

PATRÍCIA GOMES CARDOSO

ORGANIZAÇÃO DO GENE DE PECTINA LIASE EM *Penicillium expansum* E  
OBTENÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE *Penicillium griseoroseum* COM  
ALTA PRODUÇÃO DE PECTINA LIASE

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
graduação em Microbiologia Agrícola,  
para obtenção do título de “Doctor  
Scientiae”

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2004

## RESUMO

CARDOSO, Patrícia Gomes, D.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2004.  
**Organização do gene de pectina liase em *Penicillium expansum* e obtenção de linhagens recombinantes de *Penicillium griseoroseum* com alta produção de pectina liase.** Orientadora: Elza Fernandes de Araújo. Conselheiras: Marisa Vieira de Queiroz, Virginia Maria Chaves Alves e Flávia Maria Lopes Passos.

A seqüência de nucleotídeos contendo o gene *ple1* que codifica pectina liase em *Penicillium expansum* foi clonada. Esta seqüência contém 874 nucleotídeos da região promotora, 1342 nucleotídeos da região codificadora e 469 nucleotídeos da região terminadora. A região codificadora do gene *ple1* é interrompida por dois íntrons, de 101 e 116 nucleotídeos, confirmados pela seqüência do cDNA. Na seqüência da região promotora de *ple1* foi observado *cis*-elementos envolvidos na regulação da expressão desse gene, como TATA box (TATATAA) na posição -91 do códon de início da tradução, sendo esta seqüência precedida por uma região rica em pirimidinas e CAAT box (CCAATT) a -568 do códon de início da tradução. A proteína PLE1, deduzida a partir da seqüência de nucleotídeos possui 374 resíduos de aminoácidos, com massa molecular estimada de 40,1 KDa e pI calculado de 9,46. Análise por hibridização do DNA total de *P. expansum* e *P. griseoroseum* com um fragmento de DNA de 2,1 Kb que corresponde ao gene *pe1A* de *A. niger*, indicou organização semelhante dos genes de PL no genoma destes fungos. A expressão do gene *ple1*, avaliada pela hibridização do RNA total com um fragmento de DNA que corresponde à região estrutural do gene *ple1* mostrou que o transcrito foi detectado durante todo tempo de cultivo em presença de pectina. No entanto, quando cultivado em presença de sacarose, o transcrito somente foi detectado em 12 e 24 horas de cultivo, com adição de extrato de levedura. A caracterização morfológica de *P. expansum* e *P. griseoroseum* mostrou diferenças nítidas tanto no diâmetro quanto na coloração do verso

das colônias destes fungos. Diferenças na organização da região subtelomérica dos cromossomos de *P. expansum* e *P. griseoroseum*, foram observadas quando o plasmídeo pTEL13 foi utilizado como sonda. A região ITS do rDNA de *P. expansum* tem 600 pb e de *P. griseoroseum* 594 pb. As linhagens transformantes obtidas com os plasmídeos pPlg1 e pNPG1, apresentaram aumentos na atividade de PL de no máximo 3 vezes. Análise por hibridização do DNA total dos transformantes indicou a ocorrência de integrações homólogas e heterólogas de pelo menos duas cópias do gene *plg1*. Foi construído um vetor de expressão, denominado pAN52-Plg1 que continha o gene *plg1* sob o controle do promotor forte constitutivo do gene (*gpdA*) de *A. nidulans*. A transformação da linhagem mutante PG63 utilizando este vetor e o pNPG1, resultou na obtenção de uma linhagem recombinante (105) com aumento de 58 vezes na atividade de PL, quando cultivada em presença de glicose como fonte de carbono. Seis linhagens recombinantes foram avaliadas por hibridização apresentando integração heteróloga de mais de uma cópia do gene *plg1* no genoma. Avaliação das proteínas extracelulares por eletroforese (SDS-PAGE) mostrou a presença de uma banda nítida e forte de aproximadamente 40 KDa presente no sobrenadante de cultivo da linhagem recombinante 105 que corresponde a PLG1. A atividade específica aparente de PL sintetizada por esta linhagem foi 44 e 27 vezes maior do que aquela obtida para linhagem mutante PG63 e de uma preparação comercial de pectinases “Citrus Clear”, respectivamente. O cultivo da linhagem recombinante 105 em meio contendo caldo de cana promoveu uma atividade de PL 132 vezes maior do que a atividade obtida pela linhagem PG63 cultivada nesta mesma fonte de carbono. A atividade de PL da linhagem recombinante 105, cultivada em diferentes volumes de meio, aumentou linearmente com o tempo. Pectina cítrica, quando utilizada como substrato, promoveu maior atividade de PL. A enzima mostrou ser estável em ampla faixa de pH e temperatura de armazenamento. Estes resultados mostram que a linhagem recombinante 105 é promissora para produção de PL em escala industrial, principalmente, para aplicação na indústria de sucos e vinhos, onde o emprego apenas da PL apresenta várias vantagens na qualidade do produto final.

