

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**BC/38160**  
**IB/80838**



## INSTITUTO DE BIOLOGIA

BT/UNICAMP  
M366<sub>C</sub>



30820

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Ingrid Schmidt-Hebbel Martens

## Caracterização de mutantes de *Aspergillus niger* com baixa produção da fração extracelular da enzima glicoamilase.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Ingrid Schmidt-Hebbel Martens e aprovada pela Comissão Julgadora.

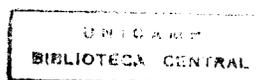
11/06/99

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

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

9913822

Campinas - SP  
1999



JB

UNIDADE	
N.º CHAMADA:	F/UNICAMP
	M366c
V.	EX.
TOMBO BC/	38160
PROC.	229/99
	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	25-07-99
N.º CPG	

CM-00125566-3

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**Martens, Ingrid Schmidt-Hebbel**

**M366c** Caracterização de mutantes de *Aspergillus niger* com baixa produção da fração extracelular da enzima glicoamilase/Ingrid Schmidt-Hebbel Martens. -- Campinas, SP:[s.n.],1999.  
185f.:ilus.

Orientador: João Lúcio de Azevedo

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. *Aspergillus niger*. 2. Fungos. 3. Mutantes. I. Azevedo, João Lúcio de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 11 de junho de 1999

BANCA EXAMINADORA:

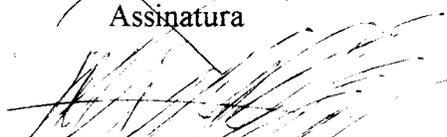
TITULARES:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo (Orientador)



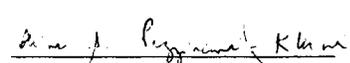
Assinatura

Prof. Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena



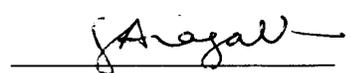
Assinatura

Profª. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner



Assinatura

Profª. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro



Assinatura

Profª. Dra. Maria Regina Calil



Assinatura

SUPLENTES:

Prof. Dr. Ivanhoé Rodrigues Baracho

Assinatura

Dr. Walter Maccheroni Junior

Assinatura

Como qualquer organismo vivo,  
o ser humano está geneticamente programado para aprender.  
No momento em que nasce,  
lhe é oferecido pela natureza todo um leque de possibilidades.

François Jacob

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho:

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pelo apoio e interesse dedicado à orientação deste trabalho de tese.

Ao Prof. Dr. Aquiles E. Piedrabuena, pelo grande estímulo ao meu trabalho, pela imensa disponibilidade de ensinar, e acima de tudo, pela amizade, que tornou a nossa convivência sempre agradável.

À Profª. Dra. Christine Hackel, pelo interesse pessoal no meu trabalho, e, como membro da SCPG-Genética, pela compreensão e facilidades concedidas.

Ao Prof. Dr. Wanderlei Dias da Silveira (Depto. de Microbiologia, IB, Unicamp) pela amizade, e discussões a respeito do meu trabalho, bem como pelas facilidades concedidas no seu laboratório.

Aos Profs. Drs. Cláudio Luiz Messias, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira e Profª. Dra. Yoko Bomura Rosato pelas facilidades concedidas nos respectivos laboratórios.

Aos colegas e amigos do Depto de Genética, e da Unicamp, que contribuíram, cada um da sua maneira , para a realização deste trabalho.

À Célia, Ana Rita e Patrícia, secretárias do Depto. de Genética e Evolução, e à Teresa e Zaira, secretárias da Pós-Graduação , pela valiosa ajuda.

Às técnicas Ernestina e Zilda, pelo auxílio na parte experimental do trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da Bolsa de Doutorado.

À FAPESP, pela concessão do Projeto, que possibilitou o desenvolvimento da parte experimental da tese.

# Índice

	Página
Resumo	XII
Summary	XIII
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	4
2.1. O fungo <i>Aspergillus niger</i>	4
2.2. A enzima glicoamilase	3
2.3. Regulação da síntese de glicoamilase em <i>A. niger</i>	10
2.4. Transformação genética de <i>A. niger</i>	12
2.5. Produção de metabólitos de interesse industrial	23
2.6. Instabilidade genética	26
2.7. Estudos realizados no Laboratório de Genética de Microrganismos Industriais	30
3. Material e métodos	34
3.1. Linhagens utilizadas	34
3.1.1. <i>Aspergillus niger</i>	34
3.1.2. <i>Escherichia coli</i>	35
3.2. Meios de cultura	36
3.2.1. Meios de cultura para <i>A. niger</i>	36
3.2.2. Meios de cultura para <i>E. coli</i>	37
3.2.3. Esterilização e conservação dos meios de cultura	37
3.3. Temperatura de incubação dos microrganismos	37
3.4. Esterilização e temperatura de incubação	37
3.5. Avaliação da atividade de glicoamilase das linhagens de <i>A. niger</i>	38
3.5.1. Fermentação em meio MAC, MAL, XIL, MALt e MCS	38
3.5.2. Obtenção de glicoamilase extracelular	39
3.5.3. Extração da glicoamilase intracelular	39
3.5.4. Extração de glicoamilase ligada ao micélio	40
3.5.5. Determinação da atividade enzimática da glicoamilase	40
3.6. Determinação da concentração de proteína	41
3.7. Determinação do peso seco do micélio	41

3.8. Produção de enzima extracelular em meio tamponado	41
3.9. Análise de proteínas	42
3.9.1. Fermentação em meio MAC, MAL e XIL	42
3.9.2. Preparação das amostras de proteínas	42
3.9.3. Eletroforese de proteínas	42
3.9.4. Detecção de proteínas	43
3.10. Análise de ácidos nucleicos	43
3.10.1. Extração de ácidos nucleicos	43
3.10.2. Eletroforese de ácidos nucleicos	44
3.10.3. Detecção de ácidos nucleicos após eletroforese	45
3.10.4. Determinação da concentração de ácidos nucleicos	46
3.10.5. Eletroeluição de fragmentos de DNA	46
3.11. Transformação	46
3.11.1. Transformação de <i>E. coli</i>	46
3.11.2. Plasmídios utilizados	46
3.11.3. Transformação de <i>A. niger</i>	48
3.11.4. Viabilidade dos protoplastos	49
3.12. Teste de resistência dos protoplastos de <i>A. niger</i> a higromocina e benomil	50
3.12.1. Teste de resistência a higromicina	50
3.12.2. Teste de resistência a benomil	50
3.13. Teste para detecção de nucleases	50
3.13.1. Halo de hidrólise de DNA em placa	50
3.13.2. Hidrólise de DNA em placa de microtitulação	51
3.14. Reações enzimáticas	51
3.14.1. Restrição	51
3.14.2. Reação de polimerase em cadeia (PCR)	51
3.15. Padrão de restrição do gene <i>glaA</i>	52
3.16. “Southern Blotting”	53
3.16.1. Transferência de DNA para membranas de nylon	53
3.16.2. Marcação isotópica da sonda	53
3.16.3. Hibridação	53
3.17. “Northern Blotting”	54
3.17.1. Transferência de RNA para membrana de nylon	54
3.17.2. Marcação isotópica da sonda	54
3.17.3. Hibridação	54

4. Resultados e discussão	55
4.1. Escolha do tempo de fermentação	55
4.2. Estocagem do caldo de fermentação	56
4.3. Escolha do tampão de extração de glicoamilase	58
4.4. Atividade enzimática	59
4.4.1. Atividade enzimática em meio com farinha de raspa de mandioca	59
4.4.1.1. Atividade extracelular	59
4.4.1.2. Atividade intracelular	61
4.4.1.3. Atividade enzimática ligada ao micélio	62
4.4.1.4. Perfil de distribuição da atividade enzimática nas diversas frações	63
4.4.2. Atividade enzimática em meio com maltose	64
4.4.2.1. Atividade extracelular	64
4.4.2.2. Atividade intracelular	65
4.4.2.3. Atividade ligada ao micélio	67
4.4.2.4. Perfil de distribuição da atividade enzimática nas diversas frações	68
4.4.3. Comparação das fermentações em meio MAL e em meio MAC	69
4.5. Produção de enzima em meio com maltose (MAL) e em meio com maltose tamponado (MALt)	74
4.6. Instabilidade das linhagens	76
4.7. Teste de sensibilidade à higromicina e ao benomil	77
4.8. Produção de protoplastos	78
4.9. Transformação	80
4.10. Eletroforese de proteínas	80
4.11. Análise do padrão de restrição do gene da glicoamilase	81
4.12. “Southern blotting”	82
4.13. “Northern blotting”	83
5. Conclusões	84
6. Referências bibliográficas	85

## Apêndice I - Tabelas

Tabela 1:	Atividade enzimática e concentração de proteína durante a fermentação em meio contendo farinha de raspa de mandioca (meio MAC).	113
Tabela 2:	Atividade enzimática e teor de proteína no caldo de fermentação submetido a congelamento.	114
Tabela 3:	Efeito da filtração e da centrifugação sobre a atividade enzimática e teor de proteína no caldo de fermentação.	114
Tabela 4:	Influência da filtração e da centrifugação seguidas de congelamento do caldo de fermentação sobre a atividade enzimática e teor de proteína no mesmo.	115
Tabela 5:	Atividade enzimática e teor de proteína no caldo de fermentação após diferentes tratamentos.	115
Tabela 6:	Atividade enzimática ligada ao micélio após extração com diversas soluções-tampão.	116
Tabela 7:	Parâmetros extracelulares da fermentação em meio com farinha de raspa de mandioca (meio MAC) após três e sete dias de fermentação.	117
Tabela 8:	Parâmetros intracelulares da fermentação em meio com farinha de raspa de mandioca (meio MAC) após três e sete dias de fermentação.	118
Tabela 9:	Parâmetros relativos ao micélio da fermentação em meio com farinha de raspa de mandioca (meio MAC) após três e sete dias de fermentação.	119
Tabela 10:	Parâmetros extracelulares da fermentação em meio com maltose (meio MAL) após três e sete dias de fermentação.	120
Tabela 11:	Parâmetros intracelulares da fermentação em meio com maltose (meio MAL) após três e sete dias de fermentação.	121
Tabela 12:	Parâmetros relativos ao micélio da fermentação em meio com maltose (meio MAL) após três e sete dias de fermentação.	122
Tabela 13:	Comparação da atividade enzimática total após três e sete dias de fermentação em meio MAC e em meio MAL.	123

Tabela 14:	Comparação do teor de proteína total após três e sete dias de fermentação em meio MAC e em meio MAL.	124
Tabela 15:	Comparação da atividade específica após três e sete dias de fermentação em meio MAC e em meio MAL.	125
Tabela 16:	Comparação do peso seco do micélio após três e sete dias de fermentação em meio MAC e em meio MAL.	126
Tabela 17:	Comparação do coeficiente atividade enzimática/peso seco após três e sete dias de fermentação em meio MAC e em meio MAL.	127
Tabela 18:	Resistência das linhagens parentais, mutantes e selvagem à higromicina após 48 horas de incubação.	128
Tabela 18A:	Resistência das linhagens Snu e 10v10 à higromicina após 108 horas de incubação.	128
Tabela 19:	Resistência das linhagens parentais, mutantes e selvagem ao benomil em meio de regeneração de protoplastos com sorbitol.	129
Tabela 20:	Resistência das linhagens parentais, mutantes e selvagem ao benomil em meio de regeneração de protoplastos com KCl.	129
Apêndice II - Figuras		130
Figura I:	Perfil de distribuição da atividade enzimática nas diferentes frações em meio MAC aos três dias de fermentação.	131
Figura II:	Perfil de distribuição da atividade enzimática nas diferentes frações em meio MAC aos sete dias de fermentação.	132
Figura III:	Perfil de distribuição da atividade enzimática nas diferentes frações em meio MAL aos três dias de fermentação.	133
Figura IV:	Perfil de distribuição da atividade enzimática nas diferentes frações em meio MAL aos sete dias de fermentação.	134
Figura V:	Curva de pH do meio durante a fermentação em meio MAL.	135
Figura VI:	Curva de pH do meio durante a fermentação em meio MALt.	136

Figura VII: Atividade enzimática durante fermentação em meio com maltose (MAL).	137
Figura VIII: Atividade enzimática durante fermentação em meio com maltose tamponado (MALt).	138
Figura IX: Eletroforese de proteínas do caldo de fermentação em meio com farinha integral de raspa de mandioca .	139
Figura X: Amplificação do gene <i>glaA</i> por reação de polimerase em cadeia (PCR).	140
Figura XIA: Padrão de restrição do gene <i>glaA</i> digerido com as enzimas BamHI, BglII, ClaI, KpnI e PstI.	141
Figura XIB: Padrão de restrição do gene <i>glaA</i> digerido com as enzimas EcoRI, PvuI, SmaI e XbaI.	142
Figura XIC: Padrão de restrição do gene <i>glaA</i> digerido com as enzimas BclI, DraI, HindIII e XhoI.	143
Figura XII: Híbridação de DNA genômico com sonda <i>glaA</i> homóloga.	144
Figura XIII: Híbridação de RNA total com sonda <i>glaA</i> .	145
Apêndice III - Análise estatística	146

## Resumo

No presente trabalho, foram estudadas linhagens mutantes de *Aspergillus niger* apresentando aumento (mutantes hgp) ou redução (mutantes lgp) da fração extracelular da enzima glicoamilase. As linhagens mutantes de baixa produção (lgp), foram avaliadas quanto a atividade enzimática, teor de proteína, atividade específica, peso seco e atividade enzimática/peso seco. Estes parâmetros foram comparados em meio contendo farinha integral de raspas de mandioca ou maltose como fonte de carbono. Em meio contendo maltose, as linhagens apresentaram crescimento homogêneo, porém menor peso seco, quando comparadas com os resultados obtidos na fermentação em meio contendo raspas de mandioca. Todas as linhagens estudadas apresentaram grande instabilidade na fermentação, em ambos os meios de cultura utilizados. Esta instabilidade também pode ser demonstrada pela perda de vigor no crescimento em meio sólido, acompanhada de perda de atividade da glicoamilase. Após amplificação mediante reação de polimerase em cadeia (PCR), analisou-se o padrão de restrição do gene da glicoamilase *glaA*, para diversas enzimas de restrição, tanto nas linhagens mutantes (hgp e lgp) quanto na linhagem selvagem, utilizada como controle. Todas estas linhagens apresentaram padrão de restrição semelhante. A enzima glicoamilase foi evidenciada por meio de eletroforese em poliacrilamida, realizada em condições não-denaturantes. Além da banda correspondente à glicoamilase, encontrou-se uma outra, de menor intensidade, compatível com  $\alpha$ -amilase. A presença desta confirmou os resultados obtidos na fermentação em meio com farinha integral de raspas de mandioca. A análise da hibridação do DNA genômico das linhagens estudadas, com sonda homóloga, após digestão com as enzimas EcoRI e EcoRV, evidenciou banda correspondente ao gene *glaA*. A intensidade da banda correspondente ao gene analisado, proporcional para todas as linhagens estudadas, indica o mesmo número de cópias deste gene em todas as linhagens estudadas. A análise do RNA total, extraído de micélio após fermentação em meio indutor (maltose como fonte de carbono), mostrou que a mesma induz a síntese de glicoamilase.

## Summary

Mutant *Aspergillus niger* strains showing low (lgp) or high (hgp) extracellular glucoamylase production were previously obtained. In this study, lgp strains were evaluated concerning enzyme activity, protein content, specific activity, dry weight and enzymatic activity/dry weight ratio. These parameters were correlated with the culture medium used, *i. e.*, containing cassava starch or maltose as the carbon source. In maltose medium the strains showed homogeneous growing, but lower dry weight, comparing with mycelium dry weight achieved when growing strains in cassava starch medium. All strains showed genetic instability during fermentation, in both mediums used. The instability could also be demonstrated by loss of growing vigor in solid medium, the same occurring with glucoamylase activity. The *glaA* gene from low and high glucoamylase production strains as much as the wild strain, used as control, was amplified by mean of polymerase chain reaction (PCR), and its restriction pattern for different enzymes analyzed. All strains showed similar restriction pattern. The polyacrilamide gel electrophoresis in non-denaturing conditions showed two bands, one glucoamylase compatible, and another, with lower density, compatible with  $\alpha$ -amylase. The latter confirmed the results for fermentation in cassava starch medium. Southern blot analysis, with fungal genomic DNA digested with EcoRI and EcoRV, hybridized with a homologous probe, showed a corresponding band to the evaluated gene. The signal intensity indicated the same copy number for the *glaA* gene in all strains. Northern blot analysis of total RNA, extracted after growing strains under inducing conditions (with maltose as carbon source) showed that maltose is capable of inducing glucoamylase.

## 1. Introdução

A glicoamilase é uma enzima bioquimicamente bem conhecida. Entretanto, do ponto de vista do sistema genético que regula a sua síntese, apesar de nos últimos anos terem sido feitos alguns progressos significativos na elucidação do mesmo, ainda há alguns aspectos a serem esclarecidos. Sabe-se atualmente que, em *Aspergillus niger*, a regulação da síntese da enzima é feita essencialmente na etapa de transcrição, sendo que o amido e a maltose induzem o processo.

Atualmente, o maior interesse na elucidação dos mecanismos de regulação gênica reside na possibilidade de se utilizarem espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* como veículos de expressão de proteínas heterólogas, provenientes de eucariontes superiores. A produção de proteínas homólogas e heterólogas é economicamente interessante para a indústria de alimentos, bem como para a indústria farmacêutica, uma vez que os fungos filamentosos são capazes de secretar uma grande variedade de proteínas e enzimas, estas últimas responsáveis pela degradação de uma ampla variedade de substratos orgânicos. Além disso, os fungos filamentosos podem ser facilmente separados do meio de cultura por filtração.

Os conhecimentos adquiridos por meio da genética clássica e da bioquímica do metabolismo destes microrganismos resultaram em um grande volume de informações, o que possibilitou a classificação como GRAS (generally regarded as safe) pelo FDA (Food and Drug Administration, órgão governamental dos Estados Unidos) para alguns dos produtos elaborados por fungos filamentosos. Todos estes fatores, aliados, mais recentemente, ao desenvolvimento de técnicas de biologia molecular têm aberto novas perspectivas na produção de proteínas homólogas e heterólogas.

As linhagens utilizadas no nosso laboratório são mutantes derivados da linhagem 10v10 de *A. niger*, usada para produção industrial de ácido cítrico, especialmente mutantes para produção da enzima glicoamilase, que apresentam aumento (mutantes hgp) ou redução

(mutantes lgp) da fração extracelular da enzima. Alguns mutantes apresentam, paralelamente, diminuição da capacidade de crescimento em meio contendo amido como única fonte de carbono. Estes mutantes de *Aspergillus niger* foram objeto de estudo do grupo de trabalho do Prof. Dr. Renato Bonatelli Jr. por muitos anos.

Os resultados obtidos anteriormente pelo mencionado grupo de trabalho sugerem algumas hipóteses quanto à diminuição da atividade extracelular da enzima, verificada para as linhagens lgp. A primeira delas diz respeito à possibilidade de ocorrência de mutação(ões) que induziria(m) a diminuição da capacidade de secreção da enzima e, portanto, as linhagens seriam mutantes de secreção. A segunda hipótese considera a possibilidade de mutantes de produção, ou seja, com mutação(ões) que levaria(m) à redução na síntese da enzima, em qualquer uma das etapas envolvidas no processo. A terceira hipótese a ser considerada é a ocorrência de mutação na própria enzima, ou seja, na sua seqüência de aminoácidos, sem que a produção e secreção da mesma esteja afetada nos mutantes lgp.

O presente trabalho teve como objetivos a caracterização fisiológica da produção da fração extracelular, intracelular e ligada ao micélio da enzima glicoamilase através dos parâmetros

- atividade enzimática
- teor de proteína
- atividade específica
- peso seco do micélio e
- atividade enzimática/peso seco do micélio,

bem como a caracterização molecular de cinco diferentes mutantes de baixa produção da enzima por meio de

- transformação das linhagens com o gene *glaA* homólogo e avaliação da inserção deste gene sobre a atividade enzimática
- eletroforese de proteínas presentes no caldo proveniente de fermentação em meio de cultura indutor e não-indutor
- perfil de restrição do gene *glaA* para diversas enzimas

- “Southern blotting” e
- “Northern blotting”, utilizando-se RNA extraído de micélio crescido em meio indutor e não-indutor da glicoamilase.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. O fungo *Aspergillus niger*

O fungo filamentosso *Aspergillus niger* é classificado como Deuteromiceto, uma vez que não apresenta ou ainda não teve o seu ciclo sexual descrito. A alternativa de recombinação genética nesta classe de microrganismos é o ciclo parassexual, inicialmente descrito por PONTECORVO & ROPER (1952) em *Aspergillus nidulans*. Um ano depois, PONTECORVO et al. (1953a) descreveram este ciclo em *A. niger*, tendo sido relatado até hoje em diversas outras espécies (AZEVEDO, 1976; CATEN, 1981; RIBA & RAVELOJOANA, 1984; VIALTA, 1986).

O interesse por este fungo, se deve à sua capacidade de produção e secreção de ácidos orgânicos, metabólitos secundários e diversas enzimas, entre outras, glicoamilase (SMITH & PATEMAN, 1977; BERRY et al., 1977; BARBESGAARD, 1977; van BRUNT, 1986), além da capacidade de degradação de compostos complexos (SHAILUBHAI et al., 1984). Métodos clássicos de mutagênese e seleção levaram ao melhoramento de inúmeras linhagens. A partir dos anos 80 iniciou-se o desenvolvimento e a aplicação de técnicas genéticas moleculares em fungos filamentosos, tais como *Neurospora crassa* (PAIETTA & MARZLUF, 1985; VOLLMER & YANOVSKY, 1986) e *A. nidulans* (YELTON et al., 1984; WERNARS et al., 1985; MILLER et al., 1985) que, como consequência, possibilitaram a introdução de melhorias e adaptação da performance de linhagens industriais.

### 2.2. A enzima glicoamilase

A enzima glicoamilase (1,4- $\alpha$ -D-glucan glucohidrolase, EC 3.2.1.3.), cuja estrutura tridimensional foi elucidada por ALESHIN et al. (1992; 1994), HARRIS et al. (1993) e STOFFER et al. (1995), é uma exohidrolase capaz de hidrolisar as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6,

esta última com especificidade 500 vezes menor do que as ligações  $\alpha$ -1,4 (HIROMI et al., 1966a,b), da molécula de amido, assim como de oligo e polissacarídeos semelhantes ao mesmo (HIROMI et al., 1983; SIERKS et al., 1989). Nesta hidrólise ocorre a liberação progressiva de  $\beta$ -D-glicose a partir das extremidades não-redutoras da molécula do substrato (DIXON & WEBB, 1962; MUNCH & TRITSCH, 1990). A importância econômica desta enzima, produzida por diversas espécies de fungos filamentosos, recai em sua utilização na produção industrial de glicose a partir de amido (SAHA & ZEIKUS, 1989).

### 2.2.1. Glicoamilase de fungos filamentosos

A glicoamilase de fungos filamentosos é uma glicoproteína que ocorre em várias formas, com peso molecular e eficiência de hidrólise do amido cru variáveis, de acordo com a isoenzima e o microrganismo produtor. *A. niger* e *Aspergillus awamori* produzem basicamente duas formas da enzima, uma, denominada G1, com peso molecular em torno de 70 kDa, e outra, denominada G2, com peso molecular em torno de 60kDa (LINEBACK et al., 1969; SMILEY et al., 1971; BOEL et al., 1984a; NUNBERG et al., 1984; MONTENECOURT & EVELEIGH, 1985). O fungo *Rhizopus* apresenta três formas diferentes, de peso molecular 74kDa, 58,6kDa e 61,4kDa para as enzimas Gluc1, Gluc2 e Gluc3, respectivamente, como foi verificado por TAKAHASHI et al. (1978). Neste mesmo ano, YOSHINO & HAYASHIDA (1978) verificaram que *A. awamori* var. *kawachi* produz três formas diferentes de glicoamilase, GAI de peso molecular de 90kDa, GAI' de 83kDa e GAII de 57kDa.

Do ponto de vista da sua estrutura, os estudos iniciais de SVENSSON et al. (1982), NUNBERG et al. (1984) e HAYASHIDA et al. (1988) demonstraram que as formas G1 da glicoamilase de *A. niger* e GAI de *A. awamori* e *A. awamori* var. *kawachi* apresentam o sítio de ligação ao substrato na extremidade carboxílica, enquanto que na forma Gluc1 da glicoamilase de *Rhizopus*, localiza-se na extremidade amina da molécula (TAKAHASHI et al., 1985). Comparando a sequência de aminoácidos de G1 e Gluc1, TANAKA et al. (1986)

verificaram que, além dos sítios de ligação estarem em extremidades opostas, não há homologia entre os mesmos, sugerindo evolução molecular independente para a enzima de *A. niger* e *Rhizopus*.

A glicoamilase (glicoamilase I) de *Aspergillus* sp. apresenta 615 ou 616 aminoácidos, de acordo com a espécie produtora, sendo que a elucidação da estrutura tridimensional da mesma, revelou a presença de três domínios diferentes (SVENSSON et al., 1983; 1989). O domínio catalítico, localizado na extremidade amina (resíduos 1-470), o domínio de ponte (linker), apresentando-se altamente glicosilado nos resíduos treonina e serina (resíduos 471-508) e o domínio de ligação ao amido, na extremidade carboxílica da molécula da enzima, com aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos (SVENSSON et al., 1983; BOEL et al., 1984a; NUNBERG et al., 1984; HAYASHIDA et al., 1989a; SHIBUYA et al., 1990; HATA et al., 1991). Das espécies conhecidas como produtoras de glicoamilase, incluindo animais, plantas, bactérias e fungos, as espécies *A. niger* e *A. awamori* foram as mais estudadas, sendo que o seqüenciamento da forma G1 da enzima mostrou que a mesma é igual em ambas as espécies citadas (SVENSSON et al., 1983; NUNBERG et al., 1984). O domínio de ligação ao amido, comum a diversas enzimas amilolíticas, como mostraram os dados obtidos para a homologia desta seqüência, incluindo G1,  $\beta$ -amilase e ciclodextrina glicosiltransferase de bactérias e fungos, não afeta a capacidade catalítica da enzima frente a substratos solúveis, como maltodextrinas (ABDULLAH et al., 1963; HIROMI et al., 1983; JESPERSEN et al., 1991). No entanto, este domínio é importante na adsorção e degradação de grânulos de amido cru (SVENSSON et al., 1982; TAKAHASHI et al., 1985; HAYASHIDA et al., 1989a). Por outro lado, na ausência do domínio catalítico e da ponte, o domínio de ligação ao amido mantém a sua função (BELSHAW & WILLIAMSON, 1990). Estes autores produziram, mediante proteólise seguida de purificação, o referido domínio da glicoamilase 1 de *A. niger*, demonstrando que o peptídeo resultante, corresponde aos resíduos 471-616 da extremidade C-terminal, peso molecular de 25,1kDa e aproximadamente 38% de carboidratos (p/p). Este peptídeo não era capaz de hidrolisar grânulos de amido, porém mantinha a sua atividade frente ao amido solúvel, apresentando, no mínimo, dois sítios de

ligação para polissacarídeos (BELSHAW & WILLIAMSON, 1991, 1993; SIGURSKJOLD et al., 1994a)

A mutagênese sítio-dirigida do sítio ativo possibilitou a elucidação da importância de determinados resíduos de aminoácidos na atividade catalítica ou na estabilidade estrutural da enzima glicoamilase de *A. awamori* (SIERKS et al., 1989, 1990; SIERKS & SVENSSON, 1993, 1994; BAKIR et al., 1993).

Comparando a seqüência de aminoácidos de diversas enzimas amilolíticas COUTINHO & REILLY (1994), assim como HENRISSAT et al. (1994), verificaram que a posição do resíduo de triptofano nas posições 543, 563, 590 e 615, pertencentes ao domínio de ligação ao amido se mostra bem conservada. Utilizando-se destas informações e deletando seqüências do domínio de ligação ao amido da glicoamilase de *A. awamori*, CHEN et al. (1995) demonstraram que os 103 resíduos C-terminais da forma G1 da enzima são importantes para a ligação ao amido, e que deleções maiores alteram a conformação e a estabilidade da proteína, comprometendo a sua ligação ao substrato.

SORIMACHI et al. (1996) propuseram a existência de dois sítios de ligação, em função das observações feitas para o domínio de ligação da forma G1, realizadas por meio de espectrofotometria de ressonância magnética nuclear (NMR). O sítio de ligação 1 apresenta os resíduos W543, K578, W590, E591 e N595, enquanto que o sítio de ligação 2 é formado pelos resíduos T526, Y527, G528, E529, N530, D554 e W563. A existência de dois sítios de ligação já havia sido proposta por BELSHAW & WILLIAMSON (1993) e SIGURSKJOLD et al. (1994b), em função de estudos bioquímicos. SVENSSON et al. (1986b), após modificarem quimicamente os resíduos W615 e W590 sugeriram que os mesmos estariam envolvidos na ligação de grânulos de amido. WILLIAMSON et al. (1997) modificaram os resíduos W590 e W563 da glicoamilase de *A. niger*, que pertencem, respectivamente, aos sítios de ligação 1 e 2, por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR). Os resíduos mencionados foram trocados por resíduos de lisina pela utilização de iniciadores (primers) mutagênicos, e resultaram em produtos protéicos secretados por *A.*

*niger*, embora em quantidades bem inferiores ao domínio de ligação não modificado. No mesmo estudo concluíram também que o sítio de ligação 2 do domínio de ligação tem afinidade notadamente maior pelo substrato do que o sítio de ligação 1, verificando ainda que este último se mostra compacto e exposto, sem sofrer modificações quando da ligação ao substrato. O sítio 2 apresenta área maior e sofre rearranjo tridimensional após ligação ao substrato. Estes resultados favorecem a hipótese levantada por DIJKHUIZEN et al. (in WILLIAMSON et al., 1997), que sugere que o sítio de ligação 1 funciona como sítio de reconhecimento inicial, enquanto que o sítio 2 estaria envolvido na preparação do substrato para a degradação. Desta forma, o domínio de ligação não teria apenas função de ligação do substrato, mas estaria também envolvido no processo catalítico. Para o resíduo W615 WILLIAMSON et al. (1997) verificaram que o mesmo é importante para o dobramento (folding) correto da proteína, sugerindo ainda que é importante para a estabilidade estrutural do domínio de ligação ao substrato.

Da mesma forma como ocorre com outras invertases, dois grupos carboxílicos, Glu179 e Glu400, possuem, respectivamente, função de catalisador ácido e catalisador básico no mecanismo de reação estudado por HIROMI et al. (1966a), SVENSSON et al. (1990), SIERKS et al. (1990), HARRIS et al. (1993) e FRANDSEN et al. (1994). O catalisador ácido intervém na protonação do oxigênio glicosídico da ligação fraca, enquanto que o catalisador básico é responsável pela ativação da água para o ataque nucleofílico no carbono C-1.

Estudando o mecanismo de ligação da glicoamilase ao substrato, CHRISTENSEN et al. (1996), verificaram que o resíduo Glu180 está relacionado com a estabilidade e ligação ao substrato ou inibidores da glicoamilase pela formação de pontes de hidrogênio, assim como os resíduos Leu177 e Trp178. O resíduo Glu179, no entanto, é responsável pela doação de hidrogênio para o oxigênio glicosídico da ligação fraca. Os mesmos autores verificaram que o resíduo Asp176 é importante na eficiência catalítica e não na ligação com o substrato.

Analisando a glicosilação dos resíduos de aminoácidos presentes no domínio de ligação ao amido da glicoamilase de *A. niger*, GUNNARSON et al. (1984) verificaram que apenas três resíduos, Thr510, Thr511 e Thr513, são glicosilados predominantemente com manose. JACKS et al. (1995) concluíram, após estudos feitos por NMR (ressonância magnética nuclear), que o resíduo Thr 511 é o mais glicosilado dos três.

Estudando a importância do resíduo Glu400 do sítio catalítico básico por meio da troca deste resíduo por glutamina, FRANDBSEN et al. (1994) notaram que o mesmo afeta tanto a ligação ao substrato quanto a estabilização do complexo de transição.

Do ponto de vista evolutivo, ITOH et al. (1987) analisando glicoamilases próximas, observaram que as mesmas apresentam seis regiões altamente conservadas. A substituição de um único aminoácido situado em uma de cinco regiões conservadas permitiu a análise detalhada, com auxílio de raios-X, da função destes aminoácidos em relação às propriedades enzimáticas e à termoestabilidade.

A enzima glicoamilase, como outras glicosilases, é inibida por análogos de açúcar que apresentam um átomo de nitrogênio adjacente a C-1 (SVENSSON & SIERKS, 1992; SIGURSKJOLD et al., 1994a). Os estudos com inibidores da atividade enzimática da glicoamilase de *A. niger* tem levado à elucidação da importância de alguns resíduos de aminoácidos da mesma.

BERLAND et al. (1995) estudaram os mutantes listados a seguir:

- Trp120 → Phe (SIERKS et al., 1989)
- Asp176 → Asn e Glu180 → Gln (SIERKS et al., 1990)
- Tyr48 → Trp (FRANDBSEN et al., 1994)
- Ser119 → Tyr (SIERKS & SVENSSON, 1994)
- Asn171 → Ser; Gln172 → Asn; Thr173 → Gly; Gly174 → Cys e Tyr175 → Phe  
(STOFFER et al., in: BERLAND et al., 1995)
- Ser 185 → His (STOFFER et al., in: BERLAND et al., 1995)

- Arg54 → Lys; Arg54 → Leu; Arg305 → Lys; Asp 309 → Glu e Trp317 → Phe (FRANSEN et al., 1995)
- Trp52 → Phe (CHRISTENSEN, in: BERLAND et al., 1995)
- Tyr50 → Phe (FRANSEN, in: BERLAND et al., 1995)

Estas formas mutantes da glicoamilase foram estudadas do ponto de vista da ligação destas com dois inibidores específicos da enzima, a acarbose (análogo do tipo pseudotetrassacarídeo, que apresenta na extremidade não redutora um pseudoaçúcar, com uma dupla ligação e um átomo de nitrogênio no lugar do átomo de oxigênio glicosídico), um inibidor potente (TRUSCHEIT et al., 1981) e a 1-deoxinojirimicina (análogo da glicose, que apresenta um átomo de nitrogênio no lugar do oxigênio endocíclico, além de ser deoxigenado no centro anomérico). As glicoamilases mutantes selecionadas para este estudo, apresentam mutações que envolvem apenas um aminoácido situado próximo ao sítio ativo da enzima, e que determinam para cada uma delas a afinidade por cada um dos inibidores citados. BERLAND et al. (1995) verificaram que todas as glicoamilases mutadas continuavam ligando 1-deoxinojirimicina especificamente e todas ligavam acarbose, embora apresentassem variações acentuadas na afinidade pelos análogos de açúcares, bem como na entalpia e na entropia de ligação destes análogos.

### **2.3. Regulação da síntese de glicoamilase em *Aspergillus niger***

Quanto ao mecanismo que origina as diversas formas de glicoamilase, BOEL et al. (1984a) identificaram um único gene que codifica a glicoamilase de *A. niger*, sendo que o mesmo apresenta 5 introns. O menor destes, de 169 pares de bases, aparentemente está envolvido com o processamento diferencial do mRNA, uma vez que um mesmo gene dá origem às duas formas de glicoamilase (G1 e G2). Portanto, na G1, esta seqüência funciona como exon, e na G2 como intron. Retirando-se este intron, altera-se o quadro de leitura, o que segundo BOEL et al. (1984b), não leva apenas a uma enzima de peso molecular menor, mas com a extremidade carboxílica modificada. Segundo SVENSSON et al. (1986b) e

HAYASHIDA et al. (1989a,b), a forma GII surge por reação proteolítica limitada a partir da forma GI, demonstrando ausência do domínio de ligação ao amido e, em alguns casos, também da totalidade ou parte do domínio de ligação. BOEL et al. (1984b) não excluem a hipótese de SVENSSON et al. (1986a,b) e HAYASHIDA et al. (1989a,b) como possível mecanismo adicional para o surgimento das duas formas enzimáticas. Para os fungos *Rhizopus oryzae* e *A. awamori* var. *kawachi*, ASHIKARI et al. (1986) e YOSHINO & HAYASHIDA (1978) e HAYASHIDA et al. (1988), respectivamente, também sugeriram mecanismos pós-traducionais para a origem de diferentes formas de glicoamilase.

NUNBERG et al. (1984) identificaram um único gene estrutural para glicoamilase em *A. awamori*, que apresenta a mesma seqüência de aminoácidos e os mesmos introns encontrados para *A. niger*, o que é uma forte evidência para o fato destes dois fungos apresentarem o mesmo mecanismo dando origem às duas formas enzimáticas. Esta tese é reforçada pela identidade imunológica verificada por MONTENECOURT & EVELEIGH (1985).

Baseando-se na homologia de seqüências consenso, BOEL et al. (1984b) sugeriram a existência de dois mecanismos distintos para o processamento do gene da glicoamilase em *A. niger*. O primeiro deles, comum em genes de leveduras, é o auto-processamento (LANGFORD & GALLWITZ, 1983; PIKIELNY et al., 1983) e o segundo, é o mecanismo encontrado em células de eucariontes superiores (ROGERS & WALL, 1980).

BOEL et al. (1984a) verificaram que o mRNA da forma G1 da glicoamilase de *A. niger* apresenta 1920 nucleotídios, começando com o códon de iniciação ATG e terminando com o códon TGA. A forma G1 é sintetizada como precursor, de 640 resíduos de aminoácidos, com um peptídio sinal de 18 resíduos e um propeptídio de 6 resíduos, de forma que a enzima madura apresenta 616 resíduos. Dando seqüência a este estudo, BOEL et al. (1984b) encontraram dois inícios de transcrição no gene da glicoamilase de *A. niger*, situados 46 e 70 pares de bases acima do códon de iniciação (ATG). Na posição -35 e -100 pares de bases foram encontrados o TATA box e o CATA box, respectivamente.

A regulação da síntese de glicoamilase em fungos filamentosos provavelmente envolve outras enzimas amilolíticas e é um processo complexo. BARTON et al. (1972) sugeriram que uma outra enzima teria que ser responsável pelo início da degradação de amido, gerando moléculas de indutores para a enzima glicoamilase. Esta enzima poderia ser a  $\alpha$ -amilase, que, agindo sobre o amido, produz glicose, maltose e dextrinas, estas sim consideradas indutores da glicoamilase (FOGARTY & KELLY, 1977). FOWLER et al. (1990) notaram que em *A. niger* a xilose atua como repressor catabólico transcricional, e a sua ação repressora é revertida pela presença de glicose ou maltose no meio de cultura. O amido não é capaz de reverter a repressão exercida pela xilose, demonstrando que o mesmo não é o sinal que desencadeia a síntese de glicoamilase. Desta forma, a xilose agiria como repressor catabólico desta 2ª enzima e não diretamente da glicoamilase.

