> // <u>lap61</u>	10,72 b
<u>lap61</u> // <u>nicl</u> olv3	10,26 b
<u>pabl</u> fwn1// <u>nicl</u> olv3	9,94 b
<u>lap73</u> // <u>lap61</u>	9,24 b
<u>lap38</u>	2,64 c
<u>lap61</u>	0,06 c

DMS à 5% = 2,91 U/ml.

* Linhagens com a mesma letra não diferem significativamente à nível de 5% pelo Teste de Tukey.