## ABSTRACT

CARDOSO, Patrícia Gomes, D.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2004.  
**Organization of pectin lyase encoding gene from *Penicillium expansum* and isolation of recombinant strains of *Penicillium griseoroseum* with high pectin lyase production.** Adviser: Elza Fernandes de Araújo. Committee Members: Marisa Vieira de Queiroz, Virginia Maria Chaves Alves and Flávia Maria Lopes Passos.

The sequence of the pectin lyase-encoding gene *ple1*, from *Penicillium expansum*, was cloned. This sequence consists of 874 nucleotides of the promoter region, 1342 nucleotides of the coding region, and 469 nucleotides of the terminator region. The coding region of *ple1* is interrupted by two introns of 101 and 116 nucleotides, confirmed by cDNA sequencing. Two cis-elements, TATA box (TATATAA) and CAAT box (CCAATT), were found at the positions 91 and 568 upstream from the translation start code, respectively. The deduced amino acid (aa) sequence (374 aa) of PLE1 has an estimated molecular mass of 40.1 KDa and a calculated pI of 9.46. One putative N-glycosylation site was found at Asn<sup>112</sup>. Southern blot analysis of genomic DNA from *P. expansum* and *P. griseoroseum* with a 2.1 kb-DNA fragment of the gene *pelA* from *A. niger* indicated that this gene is similarly organized in the genomes of these fungi. The hybridization of total RNA with a fragment of the coding region of *ple1* showed that the transcript was detected during the whole of cultivation in a medium containing pectin. However, when the fungus was cultivated in the presence of sucrose with addition of yeast extract, the transcript was detected only at 12 and 24 hours of cultivation. The morphologic characterization of *P. expansum* and *P. griseoroseum* showed clear differences in the

diameter and in the coloration of the bottom of the colonies. Differences in the organization of the subtelomeric region of chromosomes of *P. expansum* and *P. griseoroseum*, were observed when the plasmid pTEL13 was used as a probe. The ITS region of the rDNA of *P. expansum* has 600 bp and that of *P. griseoroseum* 594 bp. The transformants obtained with the plasmids pPlg1 and pNPG1 presented increases in the activity of PL of at the least 3 times the active of the wild type. The hybridization profile of the genomic DNA of the transformants showed the occurrence of homologous and heterologous integrations of at least two additional copies of the gene *plg1* in the genome. It was not possible to define the exact number of copies and correlate it with PL activity. An expression vector was built, designated pAN52-Plg1 that contained the gene *plg1* under the control of the strong constitutive promoter *gpdA* of *A. nidulans*. The transformation of the mutant strains PG63 using this vector and the pNPG1 resulted in the isolation of a recombinant strain (105) with a PL activity 58 times higher than that of the wild type, when cultivated in glucose as the sole carbon source. Six recombinants were analysed by hybridization that presented heterologous integration of more than one copy of *plg1*. Evaluation of the extracellular proteins by electrophoresis (SDS-PAGE) showed the presence of a clear and strong band of approximately 40 KDa in the cultivation filtrate of the recombinant 105. This band corresponded to PLG1. The apparent specific activity of PL synthesized by this strain was 44 and 27 times higher than that obtained for the strain PG63 and for a commercial preparation of pectinolytic enzymes (Citrus Clear), respectively. The cultivation of the recombinant strain 105 in a medium containing sugar cane juice promoted a PL activity that was 132 times higher than that for the strain PG63 cultivated with the carbon source. PL activity of the recombinant strain 105, cultivated in different volumes of medium, increased linearly with time. Citric Pectin, when used as substrate, supported higher PL activity. The enzyme was stable in a wide range of pH and storage temperature.