EL-GOGARY et al. (1989) demonstraram que em *Trichoderma reesei* opera um sistema de degradação de celulase semelhante ao descrito. Neste caso, níveis constitutivos baixos de atividade celulásica atuam sobre a celulase, ocorrendo a liberação de moléculas pequenas capazes de penetrar na célula e induzir todo o sistema.

O estudo da regulação de enzimas amilolíticas em outros fungos permite estabelecer analogias com *A. niger*.

WIRSEL et al. (1989) verificaram que *Aspergillus oryzae* apresenta três cópias do gene da  $\alpha$ -amilase, também chamada taka-amilase A, e sugeriram que a regulação da síntese da enzima envolve a indução e repressão catabólica. Segundo ERRAT et al. (1984) e TADA et al. (1991), a indução ocorre na transcrição, uma vez que se verificaram elevadas concentrações da enzima no meio de cultivo transcorridas 20 horas de fermentação (ERRAT et al., 1984).

KORMAN et al. (1990) notaram em *A. awamori* a presença de duas cópias do gene da  $\alpha$ -amilase, sendo que BHELLA & ALTOSAAR (1987) tinham proposto que a regulação ocorre pela repressão catabólica traducional, e não pela indução. Isto significa que, para que

ocorra a tradução da enzima não há necessidade da presença de um indutor, bastando apenas a ausência do repressor catabólico. Neste mesmo fungo, BHELLA & ALTOSAAR (1988) verificaram que a enzima glicoamilase sofre repressão catabólica por AMPcíclico, enquanto que NUNBERG et al. (1984) demonstraram que a regulação da indução se dá na etapa de transcrição.

Diferente do que ocorre em *A. awamori*, GHOSH et al. (1990) notaram que em *Aspergillus terreus* a síntese de glicoamilase sofre indução e repressão catabólica, sendo que a presença de  $\alpha$ -amilase foi demonstrada nos estágios iniciais da fermentação, mesmo com elevadas concentrações de glicose, sugerindo aos autores que a  $\alpha$ -amilase não sofre repressão catabólica.

Existe ainda a possibilidade das enzimas extracelulares serem reguladas pós-tradução, ou seja, durante a sua secreção. JAMIESON & PALADE (1967a,b; 1968a,b); PALADE (1975) e NOVICK et al. (1980) estudaram o processo de secreção em eucariontes superiores demonstrando que o mesmo é semelhante ao processo secretório encontrado em leveduras. NOVICK et al. (1980) verificaram que o processo de secreção envolve no mínimo 23 produtos gênicos, demonstrando por mutantes duplos a seqüência de eventos que ocorre. As proteínas são glicosiladas passo a passo na medida em que são transportadas do seu sítio de secreção na membrana plasmática (NOVICK et al., 1981).

#### **2.4. Transformação de *A. niger***

O interesse dos geneticistas na compreensão dos mecanismos de regulação e expressão em fungos se deve ao fato de que, sendo microrganismos eucariontes, eles servem de modelo de estudo para eucariontes ainda mais complexos. Outro fator importante é o fato dos fungos permitirem a expressão de genes heterólogos de eucariontes superiores, o que em sistemas procarióticos é difícil de acontecer. Estes genes são introduzidos em fungos filamentosos via vetores especialmente construídos e inseridos por meio de transformação.

Fungos filamentosos geralmente são bons secretores de proteínas, o que facilita, e como consequência barateia, a extração das mesmas do caldo de fermentação, outro fator importante em fungos de interesse industrial.

Os fungos filamentosos freqüentemente oferecem diversas vias de transformação. Em espécies de *Neurospora* utilizam-se preferencialmente os macroconídios germinados, uma vez que os mesmos são predominantemente multinucleados, enquanto que os microconídios, uninucleados, são mais difíceis de serem obtidos. Em espécies de *Aspergillus* e de *Penicillium* a transformação pode ser obtida em conídios germinados ou micélio jovem, que pode ser crescido sobre celofane ou em meio líquido, com ou sem agitação (FINCHAM, 1989).

A partir da introdução e do domínio de técnicas genéticas moleculares cada vez mais sofisticadas, tornou-se possível provocar alterações direcionadas no genoma de um microrganismo, entre elas introdução de um fragmento de DNA, que pode ser um gene ou parte dele, e que mantém as suas características de replicação e expressão, talvez seja uma das mais interessantes quando se deseja o melhoramento de uma linhagem industrial. O direcionamento que as técnicas moleculares permitem, muitas vezes as tornam superiores às técnicas clássicas (HOLT & SAUNDERS, 1985).

A primeira transformação em fungos filamentosos foi conseguida por MISHRA & TATUM (1973) em linhagem de *N. crassa* deficiente para inositol (*inl*) por meio de DNA de linhagem selvagem (*inl*<sup>+</sup>) na presença de íons cálcio. Em 1979, MISHRA conseguiu demonstrar que a transformação de *inl* via DNA de um mutante com alelo *inl*/sensibilidade à temperatura resultava em transformantes sensíveis à temperatura, o que não poderia ser explicado pela reversão espontânea.

Nessa mesma época foram feitos alguns avanços importantes na transformação de *Saccharomyces cerevisiae*, com a preparação e estabilização de protoplastos (HUTCHINSON & HARTWELL, 1967), a transformação dos protoplastos na presença de

cálcio (HINNEN et al., 1978) e a construção de um vetor bifuncional para *Escherichia coli/Saccharomyces cerevisiae* (BEGGS, 1978), que impulsionaram a transformação em fungos filamentosos. Inicialmente, os fungos utilizados foram *N. crassa* (MISHRA & TATUM, 1973; CASE et al., 1979) e *A. nidulans* (BALLANCE et al., 1983; TILBURN et al., 1983), baseado nos protocolos desenvolvidos para *S. cerevisiae* (BEGGS, 1978; HINNEN et al., 1978), estendendo-se em seguida para uma ampla variedade de fungos (FINCHAM, 1989).

Outro fungo filamentoso, que desperta interesse devido à eficiência na secreção de proteínas é o *A. niger*, primeiramente transformado por KELLY & HYNES (1985) com um gene heterólogo dominante de *A. nidulans*.

Devido à proximidade taxonômica entre *A. niger* e *A. nidulans*, as primeiras transformações feitas com *A. niger* foram baseadas nos protocolos elaborados para *A. nidulans*, inclusive utilizando-se genes heterólogos desta espécie. Incubando protoplastos de *A. nidulans*, com deleção no gene estrutural para acetamidase, com plasmídio derivado do pBR322 contendo o gene estrutural para a mencionada enzima, permitiu a TILBURN et al. (1983) obterem 25 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA. O aumento da frequência de transformação, tentada com o uso de plasmídio contendo um fragmento da seqüência de DNA ribossomal repetitivo (ribossomal repeat) de *A. nidulans*, ou um fragmento que provavelmente seria a origem mitocondrial de duplicação do mesmo fungo, juntamente com o gene para acetamidase, não foi possível. No mesmo estudo, constataram que o plasmídio e a seqüência correspondente ao gene para acetamidase foram integrados ao genoma do mencionado fungo. Na literatura existem inúmeros trabalhos relatando a clonagem direta de vários genes de *A. nidulans* por complementação, entre eles o de BALLANCE & TURNER (1986), que clonaram o gene *acuD*, da isocitrato liase, o de BUXTON et al. (1989), que clonaram o gene de resistência ao selenato.

KELLY & HYNES (1985) utilizaram o plasmídio p3SR2, que têm inserido o gene *amdS<sup>+</sup>* de *A. nidulans* (TILBURN et al., 1983) para transformar uma linhagem selvagem de

*A. niger* baseando-se em protocolo elaborado por TILBURN et al. (1983), o que permitiu a obtenção de 3 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA. BUXTON et al. (1985) obtiveram praticamente a mesma taxa de transformação, quando transformaram uma linhagem mutante de *A. niger* com o plasmídeo pBB116, descrito por BERSE et al. (1983), e que apresenta o gene *argB*<sup>+</sup> de *A. nidulans*.

Uma das tentativas feitas para aumentar a taxa de transformação em *A. niger*, levou GOOSEN et al. (1987) a usar um vetor com um gene homólogo. O gene *pyr4*<sup>+</sup>, que codifica a orotidina-5'-fosfato descarboxilase de *A. niger* presente no vetor pGW613, foi utilizado para transformação de dois diferentes mutantes *pyrA*<sup>-</sup> de *A. niger*, elevando as taxas de transformação para 30 a 50 e 8 a 10 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA, respectivamente.

Utilizando-se do protocolo de YELTON et al. (1984), e após construírem um vetor que apresenta o gene de resistência à higromicina, *hph*, PUNT et al. (1987) obtiveram 5 a 20 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA para *A. niger*.

Em 1987, van HARTINGSVELDT et al. (1987) clonaram o gene para oritidina-5'-fosfato descarboxilase no plasmídeo pUC19, denominando este novo plasmídeo de pAB4-1, obtendo 40 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA para *A. niger*.

KÜCK et al. (1989) construíram um vetor que continha a extremidade 5' do gene *pcbC* de *Cephalosporium acremonium*, que codifica a isopenicilina N sintetase, flanqueando o gene *hph* de *E. coli*. O sistema se mostrou altamente eficiente, permitindo a obtenção de aproximadamente 10<sup>4</sup> transformantes de *A. niger*/ $\mu\text{g}$  de DNA, adotando os procedimentos de transformação descritos por TILBURN et al. (1983) e van HARTINGSVELDT et al. (1987).

Usando como marca seletiva o *amdS* e um cosmídeo, contendo 4 cópias do gene *glaA*, VERDOES et al. (1993) construíram linhagens de *A. niger* super-produtoras da enzima glicoamilase, obtendo transformantes com até 200 cópias do gene de interesse. Nos

transformantes analisados, os autores verificaram que a integração ocorrera em apenas um cromossomo. Na maioria dos transformantes observaram aumento da produção da enzima, embora não houvesse uma proporcionalidade entre o número de cópias do gene e a produção da enzima. No entanto, observaram uma correlação nítida entre o nível de produção da enzima e a concentração de mRNA específico, o que os levou a concluir que a produção de glicoamilase é limitada na etapa de transcrição.

No início dos anos 90, GEMS et al. (1991) construíram um vetor com o gene *argB*, que codifica para ornitina carbamoil transferase de *A. nidulans* e uma sequência de aproximadamente 6kb, denominada AMA1, com função de estrutura de duplicação autônoma, o que aumentou em 250 vezes a taxa de transformação do mencionado fungo.

O desenvolvimento de metodologia melhorada para transformação por complementação de alelos foi descrita por VERDOES et al. (1994b) para *A. niger*, pelo uso de um vetor de duplicação autônomo, pAB4-ARp1. Este vetor fora anteriormente construído pela introdução da sequência AMA1, envolvida na duplicação autônoma, em um vetor integrativo *pyrG*, denominado pAB4-1. A utilização deste vetor permitiu o aumento em torno de 10000 vezes na frequência de transformação, quando comparado com a frequência obtida para o plasmídeo pAB4-1, o mesmo acontecendo na cotransformação. No entanto, os transformantes pAB4-ARp1 se mostraram instáveis na mitose.

Avaliando a possibilidade de melhorar o desempenho de linhagens de *A. niger* na produção de glicoamilase, VERDOES et al. (1994a) introduziram cópias adicionais do gene *glaA* por recombinação genética ou retransformação. Os resultados mostraram nitidamente que a integração do gene nos transformantes ocorrera em apenas um grupo de ligação, sendo que a produção de glicoamilase por estas linhagens era dependente do sítio de integração do gene. A introdução de cópias adicionais do gene para glicoamilase por recombinação genética não elevou a produção da enzima quando comparada com as linhagens parentais, e em alguns casos a recombinação acarretou a instabilidade genética, resultando em perda frequente de cópias de *glaA*. Da mesma forma a retransformação de

*linhagens* com múltiplas cópias do gene não significou acréscimo na produção da enzima, verificando-se inclusive um efeito contrário, com perda parcial da atividade. A análise destes transformantes por hibridação DNA-DNA (Southern) sugeriu que as cópias dos genes introduzidos sofrem rearranjo, explicação parcial dos resultados encontrados para a atividade enzimática. Análise mais detalhadas de um dos transformantes evidenciou que a super-produção da enzima também era limitada pela concentração de proteínas reguladoras.

Em fungos filamentosos, o DNA exógeno geralmente é integrado ao genoma ou então, raramente, se mantém de forma autônoma, com duplicação independente do DNA cromossomal, como acontece em bactérias. Para esta segunda possibilidade existem alguns trabalhos publicados, que relatam a ocorrência deste mecanismo em *Podospora anserina* e *N. crassa* (TUDZYNSKY et al., 1980; STOHL & LAMBOWITZ, 1983), além de algumas espécies de *Aspergillus* (GEMS et al., 1991). A integração pode ocorrer em sítios homólogos ou heterólogos. Por analogia com os mecanismos encontrados em leveduras (HINNEN et al., 1978), podem ser considerados três tipos diferentes de mecanismos envolvidos na integração de DNA exógeno nos fungos filamentosos, descritos a seguir:

Tipo I : a integração em um locus homólogo por meio de recombinação simples, sendo que a ocorrência de cópias múltiplas é resultado de recombinação antes ou depois da integração.

Tipo II : integração em sítios de homologia fraca ao acaso, por meio de recombinação simples, sendo que as recombinações dentro de um gene podem levar à inativação do mesmo.

Tipo III : integração no locus homólogo mediante dupla recombinação que leva à conversão gênica. As seqüências bacterianas não são detectáveis neste tipo de integração.

A transformação de um mutante *pyrG* de *A. nidulans* com o gene *pyr4* de *N. crassa*, que codifica para a orotidina-5'-fosfato descarboxilase, mostrou a BALLANCE & TURNER (1985) que a mesma ocorreu por integração cromossomal, apesar da reduzida homologia entre os dois genes envolvidos.

MILLER et al. (1985), trabalhando com *A. nidulans*, fizeram três séries de experimentos com o intuito de verificar a possível substituição de regiões homólogas do DNA deste fungo por meio de transformação. No primeiro introduziram um fragmento linear de DNA contendo o alelo heteromórfico *trpC*<sup>+</sup> para transformar uma linhagem *trpC*<sup>-</sup> em *trpC*<sup>+</sup>, e verificaram que neste caso o alelo heteromórfico tinha substituído o alelo *trpC*<sup>-</sup> na minoria dos transformantes obtidos. No segundo experimento, um gene *trpC*<sup>+</sup> deste fungo foi inserido no gene *arg*<sup>+</sup>, sendo que um fragmento linear de DNA, contendo o alelo *argB* resultante foi usado para transformar uma linhagem *trpC*<sup>-</sup>*argB*<sup>-</sup> para *trpC*<sup>+</sup>, verificando que neste caso aproximadamente 30% dos transformantes era simultaneamente *argB*<sup>-</sup>. O alelo *argB* tinha substituído o alelo selvagem na maioria destas linhagens. No último experimento, os autores modificaram o gene SpoC1 C1-C do mesmo fungo por remoção de um fragmento interno e introduziram o mesmo numa linhagem *trpC*<sup>-</sup> via transformação com um plasmídeo. Um transformante, que apresentava uma duplicação tandem da região C1-C separado por fragmento de plasmídeo, foi auto-fertilizado, selecionando-se progênie *trpC*<sup>-</sup>. Todos tinham perdido as seqüências plasmidiais e aproximadamente metade deles tinham retido o gene C1-C modificado e perdido a cópia selvagem. Isto demonstrou que é possível substituir DNA cromossomal por fragmentos de DNA clonados e modificados in vitro, utilizando procedimentos de uma ou duas etapas.

Em 1986, DURRENS et al., conseguiram demonstrar em *A. nidulans*, por utilização de técnicas genéticas tradicionais aliadas à análise de hibridização DNA-DNA (Southern), que dois dos quatro transformantes para o gene *prn*, responsável pelo catabolismo de prolina, apresentavam múltiplas cópias do plasmídeo inseridas em grupos de ligação que não o VII, que apresenta o cluster para *prn*. Nos outros dois transformantes obtidos, os autores concluíram que, a integração do plasmídeo teria ocorrido de forma homóloga, sendo que o fenótipo destes transformantes se mostrou de acordo com a presença de número aumentado de cópias e conseqüente aumento na expressão do gene. A manipulação genética destes transformantes, por meio do ciclo sexual ou parassexual, mostrou aos autores que os processos de recombinação ocorridos durante e possivelmente após a integração do DNA transformante podem levar a lesões mutagênicas, principalmente deleções.

WERNARS et al. (1987) notaram que, transformando linhagens de *A. nidulans* deletado para *amdS320* com um vetor contendo o gene selvagem juntamente com uma seqüência de DNA, os transformantes *amdS+* eram cotransformados com elevada freqüência. A cotransformação de um mutante duplo, *amdS320; trpC801*, mostrou que a freqüência de cotransformação dependia tanto da relação molar entre os dois vetores, como da concentração de vetor cotransformante.

Em *Podospora anserina*, COPPIN-RAYNAL et al. (1989) desenvolveram um método que permitiu a eles a substituição de uma seqüência de DNA por meio de transformação em duas etapas. A inserção homóloga do DNA é atingida por meio da utilização de cosmídios, determinada por hibridação DNA-DNA mostrando que ocorrera duplicação da seqüência separada pelo vetor. Este arranjo se mostrou instável em cruzamentos, devido à freqüente excisão do vetor junto com o marcador seletivo e uma cópia da seqüência duplicada, a residente ou introduzida. A distinção das duas seqüências duplicadas é feita em função de RFLP. Neste fungo a duplicação é “tratada” de forma diferente do que ocorre em *N. crassa* ou *Ascobolus immersus*.

A transformação para linhagens de *Metarhizium anisopliae*, resistentes ao benomil, foi objetivo de GOETTEL et al. (1990), que utilizaram o plasmídio pBENA3, que apresenta o alelo *benA3* de *A. nidulans*. A hibridação DNA-DNA indicou que houve integração por recombinação não-homóloga em diversos sítios do genoma do fungo entomopatogênico. Por outro lado, não havia evidências para a duplicação autônoma do plasmídio nos transformantes. A concentração de benomil suportada pelos transformantes era 10 vezes superior à linhagem selvagem, sendo que os mesmos se mostraram estáveis em meio seletivo e não seletivo.

Trabalhando com o fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea*, HAMADA et al. (1994) transformaram o mesmo, via protoplastos, com o plasmídio pAN7-1 que carrega o gene que codifica para higromicina fosfotransferase (*hph*), e que confere resistência à higromicina B abaixo de um promotor de *A. nidulans*. A análise molecular dos transformantes mostrou que

a integração do plasmídio ocorreu em dois sítios diferentes do genoma de *B. cinerea*, por recombinação não-homóloga, sendo que os transformantes expressavam a enzima de interesse dos autores. Os transformantes obtidos se mostraram estáveis mesmo após várias sub-culturas em meio não seletivo.

KELLY et al. (1994) transformaram o fungo *Zalerion arboricola* com DNA heterólogo de *E. coli*, de forma a obter transformantes resistentes à higromicina. Os transformantes diferiam quanto ao número de cópias do plasmídio integrado e ao sítio de integração. A adição de uma seqüência de duplicação autônoma de *A. nidulans* (AMA1) ao plasmídio utilizado na transformação, aumentou a freqüência de transformação, mas ao mesmo tempo levou a maior número de transformantes abortivos. No entanto, os autores não acreditaram que a seqüência AMA1 possa ser responsabilizada pela duplicação do plasmídio em *Z.arboricola*.

A técnica da eletroforese CHEF em gel permitiu a XUEI & SKATRUD (1994) verificarem que na transformação de linhagens OC-1 de *A. nidulans* via protoplastos, o DNA transformante provocou alterações cariotípicas em todos os transformantes obtidos por comparação do mesmo antes e depois da transformação. As alterações cariotípicas observadas incluem perda cromossomal, modificações radicais de tamanho e aparecimento de cromossomos maiores, embora todas estas alterações moleculares do cariótipo se mostraram estáveis.

Uma inovação na transformação de fungos foi a utilização de RNA no lugar de DNA como agente transformante, técnica esta denominada de retrotransformação por ZUCCHI et al. (1989), que utilizaram RNA total de uma linhagem selvagem de *Aspergillus nidulans* para corrigir alterações genéticas, via protoplastos de uma outra linhagem da mesma espécie (ribo, paba, bio, w, Acr). Os resultados obtidos demonstram que, de fato, ocorreu transformação genética, uma vez que este fenômeno era inibido na presença de ribonuclease pancreática. Os autores propuseram o termo retrotransformação depois de verificar que o RNA introduzido na célula receptora restaurava as informações genéticas selvagens.

Uma técnica introduzida no final dos anos 80 é a eletroporação, método utilizado por GOLDMAN et al. (1990) para transformar *Trichoderma harzianum* com o gene que codifica para higromicina B fosfotransferase como marca de seleção, mais o promotor *gpd* e o terminador *trpC* de *A. nidulans*. A frequência de transformação obtida foi de até 400 transformantes/ $\mu$ g de DNA, sendo que os transformantes obtidos eram estáveis fenotipica e mitoticamente.

No intuito de estabelecer uma metodologia simplificada para transformar fungos filamentosos, OZEKI et al. (1994), transformaram conídios intactos em germinação, com a vantagem de diminuir o tempo de aparecimento dos transformantes quando comparado com transformantes obtidos via protoplastos. Em relação à frequência de transformação os autores verificaram que sem tratamento prévio dos conídios, a frequência obtida foi de 1,2 colônias/ $\mu$ g de vetor integrativo e 100 colônias/ $\mu$ g de plasmídeo, enquanto que o pré-tratamento com enzimas líticas favorecia a frequência de transformação, permitindo a obtenção de número de transformantes duas vezes maior. Na análise dos transformantes os autores verificaram que ocorrera integração homóloga e não-homóloga do vetor de integração no genoma do fungo, da mesma forma como ocorre em protoplastos. No entanto, o plasmídeo fora mantido predominantemente na forma livre com integração mínima no cromossomo, quando da utilização de eletroporação ou do método convencional de transformação.

O bombardeamento através de técnicas de biobalística de conídios intactos de *A. nidulans*, auxotrófico para arginina, com microprojéteis, permitiu a FUNGARO et al. (1995), pela primeira vez, a obtenção de transformação em conídios via este processo, com produção de 81 transformantes/ $\mu$ g de DNA.

SAHA & DAS (1995) lograram transformar mutantes *lys-* de *Aspergillus ochraceus*, mantidos em condições de restrição de nutrientes durante 15 dias, pela exposição ao DNA da linhagem selvagem. Segundo os autores, a capacidade transformante do DNA doador

dependia da temperatura e da variação de pH, além do período de restrição e da concentração do mesmo.

ALEKSENKO et al. (1995) submeteram uma linhagem selvagem de *Penicillium canescens* à mutagênese de forma a obter 150 mutantes resistentes a clorato e classificados de acordo com a capacidade de utilização de diferentes fontes de nitrogênio. Os mutantes presumidamente deficientes para nitrato reductase foram transformadas por eles com o gene correspondente de *A. niger*. Os autores levantaram a hipótese da ocorrência de integração não-homóloga do vetor no cromossomo. A cotransformação com o elemento replicador AMA1 de *A. nidulans* permitiu aos autores incrementar a frequência de transformação em 2000 vezes, e resultou na manutenção autônoma do vetor.

GARCÍA-PEDRAJAS & RONCERO (1996) desenvolveram metodologia para a transformação altamente eficiente de *Fusarium oxysporum*, baseado na complementação de um mutante para nitrato reductase com o gene homólogo *nit1* na presença de seqüências ARS e teloméricas, o que permitiu a obtenção de 5600 transformantes/ $\mu$ g de DNA.

## 2.5. Produção de metabólitos de interesse industrial

Glicoamilases são extensivamente utilizadas na indústria para a produção de xarope de glicose e frutose a partir de amido, bem como na produção de bebidas alcólicas (SAHA & ZEIKUS, 1989). É por este motivo que a enzima tem sido alvo de inúmeros trabalhos para estabelecer as condições fisiológicas mais favoráveis para a sua produção.

BARTON et al. (1972) verificaram que *A. niger* produz baixas concentrações de glicoamilase quando utilizaram meio de cultura contendo sorbitol como fonte de carbono, e a substituição desta por glicose, maltose ou amido levava à maior atividade enzimática. As formas G1 e G2 da enzima eram produzidas em meio contendo extrato de levedura, enquanto que em meio com cloreto de amônia como fonte de nitrogênio resultava na síntese

apenas da forma G1. A indução da glicoamilase por maltose independia da concentração de sulfato, porém mostrava dependência do pH baixo, em torno de 2, diminuindo com o aumento do pH e ausência de fontes de carbono utilizáveis.

ALAZARD & RAIMBAULT (1981) observaram que a produção de enzimas amilolíticas por *A. niger* era 1,5 vezes maior em meio sólido quando comparado ao meio líquido.

LEWIS & SINKAR (1981) verificaram que a concentração máxima de enzima produzida por *A. niger* dependia do ajuste inicial do pH do meio em 3,0-5,0, e a temperatura ótima em condições estacionárias se encontrava na faixa de 26-28°C, embora em temperaturas mais elevadas a biomassa era maior e o crescimento hifal acelerado. A quantidade ótima de glicose e peptona no meio se encontrava em 2 e 3%, respectivamente, e a produção de glicoamilase era maximizada pela presença de elementos traço.

Mais recentemente, ELEGADO & FUJIO (1993) utilizaram para produção otimizada de glicoamilase de *A. niger* meio de cultura semi-sólido consistindo de 20% de farelo de trigo, 2% de amido de milho, suplementado com extrato de carne, extrato de levedura e peptona.

SOCCOL et al. (1994a), estudando a produção de glicoamilase por três linhagens de *Rhizopus spp* verificaram que a produção de enzima era favorecida em fermentação feita em meio semi-sólido em comparação com meio líquido. Notaram também que a produtividade para glicoamilase era maior em meio com mandioca cozida em meio semi-sólido, exceto para uma das linhagens, *R. oryzae* 28627, que produzia melhor em meio semi-sólido com mandioca crua.

Nesse mesmo ano, SOCCOL et al. (1994b), ampliando o número das linhagens de *Rhizopus spp* estudadas para dezenove, observaram que todas as linhagens apresentavam produção ligeiramente maior de glicoamilase quando cultivadas em meio com mandioca

crua. A linhagem *Rhizopus delemar* ATCC 34612 ainda foi submetida a estudos aprofundados da produção de glicoamilase em condições variáveis de temperatura, tamanho do inóculo e umidade do meio de cultura. As condições mais favoráveis se verificaram para temperaturas de 35°C, umidade entre 50 e 52% e inóculo de  $2 \times 10^7$  esporângios/g de peso seco de meio de cultura.

No mesmo ano, PANDEY et al. (1994a) notaram que a atividade de água inicial igual a 0,936 no meio de cultura semi-sólido favorecia o crescimento micelial e a atividade de glicoamilase em relação a *A. niger*, confirmando os achados de GERVAIS (1990), quanto à importância deste parâmetro na produção de metabólitos.

Ainda em 1994, PANDEY et al. (1994b), ensaiaram diversas fontes de nitrogênio, orgânicas e inorgânicas, na produção de glicoamilase de *A. niger* em meio semi-sólido de farelo de arroz. Entre os sais de amônio utilizados, o sulfato mostrou ser o mais benéfico, quando comparado com fosfato e nitrato. Em relação à fonte de nitrogênio orgânico e à produção de glicoamilase, peptona e corn steep liquor apresentaram resultados iguais. SCHRICKX et al. (1995) notaram que em condições de cultura contínua, utilizando as linhagens *A. niger* N402 e uma linhagem transformante da mesma espécie, e de elevada produção de glicoamilase, a produtividade da enzima era maior na presença de sulfato de amônio, enquanto que na ausência do sal a fonte de nitrogênio passava a ser o próprio micélio. Em relação à biomassa, na presença do mencionado sal, a morfologia das hifas tinha aspecto característico, ocorrendo modificação das mesmas em sua ausência.

Comparando o efeito do pH no meio de cultura relacionado com o tipo de fermentação para produção de glicoamilase por *A. awamori* NRRL3112, KILIKIAN (1995) notou que, no processo descontínuo, a produção da enzima é 58% maior em pH 5,0 quando comparado com pH 4,0. Por outro lado, quando em processo contínuo a influência do pH deixava de se notar. A análise da taxa específica de produção da enzima, e o fato da concentração de glicose seguir padrões totalmente diferentes nos dois tipos de processos de fermentação, levou o autor a concluir que, além de cada tipo de processo apresentar pH

ótimo para produção de glicoamilase, o microrganismo apresenta sensibilidade maior ao efeito repressor da glicose em pH 4,0 quando comparado com pH 5,0.

FUJIO & MORITA (1996), trabalhando com *Rhizopus* sp. A-11, estudaram o efeito de diversos metais na produção de glicoamilase em meio líquido com amido de mandioca, e em meio semi-sólido de farelo de trigo e amido de mandioca. Os resultados obtidos por eles apontam produção 4,6 vezes maior de enzima em meio líquido na presença de zinco, magnésio e ferro.

MACEDO et al. (1997) compararam o desempenho do processo descontínuo tradicional em relação ao processo descontínuo com pulsos de amido, proveniente de mandioca, na síntese de glicoamilase por *A. awamori* NRRL 3112, em meio de cultura à base de farinha de mandioca. Neste estudo, os autores notaram, que não há diferença entre os dois tipos de processo em relação à produtividade da enzima.

## **2.6. Instabilidade genética**

Em microrganismos de interesse industrial, que freqüentemente são obtidos mediante tratamento com agentes mutagênicos físicos e químicos, a instabilidade tem sido descrita em diversos trabalhos. A instabilidade destes microrganismos pode ser dividida em dois tipos. O primeiro tipo se refere às flutuações de produção de um determinado metabólito que se observam para uma mesma linhagem quando submetida à fermentação. Uma possível explicação poderia estar nas mínimas diferenças na composição química do meio de cultura utilizado, bem como nas diferenças nas condições físicas da fermentação, incluindo-se aqui o pH do meio, a temperatura de incubação, maior ou menor concentração de substâncias contaminantes, e que podem influenciar o metabolismo do microrganismo.

Este fenômeno têm sido descrito na literatura nos trabalhos de GARDNER et al. (1956) para o fungo *A. niger* e MERRICK (1975) para *A. nidulans*. AZEVEDO &

---

BONATELLI Jr. (1982) verificaram variação acentuada na produção de ácido cítrico utilizando a linhagem 10v10 de *A. niger*.

O segundo tipo de instabilidade está relacionada com o aparecimento de derivativos com alteração na produção de um determinado metabólito, sendo que geralmente ocorre diminuição acentuada da mesma. Este fenômeno vêm sendo observado há longa data.

Trabalhando com *A. niger*, YUILL (1952) verificou o surgimento de dois mutantes diferentes, um dos quais apresentava taxa de crescimento e de produção de ácido cítrico diminuída. BAINBRIDGE & ROPER (1966), estudando os fatores genéticos que afetam a morfologia de *A. nidulans*, observaram um processo espontâneo de instabilidade. Os autores trabalharam com um variante com colônias “rugosas”, da progênie de cruzamentos de duas linhagens normais. Analisando esse variante, os autores verificaram que o mesmo apresentava duplicação de um segmento cromossomal, resultante de uma translocação não recíproca de um segmento do cromossomo III para o VIII. Apresentava ainda instabilidade vegetativa e setores que apresentavam taxa de crescimento e morfologia normal. Os autores concluíram que os revertentes provavelmente tinham perdido um fragmento de tamanho variável do segmento cromossomal duplicado, sendo que esta perda podia ocorrer no segmento translocado ou não.

NGA & ROPER (1968) estudaram a linhagem A de *A. nidulans*, que apresenta duplicação de um segmento do cromossomo I translocado para o cromossomo II. Esta linhagem possui marcadores para a coloração de conídios localizados no segmento duplicado, além de marcas para requisitos nutricionais, fazendo dela uma linhagem apropriada para estudos genéticos. Os autores verificaram que a mencionada linhagem pode dar origem aos seguintes tipos de setores:

1) melhorados: estes setores apresentam morfologia e crescimento semelhantes à linhagem normal. Esses variantes resultam da perda parcial ou total do segmento duplicado. A perda parcial pode ser intersticial e ocorre com frequência maior no segmento

translocado. Dependendo do cromossomo que perde o segmento duplicado, o I ou o II, os setores resultantes serão verdes ou amarelos, respectivamente.

2) deteriorados: apresentam grau de instabilidade maior ou menor do que a linhagem duplicada, e textura e coloração variáveis. Os setores deteriorados podem surgir por inversão, novas duplicações em tandem ou transposição do segmento duplicado (NGA & ROPER, 1968; AZEVEDO & ROPER, 1970).

3) heterocarióticos: apresentam mistura de conidióforos com conídios verdes e amarelos, sendo que um deles pode ter mistura de conídios. Esses setores ocorrem em baixa frequência e podem ter um dos componentes letais, em decorrência da deleção de um segmento maior do que o duplicado (ROPER & NGA, 1969).

NGA & ROPER (1969) propuseram o termo “não conformidade mitótica”, para a instabilidade cromossômica na mitose.

AZEVEDO & ROPER (1970) verificaram que a instabilidade dos setores morfológicos deteriorados, originados a partir de linhagens com duplicação IR → IIR, poderia ser explicada por novas duplicações em um ou no outro segmento em duplicata. Conseguem-se o aumento da estabilidade pela ocorrência de transposição, de uma parte ou da totalidade do material genético extra, para um outro sítio do genoma onde não haja duplicação.

Após estocagem e transferência frequente, MacDONALD (1968), verificou o surgimento de colônias com reduzida produção de penicilina em linhagem de *P. chrysogenum* concluindo que a perda de produção era devida a controle nuclear. Contrariando esta colocação, MAYNE et al. (1971), analisando a diminuição de produção de aflatoxina em *A. parasiticus*, concluíram que a mesma estaria relacionada com a presença de um fator citoplasmático do micélio e não dos esporos.

BALL (1971), no entanto, observou instabilidade ligada a um fator cromossomal nos estudos realizados com *P. chrysogenum*. BALL e AZEVEDO (1976) consideraram que em

fungos de interesse industrial, a instabilidade deve ser considerada indesejada, quando leva ao surgimento de variantes de baixa produção, e desejada quando permite a obtenção de recombinantes com características de interesse. Estes autores mencionam a grande instabilidade característica em linhagens aneuplóides e em aquelas com duplicação parcial do genoma. Em 1978, BONATELLI Jr. sugeriu que a instabilidade da linhagem 10v10 de *A. niger* seria devida à heterocariose, em função do surgimento de setores a partir de colônias crescidas em meio mínimo, juntamente com a baixa viabilidade dos conídios neste meio e ausência de setores em meio completo.

Neste mesmo ano, MENEZES & AZEVEDO (1978), estudaram seis revertentes obtidos a partir de variantes originados da linhagem de *A. nidulans* com duplicação IR → IIR. A análise genética permitiu, aos autores, concluir que cinco dos revertentes eram devidos a supressores e o outro, provavelmente era causado por mutação reversa. Verificaram ainda, que os supressores segregavam como genes simples, sem estarem ligados aos genes que suprimiam.

CASE & ROPER (1981) mostraram que linhagens haplóides de *A. nidulans* com duplicação de um segmento cromossomal, um em posição normal, o outro translocado para outro cromossomo, eram instáveis na mitose. O balanceamento genômico restaurava-se por perda espontânea de um dos fragmentos, geralmente aquele em posição translocada. Os autores conseguiram provar que a eliminação do mencionado fragmento ocorria mais frequentemente por permuta mitótica do que por deleção.

BURR et al. (1982) notaram instabilidade mitótica em linhagens de *A. nidulans* com duplicação de um segmento cromossomal. As colônias destas linhagens produziam setores de crescimento acelerado, resultantes de núcleos com deleção espontânea do segmento duplicado.

MURRAY et al. (1986) examinaram o efeito do tamanho dos cromossomos artificiais, bem como fragmentos de cromossomo natural, na segregação mitótica em

levedura. Verificaram, neste estudo, que o aumento do tamanho do cromossomo artificial diminuía a taxa de perda do mesmo durante a mitose. Construíram também fragmentos do cromossomo III por integração de telômeros em diferentes posições ao longo do mesmo, e verificaram que fragmentos entre 42 e 72kb se comportavam com cromossomos artificiais. Eram, portanto, perdidos com maior frequência quando comparado com os cromossomos naturais. Por outro lado, fragmentos cromossomais de 150kb se mostraram tão estáveis, durante a mitose, quanto os cromossomos íntegros.

KOUPRINA et al. (1988) identificaram quatro loci, CHL2, CHL3, CHL4 e CHL5, responsáveis pelo controle da transmissão dos cromossomos em *S. cerevisiae* durante a mitose. A frequência de perda de cromossomos verificada era de 10-100 vezes maior nos mutantes *chl5*, *chl2*, *chl3* e *chl4* do que a observada na linhagem selvagem.

GORDENIN et al. (1993) demonstraram que em *S. cerevisiae*, seqüências longas invertidas provocam instabilidade genética, com conseqüente deleção durante a etapa de replicação. Estes fragmentos também induzem a recombinação homóloga.

## **2.7. Estudos realizados no Laboratório de Genética de Microrganismos Industriais**

Devido à importância econômica da produção de glicoamilase por linhagens de *A. niger* e ao interesse na utilização de substratos amiláceos para produção de álcool, somados à falta de estudos sobre a regulação da produção e a secreção desta enzima no mencionado fungo, VALENT (1985) iniciou os estudos para elucidar estes aspectos em linhagens derivadas da linhagem 10v10 de *A. niger* (BONATELLI Jr., 1981). Estabeleceu metodologia para testar a produção da enzima e obteve, a partir da linhagem mutante *nicA<sub>1</sub>olvA<sub>3</sub>*, mediante irradiação com luz ultravioleta, 268 colônias sobreviventes, dentre as quais foram selecionadas aquelas com atividade glicoamilolítica diminuída. Três das linhagens foram classificadas como mutantes de baixa produção da enzima, os quais apresentaram até 30% da produção da linhagem parental, enquanto que outras cinco

linhagens foram classificados como mutantes de média produção, e apresentaram entre 35 e 50% da atividade enzimática da parental. VALENT (1985) verificou também que todas as mutações eram recessivas em relação ao alelo selvagem.

Em 1988, CALIL, após introduzir modificações na metodologia de seleção estabelecida por VALENT (1985), obteve quatro mutantes que apresentaram atividade de glicoamilase 10 a 60% maior do que linhagem parental. Os estudos revelaram que três dos mutantes hap (high amyloglucosidase production) eram recessivos (mutantes hap112, hap147, hap169), enquanto um se mostrou semi-dominante (mutante hap252) em relação ao alelo selvagem. No mesmo trabalho, sugeriu também que estariam envolvidos, no mínimo, 4 a 5 genes, no aumento da produção de glicoamilase nas linhagens estudadas. Os genes *hap147*, *hap169* e *hapA252* se localizam no grupo de ligação I, enquanto que o gene *hapB252* se localiza no grupo de ligação II. Em relação ao gene *hap112*, CALIL (1988) pode demonstrar que o mesmo não se localiza em nenhum dos dois grupos de ligação mencionados.

Dando continuidade a esta linha de pesquisa, MASIERO (1988) e MASIERO & BONATELLI Jr. (1989) obtiveram mutantes auxotróficos e de resistência a drogas, com a finalidade de estabelecer novos marcadores genéticos para mapeamento dos mutantes de produção. Com os mutantes mencionados, puderam identificar dois novos grupos de ligação, denominados III e IV, além de verificar que o marcador *lysA<sub>1</sub>*, único marcador localizado no grupo de ligação III, provocava redução de aproximadamente 95% na produção de glicoamilase, em comparação com o alelo selvagem.

Em 1991, FERREIRA estudou a transformação da linhagem *lgp73*, mutante de baixa produção de glicoamilase, com gene *tub-2* heterólogo, proveniente de *N. crassa*, inserido no plasmídeo pBT6. Neste estudo, obteve entre 0,7 a 35 transformantes/ $\mu$ g de DNA, variação esta devida a modificações na obtenção de protoplastos. O plasmídeo utilizado foi integrado ao genoma dos transformantes obtidos, como pode ser demonstrado por FERREIRA (1991).

VIALTA (1987) e OLIVEIRA (1991) estudaram as interações gênicas em híbridos interespecíficos de *A. niger* e *A. awamori*, sendo que o primeiro observou que a produção de glicoamilase dos híbridos não diferia do parental *A. niger*. OLIVEIRA (1991) conseguiu demonstrar que este fato estava relacionado com a má complementação dos genes responsáveis pela produção de glicoamilase nos híbridos. Os resultados obtidos, sugeriram ainda que ocorreu dominância dos fatores de *A. niger* sobre os de *A. awamori*, o que não era esperado devido a que os genes estruturais de ambas as espécies são praticamente idênticos.

VALENT et al. (1992) sugeriram que pelo menos três genes, em diferentes grupos de ligação, tinham influência no abaixamento na produção da glicoamilase em *A. niger*. Os autores conseguiram mapear o gene *lgpA<sub>61</sub>* no grupo de ligação II, enquanto os outros dois não estavam ligados aos marcadores dos grupos I e II.

MASIERO (1992) observou que as linhagens *lgp05* e *lgp73*, bem como o segregante SV40 apresentavam atraso de 3; 6 e 3 dias, respectivamente, para dar início ao crescimento em meio mínimo com amido como fonte de carbono. Analisando a produção de glicoamilase das linhagens de baixa produção da enzima, *lgp05*, *lgp61* e *lgp73*, em meios de cultura com amido solúvel, maltose ou glicose como fonte de carbono, pode separar os genes mutados de baixa produção destas linhagens. A linhagem *lgp73* não produziu glicoamilase em nenhum dos três meios de cultura utilizados, a linhagem *lgp61* não produziu a enzima em meio com maltose e glicose, enquanto que a linhagem *lgp05* não produziu glicoamilase apenas no meio com glicose. Verificou ainda, que a linhagem *lgp73* apresenta 2 genes mutados, responsáveis pela baixa produção de glicoamilase, e que não estão ligados entre si. Verificou também que não estão ligados aos marcadores dos grupos I, II, III ou IV. Um dos genes foi denominado *lgpB<sub>73</sub>* (low glucoamylase production), sendo responsável pela redução da produção da enzima para níveis entre 2 e 4,5U/ml, enquanto que o outro foi denominado *ssuA<sub>73</sub>* (slow starch utilization) e acarretou atraso de 3 dias no início do crescimento da mencionada linhagem em meio mínimo com amido como única fonte de carbono, além de reduzir a produção da enzima para níveis abaixo de 1U/ml. Neste mesmo

estudo, MASIERO (1992) observou que o gene *ssuA*<sub>73</sub> apresentava efeito epistático sobre o gene *lgpB*<sub>73</sub>, além de que a combinação destes dois genes resultava na redução da produção da enzima para níveis muito baixos. Outro efeito da combinação dos dois genes era o retardo do início do crescimento em seis dias, quando a linhagem *lgp73* era inoculada em meio mínimo com amido como fonte de carbono.

CALIL (1995) estudou a interação alélica, a complementação de marcas, a equivalência de grupos de ligação, bem como a ocorrência de recombinação entre linhagens com seis grupos de ligação identificados, derivadas da linhagem 10v10 de *A. niger*, e linhagens derivadas da N402 da mesma espécie, com marcadores genéticos em oito grupos de ligação, descritas por BOS et al (1989). Neste estudo verificou que o gene *metA*<sub>1</sub>, localizado no grupo de ligação IV na linhagem 10v10, e o gene *metB*<sub>1</sub>, localizado no grupo de ligação V da linhagem N402, não mostraram complementação. A análise dos segregantes obtidos dos diplóides sintetizados, evidenciou a ocorrência de equivalência entre os grupos de ligação I, II, III e IV das linhagens derivadas da linhagem 10v10, com os grupos de ligação I, VI, VI e V da linhagem N402, respectivamente, sugerindo que em alguns casos ocorreu translocação gênica. Nesta mesma análise, verificou a ligação do gene *cspA*<sub>1</sub>, que codifica para altura do conidióforo, com os marcadores do grupo de ligação IV da linhagem 10v10, ou ao grupo de ligação correspondente na linhagem N402.

### 3. Material e métodos

#### 3.1 Linhagens utilizadas

##### 3.1.1. *Aspergillus niger*

As linhagens, pabfwn e nicolv, utilizadas no presente trabalho são derivadas da linhagem original 10v10 de *Aspergillus niger*, considerada selvagem para a produção de glicoamilase, utilizada na produção industrial de ácido cítrico e citada por BONATELLI Jr. (1981). A linhagem 10v10 é originária da Usina Amália S.A. (hoje Fermenta S.A.) localizada no município de Santa Rosa do Viterbo, no Estado de São Paulo.

Linhagem selvagem:

10v10 : prototrófica, coloração negra (BONATELLI Jr., 1981)

Linhagens derivadas:

pabfwn : *pabA<sub>1</sub>fwnA<sub>1</sub>* (BONATELLI Jr., 1981)

nicolv : *nicA<sub>1</sub>olvA<sub>3</sub>* (BONATELLI Jr., 1981)

A partir destas linhagens derivadas obtiveram-se, no laboratório do Prof. Dr. Renato Bonatelli Jr., mutantes de baixa e de alta produção de glicoamilase extracelular, mediante tratamento com luz ultravioleta e/ou derivadas por cruzamento via ciclo parassexual. Os mutantes para alta ou baixa produção de glicoamilase, utilizados neste trabalho estão listados e descritos a seguir.

Mutantes derivadas das linhagens pabfwn e nicolv:

a) de baixa produção de glicoamilase:

lgp 05 : *pabA<sub>1</sub>fwnA<sub>1</sub>lgpC<sub>05</sub>* (CALIL, 1988)

lgp 61	: <i>pabA<sub>1</sub> fwnA<sub>1</sub> lgpA<sub>1</sub></i> (CALIL, 1988)
lgp 73	: <i>pabA<sub>1</sub> nicA<sub>1</sub> olvA<sub>3</sub> smuA<sub>1</sub> lgpB<sub>73</sub></i> (VALENT, 1985)
SV 24	: <i>pabA<sub>1</sub> nicA<sub>1</sub> olvA<sub>3</sub> lgpB<sub>73</sub></i> (CALIL, 1988)
Snu	: <i>metA<sub>1</sub> nicA<sub>1</sub> olvA<sub>3</sub> smuA<sub>1</sub></i> (MASIERO, 1988)

b) de alta produção de glicoamilase:

hgp 169	: <i>pabA<sub>1</sub> hgp<sub>169</sub></i> (CALIL, 1988)
hgp 252	: <i>pabA<sub>1</sub> hgpA<sub>252</sub> hgpB<sub>252</sub></i> (CALIL, 1988)

### 3.1.1.1. Descrição das mutações envolvidas

<i>metA<sub>1</sub></i>	: deficiência para síntese de metionina
<i>nicA<sub>1</sub></i>	: deficiência para síntese de ácido nicotínico
<i>pabA<sub>1</sub></i>	: deficiência para síntese de ácido <i>p</i> -aminobenzóico
<i>fwnA<sub>1</sub></i>	: conídios de coloração marrom
<i>olvA<sub>3</sub></i>	: conídios de coloração verde oliva
<i>smuA<sub>1</sub></i>	: mutação que acarreta atraso do crescimento em amido (também denominada <i>ssuA<sub>1</sub></i> ; MASIERO, 1992)
<i>hgp</i>	: mutação que confere elevada produção de glicoamilase extracelular
<i>lgp</i>	: mutação que confere reduzida produção de glicoamilase extracelular

### 3.1.2. *Escherichia coli*

As linhagens de *E. coli* utilizadas no presente trabalho estão descritas a seguir:

HB 101	: <i>F<sup>-</sup> supE44 hsdS20 (r<sup>m</sup>) recA13 ara-14 proA2 lacy1 galk2 rpsL20 (Sm<sup>r</sup>) xyl-5 mtl-1 λ<sup>-</sup></i>
DH5α	: <i>F<sup>-</sup> supE44 ΔlacU169 (80φ lacZΔ M15) hsdR17 recA endA gyrA96 thi relA1</i>

## **3.2. Meios de cultura**

### **3.2.1. Meios de cultura para *A. niger***

#### **3.2.1.1. Meios de cultura básicos**

Meio mínimo (MM; PONTECORVO et al., 1953b); meio completo (MC; AZEVEDO e COSTA, 1973); meio completo simplificado (MCS; HAMLYM et al., 1981).

O pH dos meios foi ajustado para 6,5, antes de autoclavar, com NaOH 1N. No caso do meio sólido, adicionou-se ágar a 1,5%.

#### **3.2.1.2. Meios de fermentação**

Meio com farinha de raspa integral de mandioca (MAC; BONATELLI Jr et al., 1984); meio com maltose (MAL; MASIERO, 1992); meio com xilose (XIL; MASIERO, 1992); meio com maltose tamponado (MALt; MAL em tampão citrato, 100mM, pH 5,5).

O pH dos meios de fermentação foi ajustado para 5,5, antes de autoclavar, com NaOH 1N. No caso do meio sólido, adicionou-se ágar a 1,5%.

#### **3.2.1.3. Suplementação dos meios de cultura para *A. niger***

Quando necessário, os meios de cultura utilizados, tanto líquidos quanto sólidos, foram suplementados com o(s) requisito(s) nutricional(is) das linhagens estudadas (vitaminas na concentração final de 5µg/ml e aminoácidos na concentração final de 100 µg/ml), acrescentados após autoclavagem dos meios de cultura.

### **3.2.2. Meios de cultura para *E. coli***

Meio Luria Bertani (LB; SAMBROOK et al., 1989); meio SOC (SAMBROOK et al., 1989).

Quando necessário os meios de cultura para bactérias foram acrescidos de ampicilina na concentração final de 60µg/ml.

### **3.2.3. Esterilização e conservação dos meios de cultura**

As soluções, quando necessário, e exceto mencionado especificamente, e todos os meios de cultura utilizados foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15min., conservando-se os mesmos refrigerados a 4°C até a sua utilização.

## **3.3. Temperatura de incubação dos microrganismos**

As linhagens de *E.coli* foram incubadas a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  enquanto que as de *A. niger* foram incubadas a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .

## **3.4. Manutenção das linhagens de *A. niger* e de *E. coli***

As linhagens de bactérias foram mantidas na forma de suspensão glicerinada de células a 30% a partir do crescimento das mesmas em meio LB (MANIATIS et al., 1982), e guardadas a  $-70^\circ\text{C}$ .

As linhagens de *A. niger* foram mantidas como suspensão de conídios, obtidos a partir de culturas em meio MM suplementado, em glicerina a 40%, guardadas a  $-20^\circ\text{C}$  (HSIEH et al., 1989), bem como em placas de MC e MM suplementado.

### **3.5. Avaliação da atividade de glicoamilase das linhagens de *A. niger***

#### **3.5.1. Fermentação em meio MAC, MAL, XIL, MALt e MCS**

No estudo dos parâmetros da fermentação (atividade enzimática, peso seco, proteína total, atividade específica de glicoamilase e atividade enzimática/peso seco) utilizou-se meio MAC e meio MAL, sem agitação. Neste estudo, foram utilizadas as linhagens originais e as de baixa produção de glicoamilase extracelular (item 3.1.1.).

A extração de DNA foi feita a partir de micélio crescido em meio MCS durante 3 dias, com agitação de 180rpm, enquanto que na extração de RNA total utilizou-se o meio MAL como meio indutor e o meio XIL como meio não-indutor, nas mesmas condições de incubação. A extração de DNA e de RNA foi feita de todas as linhagens mencionadas no item 3.1.1. O caldo de fermentação, proveniente das fermentações em meio MAC, meio MAL e meio XIL, foi utilizado para análise de proteínas por eletroforese em poliacrilamida, como será descrito no item 3.9.

O meio MALt foi utilizado na avaliação da produção de glicoamilase em meio tamponado, como será descrito no item 3.8.

Seguiu-se metodologia descrita por BONATELLI Jr et al. (1984), com exceção da coleta de conídios a partir de micélio crescido durante 7 dias em placas de meio MC, feita com auxílio de alça de Drigalsky, em 2,5ml de solução de Tween 80 (0,1%). A escolha do meio de cultura, do tempo de incubação, da agitação e do número de repetições baseou-se na finalidade da fermentação.

### 3.5.2. Obtenção de glicoamilase extracelular

A fermentação para obtenção de glicoamilase extracelular, foi feita como descrito por BONATELLI Jr et al. (1984) em frascos erlenmeyer de 125ml, contendo 25ml de meio MAC ou MAL ( item 3.2.1.2.), sem agitação.

Alíquota de 1ml de suspensão de conídios, das linhagens mutantes de baixa atividade e das linhagens originais, com  $5 \times 10^6$  conídios/ml, foi inoculada em cada um dos 10 frascos erlenmeyer contendo meio MAC, ou meio MAL, utilizados para cada uma das linhagens estudadas. Os frascos foram incubados por 72 horas a 30°C, período após o qual 5 frascos, escolhidos aleatoriamente para cada uma das linhagens, foram retirados do incubador. Os 5 frascos restantes de cada linhagem permaneceram incubados até completarem 7 dias de incubação.

As amostras de caldo de fermentação foram filtradas em funil de Büchner e guardadas separadamente a -20°C. A verificação da atividade enzimática foi feita de acordo com VALENT (1985), em três repetições de cada amostra.

### 3.5.3. Extração de glicoamilase intracelular

Os micélios das linhagens originais e mutantes de baixa produção, foram retirados com auxílio de uma pinça e lavados com água destilada esterilizada para retirada de eventuais resíduos de meio de fermentação. Os mesmos foram então secos entre camadas de papel de filtro e, em seguida, envoltos em papel alumínio e mantidos a -20°C até o momento da determinação da atividade enzimática intracelular e da atividade ligada ao micélio.

Para obtenção de glicoamilase intracelular, trituraram-se 3 micélios de cada linhagem na presença de nitrogênio líquido, transferindo-se cada amostra para tubo de ensaio. As amostras foram extraídas com 1ml de tampão de extração A, B e C ou 4ml de tampão C e D (Tampão A : 25 mM trisfosfato pH 6,7; 10 % (v/v) glicerol; 1 ml EDTA; 0,1 mM DTT;

2 mM PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride);

Tampão B : 25 mM trisfosfato pH 6,7; 2 mM PMSF;

Tampão C : 100 mM acetato pH 5,0; 2 mM PMSF; VAINSTEIN, 1990;

Tampão D : 50 mM citrato pH 4,0; 2 mM PMSF)

e deixadas em repouso durante 1 hora a 4°C, transferindo-se, em seguida, 1ml para tubo tipo eppendorf de microcentrífuga. As amostras foram centrifugadas durante 30 minutos a 12500g em câmara fria a 4°C. A atividade enzimática intracelular foi determinada da forma como será descrito no item 3.5.5., utilizando-se 0,5ml do sobrenadante convenientemente diluído.

#### **3.5.4. Obtenção de glicoamilase ligada ao micélio**

A metodologia adotada para extração da enzima ligada ao micélio foi a de VAINSTEIN (1990), com algumas modificações. A obtenção da glicoamilase ligada ao micélio foi feita por centrifugação de 0,5ml da suspensão obtida (item 3.5.3.) em tubo tipo eppendorf de microcentrífuga durante 30 minutos a 12500g em câmara fria a 4°C. O precipitado foi lavado com um volume de 0,5ml de tampão de extração D, repetindo-se a lavagem das amostras de micélio, até total remoção da proteína. As amostras foram ressuspensas em 0,5ml do mesmo tampão.

#### **3.5.5. Determinação da atividade enzimática da glicoamilase**

A atividade enzimática da glicoamilase foi determinada como descrito por BONATELLI Jr et al. (1984), em 0,5ml de cada uma das frações, referentes à atividade extracelular, intracelular e ligada ao micélio.

A quantidade de açúcares redutores liberada durante hidrólise do amido pela glicoamilase, foi estimada pelo método da *o*-toluidina, utilizando-se os kits das firma BIOBRÁS ou BIOCLIN, de acordo com os fabricantes.

A concentração de açúcares redutores foi expressa em mg de glicose/100ml ou em unidades de enzima/ml, sendo que 10mg de glicose/ml correspondem a 1 unidade da enzima.

### **3.6. Determinação da concentração de proteína**

A determinação da concentração de proteína foi feita de acordo com o método de BRADFORD (1976), com curva padrão feita com albumina de soro bovino (BSA) em concentrações variáveis de 10 a 100 $\mu$ g/ml.

Para a determinação de concentrações baixas de proteína, utilizou-se o reagente de BRADFORD da firma BIO-RAD, em escala de micro-ensaio. Neste caso, traçou-se curva padrão utilizando albumina de soro bovino (BSA) em concentrações variáveis de 5 a 25 $\mu$ g/ml.

### **3.7. Determinação do peso seco do micélio**

O micélio correspondente a cada fração foi transferido para papel alumínio, previamente tarado, e seco a 80°C durante 48 horas, e o seu peso seco calculado por diferença de peso.

### **3.8. Produção de enzima extracelular em meio tamponado**

A avaliação da produção de glicoamilase extracelular em meio tamponado, foi feita em meio MALt, descrito no item 3.2.1.2. Neste estudo foram utilizadas as linhagens selvagem, as originais e as de baixa produção de glicoamilase.

A coleta de conídios foi feita como descrito no item 3.5.1., sendo que para cada uma das linhagens estudadas foram inoculados 3 frascos erlenmeyer de 125ml contendo cada um 25ml de meio MALt. Os frascos foram incubados sem agitação, retirando-se alíquotas de 1ml do meio, para determinação da atividade enzimática e do pH.

O pH do caldo de fermentação foi medido em alíquotas de 50µl com pHmetro Beckman (modelo Φ200pHMeter) com micro-eletrodo.

A atividade enzimática foi determinada como anteriormente descrito no item 3.5.5.

### **3.9. Análise de proteínas**

#### **3.9.1. Fermentação em meio MAC, MAL e XIL**

Para obtenção de amostras para análise do perfil de proteínas, as linhagens do fungo foram submetidas à fermentação em meio MAC, em meio indutor (meio MAL) e em meio não-indutor (meio XIL), sem agitação, a 28°C, durante três dias, de acordo com o item 3.5.1.

#### **3.9.2. Preparação das amostras de proteínas**

O caldo obtido para cada uma das linhagens e para cada um dos meios de cultura utilizados, foi filtrado utilizando-se funil de Büchner, congelado a -70°C e em seguida submetido a liofilização.

As amostras liofilizadas foram ressuspensas em água destilada e dialisadas contra tampão Tris·HCl, 125mM, pH6,8 a 4°C durante 48h, com uma troca de tampão.

#### **3.9.3. Eletroforese de proteínas**

A eletroforese de proteínas em condições denaturantes, foi feita de acordo com a metodologia descrita por LAEMMLI (1970), em gel de SDS-PAGE a 10%.

A eletroforese de proteínas em condições não denaturantes foi feita seguindo metodologia descrita em COLIGAN et al. (1998), em gel de poliacrilamida a 10%.

### **3.9.4. Detecção de proteínas**

Os géis de poliacrilamida foram corados com nitrato de prata, de acordo com a metodologia descrita em COLIGAN et al. (1998).

## **3.10. Análise de ácidos nucleicos**

### **3.10.1. Extração de ácidos nucleicos**

#### **3.10.1.1. Extração de DNA**

##### **3.10.1.1.1. Extração de DNA cromossomal dos fungos**

A extração de DNA dos fungos estudados foi feita seguindo o protocolo de RAEDER & BRODA (1985), introduzindo-se as modificações a seguir:

- utilizou-se 200mg de micélio de cada uma das linhagens estudadas, obtido por fermentação em meio MCS a 28°C com agitação de 200rpm durante 3 dias
- o tampão de extração descrito pelos autores foi acrescido de 12,5µl de proteinase K (solução-estoque de 20mg/ml), incubando-se a seguir durante 2h a 37°C
- a extração foi feita com fenol/clorofórmio (1:1) seguida de extração com clorofórmio
- a separação do DNA, após precipitação com isopropanol, foi feita por meio de centrifugação a 2200g durante 10min a temperatura ambiente

Além do mencionado método, utilizou-se o procedimento descrito por LECHELLIER & SILAR (1994).

### **3.10.1.1.2. Extração de plasmídios**

#### **3.10.1.1.2.A) Extração em pequena escala (mini-prep)**

A extração de plasmídios em pequena escala foi feita de acordo com o protocolo de HOLMES & QUIGLEY (1981).

#### **3.10.1.1.2.B) Extração em larga escala (maxi-prep)**

A extração de plasmídios em larga escala foi feita pelo método de lise alcalina como descrito por SAMBROOK et al. (1989).

### **3.10.1.2. Extração de RNA total**

A extração de RNA total das linhagens selvagem, parentais e mutantes, foi feita de acordo com a metodologia descrita por CHIRGWIN et al. (1979), SOKOLOVSKY et al. (1990) e LECCELLIER & SILAR (1994), utilizando-se 200mg de micélio, obtido de acordo com o item 3.5.1. Além da metodologia citada, utilizou-se o kit “Messenger RNA Micro Isolation” (Sigma).

### **3.10.2. Eletroforese de ácidos nucléicos**

#### **3.10.2.1.A) Separação de DNA em gel de agarose**

A eletroforese de DNA foi feita em gel de agarose de acordo com as recomendações de SAMBROOK et al. (1989).

### **3.10.2.1.B) Separação de DNA em gel de poliacrilamida**

Fragmentos pequenos de DNA foram separados em gel de poliacrilamida em gradiente descontínuo de 3,5; 5 e 8%, com 1,5mm de espessura, de acordo com metodologia descrita em AUSUBEL et al. (1998).

### **3.10.2.2. Separação de RNA em gel de agarose**

A eletroforese de RNA foi feita em gel de agarose em condições denaturantes, seguindo metodologia descrita em FOURNEY et al. (1990).

## **3.10.3. Detecção de ácidos nucléicos após eletroforese**

### **3.10.3.1. Detecção de DNA**

A visualização das bandas de DNA em gel de agarose foi feita pela adição do brometo de etídio, de acordo com as recomendações de MANIATIS et al. (1982).

Os géis de poliacrilamida, usados na separação de fragmentos de baixo peso molecular, foram corados com nitrato de prata de acordo com SANTOS et al. (1993).

### **3.10.3.2. Detecção de RNA**

As bandas de RNA foram visualizadas sob luz UV pela adição de 0,5µg de brometo de etídio diretamente a cada amostra.

### **3.10.4. Determinação da concentração de ácidos nucleicos**

A determinação da concentração de DNA nas diferentes amostras analisadas, foi feita por comparação visual com padrão de peso molecular em gel de agarose ou por espectrofotometria como descrito em MANIATIS et al. (1982).

### **3.10.5. Eletroeluição de fragmentos de DNA**

A recuperação de fragmentos de DNA de gel de agarose após separação por eletroforese, foi feita por eletroeluição, seguindo procedimento descrito em SAMBROOK et al. (1989).

## **3.11. Transformação**

### **3.11.1. Transformação de *E. coli***

Para a obtenção de células competentes das linhagens DH5 e HB101 de *E. coli*, culturas das mesmas foram tratadas de acordo com o protocolo de NISHIMURA et al. (1990), sendo em seguida resfriadas em nitrogênio líquido e mantidas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , por, no máximo, seis meses, até a sua utilização.

A transformação das linhagens de *E. coli* foi feita de acordo com o protocolo de SAMBROOK et al. (1989). Os plasmídios utilizados são os descritos a seguir.

### **3.11.2. Plasmídios utilizados**

#### **3.11.2.1. Plasmídio pBT6**

O plasmídio pBT6, de 5,8kb, apresenta o gene *tub-2*, num fragmento de 3,1kb, que codifica uma  $\beta$ -tubulina da linhagem Bml511 de *Neurospora crassa*, e que confere

resistência ao fungicida benomil, inserido no vetor pUC12. O plasmídeo resultante apresenta, além do gene *tub-2*, também o gene para resistência a ampicilina, o que faz dele um vetor bifuncional (ORBACH et al., 1986).

#### **3.11.2.2. Plasmídios da série pJD**

Os plasmídios da série pJD, construídos por McCLUNG et al. (1989), são plasmídios derivados do pBR322, pBR328 e do pKC7, acrescidos do gene para resistência ao benomil, proveniente do plasmídeo pBT6. Os plasmídios resultantes, isto é, pJD21, pJD71, pJD81 e pJD82 apresentam entre 7,0 e 7,5kb, resistência a dois antibióticos (ampicilina e tetraciclina, canamicina ou cloranfenicol, respectivamente) além da mencionada resistência ao benomil, fazendo deles vetores bifuncionais.

#### **3.11.2.3. Plasmídeo pCAMG91**

O plasmídeo pCAMG91, obtido da NOVO Industri pelo Prof. Dr. Renato Bonatelli Jr., foi descrito por BOEL et al. (1984b). Trata-se de um plasmídeo bifuncional, construído pela clonagem de um fragmento de 4,7kb, obtido por digestão parcial de DNA genômico de *A. niger* com as enzimas NdeI e Sau3A, e que tem inserido o gene da glicoamilase, no plasmídeo pBR322 digerido com as enzimas NdeI e BamHI. O plasmídeo resultante, denominado pCAMG91, de 7,1kb, apresenta, além do gene da glicoamilase, resistência a ampicilina.

#### **3.11.2.4. Plasmídeo pAN7-1**

O plasmídeo pAN7-1 (PUNT et al., 1987) apresenta o gene *hph*, que codifica para higromicina B fosfotransferase de *E. coli*, flanqueado pelas seqüências promotora do gene *gpd* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e terminadora do *trpC*<sup>+</sup> de *A. nidulans* clonado no plasmídeo pUC 18. O vetor resultante apresenta gene para resistência a ampicilina e a higromicina.

### 3.11.3. Transformação de *A. niger*

A transformação das linhagens mutantes de baixa produção de glicoamilase, foi feita via protoplastos ou conídios. A obtenção de protoplastos das linhagens de *A. niger*, foi tentada seguindo diversos protocolos, com as modificações descritas a seguir:

Utilizou-se a metodologia descrita em BALLANCE et al. (1983), introduzindo-se as seguintes modificações:

- o meio de cultura utilizado foi o MM suplementado coberto com celofane, e o tempo de incubação das linhagens variou entre 9 e 18hs.
- para a digestão da parede celular optou-se pelas enzimas líticas Novozym 234 (NOVO Industri) e celulase de *Trichoderma harzianum* (Sigma) variando-se a concentração das mesmas de 0 a 10mg/ml, para cada uma delas
- para protoplastização o micélio foi incubado a 30°C e 40rpm, observando-se a liberação de protoplastos ao microscópio, a cada 40min.
- a suspensão de protoplastos foi filtrada em tela de nylon (100µm).
- como estabilizadores osmóticos e nos meios de regeneração de protoplastos foram usados o sorbitol 0,6 e 1,2M, além de sacarose 1M (CALIL, 1995)

O protocolo de TILBURN et al. (1983), foi adotado com as seguintes modificações:

- o meio de cultura para crescimento do fungo foi o meio MCS líquido segundo modificação de FERREIRA (1991), com agitação de 200rpm
- as enzimas líticas anteriormente mencionadas foram utilizadas na concentração de 5mg/ml, respectivamente
- a protoplastização foi feita a 30°C e 100rpm
- eliminação da fração V da albumina de soro bovino
- o estabilizador osmótico utilizado foi o sorbitol 1,2M

O último protocolo adotado para obtenção de protoplastos foi o de CAMPBELL et al. (1989), específico para *A. niger*, com as modificações descritas a seguir:

- o micélio utilizado foi crescido em meio MCS líquido ou MC sólido coberto com celofane

A transformação foi feita seguindo-se metodologia descrita por BALLANCE et al. (1983), TILBURN et al. (1983) e CAMPBELL et al. (1989), utilizando-se entre 1 e 10 $\mu$ g de DNA em 20 $\mu$ l de TE (Tris-Cl 10mM pH 8,0/EDTA 1mM).

Nos estudos de cotransformação seguiu-se o protocolo de CAMPBELL et al. (1989), e WERNARS et al. (1987) com micélio crescido durante 14h em MC sólido coberto por celofane, utilizando-se os seguintes pares de plasmídios:

- a) pAN7-1/pCAMG91
- b) pBT6/pCAMG91
- c) pJD21/pCAMG91

A relação molar entre o vetor que carrega o gene marcador (primeiro) e o vetor de expressão (segundo) variou de 1:10 até 1:2.

#### **3.11.4. Viabilidade dos protoplastos**

A viabilidade dos protoplastos foi verificada por meio de semeadura de diluições da preparação de protoplastos em cada um dos experimentos nos respectivos meios de regeneração com e sem estabilizador osmótico.

### **3.12. Teste de resistência dos protoplastos de *A. niger* a higromicina e benomil**

#### **3.12.1. Teste de resistência a higromicina**

A resistência de *A. niger* a higromicina foi ensaiada espalhando-se 100µl de suspensão de protoplastos, contendo  $10^4$  protoplastos/ml, em placas de meio de regeneração de protoplastos, acrescido de higromicina em concentrações variáveis de 0 a 200µg/ml. As placas foram incubadas a 30°C durante 2 e 4,5 dias.

#### **3.12.2. Teste de resistência a benomil**

A resistência ao fungicida benomil (metil-1-butil-carbamoil-2-benzimidazol-carbamato) foi verificada de acordo com metodologia descrita por FERREIRA (1991), utilizando-se benlate, preparado comercial de benomil, em solução etanólica-estoque para preparar placas com concentrações variáveis entre 0 e 5µg/ml. Em cada placa espalharam-se 100µl de suspensão de protoplastos, contendo  $10^4$  protoplastos/ml. As placas foram incubadas a 30°C durante 2 e 5 dias.

### **3.13. Teste para produção de nuclease**

#### **3.13.1. Halo de hidrólise de DNA em placa**

As linhagens originais e mutantes foram estudadas quanto à produção de nucleases, coletando-se conídios crescidos em placas de MC, conforme descrito no item 3.5.1. Os conídios das diferentes linhagens foram contados ao microscópio em hematímetro, acertando-se a sua concentração com solução de salina a 0,85%, de forma a obter  $10^4$  conídios/ml. Alíquotas de 20µl foram inoculadas em orifícios feitos em placas de MM

modificado, cuja única fonte de fosfato era DNA de esperma de arenque (Sigma). Após a inoculação as placas foram incubadas até as colônias atingirem 2cm de diâmetro, quando então foram reveladas pela adição de 5ml de solução de brometo de etídio (0,5µg/ml) com agitação de 30rpm, durante 1h a temperatura ambiente. A avaliação do halo de digestão de DNA foi feita pela irradiação das placas com luz UV, após retirada do excesso de solução de brometo de etídio.

### **3.13.2. Hidrólise em placa de microtitulação**

Este teste foi feito baseado na metodologia adotada por FERREIRA (1991), com exceção da obtenção de extrato celular de protoplastos. Aliquotas de protoplastos, contados em hematímetro, totalizando  $5 \times 10^5$  protoplastos, obtidos como descrito no item 3.11.3., foram ressuspensos em 0,5ml de água e deixados em banho de gelo e água durante 10min. Adicionou-se igual volume de tampão TM (Tris-Cl 0,2M, pH 8; MgCl<sub>2</sub> 50mM). Em seguida, foram centrifugados a 12500g em microcentrífuga durante 2min, recolhendo-se o sobrenadante.

## **3.14. Reações enzimáticas**

### **3.14.1. Restrição**

Para proceder à hidrólise do DNA, adotaram-se as recomendações gerais de SAMBROOK et al. (1989) e as específicas de cada uma das enzimas conforme recomendações dos respectivos fornecedores.

### **3.14.2. Reação da polimerase em cadeia (PCR)**

A amplificação do gene da glicoamilase das linhagens estudadas foi feita utilizando-se iniciadores (primers) fornecidos pela Gibco, com as seguintes seqüências:

primer 1 (glico +; 5'a 3'): CGT CGC CTA ATG TCT CGT CCG T

primer 2 (glico -; 5'a 3') : GCC CTC ATC CCC AAG CTT TA

Na seqüência do primer 2 foi inserido um sítio de restrição HindIII, pela troca de duas bases, respectivamente, na posição 2470 e 2471 do gene da glicoamilase.

A reação de amplificação foi feita com 10ng de DNA genômico das linhagens de fungo, num volume final de 100µl e 30 ciclos de amplificação. As condições gerais da reação foram ajustadas de acordo com o fornecedor dos primers (Gibco) e da Taq DNA Polimerase (Pharmacia).

Após a reação de amplificação, o fragmento de DNA foi purificado com fenol, seguido de fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio e finalmente precipitado com etanol.

### **3.15. Padrão de restrição do gene *glaA***

O fragmento de DNA obtido por PCR de acordo com o item 3.14.4., foi digerido com as enzimas BamHI, Bgl II, ClaI, KpnI e PstI. Após hidrólise completa do DNA, transferiram-se para tubos de microcentrifuga, separadamente, duas alíquotas de 20µl. A primeira foi digerida com as enzimas EcoRV, PvuI, SmaI e XbaI, a segunda alíquota foi digerida com as enzimas BclI, DraI, HindIII e XhoI.

A separação dos fragmentos de DNA foi realizada em gel de poliacrilamida de acordo com o item 3.10.2.1.

## **3.16. “Southern Blotting”**

### **3.16.1. Transferência de DNA para membranas de nylon**

Aproximadamente 10 $\mu$ g de DNA (extraído de acordo com o item 3.10.1.1.1.) das linhagens originais e mutantes, digerido com as enzimas EcoRI e EcoRV (item 3.14.1.) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% (item 3.10.2.1.A). A transferência do DNA seguiu metodologia descrita em SAMBROOK et al. (1989).

### **3.16.2. Marcação isotópica da sonda**

Como sonda utilizou-se o gene homólogo da glicoamilase proveniente da digestão do plasmídeo pCAMG91 (item 3.11.2.3.) com as enzimas EcoRI e EcoRV, resultando num fragmento de aproximadamente 2,6kb. A marcação foi feita pelo método “Random Priming” mediante kit da firma Boehringer Mannheim, utilizando-se 50ng de fragmento.

### **3.16.3. Hibridação**

A hibridação seguiu recomendações gerais de SAMBROOK et al. (1989), sendo que a pré-hibridação foi feita a 65°C durante 2h. A hibridação foi feita na mesma temperatura, durante aproximadamente 18h.

Em seguida a membrana foi exposta durante 7 dias a filme de raio-X tipo X-Omat da firma Kodak.

### **3.17. “Northern blotting”**

#### **3.17.1. Transferência de RNA para membrana de nylon**

Aproximadamente 10µg de RNA total de cada uma das linhagens, extraído de acordo com o item 3.10.1.2., foram submetidos a eletroforese em gel de agarose em condições denaturantes (item 3.10.2.2.). Para a transferência do RNA adotou-se metodologia descrita em SAMBROOK et al. (1989), transferindo-se durante 18h.

#### **3.17.2. Marcação isotópica da sonda**

A sonda utilizada foi a mesma descrita no item 3.16.2., assim como a marcação isotópica também.

#### **3.17.3. Hibridação**

Para a hibridação seguiram-se as recomendações gerais de SAMBROOK et al. (1989), pré-hibridando-se a membrana a 42°C durante 2h. A hibridação foi feita durante 18h na mesma temperatura.

Em seguida a membrana foi exposta durante 7 dias a filme de raio-X tipo X-Omat da firma Kodak.

---

## 4. Resultados e discussão

As análises estatísticas dos resultados apresentados nas Tabelas 5 a 12 se encontram no Apêndice I.

### 4.1. Escolha do tempo de fermentação

Para a escolha do tempo de fermentação as linhagens originais pabfwn e nicolv foram inoculadas em meio MAC. Para cada uma das linhagens foram inoculados ao todo 15 frascos erlenmeyer, sendo os mesmos retirados do incubador de 3 em 3, após 3, 5, 6, 7 e 8 dias de fermentação. Como parâmetro para a escolha do tempo de fermentação, no qual foi feita a comparação de todas as linhagens estudadas, foi utilizada a produção de enzima extracelular, por meio da determinação da atividade enzimática de acordo com o item 3.5.5. A atividade extracelular da glicoamilase foi o critério anteriormente descrito para classificação das linhagens (VALENT, 1985).

Os resultados para este estudo preliminar encontram-se na Tabela 1 (pág. 113).

Estes dados definiram o tempo de fermentação, escolhendo-se um tempo no qual praticamente não havia atividade enzimática extracelular, correspondente a 3 dias de fermentação, e outro, no qual a produção de enzima extracelular tinha atingido o seu máximo, ou seja, decorridos 7 dias de fermentação. Escolheu-se o primeiro tempo para verificar se o nível de enzima extracelular refletia ou não o nível de acúmulo intracelular. Isto permitiria concluir, ou pelo menos suspeitar da presença de mutantes de secreção, que tendo dificuldade em secretar a glicoamilase, acabariam acumulando a mesma no interior da célula.

Após 7 dias de fermentação, interessava verificar se a relação entre a fração extracelular e intracelular da enzima observada aos 3 dias, permanecia similar. A análise dos dados obtidos na comparação entre as duas linhagens originais e as cinco mutantes de baixa

produção de enzima, poderia indicar em que nível ocorreria, no caso de se verificar, a disparidade entre o nível externo e interno de glicoamilase.

## **4.2. Estocagem do caldo de fermentação**

Durante os testes preliminares verificou-se que o caldo de fermentação mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante uma semana, perdia quase totalmente a atividade enzimática, como mostram os dados da Tabela 2 (pág. 114). Estes resultados foram obtidos de triplicatas de fermentação da linhagem pabfwn, feitas de acordo com a descrição do item 3.5.1., em meio de cultura MAC, interrompendo-se a fermentação após 5,5 dias.

A determinação da atividade enzimática no caldo de fermentação, assim como da concentração de proteína presente no mesmo, foram feitas de acordo com os itens 3.5.5. e 3.6., respectivamente.

A atividade enzimática e a concentração de proteína sofreram alteração significativa (diminuição de aprox. 90% e 43%, respectivamente, para a atividade enzimática e a concentração de proteína) nas amostras submetidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante uma semana. Uma explicação para este fenômeno poderia ser a complexação da proteína, em grande parte glicoamilase, com o substrato. Uma observação que reforça esta hipótese é o fato das raspas de farinha de mandioca apresentarem uma coloração bem mais intensa do que a solução em si, quando se adicionava o reagente de Bradford. Estas partículas não se mantinham em suspensão, depositando-se no fundo do tubo de ensaio.

Para possibilitar a manutenção das amostras obtidas na fermentação das diversas linhagens, foram ensaiados dois tratamentos, a centrifugação e a filtração das mesmas. A centrifugação foi feita a 8800g durante 60 minutos, enquanto que para a filtração utilizou-se funil de Büchner. O sobrenadante e o filtrado foram transferidos para tubo tipo Falcon e imediatamente analisados quanto à atividade enzimática e à concentração de proteína. Os resultados obtidos para cada um destes tratamentos se encontram na Tabela 3 (pág. 114), e

correspondem a triplicatas da fermentação da linhagem pabfwn em meio MAC, como descrito no item 3.5.1., durante 6 dias. Em relação à atividade enzimática e à concentração de proteína, não há diferença significativa entre os três tratamentos ensaiados.

Os sobrenadantes e os filtrados foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante uma semana, repetindo-se a determinação da atividade enzimática e da concentração de proteína, cujos resultados se encontram na Tabela 4 (pág. 115). Neste caso, verifica-se diferença significativa entre os três tratamentos após a estocagem do caldo de fermentação, tanto na atividade da enzima quanto na concentração de proteína.

Concluiu-se que a perda de atividade enzimática, bem como de proteína, era devida à presença de resíduos de farinha de raspa integral de mandioca nas amostras. Em relação aos resultados obtidos para as amostras submetidas à centrifugação, apesar de se aumentar o tempo de centrifugação até 2h, não se obteve um sobrenadante clarificado, o que era dificultado mais ainda pelo fato do precipitado ser pouco consistente.

Foi feita nova fermentação nas mesmas condições descritas anteriormente em 6 frascos erlenmeyer. Terminada a fermentação, o caldo obtido foi filtrado em funil de Büchner, juntando-se as amostras obtidas e dividindo-se o filtrado em 7 frascos erlenmeyer, cada um contendo 20 ml do mesmo.

Estas amostras foram submetidas a estocagem em condições diversas, sempre durante uma semana, utilizando-se como controle uma amostra recém-filtrada. As condições gerais e os resultados obtidos se encontram na Tabela 5 (pág. 115).

O ajuste de pH para 6,0, pela adição de KOH 1N, foi feito em virtude do pH final da fermentação estar em torno de pH 2,5, o que poderia ser um fator que levasse à perda de atividade em função da eventual perda de estabilidade da enzima. O pH 6,0 é um pH mais favorável à estabilidade da enzima segundo MIAH & UEDA (1977a,b) e SAHA et al.

(1979). MEDDA et al. (1981) estudaram a adsorção da glicoamilase produzida por *A. niger* ao amido de trigo cru e verificaram que era máxima em pH 3,4.

A finalidade da diálise era verificar se algum dos componentes existentes no meio de fermentação poderia estar contribuindo para a instabilidade da enzima. A diálise foi feita em câmara fria a 4°C, inicialmente contra água deionizada durante 24 horas, e, em seguida, pelo mesmo período de tempo, contra tampão acetato 0,05M pH 6,0.

Os resultados obtidos indicam que não há diferença significativa quanto à atividade enzimática entre filtrar e conservar a -20°C, ou filtrar, dialisar e conservar a 4°C, em relação à amostra que não foi estocada. Quanto à concentração de proteína no caldo de fermentação, não ocorreu diferença significativa entre nenhum dos diversos tratamentos. Optou-se por submeter todas as amostras obtidas a partir de fermentação em meio MAC a filtração, e a manutenção a -20°C.

### **4.3. Escolha do tampão de extração de glicoamilase**

O tampão de extração foi escolhido em função da atividade enzimática obtida para massas iguais de micélio (100 mg) provenientes da fermentação da linhagem pabfwn em meio MAC como descrito no item 3.5., durante 6 dias. A massa de micélio triturada foi extraída com 1 ml dos respectivos tampões (A, B, C e D, item 3.5.3.), ou 4 ml dos tampões C e D. Nas suspensões convenientemente diluídas, verificou-se a atividade enzimática conforme o item 3.5.5.

Os resultados obtidos se encontram na Tabela 6 (pág. 116).

Verificou-se que a atividade enzimática não diferia significativamente para as extrações com 4ml de tampão C e D, nas diluições 1:10, 1:20 e 1:40. Optou-se pelo tampão D, em um volume de extração de 4ml para cada 100mg de micélio, devido à vantagem de ser o mesmo tampão utilizado na verificação da atividade de glicoamilase.

## 4.4. Atividade enzimática

### 4.4.1. Atividade enzimática em meio com farinha de raspa integral de mandioca (meio MAC)

#### 4.4.1.1. Atividade extracelular

Os resultados obtidos para a atividade enzimática extracelular em meio MAC (item 3.5.1.) se encontram na Tabela 7 (pág. 117). Verifica-se que as linhagens originais pabfwn e nicolv, assim como as mutantes de baixa produção derivadas destas, apresentam pouca ou nenhuma atividade de glicoamilase aos 3 dias de fermentação. A única exceção é a linhagem SV24, que apresenta 12 vezes mais atividade do que a linhagem nicolv. MASIERO (1992), após 4 dias de fermentação, verificou que as linhagens pabfwn e nicolv apresentaram diferença significativa quanto à atividade enzimática quando comparadas com as linhagens mutantes lgp05, lgp61 e lgp73. Neste estudo, após 3 dias de fermentação, observou-se que não há diferença significativa para a atividade enzimática das linhagens mencionadas. Outra diferença entre os dois estudos, é o fato de MASIERO (1992) ter observado atividade enzimática bem mais elevada após 4 dias do que no presente estudo, com exceção da linhagem lgp73. Esta observação permite concluir que, para as outras linhagens, a produção de glicoamilase neste estudo foi mais lenta do que a verificada por MASIERO (1992). Em relação ao teor de proteína, nota-se que as mutantes apresentam concentração bem mais elevada do que as parentais, que não apresentam diferença significativa neste parâmetro. As linhagens lgp05 e lgp61 apresentam diferença significativa em relação à linhagem pabfwn, assim como as linhagens lgp73, SV24 e Snu com a linhagem nicolv. Quanto ao peso seco, as linhagens pabfwn, nicolv, lgp61 e SV24 não apresentam diferença significativa. A mutante lgp05 apresenta peso seco significativamente menor do que a original pabfwn, o mesmo acontecendo com a linhagem lgp73 e a Snu em relação à original nicolv. O coeficiente atividade enzimática/peso seco das originais pabfwn e nicolv não apresenta diferença significativa, enquanto que as linhagens lgp73 e SV24 apresentam diferença significativa quando comparadas com a linhagem nicolv.

Comparando-se os resultados obtidos para a atividade enzimática extracelular após sete dias de fermentação (Tabela 7, pág. 117), para cada uma das linhagens, verifica-se que a atividade enzimática aumenta consideravelmente. A análise estatística mostrou que há diferença significativa da atividade enzimática das linhagens lgp05 e lgp61 em relação à linhagem pabfwn, o mesmo acontecendo com as linhagens lgp73, SV24 e Snu em relação à original nicolv. Em relação ao teor de proteína, ambas as originais diferem significativamente, o mesmo ocorrendo entre a linhagem pabfwn e as linhagens lgp05 e lgp61, e a original nicolv com as mutantes derivadas da mesma (lgp73, SV24 e Snu). A análise estatística para o teor de proteína se repete em relação à atividade específica. A comparação dos pesos secos após 3 e 7 dias de fermentação sugere que transcorridos sete dias de fermentação as linhagens pabfwn, nicolv, lgp61 e SV24 já se encontram na fase de autólise, enquanto que as restantes ainda podem estar na fase log ou estacionária de crescimento. Estes resultados sugerem ainda, que o parâmetro adotado para a escolha do tempo de fermentação, ou seja, atividade enzimática extracelular, não tenha sido o mais apropriado, avaliando-se de forma incorreta o ponto máximo da fermentação. Entre as linhagens utilizadas neste estudo, não se verificaram diferenças significativas quanto a este parâmetro. Na análise do coeficiente atividade enzimática/peso seco, notam-se três grupos. O primeiro inclui as linhagens pabfwn e nicolv, cujos índices ficaram entre 3,7 e 3,7U GA/mg de micélio, respectivamente. Seguem-se no segundo grupo as linhagens lgp05, lgp61 e SV24, cujos índices são 0,35; 0,28 e 0,77U GA/mg de micélio, respectivamente. O terceiro grupo inclui as linhagens lgp73 e Snu com índices bem inferiores, 0,014 e 0,009U GA/mg de micélio, respectivamente. Estes índices refletem a eficiência de produção da enzima glicoamilase, já que índices maiores refletem maior atividade enzimática por unidade de peso seco. As linhagens mutantes derivadas, de baixa produção de glicoamilase, embora de forma mais lenta, atingem o mesmo crescimento que as linhagens originais. Considerando-se que a atividade enzimática extracelular das linhagens mutantes é significativamente menor em comparação com as linhagens originais, este fato indica que as linhagens mutantes sintetizam outra(s) enzima(s) que possibilita(m) a utilização de amido como fonte de carbono.

#### 4.4.1.2. Atividade intracelular

Analisando-se os resultados obtidos para a atividade de glicoamilase intracelular após 3 dias de fermentação (Tabela 8, pág. 118), nota-se que todas as linhagens apresentam acúmulo de enzima intracelular, com exceção da SV24. Para as linhagens pabfwn e nicolv, bem como para as mutantes lgp05, lgp61 e SV24 isto também é válido para o teor de proteína, enquanto que para as mutantes lgp73 e Snu ocorre o inverso, ou seja, o teor de proteína extracelular é maior do que o teor intracelular. Estes resultados indicam que estas linhagens mutantes conseguem secretar proteína com eficiência maior do que as outras linhagens. Em termos de atividade específica, as linhagens podem ser divididas em três grupos. As originais pabfwn e nicolv apresentam maior atividade específica (99,0 e 117,3U GA/mg de proteína, respectivamente), enquanto que as linhagens mutantes lgp05, lgp61 e SV24 apresentam atividade específica intermediária (50,3; 65,1 e 78,9U GA/mg proteína, respectivamente) e as linhagens mutantes lgp73 e Snu apresentam atividade específica baixa (27,0 e 15,0U GA/mg proteína, respectivamente). A diferença na atividade específica não é significativa entre as linhagens originais. Este parâmetro é significativamente maior na linhagem pabfwn em comparação com as linhagens lgp05 e lgp61, verificando-se o mesmo na comparação entre a linhagem nicolv e as linhagens lgp73, SV24 e Snu. Esta divisão se altera quando se analisa o coeficiente atividade enzimática/peso seco, uma vez que o grupo de maior coeficiente inclui ambas as linhagens originais, o grupo intermediário inclui as linhagens mutantes lgp61 e SV24 e o grupo de baixa inclui as linhagens mutantes lgp05, lgp73 e Snu. Do ponto de vista estatístico, a linhagem pabfwn apresenta diferença significativa em relação à linhagem lgp05, porém não com as linhagens nicolv e lgp61. A outra linhagem original, nicolv apresenta diferença significativa em relação às linhagens lgp73 e Snu, ao contrário do que acontece em relação à linhagem SV24.

Após 7 dias de fermentação (Tabela 8, pág. 118), a atividade enzimática intracelular aumentou para todas as linhagens estudadas. A linhagem nicolv apresenta atividade enzimática estatisticamente maior quando comparada com as linhagens lgp73, SV24 e Snu. A concentração intracelular de proteína, comparando-se a mesma aos 3 e 7 dias de

fermentação, aumenta para todas as linhagens, sendo que o aumento varia entre 6,2 e 19,2 vezes (pabfwn e lgp73, respectivamente). Em relação à atividade específica, verifica-se que a mesma aumenta para as linhagens pabfwn, nicolv e Snu, enquanto que as linhagens restantes apresentam decréscimo deste parâmetro. O coeficiente atividade enzimática/peso seco aumentou para todas as linhagens, originais e derivadas, entre o terceiro e o sétimo dia de fermentação.

#### **4.4.1.3. Atividade enzimática ligada ao micélio**

Em relação à atividade de glicoamilase ligada ao micélio (Tabela 9, pág. 119), decorridos 3 dias de fermentação, observa-se que a linhagem pabfwn apresenta atividade enzimática significativamente maior em relação às linhagens lgp05 e lgp61, enquanto que a linhagem nicolv apresenta diferença significativa em relação às linhagens lgp73 e Snu, mas não em relação à linhagem SV24. Comparando-se as linhagens originais entre si, a diferença na atividade enzimática não é significativa.

Decorridos 7 dias de fermentação (Tabela 9, pág. 119), a análise estatística mostra que, comparando-se a atividade enzimática das duas linhagens originais, pabfwn e nicolv, não há diferença significativa entre elas. A linhagem pabfwn apresenta diferença significativa com a linhagem lgp05, mas não com a lgp61. Por outro lado, a linhagem nicolv apresenta diferença significativa em relação às linhagens lgp73 e Snu, mas não em relação SV24. O coeficiente atividade enzimática/peso seco cai entre o terceiro e o sétimo dia de fermentação para todas as linhagens, exceto para a lgp05, onde este índice permanece inalterado. Para a linhagem pabfwn este coeficiente mostra-se significativamente maior do que para as linhagens lgp05 e lgp61. A linhagem nicolv apresenta coeficiente significativamente maior do que as linhagem lgp73, SV24 e Snu, enquanto que a diferença entre as duas linhagens originais não é significativa.

#### 4.4.1.4. Perfil de distribuição da atividade enzimática nas diversas frações

A análise relativa da concentração de enzima encontrada em cada fração para cada uma das linhagens, mostra que as linhagens originais pabfwn e nicolv e as mutantes derivadas lgp05, lgp61 e lgp73 apresentam um perfil semelhante (Figura I, pág. 131), após três dias de fermentação. Prevalece neste ponto a fração enzimática intracelular, enquanto que a fração ligada ao micélio é intermediária, e a fração extracelular é a mais baixa, chegando a ser nula, como no caso da lgp73. No caso da linhagem SV24, a maior fração corresponde à enzima extracelular, a enzima intracelular corresponde à intermediária e a fração ligada ao micélio é a mais baixa. Com a linhagem Snu, o perfil só apresenta fração intracelular e ligada ao micélio, ambas na mesma proporção.

A comparação do perfil de distribuição obtido para três dias de fermentação, com aquele correspondente a sete dias de fermentação (Figura II, pág. 132), evidencia que, após sete dias prevalece a fração enzimática extracelular para as linhagens pabfwn, nicolv, lgp05, lgp61 e SV24. Nestas cinco linhagens a proporção de enzima intracelular e aquela ligada ao micélio é muito baixa, ou até desprezível. No caso da lgp73, o perfil foge do característico, já que a fração correspondente à enzima intracelular e aquela ligada ao micélio correspondem juntas a quase 50% do total da atividade. No caso da Snu, a fração extracelular corresponde a aproximadamente 30%, enquanto que as outras duas somam cerca de 70%.

O perfil apresentado pela lgp73 após 7 dias de fermentação, levando-se em consideração o fato do peso seco ser inferior àquele achado para as linhagens originais, eventualmente poderia vir a ser semelhante ao apresentado para as outras linhagens, aumentando-se o tempo de fermentação. Possivelmente o mesmo raciocínio se aplica à linhagem Snu.

A distribuição da atividade enzimática encontrada para as linhagens pabfwn, nicolv, lgp05, lgp61 e SV24, era esperada, quando se leva em consideração que o amido, substrato da glicoamilase, não é transportado para o interior da célula.

#### **4.4.2. Atividade enzimática em meio com maltose (meio MAL)**

##### **4.4.2.1. Atividade extracelular**

Os dados obtidos para a fermentação em meio MAL (item 3.5.) após três dias de fermentação (Tabela 10, pág. 120), mostram que as linhagens pabfwn e nicolv apresentam nível de atividade enzimática significativamente maior do que todas as linhagens mutantes derivadas das mesmas. Observando-se o que ocorre com o teor total de proteína, nota-se que as mutantes apresentam concentração significativamente menor do que as originais, sendo que entre as duas não há diferença significativa. Quanto à atividade específica, as linhagens pabfwn e nicolv não diferem significativamente entre si. A linhagem Snu apresenta a maior atividade específica entre as linhagens mutantes, seguida pelas linhagens lgp05 e lgp61, e finalmente pela SV24, que apresenta a menor atividade específica. Em relação ao peso seco, nota-se que, com exceção da linhagem lgp73, que apresenta crescimento menor, o peso seco das outras seis linhagens estudadas não difere. O peso seco do mutante lgp73 é da ordem de 71% em relação à linhagem nicolv. Em função dos resultados obtidos para a atividade enzimática e para o peso seco, as linhagens originais apresentam um coeficiente bem mais elevado entre estes dois parâmetros. Para a linhagem Snu esta relação é 5,1 vezes menor do que para a linhagem nicolv, enquanto que para a linhagem SV24 é 14,9 vezes menor do que para a mesma linhagem original.

A comparação dos resultados obtidos para a atividade extracelular aos sete dias de fermentação (Tabela 10, pág. 120), mostra que a mesma aumenta em relação à atividade enzimática verificada após três dias de fermentação, para todas as linhagens estudadas. O fator de aumento varia de 2,2 vezes para a linhagem Snu a 8,6 vezes no caso da SV24, sendo que o aumento só não é significativo para as linhagens lgp61 e lgp73. Ao final da

fermentação não há diferença significativa entre as linhagens pabfwn e nicolv, bem como entre as linhagens lgp05, lgp61, SV24 e Snu. O teor de proteína total no meio extracelular sofre aumento entre três e sete dias de fermentação, sendo de aproximadamente 1,7 vezes para a linhagem nicolv e 11,1 vezes para a linhagem SV24. O incremento no teor de proteína total neste intervalo de tempo só é significativo para as linhagens pabfwn e nicolv. Em relação à atividade específica apresentada pelas linhagens, verifica-se que a mesma aumenta para as linhagens nicolv, lgp05, lgp61 e lgp73, enquanto que diminui para as outras três linhagens estudadas. O peso seco do micélio das linhagens pabfwn, nicolv, lgp61, SV24 e Snu diminuiu, embora a diminuição não possa ser considerada significativa, enquanto que a linhagem lgp61 mostrou perda significativa de peso seco e a linhagem lgp73 aumento significativo. Isto sugere, tal como no caso da fermentação em meio com amido, que as linhagens que apresentam perda de peso seco, já se encontram na fase de autólise, enquanto que as restantes ainda se encontram na fase log ou estacionária de crescimento. Analisando-se o coeficiente atividade enzimática/peso seco, as linhagens podem ser divididas em três grupos. O primeiro grupo inclui as duas linhagens originais, cujos índices ficaram em 6,79 para a pabfwn e 6,20 para a nicolv. No grupo intermediário situam-se as linhagens lgp05, lgp61, SV24 e Snu, com índices de 1,52; 1,08; 1,43 e 1,17, respectivamente. A linhagem lgp73, que possui os genes *lgpB<sub>73</sub>* e *ssuA<sub>1</sub>*, apresenta o índice 0,21, portanto 29 vezes menor do que o apresentado pela linhagem nicolv.

#### 4.4.2.2. Atividade intracelular

Os resultados obtidos para a atividade enzimática intracelular em meio com maltose (Tabela 11, pág.121), mostra que dentre as linhagens estudadas, a pabfwn apresenta a maior atividade aos três dias de fermentação. As linhagens restantes apresentam atividade intermediária entre a pabfwn e a linhagem lgp73, que mostra a menor atividade da enzima. Em relação ao teor de proteína total, verifica-se que as linhagens pabfwn, lgp61, SV24 e Snu apresentam o teor mais elevado de proteína. Em seguida vem as linhagens nicolv e lgp05 e por último a lgp73, que, como já foi mencionado, apresenta também a menor atividade enzimática. Verifica-se que para as linhagens pabfwn, nicolv e Snu, a atividade

enzimática extracelular é maior do que a intracelular, ao contrário portanto do que ocorre com as linhagens mutantes lgp05, lgp61, lgp73 e SV24. Em termos de teor de proteína, as sete linhagens estudadas apresentam maior teor de proteína intracelular do que extracelular aos três dias de fermentação. A linhagem pabfwn apresenta a maior atividade específica (78,7U GA/mg de proteína), enquanto que a linhagem nicolv e as linhagens mutantes lgp05, lgp61, lgp73 e SV24 apresentam atividade específica intermediária (44,6; 33,5; 32,3; 28,2 e 33,8U GA/mg de proteína respectivamente) e a linhagem Snu apresenta a menor atividade específica (18,2U GA/mg de proteína). A análise estatística mostra que há diferença significativa entre a linhagem pabfwn e as linhagens lgp05 e lgp61, enquanto que a linhagem nicolv mostra diferença significativa em relação à atividade específica com as linhagens lgp73 e Snu, porém não com a SV24.

Após sete dias de fermentação (Tabela 11, pág. 121), a atividade enzimática intracelular para todas as linhagens é menor do que aos três dias de fermentação, numa proporção de 4,3 vezes menor para a linhagem lgp61 e 1,8 vezes para a linhagem lgp05. A linhagem pabfwn apresenta 41,1U GA, com diferença significativa para a linhagem nicolv (17,5U GA), bem como em relação às linhagens lgp05 e lgp61, que apresentam 14,9 e 10,5U GA, respectivamente. A análise comparativa do teor de proteína intracelular mostra que o mesmo diminui para as linhagens que apresentam uma diminuição ou manutenção do peso seco entre três e sete dias de fermentação, o que inclui as linhagens pabfwn, nicolv, lgp61, SV24 e Snu. Na lgp73, como já foi mencionado, ocorre um aumento da massa celular entre três e sete dias de fermentação, acompanhado de um aumento considerável de proteína. A única exceção é a lgp05 que, apesar de não apresentar variação no peso seco entre três e sete dias de fermentação, apresenta um aumento de aproximadamente 83% no teor de proteína total neste intervalo. Em relação à atividade específica nota-se que as linhagens pabfwn e nicolv se destacam devido a uma atividade específica bem mais elevada do que as linhagens mutantes (36,1 e 27,8U GA/mg de proteína, respectivamente). As linhagens lgp05, lgp61 e SV24 apresentam atividade específica intermediária (11,2; 15,5 e 12,8U GA/mg de proteína, respectivamente), enquanto que as linhagens lgp73 e Snu apresentam baixa atividade específica (4,0 e 5,8U GA/mg de proteína, respectivamente). Os

resultados da análise estatística mostram que não há diferença significativa entre as linhagens pabfwn e nicolv, porém, entre estas e as respectivas linhagens mutantes derivadas, lgp05 e lgp61 e lgp73, SV24 e Snu a diferença é significativa. Para o coeficiente atividade enzimática/peso seco, tem-se a mesma distribuição verificada em relação à atividade específica. Ou seja, as linhagens pabfwn e nicolv apresentam os maiores índices (0,65 e 0,26U GA/mg de micélio, respectivamente), as linhagens lgp05, lgp61 e SV24 apresentam valores intermediários (0,22; 0,17 e 0,14U GA/mg de micélio), enquanto que a lgp73 e a Snu apresentam os menores valores (0,05 e 0,09U GA/mg de micélio). Estatisticamente a diferença entre as duas linhagens originais é significativa, e entre a linhagem pabfwn e as linhagens lgp05 e lgp61, também. Comparando-se a linhagem nicolv e as linhagens lgp73 e Snu, a diferença para o coeficiente atividade enzimática/peso seco é significativa, mas não há diferença significativa entre a linhagem nicolv e a linhagem SV24.

#### **4.4.2.3. Atividade ligada ao micélio**

Os dados referentes à atividade enzimática ligada ao micélio em meio MAL (item 3.5.) se encontram na Tabela 12 (pág. 122). O micélio é a fração que apresenta a menor atividade enzimática, analisando-se os dados obtidos aos três e aos sete dias de fermentação, sendo que esta observação já tinha sido feita em meio MAC (item 3.5.). Em relação a este parâmetro, aos três dias de fermentação, observa-se que as linhagens pabfwn e nicolv apresentam a atividade mais elevada (4,66 e 2,84U GA, respectivamente), enquanto que a linhagem lgp73 apresenta a menor atividade (0,25U GA). As outras linhagens se situam entre estes extremos, para as linhagens lgp05, lgp61, SV24 e Snu (0,84; 1,32; 1,19 e 1,35U GA, respectivamente). A diferença entre a atividade enzimática da linhagem original pabfwn e as linhagens derivadas lgp05 e lgp61 é significativa, o mesmo acontecendo entre a linhagem nicolv e as derivadas lgp73 e Snu. As linhagens pabfwn e nicolv, bem como as linhagens nicolv e SV24 não apresentam diferença significativa. Quanto à eficiência de produção da enzima, representada pelo coeficiente atividade enzimática/peso seco, verifica-se exatamente a mesma distribuição observada para a atividade enzimática. Entre as linhagens pabfwn e nicolv, este parâmetro apresenta diferença significativa, bem como entre

linhagem pabfwn e as linhagens lgp05 e lgp61. Entre a linhagem nicolv e as linhagens lgp73, SV24 e Snu a diferença também é significativa para o coeficiente atividade enzimática/peso seco.

A análise dos dados referentes aos sete dias de fermentação (Tabela 12, pág. 122), evidencia atividade extremamente baixa da linhagem nicolv. Pode-se dividir as linhagens conforme ocorreu aumento, diminuição ou não ocorreu alteração da atividade enzimática entre três e sete dias de fermentação. As linhagens pabfwn, nicolv e Snu sofreram diminuição da atividade, na linhagem lgp61 não se verificou alteração e as linhagens lgp05, lgp73 e SV24 apresentaram aumento da atividade enzimática ligada ao micélio. A relação atividade enzimática/peso seco seguiu exatamente o mesmo comportamento da atividade enzimática, com uma única exceção em relação à linhagem lgp61 que, apesar de não ter apresentado variação de atividade enzimática entre três e sete dias de fermentação, apresentou uma ligeira queda na eficiência de produção da enzima glicoamilase.

#### **4.4.2.4. Perfil de distribuição da atividade enzimática nas diversas frações**

As Figuras III e IV (págs. 133 e 134, respectivamente) mostram como a atividade enzimática total se distribui nas frações extracelular, intracelular e ligada ao micélio, decorridos três e sete dias de fermentação, respectivamente, em meio contendo maltose como fonte de carbono.

Decorridos três dias de fermentação (Figura III, pág. 133), verifica-se que para todas as linhagens a fração ligada ao micélio é a menor, não chegando a ultrapassar 2,3% da atividade total de glicoamilase apresentada pelas linhagens. Nas linhagens pabfwn, nicolv e Snu a fração extracelular é maior do que a intracelular, sendo que a diferença entre ambas é de 0,8; 59,8 e 19,7%, respectivamente. Nas linhagens lgp05, lgp61, lgp73 e SV24 a situação se inverte, isto é, a fração intracelular é maior do que a extracelular, sendo que a diferença para ambas é de 19,6; 45,9; 97,8 e 54,2%, respectivamente.

Verifica-se que todas as linhagens apresentam perfil semelhante. A fração enzimática ligada ao micélio é novamente a menor, variando de 0,2% para a linhagem nicolv a 5,2% para a lgp73. A fração intracelular têm uma distribuição bastante homogênea entre as linhagens estudadas, variando de 5,0% para a nicolv a 20,5% para a lgp73. A fração extracelular varia de 74,3% na linhagem lgp73 a 94,8% para a linhagem nicolv. Excluindo-se a lgp73 desta análise, em relação às frações extra e intracelular, em função do crescimento da mesma ser mais lento do que as demais, nota-se que a fração intracelular varia de 5,0% para a nicolv e 13,2% para a lgp05, e a fração extracelular varia de 85,5% para a lgp05 a 94,8% para a nicolv.

#### **4.4.3. Comparação das fermentações em meio MAL e em meio MAC**

A Tabela 13 (pág. 123) mostra os dados obtidos para os parâmetros atividade enzimática, teor de proteína, atividade específica, peso seco e atividade enzimática/peso seco em meio MAL e meio MAC (item 3.5.) para todas as linhagens estudadas. Transcorridos três dias de fermentação, para as sete linhagens estudadas, a somatória da atividade enzimática presente em cada uma das frações analisadas é maior no meio contendo maltose do que no meio contendo amido. Decorridos sete dias de fermentação, verifica-se que as linhagens pabfwn, nicolv, lgp61 e SV24 apresentam teor total, isto é, somatória das três frações, menor no meio MAC, quando comparado com o meio MAL.

A Tabela 14 (pág. 124) apresenta os resultados obtidos para o teor de proteína encontrado nas frações extra e intracelular, para as fermentações em meio MAL e em meio MAC (item 3.5.). Com exceção da linhagem lgp05 todas as outras linhagens apresentam, decorridos três dias de fermentação, mais proteína em meio MAL do que em meio MAC. No entanto, decorridos sete dias, a situação se inverte, isto é, as linhagens passam a apresentar maior teor de proteína no meio MAC.

Os dados que constam da Tabela 15 (pág. 125), se referem à atividade específica encontrada para as frações extra e intracelular para todas as linhagens estudadas. No meio com maltose ocorre maior atividade específica em comparação com o meio contendo amido. Esta observação é válida para três dias, assim como para sete dias de fermentação, com exceção apenas da linhagem pabfwn, onde ocorre o inverso.

Relacionando os resultados obtidos para o teor de proteína com aqueles encontrados para a atividade específica, verifica-se que as linhagens apresentam, decorridos três e sete dias de fermentação, atividade específica mais elevada em meio contendo maltose como fonte de carbono.

A Tabela 16 (pág. 126) mostra os resultados comparativos para o parâmetro peso seco em ambos os meios de fermentação. O peso seco do micélio é sempre maior no meio MAC, com exceção da linhagem lgp73 aos três dias de fermentação, quando o peso seco da linhagem é maior em meio com maltose.

Tomando-se como base o peso seco em meio MAL, o peso seco em meio MAC é 3,7 a 96,5% maior (para a Snu e pabfwn, respectivamente) decorridos três dias de fermentação. Após sete dias, a diferença de peso seco do meio MAL para o meio MAC varia de 34,7 a 95,9% (para a lgp73 e lgp61, respectivamente).

Quanto à eficiência de produção da glicamilase, expressa pela relação entre atividade enzimática e peso seco (Tabela 17, pág. 127), a mesma é sempre maior, para as frações extra e intracelular de cada uma das linhagens e dos tempos de fermentação estudados, em meio MAL.

Como já foi mencionado anteriormente, o micélio é muito pouco eficiente na produção da enzima, sendo que as razões já foram enumeradas, o que se verifica para ambos os meios utilizados.

O estudo da fermentação em meio com maltose foi feito devido à necessidade de se trabalhar com um meio de composição conhecida, para extração de DNA e principalmente RNA, em condições de indução e não indução da glicoamilase das linhagens estudadas. Em relação à extração de proteína e eletroforese para detecção das diferentes frações da enzima, a definição de um meio reprodutível na sua composição, também era importante, visto que as proteínas provenientes da farinha de mandioca dificultariam a interpretação dos resultados obtidos.

Enquanto o peso seco para todas as linhagens é significativamente maior no meio MAC, a atividade específica é significativamente menor em meio MAC, tanto aos três como aos sete dias de fermentação. Isto indica que no meio MAC houve a participação de outras enzimas amilolíticas, além da glicoamilase. Uma possibilidade que se encaixa bem nesta situação é a  $\alpha$ -amilase. O mecanismo sinérgico envolvendo a  $\alpha$ -amilase e a glicoamilase na degradação do amido, prevê a degradação inicial do amido pela primeira enzima, que hidrolisa o amido a moléculas menores, preferencialmente dextrinas, que introduzidas na célula, desencadeariam a indução da glicoamilase. Esta hipótese, formulada por BARTON et al. (1972) e FOWLER et al. (1990), confrontada com os resultados obtidos para as linhagens de crescimento mais lento, medido em termos de peso seco, e que inclui as linhagens Igp05, Igp 73 e Snu em meio MAC, faz supor que estas apresentam alterações também na  $\alpha$ -amilase, (MASIERO, 1992). Estas alterações poderiam envolver a síntese, secreção ou estrutura desta proteína, o que poderia ser esclarecido em relação às linhagens em questão.

As enzimas apresentam, do ponto de vista do mecanismo de hidrólise do amido, características próprias. A  $\alpha$ -amilase é uma endohidrolase e, portanto, hidrolisa ligações  $\alpha$ -1,4 do amido ao acaso, levando a dextrinas como produtos da reação, desta forma liquefazendo o substrato. A glicoamilase é uma exohidrolase, que também age sobre as ligações  $\alpha$ -1,4, porém, retirando moléculas de glicose da extremidade não redutora do amido e seus análogos, como dextrinas e maltose. Na presença de amido as enzimas apresentam ação sinérgica, com a  $\alpha$ -amilase liberando substrato para a glicoamilase.

O meio MAC é um meio de cultura rico em nutrientes, em virtude da farinha de raspa integral de mandioca, quando comparado com o meio MAL. A composição centesimal média da mandioca é a seguinte: 83,2g de carboidratos; 1,4g de proteína; 0,5g de lipídios; 343mg de potássio; 198mg de fósforo; 45mg de cálcio; 40,6mg de sódio; 1600 $\mu$ g de niacina; 900 $\mu$ g de ferro; 80 $\mu$ g de tiamina; 70 $\mu$ g de riboflavina e 14 $\mu$ g de ácido ascórbico (FRANCO, 1992). Os meios de cultura utilizados diferem quanto à “fonte de carbono”. Na composição do meio entram 20g de farinha de raspa integral de mandioca/l, enquanto o meio MAL apresenta 10g de maltose/l. A diferença na composição dos meios é responsável pela maior quantidade de micélio e atividade específica de glicoamilase menor para o meio MAC, ao contrário do meio MAL.

Os resultados obtidos neste trabalho não estão de acordo com o trabalho de SINKAR e LEWIS (1980) que verificaram que a indução da glicoamilase em *Aspergillus niger* com amido é mais eficiente. No estágio inicial da fermentação, a maltose mostrou-se mais eficiente como indutora da enzima em questão. Analisando dados obtidos para o fungo *A. terreus*, utilizando diferentes fontes de carbono a 1% em meio Czapek Dox, GHOSH et al. (1990) verificaram que a atividade enzimática era máxima em meio com amido, maltotriose, maltose, amilose ou amilopectina. Este fato levou-os à conclusão que a enzima é induzida por maltose ou carboidratos com unidades de maltose na sua estrutura.

Para a linhagem pabfwn, CALIL (1988) encontrou atividade enzimática, em U GA, e peso seco, em mg, determinados nas mesmas condições que as adotadas neste trabalho, significativamente maiores. A atividade máxima extracelular, ocorreu no 5º dia de fermentação e correspondeu a 27,3U GA, caindo depois para 16,9U GA no 7º dia. Em relação ao pH, o pH inicial de 5,23 caiu para 1,95 no 3º dia e 1,93 no 4º, recuperando-se em seguida até atingir 3,32 no 7º dia. Ainda segundo CALIL (1988), o peso seco para a linhagem pabfwn alcança seu valor máximo aos três dias de fermentação, atingindo 160mg, caindo depois para 115mg aos 7 dias. Confrontando estes resultados com os que constam na Tabela 1 (pág. 113), verifica-se que a linhagem, embora a metodologia adotada fosse a mesma, atinge 18,5U GA, após sete dias de fermentação caindo para 16,8U GA após oito

dias. Ou seja, a mesma linhagem atingiu o máximo de produção com maior tempo de fermentação, além da diferença significativa entre a atividade máxima encontrada. Segundo CALIL (1988), o peso seco atinge 160mg aos três dias, enquanto que neste estudo ele atinge 128mg. Aos sete dias de fermentação, as linhagens não apresentam diferença significativa no peso seco verificado em ambos os estudos.

Todas as linhagens estudadas atingem praticamente o mesmo peso seco final, embora a *lgp73* apresenta crescimento mais lento, fato este que MASIERO (1992) relacionou com a presença dos genes *lgpB<sub>73</sub>* e *ssuA<sub>1</sub>*. O primeiro deles é responsável pela redução da produção de glicoamilase para níveis entre 2 e 4,5U/ml, enquanto que o outro gene acarreta atraso de três dias no início do crescimento em meio mínimo com amido como fonte de carbono, além de redução da produção de glicoamilase para níveis abaixo de 1U/ml. Ainda segundo MASIERO (1992), o gene *ssuA<sub>1</sub>* tem efeito epistático sobre o gene *lgpB<sub>73</sub>*, e a combinação destes, resultava no atraso de seis dias no início do crescimento e redução a níveis mínimos na produção de glicoamilase. Neste estudo, os resultados obtidos para a atividade enzimática da linhagem *lgp73* em ambos os meios utilizados, MAC e MAL, estão de acordo com MASIERO (1992). Para o estudo do crescimento da mesma linhagem, verificando o crescimento das linhagens por meio do diâmetro das colônias, MASIERO (1992) utilizou meio mínimo com substituição da glicose por outras fontes de carbono, e verificou que em meio com amido a mesma não apresentava crescimento após três dias de incubação, o mesmo acontecendo com a linhagem *lgp05*. Em estudos de crescimento em placas de Petri, contendo meio mínimo com amido, por tempo mais prolongado, MASIERO (1992) observou que os mutantes *lgp05* e *lgp73* apresentavam atraso de 3 e 6 dias no crescimento, respectivamente. No presente estudo, adotou-se o peso seco do micélio como parâmetro para verificação do crescimento das linhagens e meio de fermentação com substituição da farinha de mandioca por maltose. A linhagem *lgp05* apresentou atraso em meio MAC, e não apresentou atraso de crescimento em meio MAL. A linhagem *lgp73* apresentou atraso em ambos os meios utilizados, com atraso maior no meio MAL. Os resultados obtidos neste trabalho, sugerem que no meio MAC há fatores nutricionais, que tornam este meio menos desfavorável ao crescimento da linhagem *lgp73*, do que o meio

mínimo com amido utilizado por MASIERO (1992). Este fator pode ser a glicose, bem como vitaminas e sais minerais.

Trabalhando com *A. niger* e estudando a secreção da enzima glicoamilase no meio de fermentação, HSIEH e WU (1984), perceberam que a enzima era gradualmente secretada no meio externo, uma vez que a mesma aumentava durante a fase de crescimento do micélio e permanecia constante a partir do início da fase estacionária, indicando que o micélio precisa estar crescendo para ocorrer secreção de glicoamilase. Estes resultados também contrariam os obtidos neste trabalho, uma vez apenas três das linhagens estudadas em meio MAC apresentam aumento de peso seco após três dias de fermentação, porém a quantidade de enzima total (somatória das frações extracelular, intracelular e ligada ao micélio) aumenta, sendo que em meio MAL fizeram-se as mesmas observações.

#### **4.5. Produção de enzima em meio com maltose (meio MAL) e em meio com maltose tamponado (meio MALt)**

A produção de enzima em meio com maltose e em meio com maltose tamponado foi feita de acordo com o item 3.5., e tinha por finalidade verificar a influência que o abaixamento do pH do meio sobre a estabilidade da glicoamilase, uma vez que na literatura se faz referência a valores em torno de 5,5 a 7 para o pH de estabilidade da enzima.

Independente da fonte de carbono adicionada ao meio, o mesmo apresenta fosfato diidrogenado de potássio, que exerce um efeito tampão fraco, sendo que o pH do meio antes da autoclavagem é de 5,5; e após a mesma passa para 5,8. Escolheu-se o tampão citrato, devido ao pH inicial do meio, e, sendo a linhagem 10v10 produtora de ácido cítrico, capacidade esta que pode estar presente também nas linhagens dela derivadas, esperava-se que o tampão citrato inibisse a produção de ácido cítrico.

As Figuras V e VI (págs. 135 e 136, respectivamente) mostram as curvas de pH da fermentação para os meios MAL e MALt, respectivamente.

Na Figura V (pág. 135), verifica-se que todas as linhagens apresentam queda brusca de pH nas primeiras 50 horas de fermentação, quando o pH atinge valores entre 3 e 4. Em seguida, com exceção da linhagem 10v10, todas continuam mostrando queda no pH, para valores de aproximadamente 1,8 a 2,7. Transcorridas 70 horas de fermentação todas estas linhagens apresentaram pH abaixo de 3. Tendo em vista que o pH abaixa muito nos dois primeiros dias de fermentação e a mesma demora ao redor de cinco dias para que as linhagens atinjam boa produção de glicoamilase, este fator poderia estar afetando a estabilidade da enzima, constituindo-se no fator limitante em relação à baixa produção da mesma. A linhagem produtora de ácido cítrico, a 10v10, é a que apresenta menor queda do pH do meio.

A Figura VI (pág. 136) mostra a curva de pH da fermentação para o meio MALt. Verificou-se que a queda de pH não foi tão acentuada no meio tamponado, quando comparado com o meio não tamponado. Neste caso, não ocorreu um abaixamento repentino nas primeiras 50 horas de fermentação no pH, e todas as linhagens apresentaram pH acima de 3, transcorridas 120 horas de fermentação, portanto nos primeiros 5 dias. As linhagens apresentaram um comportamento bem mais heterogêneo neste meio do que no meio não-tamponado, em relação ao pH, uma vez que em meio MALt o pH final se situa entre 2,6 e 5,4. A curva de pH da linhagem lgp73, diferiu da curva das outras linhagens, uma vez que, transcorridas 100 horas de fermentação, passa a apresentar aumento do pH. O estudo sobre o efeito do pH na estabilidade da enzima, é um aspecto a ser estudado mais detalhadamente.

As Figuras VII e VIII (págs. 137 e 138, respectivamente) apresentam as curvas de atividade extracelular da glicoamilase em meio com maltose (MAL) e meio com maltose tamponado (MALt). A comparação de ambas as curvas no meio tamponado, evidencia que a atividade da glicoamilase, além de ser maior, não apresenta a diminuição, que todas as linhagens apresentam no meio não-tamponado. Este fato, poderia estar relacionado com a perda de atividade devido à inativação decorrente do pH baixo do meio de fermentação. A literatura refere a estabilidade da enzima na faixa de pH 4 a 5,5. Em testes preliminares feitos com a enzima da linhagem pabfwn estes valores foram confirmados. Como mostra a

feitos com a enzima da linhagem pabfwn estes valores foram confirmados. Como mostra a Figura V (pág. 135), o pH do meio de fermentação não-tampado com menos de dois dias, já caiu abaixo de pH 4.

#### 4.6. Instabilidade das linhagens

Neste estudo, as linhagens mostraram-se mais lentas na produção de glicoamilase do que anteriormente descrito por MASIERO (1992), como foi discutido anteriormente.

Tanto para a fermentação em meio MAC quanto em meio MAL, o desvio padrão da produção de glicoamilase, foi sempre bem acentuado. Este fato pode ser explicado por diferenças mínimas na composição do meio de cultura, diferenças nas condições físicas da fermentação, incluindo o pH do meio, a temperatura de incubação e concentração de substâncias contaminantes. O desvio padrão para os resultados obtidos em meio MAL é, via de regra, menor do que no meio MAC. Este tipo de instabilidade foi mencionada por GARDNER et al. (1956) e MERRICK (1975), respectivamente para *A. niger* e *A. nidulans*.

Em todas as linhagens, mas com maior frequência nas linhagens de baixa produção extracelular de glicoamilase, quando crescidas em meio sólido, foi possível observar setores, com características fisiológicas e morfológicas distintas da colônia. Para a linhagem hgp169, foi possível observar em apenas uma placa quatro tipos morfológicos diferentes. Em 1978, BONATELLI Jr. sugeriu que a instabilidade da linhagem 10v10 de *A. niger* era devida à heterocariose, relacionada com o surgimento de setores a partir de colônias crescidas em meio mínimo, e ausência de setores em meio completo. BURR et al. (1982) relataram o surgimento de setores de crescimento acelerado como consequência de deleção espontânea de segmento cromossomal duplicado em linhagens de *A. nidulans*.

#### 4.7. Teste de sensibilidade à higromicina e ao benomil

Os testes foram realizados de acordo com os itens 3.12.1 e 3.12.2., respectivamente para sensibilidade das linhagens frente à higromicina e benomil.

A Tabela 18 (pág. 128) apresenta os resultados obtidos para a sensibilidade à higromicina após 48 horas de incubação.

Os testes foram feitos sempre na presença do estabilizador osmótico utilizado na transformação, uma vez que os testes preliminares indicavam diferenças marcantes quanto à sensibilidade das linhagens frente a um ou outro agente químico, na ausência e na presença do estabilizador. O crescimento dos protoplastos em meio com sorbitol foi bem mais vigoroso, com diminuição da sensibilidade à higromicina. Os testes finais foram feitos em meio com sorbitol, já que KCl não tem este mesmo efeito na sensibilidade das linhagens.

A Tabela 18A (pág. 128) mostra os resultados obtidos para as linhagens Snu e 10v10 decorridas 108 horas de incubação.

Estas duas linhagens foram as únicas que mostraram diferença quanto à sensibilidade a higromicina quando incubadas por período de tempo mais longo. Estas mesmas observações também se fizeram nos testes de sensibilidade dos protoplastos ao benomil, cujos resultados se encontram na Tabela 19 (pág. 129). FERREIRA (1991) fez as mesmas observações para a sensibilidade dos protoplastos ao benomil.

A Tabela 20 (pág. 129) mostra os resultados para a resistência das linhagens de *Aspergillus niger*, utilizadas neste trabalho, ao benomil em meio de regeneração com KCl 0,6M. Verifica-se que nestas condições as linhagens pabfwn, nicolv e lgp73 se mostram mais sensíveis ao fungicida, do que no meio de regeneração com sorbitol 1,2M.

Nos experimentos de transformação utilizaram-se as concentrações de 200µg de higromicina/ml e 0,75µg de benomil/ml de meio para as linhagens lgp61 e Snu.

#### 4.8. Produção de protoplastos

Para os experimentos de transformação foram escolhidas as linhagens lgp61 e Snu. A primeira delas foi escolhida em razão da possibilidade de apresentar mutação na estrutura primária da glicoamilase e a segunda em função da atividade enzimática muito baixa.

O primeiro protocolo adotado foi o de BALLANCE et al. (1983) modificado. O parâmetro usado para avaliar o melhor tratamento para protoplastização do micélio, foi o número de protoplastos obtidos e a viabilidade dos mesmos.

Com o protocolo mencionado, o melhor resultado foi obtido com o tempo de 14 horas de incubação do micélio, protoplastização com 5mg/ml de Novozym 234 e celulase, respectivamente, e sorbitol 1,2M como estabilizador osmótico. Neste experimento obtiveram-se  $4,6 \times 10^5$  protoplastos para a linhagem lgp61, com viabilidade de 2,3% e  $3,8 \times 10^5$  protoplastos para a linhagem Snu, com viabilidade de 1,9%.

A metodologia descrita por BALLANCE et al. (1983) prevê a utilização de 2,5mg/ml de cada uma das enzimas líticas para *A. nidulans*. UNKLES et al. (1989), trabalhando com *A. niger*, utilizaram apenas Novozym 234, na concentração final de 5mg/ml, incubando o micélio durante 2 horas a 30°C. FERREIRA (1991) obteve  $2,5 \times 10^7$  protoplastos da linhagem lgp73 utilizando 2,5mg/ml de Novozym e celulase, respectivamente, e solução de STC (sorbitol 1,2M; Tris·Cl 10mM pH 7,5; CaCl<sub>2</sub> 50mM) no lugar de do tampão de K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> (KCl 0,6M; CaCl<sub>2</sub> 50mM).

Os resultados obtidos neste estudo apontaram para o tempo de protoplastização como o fator determinante para o baixo índice de protoplastos, e principalmente, da baixa viabilidade. A viabilidade encontrada por van HARTINGSVELDT et al. (1987) para *A.*

*niger* variou de 10-20%. O tempo médio observado para a protoplastização foi de 4,5 horas, portanto bem maior que o tempo utilizado por FERREIRA (1991) para a linhagem lgp73 e CALIL (1995) para a linhagem pabfwn.

Com os resultados obtidos com a metodologia de BALLANCE et al. (1983) em relação à concentração de enzimas líticas e estabilizador osmótico, adotou-se a metodologia de TILBURN et al. (1983), que difere quanto à agitação adotada na incubação do micélio com a solução de enzimas. Enquanto BALLANCE et al. (1983) adotaram 40rpm, TILBURN et al. (1983) utilizaram 100rpm. Outra diferença entre os protocolos, é o fato de TILBURN et al. (1983) utilizarem micélio crescido em meio líquido, ao contrário de BALLANCE et al. (1983), que utilizaram micélio crescido sobre meio sólido coberto com celofane.

Esta modificação, embora não levasse ao aumento do número de protoplastos, obtendo-se  $5,1 \times 10^5$  e  $4,2 \times 10^5$  protoplastos para as linhagens lgp61 e Snu, a viabilidade aumentou para 4,2 e 3,5%, respectivamente. O tempo de contato das enzimas líticas com o micélio abaixou para 3,5 horas, e sugeriu ser responsável pelo melhoramento verificado na protoplastização.

O terceiro protocolo, de CAMPBELL et al. (1989), recomenda agitação de 250rpm para a obtenção de protoplastos. Em princípio, a agitação maior poderia diminuir o tempo de contato entre micélio e enzimas, mas também poderia provocar dano mecânico aos protoplastos. Este protocolo foi ensaiado utilizando-se Novozym 234 e celulase, na concentração anteriormente mencionada, sorbitol 1,2M para estabilizar os protoplastos e agitação de 250rpm na fase de protoplastização. Nestas condições, o tempo de protoplastização, caiu para, em média, 50 min. O número de protoplastos obtidos aumentou, passando para  $1,71 \times 10^6$  e  $1,32 \times 10^6$ , respectivamente, para as linhagens lgp61 e Snu. A viabilidade destes protoplastos ficou em 6,7 e 5,1%, respectivamente, ainda bem inferior aos valores encontrados por van HARTINGSVELDT et al. (1987).

A preparação de protoplastos obtidos de acordo com o último protocolo mencionado, foi utilizada para a cotransformação.

#### **4.9. Transformação**

A transformação, feita seguindo-se a metodologia descrita por BALLANCE et al. (1983), TILBURN et al. (1983) e CAMPBELL et al. (1989) não permitiu o isolamento de nenhum transformante sob nenhuma das condições descritas. Utilizou-se o plasmídeo pCAMG91 nos experimentos de transformação, variando-se o tempo de exposição dos protoplastos ao DNA de 20 até 60min. O DNA foi utilizado na sua forma circular e linear.

Nos experimentos de cotransformação, feitos nas condições descritas o item 3.11.3., utilizaram-se vetores circulares e linearizados. Obtiveram-se três colônias potencialmente transformantes como resultado da transformação da linhagem lgp61 com pBT6/pCAMG91. Estes transformantes foram então repicados em meio sem sorbitol, porém com benomil, verificando-se que não eram estáveis.

#### **4.10. Eletroforese de proteínas**

A eletroforese de proteínas em SDS-PAGE foi feita de acordo com o item 3.9., após fermentação em meio MAC. As amostras e o padrão para glicoamilase e  $\alpha$ -amilase não foram previamente purificados, impossibilitando a correta identificação das bandas de enzimas .

Na eletroforese de proteínas em poliacrilamida, cujos resultados estão na Figura IX (pág. 139), mostra que todas as linhagens apresentam banda correspondente à glicoamilase, de maior intensidade para as linhagem hgp169 e hgp252, seguidas das linhagens pabfwn, nicolv e lgp61, e finalmente as linhagens lgp73, Snu e 10v10.

Todas as linhagens apresentaram banda de proteína compatível com a presença de  $\alpha$ -amilase. A presença desta banda confirma os resultados obtidos para as fermentações em meio MAC, uma vez que todas as linhagens, com exceção da lgp73, atingem ao final de sete dias praticamente o mesmo peso seco do micélio.

A intensidade da banda correspondente à  $\alpha$ -amilase é variável entre as diferentes linhagens, no entanto, relativo à intensidade da banda de glicoamilase, as linhagens de baixa produção desta enzima, apresentam intensidade maior de  $\alpha$ -amilase.

A questão que não pode ser esclarecida, é o momento exato em que ocorre a indução de cada uma destas enzimas, ou seja, se ocorre concomitantemente ou em seqüência. Esta hipótese, de ocorrer indução de uma outra enzima amilolítica, provavelmente a  $\alpha$ -amilase, tinha sido cogitada por BARTON et al. (1972), FOGARTY & KELLY (1977) e FOWLER et al. (1990), em relação à utilização do amido por *A. niger*.

Os resultados obtidos na eletroforese são reforçados por aqueles obtidos por meio de cromatografia em papel (dados não mostrados). Nesta cromatografia, foi possível notar que as linhagens de baixa produção de glicoamilase e a selvagem, apresentam proporcionalmente mais maltose quando comparado com glicose, do que as outras linhagens.

Por comparação do Rf entre as amostras e o padrão, o peso molecular da glicoamilase foi estimado em 70 kDa, o que está de acordo com os dados da literatura (LINEBACK et al., 1969; BOEL et al., 1984a) para *A. niger*.

#### **4.11. Análise do padrão de restrição do gene da glicoamilase**

O resultado da amplificação do gene *glaA*, feito nas condições descritas no item 3.14., se encontra na Figura X (pág. 140). Obteve-se fragmento de 2473pb (BOEL et al., 1984a), que corresponde ao gene da glicoamilase, para todas as linhagens estudadas.

Estimou-se, por comparação visual, a quantidade total de DNA obtido a partir de 10ng de DNA genômico de cada linhagem em 30 ciclos de amplificação em 10 a 12 $\mu$ g.

A eletroforese para separação dos fragmentos resultantes da hidrólise do gene *glaA*, foi feita em gel de gradiente descontínuo de poliacrilamida. As Figuras XIA, B e C (págs. 141, 142 e 143, respectivamente) mostram os resultados obtidos nesta análise para as nove linhagens estudadas.

Analisando-se estas figuras, verifica-se que não há diferença de padrão de restrição entre as diferentes linhagens em relação a nenhuma das três reações de hidrólise montadas. Isto não quer dizer necessariamente que o gene *glaA* das linhagens estudadas, não possa apresentar alguma mutação na sua seqüência, no entanto, ela não se tornou evidente com esta metodologia.

Para a digestão com as enzimas de restrição da reação A, os sítios de restrição no fragmento amplificado eram conhecidos, de forma que se esperavam seis fragmentos na digestão total, de 78, 149, 158, 244, 288 e 1057pb, respectivamente. O tamanho dos fragmentos encontrados consta da Figura XIA (pág. 141). A análise do tamanho dos fragmentos encontrados nesta digestão, sugere que houve digestão parcial do fragmento do gene da glicoamilase, já que não se esperava encontrar fragmentos acima de 1057pb.

As Figuras XIB e C (págs. 142 e 143, respectivamente) correspondem à hidrólise com enzimas de restrição para as quais não há sítio de restrição conhecido no fragmento amplificado.

#### **4.12. “Southern blotting”**

Dos métodos utilizados para extração de DNA genômico, o de RAEDER & BRODA (1985) modificado resultou em rendimento maior do que o método rápido de LECELLIER & SILAR (1994).

No entanto, a maior dificuldade, na extração do DNA das linhagens originais e suas derivadas, ao contrário da 10v10, verificou-se na trituração do micélio. Os melhores resultados, em relação ao rendimento e à integridade do DNA genômico, foram obtidos com micélio liofilizado.

A Figura XII (pág. 144) apresenta a eletroforese do DNA genômico, digerido com as enzimas EcoRI e EcoRV, e a autorradiografia correspondente, resultado da hibridação do DNA com sonda homóloga para o gene *glaA*. Como pode ser verificado, todas as linhagens apresentaram hibridação com fragmento de DNA que corresponde ao tamanho esperado de 2486pb (BOEL et al, 1984a) para o gene de interesse.

O sinal, apesar de muito fraco, apresentou praticamente a mesma intensidade para todas as linhagens estudadas, o que significa que, uma vez que a quantidade de DNA genômico aplicada na eletroforese em gel de agarose era a mesma para todas as linhagens, as mesmas devem apresentar o mesmo número de cópias deste gene.

#### **4.13. “Northern blotting”**

A extração de RNA, da mesma forma como a extração de DNA, foi feita seguindo diversos protocolos, com consta no item 3.17.

A hibridação do RNA total, obtido após fermentação em meio MAL, com sonda de DNA homólogo, consta da Figura XIII (pág. 145). Todas as linhagens mostraram sinal positivo na hibridação, porém, aparentemente, em intensidade variável. A análise da hibridação RNA/DNA ficou bastante prejudicada em função da dificuldade das linhagens crescerem no meio com maltose (MAL), devido à instabilidade, anteriormente discutida. Em meio com xilose como fonte de carbono (XIL), a extração de RNA não foi possível, devido à baixa taxa de crescimento das linhagens.

## 5. Conclusões

Os resultados dos experimentos realizados ao longo deste trabalho, nas condições descritas, permitem concluir que:

1. Em meio com farinha integral de raspa de mandioca não há diferenças significativas ao final da fermentação entre o crescimento, analisado em termos do peso seco, para as diversas linhagens estudadas, com exceção da linhagem lgp73.
2. Em meio com maltose, embora o peso seco final seja menor do que no meio com farinha de raspa de mandioca, o crescimento de todas as linhagens se mostra igual.
3. Todas as linhagens mostraram grande instabilidade na produção de glicoamilase na fermentação em meio MAC e em meio MAL. Outra forma de instabilidade está na perda de vigor de crescimento, acompanhado da perda de atividade da glicoamilase, nos meios utilizados para produção de enzima.
4. A reação de polimerase em cadeia (PCR) se mostrou eficiente na amplificação do gene *glaA*. As linhagens de baixa produção de glicoamilase, e a selvagem apresentaram, para as enzimas de restrição testadas, padrão de restrição semelhante para este gene.
5. A eletroforese de proteínas, em condições não-denaturantes, evidenciou banda correspondente à glicoamilase, além de banda de  $\alpha$ -amilase, esta última proporcionalmente mais forte nas linhagens lgp73, Snu e 10v10.
6. Todas as linhagens apresentaram sinal positivo na hidridação do DNA genômico, digerido com EcoRI e EcoRV, com sonda homóloga para o gene *glaA*. Na hibridação do RNA total, obtido de micélio crescido em condições de indução da enzima glicoamilase, com a mesma sonda, as linhagens apresentaram sinal positivo.

---

## 6. Referências bibliográficas

- ABDULLAH, M.; I.D. FLEMING; P.M. TAYLOR & W.J. WHELAN. 1963. Substrate specificity of the amyloglucosidase of *Aspergillus niger*. *Biochem. J.*, 89: 35P-36P.
- ALAZARD, D. & M. RAIMBAULT. 1981. Comparative study of amylolytic enzyme production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state cultivation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, 12: 113-117.
- ALEKSENKO, A.Y.; N.A. MAKAROVA; I.V. NIKOLAEV & A.J. CLUTTERBUCK. 1995. Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene. *Curr. Genet.*, 28: 474-477.
- ALESHIN, A.; A. GOLUBEV; L.M. FIRSOV & R.B. HONZATKO. 1992. Crystal structure of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *X-100* to 2,2Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 267: 19291-19298.
- ALESHIN, A.; L.M. FIRSOV & R.B. HONZATKO. 1994. Refined structure for the complex of acarbose with glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *X-100* to 2,4Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 269: 15631-15639.
- ASHIKARI, T.N.; N. NAKAMURA; Y. TANAKA; N. KIUCHI; Y. SHIBANO; T. TANAKA; T. AMACHI & H. YOSHIZUMI. 1986. *Rhizopus* raw-starch-degrading glucoamylase: its cloning and expression in yeast. *Agric. Biol. Chem.*, 50: 957-964.
- AUSUBEL, F.M.; R. BRENT; R.E. KINGSTON; D.D. MOORE; J.G. SEIDMAN; J.A. SMITH & K. STRUHL. (Eds). 1998. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.

- AZEVEDO, J.L. 1976. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopatol.*, 2: 3-15.
- AZEVEDO, J.L. & R. BONATELLI Jr. 1982. Genetics of the over-production of organic acids. In: Overproduction of microbial products. KRUMPHANZIL, V. (Ed.). Academic Press, New York, p. 439-450.
- AZEVEDO, J.L. & S.O.P. COSTA. 1973. Exercícios práticos de genética. Ed. da Universidade de São Paulo. São Paulo. 288 p.
- AZEVEDO, J.L. & J.A. ROPER. 1970. Mitotic non-conformity in *Aspergillus*: successive and transposable genetic changes. *Genet. Res.*, 16: 79-93.
- BAINBRIDGE, B.W. & J. A. ROPER. 1966. Observations on the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 42: 417-424.
- BAKIR, U.; P.M. COUTINHO, P.A. SULLIVAN; C. FORD & P.J. REILLY. 1993. Cassette mutagenesis of *Aspergillus awamori* glucoamylase near its general acid residue to probe its catalytic and pH properties. *Protein Eng.*, 6: 939-946.
- BALL, C. 1971. Haploidization analysis in *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.*, 66: 63-69.
- BALL, C. & J.L. AZEVEDO. 1976. Genetic instability in parasexual fungi. In: *2nd International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms*. New York, Academic Press, 243-251.
- BALLANCE, D.J. ; F.P. BUXTON & G. TURNER. 1983. Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 112: 284-289.

- BALLANCE, D.J. & G. TURNER. 1985. Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 36: 321-331.
- BALLANCE, D.J. & G. TURNER. 1986. Gene cloning in *Aspergillus nidulans*: isolation of the isocitrate lyase gene (*acuD*). *Mol. Gen. Genet.*, 202: 271-275.
- BARBESGAARD, P. 1977. Industrial enzymes produced by members of the genus *Aspergillus*. In: Genetics and Physiology of *Aspergillus*. Smith, J.E.; Pateman, J.A. (eds). Academic Press, London, p. 391-404.
- BARTON, L.L.; C.E. GEORGI & D.R. LINEBACK. 1972. Effect of maltose on glucoamylase formation by *Aspergillus niger*. *J. Bacteriol.*, 111: 771-777.
- BEGGS, J. 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature*, 275: 104-109.
- BELSHAW, N.J. & G. WILLIAMSON. 1990. Production and purification of a granular-starch-binding domain of glucoamylase 1 from *Aspergillus niger*. *FEBS*, 269: 350-353.
- BELSHAW, N.J. & G. WILLIAMSON. 1991. Interaction of  $\beta$ -cyclodextrin with the granular starch binding domain of glucoamylase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1078: 117-120.
- BELSHAW, N.J. & G. WILLIAMSON. 1993. Specificity of the binbing domain of glucoamylase 1. *Eur. J. Biochem.*, 211: 717-724.
- BERLAND, C.R.; B.W. SIGURSKJOLD; B. STOFFER; T.P. FRANDBSEN & B. SVENSSON. 1995. Thermodynamics of inhibitor binding to mutant forms of

- 
- glucoamylase from *Aspergillus niger* determined by isothermal titration calorimetry. *Biochem.*, 34: 10153-10161.
- BERRY, D.R.; A. CHMIEL & A. AL-ZUBAIDY. 1977. Citric acid production by *Aspergillus niger*. In: Smith, J.E. Pateman, J.A. (eds). Genetics and Physiology of *Aspergillus*. Academic Press, London, p. 405-426.
- BERSE, B.; A. DMOCHOWSKA; M. SKRZYPEK; P. WEGLENSKI; M. A. BATES & R.L. WEISS. 1983. Cloning and characterization of the carbamoyl transferase gene from *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 25: 109-117.
- BHELLA, R.S. & I. ALTOSAAR. 1987. Translational control of  $\alpha$ -amylase gene expression in *Aspergillus niger*. *Appl. Biochem.*, 9: 287-293.
- BHELLA, R.S. & I. ALTOSAAR. 1988. Role of cAMP in the mediation of glucose catabolite repression of glucoamylase synthesis in *Aspergillus awamori*. *Curr. Genet.*, 14: 247-252.
- BOEL, E.; I. HJORT; B. SVENSSON; F. NORRIS; K.E. NORRIS & N.P. FIIL. 1984a. Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. *EMBO J.*, 3: 1097-1102.
- BOEL, E.; M.T. HANSEN; I. HJORT; I. HØEGH & N.P. FIIL. 1984b. Two different types of intervening sequences in the glucoamylase gene from *Aspergillus niger*. *EMBO J.*, 3: 1581-1585.
- BONATELLI Jr., R. 1978. Melhoramento de *Aspergillus niger* para produção de ácido cítrico. *Ciência e Cultura, SimpósiosII*: 123-127.

- BONATELLI Jr., R. 1981. Estabilidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba. Esalq/USP. 126p. Tese de Mestrado.
- BONATELLI Jr., R.; G.U. VALENT; M. MASIERO; A. VIALTA. & 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, 2: 34-41.
- BOS, C.J.; A.J.M. DEBETS; G. KOBUS; S.M. SLAKHORST & K. SWART. 1989. Adenine and pyrimidine genes of *Aspergillus niger* and evidence for a seventh linkage group. *Curr. Genet.*, 16: 307-310.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248 - 252.
- BURR, K.W.; J.A. ROPER & J. RELTON. 1982. Modification of chromosome instability in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 128: 2899-2907.
- BUXTON, F.P.; D.I. GWYNNE; R.W. DAVIES. 1985. Transformation of *Aspergillus niger* using the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 37: 207-214.
- BUXTON, F.P.; D.I. GWYNNE; R.W. DAVIES. 1989. Cloning of a new bidirectionally selectable marker for *Aspergillus* strains. *Gene*, 84: 329-334.
- CALIL, M.R. 1988. Isolamento e análise genética de mutantes de *Aspergillus niger* com aumento na produção de amiloglicosidase. Campinas. UNICAMP. 144p. Tese de Mestrado.

- CALIL, M.R. 1995. Comparação entre os grupos de ligação de duas linhagens de *Aspergillus niger* (van Tieghem). Campinas. Unicamp. 124p. Tese de Doutorado.
- CAMPBELL, E.I.; S.E. UNKLES; J.A. MACRO; C. van den HONDEL; R. CONTRERAS, & J.R. KINGHORN. 1989. Improved transformation efficiency of *Aspergillus niger* using the homologous *niaD* gene for nitrate reductase. *Curr. Genet.*, 16: 53-56.
- CASE, B.L. & J.A. ROPER. 1981. Mitotic processes which restore genome balance in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 124: 9-16.
- CASE, M.E.; M. SCHWEIZER; S.R. KUSHNER & N.H. GILES. 1979. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263.
- CATEN, C.E. 1981. Parasexual processes in fungi. In: The fungal nucleus. Gull, K.; Oliver, S.G. (eds). Cambridge University Press, Cambridge. 291p.
- CHEN, L.; P.M. COUTINHO; Z. NIKOLOV & C. FORD. 1995. Deletion analysis of the starch binding domain of *Aspergillus* glucoamylase. *Protein Eng.*, 8: 1049-1055.
- CHIRGWIN, T.; A.E. PRZYBYLA; R.J. MacDONALD & W.J. RUTTER. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.*, 18: 5294 -5299.
- CHRISTENSEN, U.; K. OLSEN; B.B. STOFFER & B. SVENSSON. 1996. Substrate binding mechanism of Glu180→Gln, Asp176→Asn, and wild-type glucoamylases from *Aspergillus niger*. *Biochem.*, 35: 15009-15018.

- COLIGAN, J.E.; B.M. DUNN; H.L. PLOEGH; D.W. SPEICHER & P.T. WINGFIELD. (Eds). 1995. Current protocols in protein science. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- COPPIN-RAYNAL, E.; M. PICARD & S. ARNAISE. 1989. Transformation by integration in *Podospora anserina*. III. Replacement of a chromosome segment by a two-step process. *Mol. Gen. Genet.*, 219: 270-276.
- COUTINHO, P.M. & P.J. REILLY. 1994. Structure-function relationships in the catalytic and starch binding domains of glucoamylase. *Protein Eng.*, 7: 393-400.
- DIXON, M. & E.C. WEBB. 1962. Enzymes. Longmans, London. 193p.
- DURRENS, P.; P.M. GREEN; H.N. ARST Jr & C. SCAZZOCCHIO. 1986. Heterologous insertion of transforming DNA and generation of new deletions associated with transformation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, 203: 544-549.
- EL-GOGARY, S.; A. LEITE; O. CRIVELLARO; D.E. EVELEIGH & H. EL-DORRY. 1989. Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6138-6141.
- ELEGADO, F.B. & Y. FUJIO. 1993. Selection of raw starch digestive glucoamylase-producing *Rhizopus* strain. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 39: 541-546.
- ERRAT, J.A.; P.E. DOUGLAS; F. MORANELLI & V.L. SELIGY. 1984. The induction of  $\alpha$ -amylase by starch in *Aspergillus oryzae*: evidence for controlled mRNA expression. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, 62: 678-690.
- FERREIRA, A.V.B. 1991. Transformação genética de *Aspergillus niger* com um gene heterólogo de resistência ao benomil. Campinas. UNICAMP. 120p. Tese de Mestrado.

- FINCHAM, J.R.S. 1989. Transformation in fungi. *Microbiol. Rev.*, 53: 148-170.
- FOGARTY, W.M. & C.T. KELLY. 1977. Starch degrading enzymes of microbial origin. In: Progress in industrial microbiology. Bull, M.J. (Ed.). Elsevier, New York, p. 87-150.
- FOURNEY, R.M.; J. MIYAKOSHI; R.S. DAY III & M.C. PATERSON. 1990. Northern blotting: Efficient RNA staining and transfer. *Focus*, 10: 5-6.
- FOWLER, T.; R.M. BERKA & M. WARD. 1990. Regulation of the *glaA* gene of *Aspergillus niger*. *Curr. Genet.*, 18: 537-545.
- FRANCO, G. 1992. Tabela de composição química dos alimentos. 9ª ed., Edit. Atheneu Livraria, São Paulo.
- FRANSEN, T.P.; C. DUPONT; J. LEHMBECK; B. STOFFER; M.R. SIERKS, R.B. HONZATKO & B. SVENSSON. 1994. Site-directed mutagenesis of the catalytic base glutamic acid 400 in glucoamylase from *Aspergillus niger* and of tyrosine 48 and glutamine 401, both hydrogen-bonded to the gamma-carboxylate group of glutamic acid 400. *Biochem.*,33: 13808-13816.
- FRANSEN, T.P.; T. CHRISTENSEN; B. STOFFER; J. LEHMBECK; C. DUPONT; R.B. HONZATKO & B. SVENSSON. 1995. Mutational analysis of the roles in catalysis and substrate recognition of arginines 54 and 305, aspartic acid 309, and tryptophan 317 located at subsites 1 and 2 in glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Biochem.*,34: 10162-10169.
- FUNGARO, M.H.P.; E. RECH; G.S. MUHLEN; M.H. VAINSTEIN; R.C. PASCON; M.V.D. QUEIROZ; A.A. PIZZIRANI-KLEINER & J.L. de AZEVEDO. 1995.

- 
- Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment on intact conidia. *FEMS Microbiol. Lett.*, 125: 293-297.
- FUJIO, Y. & H. MORITA. 1996. Improved glucoamylase production by *Rhizopus* sp. A-11 using metal-ion supplemented liquid medium. *J. Ferment. Bioeng.*, 82: 554-557.
- GARCÍA-PEDRAJAS, M.D. & M.I.G. RONCERO. 1996. A homologous and self-replicating system for efficient transformation of *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.*, 29: 191-198.
- GARDNER, J.F.; L.V. JAMES & S.D. RUBBO. 1956. Production of citric acid by mutants of *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.*, 14: 228-237.
- GEMS, D.; I. JOHNSTONE & J. CLUTTERBUCK. 1991. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene*, 98: 61-67.
- GERVAIS. 1990. Water activity: a fundamental parameter of metabolic production by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33: 72-75.
- GHOSH, A.; B. CHATTERJEE & A. DAS. 1990. Induction and catabolite repression of high-affinity glucoamylase in *Aspergillus terreus* strain 4. *J. Gen. Microbiol.*, 136: 1307-1311.
- GOETTEL, M.S.; R.J.S. LEGER; S. BHAIRI; B.R. OAKLEY; D.W. ROBERTS & R.C. STAPLES. 1990. Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance. *Curr. Genet.*, 17: 129-132.
- GOLDMAN, G.H.; M. van MONTAGU & A. HERRERA-ESTRELLA. 1990. Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse. *Curr. Genet.*, 17: 169-174.

- GOOSEN, T.; G. BLOEMHEUVEL; C. GYSLER, D.A. de BIE; H.W.J. van den BROEK & K. SWART. 1987. Transformation of *Aspergillus niger* using the homologous orotidine-5'-phosphate decarboxylase. *Curr. Genet.*, 11: 499-503.
- GORDENIN, D.A.; K.S. LOBACHEV; N.P. DEGTYAREVA; A.L. MALKOVA, E. PERKINS & M.A. RESNICK. 1993. Inverted DNA repeats: a source of eukaryotic genomic instability. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 5315-5322.
- GUNNARSSON, A.; B. SVENSSON; B. NILSSON & S. SVENSSON. 1984. Structural studies on the O-glycosidically linked carbohydrate chains of glucoamylase G1 from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.*, 145: 463-468.
- HAMADA, W.; P. REIGNAULT; G. BOMPEIX & M. BOCCARA. 1994. Transformation of *Botrytis cinerea* with the hygromycin B resistance gene, *hph*. *Curr. Genet.*, 26: 251-255.
- HAMLYM, P.F.; R.E. BRADSHAW; G.M. MELLON; C.M. SANTIAGO; J.M. WILSON & F. PEBERDY. 1981. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enz. Microb. Tech.*, 3: 321-325.
- HARRIS, E.M.S.; A.E. ALESHIN; L.M. FIRSOV & R.B. HONZATKO. 1993. Refined structure of the complex of 1-deoxynojirymicin with glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *X100* to 2,4Å resolution. *Biochem.*, 32: 1618-1626.
- HATA, T.; K. TSUCHIYA; K. KITAMOTO; K. GOMI; C. KUMAGAI; G. TAMURA & S. HARA. 1991. Nucleotide sequence and expression of the glucoamylase encoding gene *glaA* from *Aspergillus oryzae*. *Gene*, 108: 145-150.

- HAYASHIDA, S.; K. NAKAHARA; K. KURODA; T. KAMACHI; K. OHTA & S. IWANAGA. 1988. Evidence for post-translational generation of multiple forms of *Aspergillus awamori* var. *kamachi* glucoamylase. *Agric. Biol. Chem.*, 52: 273-275.
- HAYASHIDA, S.; K. KURODA; K. OHTA; S. KUHARA; K. FUKUDA & Y. SAKAKI. 1989a. Molecular cloning of the glucoamylase I gene of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* for localization of the raw-starch-affinity site. *Agric. Biol. Chem.*, 53: 923-929.
- HAYASHIDA, S.; K. NAKAHARA; K. KURODA; T. MIYATA & S. IWANAGA. 1989b. Structure of the raw-starch-affinity site on the *Aspergillus awamori* var. *kawachi* glucoamylase I molecule. *Agric. Biol. Chem.*, 53: 135-141.
- HENRISSAT, B.; P.M. COUTINHO & P.J. REILLY. 1994. Reading-frame shift in *Saccharomyces* glucoamylases restores catalytic base, extends sequence in improves alignment with other glucoamylases. *Protein Eng.*, 7: 1281-1282.
- HINNEN, A.; J.B. HICKS & G.R. FINK. 1978. Transformation of yeast chimaeric ColE1 plasmid carrying *LEU2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 1929-1933.
- HIROMI, K.; K. TAKAHASHI; Z. HAMAUZU & S. ONO. 1966a. Kinetic studies on glucamylase. III. The influence of pH on the rates of hydrolysis of maltose and panose. *J. Biochem.*, 59: 469-475.
- HIROMI, K.; M. KAVAI & S. ONO. 1966b. Kinetic studies on gluc-amylase. IV. Hydrolysis of isomaltose. *J. Biochem.*, 59: 476-480.
- HIROMI, K.; M. OHNISHI & A. TANAKA. 1983. Subsite structure and ligand binding mechanism of glucoamylase. *Mol. Cel. Biochem.*, 51: 79-95.

- HOLMES, D.S. & M. QUIGLEY. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, 114: 193-197.
- HOLT, G. & G. SAUNDERS. 1985. Genetic modification of industrial microorganisms. In: Comprehensive biotechnology: principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine. MOO-YOUNG, M. (Ed.), Oxford, Pergamon Press, p. 51-76.
- HSIEH, W.T. & R. WU. 1984. Releasing of intracellular glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Proc. Natl. Sci. Counc. ROC(B)*, 8: 1-3.
- HSIEH, W.T.; C.M. LIN; P.C. CHEN; S.W. CHEN & T.B. LO. 1989. Intracellular glucoamylase from *Aspergillus niger*: Purification, characterization, and comparison with the extracellular enzyme. *J. Chin. Biochem. Soc.*, 18: 66-71.
- HUTCHINSON, H.T. & L.H. HARTWELL. 1967. Macromolecule synthesis in yeast spheroplasts. *J. Bacteriol.*, 94: 1697-1705.
- ITOH, T.; I. OHTSUKI; I. YAMASHITA & S. FUKUI. 1987. Nucleotide sequence of the glucoamylase gene GLU1 in the yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. *J. Bacteriol.*, 169: 4171-4176.
- JACKS, A.J.; K. SORIMACHI; M.-F. Le GAL-COËFFET; G. WILLIAMSON; D.B. ARCHER & M.P. WILLIAMSON. 1995. <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N assignments and secondary structure of the starch-binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.*, 233:568-578.
- JAMIESON, J. & G. PALADE. 1967a. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. I. Role of peripheral elements of the Golgi complex. *J. Cell. Biol.*, 34: 577-596.

- 
- JAMIESON, J. & G. PALADE. 1967b. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. *J. Cell. Biol.*, 34: 597-615.
- JAMIESON, J. & G. PALADE. 1968a. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. III. Dissociation of intracellular transport from protein synthesis. *J. Cell. Biol.*, 39: 580-588.
- JAMIESON, J. & G. PALADE. 1968b. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. IV. Metabolic requirements. *J. Cell. Biol.*, 39: 598-603.
- JESPERSEN, H.M.; E.A. MacGREGOR; M.R. SIERKS & B. SVENSSON. 1991. Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochem. J.*, 280: 51-55.
- KELLY, J.M. & M. J. HYNES. 1985. Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.*, 4: 475-479.
- KELLY, R.; E. REGISTER & M. SOSA. 1994. Heterologous transformation of *Zalerion arboricola*. *Curr. Genet.*, 26: 217-224.
- KILIKIAN, B.V. 1995. Simultaneous influence of pH and process type on glucoamylase synthesis. *Arq. Biol. Tecnol.*, 38: 769-772.
- KOUPRINA, N.Y.; O.B. PASHINA; N.T. NIKOLAISHWILI; A.M. TSOULADZE & V.L. LARIONOV. 1988. Genetic control of chromosome stability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 4: 257-269.
- KORMAN, D.R.; F.T. BAYLISS; C.C. BARNETT; C.L. CARMONA; K.H. KODAMA; T.J. ROYER; S.A. THOMPSON; M. WARD; L.J. WILSON & R.M. BERKA. 1990.

- 
- Cloning, characterization and expression of two  $\alpha$ -amylase genes from *Aspergillus niger* var. *awamori*. *Curr. Genet.*, 17: 203-212.
- KÜCK, U.; M. WALZ; G. MOHR & M. MRACEK. 1989. The 5'-sequence of the isopenicillin N-synthase gene (*pcbC*) from *Cephalosporium acremonium* directs the expression of the prokariotic hygromycin B phosphotransferase gene (*hph*) in *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 358-365.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LANGFORD, C.J. & D. GALLWITZ. 1983. Evidence for an intron-contained sequence required for the splicing of yeast RNA polymerase II transcript. *Cell*, 33: 519-527.
- LECELLIER, G. & P. SILAR. 1994. Rapid methods for nucleic acid extraction from Petri dish-grown mycelia. *Curr. Genet.*, 25: 122-123.
- LEWIS, N.F. & V.P. SINKAR. 1981. Optimization of nutrients and cultivation conditions in glucoamylase production. *J. Food Biochem.*, 5: 69-77.
- LINEBACK, D.R.; I.J. RUSSELL & C. RASMUSSEN. 1969. Two forms of the glucoamylase of *Aspergillus niger*. *Arch. Bioch. Biophys.*, 134: 539-553.
- MacDONALD, K.D. 1968. The selection of auxotrophs of *Penicillium chrysogenum* with nystatin. *Genet. Res.*, 11: 327-330.
- MACEDO, G.R.; M.C.R. FACCIOTTI; A. TONSO & W. SCHMIDELL. 1997. Comparison between the batch process and the batch process with pulses for the synthesis of glucoamylase by *Aspergillus awamori* NRRL3112. *Rev. Microb.*, 28: 1-5.

- MANIATIS, T.; E.F. FRITSCH & J. SAMBROOK. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- MASIERO, M. 1988. Parassexualidade e produção de amiloglicosidase em *Aspergillus niger*. Campinas, UNICAMP, 110p. Tese de Mestrado.
- MASIERO, M. 1992. Caracterização e mapeamento de genes que alteram a produção de glicoamilase em *Aspergillus niger*. Campinas. UNICAMP. 100p. Tese de Doutorado.
- MASIERO, M. & R. BONATELLI Jr. 1989. Genetic study of auxotrophic and resistant mutants of *Aspergillus niger* and their glucoamylase production. *Braz. J. Gen.*, 12: 707-718.
- MAYNE, R.Y.; J.W. BENNET & J. TALLANT. 1971. Instability of an aflatoxin-producing strain of *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, 63: 644-646.
- McCLUNG, C.R.; J.D. PHILLIPS; M.J. ORBACH & J.C. DUNLAP. 1989. New cloning vectors using benomyl resistance as a dominant marker for selection in *Neurospora crassa* and in other filamentous fungi. *Exper. Mycol.*, 13: 299-302.
- MEDDA, S.; B.C. SAHA & S. UEDA. 1981. Raw starch adsorption and elution behavior of glucoamylase I of black *Aspergillus* and its modification by alkaline protease. *Annual Reports of International Center of Cooperative Research and Development in Microbial Engineering, Japan*, 4: 211-229.
- MENEZES, E.M. & J.L. AZEVEDO. 1978. Reversion in variants from a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, 164: 255-258.

- MERRICK, M.J. 1975. The inheritance of penicillin titre in crosses between lines of *Aspergillus nidulans* selected for increased productivity. *J. Gen. Microbiol.*, 91: 287-294.
- MIAH, M.N.N. & S. UEDA. 1977a. Multiplicity of glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. Part I. *Starch/Stärke*, 29: 191 - 196.
- MIAH, M.N.N. & S. UEDA. 1977b. Multiplicity of glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. Part II. *Starch/Stärke*, 29: 235 - 239.
- MILLER, B.L.; K.Y. MILLER & W.E. TIMBERLAKE. 1985. Direct and indirect gene replacements in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.*, 5: 1714-1721.
- MISHRA, N.C. 1979. DNA-mediated genetic changes in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.*, 113: 255-259.
- MISHRA, N.C. & E.L. TATUM. 1973. Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 3875-3879.
- MONTENECOURT, B.S. & D.E. EVELEIGH. 1985. Fungal carbohydrases: amylases and cellulases. In: Gene manipulations in fungi. BENNET, J.W. & L. L. LASURE (eds.), Academic Press, New York, p.491-512.
- MUNCH, O. & D. TRITSCH. 1990. Irreversible thermoinactivation of glucoamylase from *Aspergillus niger* and thermostabilization by chemical modification of carboxyl groups. *Bioch. Biophys. Acta*, 1041: 111-116.
- MURRAY, A.W.; N.P. SCHULTES & J.W. SZOSTAK. 1986. Chromosome length controls mitotic chromosome segregation in yeast. *Cell*, 23: 529-536.

- 
- NGA, B.H. & J.A. ROPER. 1968. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 58: 193-209.
- NGA, B.H. & J.A. ROPER. 1969. A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 88: 364-366.
- NISHIMURA, A.; M. MORITA; Y. NISHIMURA & Y. SUGINO. 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucl. Acids Res.*, 18: 6169.
- NOVICK, P.; C. FIELD & R. SCHEKMAN. 1980. Identification of 23 complementation groups requires for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, 21:205-215.
- NOVICK, P.; S. FERRO & R. SCHEKMAN. 1981. Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell*, 25: 461-469.
- NUNBERG, J.H.; J.H. MEADE; G. COLE; F.C. LAWYER; P. M<sup>C</sup>CABE; V. SCHWEICKART; R. TAL; V.P. WITTMAN; J.E. FLATGAARD & M.A. INNIS. 1984. Molecular cloning and characterization of glucoamylase gene of *Aspergillus awamori*. *Mol.Cell. Biol.*, 4: 2306-2315.
- OLIVEIRA, A.L.Z.G. 1991. Interação gênica e produção de g;icoamilase em híbridos interespecíficos de *Aspergillus niger* e *Aspergillus awamori*. Campinas, UNICAMP, 124p. Tese de Mestrado.
- ORBACH, M.J.; E.B. PORRO & C. YANOVSKY. 1986. Cloning and characterization of the gene for  $\beta$ -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant marker. *Mol.Cell. Biol.*, 6: 2452 - 2461.

- 
- OZEKI, K.; F. KYOYA; K. HIZUME; A. KANDA; M. HAMACHI & Y. NUNOKAWA. 1994. Transformation of intact *Aspergillus niger* by electroporation. *Bioscience, Biotechnol. Biochem.*, 58: 2224-2227.
- PAIETTA, J.Y. & G.A. MARZLUF. 1985. Gene disruption by transformation in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.*, 5: 1554-1559.
- PALADE, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, 189: 347-358.
- PANDEY, A.; L. ASHAKUMARY; P. SELVAKUMAR & K.S. VIJAYALAKSHMI. 1994a. Influence of the water activity on growth and activity of *Aspergillus niger* for glucoamylase production in solid-state fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10: 485-486.
- PANDEY, A.; P. SELVAKUMAR & L. ASHAKUMARY. 1994b. Glucoamylase production by *Aspergillus niger* on rice bran is improved by adding nitrogen sources. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10: 348-349.
- PIKIELNY, C.W.; J.L. TEEN & M. ROSBASH. 1983. Evidence for the biochemical role of an internal sequence in yeast nuclear mRNA introns: implications for U1-RNA and metazoan mRNA splicing. *Cell*, 34: 395-403.
- PONTECORVO, G. & J.A. ROPER. 1952. Genetic analysis without sexual reproduction by means of poliploidy in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 6: 7.
- PONTECORVO, G.; J.A. ROPER & E. FORBES. 1953a. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.*, 8: 198-210.

- 
- PONTECORVO, G.; J.A. ROPER; L.M. HEMMONS; K.D. MacDONALD & W.J. BUFTON. 1953b. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genetics*, 5: 141 - 238.
- PUNT, P.J.; R.P. OLIVER; M.A. DINGEMANSE; P.H. POWELS & C.A.M.J.J. van den HONDEL. 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*, 56: 117 - 124.
- RAEDER, U. & P. BRODA. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microb.*, 1: 17-19.
- RIBA, G. & A.M. RAVELOJOANA. 1984. The parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumoso roseus*. *Can. J. Microbiol.*, 30: 922-926.
- ROGERS, J. & R. WALL. 1980. A mechanism for RNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 1877-1879.
- ROPER, J.A. & B.H. NGA. 1969. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the production of hypodiploid and hypohaploid nuclei. *Genet. Res.*, 14: 127-136.
- SAHA, B.C.; T. MITSUE & S. UEDA. 1979. Glucoamylase produced by submerged culture of *Aspergillus oryzae*. *Starch/Stärke*, 9: 307-314.
- SAHA, B.C. & J.G. ZEIKUS. 1989. Microbial glucoamylases: biochemical and biotechnological features. *Starch/Stärke*, 41: 57-64.
- SAHA, D. & T.K. DAS. 1995. Transformation in *Aspergillus ochraceus*. *Curr. Microbiol.*, 30: 83-86.

- 
- SAMBROOK, J.; E.F. FRITSCH & T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SANTOS, F.R.; S.D.J. PENA & J.T. EPPLEN. 1993. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non isotopic technique. *Hum. Genet.*, 90: 655-656.
- SCHRICKX, J.M.; A.H. STOUTHAMER & H.W. van VERSEVELD. 1995. Growth behavior and glucoamylase production by *Aspergillus niger* N402 and a glucoamylase overproducing transformant in recycling culture without a nitrogen source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43: 109-116.
- SHAILUBHAI, K.; S.R. SAHASRABUDHE; K.A. VORA & V.V. MODI. 1984. Degradation of chlorobenzoates by *A. niger*. *Experientia*, 40: 406-407.
- SHIBUYA, I.; K. GOMI; Y. IIMURA; K. TAKAHASHI; G. TUMURA & S. HARA. 1990. Molecular cloning of the glucoamylase gene of *Aspergillus shirousami* and its expression in *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.*, 54: 1905-1914.
- SIERKS, M.R.; C. FORD; P.J. REILLY & B. SVENSSON. 1989. Site-directed mutagenesis at the active site Trp120 of *Aspergillus awamori* glucoamylase. *Protein Eng.*, 2: 621-625.
- SIERKS, M.R.; C. FORD; P.J. REILLY & B. SVENSSON. 1990. Catalytic mechanism of fungal glucoamylase as defined by mutagenesis of Asp176, Glu179 and Glu180 in the enzyme from *Aspergillus awamori*. *Protein Eng.*, 3: 193-198.

- SIERKS, M.R. & B. SVENSSON. 1993. Functional roles of the invariant aspartic acid 55, tyrosine 306 and aspartic acid 309 in glucoamylase from *Aspergillus awamori* studied by mutagenesis. *Biochem.*, 32: 1113-1117.
- SIERKS, M.R. & B. SVENSSON. 1994. Protein engineering of the relative specificity of glucoamylase from *Aspergillus awamori* based on sequence similarities between starch degrading enzymes. *Protein Eng.*, 7: 1479-1484.
- SIGURSKJOLD, B.W.; C.R. BERLAND & B. SVENSSON. 1994a. Thermodynamics of inhibitor binding to the catalytic site of glucoamylase from *Aspergillus niger* determined by displacement titration calorimetry. *Biochem.*, 33: 10191-10199.
- SIGURSKJOLD, B.W.; B. SVENSSON; G. WILLIAMSON & H. DRIGUEZ. 1994b. Thermodynamics of ligand binding to the starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.*, 225: 133-141.
- SINKAR, V.P. & N.F. LEWIS. 1980. Increased glucoamylase production using agricultural by-products. *J. Food Biochem.*, 4: 159-168.
- SMILEY, K.L.; D.E. HENSLEY; M.J. SMILEY & H.J. GASDORF. 1971. Kinetic patterns of glucoamylase isozymes from *Aspergillus* species. *Arch. Biochem. Biophys.*, 144: 694-699.
- SMITH, J.E. & J.A. PATEMAN. 1977. Genetics and physiology of *Aspergillus*. Academic Press, London.
- SOCCOL, C.R.; I. ILOKI; B. MARIN & M. RAIMBAULT. 1994a. Comparative production of alpha-amylase, glucoamylase and protein enrichment of raw and cooked cassava by *Rhizopus* strains in submerged and solid state fermentations. *J. Food Sci. Technol.*, 31: 320-323.

- SOCCOL, C.R.; B. MARIN; M. RAIMBAULT & J.-M. LEBEAULT. 1994b. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41: 330-336.
- SOKOLOVSKY, V.; R. KALDENHOFF; M. RICCI & V.E.A. RUSSO. 1990. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. *Fungal Gen. Newsl.*, 37: 41-43.
- SORIMACHI, K.; A.J. JACKS; M.F. Le GAL-COEFFET; G. WILLIAMSON; D.B. ARCHER & M.P. WILLIAMSON. 1996. Solution structure of the granular starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, 259: 970-987.
- STOFFER, B.; A.E. ALESHIN; L.M. FIRSOV; B. SVENSSON & R.B. HONZATKO. 1995. Refined structure for the complex of D-gluco-dihydroacarbose with glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X-100 to 2.2Å resolution dual conformations for extended inhibitors bound to the active site of glucoamylase. *FEBS Lett.*, 358: 57-61.
- STOHL, L.L. & A.L. LAMBOWITZ. 1983. Construction of a shuttle vector for the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 1058-1062.
- SVENSSON, B.; T.G. PEDERSEN; I. SVENDSEN; T. SAKAI & M. OTTESEN. 1982. Characterization of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Carlsberg Res. Comm.*, 47: 55-69.
- SVENSSON, B., K. LARSEN, I. SVENDSEN & E. BOEL. 1983. The complete amino acid sequence of the glycoprotein, glucoamylase G1, from *Aspergillus niger*. *Carlsberg Res. Comm.*, 48: 529-544.

- 
- SVENSSON, B.; A.J. CLARKE & I.B. SVENDSEN. 1986a. Influence of acarbose and maltose on the reactivity of individual tryptophanyl residues in glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Carlsberg Res. Commun.*, 51: 61-73.
- SVENSSON, B., K. LARSEN & A. GUNNARSON. 1986b. Characterization of a glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.*, 154: 497-502.
- SVENSSON, B., H. JESPERSEN, M. SIERKS & E.A. Mac GREGOR. 1989. Sequence homology between putative raw-starch binding domains from different starch-degrading enzymes. *Biochem. J.*, 264: 309-311.
- SVENSSON, B.; A.J. CLARKE; I.B. SVENDSEN & M. MØLLER. 1990. Identification of carboxylic acid residues in glucoamylase G2 from *Aspergillus niger* that participate in catalysis and substrate binding. *Eur. J. Biochem.*, 188: 29-38.
- SVENSSON, B. & M.R. SIERKS. 1992. Roles of the aromatic side chains in the binding of substrates, inhibitors, and cyclomalto-oligosaccharides to the glucoamylase from *Aspergillus niger* probed by perturbation difference spectroscopy, chemical modification and mutagenesis. *Carbohydr. Res.*, 227: 29-44.
- TADA, S.; K. GOMI; K. KITAMOTO; K. TAKAHASHI; G. TAMURA & S. HARA. 1991. Construction of a fusion gene comprising the TAKA-amylase A promoter and the *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase gene and analysis of its expression in *Aspergillus niger*. *Mol. Gen. Genet.*, 229: 301-306.
- TAKAHASHI, T.; Y. TSUCHIDA & M. IRIE. 1978. Purification and some properties of three forms of glucoamylase from *Rhizopus* species. *J. Biochem.*, 84: 1183-1194.

- TAKAHASHI, T.; K. KATO; Y. IKEGAMI & M. IRIE. 1985. Different behavior towards raw starch of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus* sp. *J. Biochem.*, 98: 663-671.
- TANAKA, Y.; T. ASHIBARI; N. NAKAMURA; N. KIUCHI; Y. SHIBANO; T. AMACHI & H. YOSHIZUMI. 1986. Comparison of amino acid sequence of three glucoamylases and their structure-function relationships. *Agric. Biol. Chem.*, 50: 965-969.
- TILBURN, J.; C. SCAZZOCCHIO; G.G. TAYLOR; J.H. ZABICKY-ZISSMAN; R.A. LOCKINGTON & R.W. DAVIES. 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 26: 205-221.
- TRUSCHEIT, E.; W. FROMMER; B. JUNGE; L. MÜLLER; D.D. SCHMIDT & W. WINGENDER. 1981. Chemistry and biochemistry of microbial  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 20: 744-761.
- TUDZINSKY, P.; U. STAHL & K. ESSER. 1980. Transformation to senescence with plasmid like DNA in the ascomycete *Podospora anserina*. *Curr. Genet.*, 2: 181-184.
- VAINSTEIN, M.H. 1990. Regulation and characterization of invertase in *Aspergillus nidulans*. Nottingham. University of Nottingham. 244p. Tese de Doutorado.
- VALENT, G.U. 1985. Isolamento e análise genética de mutantes com alteração na produção de amiloglicosidase em *Aspergillus niger*. Campinas. UNICAMP. 107p. Tese de Mestrado.
- VALENT, G.U.; M.R. CALIL & R. BONATELLI Jr.. 1992. Isolation and genetic analysis of *Aspergillus niger* mutants with reduced extracellular glucoamylase. *Rev. Bras. Genét.*, 15: 19-32.

- van BRUNT, J. 1986. Fungi: the perfect hosts? *Biotech.*, 4: 1057-1062.
- van HARTINGSVELDT, W.; I.E. MATTERN; C.M.J. van ZEIJL; P.H. POUWELS & C.A.M.J.J. van den HONDEL. 1987. Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. *Mol. Gen. Genet.*, 206: 71-75.
- VERDOES, J.C.; P.J. PUNT; J.M. SCHRICKX; H.W. van VERSEVELD; A.H. STOUTHAMER & C.A.M.J.J. van den HONDEL. 1993. Glucoamylase overexpression in *Aspergillus niger*: Molecular genetic analysis of strains containing multiple copies of the *glaA* gene. *Transgenic Res.*, 2: 84-92.
- VERDOES, J.C.; A.D. van DIEPENINGEN; P.J. PUNT; A.J.M. DEBETS; A.H. STOUTHAMER & C.A.M.J.J. van den HONDEL. 1994a. Evaluation of molecular and genetic approaches to generate glucoamylase overproducing strains of *Aspergillus niger*. *J. Biotechnol.*, 36: 165-175.
- VERDOES, J.C.; P.J. PUNT; P. van der BERG; F. DEBETS; A.H. STOUTHAMER & C.A.M.J.J. van den HONDEL. 1994b. Characterization of an efficient gene cloning strategy for *Aspergillus niger* based on autonomously replicating plasmid: Cloning of the *nicB* gene of *A. niger*. *Gene*, 146: 159-165.
- VIALTA, A. 1987. Genética e produção de amiloglicosidase em *Aspergillus awamori* e no híbrido interespecífico com *Aspergillus niger*. Campinas, UNICAMP, 173p. (Tese de Mestrado).
- VOLLMER, S.J. & C. YANOVSKY. 1986. Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 4869-4873.
- WERNARS, K.; T. GOOSEN; L.M.J. WENNEKES; J. VISSER; C.J. BOS; H.W.J. van den BROEK; R.F.M. van GORCOM; C.A.M.J.J. van den HONDEL & P.H.

- 
- POUWELS. 1985. Gene amplification in *Aspergillus nidulans* by transformation with vectors containing the *amdS* gene. *Curr. Genet.*, 9: 361-368.
- WERNARS, K.; T. GOOSEN; B.M. WENNEKES; K. SWART; C.A.M.J.J. van den HONDEL & H.W.J. van den BROEK. 1987. Cotransformation of *Aspergillus nidulans*: a tool for replacing fungal genes. *Mol. Gen. Genet.*, 209: 71-77.
- WILLIAMSON, M.P.; M.-F. Le GAL-COËFFET; K. SORIMACHI; C.S.M. FURNISS; D. B. ARCHER & G. WILLIAMSON. 1997. Function of conserved tryptophans in the *Aspergillus niger* glucoamylase 1 starch binding domain. *Biochem.*, 36: 7535-7539.
- WIRSEL, S.; A. LACHMUND; G. WILDHARDT & E. RUTTKOWSKI. 1989. Three  $\alpha$ -amylase genes of *Aspergillus oryzae* exhibit identical intron-exon organization. *Mol. Microbiol.*, 3: 3-14.
- XUEI, X. & P.L. SKATRUD. 1994. Molecular karyotype alterations induced by transformation in *Aspergillus nidulans* are mitotically stable. *Curr. Genet.*, 26: 225-227.
- YELTON, M.M.; J.E. HAMER & W.E. TIMBERLAKE. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 81: 1370-1374.
- YOSHINO, E. & S. HAYASHIDA. 1978. Enzymatic modification of glucoamylase of *Aspergillus awamori* var. *kawachi*. *J. Ferment. Technol.*, 56: 289-295.
- YUILL, J.L. 1952. Culture study of an unstable strain of *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.*, 8: i

ZUCCHI, T.M.; G.A. PASSOS Jr & F.L. De LUCCA. 1989. RNA-mediated genetic transformation in *Aspergillus nidulans*. *Cell. Mol. Biol.*, 35: 573-580.

## **APÊNDICE I**

### **TABELAS**

Tabela 1:

Atividade enzimática e concentração de proteína durante a fermentação em meio contendo farinha de raspa de mandioca (meio MAC).

	fermentação (dias)													
	3			5			6			7			8	
	ativ. enzim. (U GA/ml)	conc. prot. ( $\mu$ g/ml)	ativ. enzim. (U GA/ml)	conc. prot. ( $\mu$ g/ml)	ativ. enzim. (U GA/ml)	conc. prot. ( $\mu$ g/ml)	ativ. enzim. (U GA/ml)	conc. prot. ( $\mu$ g/ml)	ativ. enzim. (U GA/ml)	conc. prot. ( $\mu$ g/ml)	ativ. enzim. (U GA/ml)	conc. prot. ( $\mu$ g/ml)	ativ. enzim. (U GA/ml)	conc. prot. ( $\mu$ g/ml)
linhagem														
pabfwn	0,2 $\pm$ 0,0	44 $\pm$ 2	4,5 $\pm$ 0,5	46 $\pm$ 2	12,2 $\pm$ 0,9	50 $\pm$ 1	18,5 $\pm$ 1,3	60 $\pm$ 2	16,8 $\pm$ 1,4	68 $\pm$ 2	18,3 $\pm$ 1,6	102 $\pm$ 3	105 $\pm$ 2	105 $\pm$ 2
nicolv	0,1 $\pm$ 0,0	58 $\pm$ 3	5,1 $\pm$ 0,7	66 $\pm$ 4	12,6 $\pm$ 1,1	96 $\pm$ 4	20,1 $\pm$ 1,8	102 $\pm$ 3	18,3 $\pm$ 1,6	105 $\pm$ 2	105 $\pm$ 2	105 $\pm$ 2	105 $\pm$ 2	105 $\pm$ 2

Tabela 2:

Atividade enzimática e teor de proteína no caldo de fermentação submetido a congelamento.

tratamento	ativ. enzimática (U GA/ml)	conc. proteína ( $\mu$ g/ml)
sem tratamento	$7,1 \pm 1,1$	$41,0 \pm 3,0$
- 20°C/ 1 semana	$0,7 \pm 0,1$	$18,0 \pm 2,1$

Tabela 3:

Efeito da filtração e da centrifugação sobre a atividade enzimática e teor de proteína no caldo de fermentação.

tratamento	ativ. enzimática	conc. proteína (U GA /ml)
sem tratamento	$11,8 \pm 0,8$	$52 \pm 4$
filtração	$11,2 \pm 0,9$	$55 \pm 3$
centrifugação	$12,3 \pm 0,4$	$50 \pm 4$

Tabela 4:

Influência da filtração e da centrifugação seguidas de congelamento do caldo de fermentação sobre a atividade enzimática e teor de proteína no mesmo.

tratamento	ativ. enzimática (U GA/ml)	conc. proteína ( $\mu$ g/ml)
sem tratamento (-20°C/1 semana)	1,5 $\pm$ 0,2	21 $\pm$ 1
filtração (-20°C/1 semana)	11,0 $\pm$ 1,0	53 $\pm$ 3
centrifugação (-20°C/1 semana)	5,9 $\pm$ 0,7	40 $\pm$ 3

Tabela 5:

Atividade enzimática e teor de proteína no caldo de fermentação após diferentes tratamentos.

tratamento	ativ. enzimática (U GA/ml)	conc. proteína ( $\mu$ g/ml)
filtração	9,6 $\pm$ 0,9	52 $\pm$ 2
filtração/4°C/7 dias	9,5 $\pm$ 0,9	52 $\pm$ 3
filtração/-20°C/7 dias	9,3 $\pm$ 0,9	49 $\pm$ 2
filtração/ajuste pH 6,0/ 4°C/7 dias	9,2 $\pm$ 0,8	52 $\pm$ 3
filtração/ajuste pH 6,0/ -20°C/7 dias	9,4 $\pm$ 0,8	48 $\pm$ 3
filtração/diálise/ 4°C/7 dias	9,8 $\pm$ 0,9	50 $\pm$ 2
filtração/diálise/ -20°C/7 dias	9,6 $\pm$ 0,8	52 $\pm$ 2

Tabela 6:

Atividade enzimática ligada ao micélio após extração com diversas soluções-tampão.

tampão	diluição	ativ. enzimática (U GA/ml)
A (1 ml)	1:10	6,5 ± 0,7
	1:20	10,3 ± 1,2
	1:40	13,2 ± 1,7
B (1 ml)	1:10	6,7 ± 0,8
	1:20	9,4 ± 1,3
	1:40	11,7 ± 1,6
C (1 ml)	1:10	6,0 ± 0,9
	1:20	7,3 ± 1,0
	1:40	8,9 ± 1,3
C (4 ml)	1:10	11,7 ± 1,4
	1:20	14,2 ± 1,8
	1:40	14,0 ± 1,8
D (4 ml)	1:10	10,7 ± 1,4
	1:20	13,6 ± 1,7
	1:40	13,9 ± 1,3

Tabela 7:

Parâmetros extracelulares da fermentação em meio com farinha de raspas de mandioca (meio MAC) após três e sete dias de fermentação.

linhagem	ativ. enzim. total (U GA)	proteína total ( $\mu$ g)	atividade específica (U GA/mg prot.)	peso seco (mg)	ativ.enzim./peso seco (U GA/mg micélio)
3 dias					
pabfwn	4,1 $\pm$ 0,2	70,1 $\pm$ 5,5	59,0 $\pm$ 1,9	128,5 $\pm$ 10,3	0,032 $\pm$ 0,004
nicolv	1,8 $\pm$ 0,1	88,3 $\pm$ 6,0	21,0 $\pm$ 0,8	116,2 $\pm$ 18,4	0,016 $\pm$ 0,004
lgp05	0,0	148,3 $\pm$ 10,8	0,0	97,3 $\pm$ 2,8	0,0
lgp61	0,6 $\pm$ 0,1	111,7 $\pm$ 4,9	5,4 $\pm$ 0,6	125,5 $\pm$ 12,2	0,005 $\pm$ 0,0004
lgp73	0,0	120,0 $\pm$ 5,8	0,0	20,1 $\pm$ 3,1	0,0
SV24	22,1 $\pm$ 1,9	311,2 $\pm$ 11,9	71,1 $\pm$ 7,5	129,9 $\pm$ 7,3	0,170 $\pm$ 0,020
Snu	0,0	134,5 $\pm$ 12,4	0,0	71,3 $\pm$ 11,5	0,0
7 dias					
pabfwn	431,8 $\pm$ 27,7	1941,7 $\pm$ 94,7	222,3 $\pm$ 4,3	116,2 $\pm$ 10,7	3,72 $\pm$ 0,11
nicolv	408,5 $\pm$ 11,8	2365,0 $\pm$ 113,5	172,9 $\pm$ 3,8	109,8 $\pm$ 6,7	3,72 $\pm$ 0,15
lgp05	41,0 $\pm$ 2,1	428,3 $\pm$ 16,8	95,6 $\pm$ 1,2	118,4 $\pm$ 6,5	0,35 $\pm$ 0,004
lgp61	34,3 $\pm$ 0,8	584,3 $\pm$ 25,6	58,7 $\pm$ 1,3	121,5 $\pm$ 2,3	0,28 $\pm$ 0,006
lgp73	1,2 $\pm$ 0,2	740,0 $\pm$ 42,0	1,7 $\pm$ 0,1	96,7 $\pm$ 26,2	0,013 $\pm$ 0,005
SV24	87,9 $\pm$ 5,4	1436,7 $\pm$ 134,0	61,3 $\pm$ 2,5	114,3 $\pm$ 5,3	0,77 $\pm$ 0,08
Snu	1,1 $\pm$ 0,2	393,3 $\pm$ 41,5	2,9 $\pm$ 0,2	120,7 $\pm$ 8,6	0,009 $\pm$ 0,002

Tabela 8:

Parâmetros intracelulares da fermentação em meio com farinha de raspas de mandioca (meio MAC) após três e sete dias de fermentação.

linhagem	ativ. enzim. total (U GA)		proteína total (µg)	ativ. específica (U GA/mg prot.)		peso seco (mg)	ativ. enzim./peso seco (U GA/mg micélio)
3 dias							
pabfwn	24,3 ± 0,9		247,0 ± 20,7	99,0 ± 11,0		128,5 ± 10,3	0,19 ± 0,02
nicolv	23,1 ± 5,2		198,7 ± 53,7	117,3 ± 11,6		116,2 ± 18,4	0,20 ± 0,04
lgp05	5,8 ± 1,2		118,7 ± 34,9	50,3 ± 5,7		97,3 ± 2,8	0,06 ± 0,01
lgp61	16,4 ± 2,1		253,3 ± 46,2	65,1 ± 5,5		125,5 ± 12,2	0,13 ± 0,02
lgp73	1,3 ± 0,1		49,3 ± 10,1	27,0 ± 5,8		20,1 ± 3,1	0,07 ± 0,01
SV24	16,0 ± 2,2		205,3 ± 48,2	78,9 ± 7,5		129,9 ± 7,3	0,12 ± 0,01
Snu	1,2 ± 0,1		86,7 ± 30,5	15,0 ± 6,0		71,3 ± 11,5	0,02 ± 0,00
7 dias							
pabfwn	159,2 ± 16,3		1541,7 ± 72,2	103,4 ± 11,6		116,2 ± 10,7	1,38 ± 0,22
nicolv	219,2 ± 20,1		1500,0 ± 544,9	155,4 ± 40,4		109,8 ± 6,7	1,99 ± 0,08
lgp05	46,7 ± 12,3		2008,3 ± 440,4	23,1 ± 1,4		118,4 ± 6,5	0,39 ± 0,09
lgp61	209,2 ± 38,8		3308,3 ± 62,9	63,2 ± 11,4		121,5 ± 2,3	1,72 ± 0,31
lgp73	8,9 ± 7,1		940,0 ± 197,0	8,9 ± 5,8		96,7 ± 26,2	0,08 ± 0,05
SV24	70,0 ± 10,9		2691,7 ± 62,9	26,0 ± 3,5		114,3 ± 5,3	0,61 ± 0,08
Snu	40,0 ± 4,3		1210,0 ± 65,6	33,0 ± 2,0		120,7 ± 8,6	0,33 ± 0,01

Tabela 9:

Parâmetros relativos ao micélio da fermentação em meio com farinha de raspas de mandioca (meio MAC) após três e sete dias de fermentação.

linhagem	3 dias				7 dias			
	ativ. enzim. total (U GA)	peso seco (mg)	ativ. enzim./peso seco (U GA/mg micélio)	ativ. enzim. total (U GA)	peso seco (mg)	ativ. enzim. total (U GA)	peso seco (mg)	ativ. enzim./peso seco (U GA/mg micélio)
pabfvn	9,9 ± 0,4	128,5 ± 10,3	0,078 ± 0,074	4,3 ± 0,9	116,2 ± 10,7	4,3 ± 0,9	116,2 ± 10,7	0,036 ± 0,004
nicolv	7,6 ± 1,0	116,2 ± 18,4	0,043 ± 0,028	3,9 ± 0,5	109,8 ± 6,7	3,9 ± 0,5	109,8 ± 6,7	0,035 ± 0,005
lgp05	1,6 ± 0,2	97,3 ± 2,8	0,017 ± 0,002	2,0 ± 0,2	118,4 ± 6,5	2,0 ± 0,2	118,4 ± 6,5	0,017 ± 0,011
lgp61	6,0 ± 1,2	125,5 ± 12,2	0,049 ± 0,014	3,0 ± 0,1	121,5 ± 2,3	3,0 ± 0,1	121,5 ± 2,3	0,025 ± 0,001
lgp73	0,4 ± 0,1	20,1 ± 3,1	0,017 ± 0,003	0,6 ± 0,4	96,7 ± 26,2	0,6 ± 0,4	96,7 ± 26,2	0,005 ± 0,002
SV24	6,9 ± 0,8	129,9 ± 7,3	0,053 ± 0,006	2,8 ± 0,6	114,3 ± 5,3	2,8 ± 0,6	114,3 ± 5,3	0,024 ± 0,004
Smu	1,2 ± 0,3	71,3 ± 11,5	0,017 ± 0,005	0,9 ± 0,2	120,7 ± 8,6	0,9 ± 0,2	120,7 ± 8,6	0,007 ± 0,002

Tabela 10:

Parâmetros extracelulares da fermentação em meio com maltose (meio MAL) após três e sete dias de fermentação.

linhagem	ativ. enzim. total (U GA)		proteína total ( $\mu$ g)		ativ. específica (U GA/mg prot.)		peso seco (mg)		ativ. enzim./peso seco (U GA/mg micélio)	
	3 dias									
pabfwn	115,8 $\pm$ 32,6		291,7 $\pm$ 118,1		409,2 $\pm$ 47,1		65,4 $\pm$ 5,8		1,75 $\pm$ 0,36	
nicolv	160,0 $\pm$ 28,4		434,2 $\pm$ 101,3		371,9 $\pm$ 30,6		67,2 $\pm$ 0,4		2,38 $\pm$ 0,41	
lgp05	16,7 $\pm$ 1,4		59,2 $\pm$ 8,0		283,1 $\pm$ 15,6		67,6 $\pm$ 4,9		0,25 $\pm$ 0,01	
lgp61	12,5 $\pm$ 9,0		56,3 $\pm$ 26,5		188,4 $\pm$ 164,4		68,7 $\pm$ 2,8		0,18 $\pm$ 0,13	
lgp73	0,0		0,0		0,0		49,8 $\pm$ 1,1		0,0	
SV24	11,7 $\pm$ 3,8		65,0 $\pm$ 10,0		176,2 $\pm$ 34,7		67,4 $\pm$ 11,1		0,16 $\pm$ 0,05	
Snu	35,0 $\pm$ 6,6		81,7 $\pm$ 27,5		448,2 $\pm$ 88,2		75,1 $\pm$ 6,3		0,46 $\pm$ 0,05	
	7 dias									
pabfwn	425,5 $\pm$ 35,9		1163 $\pm$ 151		368,0 $\pm$ 35,2		62,9 $\pm$ 3,1		6,79 $\pm$ 0,91	
nicolv	395,3 $\pm$ 27,8		755 $\pm$ 146		532,8 $\pm$ 72,2		65,1 $\pm$ 11,4		6,20 $\pm$ 1,19	
lgp05	103,4 $\pm$ 19,9		145 $\pm$ 67		528,1 $\pm$ 144,1		67,9 $\pm$ 1,1		1,52 $\pm$ 0,30	
lgp61	65,5 $\pm$ 38,6		188 $\pm$ 88		517,0 $\pm$ 210,7		62,0 $\pm$ 3,1		1,08 $\pm$ 0,66	
lgp73	15,3 $\pm$ 2,2		53 $\pm$ 39		404,7 $\pm$ 346,9		71,8 $\pm$ 6,0		0,21 $\pm$ 0,03	
SV24	99,8 $\pm$ 5,3		586 $\pm$ 270		205,2 $\pm$ 119,7		69,5 $\pm$ 4,4		1,43 $\pm$ 0,09	
Snu	76,2 $\pm$ 5,8		612 $\pm$ 363		155,2 $\pm$ 84,4		65,2 $\pm$ 3,3		1,17 $\pm$ 0,09	

Tabela 11:  
Parâmetros intracelulares da fermentação em meio com maltose (meio MAL) após três e sete dias de fermentação.

linhagem	ativ. enzim. total (U GA)	proteína total ( $\mu$ g)	ativ. específica (U GA/mg prot.)	peso seco (mg)	ativ. enzim./peso seco (U GA/mg micélio)
3 dias					
pabfwn	103,3 $\pm$ 34,0	1300 $\pm$ 350	78,7 $\pm$ 9,6	65,4 $\pm$ 5,7	1,56 $\pm$ 0,43
nicolv	39,2 $\pm$ 6,3	975 $\pm$ 225	44,7 $\pm$ 8,0	67,2 $\pm$ 0,4	0,58 $\pm$ 0,09
lgp05	25,0 $\pm$ 5,0	741 $\pm$ 63	33,5 $\pm$ 3,9	67,6 $\pm$ 4,9	0,37 $\pm$ 0,05
lgp61	45,0 $\pm$ 8,6	1400 $\pm$ 288	32,3 $\pm$ 3,6	68,7 $\pm$ 2,8	0,65 $\pm$ 0,10
lgp73	10,8 $\pm$ 1,4	383 $\pm$ 14	28,2 $\pm$ 2,6	49,8 $\pm$ 1,1	0,22 $\pm$ 0,03
SV24	40,8 $\pm$ 12,3	1200 $\pm$ 307	33,8 $\pm$ 1,5	67,4 $\pm$ 11,1	0,56 $\pm$ 0,14
Snu	23,3 $\pm$ 1,4	1308 $\pm$ 245	18,2 $\pm$ 3,3	75,1 $\pm$ 6,3	0,31 $\pm$ 0,03
7 dias					
pabfwn	41,1 $\pm$ 8,1	1133 $\pm$ 137	36,1 $\pm$ 4,0	62,9 $\pm$ 3,1	0,65 $\pm$ 0,12
nicolv	17,5 $\pm$ 8,2	617 $\pm$ 260	27,8 $\pm$ 3,4	65,1 $\pm$ 11,4	0,26 $\pm$ 0,01
lgp05	14,9 $\pm$ 0,6	1358 $\pm$ 218	11,2 $\pm$ 1,7	67,9 $\pm$ 1,1	0,22 $\pm$ 0,01
lgp61	10,5 $\pm$ 2,2	700 $\pm$ 100	15,5 $\pm$ 5,4	62,0 $\pm$ 3,1	0,17 $\pm$ 0,03
lgp73	3,5 $\pm$ 1,3	866 $\pm$ 126	4,0 $\pm$ 1,1	71,8 $\pm$ 6,0	0,05 $\pm$ 0,00
SV24	9,5 $\pm$ 1,3	750 $\pm$ 108	12,8 $\pm$ 1,6	69,5 $\pm$ 4,4	0,14 $\pm$ 0,02
Snu	6,1 $\pm$ 0,8	1050 $\pm$ 66	5,8 $\pm$ 0,6	65,2 $\pm$ 3,3	0,09 $\pm$ 0,01

Tabela 12:

Parâmetros relativos ao micélio da fermentação em meio com maltose (meio MAL) após três e sete dias de fermentação.

linhagem	3 dias			7 dias		
	ativ. enzim. total (U GA)	peso seco (mg)	ativ. enz./peso seco (U GA/mg micélio)	ativ. enzim. total (U GA)	peso seco (mg)	ativ. enz./peso seco (U GA/mg micélio)
pabfwn	4,7 ± 1,4	65,4 ± 5,7	0,070 ± 0,013	3,4 ± 0,5	62,9 ± 3,1	0,054 ± 0,005
nicolv	2,8 ± 0,3	67,2 ± 0,4	0,043 ± 0,004	0,7 ± 0,3	65,1 ± 11,4	0,010 ± 0,002
lgp05	0,8 ± 0,2	67,6 ± 4,9	0,012 ± 0,002	1,5 ± 0,2	67,9 ± 1,1	0,022 ± 0,003
lgp61	1,3 ± 0,3	68,7 ± 2,8	0,019 ± 0,003	1,4 ± 0,3	62,0 ± 3,1	0,022 ± 0,003
lgp73	0,3 ± 0,0	49,8 ± 1,1	0,005 ± 0,000	1,1 ± 0,1	71,8 ± 6,0	0,015 ± 0,004
SV24	1,2 ± 0,3	67,4 ± 11,1	0,016 ± 0,002	1,7 ± 0,2	69,5 ± 4,4	0,024 ± 0,002
Snu	1,4 ± 0,3	75,1 ± 6,3	0,018 ± 0,003	0,9 ± 0,2	65,2 ± 3,3	0,013 ± 0,002

Tabela 13:

Comparação da atividade enzimática extracelular, intracelular e ligada ao micélio (em U GA) após três e sete dias de fermentação em meio MAC e em meio MAL.

linhagem	3 dias						7 dias					
	MAL			MAC			MAL			MAC		
	extracel.	intracel.	micélio									
pabfyn	115,8	103,3	4,7	4,1	24,3	9,9	425,5	41,1	3,4	431,8	159,2	4,3
nicolv	160,0	39,2	2,8	1,8	23,1	7,6	395,3	17,5	0,7	408,5	219,2	3,9
lgp05	16,7	25,0	0,8	0,0	5,8	1,6	103,4	14,9	1,5	40,9	46,7	2,0
lgp61	12,5	45,0	1,3	0,6	16,4	6,0	65,5	10,5	1,4	34,3	209,2	3,0
lgp73	0,0	10,8	0,3	0,0	1,3	0,4	15,3	3,5	1,1	1,2	8,9	0,5
SV24	11,7	40,8	1,2	22,1	16,0	6,9	99,8	9,5	1,7	87,9	70,0	2,8
Snu	35,0	23,3	1,4	0,0	1,2	1,2	76,2	6,1	0,9	1,1	40,0	0,9

Tabela 14:  
 Comparação do teor de proteína (em  $\mu\text{g}$ ) após três e sete dias de fermentação em meio MAL e em meio MAC.

linhagem	3 dias						7 dias					
	meio		MAL	meio		MAC	meio		MAL	meio		MAC
	extracel.	intracel.		extracel.	intracel.		extracel.	intracel.		extracel.	intracel.	
pabfwn	292	1300	70	247	1163	1133	1942	1542				
nicolv	434	975	88	199	755	616	2365	1500				
lgp05	59	742	148	119	145	1358	428	2008				
lgp61	38	1400	118	253	188	700	584	3308				
lgp73	0	383	121	49	53	867	740	940				
SV24	65	1200	311	205	587	750	1437	2692				
Snu	82	1308	134	87	612	1050	393	1210				

Tabela 15:  
 Comparação da atividade específica (U GA/mg de proteína) após três e sete dias de fermentação em meio MAL e em meio MAC

linhagem	3 dias						7 dias					
	meio MAL			meio MAC			meio MAL			meio MAC		
	extracelular	intracelular	total									
pabfyn	409,2	78,9	488,1	59,0	99,0	158,0	368,0	36,1	222,3	103,4	272,7	375,9
micolv	371,9	44,7	416,6	20,8	117,3	138,1	532,8	27,8	172,9	155,4	328,3	483,7
Igp05	283,1	33,5	316,6	0,0	50,3	50,3	528,1	11,2	95,6	23,1	118,7	141,8
Igp61	188,9	32,3	221,2	5,4	65,1	70,5	517,0	15,5	58,7	63,2	121,9	184,9
Igp73	0,0	28,2	28,2	0,0	27,0	27,0	404,7	3,9	1,6	8,8	12,5	16,4
SV24	176,2	33,8	210,0	71,1	78,9	150,0	205,2	12,8	61,3	26,0	87,3	113,3
Snu	448,2	18,2	466,4	0,0	15,0	15,0	155,2	5,8	2,9	33,0	38,9	42,9

Tabela 16:

Comparação do peso seco (em mg) após três e sete dias de fermentação em meio MAL e em meio MAC.

linhagem	3 dias		7 dias	
	meio MAL	meio MAC	meio MAL	meio MAC
pabfwn	65,4	128,5	62,9	116,2
nicolv	67,2	116,2	65,1	109,8
lgp05	67,6	97,3	67,9	118,4
lgp61	68,7	125,5	62,0	121,5
lgp73	49,8	20,1	71,8	96,7
SV24	72,6	129,9	69,5	114,3
Snu	75,1	71,3	65,2	120,7

Tabela 17:

Comparação do coeficiente atividade enzimática/peso seco (U GA/mg de micélio) após três e sete dias de fermentação em meio MAL e em meio MAC.

linhagem	3 dias						7 dias					
	MAL			MAC			MAL			MAC		
	extracel.	intracel.	micélio									
pabfvn	1,75	1,56	0,070	0,032	0,19	0,078	6,80	0,65	0,054	3,72	0,65	0,036
nicolv	2,38	0,58	0,042	0,016	0,20	0,043	6,20	0,30	0,010	3,72	0,26	0,036
lgp05	0,25	0,37	0,012	0,0	0,06	0,017	1,42	0,22	0,022	0,35	0,22	0,017
lgp61	0,18	0,65	0,019	0,005	0,13	0,049	1,07	0,17	0,022	0,28	0,17	0,025
lgp73	0,0	0,22	0,010	0,0-	0,07	0,017	0,21	0,07	0,015	0,01	0,05	0,005
SV24	0,16	0,56	0,016	0,171	0,12	0,053	1,43	0,14	0,024	0,77	0,13	0,024
Snu	0,46	0,31	0,018	0,0	0,02	0,017	1,17	0,09	0,014	0,01	0,09	0,007

Tabelas

Tabela 18:

Resistência de protoplastos das linhagens de *Aspergillus niger* utilizadas à higromicina em meio de regeneração com sorbitol 1,2M após 48 horas de incubação.

linhagem	concentração de higromicina ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	0	100 e 200
pabfwn	+	-
nicolv	+	+/--
lgp61	+	+/--
lgp73	+	-
SV24	+	-
Snu	+	-
hgp169	+	-
hgp252	+	-
10v10	+	+/-

Tabela 18A:

Resistência de protoplastos das linhagens Snu e 10v10 à higromicina em meio de regeneração com sorbitol 1,2M após 108 horas de incubação.

linhagem	concentração de higromicina ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	0	100	200
Snu	+++	+	-
10v10	+++	++	+/-

+ : crescimento normal

+/-- : muito pouco crescimento

+/- : pouco crescimento

- : sem crescimento

Tabela 19:

Resistência de protoplastos das linhagens de *Aspergillus niger* utilizadas ao benomil em meio de regeneração com sorbitol 1,2M.

linhagem	concentração de benomil ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	0,25	0,50	0,75
pabfwn	+	+/-	-
nicolv	+	+/-	-
lgp61	+	+/--	-
lgp73	+	+/-	-
SV24	+	+/--	-
Snu	+	+/--	-

Tabela 20:

Resistência de protoplastos das linhagens de *Aspergillus niger* utilizadas ao benomil em meio de regeneração de protoplastos com KCl 0,6M.

linhagem	concentração de benomil ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	0,25	0,50	0,75
pabfwn	+	+/--	-
nicolv	+	+/--	-
lgp61	+	+/--	-
lgp73	+	+/--	-
SV24	+	+/--	-
Snu	+	+/--	-

+ : crescimento normal  
+/-- : muito pouco crescimento

+/- : pouco crescimento  
- : sem crescimento

## **APÊNDICE II**

### **FIGURAS**

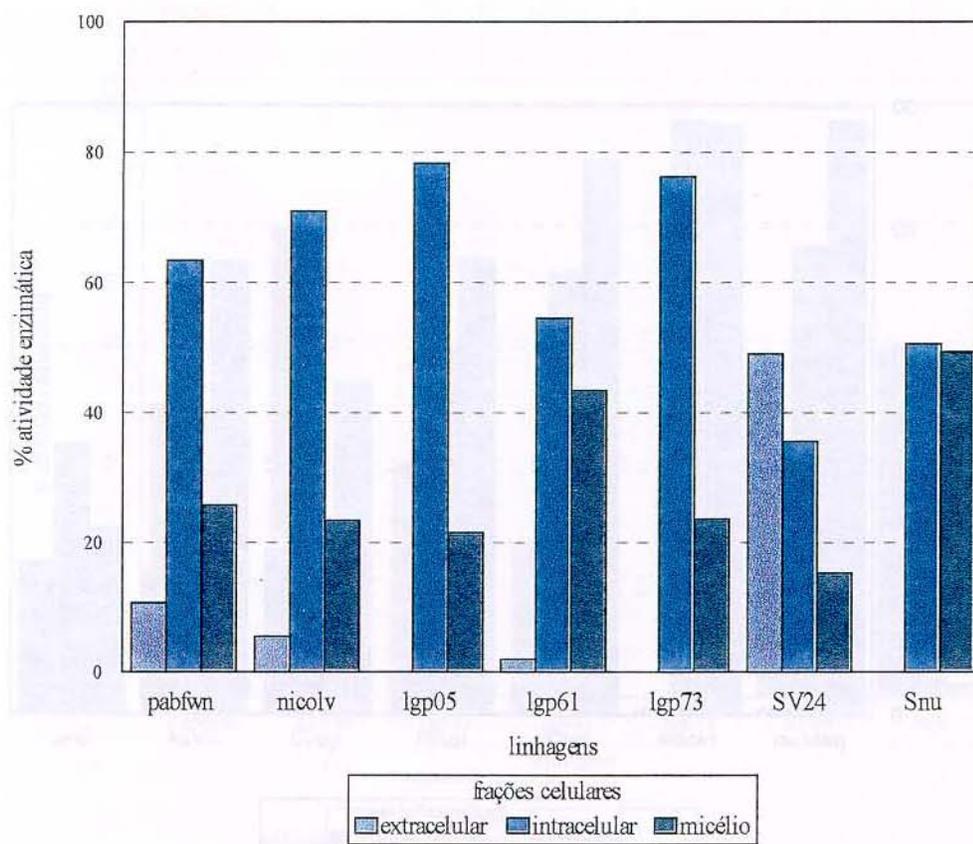


Figura I:

Perfil de distribuição da atividade enzimática, em %, nas diferentes frações celulares em meio MAC aos três dias de fermentação.

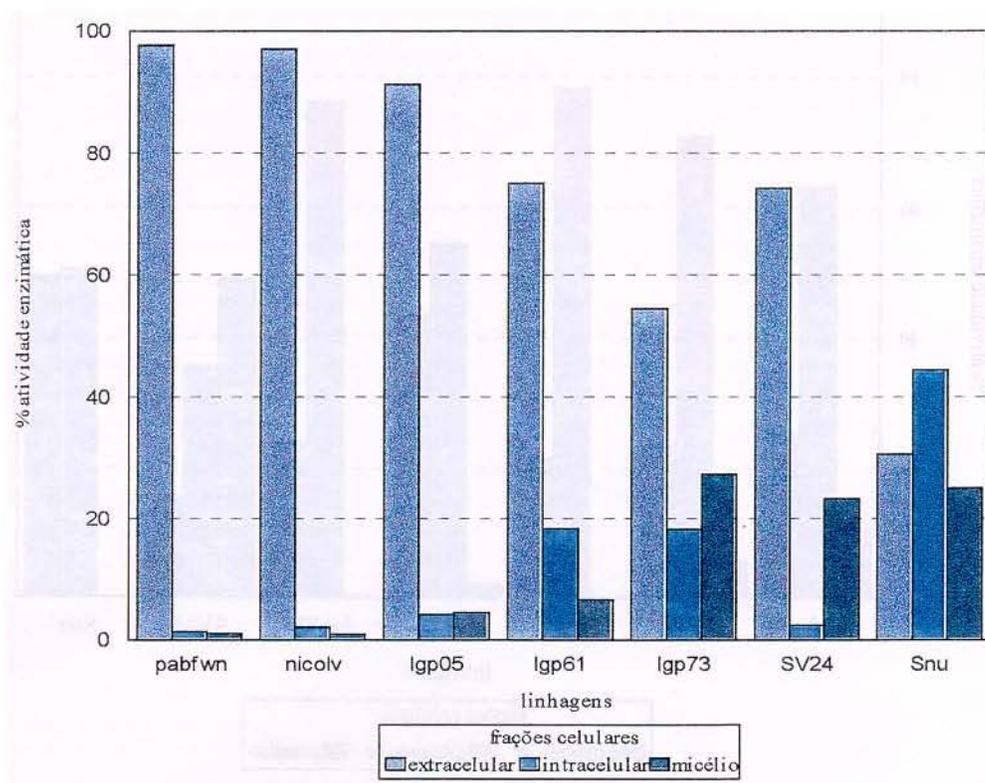


Figura II:

Perfil de distribuição da atividade enzimática, em %, nas diferentes frações celulares em meio MAC aos sete dias de fermentação.

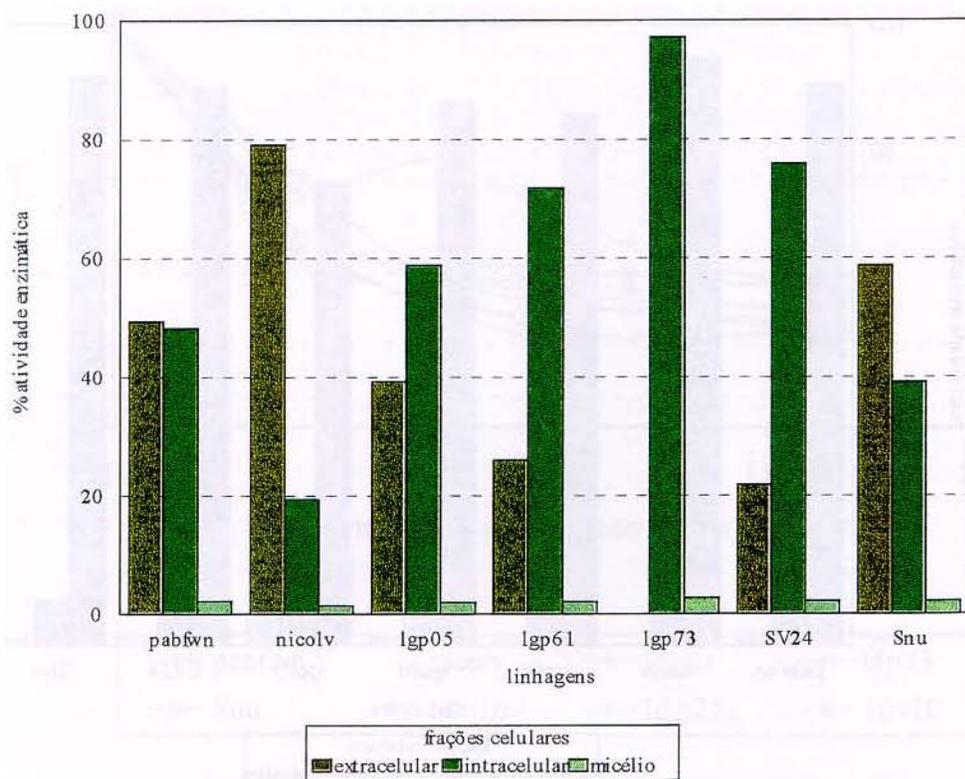


Figura III:

Perfil de distribuição da atividade enzimática, em %, nas diferentes frações celulares em meio MAL aos três dias de fermentação.

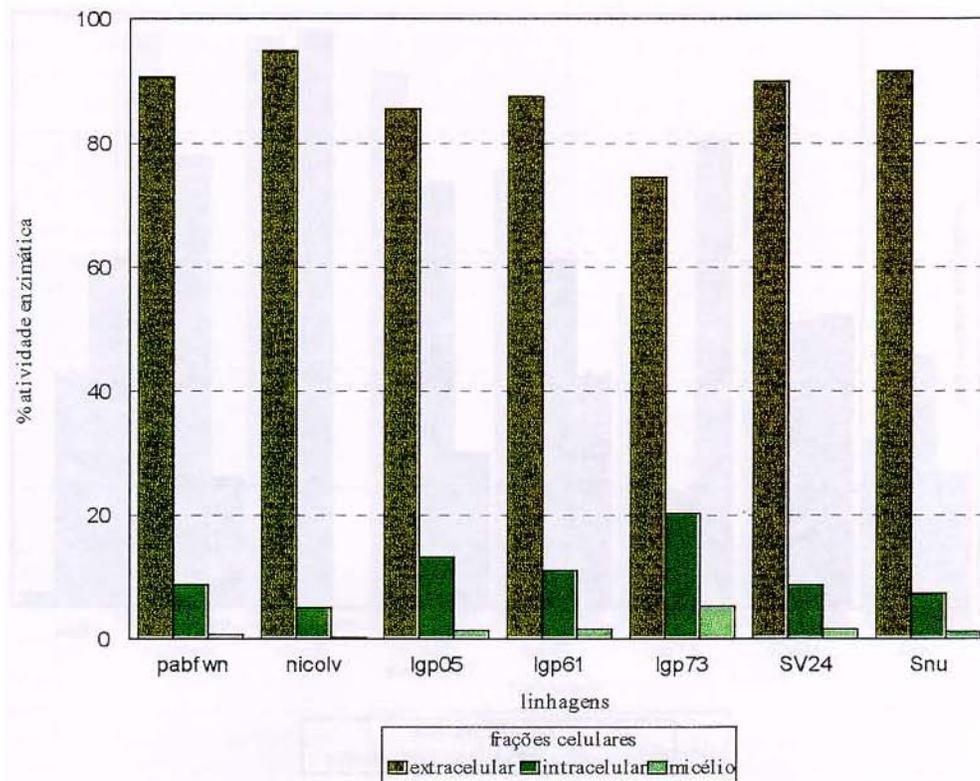


Figura IV:

Perfil de distribui o da atividade enzim tica, em %, nas diferentes fra es celulares em meio MAL aos sete dias de fermenta o.

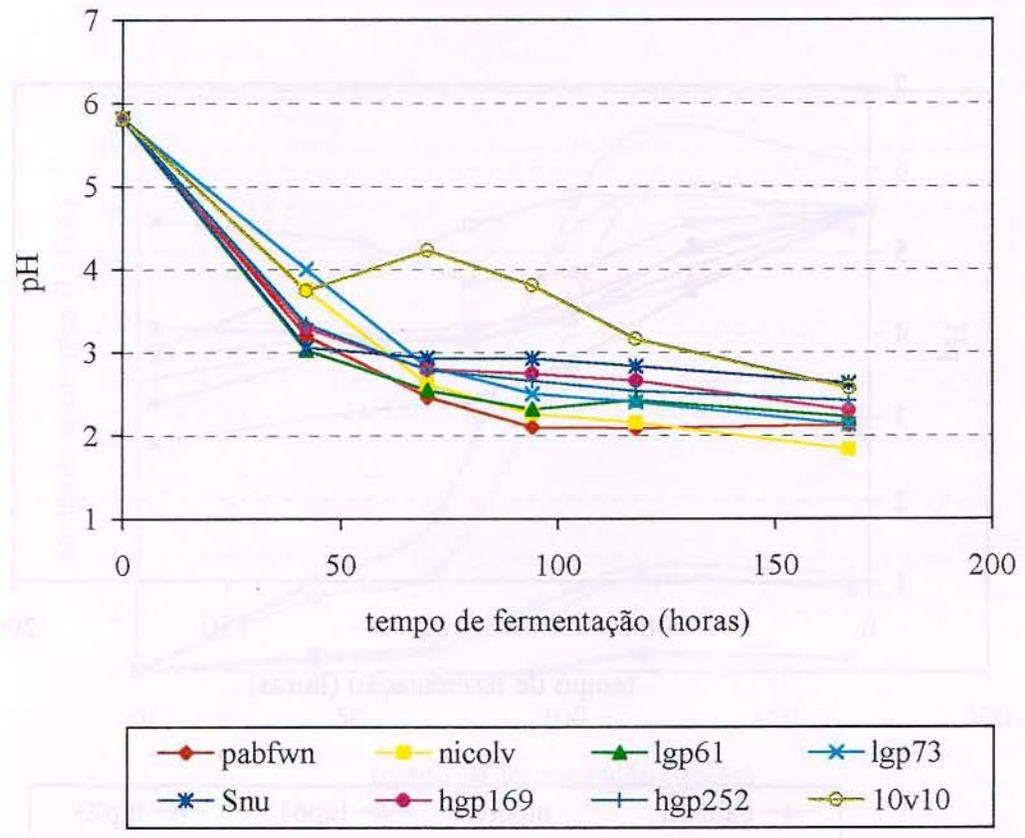


Figura V:

pH do meio durante fermentação em meio com maltose (MAL).

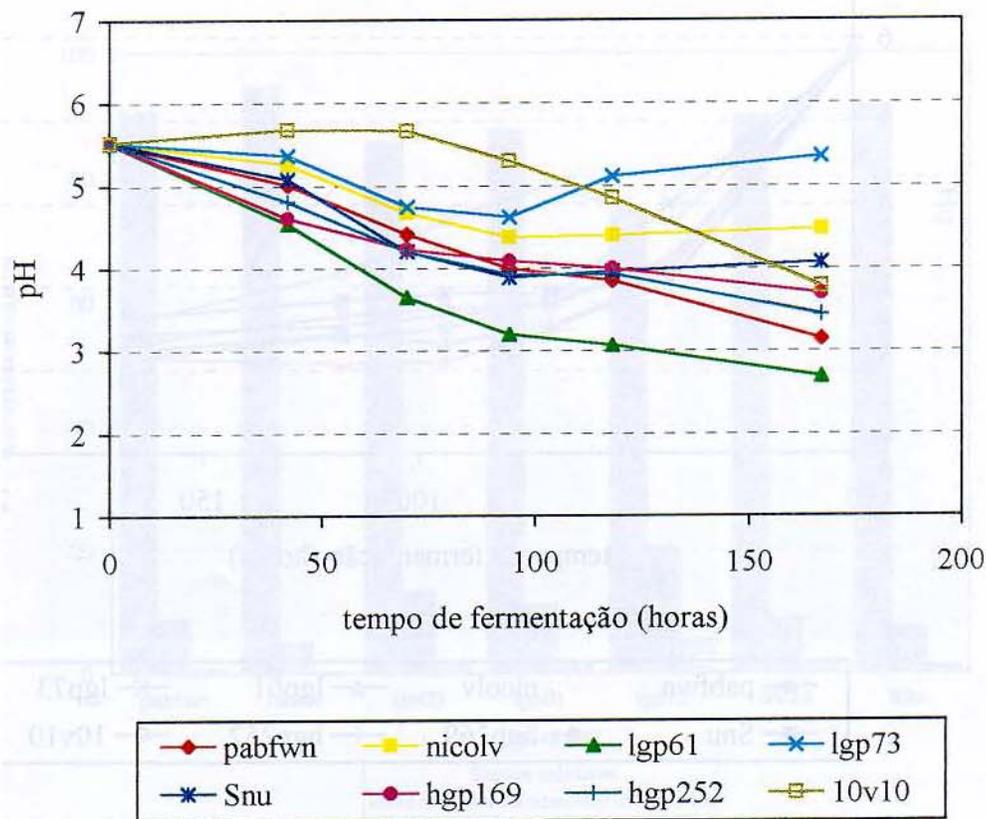


Figura VI:

pH do meio durante fermentação em meio com maltose tamponado (MALt).

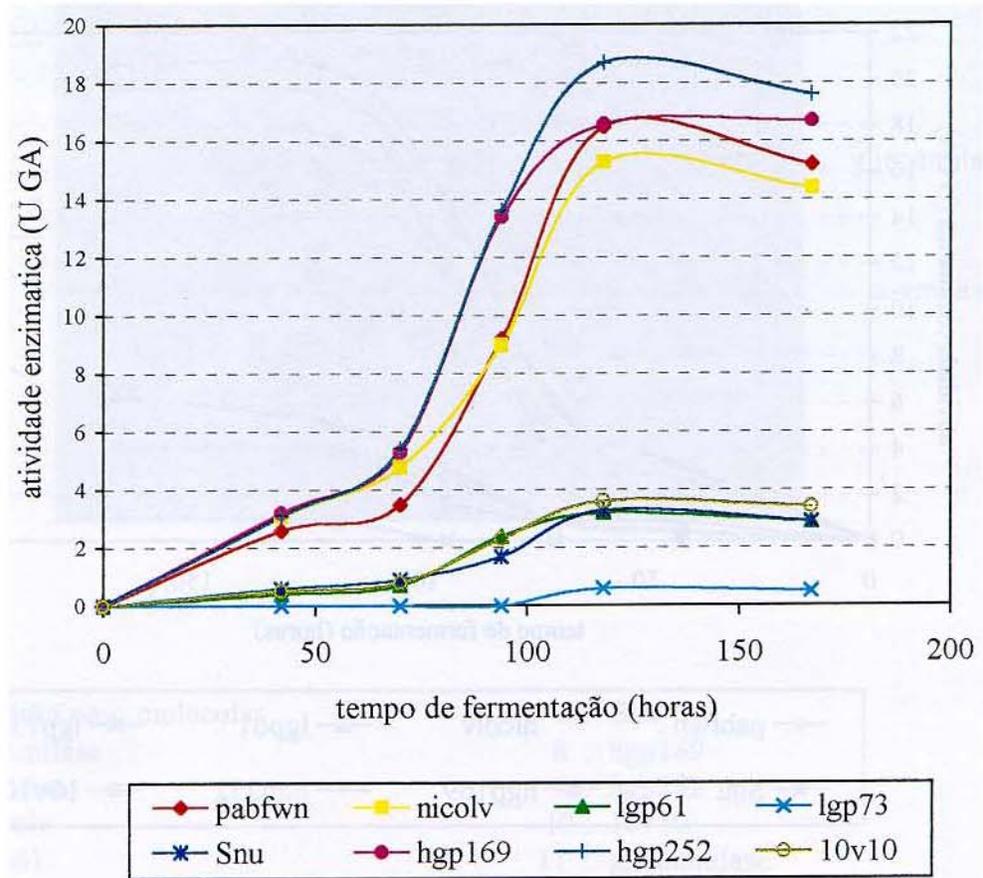


Figura VII:

Atividade de glicoamilase durante fermentação em meio com maltose (MAL).

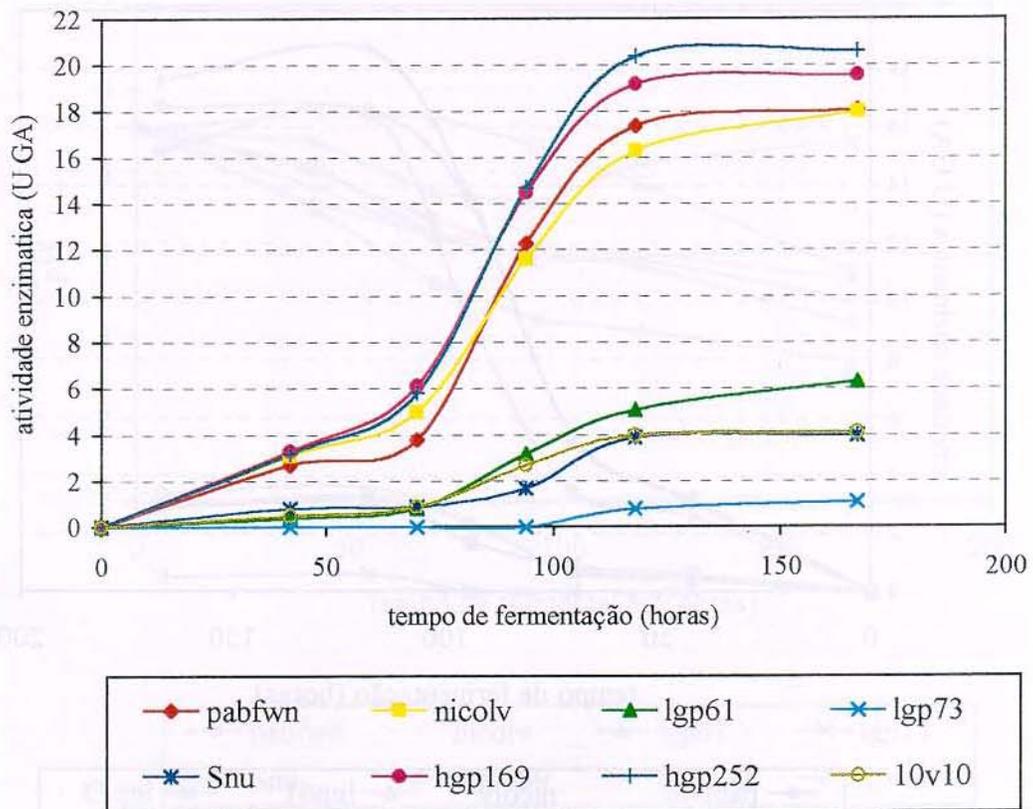
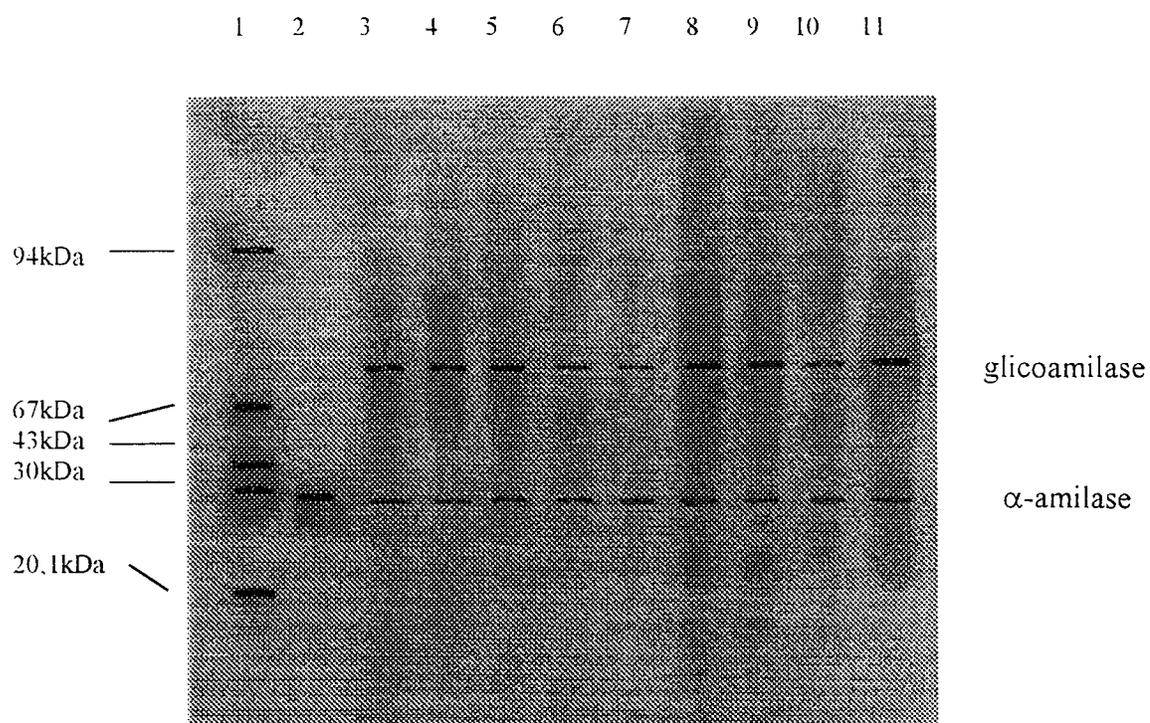


Figura VIII:

Atividade enzimática durante fermentação em meio com maltose tamponado (MALt).

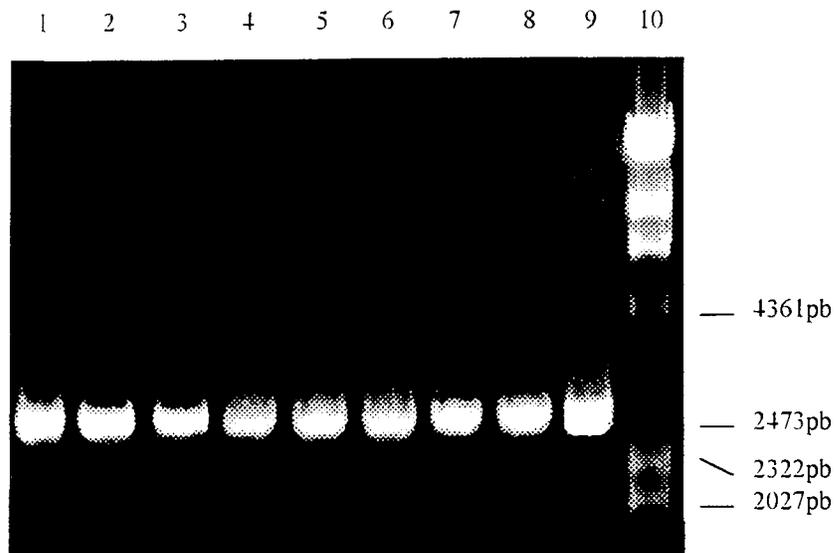


## Canaletas:

- |                           |                   |
|---------------------------|-------------------|
| 1 : padrão peso molecular | 7 : Snu           |
| 2 : $\alpha$ -amilase     | 8 : hgp169        |
| 3 : pabfwn                | 9 : hgp252        |
| 4 : nicolv                | 10 : 10v10        |
| 5 : lgp61                 | 11 : glicoamilase |
| 6 : lgp73                 |                   |

## Figura IX:

Eletroforese de proteínas do caldo de fermentação em meio com farinha integral de raspa de mandioca (MAC).



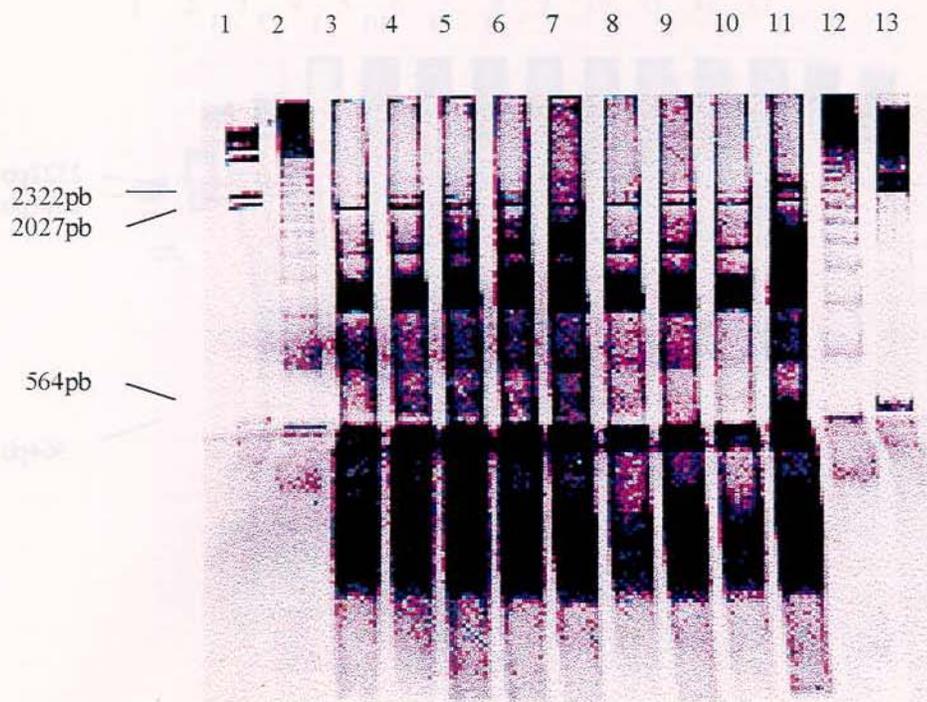
Canaletas:

1 : pabfwn  
2 : nicolv  
3 : lgp61  
4 : lgp73  
5 : SV24

6 : Snu  
7 : hgp169  
8 : hgp252  
9 : 10v10  
10 :  $\lambda$ /HindIII

Figura X:

Amplificação do gene *glaA* por reação de polimerase em cadeia (PCR).

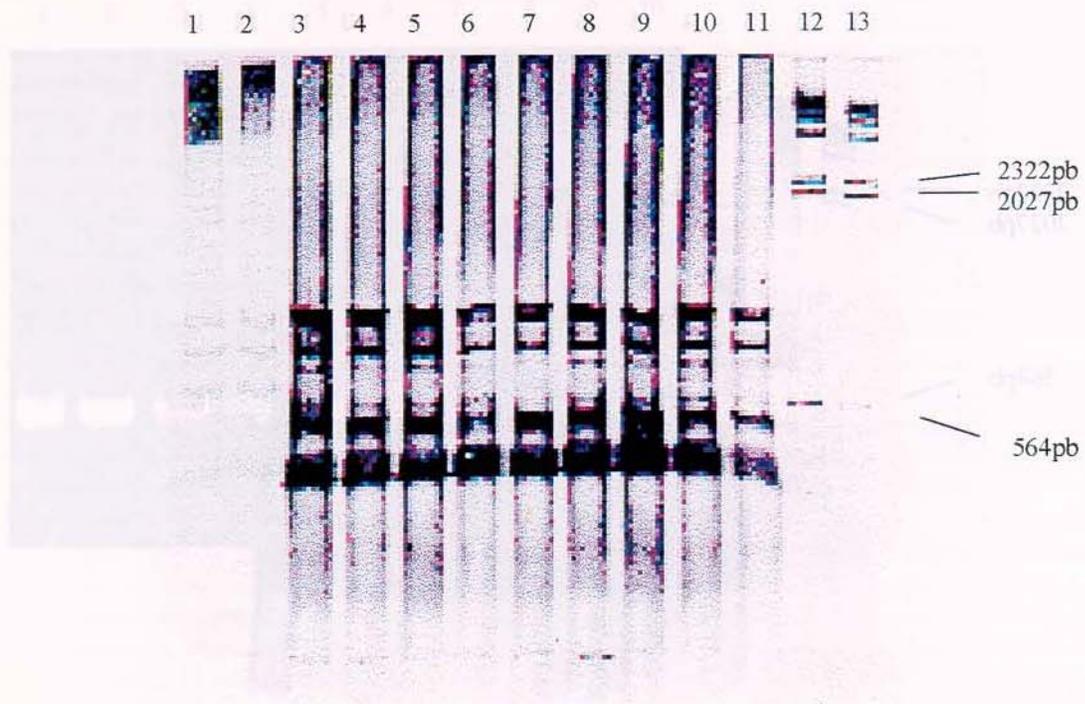


## Canaletas:

- |                        |                         |
|------------------------|-------------------------|
| 1 : $\lambda$ /HindIII | 8 : Snu                 |
| 2 : ladder 123pb       | 9 : hgp169              |
| 3 : pabfwn             | 10 : hgp252             |
| 4 : nicolv             | 11 : 10v10              |
| 5 : lgp61              | 12 : ladder123pb        |
| 6 : lgp73              | 13 : $\lambda$ /HindIII |
| 7 : SV24               |                         |

Figura XIA:

Padrão de restrição do gene *glaA* digerido com as enzimas BamHI, BglII, ClaI, KpnI e PstI.

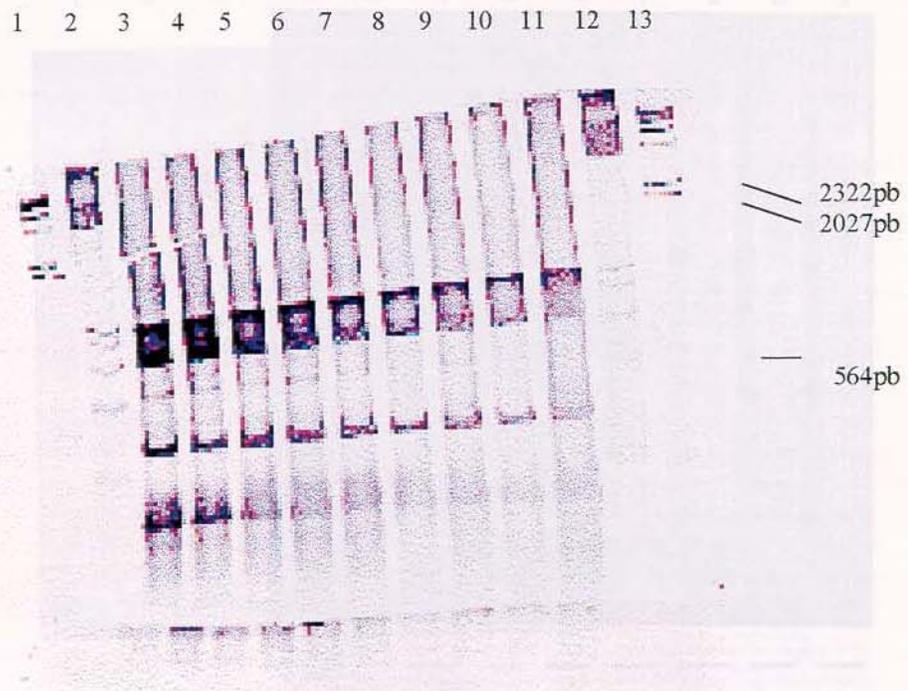


Canaletas:

- |                  |                         |
|------------------|-------------------------|
| 1 : ladder 123pb | 8 : Snu                 |
| 2 : ladder 123pb | 9 : hgp169              |
| 3 : pabfwn       | 10 : hgp252             |
| 4 : nicolv       | 11 : 10v10              |
| 5 : lgp61        | 12 : $\lambda$ /HindIII |
| 6 : lgp73        | 13 : $\lambda$ /HindIII |
| 7 : SV24         |                         |

Figura XIB:

Padrão de restrição do gene *glaA* digerido com as enzimas EcoRI, PvuI, SmaI e XbaI.

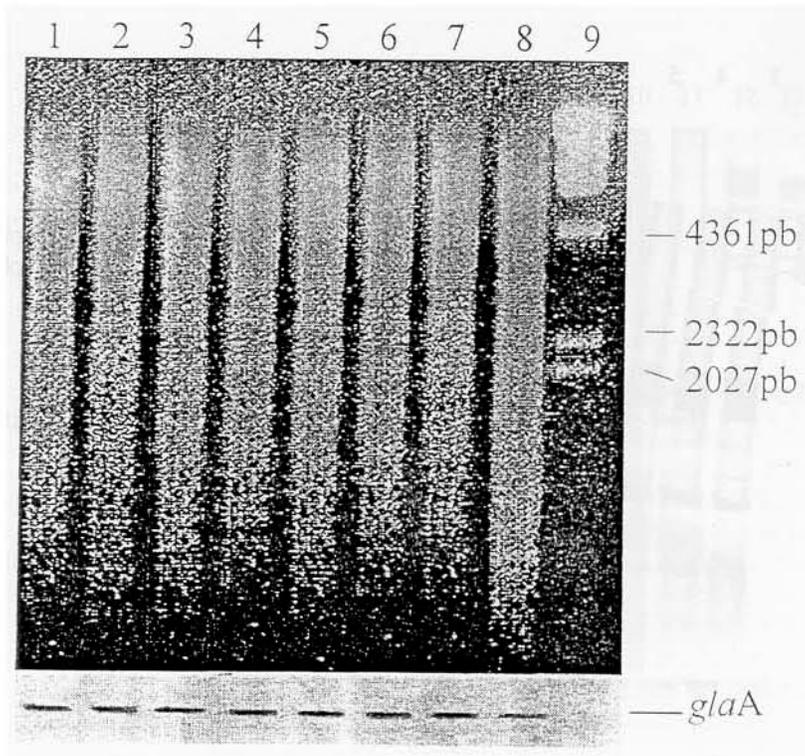


## Canaletas:

- |                        |                         |
|------------------------|-------------------------|
| 1 : $\lambda$ /HindIII | 8 : Snu                 |
| 2 : ladder 123pb       | 9 : hgp169              |
| 3 : pabfwn             | 10 : hgp252             |
| 4 : nicolv             | 11 : 10v10              |
| 5 : lgp61              | 12 : ladder123pb        |
| 6 : lgp73              | 13 : $\lambda$ /HindIII |
| 7 : SV24               |                         |

Figura XIC:

Padrão de restrição do gene *glaA* digerido com as enzimas BcLI, DraI, HindII e XhoI.



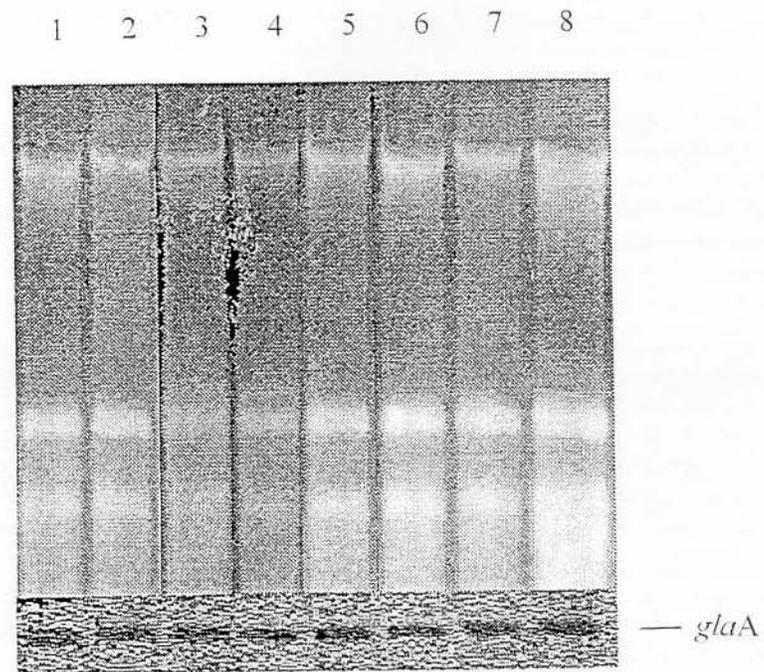
Canaletas:

- 1 : pabfwn
- 2 : nicolv
- 3 : lgp61
- 4 : lgp73
- 5 : Snu

- 6 : hgp169
- 7 : hgp252
- 8 : 10v10
- 9 :  $\lambda$ /HindIII

Figura XII:

Hibridação de DNA genômico, digerido com EcoRI e EcoRV, com sonda *glA* homóloga.



ANÁLISE ESTATÍSTICA

Canaletas:

1 : pabfwn  
 2 : nicolv  
 3 : lgp61  
 4 : lgp73

5 : Snu  
 6 : hgp169  
 7 : hgp252  
 8 : 10v10

Figura XIII:

Hibridação de RNA total com sonda *glA* homóloga.

**APÊNDICE III**  
**ANÁLISE ESTATÍSTICA**

## Análise estatística

A análise estatística dos resultados apresentados nas Tabelas 2 a 12 foi feita mediante o programa Sigma Stat 2.0 da firma Jandel Scientific, que utiliza o Teste t ( $P < 0,001$ ) ou a análise unidirecional de variância de acordo com o Teste de Tukey ou o Método de Dunnett ( $P < 0,05$ ). Os resultados obtidos para estas análises constam a seguir.

### 1) Tabela 2

A) Comparação da atividade enzimática (UGA/ml) do caldo de fermentação não tratado ou submetido a congelamento pelo Teste t.

tratamento	média (UGA/ml)
sem tratamento	7,133
-20°C/1 semana	0,733

A diferença entre as médias dos dois grupos analisados é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre ambos ( $P < 0,001$ ).

B) Comparação da concentração de proteína ( $\mu\text{g/ml}$ ) do caldo de fermentação não tratado ou submetido a congelamento pelo Teste t.

tratamento	média ( $\mu\text{g/ml}$ )
sem tratamento	41,17
-20°C/1 semana	17,87

A diferença entre as médias dos dois grupos analisados é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre ambos ( $P < 0,001$ ).

**2) Tabela 3**

A) Comparação da atividade enzimática (UGA/ml) no caldo de fermentação submetido à filtração ou à centrifugação.

tratamento	média (UGA/ml)
centrifugação	12,27
sem tratamento	11,77
filtração	11,20

A diferença entre as médias dos diversos grupos não é suficientemente grande para excluir a possibilidade que a mesma seja devida à variabilidade da amostra, portanto não há diferença significativa entre os grupos ( $P=0,265$ ).

B) Comparação da concentração de proteína ( $\mu\text{g/ml}$ ) no caldo de fermentação submetido à filtração ou à centrifugação.

tratamento	média ( $\mu\text{g/ml}$ )
filtração	55,26
sem tratamento	51,97
centrifugação	49,77

A diferença entre as médias dos diversos grupos não é suficientemente grande para excluir a possibilidade que a mesma seja devida à variabilidade da amostra, portanto não há diferença significativa entre os grupos ( $P=0,216$ ).

**3) Tabela 4**

**A)** Comparação da atividade enzimática (UGA/ml) do caldo de fermentação após filtração ou centrifugação seguidas de congelamento pelo Teste de Tukey.

tratamento	média (UGA/ml)		
filtração	10,58	a	
centrifugação	5,89		b
sem tratamento	1,50		c

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

**B)** Comparação da concentração de proteína ( $\mu\text{g/ml}$ ) no caldo de fermentação após filtração ou centrifugação seguidas de congelamento Teste de Tukey.

tratamento	média ( $\mu\text{g/ml}$ )		
filtração	52,63	a	
centrifugação	40,38		b
sem tratamento	21,10		c

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

**4) Tabela 5**

A) Comparação da atividade enzimática (UGA/ml) do caldo de fermentação filtrado após diferentes tratamentos pelo Teste de Tukey.

tratamento	média (UGA/ml)					
filtr/diál/4°C/7dias	9,820	a				
filtr/-20°C/7dias	9,817	a				
filtração	9,607	a	b	c		
filtr/diál/-20°C/7dias	9,573		b	c	d	
filtr/4°C/7dias	9,523			c	d	e
filtr/pH6/-20°C/7dias	9,443			c	d	e f
filtr/pH6/4°C/7dias	9,230					f

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

B) Comparação da concentração de proteína do caldo ( $\mu\text{g/ml}$ ) de fermentação filtrado após diferentes tratamentos.

tratamento	média ( $\mu\text{g/ml}$ )
filtr/pH6/4°C/7dias	51,93
filtração	51,67
filtr/4°C/7dias	51,57
filtr/diál/-20°C/7dias	51,53
filtr/diál/4°C/7dias	50,43
filtr/-20°C/7dias	49,47
filtr/pH6/-20°C/7dias	47,63

A diferença entre as médias dos diversos grupos não é suficientemente grande para excluir a possibilidade que a mesma seja devida à variabilidade da amostra, portanto não há diferença significativa entre os grupos ( $P=0,281$ ).

**5) Tabela 6**

Comparação da atividade enzimática (UGA/ml) ligada ao micélio após extração com diversas soluções tampão pelo Teste de Tukey.

tratamento	média (UGA/ml)														
tampãoA1ml(1:10)	6,47									j	k	l	m	n	o
tampãoA1ml(1:20)	10,00	a	b	c	d	e	f	g	h	j					
tampãoA1ml(1:40)	13,23	a	b	c	d	e									
tampãoB1ml(1:10)	6,70								h	j	k	l	m	n	
tampãoB1ml(1:20)	9,40						f	g	h	j	k				
tampãoB1ml(1:40)	11,73	a	b	c	d	e	f								
tampãoC1ml(1:10)	6,03										k	l	m	n	o
tampãoC1ml(1:20)	7,27								h	j	k	l	m		
tampãoC1ml(1:40)	8,93						f	g	h	j	k	l			
tampãoC4ml(1:10)	11,73	a	b	c	d	e	f	g							
tampãoC4ml(1:20)	14,17	a													
tampãoC4ml(1:40)	14,00	a	b												
tampãoD4ml(1:10)	10,70	a	b	c	d	e	f	g	h						
tampãoD4ml(1:20)	13,60	a	b	c	d										
tampãoD4ml(1:40)	13,90	a	b	c											

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

## 6) Tabela 7

## 6.1) Parâmetros extracelulares em meio MAC aos três dias de fermentação.

## A) Comparação da atividade enzimática (UGA) pelo Método de Dunnett.

linhagem	mediana (UGA)	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	4,25	---	não procede
nicolv	1,82	não procede	---
lgp05	0,0	não	não
lgp61	0,58	não procede	não procede
lgp73	0,0	não procede	não procede
SV24	22,9	não procede	não procede
Snu	0,0	não procede	não procede

A diferença entre as medianas dos diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre os grupos ( $P=0,003$ ).

B) Comparação do teor de proteína total ( $\mu\text{g}$ ) pelo Teste de Tukey.

linhagem	média ( $\mu\text{g}$ )			
pabfwn	70,13			f
nicolv	88,33		e	f
lgp05	148,27	b		
lgp61	111,70		c	d e
lgp73	120,57		c	d
SV24	311,20	a		
Snu	134,47	b	c	

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

**C) Comparação da atividade específica (UGA/mg proteína) pelo Método de Dunnett.**

linhagem	medianas (UGA/mg prot)	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	59,03	---	não procede
nicolv	20,77	não procede	---
lgp05	0,0	não	não
lgp61	5,42	não procede	não procede
lgp73	0,0	não procede	não procede
SV24	71,18	não procede	não procede
Snu	0,0	não procede	não procede

A diferença entre as medianas dos diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre os grupos ( $P=0,003$ ).

**D) Comparação do peso seco (mg) pelo Teste de Tukey.**

linhagem	média (mg)				
pabfwn	128,53	a	b		
nicolv	116,20	a	b	c	d
lgp05	97,30			c	d e
lgp61	125,53	a	b	c	
lgp73	20,07				f
SV24	129,87	a			
Snu	71,30				e

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

E) Comparação da atividade enzimática/peso seco (UGA/mg micélio) pelo Método de Dunnett.

linhagem	mediana (UGA/mg micélio)	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	0,032	---	não procede
nicolv	0,014	não procede	---
lgp05	0,0	não	não
lgp61	0,005	não procede	não procede
lgp73	0,0	não procede	não procede
SV24	0,167	não procede	não procede
Snu	0,0	não procede	não procede

A diferença entre as medianas dos diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre os grupos ( $P=0,003$ ).

## 6.2) Parâmetros extracelulares em meio MAC aos sete dias de fermentação.

A) Comparação da atividade enzimática (UGA) pelo Método de Dunnett.

linhagem	mediana (UGA)	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	431,80	---	não procede
nicolv	408,55	não	---
lgp05	40,94	sim	não
lgp61	34,29	sim	sim
lgp73	1,22	sim	sim
SV24	87,90	sim	não procede
Snu	1,13	sim	sim

A diferença entre as medianas dos diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,004$ ).

**B) Comparação do teor de proteína total ( $\mu\text{g}$ ) pelo Teste de Tukey.**

linhagem	média ( $\mu\text{g}$ )			
pabfwn	1941,7		b	
nicolv	2365,0	a		
lgp05	428,3			e f
lgp61	584,3		d	e
lgp73	740,0		d	
SV24	1436,7		c	
Snu	393,3			e f

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

**C) Comparação da atividade específica (UGA/mg proteína) pelo Teste de Tukey.**

linhagem	média (UGA/mg prot.)			
pabfwn	222,3	a		
nicolv	172,9		b	
lgp05	95,6		c	
lgp61	58,7			d
lgp73	1,6			e
SV24	61,3		d	
Snu	2,9			e

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

**D) Comparação do peso seco (mg).**

linhagem	mediana (mg)	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	116,2	---	não procede
nicolv	109,8	não	---
lgp05	118,4	sim	sim
lgp61	121,5	sim	não procede
lgp73	96,7	sim	sim
SV24	114,3	sim	não
Snu	120,7	sim	sim

A diferença entre as medianas dos diversos grupos não é suficientemente grande para excluir a possibilidade que a mesma seja devida à variabilidade da amostra, portanto não há diferença significativa entre os grupos ( $P=0,234$ ).

**E) Comparação da atividade enzimática/peso seco (UGA/mg micélio) pelo Método de Dunnett.**

linhagem	mediana (UGA/mg micélio)	Linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	3,750	---	não procede
nicolv	3,790	não procede	---
lgp05	0,347	sim	não
lgp61	0,285	sim	sim
lgp73	0,015	sim	sim
SV24	0,728	não	não
Snu	0,010	sim	sim

A diferença entre as medianas dos diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,004$ ).

## 7) Tabela 8

## 7.1) Parâmetros intracelulares em meio MAC aos três dias de fermentação.

## A) Comparação da atividade enzimática (UGA) pelo Método de Dunnett.

linhagem	mediana (UGA)	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	24,66	---	não procede
nicolv	20,91	não	---
lgp05	6,21	sim	sim
lgp61	16,71	sim	não procede
lgp73	1,27	sim	sim
SV24	16,10	sim	não
Snu	1,19	sim	sim

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,005$ ).

B) Comparação do teor de proteína total ( $\mu\text{g}$ ) pelo Teste de Tukey.

linhagem	média ( $\mu\text{g}$ )				
pabfwn	247,0	a	b		
nicolv	198,7	a	b	c	d
lgp05	118,7			c	d e
lgp61	253,3	a			
lgp73	49,3				e f
SV24	205,3	a	b	c	
Snu	86,7				e f

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

## C) Comparação da atividade específica (UGA/mg proteína) pelo Teste de Tukey.

linhagem	média (UGA/mg prot.)			
pabfwn	99,04	a	b	
nicolv	117,34	a		
lgp05	50,34			d e
lgp61	65,13		c	d
lgp73	27,00			f
SV24	78,86		b	c
Snu	15,00			f

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

## D) Comparação do peso seco (mg).

( vide análise 6.1.D)

## E) Comparação da atividade enzimática/peso seco (UGA/mg micélio) pelo Método de Dunnett.

linhagem	mediana (UGA/mg micélio)	Linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	0,184	---	não procede
nicolv	0,202	não procede	---
lgp05	0,062	sim	sim
lgp61	0,133	não procede	não procede
lgp73	0,069	sim	sim
SV24	0,117	não	não
Snu	0,017	sim	sim

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,005$ ).

## 7.2) Parâmetros intracelulares em meio MAC aos sete dias de fermentação.

### A) Comparação da atividade enzimática (UGA) pelo Método de Dunnett.

linhagem	mediana (UGA)	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	160,0	---	não
nicolv	217,5	não procede	---
lgp05	52,5	não procede	sim
lgp61	210,0	não procede	não procede
lgp73	6,3	não	sim
SV24	75,0	não procede	sim
Snu	37,5	não procede	sim

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,005$ ).

### B) Comparação do teor de proteína total ( $\mu\text{g}$ ).

linhagem	mediana ( $\mu\text{g}$ )	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	1500	---	não procede
nicolv	1250	não procede	---
lgp05	2250	não procede	não procede
lgp61	3300	não	não
lgp73	1000	não procede	não procede
SV24	2700	não procede	não procede
Snu	1200	não procede	não procede

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,006$ ).

## C) Comparação da atividade específica (UGA/mg proteína) pelo Método de Dunnett.

linhagem	mediana ( $\mu\text{g}$ )	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	98,46	---	não
nicolv	160,00	não procede	---
lgp05	23,08	sim	sim
lgp61	62,22	não procede	sim
lgp73	6,25	sim	sim
SV24	27,78	sim	sim
Snu	32,61	não	sim

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,004$ ).

## D) Comparação de médias de peso seco (mg).

(vide análise 6.2.D)

## E) Comparação da atividade enzimática/peso seco (UGA/mg micélio) pelo Método de Dunnett.

linhagem	mediana (UGA/mg micélio)	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	1,504	---	sim
nicolv	2,029	não procede	---
lgp05	0,436	não procede	sim
lgp61	1,766	não procede	sim
lgp73	0,073	não	sim
SV24	0,628	não procede	sim
Snu	0,326	não procede	sim

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,004$ ).

**8) Tabela 9****8.1) Parâmetros relativos ao micélio em meio MAC aos três dias de fermentação.**

**A) Comparação da atividade enzimática (UGA) pelo Teste de Tukey.**

Linhagem	média (UGA)				
pabfwn	9,94	a			
nicolv	7,62	b			
lgp05	1,64				e
lgp61	6,04	b	c	d	
lgp73	0,35				e f
SV24	6,88	b	c		
Snu	1,17				e f

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

**B) Comparação do peso seco (mg).**

(vide análise 6.1.D)

**C) Comparação da atividade enzimática/peso seco (UGA/mg micélio) pelo Método de Dunnett.**

linhagem	mediana (UGA/mg micélio)	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	0,0772	---	não
nicolv	0,0531	sim	---
lgp05	0,0176	sim	não procede
lgp61	0,0446	sim	não procede
lgp73	0,0165	sim	não procede
SV24	0,0542	sim	não procede
Snu	0,0168	sim	não procede

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,032$ ).

**8.2) Parâmetros relativos ao micélio em meio MAC aos sete dias de fermentação.**

A) Comparação da atividade enzimática (UGA) pelo Teste de Tukey.

linhagem	média (UGA)				
pabfwn	4,27	a			
nicolv	3,88	a	b		
lgp05	2,04			c	d e
lgp61	3,03	a	b	c	
lgp73	0,55				f
SV24	2,76		b	c	d
Snu	0,85				e f

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

B) Comparação do peso seco (mg).

(vide análise 6.2.D)

C) Comparação da atividade enzimática/peso seco (UGA/mg micélio) pelo Teste de Tukey.

linhagem	média (UGA/mg micélio)				
pabfwn	0,0364	a			
nicolv	0,0355	a	b		
lgp05	0,0172			c	d e
lgp61	0,0250			c	
lgp73	0,0053				f
SV24	0,0241			c	d f
Snu	0,0071				

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

## 9) Tabela 10

## 9.1) Parâmetros extracelulares em meio MAL aos três dias de fermentação.

A) Comparação da atividade enzimática (UGA) pelo Método de Dunnett.

linhagem	linhagens controle		
	mediana (UGA)	pabfwn	nicolv
pabfwn	105,0	---	não
nicolv	147,5	não procede	---
lgp05	17,5	não procede	sim
lgp61	10,0	não procede	sim
lgp73	0,0	sim	sim
SV24	12,5	não	sim
Snu	37,5	não procede	sim

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,005$ ).

B) Comparação do teor de proteína total ( $\mu\text{g}$ ) pelo Método de Dunnett.

linhagem	linhagens controle		
	mediana ( $\mu\text{g}$ )	pabfwn	nicolv
pabfwn	250,0	---	não
nicolv	390,0	não	---
lgp05	62,5	sim	sim
lgp61	37,5	sim	sim
lgp73	0,0	sim	sim
SV24	65,0	sim	sim
Snu	95,0	sim	sim

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,011$ ).

## C) Comparação da atividade específica (UGA/mg proteína) pelo Método de Dunnett.

linhagem	mediana (UGA/mg proteína)	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	420,0	---	não
nicolv	359,0	não	---
lgp05	280,0	sim	não procede
lgp61	266,7	sim	não procede
lgp73	0,0	sim	não
SV24	192,3	sim	não procede
Snu	400,0	não procede	não procede

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,007$ ).

## D) Comparação do peso seco (mg) pelo Teste de Tukey.

linhagem	média (mg)					
pabfwn	65,43	a	b	c	d	e
nicolv	67,17	a	b	c	d	e
lgp05	67,60	a	b	c	d	
lgp61	68,70	a	b	c		
lgp73	49,83					f
SV24	72,57	a	b			
Snu	75,07	a				

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

**E) Comparação da atividade enzimática/peso seco (UGA/mg micélio) pelo Método de Dunnett.**

linhagem	mediana (UGA/mg micélio)	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	1,57	---	não
nicolv	2,12	não procede	---
lgp05	0,24	não procede	sim
lgp61	0,09	não procede	sim
lgp73	0,0	sim	sim
SV24	0,18	não	sim
Snu	0,47	não procede	sim

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,005$ ).

**9.2) Parâmetros extracelulares em meio MAL aos sete dias de fermentação.**

**A) Comparação da atividade enzimática (UGA) pelo Teste de Tukey.**

linhagem	média (UGA)					
pabfwn	425,50	a				
nicolv	395,33	a	b			
lgp05	103,42			c		
lgp61	65,50			c	d	e f
lgp73	15,25					e f
SV24	99,75			c	d	
Snu	76,17			c	d	e

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

**B) Comparação do teor de proteína total ( $\mu\text{g}$ ) pelo Método de Dunnett.**

linhagem	mediana ( $\mu\text{g}$ )	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	1140	---	não procede
nicolv	775	não procede	---
lgp05	150	sim	não procede
lgp61	125	sim	não procede
lgp73	25	sim	não
SV24	600	não procede	não procede
Snu	525	não	não procede

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,008$ ).

**C) Comparação da atividade específica (UGA/mg proteína).**

linhagem	mediana (UGA/mg prot.)
pabfwn	350,4
nicolv	507,7
lgp05	528,1
lgp61	517,0
lgp73	404,7
SV24	159,2
Snu	136,2

A diferença das medianas para os diversos grupos não é suficientemente grande de forma a excluir a possibilidade da mesma ser devida à variabilidade das amostras, portanto não há diferença significativa entre eles ( $P=0,063$ ).

**D) Comparação de médias de peso seco (mg).**

linhagem	média (mg)
pabfwn	62,9
nicolv	65,1
lgp05	68,0
lgp61	62,0
lgp73	71,8
SV24	69,5
Snu	65,2

A diferença entre as médias dos diversos grupos não é suficientemente grande de forma a excluir a possibilidade da mesma ser devida a variabilidade das amostras, portanto não há diferença significativa entre os mesmos ( $P=0,354$ )

**E) Comparação da atividade enzimática/peso seco (UGA/mg micélio).**

linhagem	mediana (UGA/mg micélio)	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	6,44	---	não procede
nicolv	5,77	não	---
lgp05	1,41	sim	não procede
lgp61	1,40	sim	não
lgp73	0,26	sim	sim
SV24	1,45	sim	não procede
Snu	1,16	sim	sim

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,008$ ).

**10) Tabela 11****10.1) Parâmetros intracelulares em meio MAL aos três dias de fermentação.****A) Comparação da atividade enzimática (UGA) .**

linhagem	linhagens controle		
	mediana (UGA)	pabfwn	nicolv
pabfwn	115,0	---	não procede
nicolv	40,0	não	---
lgp05	25,0	sim	não procede
lgp61	50,0	não procede	não procede
lgp73	10,0	sim	não
SV24	35,0	não procede	não procede
Snu	22,5	sim	não procede

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,006$ ).

**B) Comparação do teor de proteína total ( $\mu\text{g}$ ) pelo Teste de Tukey.**

linhagem	média ( $\mu\text{g}$ )						
pabfwn	1300,0	a	b	c			
nicolv	975,0	a	b	c	d	e	
lgp05	741,7	a	b	c	d	e	f
lgp61	1400,0	a					
lgp73	383,3						f
SV24	1200,0	a	b	c	d		
Snu	1308,3	a	b				

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

## C) Comparação da atividade específica (UGA/mg proteína) pelo teste de Tukey.

linhagem	média (UGA/mg prot.)					
pabfwn	78,69	a				
nicolv	44,72		b			
lgp05	33,49		b	c	d	
lgp61	32,30		b	c	d	e
lgp73	28,20			c	d	e f
SV24	33,79		b	c		
Snu	18,24					e f

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

## D) Comparação do peso seco (mg).

(vide análise 9.1.D)

## E) Comparação da atividade enzimática/peso seco (UGA/mg micélio) pelo Método de Dunnett.

linhagem	mediana (UGA/mg micélio)	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	1,63	---	não procede
nicolv	0,59	sim	---
lgp05	0,37	sim	não procede
lgp61	0,70	sim	não procede
lgp73	0,20	sim	não
SV24	0,49	sim	não procede
Snu	0,32	sim	não procede

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,005$ ).

**9.2) Parâmetros intracelulares em meio MAL aos sete dias de fermentação.****A) Comparação da atividade enzimática (UGA) pelo Método de Dunnett.**

linhagem	mediana (UGA)	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	39,75	---	não procede
nicolv	22,00	sim	---
lgp05	15,25	sim	não procede
lgp61	9,25	sim	não procede
lgp73	4,00	sim	não
SV24	9,00	sim	não procede
Snu	5,75	sim	não procede

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,007$ ).

**B) Comparação do teor de proteína total ( $\mu\text{g}$ ) pelo Teste de Tukey.**

linhagem	média ( $\mu\text{g}$ )					
pabfwn	1133,3	a	b			
nicolv	616,7			c	d	e f
lgp05	1358,3	a				
lgp61	700,0		b	c	d	e f
lgp73	866,7		b	c	d	
SV24	750,0		b	c	d	e
Snu	1050,0	a	b	c		

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

**C) Comparação da atividade específica (UGA/mg proteína) pelo Teste de Tukey.**

linhagem	média (UGA/mg prot.)				
pabfwn	36,12	a			
nicolv	27,77	a	b		
lgp05	11,16			c	d e
lgp61	15,48			c	
lgp73	3,96				e f
SV24	12,75			c	d
Snu	5,79				d e f

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

**D) Comparação do peso seco (mg).**

(vide análise 9.2.D)

**E) Comparação da atividade enzimática/peso seco (UGA/mg micélio) pelo Teste de Tukey.**

linhagem	média (UGA/mg micélio)				
pabfwn	0,651	a			
nicolv	0,258		b		
lgp05	0,220		b	c	
lgp61	0,170		b	c	d
lgp73	0,048				d e f
SV24	0,138		b	c	d e
Snu	0,094			c	d e f

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

**11) Tabela 12****11.1) Parâmetros relativos ao micélio em meio MAL aos três dias de fermentação.****A) Comparação da atividade enzimática (UGA) pelo Método de Dunnett.**

linhagem	mediana (UGA)	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	5,16	---	não procede
nicolv	2,73	não	---
lgp05	0,81	sim	sim
lgp61	1,39	sim	não procede
lgp73	0,25	sim	sim
SV24	1,21	sim	não
Snu	1,50	sim	não procede

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,008$ ).

**B) Comparação do peso seco (mg).**

(vide análise 9.1.D)

**C) Comparação da atividade enzimática/peso seco (UGA/mg micélio) pelo Método de Dunnett.**

linhagem	mediana (UGA/mg micélio)	linhagens controle	
		pabfwn	nicolv
pabfwn	0,0770	---	não procede
nicolv	0,0400	sim	---
lgp05	0,0110	sim	não
lgp61	0,0195	sim	não procede
lgp73	0,0051	sim	não procede
SV24	0,0171	sim	não procede
Snu	0,0189	sim	não procede

A diferença das medianas para os diversos grupos é maior do que a esperada ao acaso, portanto há diferença significativa entre eles ( $P=0,019$ ).

**11.2) Parâmetros relativos ao micélio em meio MAL aos sete dias de fermentação.**

**A) Comparação da atividade enzimática (UGA) pelo Teste de Tukey.**

linhagem	média (UGA)					
pabfwn	3,43	a				
nicolv	0,68			d	e	f
lgp05	1,50	b	c			
lgp61	1,37	b	c	d		
lgp73	1,07	b	c	d	e	
SV24	1,65	b				
Snu	0,89		c	d	e	f

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.

**B) Comparação do peso seco (mg).**

(vide análise 9.2.D)

**C) Comparação da atividade enzimática/peso seco (UGA/mg micélio) pelo Teste de Tukey.**

linhagem	média (UGA/mg micélio)					
pabfwn	0,054	a				
nicolv	0,010				e	f
lgp05	0,022	b	c			
lgp61	0,022	b	c	d		
lgp73	0,015	b	c	d	e	
SV24	0,024	b				
Snu	0,014		c	d	e	f

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente.