

JOÃO BATISTA RIBEIRO

**OBTENÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE *Penicillium griseoroseum*
PARA PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE**

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
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R484o
2005

Ribeiro, João Batista, 1974-

Obtenção de linhagens recombinates de
Penicillium griseoroseum para produção de poligalacturo-
nase / João Batista Ribeiro. – Viçosa : UFV, 2005.
xii, 94f. : il. ; 29cm.

Orientador: Elza Fernandes de Araújo.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Pectinase. 2 *Penicillium griseoroseum* - Melhora-
mento. 3. Promotores (genética). 4. Inativação de genes.
5. Enzimas de fungos. 6. Microbiologia industrial.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.5662

JOÃO BATISTA RIBEIRO

**OBTENÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE *Penicillium griseoroseum* PARA
PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE**

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”

APROVADA: 09 de dezembro de 2005

Prof^a. Marisa Vieira de Queiroz
(Conselheira)

Prof^a. Flávia Maria Lopes Passos
(Conselheira)

Prof. Eustáquio Souza Dias

Prof^a. Rosane Freitas Schwan

Prof^a. Elza Fernandes de Araújo
(Orientadora)

A Deus

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade oferecida para realização deste curso.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

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

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

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

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pela dedicação dispensada aos alunos.

Aos professores Eustáquio Souza Dias e Rosane Freitas Schwan pela participação na banca de defesa de tese.

À professora Andréa Barros de Oliveira Ribon pelas sugestões e ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho e amigos Daniel e Janaína, pelo companheirismo e imprescindível ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, pelos momentos de convivência.

À Laura, Nilcéa e Dona Aparecida, por todo o empenho, profissionalismo e pela amizade.

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

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

À minha esposa Márcia e minha filha Maria Eduarda, pela compreensão nos momentos de ausência.

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

BIOGRAFIA

JOÃO BATISTA RIBEIRO, filho de João Raimundo Moreira e Geni Rosa de Souza, nasceu em 08 de junho de 1974, em Aldeia, município de Conselheiro Pena, MG.

Ingressou na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, em março de 1995, concluindo a graduação em Ciências Biológicas em março de 1999.

Em abril de 1999, iniciou o programa de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, concluindo-o em março de 2001.

Em abril de 2001, iniciou o programa de Doutorado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Em fevereiro de 2005, tornou-se docente da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde de Viçosa, em Viçosa, MG.

ÍNDICE

CONTEÚDO	PÁGINA
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	01
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 1	
CARACTERIZAÇÃO DE CIS-ELEMENTOS PRESENTES NOS GENES <i>pgg1</i> E <i>pgg2</i> , QUE CODIFICAM POLIGALACTURONASES E INATIVAÇÃO DO GENE <i>pgg2</i> DE <i>Penicillium griseoroseum</i> .	
1. INTRODUÇÃO	25
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1. Microrganismos e plasmídeos utilizados	28
2.2. Manutenção das culturas, preparo de inóculo e condições de cultivo	28
2.3. Isolamento de núcleos e obtenção de extratos nucleares brutos	29
2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS	30
2.5. Preparação dos fragmentos de DNA para os ensaios de ligação	30
2.6. Ensaios de ligação	30
2.7. Construção do vetor de inativação do gene <i>pgg2</i>	34
2.8. Transformação bacteriana e extração de DNA plasmidial	34
2.9. Obtenção de protoplastos de <i>P. griseoroseum</i> PG63	34
2.10. Transformação de protoplastos de <i>P. griseoroseum</i> PG63	34

2.11. Purificação monospórica dos transformantes	35
2.12. Estabilidade mitótica dos transformantes	35
2.13. Extração de DNA total e Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	35
2.14. Caracterização molecular das linhagens transformantes	35
2.15. Obtenção do sobrenadante da cultura e determinação da atividade de poligalacturonase	36
2.16. Avaliação do crescimento fúngico	36
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1 - Identificação de cis-elementos na região promotora do gene <i>pgg1</i> de <i>Penicillium griseoroseum</i> .	37
3.2 - Identificação de cis-elementos na região promotora do gene <i>pgg2</i> de <i>P. griseoroseum</i> .	39
3.3 - Inativação do gene <i>pgg2</i> e avaliação da atividade da PGII na atividade total de poligalacturonase em <i>Penicillium griseoroseum</i> .	46
3.3.1 - Construção do vetor de inativação pPG15 <i>pgg2</i> Δniafo	46
3.3.2 - Inativação do gene <i>pgg2</i> de <i>P. griseoroseum</i>	46
4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
CAPÍTULO 2	
OBTENÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE <i>Penicillium griseoroseum</i> COM ALTA PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE	
1 - INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1. Microrganismos e plasmídeos utilizados	62
2.2. Manutenção das culturas e obtenção do inóculo	62
2.3. Construção do vetor de expressão	63
2.4. Obtenção de protoplastos da linhagem de <i>P. griseoroseum</i> PG63	63
2.5. Transformação de protoplastos de <i>P. griseoroseum</i> PG63	63
2.6. Purificação monospórica dos transformantes	64
2.7. Estabilidade mitótica dos transformantes	64
2.8. Determinação da atividade de poligalacturonase no sobrenadante da cultura	64
2.9. Avaliação do crescimento fúngico	65
2.10. Transformação bacteriana e extração de DNA plasmidial	65
2.11. Efeito de diferentes concentrações de glicose e do tempo de cultivo na produção de PG pela linhagem recombinante 146 de <i>P. griseoroseum</i>	65
2.12. Efeito de diferentes temperaturas na atividade de PG da linhagem	

recombinante	65
2.13. Atividade e estabilidade da PG em diferentes temperaturas de armazenamento e valores de pH	65
2.14. Efeito do pH e da temperatura de armazenamento na atividade e estabilidade da PG	65
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1 - Obtenção de linhagens recombinantes de <i>P. griseoroseum</i> com alta produção de poligalacturonase	67
3.2 Produção de poligalacturonase pela linhagem recombinante 146 de <i>Penicillium griseoroseum</i>	74
3.3 - Caracterização parcial da poligalacturonase produzida pela linhagem recombinante 146 de <i>P. griseoroseum</i>	80
4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
CONCLUSÕES	93

RESUMO

RIBEIRO, João Batista, D.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2005.
OBTENÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE *Penicillium griseoroseum* PARA PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE. Orientadora: Elza Fernandes de Araújo. Conselheiras: Marisa Vieira de Queiroz e Flávia Maria Lopes Passos.

Análise de um fragmento de DNA de 170 pb da região promotora do gene *pgg2* contendo um possível CCAAT-box localizado a -270 pares de bases (pb) do códon de início da tradução, por meio de ensaios de migração retardada em gel, revelou a formação de complexos específicos deste fragmento de DNA com proteínas nucleares obtidas a partir de micélio cultivado em meio contendo pectina. A ligação de proteínas no elemento CCAAT foi confirmada quando a análise foi realizada utilizando um oligonucleotídeo fita dupla contendo essa seqüência. Substituição da seqüência original pela seqüência GTAGG diminuiu a formação de complexos específicos, comprovando o envolvimento do elemento CCAAT na regulação da expressão do gene *pgg2*. Um oligonucleotídeo de 23 pb contendo a seqüência CTACAGTG, similar à seqüência de um cis-elemento de resposta a AMPc encontrado em promotores de leveduras e mamíferos, também foi usado como sonda em ensaios de migração retardada em gel. Complexos de DNA-proteínas não foram detectados quando se utilizou extratos protéicos nucleares, preparados a partir de micélio cultivado em glicose e extrato de levedura, sugerindo que o elemento CTACAGTG não representa um sítio para a ligação de proteínas ativadoras. Foi construído um vetor para inativação do gene *pgg2* de *P. griseoroseum*, denominado pPG15pgg2 Δ niafo, o qual contém o gene *pgg2* interrompido por um fragmento de DNA de 4,0 Kb, correspondente ao gene *nia* de *Fusarium oxysporum*. A inativação do gene *pgg2*, demonstrou que a poligalacturonase codificada por este gene é responsável por 90 % da atividade total de PG de *P. griseoroseum*. Foi construído um vetor

para expressão do gene *pgg2* sob o controle do promotor constitutivo do gene *gpdA* de *Aspergillus nidulans*, o qual foi utilizado na transformação da linhagem PG63 de *P. griseoroseum*. Foram obtidas linhagens transformantes que, quando cultivadas na presença de glicose, sacarose ou caldo de cana, apresentaram aumento na atividade de PG de até 12 vezes em relação à linhagem PG63 cultivada em pectina e extrato de levedura. A linhagem recombinante 146 apresentou aumento na atividade de PG quando cultivada em meio contendo glicose (1%) por 48 a 96 horas, utilizando-se 10^6 ou 10^7 conídios/mL do meio de cultura. Embora tenha sido observado menor massa micelial seca, quando as linhagens recombinantes foram cultivadas em sacarose e caldo de cana, a atividade de PG foi de 90 % da determinada quando estas linhagens foram cultivadas em glicose. A poligalacturonase produzida pela linhagem recombinante 146 de *P. griseoroseum* apresentou alta atividade na faixa de pH de 3,5 a 5,0 e nas temperaturas de 30 a 60°C, sendo estável quando armazenada por pelo menos 5 semanas nas temperaturas de -20, 4 e 30°C. No entanto, apresentou baixa termoestabilidade, sofrendo desnaturação quando pré-incubada por 1 hora nas temperaturas de 40, 50 e 60°C. Os níveis enzimáticos relatados neste trabalho e as propriedades físico-químicas da PG II produzida pela linhagem recombinante 146 de *P. griseoroseum* demonstram a eficiência do sistema de expressão desenvolvido e que a PG II é uma enzima adequada para aplicação na indústria de processamento de sucos de frutas.

ABSTRACT

RIBEIRO, João Batista, D.S., Universidade Federal de Viçosa, december, 2005.
OBTENTION OF RECOMBINANT STRAINS FROM *Penicillium griseoroseum* FOR POLYGALACTURONASE PRODUCTION. Adviser: Elza Fernandes de Araújo.
Committee members: Marisa Vieira de Queiroz and Flávia Maria Lopes Passos.

Analysis of a 170 bp DNA fragment of the promoter region of the *pgg2* gene containing a putative CAAT box at - 270 bp from ATG code by electrophoretic mobility shift assay with nuclear extracts prepared from mycelia grown under pectin-containing medium revealed a high mobility complex that was subsequently confirmed when analysis was conducted employing a double-stranded oligonucleotide spanning the CCAAT motif. A substitution in the core sequence for GTAGG partially abolished formation of specific complexes, showing the involvement of the CCAAT box in the regulation of the polygalacturonase gene studied. A 23 bp synthetic double-stranded oligonucleotide containing a cis-element resembling the cAMP response element (CTACAGTG) observed in yeasts and mammals promoters was also used as probe in EMSA assays. Band shifts were not seen when nuclear extracts prepared from mycelia cultured on pectin and glucose-containing medium supplemented with yeast extract were used in the reactions. This result suggests that the CTACAGTG element tested is not a target site for regulatory activators. In order to inactivate the *P. griseoroseum pgg2* gene, a disruption vector, named pPG15pgg2 Δ niafo was constructed by inserting a 4 Kb *Hind*III DNA fragment, containing the *nia D* gene from *Fusarium oxysporum* in the coding region of *pgg2*. The disruption of *pgg2* resulted in transformant strains producing at most 12 % of PG activity of the host strain (PG63), indicating that this gene responds for almost 90% of PG total activity in *P. griseoroseum*. To overexpress extracellular polygalacturonase in *P. griseoroseum*, an expression cassette was constructed, designated pAN52-pgg2 that contained the *pgg2* gene

under the control of the strong constitutive promoter *gpdA* from *Aspergillus nidulans*. The transformation of the PG63 mutant strain using this vector and the selective plasmid (pNPG1) resulted in the isolation of a recombinant strain (146) that, when cultivated in glucose, sucrose or sugar cane juice as sole carbon source, produced a PG activity 12 times higher than that produced by the mutant strain cultivated in pectin and yeast extract. The PG produced by the recombinant strain possesses an optimum pH range from 3,5 to 5,0 and is inactivated at the extrem pHs 2,5 and 8,0. It was demonstrated that this enzyme acts efficiently hydrolysing polygalacturonic acid in a broad range of temperature (30 to 60 °C) with the optimal temperature ranging from 30 to 45 °C. In addition, storage of the recombinant strain culture supernatants at temperatures of - 20, 4, and 30 °C for five weeks did not affect enzyme activity. On the other hand, the enzyme exhibited low thermostability, being inactivated when pre-incubated for 1 hour at temperatures of 40, 50, and 60°C.

1 - INTRODUÇÃO GERAL

Os três principais polissacarídeos pécticos encontrados em paredes celulares primárias de vegetais superiores são a homogalacturonana, rhamnogalacturonana I e rhamnogalacturonana II. A homogalacturonana é uma cadeia linear de resíduos de ácido D-galacturônico em que alguns dos grupos carboxil são esterificados por grupamentos metil, a rhamnogalacturonana I é uma família de polissacarídeos que contêm um esqueleto principal do dissacarídeo $[-\rightarrow 4)-\alpha\text{-ácido-D-galacturônico-(1}\rightarrow 2)-\alpha\text{-L-ramnose-(1}\rightarrow]$ e as rhamnogalacturonana II são um grupo de polissacarídeos que contêm um esqueleto linear de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações $\alpha\text{-1}\rightarrow 4$ apresentando como ramificações uma cadeia não sacarídica e um octassacarídeo ligados ao carbono 2 de alguns dos resíduos de ácido galacturônico da cadeia principal e dois dissacarídeos estruturalmente diferentes ligados ao C-3 da cadeia principal. As pectinas presentes na parede celular de vegetais, normalmente estão ligadas a microfibrilas de celulose, conferindo rigidez à parede (Visser e Voragen, 1996; Ridley *et al.*, 2001).

Considerando a heterogeneidade estrutural das substâncias pécticas, sua degradação completa requer a ação de várias enzimas, denominadas em conjunto pectinases. Essas enzimas hidrolisam a pectina por diferentes mecanismos e são divididas em 2 classes gerais: pectinesterase e despolimerase. A pectinesterase desesterifica a pectina produzindo ácido poligalacturônico e metanol. As despolimerases clivam as ligações glicosídicas da cadeia D-galacturonana de seus substratos específicos, pectato ou pectina, por hidrólise (hidrolases) ou por β -eliminação (liases) e são ainda classificadas com base na posição em que atua, que pode ser aleatória (endo) ou terminal (exo), quebrando as ligações glicosídicas. Dentre as despolimerases, encontram-se a endopoligalacturonase (EC 3.2.1.15), exopoligalacturonase (EC 3.2.1.67), endopectato liase (EC 4.2.2.2), exopectato liase (EC 4.2.2.9) e a endopectina liase (EC 4.2.2.10). Outra enzima que atua na hidrólise da pectina é a rhamnogalacturonase, a qual quebra as ligações entre os resíduos de ácido galacturônico e ramnose das cadeias de rhamnogalacturonana I (Schols *et al.* 1990a).

Na indústria de alimentos, o complexo pectinolítico é utilizado na clarificação de sucos de frutas (Alanã *et al.*, 1989), no preparo de frutas e vegetais para estocagem, na manufatura de produtos hidrolisados da pectina, na cura do café, cacau e fumo (Ghildyal *et al.*, 1981) e na extração do óleo de sementes oleaginosas (Buenrostro e Lopes-Munguia, 1986). Na indústria têxtil, essas enzimas são empregadas no processo de maceração das fibras vegetais, que consiste na degradação da pectina da lamela média resultando na desintegração de tecidos devido à separação das células (Bailey e Pessa, 1990). As fibras celulósicas resultantes dessa maceração têm sido obtidas para a fabricação têxtil.

Dentre as pectinases mais usadas na clarificação de sucos encontram-se as pectina liases (PLs) e as poligalacturonases (PGs). Grassin e Fauquembergue (1996) afirmaram que a atividade de poligalacturonase é considerada chave nesse processo, pois a PG atua sobre o ácido péctico com grau de metilação abaixo de 60%, o qual é produzido por ação da pectina metil esterase sobre a pectina. A pectina liase, por outro lado atua sobre compostos pécticos com alto grau de metilação, portanto sua atuação não necessita da ação prévia de outras enzimas. Diversos estudos têm sido realizados no sentido de se caracterizar essas enzimas.

D'Ângelo (1998) relatou a purificação e caracterização parcial das poligalacturonases de *P. griseoroseum*, sendo observadas duas PGs de carácter básico (PG1 e PG2) e uma PG de carácter ácido (PG 3). As PGs 1 e 3 apresentaram pH ótimo de atuação de 3,5 e a PG 2 apresentou melhor atividade em pH 4,5. As temperaturas ótimas para atuação dessas enzimas foram 40°C para PG 1 e 45°C para as PGs 2 e 3. Em um trabalho similar, Miranda (1997) demonstrou que *P. expansum* também produz pelo menos três isoenzimas de poligalacturonases, que foram denominadas PG I, II e III. Essas enzimas foram parcialmente purificadas e caracterizadas, apresentando temperatura ótima de atividade de 50°C e pH ótimo igual a 5,0 (PGs II e III). O padrão de eluição dessas enzimas em cromatografia de troca iônica indicou que PG II e PG III são carregadas positivamente e PG I carregada negativamente. Poligalacturonases de outros organismos também foram purificadas e caracterizadas como, por exemplo, poligalacturonase de *Aspergillus japonicus* e poligalacturonases de *Aspergillus niger* (Kester e Visser, 1990; Bussink *et al.*, 1991a).

As poligalacturonases fúngicas, até hoje estudadas, são proteínas monoméricas apresentando entre 30.000 e 78.000 dáltons e contendo de 300 a 435 aminoácidos. Estudos enfocando a estrutura e o mecanismo de ação das poligalacturonases ainda são escassos, sendo a produzida por *Erwinia carotovora* a primeira poligalacturonase cuja estrutura foi elucidada. Foi demonstrado que essa enzima contém 10 voltas completas com conformação em folha β paralelas girando para a direita, uma α -hélice em uma volta adicional na extremidade N-terminal e uma volta incompleta na extremidade C-terminal. O alinhamento de 36 seqüências de poligalacturonases revelou quatro regiões conservadas: Asn²⁰¹-Thr²⁰²-

Asp²⁰³, Gly²²²-Asp²²³-Asp²²⁴, Gly²⁵⁰-His²⁵¹-Gly²⁵² e Arg²⁸⁰-Ile²⁸¹-Lys²⁸². Estas seqüências se dispõem antes ou nas voltas das fitas β . Este arranjo em agrupamento é uma clara indicação de conservação funcional e sugere fortemente que a região na superfície das fitas β 5 a 8 e as voltas adjacentes formam o sítio catalítico da enzima sendo indicados dois resíduos de aspartato como potenciais resíduos que compõem o sítio catalítico (Pickersgill *et al*, 1998).

A estrutura da poligalacturonase mais abundante de *A. niger* (PGII) também foi estabelecida por cristalografia e os resíduos dos aminoácidos catalíticos, identificados por mutagênese sítio direcionada. Esta enzima se dobra formando uma folha β - paralela com giro para a direita com 10 voltas completas, a qual é composta de 4 folhas β paralelas apresentando uma α -hélice muito pequena que ancora o centro hidrofóbico da enzima. As regiões em alça formam uma fenda no exterior da folha β . Mutagêneses sítio direcionadas dos resíduos Asp¹⁸⁰, Asp²⁰¹, Asp²⁰², His²²³, Arg²⁵⁶ e Lys²⁵⁸ que estão localizados nessa fenda, resultaram em drástica redução de atividade, demonstrando que estes resíduos são importantes para a ligação do substrato e ou para a catálise. Uma comparação do sítio ativo da endopoligalacturonase II com o de ramnosidase, que também é uma glicosil hidrolase da família 28, sugeriu que Asp¹⁸⁰ e Asp²⁰² ativam a molécula de água que promove o ataque nucleofílico, enquanto Asp²⁰¹ protona o oxigênio glicosídico da ligação a ser hidrolisada (van Santen *et al.*, 1999). Embora não se tenha um estudo similar e os aminoácidos catalíticos de poligalacturonases do gênero *Penicillium* não tenham sido identificados até o momento, é muito provável que esses aminoácidos sejam os mesmos que ocorrem na PGII de *A. niger*.

Atualmente, existem diversas estratégias utilizando organismos procariotos e eucariotos disponíveis para a produção de proteínas extracelulares. Dependendo da proteína a ser produzida e sua aplicação, uma ou outra estratégia pode ser escolhida. Devido à propriedade natural dos fungos filamentosos de degradar polímeros biológicos complexos, esses organismos são excelentes produtores de um grande espectro de enzimas extracelulares, tais como, amilases, proteases, celulasas, pectinases, catalases, lipases, fosfatases, glicose oxidase (van den Hombergh *et al.*, 1997) e xilanases (Bailey e Poutanen, 1989). Segundo van den Hombergh *et al.*, (1997) a utilização de fungos filamentosos para expressão de proteínas homólogas e heterólogas tem sido considerada muito atrativa, pois eles apresentam várias vantagens quando comparados com outros sistemas de expressão. Estas vantagens incluem a produção e secreção de grandes quantidades de proteínas; a expressão de proteínas eucarióticas que requerem modificações pós-traducionais como glicosilação e formação de pontes dissulfeto e ainda o fato de que vários processos de produção têm sido considerados seguros em diversos fungos (GRAS - "generally considered as safe"), possibilitando aplicações no setor

alimentício. Além disso, linhagens recombinantes estáveis podem ser obtidas, permitindo maior controle do processo.

Considerando a alta eficiência de fungos filamentosos como produtores de enzimas extracelulares, alguns trabalhos foram realizados para a seleção de isolados fúngicos produtores de pectinases (Baracat *et al.*, 1989; Alaña *et al.*, 1989; Sólis *et al.*, 1990; Lopes-Shikida, 1995). Dentre os isolados testados, destacaram-se espécies de *Penicillium*, pois, além de apresentarem excelente atividade pectinolítica, praticamente não apresentaram atividade de celulasas, que poderiam atuar enfraquecendo as fibras celulósicas e tal fato tornaria as preparações enzimáticas inadequadas à aplicação na indústria têxtil (Baracat *et al.*, 1989). Foi demonstrado ainda que, dentre todos os isolados testados, *P. expansum* e *P. griseoroseum* apresentaram as maiores atividades de poligalacturonase e pectina liase, respectivamente. Devido a estas características, estas espécies vêm sendo estudadas visando à aplicação industrial. Para avaliar o potencial dessas espécies de *Penicillium* para aplicação também na indústria alimentícia, diversos trabalhos foram realizados para verificar se estes fungos produziam micotoxinas. Estes trabalhos demonstraram que esses isolados não produzem patulina, citrinina nem ocratoxina nas condições de cultivo utilizadas para a produção de pectinases mostrando o seu potencial para o setor alimentício (Ferreira, 2000; Vivan, 2002 e Visôto, 2003).

Teixeira (2005) demonstrou que *P. griseoroseum* não produz proteases extracelulares e apresenta baixa atividade de pectinesterase, sendo essas características desejáveis em linhagens com potencial para aplicação na indústria de sucos de frutas porque a pectinesterase atua desesterificando a pectina promovendo a liberação de ésteres voláteis que interferem na qualidade organoléptica e estabilidade do produto final (Grassin e Fauquemberg, 1996).

A aplicação das enzimas pectinolíticas na indústria requer a obtenção de isolados com alta produção enzimática. Portanto, além dos estudos fisiológicos, é necessário o desenvolvimento de estudos genéticos que possibilitem o melhoramento das linhagens selecionadas (Fincham, 1989). Diversas estratégias podem ser empregadas no melhoramento genético de organismos, tais como: mutação e recombinação seguidas de seleção e manipulação de genes, como aumento do número de cópias do gene de interesse.

Leuchtenberger e Mayer (1991) relataram a obtenção de mutantes de *A. niger* superprodutores de pectinases utilizando nitrosoguanidina e luz ultravioleta como agentes mutagênicos, sendo observados aumentos de 2 a 3 vezes na atividade de endo e exo-PG, pectinesterase e pectina liase, quando comparados com a linhagem selvagem. Hadj-Taieb *et al.* (2002) obtiveram um mutante (CT1) completamente constitutivo em relação à síntese de pectinases após tratamento de conídios da linhagem selvagem de *Penicillium occitanis*

com NaNO₂. Estes autores observaram aumentos de 18 a 77 vezes na produção de diversas pectinases quando o fungo foi cultivado em pectina cítrica. Uma característica muito interessante do mutante CT1 é que ele superproduz apenas as enzimas do complexo pectinolítico, o que o torna importante não apenas como produtor dessas enzimas mas também para estudos de regulação da síntese de pectinases, pois nenhuma proteína específica envolvida na regulação dessas enzimas foi ainda identificada. Antier *et al.* (1993) obtiveram linhagens superprodutoras de pectinases usando 2-deoxi-D-glicose, um análogo tóxico da glicose, para isolar mutantes de *A. niger* menos sensível à repressão catabólica por glicose. Dois destes mutantes com atividade pectinolítica superior ao selvagem foram usados em cruzamento parassexual, sendo obtido um diplóide com produção de pectinases superior (127%) à das linhagens parentais (Loera *et al.*, 1999).

Fernandes-Salomão *et al.* (1996) obtiveram mutantes de *P. expansum* com aumento de até duas vezes na produção de pectina liase e poligalacturonase, utilizando nitrosoguanidina e luz ultravioleta como agentes mutagênicos. Visando ao melhoramento da produção de pectinases via processo parassexual, foram isoladas diversas linhagens mutantes auxotróficas e morfológicas de *P. expansum* (Lana, 1999) e *P. griseoroseum* (Brito, 1998). Estas linhagens mutantes foram caracterizadas quanto à produção de pectinases em meio sólido contendo pectina e os mutantes com atividade pectinolítica igual ou superior ao isolado selvagem foram selecionados para uso em cruzamentos para obtenção de linhagens diplóides e recombinantes com aumento na produção dessas enzimas. Varavallo (2002) relatou a obtenção de dezenas de linhagens recombinantes por meio de fusão de protoplastos intra e interespecífica de *P. expansum* e *P. griseoroseum*, obtendo recombinantes com até três vezes a produção de PL e 1,2 vezes a de PG em relação aos isolados selvagens.

Outra estratégia que vem sendo usada no melhoramento de espécies de *Penicillium* para a produção de pectinases é a manipulação de genes e uma etapa fundamental deste processo é o isolamento e caracterização desses genes. Atualmente, muitos genes de endo e exo-poligalacturonases, bem como de outras pectinases de dezenas de espécies, foram clonados. Dias (1997) construiu um banco genômico e isolou um dos genes que codifica poligalacturonase em *P. expansum*. Utilizando este mesmo banco genômico, Cardoso (2000) isolou dois genes que codificam pectina liase e Ribeiro (2001) realizou o isolamento de um gene que codifica PG neste fungo. Um banco genômico de *P. griseoroseum* também foi construído por Ribon *et al.* (1999), sendo realizado o isolamento de dois genes que codificam pectina liase (Bazzolli, 2003) e o isolamento de dois genes que codificam PGs neste fungo (Ribon *et al.*, 1999 e 2002). Também dois genes de PG de *Penicillium olsonii* foram isolados e caracterizados (Wagner *et al.*, 2000). Estes autores realizaram a inativação de todos os genes de PG no genoma deste fungo, para

avaliar a contribuição de cada enzima na atividade total, demonstrando uma predominância de atividade de PG acídica em relação à atividade de PG com ponto isoelétrico superior a 7.

Para aplicação da estratégia de melhoramento por meio da manipulação de genes, é fundamental conhecer a organização e o controle da expressão do gene que codifica a enzima de interesse e, em caso de famílias multigênicas, é interessante também uma caracterização detalhada das enzimas, considerando que elas podem apresentar diferenças em relação à especificidade pelo substrato, velocidade de reação e pH ótimo de atuação, como demonstrado para poligalacturonases de *A. niger* (Benen *et al.*, 1999). Tal conhecimento permite direcionar a escolha do gene para uso na transformação, visando obter transformantes com alto número de cópias desse gene no genoma e aumento da produção da enzima. Para que o processo de produção de enzima seja viável, é necessário que o gene a ser usado na transformação seja eficientemente expresso, possibilitando a produção de altos níveis da enzima, preferencialmente com utilização de substrato de menor custo, não requerendo indução. Ribon *et al.* (2002) demonstrou que dois genes que codificam poligalacturonases em *P. griseoroseum* são transcricionalmente regulados e que o gene *pgg1* se expressa apenas a partir de 72 h de crescimento, enquanto *pgg2* apresenta expressão em todos os tempos estudados. Transcritos do gene *pgg1* foram detectados apenas na presença de pectina, independente da adição de extrato de levedura. O gene *pgg2* foi expresso na presença de pectina ou sacarose como fonte de carbono, sendo sua expressão reprimida por glicose, na ausência de extrato de levedura.

A estratégia de aumento do número de cópias de genes de interesse tem sido utilizada com êxito para aumento da produção de enzimas em diversos fungos. Kubicek-Pranz *et al.* (1991) obtiveram transformantes com maior atividade celulolítica em relação à linhagem selvagem, por meio dessa estratégia usando o gene de celobiohidrolase em *Trichoderma reesei*. Someren *et al.* (1991) relataram a obtenção de transformantes de *A. niger* com múltiplas cópias do gene *pelA* com superprodução da enzima pectina liase, em meio contendo pectina como única fonte de carbono. Esse gene foi também expresso em transformantes de *A. nidulans*, mesmo na ausência de pectina no meio de cultura e alta concentração de glicose. Bussink *et al.* (1991b) demonstraram que é possível a expressão heteróloga do gene *pgall* de *A. niger* em *A. tubigenensis* produzindo altos níveis de poligalacturonase. Também foram obtidos transformantes de *A. niger* com aumentos de dez vezes na produção de poligalacturonase, quando o gene homólogo *pgall* foi utilizado na transformação (Bussink *et al.*, 1992) e Ribeiro (2001) relatou a obtenção de linhagens transformantes de *P. expansum* com aumentos de quase duas vezes na atividade de poligalacturonase.

Todavia, o aumento na atividade enzimática em transformantes contendo alto número de cópias de um gene nem sempre acontece. Ribeiro (2001) relatou a obtenção e

análise de mais de 200 transformantes com múltiplas cópias do gene *pepg1* de *P. expansum* sendo observado que a maioria dos transformantes apresentou atividade da enzima igual à do isolado selvagem e um resultado similar a esse foi relatado por Cardoso (2004) para transformantes de *P. griseoroseum* em relação à produção de pectina liase, onde 1500 linhagens transformantes foram avaliadas. Estes resultados são devidos aos mecanismos envolvidos na regulação destes genes em *P. expansum* e *P. griseoroseum*.

O fungo filamentososo mais estudado quanto à produção de poligalacturonases é o fungo saprofítico *A. niger*. Kester e Visser (1990) relataram a purificação e caracterização de várias poligalacturonases (PG) a partir de uma preparação comercial obtidas de culturas desse fungo, sendo postulado a ocorrência de uma família multigênica, codificando essas enzimas nesse organismo. Esses autores verificaram que PG II era a enzima mais abundante na preparação, apresentando atividade específica superior às demais isoformas. Com base na seqüência parcial de aminoácidos de PG II, uma mistura de oligonucleotídeos foi preparada e utilizada como sonda para o isolamento do gene correspondente a partir de uma biblioteca genômica de *A. niger* (Bussink *et al*, 1990).

Em um trabalho posterior, Bussink *et al* (1992) utilizaram uma linhagem transformante de *A. niger* contendo múltiplas cópias do gene *pgall* para estudar a regulação de sua expressão. As linhagens selvagem e transformante foram cultivadas em meio contendo pectina e polpa de beterraba ou em glicose e o RNA total extraído do micélio para análise por hibridização. Neste trabalho foi detectado aumento dos transcritos do gene *pgall* na linhagem transformante em relação ao isolado selvagem, no entanto, quando glicose foi usada como única fonte de carbono a detecção do transcrito no transformante foi ainda menor do que na linhagem selvagem quando cultivada em pectina e polpa de beterraba. Este trabalho levou à conclusão de que o gene *pgall* é fortemente regulado no nível de transcrição. Foi também demonstrado que este gene apresenta o mesmo padrão de expressão em outras espécies de *Aspergillus*. Linhagens transformantes (múltiplas cópias de *pgall*) de *A. nidulans* produziram PGII mesmo na presença de glicose. Para estudar a região 5' deste gene, Bussink *et al* (1992) construíram diversos plasmídeos com modificações desta região e os utilizaram na transformação de *A. niger*. Os efeitos dessas modificações foram testados em transformantes superprodutores da enzima com padrão similar de integração sendo observado uma região de 300 pares de bases antes do códon de início da tradução suficiente para ocorrer transcrição e que uma seqüência de nucleotídeos compreendida na posição -799 a -576 em relação ao ATG do gene *pgall* contém um sítio que é essencial para a regulação da expressão do gene e é funcional a várias distâncias da unidade de transcrição. Ao mesmo tempo em que esta seqüência é dispensável para a transcrição em nível basal, ela aumenta a expressão do gene sob condições fisiológicas apropriadas. Isso indica a presença de um sítio de controle positivo e

por analogia com outros genes eucarióticos, os autores levantaram a hipótese que este seja um sítio para a ligação de uma proteína ativadora. Além disso, foram observadas evidências favoráveis à existência de sítio(s) para a ligação de proteínas repressoras na região -300 a -529 em relação ao códon ATG.

O segundo gene que codifica PG em *A. niger* (*pgal*) foi isolado usando a mesma estratégia utilizada no isolamento do gene *pgall*. A enzima PGI é responsável pela segunda atividade mais abundante na preparação de enzima industrial (Bussink, *et al* 1991a). O terceiro gene que codifica PG em *A. niger* foi designado *pgaC*. Este gene foi isolado por triagem da biblioteca genômica usando como sonda os genes *pgall* e *pgal* sob condições de baixo rigor. O sequenciamento do gene *pgaC* revelou uma região codificadora com três íntrons. O gene *pgaC* codifica uma possível pré-pro-proteína com 383 aminoácidos com massa molecular estimada em 61 kDa por SDS/PAGE, a qual é clivada após um par de aminoácidos básicos e apresenta aproximadamente 60% de similaridade de seqüência às outras PGs após o processamento. A seqüência de aminoácido N-amino terminal das PGs mostram inserções ou deleções de aminoácidos, características que também são observadas em PGs de fungos fitopatogênicos. Nas regiões reguladoras 5' dos genes de PG foi encontrada uma seqüência de 10 nucleotídeos conservada, contendo uma seqüência CCAAT, a qual provavelmente representa um sítio de ligação para proteínas regulatórias, uma vez que apresenta alta similaridade com sítio de ativação CYC1 de levedura reconhecido pelo complexo de ativação HAP2/3/4. Foi observado que a atividade enzimática nos filtrados obtidos com o cultivo de transformantes produtores de PGC, foi muito menor do que nos filtrados contendo a mesma quantidade de PG1, indicando que estas poligalacturonases têm propriedades diferentes (Bussink *et al*, 1992).

Parenicova *et al* (1998) relataram o isolamento e caracterização de um quarto membro da família multigênica que codifica poligalacturonase em *A. niger* (*pgaE*). Este gene consiste de 1293 pares de bases e é interrompido por três íntrons pequenos. A seqüência da proteína deduzida contém 378 resíduos de aminoácido incluindo 39 aminoácidos N-terminal do prepropeptídeo. A massa molecular e pI calculados da proteína processada são 35.584 dáltons e 3,6, respectivamente.

Waggoner e Dimond (1955) realizaram um trabalho onde foi demonstrada a síntese constitutiva de pectinesterase e síntese induzida de PG em *Fusarium oxysporum*. Ambas as enzimas foram produzidas pelo fungo cultivado em pectina, no entanto, em presença de pectina e glicose (0,05 M) apenas atividade de pectina esterase foi detectada. Estes dados, entretanto, contrastaram com os obtidos por outros autores onde se verificou a síntese induzida de ambas enzimas em *P. chrysogenum* e síntese constitutiva de PG e síntese induzida de pectina esterase em *Botrytis cinerea* e *A. niger* (Gäumam e Böhni, 1947, Phaff, 1947). A repressão da síntese de PG em *Fusarium oxysporum* foi verificada também na

presença de sorbitol 0,06 M, 2-deoxi *D*-glicose 0,006 M e ácido monogalacturônico 0,05 M (Suresh e Dimond, 1968). Segundo os autores, esse dado mostra que quando o indutor é uma fonte de carbono prontamente metabolizável, às vezes, ele pode agir também como um repressor. Este fenômeno já foi observado em outros fungos filamentosos e foi denominado auto-repressão catabólica e é particularmente importante na regulação de enzimas extracelulares que degradam substratos complexos em organismos expostos a ambientes variáveis (Collmer, 1986).

Spalding *et al.* (1973) relataram a repressão da síntese de PG em *P. expansum* cultivado em meio contendo pectina/polipectato (0,5%) adicionado dos seguintes açúcares: arabinose, manose, galactose, glicose, sacarose, rafinose, ácido galacturônico e ácido glutâmico, todos na concentração de 0,1 M e rafinose (0,03 M). Em estudos com essa mesma espécie, Piccoli-Valle *et al.* (1995) observaram que em culturas com concentrações de 0,3% de sacarose houve uma repressão parcial da síntese de PG quando o açúcar era adicionado 6 ou 12 horas após o início do cultivo. No entanto, repressão total foi observada quando sacarose era adicionada desde o início do cultivo.

Penicillium frequentans foi avaliado quanto a produção de pectinases em diversos substratos, sendo observado maiores níveis de atividade nas culturas suplementadas com pectina, ácido poligalacturônico e ácido monogalacturônico, nesta ordem. A repressão catabólica foi observada pela adição de glicose, em concentração igual ou superior a 0,8 % ao meio de cultivo já contendo 0,8 % de pectina (Siéssere, 1991).

Segundo Freitas (1991) e Geöcze (1994), *P. expansum* apresentou produção de PG em todos os substratos pécticos testados (pectina, ácido poligalacturônico e bagaço de laranja) com exceção da fibra de rami. Contudo, quando o fungo foi cultivado em meio contendo pectina e sacarose, praticamente não se detectou diminuição da atividade da enzima. Não foi detectada nenhuma atividade de PG em sobrenadantes do fungo cultivado em glicose, xilose, citrato, acetato e celulose, apesar de a produção de massa micelial ter sido similar ou superior à observada quando o fungo foi cultivado em substratos pécticos. Um efeito inibitório de extrato de levedura sobre a atividade de PG em *P. expansum* foi evidenciado por Geöcze *et al.* (1995). Em *P. griseoroseum* verificou-se uma atividade mais elevada de PG em pectina 0,5 % e o fenômeno de repressão foi observado na presença de pectina combinada com sacarose ou glicose (Soares-Ramos, 1996).

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* apresentou atividade de PG em meios de cultivo contendo extrato de parede celular de malva ou pectina ou mesmo na presença de glicose como única fonte de carbono, não apresentando distinção nos níveis enzimáticos produzidos nos diferentes substratos (Shih *et al.*, 2000). Similarmente, em *Botrytis cinerea* foi verificada atividade de duas PGs mesmo quando o fungo foi cultivado em presença de glicose como única fonte de carbono (Johnston e Williamson, 1992). Riou *et al.* (1992)

relataram a ocorrência de 3 endoPGs induzidas, cuja síntese não foi verificada quando o fungo foi cultivado em glicose, e 2 exo PGs constitutivas, as quais foram produzidas em meios contendo pectina cítrica, pectina de maçã, poligalacturonato de sódio, carboximetilcelulose e glicose, não estando sujeitas à repressão por glicose. O fenômeno de repressão catabólica sobre a síntese de exo PGs foi também verificado em *Aspergillus awamori* por Blandino *et al.*, (2002) por análise da atividade enzimática em sobrenadantes de culturas cultivadas em glicose. No entanto, a síntese de endo PG não foi reprimida por esse açúcar.

Ribon *et al.* (2002) avaliou o efeito de diferentes fontes de carbono na expressão dos genes que codificam PG em *P. griseoroseum* por hibridização e RT-PCR. Transcritos do gene *pgg1* foram detectados apenas quando o fungo foi cultivado na presença de pectina, independente da adição de extrato de levedura. Por outro lado, transcritos do gene *pgg2* foi detectado em micélio cultivado na presença de pectina e sacarose, mas não na presença de glicose. Adição de extrato de levedura ao meio de cultura, na presença de glicose, resultou em ligeira expressão deste gene.

Análise da região promotora dos genes *pgg1* e *pgg2* que codificam PG em *P. griseoroseum* revelou a presença de possíveis sítios de ligação para a proteína CREA no gene *pgg2* (Ribon, 2001). Esta proteína se caracteriza por apresentar domínios dedos de zinco e desempenha um papel central no fenômeno de repressão catabólica, tendo sido identificada em várias espécies de *Aspergillus* (Scazzocchio *et al.*, 1995, Mathieu *et al.*, 2005). Para verificar a funcionalidade desses possíveis cis-elementos, um fragmento de DNA contendo esta região foi usado em ensaios de ligação com extrato nuclear bruto de micélio cultivado em sacarose acrescido ou não de extrato de levedura ou em glicose, sendo observado modificação da mobilidade do fragmento de DNA de 335 pb (Ribon, 2001).

Reymond-Cotton *et al.* (1996) relataram um trabalho com *Sclerotinia sclerotiorum* em que se verificou a presença de possíveis sítios de ligação da proteína CREA no promotor do gene *pg1*, cujos transcritos não foram detectados quando o fungo foi cultivado em glicose ou em poligalacturonato como fontes de carbono. No entanto, transcritos desse gene foram observados quando *S. sclerotiorum* foi cultivado em presença de tecidos do hospedeiro. Estes autores demonstraram, com experimentos de ligação DNA-proteína, que proteínas presentes nos extratos nucleares preparados de micélio cultivado em glicose ou poligalacturonato interagem com diferentes regiões do promotor. Em seguida, foi feito um ensaio de ligação com fragmentos de DNA contendo a seqüência consenso 5'-SYGGRG-3' com uma proteína de fusão GST-CREA de *Aspergillus nidulans*, sendo verificado a formação de vários complexos proteína-DNA, levando os autores a sugerir que uma proteína homóloga à CREA de *A. nidulans* poderia estar envolvida na regulação do gene *pg1* de *S. sclerotiorum*.

Além de serem regulados por fonte de carbono, os genes que codificam poligalacturonases em fungos filamentosos podem ser regulados pelo pH do ambiente. Kojima *et al.* (1999) relataram a ocorrência de variação nos perfis de atividade de poligalacturonases em sobrenadantes de culturas de *Aspergillus kawachii* obtidas em diferentes pHs. Cromatografia de troca iônica revelou que a composição de PG nos diferentes sobrenadantes era diferente, predominando as PGs I e II na cultura de pH 2 e PG-B na cultura de pH 5. Os autores sugeriram que a síntese de PGI e PGII pode ser induzida por condições ácidas e que um sistema de expressão regulado por pH deve estar envolvido na produção de PG nesse fungo. Cotton *et al.* (2003) observaram que o pH do ambiente regula a expressão dos genes de *S. sclerotiorum*, sendo verificada a expressão de *pg1*, *pg2* e *pg3*, por hibridização, apenas quando o fungo foi cultivado na faixa de pH ácida.

Em estudos com *A. niger* NCIM 548, Panda *et al.* (2004) relataram que a síntese de PG é drasticamente reduzida quando o fungo é cultivado em meio contendo pectina acrescido de glicose em concentrações superiores a 5 g/L do meio de cultura. Tendo em vista a alta complexidade da regulação da expressão dos genes pectinolíticos em fungos filamentosos, mesmo que se obtenha transformantes superprodutores dessas enzimas por aumento do número de cópias dos genes correspondentes, a ocorrência de repressão catabólica e principalmente o requerimento de indução da expressão do gene, constituem-se em limitações do processo de produção enzimática em escala industrial, devido ao alto custo deste substrato na forma pura. Ainda que sejam encontrados genes que codificam poligalacturonases com expressão constitutiva em alguns fungos filamentosos (Phaff, 1947 e Cotton *et al.*, 2003), a maioria dos genes que codificam essas enzimas, além de requererem indução, sofrem repressão catabólica por uma série de açúcares, como é o caso de *P. expansum* quando cultivado na presença de pectina e dos açúcares glicose, galactose, arabinose, manose, sacarose, rafinose e ácido galacturônico (Spalding, 1973, Piccoli-Valle *et al.*, 1995). Além disso, todos os genes de PG, que apresentam expressão constitutiva isolados até o momento, estão sob o controle de promotores fracos, não permitindo elevados níveis de expressão da enzima. Ribon *et al.* (1999 e 2002) relatou o isolamento e caracterização de 2 genes que codificam PG em *P. griseoroseum*, demonstrando que o gene *pgg1* se expressa apenas em pectina a partir de 72 horas de crescimento e que *pgg2* apresenta expressão em todos os tempos estudados a partir de 24 horas, tanto em pectina como em sacarose e extrato de levedura.

O estudo da regulação dos genes que codificam PG e outras pectinases, isolados até o momento, em *P. expansum* e *P. griseoroseum* mostrou que a expressão desses genes requer indução pela pectina. No entanto, este requerimento pode ser eliminado substituindo-se o promotor original do gene de interesse por um promotor forte e constitutivo. Essa

estratégia apresenta, além da vantagem de aumentar a expressão da enzima de interesse, a possibilidade de reprimir a síntese da maioria das outras enzimas, uma vez que apenas aquela de interesse se encontra sob o controle de um promotor transcricionalmente ativo numa condição específica, como por exemplo, a presença de glicose no meio de cultura. Isso é particularmente interessante, na produção de proteínas que serão empregadas sem purificação prévia. O promotor do gene de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpdA*) de *Aspergillus nidulans* é um bom exemplo de promotor forte e constitutivo e tem sido empregado na expressão de proteínas homólogas e ou heterólogas em diversas espécies de *Aspergillus* (Van Gorcom *et al.*, 1986; Punt *et al.*, 1987), *Penicillium* (Kolar *et al.*, 1988; Lopes *et al.*, 2004; Cardoso, 2004), *Trichoderma* (Penttilä *et al.*, 1987), entre outros fungos.

Segundo Devchand e Gwynne (1991), em alguns casos, promotores induzidos são preferidos, uma vez que a superprodução de uma proteína recombinante pode comprometer o crescimento ou ser tóxica para o hospedeiro. Nesses casos, é desejável separar o crescimento da produção. Na presença de glicose ocorre o crescimento e acúmulo de massa micelial, sendo a expressão do gene de interesse reprimida. Por outro lado, quando a glicose acaba, o indutor apropriado pode ser adicionado possibilitando a expressão do gene. Um exemplo muito interessante disso é a produção de glicoamilase por *Aspergillus niger*. A produção dessa enzima é favorecida em condições limitantes de oxigênio, mas esta limitação é extremamente danosa para o crescimento fúngico. Nesse caso, a síntese e secreção da enzima ocorre após o término do crescimento, não estando associada ao mesmo (Wongwicharn *et al.*, 1999). Por outro lado, Cardoso (2004) demonstrou eficiente expressão do gene que codifica pectina liase em *P. griseoroseum* sob o controle do promotor *gpdA* de *Aspergillus nidulans* em glicose como fonte de carbono sem nenhum prejuízo no crescimento da linhagem superprodutora.

A estratégia de substituir o promotor original por um que seja mais eficientemente expresso tem mostrado bons resultados em vários fungos filamentosos. Margolles-Clark *et al.* (1996) construíram um vetor de expressão colocando a região codificadora de um gene de endoquitinase de *Trichoderma harzianum*, sob o controle do promotor de celulase (*cbh1*) de *T. reesei*, obtendo aumento de 10 vezes na atividade de quitinase na maioria dos transformantes analisados. Haran *et al.* (1993) obtiveram sucesso na transformação de *T. harzianum* com o gene de quitinase de *Serratia marcescens* sob o controle do promotor constitutivo 35 S. Foi também descrita a clonagem do cDNA de um gene de pectina metil esterase de *A. aculeatus* em um vetor de expressão de *Aspergillus* e usado na transformação de *A. oryzae* para a expressão heteróloga, purificação e caracterização da enzima. A pectina metil esterase I catalisou a remoção 75-85% dos grupos metil em pectina altamente metilada, e quando adicionada à pectina juntamente com poligalacturonases, uma rápida despolimerização foi observada (Christgau *et al.*, 1996).

Outro requisito indispensável quando se deseja obter linhagens superprodutoras de enzima por aumento do número de cópias do gene correspondente é o estabelecimento de um sistema de transformação de alta eficiência, possibilitando que um grande número de transformantes sejam obtidos. Dentre as técnicas usadas na transformação de protoplastos de fungos, a que utiliza o polietilenoglicol é um método amplamente utilizado para transformação de muitos gêneros de fungos filamentosos, exemplificado por *Aspergillus* (Ballance e Turner, 1985; Varadarajalu e Punekar, 2005), *Penicillium* (Queiroz *et al.*, 1998, Dias, *et al.*, 1999, Pereira *et al.*, 2004) e *Trichoderma* (Herrera-Estrela *et al.*, 1990). Além desse, outros métodos têm sido empregados na transformação de diversos fungos, como por exemplo, a utilização de cloreto de lítio na transformação de esporos intactos (Dhawale *et al.*, 1984), eletroporação de conídios germinados (Dantas-Barbosa, *et al.*, 1998) e o bombardeamento de partículas (biolística ou biobalística), envolvendo células fúngicas intactas (Klein *et al.*, 1992), a qual é tecnicamente simples e pode ser usada para transformar qualquer espécie de fungo, incluindo aquelas espécies que dificilmente seriam transformadas por métodos convencionais. Outra técnica é a transformação mediada por *Agrobacterium*, que vem sendo usada para transformar diversos fungos, como por exemplo, *Rhizopus oryzae* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Michielse e Hooykaas, 2005; Weld *et al.*, 2005).

Para a seleção das células transformadas, três diferentes tipos de marcadores podem ser utilizados: marcadores de seleção dominantes, genes que codificam um tRNA supressor e marcadores auxotróficos. A maioria dos marcadores de seleção dominantes baseiam-se na resistência a drogas, sendo amplamente aplicados em diferentes espécies de fungos como, por exemplo, resistência ao benomil (May *et al.*, 1985) e resistência à higromicina B (Queener *et al.*, 1985, Lima *et al.*, 2003). Inicialmente, o principal método de seleção dos transformantes foi a conversão de mutantes auxotróficos em linhagens prototróficas (Fincham, 1989). Obviamente, um pré-requisito para o uso deste método de seleção é a presença de um mutante apropriado. Mutações nos genes que codificam enzimas para a biossíntese de uridina e para utilização de nitrato são consideradas de grande importância para o desenvolvimento de sistemas de transferência de genes, principalmente em espécies que não são geneticamente bem caracterizadas (Unkles *et al.*, 1989). Além da relativa facilidade no isolamento de mutantes *niaD* em vários gêneros de fungos filamentosos, muitos genes de nitrato redutase já foram clonados e caracterizados, o que torna possível o estabelecimento de sistemas de transformação para as espécies de interesse (Diolez *et al.*, 1993; Banks *et al.*, 1993; Avila *et al.*, 1995; Tudzynski *et al.*, 1996; Haas *et al.*, 1996; Cutler e Cooley, 1998; Torres, 2001). Pereira *et al.* (2004) relataram a obtenção de um mutante de *P. griseoroseum* contendo uma deleção de 122 pb no gene

niaD e o isolamento do gene que codifica nitrato redutase, os quais foram utilizados para estabelecer um sistema de transformação homóloga para este fungo.

Uma vez obtidas linhagens com alta produção de PG, outro aspecto que deve ser levado em consideração é que a produção de enzimas extracelulares por fungos filamentosos é influenciada pelas condições fisiológicas da cultura e por fatores ambientais, como temperatura, pH, aeração do meio, concentração e idade do inóculo e concentração de substratos indutores e de repressores (Eveleigh e Montenecourt, 1979). Segundo Pedersen *et al.* (1993) a morfologia de crescimento e a concentração da massa micelial dos fungos filamentosos são também importantes parâmetros que devem ser considerados quando se trata de produção enzimática por fungos filamentosos. Tendo em vista tais informações, Piccoli-Vale *et al.* (2003) estudou a cinética de crescimento e produção de pectina liase por *P. griseoroseum* em fermentador aerado e com agitação mecânica. Foi observado que diferentes condições de agitação e aeração não influenciaram no aspecto macroscópico do desenvolvimento deste fungo, que cresceu formando de esferas em todos os tratamentos, cultivado em fermentador de 20 L, com volume de trabalho de 10 L. No entanto, a maior produção de pectina liase foi observada na velocidade de agitação constante de 200 RPM e com aeração inicial de 5 L/min e final de 10 L/min.

Foi analisada também a influência da escala de cultivo na obtenção de pectina liase pelo cultivo de *P. griseoroseum* em biorreator de vidro jaquetado de 1 L, com volume de trabalho de 600 mL, montado sobre agitador magnético sem aeração forçada e fermentadores de 2 e 20 L, com volume de trabalho de 1 e 10 L, respectivamente, aerados e agitados mecanicamente, com pás tipo turbina Rushton (Piccoli-Vale *et al.*, 2003). Foi observado que não houve diferença marcante entre a atividade de pectina liase do fungo cultivado em diferentes escalas e tipos de biorreatores, porém, o crescimento celular foi maior nos biorreatores de vidro jaquetado, com volume de trabalho de 600 mL. Cardoso (2004) também avaliou a produção de PL na linhagem recombinante 105 de *P. griseoroseum* verificando um aumento linear da atividade enzimática até 120 horas de incubação em fermentadores de 3 e 20 litros, com volumes de trabalho de 2 e 10 litros, respectivamente.

Considerando a potencialidade do uso de *P. griseoroseum* como produtor de poligalacturonase em escala industrial e visando uma melhor compreensão do sistema pectinolítico nesse organismo, este trabalho teve como objetivos verificar a funcionalidade de possíveis cis-elementos presentes na região promotora dos genes *pgg1* e *pgg2* de *P. griseoroseum* por meio de interação destes elementos com proteínas presentes em extratos nucleares brutos; inativar o gene *pgg2* de *P. griseoroseum* para avaliar sua contribuição na atividade total de PG; subclonar a região codificadora do gene *pgg2* de *P. griseoroseum* no plasmídeo pAN 52-1, sob o controle do promotor *gpdA* de *A. nidulans* e obter linhagens com

maior produção de poligalacturonase usando fontes de carbono de baixo custo como substrato e estabelecer as condições fisiológicas para a produção em batelada de PG pela linhagem superprodutora de PG.

2 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaña, A.; Gabilondo, A.; Gernando, F.; Moragues, M. D.; Domingues, J. B.; Llana, M. J.; Serra. Pectin lyase production by a *Penicillium italicum* strain. *Appl. Environ. Microbol.*, 55:1612-1616, 1989.
- Antier, P.; Minjares, A.; Roussos, S.; Viniestra-Gonzalez, G. New approach for selecting pectinase producing mutants of *Aspergillus niger* well adapted to solid state fermentation. *Biotechnol. Adv.*, 11(3):429-440, 1993.
- Avila, J.; Pérez, M. D.; Brito, N.; González, C.; Silverio, J. M. Cloning and disruption of the YNR1 gene encoding the nitrate reductase apoenzyme of the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEBS Lett.*, 366:137-142, 1995.
- Bailey, M. J.; Pessa, E. Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 12:266-271, 1990.
- Bailey, M. J.; Poutanen, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30:5-10, 1989.
- Ballance, D. J.; Turner, G. Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 36:321-331, 1985.
- Banks, G. R.; Shelton, P. A.; Kanuga, N.; Holden, D. W.; Spanos, A. The *Ustilago maydis* nar 1 gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene*, 131:69-78, 1993.
- Baracat, M. C.; Valentim, C.; Muchovej, J. J.; Silva, D. O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibres. *Biotechnol. Lett.*, 11:899-902, 1989.

- Bazzolli, D.M.S. Organização e regulação de genes que codificam pectina liase em *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, MG: UFV, 105p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- Benen, J. A.; Kester, H. C.; Visser, J. Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. *Eur. J. Biochem.*, 259:577-585, 1999.
- Blandino, A.; Iqbalsyah, T.; Pandiella, S. S.; Cantero, D.; Webb, C. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58(2):164-9, 2002.
- Brito, A. R. T. Isolamento e caracterização de mutantes de *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, MG: UFV. 68p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 1998
- Buenrostro, M.; Lopes-Munguia, A. Enzymatic extraction of avocado oil. *Biotechnol. Lett.*, 8:505-506, 1986.
- Bussink, H. J. D.; Brower, K. B.; De Graaff, L. H.; Kester, H. C. M.; Visser, J. Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger*. *Curr. Genet.*, 20:301-307, 1991a.
- Bussink, H. J. D.; Buxton, F. P.; Visser, J. Expression and sequence comparison of the *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubigensis* genes encoding polygalacturonase II. *Curr. Genet.*, 19:467-474, 1991b.
- Bussink, H. J. D.; Kester, H. C. M.; Visser, J. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding prepro-polygalacturonase II of *Aspergillus niger*. *Febs* 273:127-130, 1990.
- Bussink, H. J. D.; Van Den Hombergh, J. P. T. W.; Van Den Ijssel, P. R. L. A.; Visser, J. Characterization of polygalacturonase-overproducing *Aspergillus niger* transformants. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 37:324-329, 1992.
- Cardoso, P. G. Isolamento e caracterização parcial de gene que codifica pectina liase em *Penicillium expansum*. Viçosa, MG: UFV, 59p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- Cardoso, P. G. Organização do gene de pectina liase em *Penicillium expansum* e obtenção de linhagens recombinantes de *Penicillium griseoroseum* com alta produção de pectina liase. Viçosa, MG: UFV, 127p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- Christgau, S.; Kofod, L. V.; Halkier, T.; Andersen, L. N.; Hockauf, M.; Dörreich, K.; Dalboge, H.; Kauppinen, S. Pectin methyl esterase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast and characterization of the recombinant enzyme. *Biochem. J.*, 319:705-712, 1996.

- Collmer, A.; Keen, N. T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 24: 383-409, 1986.
- Cotton, P.; Kasza, Z.; Bruel, C.; Rasclé, C.; Fèvre, M. Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 227:163-169, 2003.
- Cutler, S. B.; Cooley, R. N. Cloning of the nitrate reductase gene of *Stagnospora (Septoria) nodorum* and its use as a selectable marker for targeted transformation. *Curr. Genet.* 34:128-137, 1998.
- D'Ângelo, M. A. C. Purificação Parcial e caracterização de poligalacturonases de *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, MG: UFV, 53p. (Monografia) Universidade Federal de Viçosa, 1998
- Dantas-Barbosa, C.; Araújo, E. F.; Moraes, L. M. P.; Vainstein, M. H.; Azevedo, M. O. Genetic transformation of germinated conidia of thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* to hygromycin B resistance. *FEMS Microbiol. Lett.*, 169:185-190, 1998.
- Devchand, M.; Gwynne, D. I. Expression of heterologous proteins in *Aspergillus*. *J. Biotechnol.*, 17(1):3-9, 1991.
- Dhawale, S. S.; Paietta, J. V.; Marzluf, G. A. A new, rapid and efficient transformation procedure for *Neurospora*. *Curr. Genet.*, 8:77-79, 1984.
- Dias, E. S. Clonagem e caracterização parcial de um gene que codifica a enzima poligalacturonase em *Penicillium expansum*. Viçosa, MG: UFV, 68p. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- Dias, E. S.; Queiroz, M. V.; Cardoso, P. G.; Barros, E. G.; Araújo, E. F. Transformation of *Penicillium expansum* with a heterologous gene which confers resistance to benomyl. *World J. Microbiol.*, 15:513-514, 1999.
- Diolez, A.; Langin, T.; Gerlinger, C.; Brygoo, Y.; Daboussi, M. J. The *nia* gene of *Fusarium oxysporum*: isolation, sequence and development of a homologous transformation system. *Gene*, 131:61-67, 1993.
- Eveleigh, D. E.; Montenecourt, B. S. Increasing yields of extracellular enzymes. In: Perlman D. (Eds.) *Adv. appl. microbiol.*, 25:57-75, 1979.
- Fernandes-Salomão, T. M.; Amorim, A. C. R.; Chaves-Alves, V. M.; Coelho, J. L. C.; Silva, D. O.; Araújo, E. F. Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 27(1): 33-36, 1996.
- Ferreira, G. Produção de patulina por *Penicillium* spp. Viçosa, MG: UFV. 54p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- Fincham, J. R. S. Transformation in fungi. *Microbiol. Rev.*, 53:148-170, 1989.

- Freitas, L. E. Produção e caracterização parcial de poligalacturonase de *Penicillium expansum*. Viçosa, MG: UFV. 66p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- Gäumann, E. e Böhni, E. Über adaptive Enzyme bei parasitischen Pilzen. I. Helv. Chim. Acta, 30: 24-38, 1947.
- Geöcze, M. L. A. Efeitos de extrato de levedura, pH e outros fatores sobre a poligalacturonase de *Penicillium expansum*. Viçosa, MG: UFV, 54p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 1994.
- Geöcze, M. L. A, Coelho, J. L. C., Araújo, E. F., Silva, D. O. Effect of yeast extract and medium pH on polygalacturonase production by *Penicillium expansum*. Rev. Microbiol., 26(3): 165-168, 1995.
- Ghildyal, N. P.; Ramakrishna, S. V.; Devi, P.N.; Lonsane, B.K.; Asthana, H. N. Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation. J. Food Science Technol., 18:248-251, 1981.
- Grassin, C.; Fauquembergue, P. Application of Pectinases in Beverages. In: Visser and A.G.J. Voragen (Editors), Pectins and Pectinases, Elsevier Science, 1996.
- Haas, H., Marx, F., Graessle, S., Stöffler, G. Sequence analysis and expression of the *Penicillium chrysogenum* nitrate reductase encoding gene (*niaD*). Bioch. Biophys. Acta, 1309:81-84, 1996.
- Hadj-Taieb, N., Ayadi, M.; Trigui, S.; Bouabdallah, F.; Gargouri, A. Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CTI) of *Penicillium occitanis*. Enz. Microb. Technol., 30:662-666, 2002.
- Haran, S., Schickler, H., Peer, S., Logemann, S., Openheim, A., Chet, I. Increased constitutive chitinase activity in transformed *Trichoderma harzianum*. Biolog. Control., 3:101-108, 1993.
- Herrera-Estrela, A., Goldman, G. H.; Van Montagu, M. High-efficiency transformation system for the biocontrol agents *Trichoderma* spp. Mol. Microbiol., 4:839-843, 1990.
- Johnston, D. J.; Williamson, B. An immunological study of the induction of polygalacturonase in *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiol., 96(1-2):19-23, 1992.
- Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S.; Tewari, R. Applications of pectinases in the commercial sector; a review. Bioresour. Technol., 77:215-227, 2001.
- Kester, H. C. M.; Visser, J. Purification and characterization of polygalacturonases produced by the hyphal fungus *Aspergillus niger*. Biotechnol. Appl. Biochem., 12:150-160, 1990.
- Klein, T. M.; Arentzen, R.; Lewis, P. A. e Fitzpatrick-Mcelligott, S. Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. Biotechnol., 10:286, 1992.
- Kojima, Y.; Sakamoto, T.; Kishida, M.; Sakai, T.; Kawasaki, H. Acidic condition-inducible

- polygalacturonase of *Aspergillus kawachii*. J. Mol. Catalysis. B: Enzymatic, 6:351-357, 1999.
- Kolar, M.; Punt, P. J.; Van Den Hondal, C. A. M. J. J.; Schwab, H. Transformation of *Penicillium chrysogenum* using dominant selection markers and expression of an *Escherichia coli lacZ* fusion gene. Gene, 62:127-134, 1988.
- Kubicek-Pranz, E. M.; Gruber, F.; Kubicek, C. P. Transformation of *Trichoderma reesei* with the cellobiohydrolase as a mean for obtaining strains with increase cellulase production and specific activity. J. Biotechnol., 20:83-94, 1991.
- Lana, T. G. Isolamento e caracterização de linhagens diplóides e recombinantes em *Penicillium expansum*. Viçosa, MG: UFV, 55p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- Lima, J. O., Santos, J. K.; Pereira, J. F.; Resende, M. L.; Araújo, E. F. Development of a transformation system for *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom in cocoa plants. Curr. Genet., 42(4):236-40, 2003. Epub 2002 Dec 17. Erratum in: Curr Genet. 43(1):70, 2003.
- Leuchtenberger, A. e Mayer, G. Synthesis of different pectinases by filamentous growing *Aspergillus niger* mutants. Fol. Microbiol., 36:362-66, 1991.
- Loera, O.; Aguirre, J.; Viniegra-González, G. Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* overproducing mutants. Enz. Microb. Technol., 25:103-108, 1999.
- Lopes, F. J. F.; Araújo, E. F.; Queiroz, M. V. Easy detection of green fluorescent protein multicopy transformants in *Penicillium griseoroseum*. Mol. Genet. Res., 3(4):449-55, 2004.
- Lopes-Shikida, S. A. R. Isolamento seleção e preservação de fungos produtores de pectinases. Piracicaba, SP: ESALQ, 114 p. (Dissertação de Mestrado) 1995.
- Margolles-Clark, E., Harman, G. E.; Pentilã, M. Enhanced expression of endochitinase in *Trichoderma harzianum* with the *cbh1* promoter of *Trichoderma reesei*. Appl. Environ. Microbiol., 62:2152-2155, 1996.
- Mathieu, M.; Nikolaev, I.; Scazzocchio, C.; Felenbok, B. Patterns of nucleosomal organization in the alc regulon of *Aspergillus nidulans*: roles of the AlcR transcriptional activator and the CreA global repressor. Mol. Microbiol., 56(2):535-48, 2005.
- May, G. S.; Gambino, J.; Weatherbe, J. A.; Morris, N. R. Identification and functional analysis of β -tubulin genes by site-specific integrative transformation in *Aspergillus nidulans*. J. Cell. Biol., 100:712-718, 1985.
- Michielse, C. B.; Hooykaas, P. J. J.; van den Hondel, C. A. M. J. J.; Ram, A. F. J. *Agrobacterium-mediated* transformation as a tool for functional genomics in fungi. Curr. Genet., 48:1-17, 2005.

- Miranda, R. P. Purificação e Caracterização Parcial de Poligalacturonases de *Penicillium expansum*. Viçosa, MG: UFV, 55p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- Panda, T.; Nair Sushma R., M. Prem Kumar. Regulation of synthesis of the pectolytic enzymes of *Aspergillus niger*. *Enz. Microb. Technol.*, 34:466-473, 2004.
- Parenticová, J. L.; Benen, J. A. E. J.; Kester, H. C. M.; Visser J. J. *pgaE* encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.*, 251:72-80, 1998.
- Pedersen, A. G.; Bundgaard-Nielsen, M.; Nielsen, J.; Villadsen, J. Rheological characterization of media containing *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.*, 41:162-164, 1993.
- Penttilä, M.; Nevalainen, H.; Rättö, M.; Salminen, E.; Knowles, J. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 61:155-164, 1987.
- Pereira, J. F.; Queiroz, M. V.; Lopes, F. J.; Rocha, R. B.; Daboussi, M. J.; Araújo, E. F. Characterization, regulation, and phylogenetic analyses of the *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase gene and its use as selection marker for homologous transformation. *Can. J. Microbiol.*, 50(11):891-900, 2004.
- Phaff, H. J. The production of exocellular pectic enzymes by *Penicillium chrysogenum*. On the formation and adaptative nature of polygalacturonase and pectinesterase. *Arch. Biochem.*, 13:67-81, 1947.
- Piccolli-Valle, R. H., Passos, F. J. V., Brandi, I. V., Peternelli, L. A, Silva, D. O. Influence of different mixing and aeration and regimens on pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum*. *Proc. Biochem.*, 38:849-854, 2003.
- Piccoli-Valle, R. H.; Baracat-Pereira, M. C.; Silva, D. O. Catabolite repression of inductive polygalacturonase synthesis in *Penicillium expansum*. *J. Bas. Microbiol.*, 35:189-193, 1995.
- Pickergill, R.; Smith, D.; Worboys, K.; Jenkins, J. Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *J. Biol. Chem.*, 273(38):24660-24664, 1998.
- Punt, P. J.; Oliver, R. P.; Dingemanse, M. A.; Pouwels, P. H.; Van Den Hondal, C. A. M. J. J. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*, 59:117-124, 1987.
- Queener, S. W.; Ingolia, T. D.; Skatrud, P. L.; Chapman, J. L.; Kaster, K. R. A system for genetic transformation of *Cephalosporium acremonium*. In Leive, L. (ed.), *Microbiology - American Society of Microbiology*, Washington, DC, pp. 468-472, 1985.

- Queiroz, M. V.; Barros, A. O.; Barros, E. G.; Guimarães, W. V.; Araújo, E. F. Transformation of *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase mutant with the *nia* gene from *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Microbiol.*, 44:1-3, 1998.
- Reymond-Cotton, J. P. J.; Fraissinet-Tachet J. L.; Fêvre, M. Expression of the *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase *pgl* gene: possible involvement of CREA in glucose catabolite repression. *Curr. Genet.*, 30:240-245, 1996.
- Ribeiro, J. B. Isolamento e caracterização de genes que codificam poligalacturonase e transformação de *Penicillium expansum*. Viçosa, MG, UFV, 57p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- Ribon, A. O. B. Organização e regulação de genes que codificam poligalacturonase em *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, MG: UFV, 85p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- Ribon, A. O. B.; Coelho, J. L. C.; Barros, E. G.; Araújo, E. F. Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Penicillium griseoroseum*. *Biotechnol. Lett.*, 21:395-399, 1999.
- Ribon, A. O. B., Queiroz, M. V., Coelho, J. L. C.; Araújo, E. F. Differential expression of polygalacturonase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum* in different carbon sources. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 29:145-148, 2002.
- Ridley, B. L.; O'Neill, Malcolm A.; Mohnen, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57:929-967, 2001.
- Riou, C.; Fraissinet-Tachet, L.; Freyssinet, G.; Fêvre, M. Secretion of pectic isoenzymes by *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 91:231-238, 1992.
- Scazzocchio, C., Gavrias, V., Cubero, B., Panozzo, C., Mathieu, M., Felenbok, B. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*: a review. *Can. J. Bot.*, 73:5160-5166, 1995.
- Schols, H. A.; Geraeds, C. C. J. M.; Searle-van Leeuwen, M. F.; Kormelink, F. J. M.; Voragen, A. G. J. Rhamnogalacturonase: a novel enzyme that degrades the hairy regions of pectins. *Carbohydr. Res.*, 206:105-115, 1990a.
- Shih, J.; Wei, Y.; Goodwin, P. R. A comparison of the pectate lyase genes, *pel-1* and *pel-2*, of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* and the relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection. *Gene*, 243:139-150, 2000.
- Siéssere, V.; Fonseca, M. J. V. e Said, S. Extra-cellular polygalacturonases from *Penicillium frequentans*: separation and regulatory aspects. *J. Gen. Microbiol.*, 138:1801-1805, 1991.
- Soares-Ramos, J. R. L. Atividade de poligalacturonase produzida por *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, MG: UFV, 39p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 1996.

- Sólis, S.; Flores, M. E.; Huitrón, C. Isolation of endopolygalacturonase hyperproducing mutants of *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Biotchnol. Lett.*, 10:751-756, 1990.
- Someren, M. A. K.; Harmsen, J. A. M.; Kester, C. M.; Visser, J. Structure of the *Aspergillus niger pelA* gene and its expression in *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.*, 20:293-299, 1991.
- Spaldind, D. M.; Abdul-Baki, A. A. In vitro and in vivo production of pectin lyase by *Penicillium expansum*. *Phytopathology*, 63(2):231-235, 1973.
- Suresh, S. P.; Dimond, A. E. Repression of polygalacturonase synthesis in *Fusarium oxysporum* by sugars and its effect on symptom reduction in infected tomato plants. *Phytopatology*, 58:676-682, 1968.
- Torres, A. R. Isolamento e caracterização do gene que codifica nitrato redutase em *Penicillium expansum*. Viçosa, MG, UFV, 47p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- Tudzynski, B.; Mende, K.; Weltring, K. M.; Kinghorn, J. R.; Unkles, S. E. The *Gibberella fujikuroi niaD* gene encoding nitrate reductase: isolation, sequence, homologous transformation and electrophoretic karyotype location. *Microbiology*, 142:533-539, 1996.
- Unkles, S. E., Campbell, E. I., Carrez, D., Grieve, C., Contreras, R., Fiers, W., Van Den Hondel, C. A. M. J. J.; Kinghorn, J. R. Transformation of *Aspergillus niger* with the homologous nitrate reductase gene. *Gene*, 78:157-166, 1989.
- van den Homberg, J. P. T. W.; van den Vondervoort P. N., FraissinetTachet, L., Visser, J. *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends Biotechnol.*, 15:256-263, 1997.
- van Gorgom, R. F. M.; Punt, P. J.; Pouwels, P. H.; van den Hondal, C. A. M. J. J. A system analysis of expression signals in *Aspergillus*. *Gene*, 48:211-217, 1986.
- van Santen, Y.; Benen, J. A.; Schroter, K. H.; Kalk, K. H.; Armand, S.; Visser, J.; Dijkstra, B. W. 1.68 Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 274:30474-30480, 1999.
- Varadarajalu, L. P.; Punekar, N. S. Cloning and use of sC as homologous marker for *Aspergillus niger* transformation. *J. Microbiol. Methods*, 61:219- 224, 2005.
- Varavallo, M. A. Recombinantes com maior produção de pectinases e transformação em *Penicillium spp.* Viçosa, MG: UFV, 80p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- Visôto, L. E. Produção de ocratoxina A por fungos filamentosos isolados de café e por fungos produtores de pectinases. Viçosa, MG: UFV, 43p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- Visser, J.; Voragen, A. G. J. (Eds.) Pectins and pectinases. *Prog. Biotechnol.*, 14. Elsevier,

Amsterdam, 1996.

- Vivan, J. Produção da micotoxina citrinina por *Penicillium* spp. Viçosa, MG: UFV, 42p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- Waggoner, P. E.; Dimond, A. E. Production and role of extracellular pectic enzymes of *Fusarium oxysporum* f. lycopersici. *Phytopatology*, 45:79-87, 1955.
- Wagner, F.; Kusserow, H.; Schäfer, W. Cloning and targeted disruption of two polygalacturonase genes in *Penicillium olsonii*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 186:293-299, 2000.
- Weld, R. J.; Eady, C. C.; Ridgway, H. J. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Microbiol. Methods*, "In Press", 2005.
- Wongwicharn, A.; McNeil, B.; Harvey, L. M. Effect of oxygen enrichment on morphology, growth, and heterologous protein production in chemostat cultures of *Aspergillus niger* B1-D. *Biotechnol. Bioeng.*, 65:416-424, 1999.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO DE CIS-ELEMENTOS PRESENTES NOS GENES *pgg1* E *pgg2*, QUE CODIFICAM POLIGALACTURONASES E INATIVAÇÃO DO GENE *pgg2* DE *Penicillium griseoroseum*

1 - INTRODUÇÃO

O fungo filamentosso *Penicillium griseoroseum* apresenta grande potencial como produtor das enzimas do complexo pectinolítico (Baracat *et al.*, 1989). Essas enzimas atuam sobre a molécula da pectina hidrolisando-a e são de grande interesse econômico devido à sua aplicação industrial (Ghildyal *et al.*, 1981, Bailey e Pessa, 1990). Considerando a importância dessas enzimas, diversos trabalhos têm sido conduzidos no sentido de entender a regulação da síntese de pectinases em *Penicillium* spp. e genes que codificam poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL) nessas espécies foram isolados (Ribon *et al.*, 1999; Ribon *et al.*, 2002; Cardoso, 2004; Bazzolli, 2005). A síntese dessas enzimas em *Penicillium* spp, assim como na maioria dos organismos estudados, é regulada em nível de transcrição por dois mecanismos gerais: um de indução, em que atuam substâncias pécticas ou seus derivados, e um de repressão por fontes de carbono mais facilmente metabolizáveis como, por exemplo, glicose ou frutose (Ribon *et al.*, 2002; Bazzolli, 2005).

Ribon *et al.* (1999 e 2002) realizaram o isolamento e caracterização de 2 genes de PG em *P. griseoroseum*, *pgg1* e *pgg2*, verificando que esses genes codificam proteínas com massa molecular estimada em 38,4 e 38,3 KDa. O ponto isoelétrico da PG deduzida a partir da seqüência do gene *pgg1* é 5,31 e do gene *pgg2* é 8,31. Foi observado também que esses genes são transcricionalmente regulados e que o gene *pgg1* se expressa apenas a partir de 72 horas de cultivo na presença de pectina enquanto *pgg2* apresenta expressão em todos os tempos estudados a partir de 24 horas. D'Ângelo (1998) realizou a purificação parcial e caracterização das poligalacturonases de *P. griseoroseum* demonstrando que esse fungo produz pelo menos 3 poligalacturonases. Com base nos dados de D'Ângelo (1998) e Ribon *et al.* (1999), sugerimos que o gene *pgg2* codifica a PG mais abundantemente expressa em *P. griseoroseum* e que essa enzima apresenta características físico-químicas mais favoráveis à aplicação industrial.

Embora haja relatos de genes que codificam poligalacturonases isolados e caracterizados de diversas espécies fúngicas, ainda existem poucos estudos enfocando as proteínas e os cis-elementos específicos envolvidos na regulação da transcrição desses genes, considerando que possíveis cis-elementos têm sido observados para todos os genes isolados. Dentre as seqüências descritas, há indicações de que CCAAT, SYGGRG e CCCTGA desempenham papéis importantes na transcrição dos genes que codificam PGs (Bussink *et al.*, 1991; Benen *et al.*, 1996; Ishida *et al.*, 1997; Parenicova *et al.*, 1998; Wubben *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004; Yan e Liou, 2005).

Bussink *et al.* (1991b), após verificarem que em *Aspergillus niger* o gene *pgal* é induzido na presença de pectina e reprimido por glicose, realizaram um estudo para avaliar o papel de diversas seqüências da região promotora na expressão do gene. Foi verificado que uma seqüência de 300 pb antes do códon de início da tradução era suficiente para ocorrer transcrição e uma região de 223 pb (-799 a -576) foi apontada como um local importante para a ligação de proteínas ativadoras. Raymond-Cotton *et al.* (1996) observaram a formação de complexos DNA-proteína com a seqüência consenso 5'-SYGGRG-3' sugerindo que uma proteína homóloga à CREA de *A. nidulans* estava envolvida na regulação do gene *pg1* de *S. sclerotiorum*.

Ribon (2001) analisou as regiões promotoras dos genes *pgg1* e *pgg2* de *P. griseoroseum* visando à investigação dos elementos específicos envolvidos na regulação da expressão desses genes. Verificou-se a presença de possíveis cis-elementos, como por exemplo, um CCAAT Box na posição - 270, um TATAATATA a - 522 e um elemento de resposta ao cAMP a -757 no gene *pgg2*. No gene *pgg1* foi também encontrado um possível TATATAA na posição - 93. O presente trabalho teve como objetivos verificar a funcionalidade *in vitro* desses cis-elementos por meio de ensaios de retardamento em gel utilizando extrato nuclear protéico de *P. griseoroseum* cultivado em diferentes fontes de

carbono, inativar o gene *pgg2* no genoma de *P. griseoroseum* e avaliar a contribuição da atividade da PG, codificada por esse gene, na atividade total de PG nesse fungo.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

2.1. Microrganismos e plasmídeos utilizados

Para estudar a ligação de proteínas reguladoras aos cis-elementos da região promotora dos genes *pgg1* e *pgg2*, foi utilizada a linhagem selvagem de *P. griseoroseum*, isolada de sementes florestais na Universidade Federal de Viçosa-Brasil. Para a inativação do gene *pgg2* foi utilizada a linhagem mutante espontâneo PG63 *nia⁻* de *P. griseoroseum* (Pereira *et al.*, 2004). O plasmídeo pPG15 que contém a região codificadora e parte do promotor do gene *pgg2* que codifica a poligalacturonase II de *P. griseoroseum* e o plasmídeo pNH24 contendo o gene *niaD* de *Fusarium oxysporum* foram utilizados para construção do vetor de inativação (Ribon *et al.*, 1999; Diolez *et al.*, 1993). Para amplificação dos plasmídeos foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* K12 linhagem DH5 α .

2.2. Manutenção das culturas, preparo de inóculo e condições de cultivo

Os fungos foram cultivados a 25°C por 5 dias, em placas de Petri contendo meio completo sólido (6,0 g NaNO₃; 1,5 g KH₂PO₄; 0,5 g KCl; 0,5 g MgSO₄.7H₂O; 0,01 g FeSO₄; 0,01 g ZnSO₄; 10,0 g glicose; 2,0 g peptona; 1,5 g caseína hidrolisada; 0,5 g extrato de levedura; 1 mL de solução de vitaminas; 15 g ágar em 1000 mL de água destilada - pH 6,8 - Pontecorvo *et al.*, 1953, modificado por Azevedo e Costa, 1973), e estocados sob refrigeração por no máximo dois dias, quando não utilizados imediatamente. Após o crescimento, os conídios foram raspados da superfície da cultura com auxílio de uma alça

de platina e suspensos em Tween 80 a 0,1% (v/v). Foram inoculados 10^5 conídios por placa de meio completo recoberto com papel celofane, para as linhagens selvagem e PG63, ou em meio mínimo (6,0 g NaNO_3 ; 1,5 g KH_2PO_4 ; 0,5 g KCl; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g FeSO_4 ; 0,01 g ZnSO_4 ; 10,0 g glicose; 15 g ágar em 1000 mL de água destilada - pH 6,8) para os transformantes. As placas foram incubadas a 25°C por 24 a 30 horas para a produção de massa micelial, utilizada no preparo de protoplastos, ou por 48 horas para extração de DNA total. Para a produção de massa micelial, para isolamento de núcleos e extração de proteínas nucleares, foram inoculados 10^6 conídios mL^{-1} de meio mineral (K_2HPO_4 6,8 gL^{-1} , KH_2PO_4 3,4 gL^{-1} , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 gL^{-1} , pH 6,3) suplementado com extrato de levedura (0,06% p/v) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,11% p/v). Como fonte de carbono foi utilizada pectina cítrica (Sigma P9135), glicose ou sacarose 0,3 % p/v. Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 500 mL com volume de trabalho de 250 mL, os quais foram incubados a 25°C, 150 RPM, por 24 ou 76 horas. Após o crescimento, o micélio foi coletado em peneira de 400 mesh, lavado com água destilada, seco com gaze e congelado em nitrogênio líquido.

2.3 - Isolamento de núcleos e obtenção de extratos nucleares

A metodologia empregada para a preparação de extratos nucleares foi a descrita por Nagata *et al.* (1993), com algumas modificações. O micélio foi triturado em N_2 líquido até a obtenção de um pó fino, o qual foi ressuscitado em tampão A (glicerol 25% p/v, PIPES-KOH 10 mM, pH 7,0, MgCl_2 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, Triton X-100 0,5%), na concentração final de 20 gramas de micélio por 100 mL. A preparação foi homogeneizada em homogeneizador "Potter" (15 mL) e centrifugada por 10 minutos, a 1000 g, a 4°C em centrífuga Sorvall RC-5C (DuPont). O sobrenadante foi recolhido e 20 mL de tampão A foram adicionados ao sedimento. O material foi novamente centrifugado, após homogeneização em homogeneizador "Potter". Os sobrenadantes foram misturados e centrifugados a 5000 g, por 10 minutos, a 4°C. O sedimento foi lavado em tampão B (tampão A sem Triton X-100). A fração nuclear foi cuidadosamente ressuscitada em 1 mL de tampão B e colocada sobre 12 mL de uma solução constituída de Percoll 40%, preparada em tampão C (Sacarose 20%, MgCl_2 5 mM, PIPES-KOH 5 mM pH 7,0). A centrifugação foi feita em rotor "swing", a 3000 g, por 40 minutos, a 4°C. A solução de percoll foi descartada e o sedimento, cuidadosamente ressuscitado em 2 mL de tampão B e novamente centrifugado. A fração nuclear foi lavada com tampão B e ressuscitada em 300 μL de tampão de extração nuclear (glicerol 10% p/v, HEPES-KOH 15mM pH 7,9, KCL 0,5 M, MgCl_2 5 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM e aprotinina, leupeptina, pepstatina a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cada). A preparação foi colocada em banho de gelo por 30 minutos, e centrifugada por 10 minutos, 12000 RPM, a 4°C. O extrato nuclear assim obtido foi dialisado por 2 horas a 4°C, em tampão D (glicerol 15% p/v, HEPES-KOH 15 mM pH 7,9, KCl 100 mM, EDTA 1

mM, PMSF 0,5 mM, DTT 2 mM). Em seguida, o material foi centrifugado por 10 minutos, a 10000 *g*. A determinação da quantidade de proteína nuclear foi feita segundo Bradford (1976). Alíquotas contendo 10 µg de proteína foram congeladas em N₂ líquido e armazenadas a - 80°C.

2.4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

Os extratos nucleares brutos foram submetidos a eletroforese para uma pré avaliação da qualidade das preparações de proteínas nucleares. O gel de separação contendo 14% acrilamida (Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,06%; TEMED 0,05%) e o gel empilhador com 5% de acrilamida (Tris-HCl 0,14M, pH 6,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,05%) foram feitos segundo Laemmli (1970). Um tampão (Tris-HCl 0,06M pH 6,8; glicerol 10%; SDS 0,3%; β-mercaptoetanol 2% e azul de bromofenol 1%) foi adicionado às amostras e estas aquecidas por 3 minutos em banho fervente antes da aplicação no gel. Foi realizada uma pré-corrída a 60 volts por 30 minutos seguida de uma corrida de 4 horas a 80 volts em tampão de corrida (Tris-HCl 0,07M pH 8,5; glicina 0,58M; SDS 0,24%). O gel foi corado (metanol 45%, ácido acético 9%; Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1%) durante 2 horas e descorado (ácido acético 7,5%; metanol 25%) durante 8 horas em temperatura ambiente.

2.5 - Preparação dos fragmentos de DNA para os ensaios de ligação

Diferentes fragmentos de DNA das regiões 5' terminais dos genes *pgg1* e *pgg2* foram obtidos por amplificação dos plasmídeos pPGR e pPGR4.3, com oligonucleotídeos específicos (Tabela 1). Os fragmentos de DNA amplificados foram precipitados e, em seguida, marcados com [γ -³²P]dATP, empregando-se a enzima polinucleotídeo quinase (Promega), conforme recomendações do fabricante. Alguns fragmentos de DNA foram clivados com enzimas de restrição originando-se fragmentos menores que foram purificados após separação por eletroforese em gel de agarose e marcados radioativamente.

2.6 - Ensaios de ligação

A mistura de ligação consistiu de 4 µL de tampão de ligação 5x (KCl 200 mM, EDTA 5 mM, HEPES-KOH 125 mM, pH 7,9, glicerol 50% p/v), 2 µg de poli(dIdC), 1 a 5 ng do fragmento de DNA radioativo (10⁴ CPM), 10 µg de extrato nuclear bruto e água deionizada para um volume final de 20 µL. Como competidor específico foi utilizado um excesso molar da mesma seqüência utilizada como sonda porém não marcada radioativamente. Inicialmente, a reação foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos, e incubada nas mesmas condições na presença do fragmento de DNA marcado. Um gel não desnaturante

de poliacrilamida 4% (acrilamida/bisacrilamida, 19:1) foi preparado e feita uma pré-corrída por 30 minutos, a 90V, em TEB 0,5 X. Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese por 4 a 5 horas a 100V, em temperatura ambiente. O gel foi transferido para papel Whatmann 3MM, protegido por filme PVC, e exposto ao filme auto-radiográfico BIOMAX MR (Kodak), por 20 horas a -80°C, entre dois intensificadores.

Foram realizados ensaios de ligação utilizando oligonucleotídeos dupla-fita (Tabela 1). Para tal, oligonucleotídeos complementares foram desenhados com base na seqüência desejada, anelados por 5 minutos, a 40°C e marcados radioativamente como descrito acima.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para a obtenção dos fragmentos de DNA utilizados nos ensaios de retardamento em gel.

Oligonucleotídeo	Seqüência (5'→3')	Posição	
		5'	3'
PG2.5	TGAGGAATGAATGAATGAATG	-80	-100
PG2.7	GCCCATCTAGACTAGGTGG	-311	-329
PG2.8	GGTACCTTTGATCCTTTGTAG	-843	-823
PG2.9	GGCGTIAACCCCTGTTCTTAG	-238	-258
CAATPG2A	TGATTTTCCAATGAGGGGTCC	-281	-261
CAATPG2B	GGACCCCTCATIGGAAAATCA	-261	-281
CAATmutPG2A	GATTTTCGTAGGAGGGGTCT	-280	-260
CAATmutPG2B	AGACCCCTCCTATGAAAATC	-260	-280
TATAPG2A	GAGGTATAATATAGTCTTCAG	-534	-514
TATAPG2B	CTGAAGACTATATTATACCTC	-514	-534

A

```

-----GGTAAGCTTAACGGGAATGAAGCTTATATATGGCCATTCTCCGAGTTGCCGCAAAGAACGGATGGATACTTGGCCG -676
CGTAGCTTTCTGACTTCTTTTGAATCCTTTTGAATGTCTTAGATGTCTTTTATAGATGACTTTTTTTGGTTAATTTAAAAAA -593
ATTTTCCAGATATTTTCACTTCCATGCCTTTTTCAGGTTTCGTAGATCGGCAGAAAAAAGGGGCCAAAGGCTTAACCTTCTGAAA -510
CTGGGTCCACGGCCCGGGGGTACTTACCGGAGTATCTTATTCCTCGCTTGTGAGTGCATCTCAGTTCTCTCTACACATGG -427
GCTCAACCTCGTTTAAATGCCATTACATAGTGGATCCCCACCTAGAAATCCGAATGTCTTATATTCGAAACAGCCATCTGAAG -344
TCACAAATGAGCTTGACTTATTCTACCACCCCTTGGCGGGATTTCGTCTTCCATCGCCGCTTTGAAACTGAAACGAAGCCCCGC -261
AGGACGGATAAACACAAAGCTCAGGATCACATTGGAGAAAAATTCATCGGTGCCTGTTCTCGGAAAGATACAACCCCTCAA -178
AGGAAAATCTCGTTCTCTCAATCTAATTTCCGGCTCTAGTTCTAGATTCCAGTTCGTTTCAGGATGAACCGTAGAGGTATAT -95
AAGACTCCCCTCGTCTGCTCTTTCGAAAATCATAAACAACCATCACACTCTTTTAAAACCCACATTTCATTTCTATTTCATA -12
TTTTCTTTATCATG ----- +3

```

B

```

-----GGTAAGTG -1012
CGGGTGTACTTTGAAAAAATAGGAAGGGTGGTCTGGCAATGATTTATTCCTGATTTATCTGCCAATTTATTGGGTACCTTAAG -926
GGGTAGGGTAACCCACCCACCATGTTCGGTGGATAACCTTTCCAATGTAGTACCTCCCAATAGTTACGGCTTCTCTCCGGAGGT -846
ACCTTTGATCCTTTTGTAGCTCCCTAAATATGATTTATCAGCACAGAAAATAGTCGGCAACATAACTAACCGCCTTGTCTAC -763
AGTGTATTTCTTGCCTCGTGCCTGAATATCTAGACAGGGCACCAATCAAACAAAAGACATGGTAAATAAAAGGGTGCATTGTT -680
TCAGCGCCACAGAATCTTTTGGAAAGGGTCTCTTACATACGGGATTTTCGTGTGGAACCAGCCCTACATCGGTAAATTTCTT -597
CAAATCAAGTGCCTGGCGTGAACACAAAGCTCGATAGGGCTCCACATGGTTTGCATAGTGGAGGTATAATATAGTCTTCAGG -514
CATCAATGCCATGTTCTTATTGGATAATAACTAGATATGTCTCGGCTTTTAAACCCGAAGATATTCCGCGTATTAATTATCCCA -431
GCAATGGTCCATTTTAGCAGGGATTCTAGACTAGGTGGAGTTAAATGTTTCGGAGAGTTGCCAGTCCGGGTGTAGCTGACCAT -348
GTAGCTGGCCCTAGTAGATTAATCCAATGGAGCATCTAACAATTATCCATGCATCCCTGGATCTTATGATTTTCCAATGAGGG -265
GTCCAACATAAGAACAGGGGTTAACGCCATGACAGATGGCGGTAGTCCCGTTTCATAGAGATACTAGCGTAGGATCTATAAGGA -182
GGATGCTTGGCGGACCAAGCATTTAAATACCAAGGCCAAGCTCGGTGGAATAGCTTGTCAAACCTCATTTCATTTCATTCA -99
TTCATTTCATTTCCTCATTTCCTATTACACTCAGGTTCGGCTAGTCCGGAACATCTACACTCTCTTTAATTGTCTGTTGATC -16
GGACACCTACTTAAAATG----- +3

```

Figura 1. Seqüências de nucleotídeos das regiões promotoras dos genes *pgg1* (A) e *pgg2* (B), que codificam poligalacturonases em *Penicillium griseoroseum* (Ribon, 2001). O sítio de início da tradução está sublinhado. Possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição referidos no texto estão em negrito. As seqüências usadas como molde para desenhar os oligonucleotídeos estão duplamente sublinhadas. Estas seqüências estão depositadas no Gene Bank sob número de acesso AF085238 (*pgg2*) e AF195790 (*pgg1*).

2.7. Construção do vetor de inativação do gene *pgg2*

Para a construção do vetor de inativação, o plasmídeo pPG15 foi clivado com a endonuclease de restrição *Bal* I, liberando um fragmento de DNA de 200 pares de bases que corresponde à parte central da região codificadora do gene *pgg2*. Em seguida, o fragmento de DNA de 4,69 Kb (pBluescript contendo partes do gene *pgg2* nas extremidades) foi purificado do gel de agarose e ligado com um fragmento de *Hind* III de 4,4 Kb do plasmídeo pNH24, correspondente ao gene *niaD* de *Fusarium oxysporum*. Os dois fragmentos de DNA foram submetidos a tratamento com nuclease S1 antes de serem usados na reação de ligação.

2.8. Transformação bacteriana e extração de DNA plasmidial

A transformação bacteriana e extração de DNA plasmidial foram realizadas segundo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989).

2.9. Obtenção de protoplastos de *P. griseoroseum* PG63

A obtenção dos protoplastos baseou-se no método de Dias *et al.* (1997). O micélio foi coletado, ressuspendido em KCl 0,6 M em tampão fosfato 100 mM pH 5,8 contendo 3 mg mL⁻¹ do complexo enzimático glucanex (Novo Nordisk® CH4243) e incubado a 27°C sob agitação lenta por aproximadamente 3 horas. Os protoplastos foram separados dos fragmentos de hifas por filtração, e lavados 3 vezes em Sorbitol 1M, CaCl₂ 50 mM e Tris-HCl 100 mM (SCT) por centrifugação. O sedimento contendo os protoplastos foi ressuspendido em SCT para se obter uma suspensão com 10⁸ protoplastos mL⁻¹.

2.10. Transformação de protoplastos de *P. griseoroseum* PG63

A transformação baseou-se na metodologia estabelecida por Queiroz *et al.* (1999). Os protoplastos foram misturados com 5 µg do vetor de inativação e 50 µL de polietilenoglicol 6000 a 60% (p/v). Essa mistura foi incubada a 0°C por 20 minutos, seguindo-se a adição de 0,5 mL da mesma solução de polietilenoglicol. Após 20 minutos a 25°C, o volume foi completado para 1,5 mL com SCT. Os protoplastos foram recuperados por centrifugação, ressuspendidos em 0,5 mL de SCT, e em seguida inoculados em meio mínimo com estabilizador osmótico (6 g NaNO₃; 1,5 g KH₂PO₄; 0,5 g KCl; 0,5 g MgSO₄.7H₂O; 0,01 g FeSO₄; 0,01 g ZnSO₄; 10 g glicose, 171 g sacarose, 15 g ágar em 1000 mL de água destilada-pH 6,8), pelo método de “pour plate”, e mantidos a 27°C por 5 dias.

2.11. Purificação monospórica dos transformantes

A purificação monospórica foi realizada pela semeadura de 100µL de suspensão de conídios diluída em meio mínimo (MM) e transferência de uma colônia isolada, proveniente de um único conídio, para uma nova placa de Petri contendo MM após o período de crescimento.

2.12. Estabilidade mitótica dos transformantes

Para avaliar a estabilidade mitótica dos transformantes quanto ao gene da nitrato redutase, eles foram sucessivamente transferidos para MC sólido (não seletivo), num total de cinco passagens e, após isso, novamente transferidos para o MM. A cada passagem as placas foram incubadas a 25°C por aproximadamente 5 dias.

2.13. Extração de DNA total e reação da polimerase em cadeia (PCR)

As extrações de DNA total das linhagens transformantes, selvagem e PG63 basearam-se na técnica descrita por Specht *et al.* (1982) com modificações. A reação de amplificação foi feita em um volume de 25µL, contendo 10mM Tris-HCl, pH 8,0, 50mM KCl, 2,5mM MgCl₂, 0,1mM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 5 pmol dos oligonucleotídeos pipg2 (5'-AACTCCCACCATGGAGATCGCC-3') e pfp2 (5'-CACAACCTGGATCCGCGAGT-3'), 20 ng de DNA total da linhagem PG63 ou dos transformantes; 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em termociclador "Programmable Thermal Controller-100" (MJ Research, Inc.). Quarenta ciclos foram empregados, cada ciclo consistindo de um passo a 94°C por 1 min, um passo a 52°C por 1 min e um passo a 72°C, por 1 min e 30 seg. Ao final de 40 ciclos, foi realizada uma etapa final de extensão a 72°C, por 7 min. Como controle foram utilizados os oligonucleotídeos ITS 1 e ITS 4. Em seguida, as reações de amplificação foram aplicadas em gel de agarose 0,8% e submetidas a uma corrida eletroforética.

2.14. Caracterização molecular das linhagens transformantes

As reações de clivagem, utilizando enzimas de restrição que não clivam o vetor de inativação, foram aplicadas em gel de agarose 0,8% e após a corrida, transferidas para membranas de náilon (Duralon-UVTM, Stratagene), conforme descrito por Southern *et al.* (1975). A sonda utilizada para análise do padrão de integração foi o gene *pgg2* marcado com dUTP-fluoresceína segundo instruções do fabricante. A hibridização foi feita por 18 horas a 65°C e as lavagens das membranas duas vezes em SSC 2X, SDS 0,1% por 20 minutos e 2 vezes em SSC 1X, SDS 0,1% por 10 minutos a 65°C. A membrana foi colocada em contato com filme XOMAT K (Kodak), por uma hora à temperatura ambiente.

2.15. Obtenção do sobrenadante da cultura e determinação da atividade de poligalacturonase

Os transformantes contendo o gene *pgg2* inativado foram avaliados, quanto à produção da enzima poligalacturonase pela dosagem de açúcar redutor, pelo método do DNS (Miller, 1959). Para obtenção do filtrado da cultura, foram adicionados 5×10^7 conídios em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio mineral tamponado [MMNT - 6,980 g K_2HPO_4 , 5,44 g KH_2PO_4 , 1,0 g $(NH_4)_2SO_4$, em 1000 mL água destilada - pH 6,3] suplementado com $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,11%), sacarose ou pectina (0,3%) e extrato de levedura (0,06%), a 25 °C, sob agitação rotacional de 150 RPM por 48 horas. Para preparo da mistura de reação, foi adicionado 1 mL do sobrenadante da cultura a 1 mL de solução do substrato (4 mL de solução de NaCl 2,5 M, 0,6 g ácido poligalacturônico, 50 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,8 e água destilada em quantidade suficiente para 100 mL). O branco da reação foi feito, adicionando-se uma alíquota de 0,125 mL da mistura de reação, retirada no tempo zero, a um tubo contendo 0,5 mL de DNS e completando-se o volume para 1 mL com água destilada. Em seguida, a mistura de reação foi incubada a 40 °C por 20 minutos. Uma alíquota de 0,125 mL da mistura de reação foi retirada, após 20 minutos, e adicionada a um tubo contendo 0,5 mL de DNS, sendo o volume completado para 1 mL com água destilada. Os tubos foram mantidos a 95-100°C por 5 minutos e, em seguida, o volume de cada tubo, completado para 5 mL com água destilada. A leitura da absorvância foi realizada a 540 nm. Para determinar a quantidade de ácido galacturônico presente na amostra, foi construída uma curva padrão para o ácido galacturônico. Para cada transformante analisado, foi utilizada a atividade enzimática da linhagem PG63 como padrão para comparações. A atividade enzimática foi expressa em μ moles de ácido galacturônico liberado por minuto de reação.

2.16. Avaliação do crescimento fúngico

A produção de massa micelial foi quantificada pela coleta do micélio em peneira de 400 malhas/polegada² (37 μ m de poro), seguida por sua lavagem com água destilada, acondicionamento em cadinhos de papel alumínio e secagem a 105°C até a obtenção de massa constante (Calam, 1969).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Identificação de cis-elementos na região promotora do gene *p_{gg1}* de *Penicillium griseoroseum*.

Para verificar a funcionalidade do possível cis-elemento TAATA na expressão do gene *p_{gg1}*, um fragmento de DNA de 100 pares de bases contendo a seqüência TATATAA localizada na posição -93 em relação ao ponto +1 da tradução foi empregado como sonda em ensaios de ligação com extratos protéicos nucleares preparados a partir de micélio cultivado em meio mineral contendo pectina como única fonte de carbono suplementado com extrato de levedura por 76 horas a 25 °C. A Figura 2 mostra sinal de interação de proteínas nucleares com o fragmento de DNA de 100 pares de bases, indicando que o mesmo apresenta sítios para a ligação de fatores protéicos, sugerindo que a seqüência TATATAA exerce um papel importante na montagem do complexo de iniciação da transcrição do gene *p_{gg1}* de *P. griseoroseum*.

Seqüências TAATA são encontradas nas regiões promotoras de muitos genes eucarióticos, geralmente localizadas entre -40 e -120 nucleotídeos do sítio de início da transcrição e apresentam um papel importante para a acurácia e eficiência do início da transcrição. Embora o elemento TATA box seja encontrado na maioria dos genes eucarióticos, em alguns casos ele está ausente (Punt *et al.*, 1995; Latchman, 2004).

Extrato nuclear	-	-	+	+	+	+	+	+
Competidor	-	-	-	20x	50x	-	-	-
Poli (dIdC)	-	-	-	-	-	10x	20x	50x

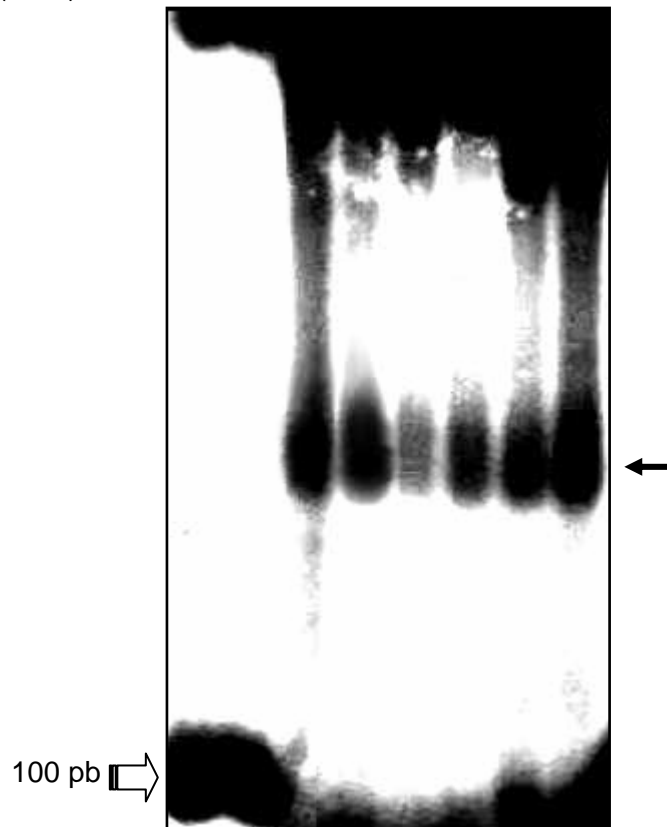


Figura 2. Ensaio de retardamento em gel da interação DNA-proteína entre extratos nucleares de *Penicillium griseoroseum* e o fragmento de DNA de 100 pb do gene *pgg1*, que contém o cis-elemento TATATAA. Este fragmento foi incubado na ausência e na presença de 10 µg de proteínas do extrato nuclear preparado a partir de micélio cultivado em pectina e extrato de levedura, por 76 horas, e do competidor específico (fragmento de 100 pb não marcado) com excesso molar de vinte e cinquenta vezes. O competidor inespecífico poli dIdC foi adicionado com excesso molar de dez, vinte e 50 vezes. A seta à direita indica a posição da banda correspondente ao complexo DNA-proteína

3.2 - Identificação de cis-elementos na região promotora do gene *p_{gg}2* de *P. griseoroseum*.

O gene *p_{gg}2* foi descrito em trabalhos anteriores como um modelo interessante para estudos de regulação transcricional, devido aos seus altos níveis de expressão em diferentes tempos e condições de cultivo mesmo na presença de açúcares não indutores como sacarose, diferente do gene *p_{gg}1* que somente se expressa na presença de pectina e após 76 horas de cultivo. O gene *p_{gg}2* é sujeito à repressão catabólica por glicose, entretanto, transcritos de *p_{gg}2* são detectados em preparações de RNA total obtidas a partir de micélio cultivado em meio contendo glicose e extrato de levedura mostrando que a presença do extrato de levedura, de alguma maneira diminui a repressão por esse açúcar (Ribon *et al.*, 2002).

Ribon (2001) avaliou a região 5' do gene *p_{gg}2* (Figura 1B) e detectou diversos cis-elementos, que são sítios prováveis de ligação para proteínas reguladoras que poderiam estar envolvidas na regulação da expressão do gene *p_{gg}2*. Neste trabalho, foi avaliada a relevância de alguns desses possíveis cis-elementos para a expressão do gene *p_{gg}2*. Inicialmente foi testado se o cis-elemento CCAAT localizado a -270 pb do códon de início da tradução representava um sítio para a ligação de proteínas. Tendo em vista que cis-elementos CCAAT têm sido referidos como sítios de ligação para proteínas que modulam a expressão de genes eucarióticos, consideramos que esse elemento poderia ser importante para a constante expressão de *p_{gg}2* observada nos trabalhos anteriores.

Extratos nucleares foram preparados a partir de micélio de *P. griseoroseum* cultivado em meio mineral contendo pectina como única fonte de carbono por 24 horas e utilizados em ensaios de interação DNA-proteínas, usando inicialmente um fragmento de 170pb contendo o possível cis-elemento CCAAT (Nagata *et al.*, 1993; Ribon *et al.*, 2002). A Figura 3 evidencia a presença de uma banda correspondente a um complexo DNA-proteína indicando que proteínas no extrato nuclear reconhecem o elemento CCAAT presente no fragmento de 170 pb (Figura 3). Outra indicação da funcionalidade desse cis-elemento foi obtida com um ensaio de ligação usando o oligonucleotídeo dupla fita de 21 pares de base contendo o sítio CCAAT como sonda, onde se observou também a formação de complexos. Além disso, a substituição da seqüência CCAAT por CGTAGG praticamente aboliu a formação de complexos DNA-proteína específicos, confirmando que CCAAT é um sítio para a ligação de proteínas reguladoras ou fatores de transcrição (Figura 4).

Extrato nuclear	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Competidor	-	-	10X	20X	50X	-	-	-	-
Poli (dIdC)	-	-	-	-	-	5X	10X	20X	50X

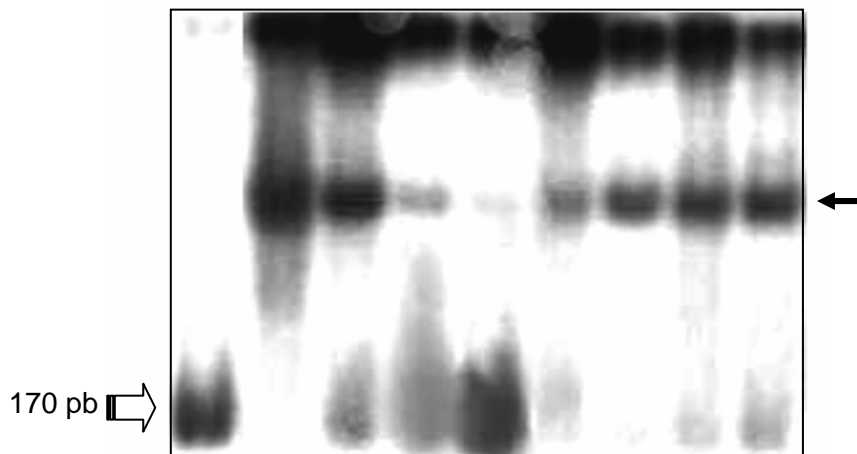


Figura 3. Ensaio de retardamento em gel da interação DNA-proteína entre extratos protéicos nucleares de *Penicillium griseoroseum* e o fragmento de DNA de 170 pb (5ng) do gene *pgg2*, que contém o cis-elemento CCAAT. Este fragmento foi incubado na ausência e na presença de 10 µg de proteínas do extrato nuclear preparado a partir de micélio cultivado em pectina e extrato de levedura, por 24 horas, e do competidor específico (fragmento de 170pb não marcado) com excesso molar de dez, vinte e cinqüenta vezes. O competidor inespecífico (poli dIdC) foi adicionado com excesso molar de cinco, dez, vinte e 50 vezes. A seta da direita indica a posição da banda correspondente ao complexo DNA- proteína.

Extrato nuclear	-	+	+	+	+
Competidor	-	-	25 X	50X	-
Oligo mutado	-	-	-	-	+

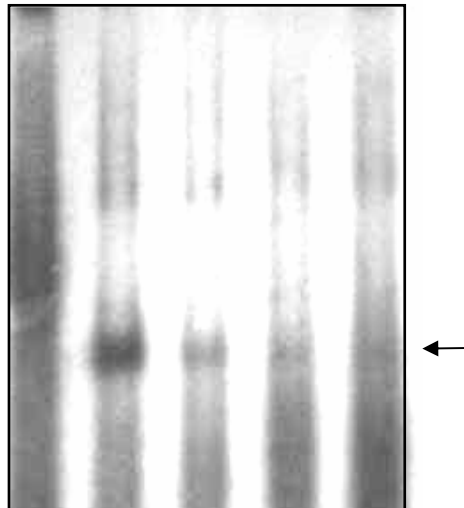


Figura 4. Ensaio de retardamento em gel da interação DNA-proteína entre extratos nucleares de *Penicillium griseoroseum* e o fragmento de DNA dupla fita de 25 pb obtido a partir dos oligonucleotídeos sintéticos CAAT1 e CAAT2 e CAATmut1 e CAATmut2 contendo o possível elemento CAAT do gene *pgg2*. Estes fragmentos foram incubados na ausência e na presença de 10 µg de proteínas do extrato nuclear preparado a partir de micélio cultivado em pectina e extrato de levedura, por 24 horas. O competidor específico (fragmento de 100 pb não marcado) foi adicionado com excesso molar de vinte e cinco e cinqüenta vezes. A seta indica a posição da banda correspondente ao complexo DNA- proteína.

Em um contexto geral, estes resultados mostraram que a seqüência CCAAT no gene *pgg2* é responsável pela ligação de complexos protéicos presentes nos extratos nucleares obtidos de micélio de *P. griseoroseum* cultivado sob condições de indução e pode ser importante para a expressão desse gene *in vivo*. Considerando que pectina e sacarose ativam a transcrição do gene *pgg2* nas 24 horas iniciais do cultivo *in vitro*, é razoável inferir que a seqüência CCAAT pode estar envolvida na expressão do gene de poligalacturonase também em outras fontes de carbono. Sacarose não é um constituinte normal da molécula de pectina, então a ativação gênica pode ocorrer de maneira diferente não exclusiva para o sistema pectinolítico a qual pode ser uma via geral controlada por um elemento CCAAT. É provável que este elemento regule a expressão do gene *pgg2* em pectina mas não esteja envolvido na regulação da expressão do gene *pgg1* que é induzido somente por pectina após 76 horas de cultivo do fungo (Ribon *et al.*, 2002). Isso coincide com a inexistência de uma seqüência CCAAT no promotor do gene *pgg1* (Figura 1). CCAAT “boxes” têm sido relatados como moduladores da transcrição em eucariotos e sua funcionalidade tem sido reportada para alguns genes que codificam outras enzimas que degradam os constituintes da parede celular vegetal, tais como celulase e xilanase e também enzimas de importância biotecnológica, como por exemplo a amilase e isopenicilina sintase (Raymondjean *et al.*, 1988; Litzka *et al.*, 1996; Zeilinger *et al.*, 1996; Zeilinger *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 2000). Ligação de proteínas a estas seqüências tem sido identificada em *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa* à semelhança do complexo HAP de *Saccharomyces cerevisiae* (Litzka *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998; Steidl *et al.*, 1999; de Vries *et al.*, 2001). Até o momento, proteínas homólogas a estas ainda não foram descritas em *Penicillium*.

Como mencionado anteriormente, o gene *pgg2* é expresso quando o fungo é cultivado em meio de cultura contendo glicose suplementado com extrato de levedura mas não em meio contendo apenas glicose (Ribon *et al.*, 2002). Próximo do CCAAT box (-270) existe um elemento GAGGGG (-264) reconhecido como sítio para ligação da proteína repressora CREA em outros fungos filamentosos. Deste modo, sob condição de repressão uma proteína similar a CREA poderia reconhecer e se ligar ao sítio reconhecido pelo fator ativador, inibindo a transcrição de *pgg2*. No entanto, a presença de extrato de levedura no meio de cultura modula a resposta de indução sugerindo a participação de um ativador transcricional. Considerando que o extrato de levedura tem sido reportado estar envolvido na produção de pectina liase em *P. griseoroseum* devido à elevação dos níveis de AMPc e trabalhos têm identificado um elemento de resposta a AMPc no promotor de alguns genes de fungos filamentosos, foi feita uma avaliação da seqüência da região promotora do gene *pgg2* com particular interesse em possíveis elementos de resposta a AMPc visando uma explicação para esse padrão de expressão (Baracat-Pereira *et al.*, 1999; Fox *et al.*, 2000; Conkright *et al.*, 2003).

O elemento que mais se assemelhou à seqüência C/T/G/TGACGTCAA/C descrita na literatura foi uma seqüência CTACAGTG invertida localizada a -757 em relação ao códon de início da tradução ATG (Figura 1). Ribon (2001) realizou um ensaio de interação DNA-proteína onde foi verificada a formação de complexo entre um fragmento de 118 pb contendo esse possível cis-elemento e proteínas do extrato nuclear preparado a partir de micélio cultivado na presença de pectina ou glicose suplementado com extrato de levedura. Para confirmar o papel dessa seqüência na expressão de *pgg2* na presença de glicose e extrato de levedura, foram preparados extratos nucleares brutos de micélio de *P. griseoroseum* cultivado em glicose e extrato de levedura e foram realizados ensaios de ligação de DNA-proteína utilizando como sonda um oligonucleotídeo dupla fita de 23 pb contendo a referida seqüência. A Figura 5 mostra que não houve formação de complexos DNA-proteína quando se usou esse oligonucleotídeo nos ensaios de ligação. Considerando que os extratos nucleares apresentavam boa qualidade (Figura 6), isso demonstra que essa seqüência não é um sítio para a ligação de fatores protéicos. No entanto, considerando os resultados obtidos por Ribon (2001), não se pode descartar que o fragmento de 118 pb usado como sonda possua uma seqüência alvo para proteínas regulatórias e para comprovar isso são necessários estudos adicionais.

Talvez a ligação da proteína regulatória a um sítio nesse fragmento neutralize parcialmente o efeito de uma proteína homóloga à proteína CREA ligada ao sítio GAGGGG (-264) e esteja envolvida no recrutamento da maquinaria de transcrição, permitindo a expressão do gene quando o fungo é cultivado em glicose e extrato de levedura. Não se pode descartar que esta função é realizada por outros co-ativadores ligados em outros sítios na região promotora de *pgg2*. Considerando que muitas perguntas sobre a regulação da expressão desse gene permanecem sem respostas, estudos adicionais ainda são necessários para determinar a relação entre a ligação de reguladores transcricionais “*in vivo*” e o nível de expressão do gene.

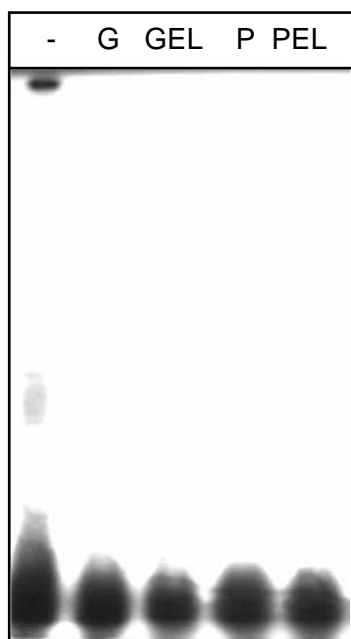


Figura 5. Ensaio de retardamento em gel da interação DNA-proteína entre extratos nucleares de *Penicillium griseoroseum* e o fragmento de DNA dupla fita de 25 pb obtido a partir dos oligonucleotídeos sintéticos CRER e CREF, contendo o possível elemento de resposta ao cAMP do gene *pgg2*. Este fragmento foi incubado na ausência e na presença de 10 µg de proteínas do extrato nuclear preparado a partir de micélio cultivado em glicose (G), glicose e extrato de levedura (GEL), pectina (P) e pectina e extrato de levedura (PEL), por 24 horas.

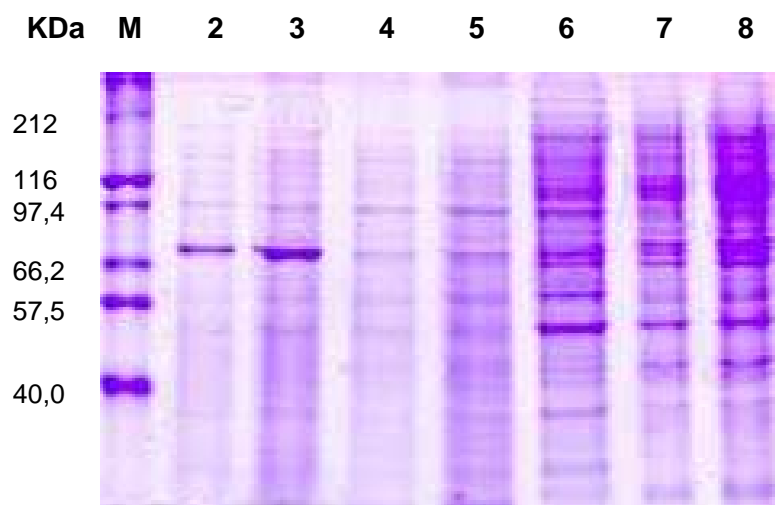


Figura 6. Perfil de proteínas dos extratos nucleares de *Penicillium griseoroseum* separadas por SDS-PAGE. O fungo foi cultivado em pectina e extrato de levedura (2-3), pectina (4-5), glicose e extrato de levedura (6) e sacarose e extrato de levedura (7-8). M: Marcador de massa molecular.

3.3 - Inativação do gene *pgg2* e avaliação da atividade da PGII na atividade total de poligalacturonase em *Penicillium griseoroseum*.

Trabalhos anteriores sugerem que o gene *pgg2* codifica a poligalacturonase mais abundante em sobrenadantes de culturas de *P. griseoroseum* e que essa PG é a mais promissora para aplicação industrial, considerando suas propriedades físico-químicas (D'Ângelo, 1998; Ribon *et al.*, 2001, Ribon *et al.*, 2002). Para avaliar a contribuição da expressão de *pgg2* na atividade total de PG foram realizados diversos experimentos visando à inativação desse gene.

3.3.1 - Construção do vetor de inativação pPG15*pgg2*Δ*nia*fo

Para a construção do vetor de inativação do gene *pgg2* de *P. griseoroseum*, os plasmídeos pPG15, contendo o gene *pgg2* e o plasmídeo pNH24, contendo o gene *nia* de *Fusarium oxysporum* foram clivados com as enzimas de restrição *Bal* I e *Hind* III, respectivamente. A Clivagem do plasmídeo pPG15 liberou um fragmento de DNA de 200pb da porção central do gene *pgg2* e um fragmento de 4,3 Kb. A clivagem do plasmídeo pNH24 gerou um fragmento de 4,0Kb correspondente ao gene *nia* e um de 2,89Kb correspondente ao vetor pUC18. Os fragmentos de DNA de 4,3 e 4,0 Kb foram tratados com a enzima nuclease S1 e ligados entre si originando o plasmídeo pPG15*pgg2*Δ*nia*fo, contendo o gene *pgg2* mutado pela inserção do gene *nia* na sua região codificadora. A estratégia usada na construção do vetor de inativação está esquematizada na Figura 7.

3.3.2 - Inativação do gene *pgg2* de *P. griseoroseum*

Visando a obtenção de transformantes contendo o gene *pgg2* inativado, vários experimentos de transformação foram realizados utilizando o plasmídeo pPG15*pgg2*Δ*nia*fo. Foram obtidos 653 transformantes, sendo a eficiência de transformação de 30 transformantes por micrograma de DNA.

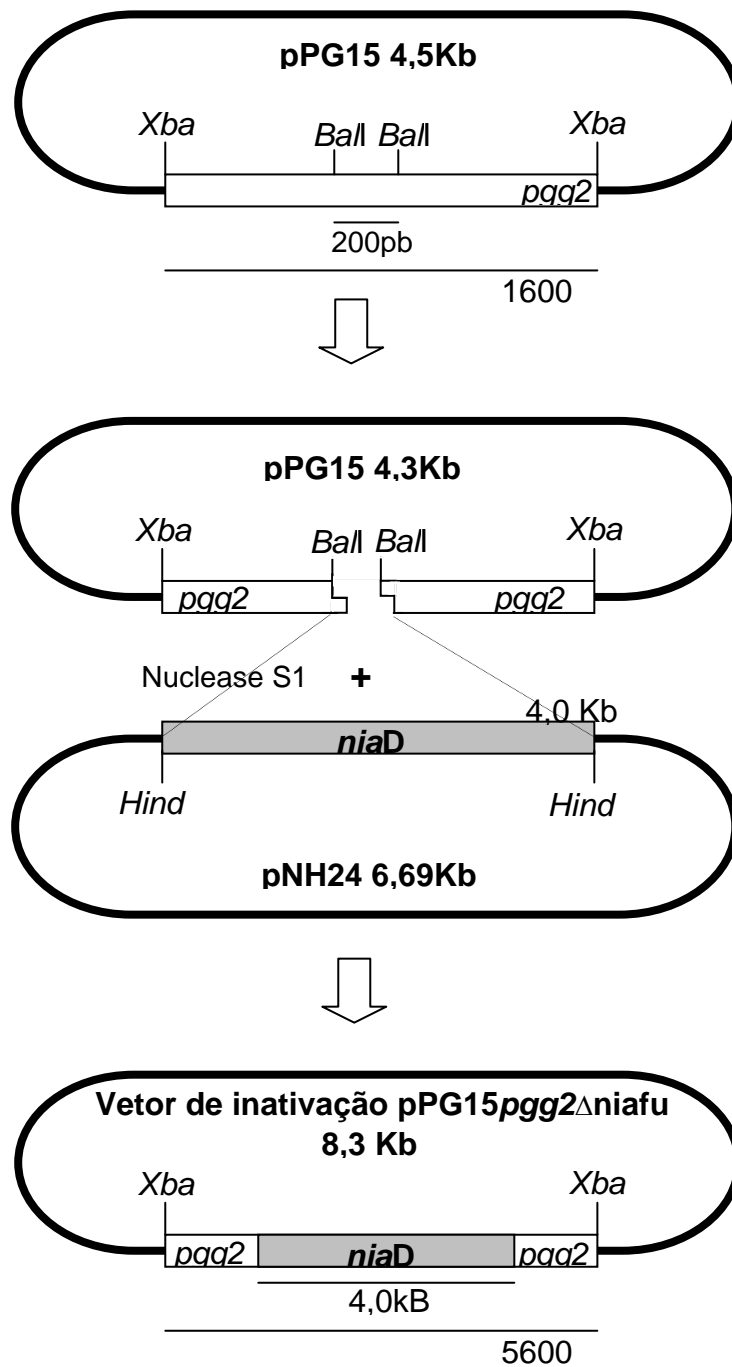


Figura 7. Construção do vetor de inativação pPG15pgg2Δniafu. O plasmídeo pPG15 contendo o gene *pgg2* de *Penicillium griseoroseum* foi clivado com a endonuclease de restrição *Bal* I liberando um fragmento de DNA de 200 pb. Um fragmento de DNA de 4,0 Kb *Hind* III do plasmídeo pNH24 correspondente ao gene *nia* de *Fusarium oxysporum* foi subclonado em substituição ao fragmento de DNA de 200 pb interrompendo o gene *pgg2*, originando o vetor de inativação. Os dois fragmentos de DNA utilizados na reação de ligação foram previamente tratados com nuclease S1.

Os transformantes contendo o *pgg2* inativado foram identificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos *pipg2* e *pfpg2*, que anelam no início e no final da região codificadora do gene, respectivamente. Esta estratégia baseou-se no fato de que o gene *pgg2* apresenta-se em cópia única no genoma de *P. griseoroseum* e que a amplificação do DNA total dos transformantes contendo a cópia do gene *pgg2* selvagem resultaria em um fragmento de DNA de 1,3 Kb, ao passo que a amplificação do DNA total dos transformantes contendo a cópia do gene *pgg2* mutada pela inserção do gene *nia* de *F. oxysporum* não amplificaria nenhum fragmento de DNA devido ao tamanho do gene mutado.

A Figura 8 mostra o resultado de reações de amplificação do DNA total de nove dos 150 transformantes analisados, onde se observou uma banda correspondente ao fragmento de DNA de 1,3 Kb em todas as canaletas, exceto naquelas correspondentes as reações utilizando DNA dos transformantes T6 e T8. A ausência de bandas nessas canaletas sugere que o gene *pgg2* foi inativado nessas linhagens transformadas. Para confirmar a inativação do gene *pgg2* de *P. griseoroseum*, o DNA total dos transformantes que não apresentaram o fragmento de PCR de 1,3 Kb foi clivado usando a enzima de restrição *Sal* I, os fragmentos resultantes foram separados por eletroforese em gel de agarose e hibridizados com o fragmento de 4,0 Kb/*Sal* I marcado com dUTP-fluoresceína. A Figura 9 mostra o padrão de hibridização de 5 transformantes demonstrando que a maioria dos transformantes apresentou uma banda de 4 Kb correspondente ao fragmento de DNA genômico que contém o gene *pgg2*, indicando que nessas linhagens transformantes esse gene permanece intacto. Por outro lado, pela análise do padrão de hibridização do transformante T6 observou-se a presença de uma banda de 8,1 Kb hibridizando com a sonda e ausência da banda de 4,0 Kb. A soma do fragmento de DNA genômico de 4,0 Kb contendo o gene *pgg2* com o fragmento de 4,4 Kb contendo o gene *nia* de *F. oxysporum* resulta num fragmento de 8,4 Kb, portanto, concluímos que a banda de 8,1 Kb corresponde ao gene *pgg2* interrompido pelo gene *nia*, e que esta é resultante da ocorrência de duplo “crossing over” levando à troca do alelo intacto pelo interrompido.

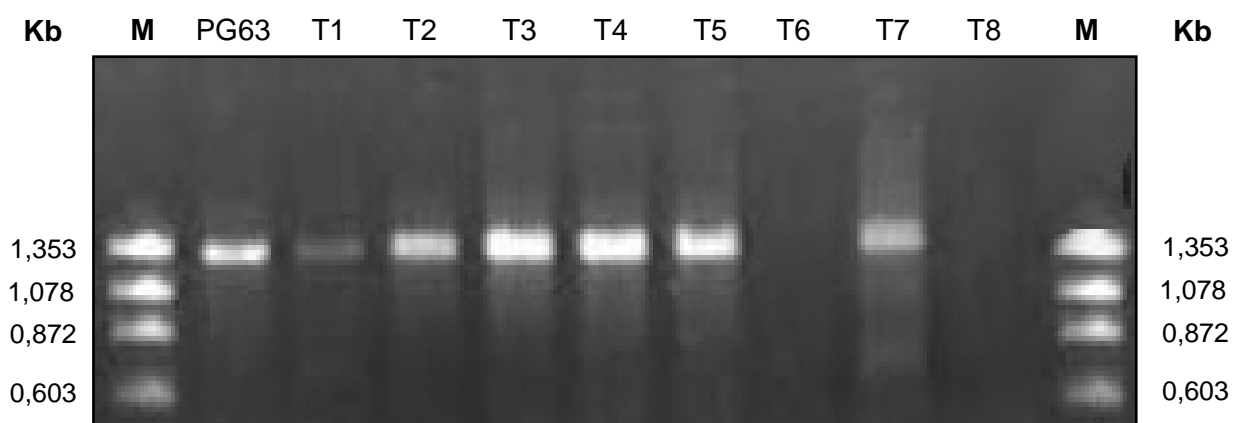
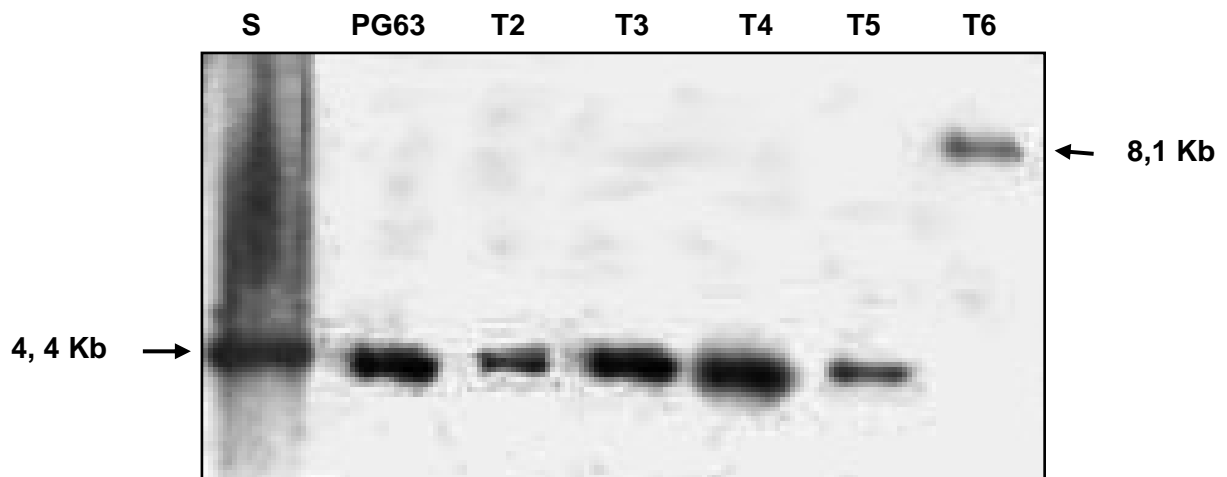


Figura 8. Reação da polimerase em cadeia (PCR) do DNA total da linhagem mutante PG63 e das linhagens transformantes (T) de *Penicillium griseoroseum* obtidos com o plasmídeo pPG15pgg2 Δ niafo. M: DNA do bacteriófago ϕ X174 clivado com a endonuclease de restrição *Hae* III.

(A)



(B)

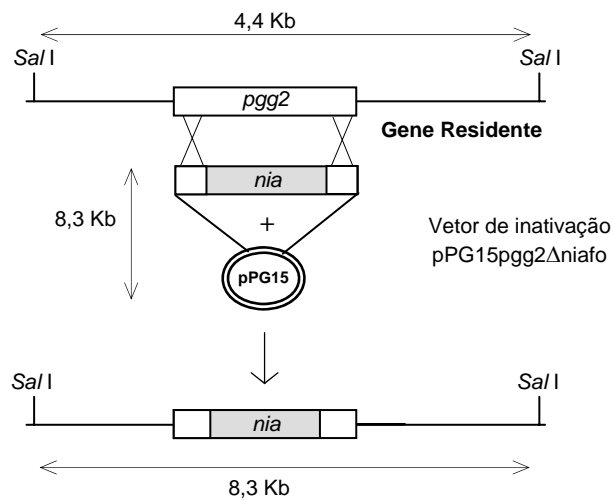


Figura 9. Análise do DNA total das linhagens recombinantes, obtidas por transformação da linhagem mutante PG63 com o vetor de inativação pPG15*pgg2*Δniafo, por hibridização. **A)** Auto-radiografia da hibridização do DNA total das linhagens transformantes (T) e da linhagem PG63 digerido com a enzima *Sal*I com o fragmento de DNA de 1,3 Kb, utilizado como sonda, correspondente à região codificadora do gene *pgg2* de *P. griseoroseum*, marcado com dUTP-fluoresceína. **B)** Desenho esquemático representando os eventos moleculares que deram origem ao transformante T6 contendo o gene *pgg2* inativado. S: Sonda.

Trezentos transformantes foram selecionados para realização de purificação monospórica. Cento e cinquenta desses transformantes foram analisados por PCR e apenas os transformantes T6 (dado não mostrado) e T8 (1,33%) apresentaram o padrão de integração do tipo troca gênica com substituição do gene selvagem pelo mutante (Figuras 8 e 9). Este é um resultado inesperado, considerando que Pereira *et al.* (2004) utilizando o gene *nia* de *P. griseoroseum* para transformar esse mesmo fungo, relatou a ocorrência de integração de uma única cópia do gene, por troca gênica, em 100 % dos transformantes analisados. Talvez essa diferença na taxa de eventos de integração do tipo troca gênica possa ser explicada pelo fato de se tratar de diferentes *loci*. Outro aspecto importante a ser considerado é o tamanho da região de homologia, o qual pode ter afetado a frequência de integração do tipo troca gênica pois Pereira *et al.* (2004) usou uma região de homologia bem maior do que a que foi utilizada neste trabalho.

Nenhum dos transformantes analisados apresentou integração de múltiplas cópias do vetor e integração em sítios ectópicos. Este dado contrasta com relatos de Ribeiro (2001) onde se observou integração ectópica de múltiplas cópias do gene *pepg1* no genoma de todos os transformantes de *Penicillium expansum*. Este dado é surpreendente, uma vez que *P. expansum* e *P. griseoroseum* são espécies muito relacionadas.

Adachi *et al.* (2002) relataram a obtenção de transformantes contendo os genes LEUC e ATR de *Mycosphaerella graminicola* interrompidos, sendo observado 4,3 % e 5,3 % de transformantes contendo os genes LEUC e ATR inativados, respectivamente, dentre todos os transformantes analisados. Estas frequências de transformantes contendo os genes alvos mutados são consideravelmente maiores do que as que foram observadas neste trabalho e isso pode ser devido ao fato de que esses autores usaram vetores de inativação contendo seqüências homólogas maiores. Eles utilizaram seqüências homólogas de 3,1 a 6,7 Kb, enquanto neste trabalho, foi utilizada uma seqüência com 1,4 Kb de homologia.

Ribon *et al.* (2002) avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono na expressão dos genes que codificam PG em *P. griseoroseum* por hibridização e RT-PCR. Transcritos do gene *pgg1* foram detectados apenas quando o fungo foi cultivado na presença de pectina, independente da adição de extrato de levedura. Por outro lado, transcritos do gene *pgg2* foram detectados quando o fungo foi cultivado na presença de pectina e sacarose, mas não na presença de glicose. Adição de extrato de levedura ao meio de cultura resultou em ligeira expressão deste gene. Considerando o padrão de expressão dos genes *pgg1* e *pgg2* de *P. griseoseoroseum* em meio de cultura contendo sacarose e pectina suplementados com extrato de levedura, essas fontes de carbono foram utilizadas no cultivo das linhagens transformadas T6 e T8, por um período de 48 ou 96 horas, para avaliação da atividade de PG. A Tabela 2 e a Figura 10 mostram a atividade de PG apresentada por essas linhagens.

Foi observado que os transformantes T6 e T8 não apresentaram atividade de PG quando cultivados em meio mineral tamponado contendo sacarose e extrato de levedura por 48 horas (Tabela 2). Esse resultado confirma a inativação do gene *pgg2* e está de acordo com os estudos de regulação da expressão dos genes que codificam poligalacturonase em *P. griseoroseum* realizados por Ribon *et al.* (2002) onde a maior expressão observada foi em relação ao gene *pgg2*. Além disso, D'Ângelo (1998) relatou que *P. griseoroseum* produz pelo menos três PGs quando cultivado na presença de pectina e extrato de levedura. Por analogia com outros fungos filamentosos e considerando os relatos de D'Ângelo (1998) é razoável supor que existe uma família multi-gênica com pelo menos três genes codificando as poligalacturonases em *P. griseoroseum* como observado para diversas espécies de *Aspergillus* (Bussink *et al.*, 1990, Bussink *et al.*, 1991). No entanto, Ribon *et al.* (1999 e 2002), após um laborioso trabalho de triagem do banco genômico deste fungo relatou o isolamento de apenas dois genes codificando endo-PGs mas não descartou a existência de um terceiro gene. Considerando a hipótese da existência de um terceiro membro da família de genes que codificam PG em *P. griseoroseum*, como sugerem os dados de D'Ângelo (1998), os resultados aqui apresentados indicam que esse gene também não se expressa quando o fungo é cultivado na presença de sacarose e extrato de levedura por até 96 horas (dados não mostrados).

Para avaliar a contribuição da expressão do gene *pgg2* na atividade total de poligalacturonase de *P. griseoroseum*, os transformantes T6 e T8 foram cultivados em meio mineral tamponado na presença de pectina e extrato de levedura por 96 horas e a atividade de PG foi analisada a partir de sobrenadantes das culturas. A Figura 10 mostra que a atividade de PG dos transformantes T6 e T8 representa apenas 10 e 12 %, respectivamente, da atividade de PG da linhagem PG63 indicando que em torno de 90% da atividade total de poligalacturonase de *P. griseoroseum* se deve à expressão do gene *pgg2*. Wagner *et al.* (2000) relataram o isolamento, a caracterização e a inativação de dois genes de PG de *P. olsonii*. Estes autores, no entanto, observaram uma predominância de atividade de PG acídica em relação à atividade de PG com ponto isoelétrico superior a 7,0, o que é contrastante com os nossos resultados, uma vez que *pgg2* codifica uma PG, cujo ponto isoelétrico, deduzido a partir da seqüência gênica, é de 8,4. Estes resultados se constituem em mais uma indicação do potencial do uso do gene *pgg2* em programas de melhoramento da produção de enzimas do complexo pectinolítico.

Tabela 2. Atividade de poligalacturonase dos transformantes T6 e T8 de *Penicillium griseoroseum*. Os ensaios enzimáticos foram realizados a partir de sobrenadantes da cultura da linhagem PG63 (controle) e dos transformantes cultivados em meio mineral tamponado contendo sacarose e extrato de levedura, a 25 °C, 150 RPM, por 48 horas.

Linhagem	Atividade relativa*	Massa seca (gL ⁻¹)
PG63	1,0	4,66
T6	Nula	4,41
T8	Nula	3,55

*Atividade de PG das linhagens transformantes em relação à da linhagem PG63

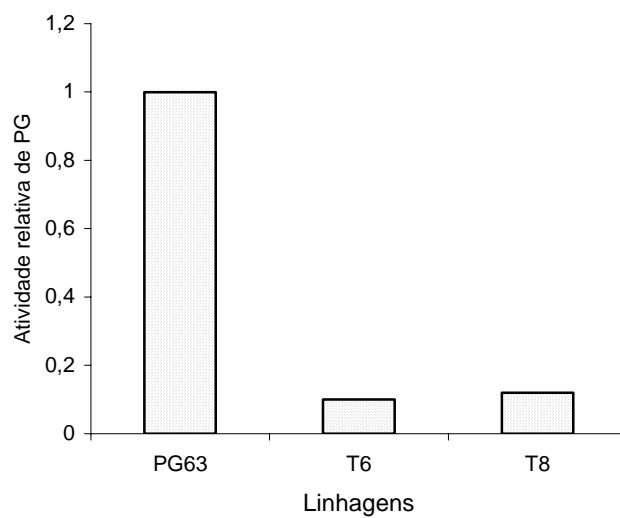


Figura 10. Avaliação da atividade de poligalacturonase dos transformantes T6 e T8 de *Penicillium griseoroseum* em relação à linhagem PG63. Os ensaios enzimáticos foram realizados a partir de sobrenadantes da cultura da linhagem PG63 (controle) e dos transformantes cultivados em meio mineral tamponado contendo pectina e extrato de levedura, a 25 °C, 150 RPM, por 96 horas.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi, K.; Nelson, G. H.; Peoples, K. A.; Frank, S. A., Montenegro-chamorro, M. V.; DeZwaan, T. M.; Ramamurthy, L.; Shuster, J. R.; Hamer, L.; Tanzer, M. M. Efficient gene identification and targeted gene disruption in the wheat blotch fungus *Mycosphaerella graminicola* using TAGKO. *Curr. Genet.*, 42(2):123-7, 2002.
- Azevedo, J. L., Costa, S. O. P. Exercícios práticos de genética. São Paulo: Ed. Nacional, EDUSP, 288p - 1973.
- Bailey, M. J.; Pessa, E. Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 12:266-271, 1990.
- Ballance, D. J.; Turner, G. Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 36:321-331, 1985.
- Baracat, M. C.; Valentim, C.; Muchoveej, J. J.; Silva, D. O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibres. *Biotechnol. Lett.*, 11:899-902, 1989.
- Baracat-Pereira, M. C, Coelho, J. L. C, Minussi, R. C., Chaves-Alves, V. M., Brandão, R. L., Silva, D. O. Cyclic AMP and low molecular weight effector(s) present in yeast extract are involved in pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 76:129-141, 1999.
- Bazzolli, D. M. S. Comunicação pessoal. 2005.
- Benen, J., Parenicová, L., Kusters van Someren, M., Kester, H., Visser, J. Molecular genetic and biochemical aspects of pectin degradation in *Aspergillus*. In: Visser, J., Voragen, A. G. J. (Eds.). *Pectins and Pectinases*, 331-348, 1996.
- Bradford, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72:248-254, 1976.

- Bussink, H. J. D., Brower, K. B., De Graaff, L. H., Kester, H. C. M.; Visser, J. Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger*. *Curr. Genet.*, 20: 301-307, 1991a.
- Bussink, H. J. D., Buxton, F. P.; Visser, J. Expression and sequence comparison of the *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubigensis* genes encoding polygalacturonase II. *Curr. Genet.*, 19:467-474, 1991b.
- Bussink, H. J. D., Kester, H. C. M.; Visser, J. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding prepro-polygalacturonase II of *Aspergillus niger*. *Febs*, 273:127-130, 1990.
- Calam, C. T. The evaluation of micelial growth. In: Norris, J.R., Ribbons, D.W. (Ed.). *Methods Microbiol.*, Lodon; Academic Press, I:567-591, 1969.
- Chen, H., Crabb, J. W., Kinsey, J. A. The *Neurospora aab-1* gene encodes a CCAAT binding protein homologous to yeast HAP5. *Genetics*, 148:123-130, 1998.
- Conkright, M. D., Guzman, E., Flechner, L., Su, A. I., Hogenesch, J. B., Montminy, M., 2003. Genome-wide analysis of CREB target genes reveals a core promoter requirement for cAMP responsiveness. *Mol. Cell.*, 11:1101-1108.
- D'Angelo, M. A. C. Purificação Parcial e caracterização de poligalacturonases de *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, MG:UFV, 53p. (Monografia) Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- de Vries, R. P, Visser J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microb. Mol. Biol. Rev.*, 65:497, 2001.
- Diolez, A.; Langin, T.; Gerlinger, C.; Brygoo, Y.; Daboussi, M. J. The *nia* gene of *Fusarium oxysporum*: isolation, sequence and development of a homologous transformation system. *Gene*, 131:61-67, 1993.
- Fox, M. E., Yamada, T., Ohta, K., Smith, G. R. A family of cAMP-response-element-related DNA sequences with meiotic recombination hotspot activity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 156:59-68, 2000.
- Ghildyal, N. P., Ramakrishna, S. V., Devi, P. N., Lonsane, B. K.; Asthana, H. N. Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation. *J. Food Sc. Technol.*, 18:248-251, 1981.
- Ishida, Y., Kakibuchi, K, Hirao, Y, Izumori, K. Cloning and characterization of a polygalacturonase-encoding gene from *Penicillium janthinellum*. *J. Ferment. Bioeng.*, 84:257-260, 1997.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
- Latchman, D. S. DNA sequences, transcription factors and chromatin structure. In: *Eucaryotic transcription factors*. 4th Edition. p 01-22. 2004.

- Litzka, J. O. J.; Then, B. J. K. J.; Brakhage, J. A. A. The *Aspergillus nidulans* penicillin-biosynthesis gene *aat* (*penDE*) is controlled by a CCMT-containing DNA element. *Eur. J. Biochem.*, 238:675-682, 1996.
- Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31:426-428, 1959.
- Nagata, O., Takashima, T., Tanaka, M., Tsukagoshi, N. *Aspergillus* nuclear proteins bind to a CCAAT element and the adjacent upstream sequence in the promoter region of the starch-inducible Taka-amylase A gene. *Mol. Gen. Genet.*, 237:251-260, 1993.
- Parenticová, J. L. Benen, J. A. E; Kester, H. C. M., Visser J. *pgaE* encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.*, 251:72-80, 1998.
- Pereira, J. F.; Queiroz, M. V.; Lopes, F. J.; Rocha, R. B.; Daboussi, M. J.; Araújo, E. F. Characterization, regulation, and phylogenetic analyses of the *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase gene and its use as selection marker for homologous transformation. *Can. J. Microbiol.*, 50(11):891-900, 2004.
- Pontecorvo, G.; Roper, J. A.; Hemmons, L. M.; MacDonald, K. D., Bufton, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. in Genet.*, 5:141-238, 1953.
- Queiroz, M. V.; Barros, A. O.; Barros, E. G.; Guimarães, W. V.; Araújo, E. F. Transformation of *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase mutant with the *nia* gene from *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Microbiol.*, 44:1-3, 1998.
- Raymondjean, M., Cereghini, S., Yaniv, M. Several distinct "CCAAT" box binding proteins coexist in eukaryotic cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 85:757-761, (1988).
- Reymond, P., Deléage, J. G., Rasclé, C. J.; Fêvre, M. Cloning and sequence analysis of a polygalacturonase-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Gene*, 146:233-237, 1994.
- Reymond-Cotton, J. P. J.; Fraissinet-Tachet, J. L.; Fêvre, M. Expression of the *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase *pgl* gene: possible involvement of CREA in glucose catabolite repression. *Curr. Genet.*, 30:240-245, 1996.
- Ribeiro, J.B. Isolamento e caracterização de genes que codificam para poligalacturonase e transformação de *Penicillium expansum*. Viçosa, MG: UFV, 57p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- Ribon, A.O.B. Organização e regulação de genes que codificam poligalacturonase em *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, MG: UFV, 85p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- Ribon, A. O. B., Coelho, J. L. C., Barros, E. G., Araújo, E. F. Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Penicillium griseoroseum*. *Biotechnol. Lett.*, 21:395-399, 1999.

- Ribon, A. O. B., Queiroz, M. V., Coelho, J. L. C., Araújo, E. F. Differential expression of polygalacturonase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum* in different carbon sources. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 29:145-148, 2002.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98:503-517, 1975.
- Speacht, C. A.; Dirusso, C. C.; Novotny, C. P.; Ullrich, R. C. A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Analyt. Biochem.*, 119:158-163, 1982.
- Steidl, S., Papagiannopoulos, P., Litzka, O., Andrianopoulos, A., Davis, M. A., Brakhage, A. A., Hynes, M. J. AnCF, the CCAAT binding complex of *Aspergillus nidulans*, contains products of the *hapB*, *hapC*, and *hapE* genes and is required for activation by the pathway-specific regulatory gene *amdR*. *Mol. Cell. Biol.*, 19:99-106, 1999.
- Tanaka, A., Kato, M., hashimoto, H., Kamei, K. I, Naruse, F., Papagiannopoulos, P., Davis, M. A., Hynes, M. J., Kobayashi, T., Tsukagoshi, N. An *Aspergillus oryzae* CCMT-binding protein, AoCP, is involved in the high-level expression of the taka-amylase A gene. *Curr. Genet.*, 37:380-387, 2000.
- Wagner, F., Kusserow, H., Schäfer, W. Cloning and targeted disruption of two polygalacturonase genes in *Penicillium olsonii*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 186:293-299, 2000.
- Wubben, J. P., ten Have, A., van Kan, J. A. L., Visser, J. Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. *Curr. Genet.*, 37: 152-157, 2000.
- Zeilinger S., Mach, R. L., Schindler. M., Herzog, P. Kubicek. C. P. Different inducibility of expression of the two xylanase genes *xyn1* and *xyn2* in *Trichoderma reesei*. *Biol. Chem.*, 271:25624-25629, 1996.
- Zeilinger, S., Mach, R. L, Kubicek, C. P. Two adjacent protein binding motifs in the *cbh2* (cellobiohydrolase II-encoding) promoter of the fungus *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cooperate in the induction by cellulose. *J. Biol. Chem.*, 51:34463-34471, 1998.

CAPÍTULO 2

OBTENÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE *Penicillium griseoroseum* COM ALTA PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE

1 - INTRODUÇÃO

Espécies de *Penicillium* produzem múltiplas formas da enzima poligalacturonase (PG), a qual juntamente com outras enzimas do complexo pectinolítico, estão envolvidas na quebra da molécula de pectina, um polissacarídeo complexo, presente na lamela média e parede celular de plantas (Miranda, 1997, D'Ângelo, 1998, Vries *et al.*, 1986, Kawano *et al.*, 1999). Essas enzimas são de grande interesse econômico, devido à sua aplicação industrial, como na indústria de alimentos para o processamento de sucos e na indústria têxtil para a desengomagem de fibras vegetais para a fabricação de tecidos (Bailey e Pessa, 1990; Kashyap *et al.*, 2001).

Baracat *et al.*, (1989) relataram que *Penicillium griseoroseum* e *P. expansum* apresentam considerável atividade de poligalacturonase associada a baixa atividade de celulase, mostrando o potencial dessas espécies para aplicação na indústria têxtil. Além disso, esses fungos não produzem ocratoxina, citrinina nem patulina nas condições de produção das pectinases o que os torna interessantes para a indústria de alimentos (Ferreira, 2000; Vivan, 2002; Visôto, 2003). Diversos trabalhos foram realizados visando a

otimização da produção de pectinases em *Penicillium* spp (Freitas, 1991; Geöcze *et al.*, 1995; Piccoli-Valle *et al.*, 1995; Soares-Ramos, 1996; Baracat-Pereira *et al.*, 1997; Minussi *et al.*, 1997; Baracat-Pereira *et al.*, 1999). Ribon *et al.* (1999 e 2002) isolaram e caracterizaram dois genes, *pgg1* e *pgg2*, que codificam PG em *P. griseoroseum*. Foi demonstrado que a expressão desses genes é transcricionalmente regulada e que o gene *pgg1* se expressa apenas a partir de 72 h de cultivo na presença de pectina, enquanto *pgg2* apresenta expressão em todos os tempos estudados a partir de 24 horas de cultivo em pectina ou sacarose e extrato de levedura. O gene *pgg2* codifica uma PG de 376 aminoácidos com ponto isoelétrico deduzido de 8,4. D'Ângelo (1998) demonstrou que a PGII apresenta baixo Km, atua em uma faixa de temperatura ampla e em pH baixo, o que indica o potencial do gene *pgg2* para ser utilizado no melhoramento visando o aumento da produção de PG por obtenção de linhagens com maior número de cópias do gene no genoma, pois, além da otimização das condições fisiológicas, é necessário a obtenção de linhagens, geneticamente melhoradas, para aplicação industrial deste fungo.

Ribeiro (2001) realizou a transformação de *P. expansum* com o gene *pepg1* que codifica PG neste mesmo fungo. O gene *pepg1* foi isolado por Dias (1997) e caracterizado por Ribeiro (2001), apresentando 100 % de homologia com o gene *pgg2* de *P. griseoroseum*. Foram obtidas linhagens transformantes com quase duas vezes a atividade de poligalacturonase produzida pelo isolado selvagem. No entanto, o aumento na produção de poligalacturonase nesses transformantes é insuficiente para aplicação industrial, sendo a baixa produção de PG atribuída aos complexos mecanismos envolvidos na regulação da expressão do gene. O aumento do número de cópias de genes que codificam pectinases foi utilizado com grande sucesso em diversas espécies de *Aspergillus*, produzindo linhagens com alta produção de PG, pectina liase (PL) e pectina esterase (Bussink *et al.*, 1991; Someren *et al.*, 1991; Khanh *et al.*, 1991), todavia não apresentou bons resultados para produção de PG e PL em *P. expansum* e *P. griseoroseum*, sendo relatado aumentos de no máximo 3 vezes em relação aos isolados selvagens após análise de mais de 1700 transformantes (Ribeiro, 2001 e Cardoso, 2004).

Outra estratégia que pode ser usada para obtenção de linhagens produtoras de PG é a substituição do promotor endógeno por um que seja constitutivo e forte, o que tem sido possível graças ao grande número de promotores fortes disponíveis, tais como, os promotores dos genes de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpdA*) de *Aspergillus nidulans* (Punt *et al.*, 1990 e 1992), de celobiohidrolase I (*cbh1*) de *Trichoderma reesei* (Shoemaker *et al.*, 1983), de glutamato desidrogenase (*gdhA*) de *Aspergillus awamori* (Cardoza *et al.*, 1998), de isopenicilina N-sintase (*pcbC*) (Gutiérrez *et al.*, 1997), de endoxilase (*xyIP*) de *Penicillium chrysogenum*, dentre outros.

Margolles-Clark *et al.* (1996) construíram um vetor de expressão colocando a região estrutural do gene que codifica uma endoquitinase de *Trichoderma harzianum* sob o controle do promotor de celulase (*cbh1*) de *T. reesei*, obtendo aumento de 10 vezes na atividade de quitinase na maioria dos transformantes analisados. Haran *et al.* (1993) também obtiveram sucesso na transformação de *T. harzianum* com o gene de quitinase de *Serratia marcescens* sob o controle do promotor constitutivo 35 S. O promotor *gpdA* de *Aspergillus nidulans* tem sido empregado na expressão de proteínas homólogas e ou heterólogas em diversas espécies de fungos filamentosos incluindo espécies do gênero *Penicillium* (Van Gorcom *et al.*, 1986; Punt *et al.*, 1987; Kolar *et al.*, 1988; Lopes, 2004; Cardoso, 2004; Penttilä *et al.*, 1987).

Além das características genéticas, é importante avaliar as condições de cultivo do fungo para melhorar a produção da enzima. Segundo Frost e Most (1987), a escolha de meios adequados e das demais condições de cultivo do microrganismo pode intensificar os processos metabólicos do fungo e, conseqüentemente, contribuir para o aumento da produção da enzima.

Tendo em vista o potencial de *P. griseoroseum* como organismo produtor de enzimas pectinolíticas e a ampla aplicação industrial dessas enzimas, o presente trabalho teve como objetivos construir um vetor de expressão utilizando o gene *pgg2* de *P. griseoroseum*, obter linhagens transformantes com alta atividade de poligalacturonase, avaliar o efeito de diferentes condições de cultivo sobre o crescimento da linhagem recombinante e produção da enzima e avaliar alguns fatores que influenciam a atividade enzimática.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos e plasmídeos utilizados

Foi utilizada a linhagem selvagem de *Penicillium griseoroseum*, isolada de sementes florestais na Universidade Federal de Viçosa e a linhagem mutante *nia⁻* de *Penicillium griseoroseum*, PG63. A linhagem PG63 e o plasmídeo pNPG1 (9,1Kb) contendo o gene de nitrato redutase (*nia*) de *P. griseoroseum* utilizados nos experimentos de transformação foram obtidos por Pereira *et al.* (2004).

O plasmídeo pAN52-1-GFP (6,4kb), contendo o gene que codifica a proteína verde fluorescente GFP da hidromedusa *Aequorea victoria* (SGFP-TYG), sob o controle do promotor constitutivo e forte do gene *gpdA* e da região terminadora do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans* (Punt *et al.*, 1988) e o plasmídeo pPG15, que contém um fragmento de DNA (1,6 Kb) correspondente ao gene *pgg2* de *P. griseoroseum* foram utilizados para construção do vetor de expressão (Ribon *et al.*, 1999). Para amplificação dos plasmídeos foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* K12 linhagem DH5 α .

2.2. Manutenção das culturas e obtenção do inóculo

Os fungos foram cultivados por 5 dias a 25°C, em placas de Petri contendo meio completo sólido (6,0 g NaNO₃; 1,5 g KH₂PO₄; 0,5 g KCl; 0,5 g MgSO₄.7H₂O; 0,01 g FeSO₄; 0,01 g ZnSO₄; 10,0 g glicose; 2,0 g peptona; 1,5 g caseína hidrolisada; 0,5 g extrato de levedura; 1 mL de solução de vitaminas; 15 g ágar em 1000 mL de água destilada - pH 6,8 - Pontecorvo *et al.*, 1953, modificado por Azevedo e Costa, 1973), e estocados sob refrigeração por no máximo cinco dias, quando não utilizados imediatamente. Após o cultivo, os conídios foram raspados da superfície da cultura com auxílio de uma alça de platina, para obtenção de uma suspensão de conídios em solução de Tween 80 a 0,2% (v/v). Foram

inoculados 10^5 conídios por placa de meio completo recoberto com papel celofane, para as linhagens selvagem e PG63, ou em meio mínimo (6,0 g NaNO_3 ; 1,5 g KH_2PO_4 ; 0,5 g KCl; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g FeSO_4 ; 0,01 g ZnSO_4 ; 10,0 g glicose; 15 g ágar em 1000 mL de água destilada - pH 6,8) para as linhagens transformantes. Após a inoculação, as culturas foram incubadas a 25°C para a produção de massa micelial para obtenção de protoplastos (24 a 30 horas) ou para extração de DNA (48 horas).

2.3. Construção do vetor de expressão

Para substituição da região codificadora do gene *gfp* pela região codificadora do gene *pgg2*, oligonucleotídeos específicos foram desenhados para introdução de sítio de restrição para a enzima *NcoI* no códon de início da tradução ATG e para introdução de um sítio de restrição para a enzima *BamHI* após a região de término da tradução do gene *pgg2*. A reação de amplificação foi feita em um volume de $25\mu\text{L}$, contendo Tris-HCl, 10mM pH 8,0, KCl 50mM, MgCl_2 2,5mM, cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) na concentração de 0,1mM e 5 pmol dos oligonucleotídeos *pgg2.1* (5'-AACTCCCACCATGGAGATCGCC-3') e *pgg2.2* (5'-CACAACTTGGATCCGCGAGT-3'), 10 ng do plasmídeo pPG 15; 1 unidade da Amplitaq Gold DNA polimerase (Perkin Elmer). As amplificações foram realizadas em termociclador "Programmable Thermal Controller-100" (MJ Research, Inc.). Quarenta ciclos foram empregados, cada ciclo consistindo de um passo a 94°C por 1 min, um passo a 52°C por 1 min e um passo a 72°C , por 1 min e 30 seg. Ao final de 40 ciclos, foi realizada uma etapa final a 72°C , por 7 min. O fragmento de DNA do gene *pgg2*, gerado pela amplificação, foi clivado com as enzimas de restrição *NcoI* e *BamHI* e usado na reação de ligação juntamente com fragmento de DNA do plasmídeo pAN52-1-GFP clivado com as mesmas enzimas.

2.4. Obtenção de protoplastos da linhagem de *P. griseoroseum* PG63

A obtenção dos protoplastos baseou-se no método de Dias *et al.* (1997). O micélio foi coletado, ressuspensionado em KCl 0,6 M em tampão fosfato 100 mM pH 5,8 contendo 3 mg mL^{-1} do complexo enzimático glucanex (Novo Nordisk® CH4243) e incubado a 25°C sob agitação (80RPM) por aproximadamente 3 horas. Os protoplastos foram separados dos fragmentos de hifas por filtração, e lavados 3 vezes em Sorbitol 1M, CaCl_2 50 mM e Tris-HCl 100 mM (SCT) por centrifugação. O sedimento contendo os protoplastos foi ressuspensionado em SCT para se obter uma concentração final de 10^8 protoplastos mL^{-1} de suspensão.

2.5. Transformação de protoplastos da linhagem de *P. griseoroseum* PG63

A transformação baseou-se na metodologia estabelecida por Queiroz *et al.* (1998). Os protoplastos foram misturados com $3\mu\text{g}$ do DNA do plasmídeo pNPG1, $10\mu\text{g}$ do DNA

do plasmídeo pAN52pgg2 e 50 µL de polietilenoglicol 6000 a 60% (p/v). A mistura foi incubada a 0°C por 20 minutos, seguindo-se a adição de 0,5 mL da mesma solução de polietilenoglicol. Após 20 minutos a 25°C, o volume foi completado para 1,5 mL com SCT. Os protoplastos foram recuperados por centrifugação, ressuspensos em 0,5 mL de SCT, e em seguida plaqueados em meio mínimo com estabilizador osmótico (6 g NaNO₃; 1,5 g KH₂PO₄; 0,5 g KCl; 0,5 g MgSO₄.7H₂O; 0,01 g FeSO₄; 0,01 g ZnSO₄; 10 g glicose, 171 g sacarose, 15 g ágar em 1000 mL de água destilada, pH 6,8), pelo método de “pour plate”, e mantidos a 25°C por 5 dias.

2.6. Purificação monospórica dos transformantes

A purificação monospórica foi realizada pela semeadura de 100µL de suspensão diluída de conídios em meio mínimo (MM) e transferência de uma colônia isolada, para uma nova placa de Petri contendo MM após o período de crescimento.

2.7. Estabilidade mitótica dos transformantes

Para avaliar a estabilidade mitótica das linhagens transformantes quanto ao gene da nitrato redutase, foram feitas sucessivas transferências para MC (não seletivo), num total de cinco passagens e, após isso, novamente transferidas para MM. A cada passagem as placas foram incubadas a 25°C por aproximadamente 5 dias.

2.8. Determinação da atividade de poligalacturonase no sobrenadante da cultura

A atividade de poligalacturonase de sobrenadantes de cultivo das possíveis linhagens co-transformadas foi avaliada por meio de dosagem de açúcar redutor, pelo método do DNS (Miller, 1959). A cultura foi conduzida com um inóculo inicial de 5×10^7 conídios em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio mineral tamponado [MMT - 7,0 g K₂HPO₄, 5,4 g KH₂PO₄, 1,0 g (NH₄)₂SO₄, em 1000 mL água destilada - pH 6,3] suplementado com MgSO₄.7H₂O (0,11%), glicose (0,3%) e extrato de levedura (0,06%), a 25 °C, sob agitação rotacional de 150 RPM por 48 horas. A mistura de reação consistiu de 1 mL do sobrenadante da cultura e 1 mL de solução do substrato (4 mL de solução de NaCl 2,5 M, 0,6 g ácido poligalacturônico, 50 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,8 e água destilada em quantidade suficiente para 100 mL de solução tampão). O controle da reação foi feito, adicionando-se uma alíquota de 0,25 mL da mistura de reação, retirada no tempo zero, a um tubo contendo 1 mL de DNS e completando-se o volume para 2 mL com água destilada. Em seguida, a mistura de reação foi incubada a 40° C por 20 minutos. Uma alíquota de 0,25 mL da mistura de reação foi retirada, após o tempo de reação, e adicionada a um tubo contendo 1 mL de DNS, sendo o volume completado para 2 mL com

água destilada. Os tubos foram mantidos a 95-100°C por 5 minutos e, em seguida, o volume de cada tubo foi completado para 10 mL com água destilada. A leitura da absorvância foi realizada a 540 nm. Para determinar a quantidade de ácido galacturônico presente na amostra, foi construída uma curva padrão para o ácido galacturônico. Para cada linhagem transformante analisada, foi utilizada a atividade enzimática das linhagens selvagem e mutante como padrão para comparações. A atividade enzimática foi expressa em μmol de ácido galacturônico liberado por mL da mistura de reação por minuto.

2.9. Avaliação do crescimento fúngico

A produção de massa micelial foi quantificada pela coleta do micélio em peneira de 400 malhas/polegada² (37 μm de poro), seguida por lavagem com água destilada, acondicionamento em cadinhos de papel alumínio e secagem a 105°C até a obtenção de massa constante (Calam, 1969).

2.10. Transformação bacteriana e extração de DNA plasmidial

A transformação bacteriana e extração de DNA plasmidial foram realizadas segundo os protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989).

2.11. Efeito da concentração de glicose e tempo de cultivo na produção de PG pela linhagem recombinante 146 de *P. griseoroseum*

O efeito de diferentes tempos de cultivo, 24; 48; 72 e 96 horas, quantidade de inóculo e concentrações de glicose foi avaliado para produção de PG pela linhagem recombinante cultivada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio mineral tamponado.

2.12. Efeito da fonte de carbono na produção de PG pela linhagem recombinante

Para avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono na produção de PG, a linhagem recombinante foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio mineral tamponado contendo caldo de cana, glicose, sacarose (Merck) e sacarose comercial, todos na concentração de 1%.

2.13. Efeito da temperatura na atividade de PG da linhagem recombinante

O efeito da temperatura na atividade da PG produzida pela linhagem recombinante foi testado por meio da realização de ensaios enzimáticos nas temperaturas de 30 a 70 °C variando de 5 em 5°C. O sobrenadante da cultura foi obtido por cultivo da linhagem recombinante em meio mineral tamponado contendo glicose como fonte de carbono.

2.14. Efeito do pH e da temperatura de armazenamento na atividade e estabilidade da PG

O sobrenadante da cultura foi incubado nas temperaturas de -20°C (freezer) e 7°C

(geladeira) na ausência de crioprotetor e 30°C (bancada), durante um período de 5 semanas para determinação da estabilidade de PG quanto ao tempo de armazenamento e nas temperaturas de 40°C, 50°C e 60°C durante um período de 6 horas para determinação da estabilidade térmica. Azida de sódio foi utilizada na concentração de 0,03% para inibir o crescimento de bactérias e fungos no sobrenadante armazenado a 7 e 30°C. O pH de atividade da PG foi avaliado na faixa de 2,0 a 8,0.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Obtenção de linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* com alta produção de poligalacturonase

A região codificadora do gene *pgg2* foi clonada sob o controle da região promotora do gene *gpd* e região terminadora do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans* originando o vetor de expressão *pAN52pgg2*. As etapas empregadas na construção deste vetor estão esquematizadas na Figura 1.

Na transformação da linhagem PG63 de *P. griseoroseum* foram utilizadas cinco preparações de DNA do plasmídeo recombinante *pAN52pgg2* oriundas da transformação de *E. coli* DH5 α com diferentes reações de ligação. No intuito de aumentar a eficiência de co-transformação, o vetor de expressão *pAN52pgg2* foi adicionado na mistura de transformação na proporção de 5:1 em relação ao plasmídeo contendo o gene *niaD*, marcador de seleção. Foram obtidos 1.350 transformantes, sendo a frequência de transformação de 40 transformantes por μg de DNA do plasmídeo *pNPG1*.

Os transformantes foram transferidos para placas de Petri com meio mínimo e estocados a 4°C. Todos os transformantes apresentaram crescimento vigoroso em meio contendo nitrato de sódio como única fonte de nitrogênio. Cerca de 100 a 150 transformantes obtidos com cada preparação de DNA plasmidial do vetor de expressão *pAN52pgg2* foram cultivados em meio mineral tamponado líquido contendo apenas glicose como fonte de carbono para avaliação da atividade de PG presente no sobrenadante da cultura. Observou-se que 80 % dos transformantes analisados apresentaram atividade de PG mesmo tendo sido cultivados em presença de glicose que reprime fortemente a expressão dos genes que codificam PG em *Penicillium* spp, sendo observados

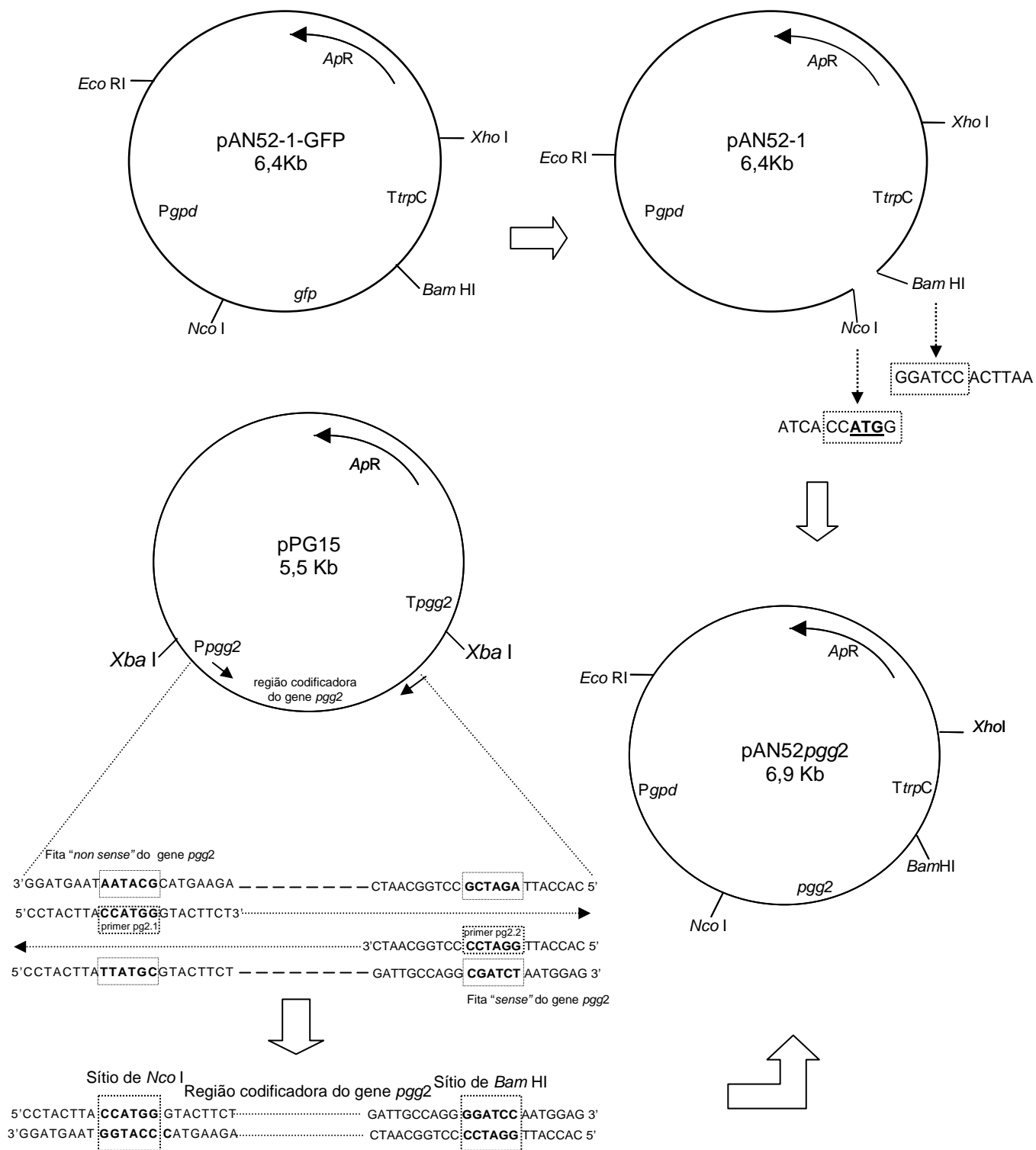


Figura 1. Esquema representando a estratégia utilizada na construção do plasmídeo recombinante pAN52-*pgg2*. O fragmento de DNA *Nco*I-*Bam*HI do plasmídeo pAN52-1-GFP foi ligado ao fragmento de DNA *Nco*I-*Bam*HI do amplificado de 1,2 Kb, contendo a região codificadora do gene *pgg2* de *P. griseoroseum*. As caixas pontilhadas indicam as modificações nas seqüências dos oligonucleotídeos para geração dos sítios de restrição para as enzimas *Nco*I e *Bam*HI.

transformantes apresentando até 12 vezes a atividade de PG quando comparado com a atividade de PG da linhagem PG63 cultivada em pectina e extrato de levedura. Este resultado indica que a maioria das linhagens é co-transformante, contendo cópias do vetor de expressão pAN52-pgg2 integradas no genoma. A Tabela 1 mostra a massa micelial seca e atividade de PG de 10 linhagens recombinantes cultivadas na presença de glicose em relação à linhagem PG63 cultivada em pectina e extrato de levedura. Esta linhagem apresentou atividade máxima de PG quando cultivada em pectina e extrato de levedura e atividade praticamente nula quando cultivada em meio contendo glicose e extrato de levedura.

Para confirmar a integração do vetor pAN52pgg2 no genoma de *P. griseoroseum*, foi feita extração de DNA total de 10 linhagens recombinantes apresentando variações na atividade de PG e analisados por PCR. Foram utilizados oligonucleotídeos que anelam na região terminadora *trpC* e na região central do gene *pgg2*, amplificando um fragmento de DNA de 820 pb detectado somente nas linhagens co-transformadas, indicando a integração do vetor de expressão. Como controle negativo foi usado o DNA total da linhagem PG63. A Figura 2 mostra o resultado da amplificação do DNA total das linhagens recombinantes e da linhagem PG63, evidenciando que todas as linhagens recombinantes testadas contêm pelo menos uma cópia do vetor de expressão no seu genoma. O número de cópias e o padrão de integração do vetor pAN52pgg2 no genoma dessas linhagens recombinantes será investigado por hibridização.

A substituição do promotor endógeno do gene *pgg2* pelo promotor *gpdA* de *A. nidulans* possibilitou a obtenção de linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* com alta produção de PG. Esse promotor é um bom exemplo de promotor forte e constitutivo e tem sido utilizado com sucesso na expressão de proteínas homólogas e heterólogas em diversas espécies de *Aspergillus* (Punt *et al.*, 1987, Levasseur *et al.*, 2004), *Penicillium* (Kolar *et al.*, 1988; Lopes, 2004; Cardoso, 2004), *Trichoderma* (Penttilä *et al.*, 1987), entre outros fungos. Molarejo *et al.*, (1999) avaliaram o efeito de diferentes promotores na expressão de uma seqüência sintética de nucleotídeos, que codifica a proteína taumatina II de *Thaumatococcus daniellii*, em *Aspergillus awamori*. Foi demonstrado que os melhores resultados foram obtidos com a utilização do promotor *gpd*.

Considerando que a síntese de pectinases em fungos filamentosos é um processo complexo, no qual estão envolvidos muitos genes estruturais e regulatórios, diversos autores utilizaram as estratégias de mutação e recombinação, via processo parassexual, visando ao melhoramento genético de *Penicillium* spp. Com análise de quase duas mil linhagens mutantes e recombinantes de *P. expansum* e *P. griseoroseum*, foram identificadas linhagens com aumento na produção de PG e PL, no entanto, não foram obtidas linhagens

Tabela 1. Atividade relativa de poligalacturonase e massa do micélio seco da linhagem mutante PG 63 e das linhagens transformadas de *Penicillium griseoroseum* cultivadas em meio mineral tamponado contendo glicose (G) ou pectina (P) como fonte de carbono suplementado com extrato de levedura.

Linhagem	Massa micelial seca (g/L)	Atividade relativa (%)^a
Selvagem^P	4,02	100
Selvagem^G	6,12	0,00
PG 63^P	3,90	100
PG 63^G	6,15	0,00
T3.3^G	6,04	1136
T5.5^G	5,89	265
T21^G	6,02	877
T23^G	5,68	726
T128^G	5,47	723
T135^G	6,1	600
T137^G	4,6	327
146^G	6,27	1258
T143^G	6,00	1153
T136^G	6,04	614

^aAtividade de PG das linhagens transformantes em relação à da atividade da linhagem PG63

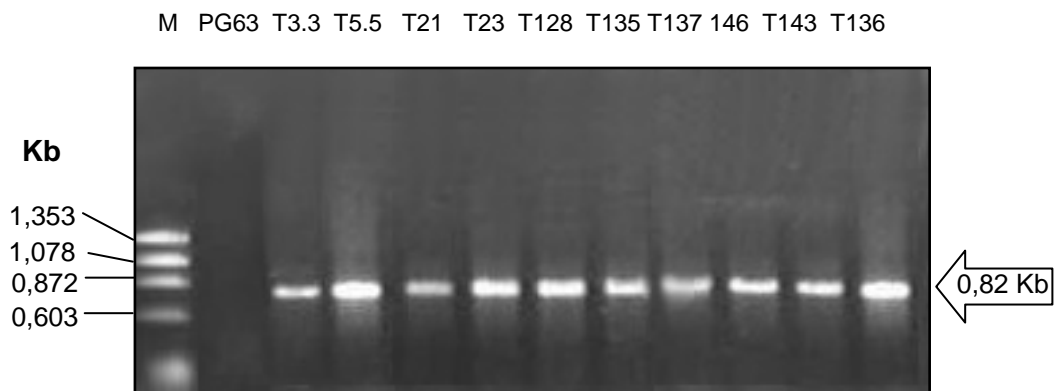


Figura 2. Reação da polimerase em cadeia (PCR) do DNA total das linhagens transformantes de *Penicillium griseoroseum* obtidas pela transformação com os plasmídeos pNPG1 e pAN52-*pgg2*. A linhagem PG63 foi utilizada como controle. M: DNA do fago ϕ X174 clivado com a enzima de restrição *Hae* III.

superprodutoras que viabilizasse economicamente a produção enzimática em grande escala (Fernandes-Salomão *et al.*, 1996; Brito, 1998, Lana, 1999, Varavallo, 2002).

Outra estratégia utilizada visando o aumento da produção de PG e PL em *P. expansum* e *P. griseoroseum* foi o aumento do número de cópias dos genes que codificam essas enzimas no genoma desses fungos (Ribeiro, 2001; Cardoso, 2004). Obtenção de linhagens de *Aspergillus* spp. com alto número de cópias de genes que codificam pectinases no genoma resultou em elevada produção enzimática, indicando a eficácia do uso dessa estratégia para o melhoramento genético de espécies deste gênero (Bussink *et al.*, 1991a; Bussink *et al.*, 1991b, Bussink *et al.*, 1992, Khanh *et al.*, 1991). No entanto, Ribeiro (2001) e Cardoso (2004) verificaram, após avaliação de mais de mil linhagens transformantes, que essa estratégia não foi adequada para o melhoramento da produção de PG e PL em *P. expansum* e *P. griseoroseum*, respectivamente.

A obtenção de linhagens recombinantes de *P. griseoroseum*, contendo cópias do gene *pgg2* sob o controle da região promotora *gpdA* e região terminadora *trpC*, com alta produção de PG indica que a estratégia de manipulação gênica e aumento do número de cópias do gene modificado é mais promissora no melhoramento genético de *P. expansum* e *P. griseoroseum* para a produção de PG do que os métodos convencionais de melhoramento (mutação e recombinação) e do que o aumento do número de cópias do gene sob o controle das seqüências regulatórias endógenas. Cardoso (2004) chegou a uma conclusão similar devido à obtenção de linhagens recombinantes de *P. griseoroseum*, contendo múltiplas cópias do gene *plg1* sob o controle do promotor *gpd*, as quais apresentaram elevada atividade de pectina liase em relação à linhagem selvagem.

A estratégia de substituir o promotor original por um que seja mais eficiente em promover a expressão tem mostrado bons resultados também em outros fungos filamentosos. Margolles-Clark *et al.* (1996) observaram aumento de 10 vezes na atividade de quitinase em linhagens obtidas por transformação de *Trichoderma harzianum* com um gene de endoquitinase sob o controle do promotor de celulase (*cbh1*) de *T. reesei*. Lopes *et al.* (2004) e Mikkelsen *et al.* (2003) relataram o uso do promotor *gpd* de *A. nidulans* para obtenção de transformantes de *P. griseoroseum* e *Penicillium paxilli* com alta expressão dos genes que codificam as proteínas verde (GFP) e vermelha (DsRed), respectivamente. Levasseur *et al.* (2004) relataram a obtenção de linhagens transformantes de *A. niger* contendo o gene *faeB* sob o controle do promotor *gpd* e terminador *trpC* de *A. nidulans* com aumento de 16 vezes na produção de feruloyl esterase B. O promotor *gpd* de *Schizophyllum commune* também foi usado para expressão do gene de lacase em *Pycnoporus cinnabarinus* resultando em aumento de 1,4 vezes na produção da enzima. Levando em consideração a força do promotor *gpd* e a capacidade de secreção de proteínas extracelulares de *P. griseoroseum* (Cardoso, 2004), é provável que a análise de um número

maior de linhagens transformantes deste fungo obtidas por transformação com o vetor pAN52pgg2 possibilite a detecção de linhagens com atividade de PG ainda mais elevada.

Após purificação monospórica e avaliação da atividade de PG de vários transformantes com diferentes níveis de aumento da produção da enzima, a linhagem transformante 146 foi selecionada para a otimização de alguns parâmetros que afetam a produção enzimática. A escolha dessa linhagem baseou-se no fato de apresentar maior atividade de PG e um crescimento vigoroso com elevada taxa de esporulação, o que é importante na obtenção do inóculo. Além disso, não foi observada nenhuma alteração na atividade de PG em sobrenadantes obtidos a partir de diferentes cultivos por um período de 5 meses, indicando que essa linhagem apresenta alta estabilidade mitótica.

3.2 Produção de poligalacturonase pela linhagem recombinante 146 de *Penicillium griseoroseum*.

A primeira condição avaliada para a produção de PG pela linhagem recombinante 146 foi a concentração de inóculo. A Figura 3 mostra que a concentração de inóculo influenciou na produção de PG pela linhagem recombinante 146 quando cultivada em meio contendo glicose na concentração de 0,5 %, sendo as concentrações de 10^6 e 10^7 conídios por mililitro da cultura as que proporcionaram melhor produção de PG e crescimento micelial. Esse padrão se manteve quando a linhagem recombinante 146 foi cultivada em glicose 1 % (Dados não mostrados). Análise da atividade de PG em sobrenadantes obtidos pelo cultivo de 10^5 conídios por mililitro da cultura revelou redução de 30 % de atividade da enzima, indicando menor produção de PG nessa condição.

Considerando que nas concentrações de 10^6 e 10^7 conídios por mililitro da cultura a atividade da enzima foi praticamente a mesma, foram utilizados 10^6 conídios por mililitro para a produção de PG pela linhagem recombinante 146. Essa concentração de inóculo coincide com a que foi estabelecida para a linhagem selvagem de *P. griseoroseum* para produção de PGs (Soares-Ramos, 1996). Cardoso (2004) observou que 10^6 conídios/mL foram mais adequados para produção de pectina liase pela linhagem recombinante T105 de *P. griseoroseum*. Esse resultado, juntamente com o fato de a linhagem 146 produzir PG em meio mineral tamponado, que é o mesmo meio utilizado para produzir PL é muito interessante porque possibilita a produção simultânea das duas enzimas por uma mesma linhagem contendo os dois vetores de expressão em condições similares. Para linhagem selvagem de *P. griseoroseum* a otimização das condições de cultivo para produção de PG foram definidas por Soares-Ramos (1996), sendo observado que a concentração de inóculo inicial utilizada não teve influência na atividade de PG, optando-se por utilizar em seus experimentos um inóculo de 10^6 conídios/mL.

Para avaliar a influência da concentração da fonte de carbono e tempo de cultivo na produção de PG, a linhagem 146 foi cultivada em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL meio mineral tamponado com glicose nas concentrações de 0,5, 1, 1,5 e 2,0 % e os sobrenadantes das culturas foram coletados de 24 em 24 horas até 96 horas de cultivo para todas as concentrações da fonte de carbono utilizadas.

A Figura 4 mostra que maior atividade de PG (417,1 U/mL) foi obtida quando a linhagem recombinante 146 foi cultivada por 72 horas na presença de glicose 1 %, diferente do observado para a PL produzida pela linhagem 105 de *P. griseoroseum*, a qual apresentou atividade máxima de PL com 48 horas de cultivo (Cardoso, 2004). Com 48 horas de cultivo a linhagem recombinante 146 apresentou 83 % (347,7) da atividade máxima da PG. Diminuição do tempo de cultivo é interessante, considerando que do ponto de vista

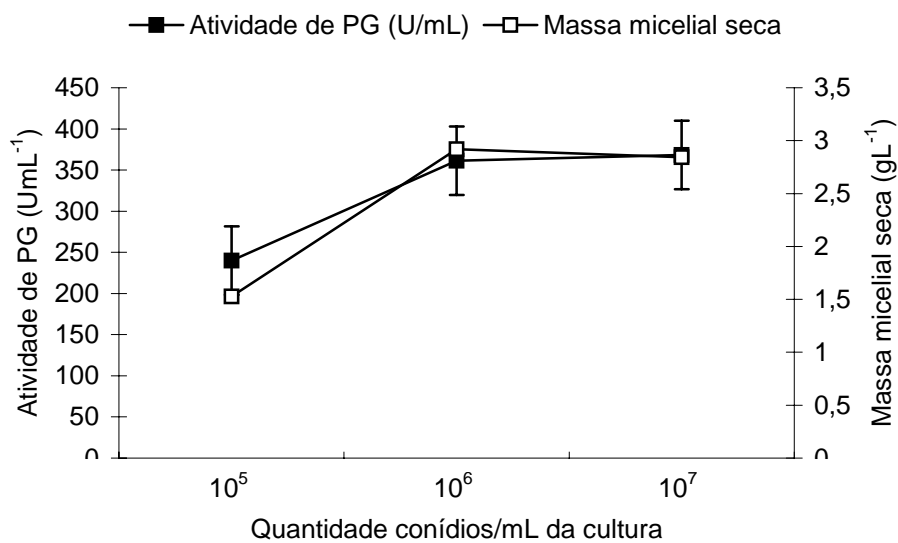


Figura 3. Efeito da concentração de inóculo na atividade de poligalacturonase. A linhagem recombinante 146 de *Penicillium griseoroseum* foi cultivada em meio mineral tamponado contendo glicose 0,5 % como fonte de carbono, por 48 horas. Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de ácido galacturônico, em μ moles, liberado na mistura de reação por minuto. Os valores apresentados representam a média de triplicatas.

industrial, redução do tempo de produção da enzima pode representar diminuição de custos e aumento de produtividade (Frost e Most, 1987). Aumentos da concentração de glicose para 1,5 e 2,0% não levou a aumentos na atividade de PG. Por outro lado, a massa micelial aumentou de forma quase linear com a concentração de glicose e com o tempo.

Cardoso (2004) avaliou o efeito da concentração de glicose no meio de cultura e do tempo de cultivo sobre a produção de pectina liase na linhagem recombinante 105 de *P. griseoroseum*, a qual contém múltiplas cópias do gene *plg1* sob o controle do promotor *gpd* de *A. nidulans*. Foi demonstrado que essa linhagem apresentou atividade máxima de PL em 48 horas de cultivo em meio contendo glicose 0,3% e que o aumento da concentração de glicose para 1% levou a aumento da atividade da enzima, não tendo sido testados outros tempos de cultivo para o meio contendo 1% de glicose.

O requerimento de indução da expressão do gene de PG de *P. griseoroseum* por pectina constitui-se numa limitação do processo de produção enzimática em escala industrial devido ao custo deste substrato, havendo uma busca constante de fontes alternativas para o cultivo de microrganismos e produção de pectinases. Deste modo, além da glicose, outras fontes de carbono foram testadas para o cultivo da linhagem recombinante 146. A Figura 5 mostra o efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento e atividade de PG da linhagem recombinante 146. Foram testados caldo de cana, sacarose comercial (marca Cristalçúcar), sacarose (Merck), glicose e extrato de levedura e sacarose e extrato de levedura, todos na concentração de 1%. A linhagem recombinante 146 apresentou alta atividade de PG em todas as fontes de carbono testadas, sendo a maior atividade absoluta (378,9) observada quando cultivada em glicose e extrato de levedura. No entanto, a relação da atividade de PG pela massa micelial e atividade específica foi maior quando a linhagem recombinante foi cultivada em açúcar comercial (71,38) seguida da sacarose Merck (65,0). Este resultado é muito interessante, uma vez que o custo desse produto é relativamente baixo.

A atividade de PG da linhagem recombinante 146 quando cultivada na presença de caldo de cana como fonte de carbono foi 10 vezes maior do que a atividade de PG produzida pela linhagem PG63 cultivada em pectina e extrato de levedura. A alta atividade de PG apresentada pela linhagem recombinante 146 quando cultivada nesse substrato indica a potencialidade do uso de caldo de cana para produção de PG, em escala industrial, por linhagens geneticamente modificadas de *P. griseoroseum*, considerando que no Brasil há uma consolidada tecnologia de produção e moagem de cana de açúcar.

A substituição do promotor endógeno pelo promotor do gene *gpd* de *A. nidulans* representa um grande avanço na produção de PG em *Penicillium griseoroseum* pois foi eliminada a necessidade de indução da síntese da enzima pela pectina, que é um substrato de maior custo, além da repressão catabólica, a qual tem sido considerada uma dificuldade

em se tratando da produção de PG em *P. griseoroseum* e *P. expansum* utilizando-se fontes alternativas de carbono (Piccolli-Valli *et al.*, 2003, Freitas, 1991, Geocze *et al.*, 1995, Soares-Ramos, 1996). Além disso, outros fatores envolvidos na regulação da expressão do gene *pgg2* de *P. griseoroseum*, como por exemplo, a influência do pH que ainda não foi investigada neste fungo, deixa de representar um problema para a produção da enzima.

Segundo Devchand e Gwynne (1991), em alguns casos, promotores induzidos são mais adequados, uma vez que o aumento da expressão da proteína de interesse pode comprometer o crescimento ou ser tóxica para o hospedeiro, como no caso da produção de glicoamilase por *Aspergillus niger* (Wongwicham *et al.*, 1999). No entanto, foi observado que a linhagem recombinante de *P. griseoroseum* 146 apresenta um crescimento tão vigoroso quanto a linhagem PG63 nas condições de produção de PG (Tabela 1). O cultivo de linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* com alta produção de PL em diversas fontes de carbono possibilitou a produção de uma massa micelial semelhante àquela obtida para a linhagem controle PG63 (Cardoso, 2004). Deste modo, pode-se afirmar que a produção de poligalacturonase e pectina liase em linhagens recombinantes contendo cópias dos respectivos genes sob o controle do promotor do gene *gpd*, não afeta o crescimento do fungo e permite alta produção da enzima.

Tendo em vista a importância das condições de cultivo para a produção de PG e a aplicação industrial de PG, outros fatores ainda deverão ser avaliados para produção de PG nessa linhagem, como por exemplo, a composição e o pH do meio de cultura, aeração, morfologia de crescimento do micélio e variação no volume da cultura para produção da enzima. A otimização das condições de cultivo pode aumentar ainda mais a produção da PGII pela linhagem recombinante 146.

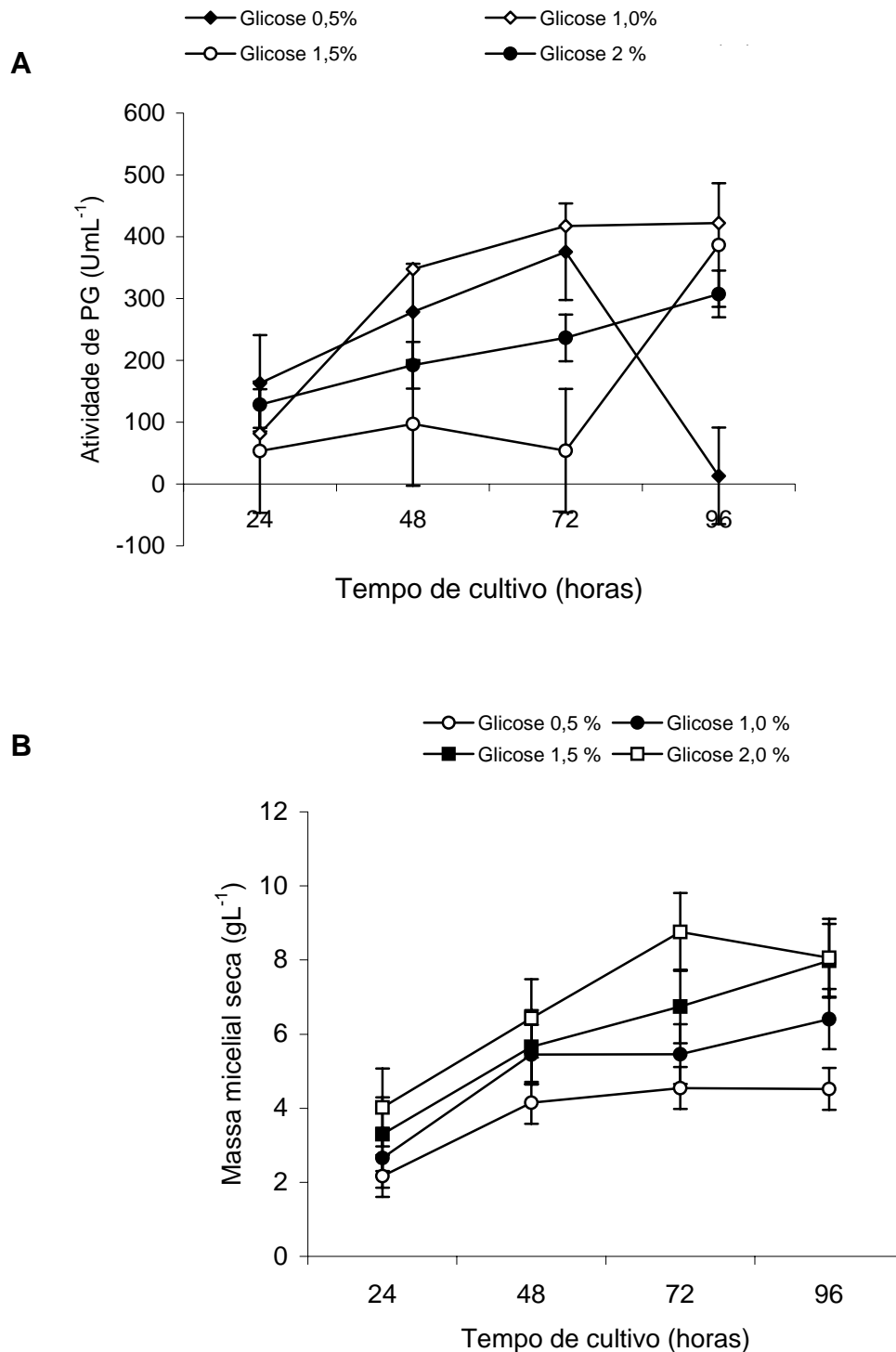


Figura 4. Determinação da concentração de glicose e do tempo de cultivo para a produção de poligalacturonase (PG) pela linhagem recombinante 146 de *Penicillium griseoroseum*. A: Atividade de PG, B: Massa micelial seca. Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de ácido galacturônico, em μmoles , liberado na mistura de reação por minuto. Os valores apresentados representam a média de duplicatas.

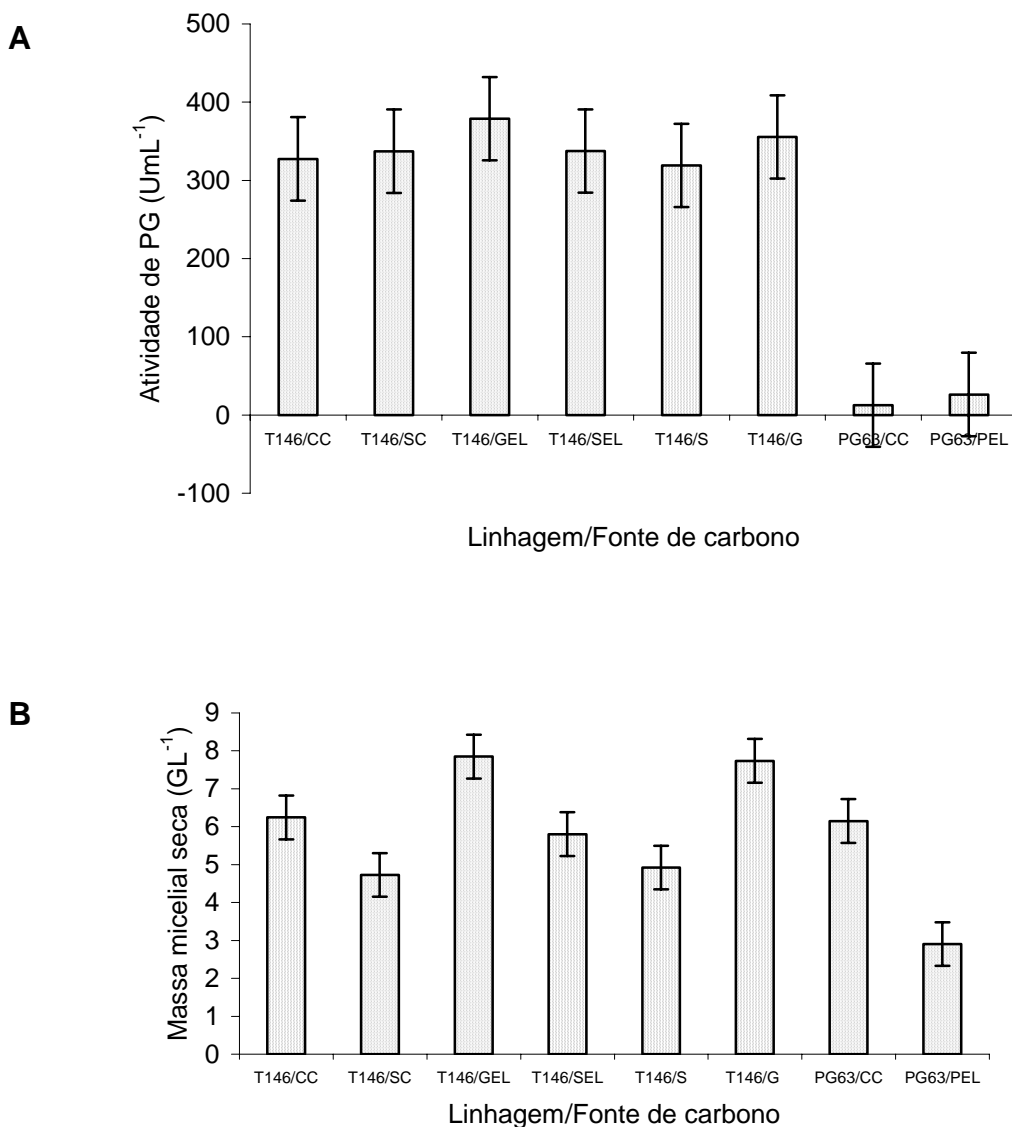


Figura 5. Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono na atividade de poligalacturonase da linhagem recombinante 146 de *P. griseoroseum*. A linhagem recombinante foi cultivada em meio mineral tamponado contendo diferentes fontes de carbono na concentração de 1,0 % por 48 horas e para a linhagem PG63 a concentração da fonte de carbono foi de 0,3%. CC: Caldo de cana, SC: Sacarose comercial (Cristalçúcar), Gel: Glicose + extrato de levedura, Sel: Sacarose + extrato de levedura, S: Sacarose (Merck), G: Glicose. Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de ácido galacturônico, em μ moles, liberado na mistura de reação por minuto. Os valores apresentados representam a média de duplicatas.

3.3 - Caracterização parcial da poligalacturonase produzida pela linhagem recombinante 146 de *P. griseoroseum*.

O efeito de diferentes pHs na atividade da PG produzida pela linhagem recombinante 146 é mostrado na Figura 6. Foi utilizado o tampão Tris-acetato K/KH₂PO₄ (Araújo, *et al.*, 1983), o qual não apresentou interferência na atividade da enzima, sendo observada alta atividade da PG II, principalmente nos valores de pH de 3,5 a 5,0. A baixa atividade da PG nos extremos de pH de 2,0 a 3,0 e de 7,0 a 8,0 indica instabilidade da estrutura da enzima ou da interação com o substrato nesses pHs.

Contreras-Esquivel e Voget (2004) relataram que a PG I de *Aspergillus kawachii* apresenta um pl de 3,55 e alta atividade na faixa de pH de 2 a 3 sendo inativada em pH 5. A maioria das poligalacturonases, considerando espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, dentre outros, apresenta pl inferior a 7 e tem sua atividade favorecida por baixos valores de pH (Miranda, 1997, D'Ângelo, 1998, Benen *et al.*, 1999, Shih *et al.*, 2000, Singh *et al.*, 2002, Contreras-Esquivel e Voget, 2004). Jyothi *et al.* (2005) realizaram um trabalho com uma poligalacturonase de *Aspergillus niger* em que se verificou atividade máxima em pH 4,3, sendo o ponto isoelétrico da enzima 3.9. Esses autores verificaram inativação irreversível da PG em pH 7,0.

O pH pode influenciar diretamente a atividade enzimática por meio de mudanças nas cargas de aminoácidos situados no sítio ativo da enzima, responsáveis pela catálise; aminoácidos envolvidos na ligação da enzima ao substrato, acarretando maior ou menor afinidade da enzima com o substrato; ou na manutenção das estruturas secundárias e terciárias da proteína (Singh *et al.*, 2002, Nelson e Cox, 2005).

Atividade enzimática pode sofrer interferência do pl quando este coincide com o pH de atuação da enzima, uma vez que em pH próximo ao pl da enzima tende a ocorrer precipitação. Grassin e Fauquembergue (1996) afirmaram que pectinases com atuação em pH baixo são mais adequadas para aplicação em indústria alimentícia no processo de clarificação de suco de frutas, onde o pH é mais baixo. O pl calculado para a PG codificada pelo gene *pgg2* é de 8,4. Deste modo, atuação da PG produzida pela linhagem 146 de *P. griseoroseum* em pH baixo associada a um elevado pl indica que essa enzima é muito promissora para aplicação no processo industrial de clarificação de sucos de frutos com pH tendendo para a faixa acídica, tais como, tomate, laranja, maçã e manga.

Pickersgill *et al.*, (1998) realizaram o alinhamento de 36 seqüências de poligalacturonases e observaram a presença de quatro regiões conservadas, Asn²⁰¹-Thr²⁰²-Asp²⁰³, Gly²²²-Asp²²³-Asp²²⁴, Gly²⁵⁰-His²⁵¹-Gly²⁵² e Arg²⁸⁰-Ile²⁸¹-Lys²⁸², as quais se dispõem antes ou nas regiões de folha β da estrutura da enzima, indicando conservação funcional e sugerindo que uma região na superfície das regiões β de 5 a 8 e as voltas adjacentes formam o sítio catalítico da enzima. van Santen *et al.* (1999) demonstraram

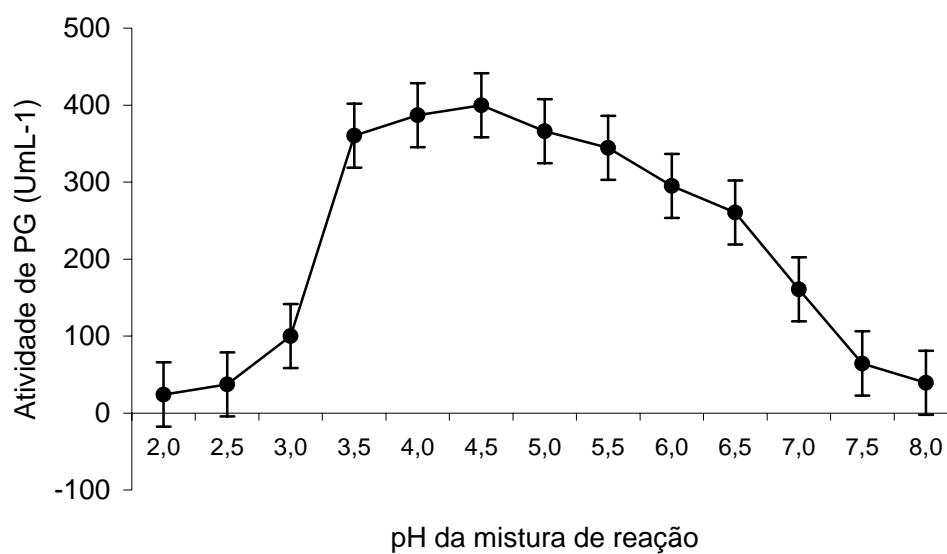


Figura 6. Efeito do pH na atividade de poligalacturonase da linhagem recombinante 146 de *Penicillium griseoroseum*. Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de ácido galacturônico, em μ moles, liberado na mistura de reação por minuto. Os valores apresentados representam a média de duplicatas.

que mutação dos resíduos Asp¹⁸⁰, Asp²⁰¹, Asp²⁰², His²²³, Arg²⁵⁶ e Lys²⁵⁸ que estão localizados nessa região, resultaram em drástica redução de atividade, demonstrando que estes resíduos são importantes para a ligação do substrato ou para a catálise. Uma comparação do sítio ativo da endopoligalacturonase II com o de ramnosidase, que também é uma glicosil hidrolase da família 28 sugeriu que Asp¹⁸⁰ e Asp²⁰² ativam a molécula de água que promove o ataque nucleofílico, enquanto Asp²⁰¹ protona o oxigênio glicosídico da ligação a ser hidrolisada. Talvez este mecanismo explique o fato dessa PG, bem como a maioria das poligalacturonases, ter sua atividade favorecida por baixos valores de pH.

A Figura 7 mostra a atividade da PGII em diferentes temperaturas. Essa enzima demonstrou alta atividade em ampla faixa de temperatura variando de 30 a 60°C, apresentando atividade máxima de 30 a 45°C. Verificou-se uma redução de 20 a 40 % da atividade enzimática nas temperaturas de 50 a 60°C, não sendo detectada atividade de PG na temperatura de 65°C, indicando que nessa temperatura a enzima é inativada. A maioria das PGs fúngicas apresenta atividade máxima entre 40 e 50°C, no entanto, existem relatos de PGs que apresentam temperaturas ótimas desde zero até 70°C (Xavier-Santos *et al.*, 2004, Nakagawa *et al.*, 2005).

Para avaliar a estabilidade térmica da PG, o sobrenadante da cultura, contendo a enzima foi incubado nas temperaturas de 40, 50 e 60°C por um período de 6 horas sendo retiradas alíquotas de hora em hora para avaliação da atividade enzimática. A Figura 8 mostra que a poligalacturonase produzida pela linhagem recombinante 146 apresenta baixa estabilidade térmica sendo verificado uma redução em torno de 100 % da atividade de PG quando o sobrenadante da cultura foi incubado por 1 hora em todas as temperaturas testadas. O fato da PGII ter apresentado baixa estabilidade térmica nas temperaturas de 40, 50 e 60°C não implica em impedimento de sua aplicação biotecnológica, porque essa PG apresenta atividade máxima também na temperatura de 30°C e foi observado que essa enzima mantém quase 100 % de sua atividade quando estocada a 30 °C por pelo menos 5 semanas (Figura 9).

Considerando a alta atividade da PG produzida pela linhagem recombinante 146 de *P. griseoroseum* em amplas faixas de pH e temperatura e sua estabilidade em diferentes temperaturas de armazenamento, pode se inferir que essa enzima apresenta grande potencial para aplicação na indústria de processamento de vegetais e clarificação de sucos. No entanto, experimentos visando à comprovação da eficiência dessa enzima nesses processos ainda deverão ser realizados.

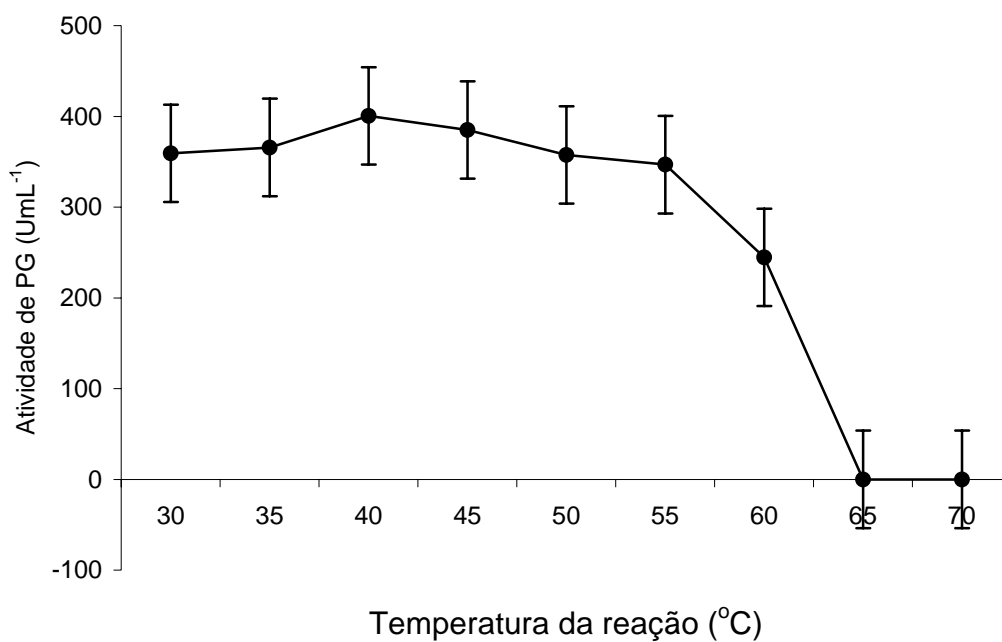


Figura 7. Efeito da temperatura na atividade de poligalacturonase da linhagem recombinantes 146 de *Penicillium griseoroseum*. Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de ácido galacturônico, em μmoles , liberado na mistura de reação por minuto. Os valores apresentados representam a média de duplicatas.

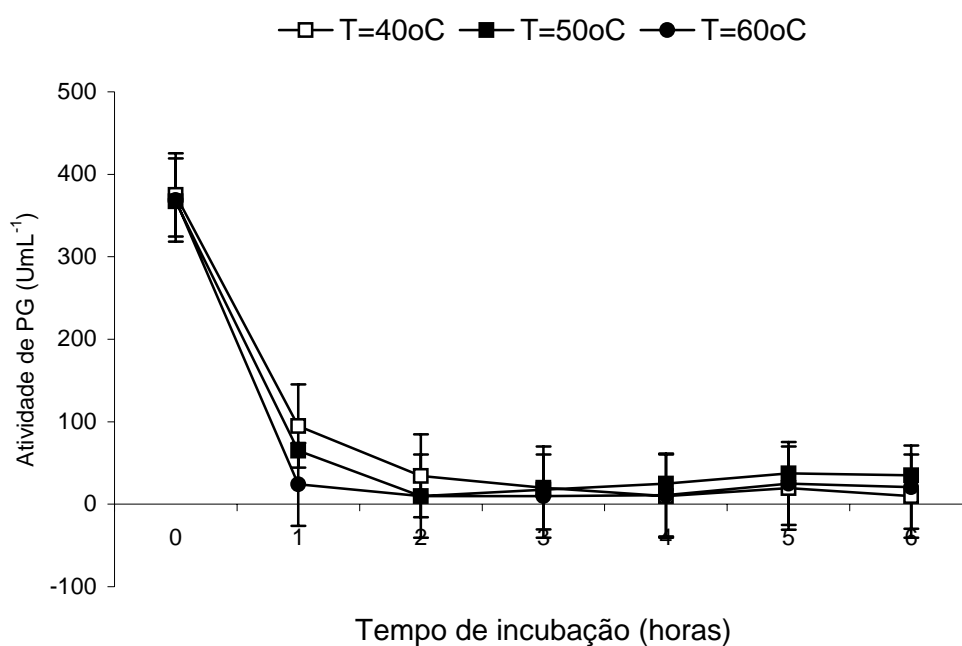


Figura 8. Efeito do tempo de incubação do sobrenadante da cultura em diferentes temperaturas na atividade de poligalacturonase da linhagem recombinante 146 de *Penicillium griseoroseum*. Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de ácido galacturônico, em μmoles , liberado na mistura de reação por minuto. Os valores apresentados representam a média de duplicatas.

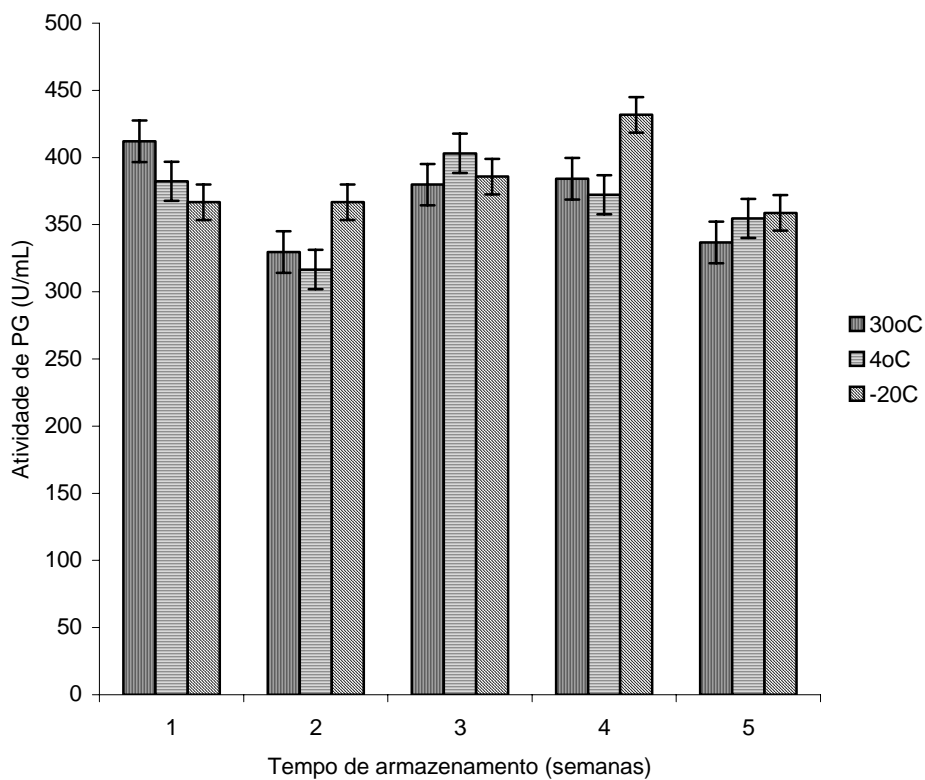


Figura 9. Efeito do tempo de armazenamento, em diferentes temperaturas, na atividade da PG da linhagem recombinante 146 de *Penicillium griseoroseum*. Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de ácido galacturônico, em μmoles , liberado na mistura de reação por minuto. Os valores apresentados representam a média de duplicatas.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, E. F., Barros, E. G., Caldas, R. A. Beta-glucosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus, *Humicola* sp. *Biotechnol. Lett.*, 5:781-784, 1983.
- Azevedo, J. L., Costa, S. O. P. Exercícios práticos de genética. São Paulo: Ed. Nacional, EDUSP, 288p, 1973.
- Bailey, M. J.; Pessa, E. Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 12:266-271, 1990.
- Ballance, D. J., Turner, G. Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 36:321-331, 1985.
- Baracat, M. C.; Valentim, C.; Muchoveej, J. J.; Silva, D. O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibres. *Biotechnol. Lett.*, 11:899-902, 1989.
- Baracat-Pereira, M. C, Coelho, J. L. C, Minussi, R. C., Chaves-Alves, V. M., Brandão, R. L., Silva, D. O. Cyclic AMP and low molecular weight effector(s) present in yeast extract are involved in pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 76:129-141, 1999.
- Baracat-Pereira, M. C., CoeJho, J. L. C, Silva, D. O . Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose and yeast extract for degumming of natural fibers. *Lett. App. Microbiol.*, 18:127-129, 1994.
- Baracat-Pereira, M. C., Minussi, R. C., Coelho, J. L., Silva, D. O. Tea extract as an inexpensive inducer of pectin lyase in *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. *J. Ind. Microbiol.*, 18:308-311, 1997.
- Benen, J. A.; Kester, H. C.; Visser, J. Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. *Eur. J. Biochem.*, 259:577-585, 1999.

- Brito, A. R. T. Isolamento e caracterização de mutantes de *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, MG: UFV, 68p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- Bussink, H. J. D., Brower, K. B., de Graaff, L. H., Kester, H. C. M., Visser, J. Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger*. *Curr. Genet.*, 20, 301-307, 1991a.
- Bussink, H. J. D., Buxton, F. P., Visser, J. Expression and sequence comparison of the *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubigenensis* genes encoding polygalacturonase II. *Curr. Genet.*, 19:467-474, 1991b.
- Bussink, H. J. D., van den Hombergh, J. P. T. W., van den Lissel, P. R. L. A., Visser, J. Characterization of polygalacturonase-overproducing *Aspergillus niger* transformants. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 37:324-329, 1992.
- Calam, C. T. The evaluation of micelial growth. In: Norris, J.R., Ribbons, D.W. (Ed.). *Methods Microbiol.*, Lodon; Academic Press, 1:567-591, 1969.
- Cardoso, P. G. Organização do gene de pectina liase em *Penicillium expansum* e obtenção de linhagens recombinantes de *Penicillium griseoroseum* com alta produção de pectina liase. Viçosa, MG: UFV, 127p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- Cardoza, R. F.; Moralejo, R. J.; Gutierrez, S.; Casqueiro, J.; Fierro, F.; Martin, J. F. Characterization and nitrogen-source regulation at the transcriptional level of the *gdhA* gene of *Aspergillus awamori* encoding an NADP-dependent glutamate dehydrogenase. *Curr. Genet.*, 34(1):50-9. 1998.
- Christgau, S.; Kofod, L. V.; Halkier, T.; Andersen, L. N.; Hockauf, M.; Dörreich, K.; Dalboge, H., Kauppinen, S. Pectin methyl esterase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast and characterization of the recombinant enzyme. *Biochem. J.*, 319:705-712, 1996.
- Contreras-Esquivel, J. C.; Voget, C. E. Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *J. Biotechnol.*, 110(1):21-28, 2004.
- D'Angelo, M. A. C. Purificação Parcial e caracterização de poligalacturonases de *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, MG:UFV, 53p. (Monografia) Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- Devchand, M. e Gwynne, D. I. Expression of heterologous proteins in *Aspergillus*. *J. Biotechnol.*, 17(1):3-9, 1991.
- Dias, E. S., Araújo, E. F., Guimarães, W. V., Coelho, J. L. e Silva, D. O. Production and regeneration of *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum* protoplasts. *Rev. Microbiol.*, 1997(28):116-120.
- Eveleigh, D. E., Montenecourt, B. S. Increasing yields of extracellular enzymes. In: Perlman, D. (Eds.) *Adv. Appl. Microbiol.*, 25:57-75, New York: Academic Press, 1979.

- Fernandes-Salomão, T. M., Amorim, A. C. R., Chaves-Alves, V. M., Coelho, J. L. C., Silva, D. O., Araújo, E. F. Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. Rev. Microbiol., 27(1): 33-36, 1996.
- Ferreira, G. Produção de patulina por *Penicillium* spp. Viçosa, MG, 54p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- Freitas, L. E. Produção e caracterização parcial de poligalacturonase de *Penicillium expansum*. Viçosa, MG: UFV, 66p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- Frost, G. M.; Most, D. A. Production of enzymes by fermentation. In: Rehm, H. J.; Reed, G. (eds) Biotechnology, VCH, Weinheim, 7a:65-211, 1987.
- Geöcze, M. L. A, Coelho, J. L. C., Araújo, E. F., Silva, D. O. Effect of yeast extract and medium pH on polygalacturonase production by *Penicillium expansum*. Rev. Microbiol., 26(3): 165-168, 1995.
- Grassin, C., Fauquembergue, P. Fruit juices. In: Goudfey T., West S. (Ed.). Ind. Enzymol., Macmillan Press, New York, 225-260, 1996.
- Gutiérrez, S.; Velasco, J.; Marcos, A. T.; Fernandez F. J.; Fierro, F.; Barredo, J. L.; Diez, B.; Martín, J. F. Expression of the cefG gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 48(5):606-14, 1997.
- Haran, S., Schickler, H., Peer, S., Logemann, S., Openheim, A, Chet, I. Increased constitutive chitinase activity in transformed *Trichoderma harzianum*. Biolog. Control., 3:101-108, 1993.
- Jyothi, T. C.; Singh, S. A.; Appu-Rao, A. G. The contribution of ionic interactions to the conformational stability and function of polygalacturonase from *A. niger*. Int. J. Biol. Macromol., 36(5):310-17, 2005.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., Tewari, R. Applications of pectinases in the commercial sector; a review. Biores. Technol., 77:215-227, 2001.
- Kawano, C. Y.; Chellegatti, M. A. S. C.; Said, S. e Fonseca, M. J. V. Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*. Biotechnol. Biochem., 29:133-140, 1999.
- Khanh, N. Q.; Rutkowski, E.; Leidinger, K.; Albrecht, H.; Gottschalk, M. Characterization and expression of a genomic pectin methyl esterase-encoding gene in *Aspergillus niger*. Gene, 106(1):71-7. 1991.
- Kolar, M., Punt, P. J., van den Hondal, C. A. M. J. J., Sehwab, H. Transformation of *Penicillium chrysogenum* using dominant selection markers and expression of an *Escherichia coli* lacZ fusion gene. Gene, 62:127-134, 1988.

- Lana, T. G. Isolamento e caracterização de linhagens diplóides e recombinantes em *Penicillium expansum*. Viçosa, MG: UFV, 55p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- Levasseur, A.; Benoit, I.; Asther, M.; Record, E. Homologous expression of the feruloyl esterase B gene from *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein. Expr. Purif.*, 37(1):126-133, 2004.
- Lopes, F. J. F.; Araújo, E. F. e Queiroz, M. V. Easy detection of green fluorescent protein multicopy transformants in *Penicillium griseoroseum*. *Genet. Mol. Res.*, 3(4):449-55, 2004.
- Margolles-Clark, E., Harman, G. E., Penttilä, M. Enhanced expression of endochitinase in *Trichoderma harzianum* with the *cbh1* promoter of *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:2152-2155, 1996.
- Mikkelsen, L.; Sarrocco, S.; Lubeck, M.; Jensen, D. F. Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. *FEMS Microbiol. Lett.*, 223(1):135-139, 2003.
- Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt. Chem.*, 31:426-428, 1959.
- Minussi, R. C.; Baracat-Pereira, M. C.; Coelho, J. L. C.; Silva, D. O. Methylxanthines as inducers of pectin lyase in *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. *Lett. Appl. Microbiol.*, 24: 369-372, 1997.
- Miranda, R. P. Purificação e Caracterização Parcial de Poligalacturonases de *Penicillium expansum*. Viçosa, MG: UFV, 55p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- Moralejo, F. J.; Cardoza, R. E.; Gutierrez, S.; Martin, J. F. Thaumatin Production in *Aspergillus awamori* by use of expression cassettes with strong fungal promoters and high gene dosage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(3):1168-1174, 1999.
- Murray, P.; Arob, N. Collins, C., Grassick, A., Penttilä, M., Saloheimo, M., Tuohy, M. Expression in *Trichoderma reesei* and characterisation of a thermostable family 3 β -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. *Prot. Expr. Purif.*, 38:248-257, 2004.
- Nakagawa, T.; Nagaoka, T.; Miyaji, T.; Timizuka, N. Cold-active polygalacturonase from psychrophilic-basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum* strain PPY-1. *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, 69(2):419-21, 2005.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. Lehninger principles of biochemistry. 4th edition. Ed. Freeman. New York, 2005.

- Pedersen, A. G., Bundgaard-Nielsen, M., Nielsen, J., Villadsen, J. Rheological characterization of media containing *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.*, 41:162-164, 1993.
- Penttilä, M., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E., Knowles, J. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 61:155-164, 1987.
- Pereira, J. F.; Queiroz, M. V.; Lopes, F. J.; Rocha, R. B.; Daboussi, M. J. e Araújo, E. F. Characterization, regulation, and phylogenetic analyses of the *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase gene and its use as selection marker for homologous transformation. *Can. J. Microbiol.*, 50(11):891-900, 2004.
- Piccoli-Valle, R. H.; Baracat-Pereira, M. C. e Silva, D. O. Catabolite repression of inductive polygalacturonase synthesis in *Penicillium expansum*. *J. Basic Microbiol.*, 35:189-193, 1995.
- Pickergill, R.; Smith, D.; Worboys, K. e Jenkins, J. Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *J. Biol. Chem.*, 273(38):24660-24664, 1998.
- Pontecorvo, G.; Roper, J. A.; Hemmons, L. M.; MacDonald, K. D., Bufton, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. in Genet.*, 5:141-238, 1953.
- Punt, P. J.; Oliver, R. P.; Dingemanse, M. A; Pouwels, P. H.; van den Hondel, C. A. M. J. J. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*, 59:117-124, 1987.
- Punt, P. J.; Dingemanse, M. A.; Kuyvenhoven, A.; Soede, R. D.; Pouwels, P. H. Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene*, 93(1):101-9, 1990.
- Punt, P. J.; Dingemanse, M. A; Jacobs-Meijsing, R. I. M.; Pouwels, P. H.; van den Hondel L. C. A. M. J. I. Isolation and characterization of the glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 69:49-57, 1988.
- Punt, P. J.; van den Hondel, C. A. Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers. *Methods Enzymol.*, 216:447-57, 1992.
- Queiroz, M. V.; Barros, A. O.; Barros, E. G.; Guimarães, W. V., Araújo, E. F. Transformation of *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase mutant with the *nia* gene from *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Microbiol.*, 44:1-3, 1998.
- Ribeiro, J. B. Isolamento e caracterização de genes que codificam poligalacturonase e transformação de *Penicillium expansum*. Viçosa, MG: UFV, 57p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- Ribon, A. O. B.; Coelho, J. L. C.; Barros, E. G.; Araújo, E. F. Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Penicillium griseoroseum*. *Biotech. Lett.*, 21:395-399, 1999.

- Ribon, A. O. B., Queiroz, M. V., Coelho, J. L. C. e Araújo, E. F. Differential expression of polygalacturonase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum* in different carbon sources. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 29:145-148, 2002.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2 ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- Shih, J.; Wei, Y. e Goodwin, P. R. A comparison of the pectate lyase genes, *pel-1* and *pel-2*, of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* and the relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection. *Gene*, 243:139-150, 2000.
- Shoemaker, S.; Schweickart, V.; Ladner, M.; Gelfand, D.; Kwok, S.; Myambo, K.; Innis, M. Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase I derived from *Trichoderma reesei* strain L27. *Biotechnology*, 1:691-696.
- Singh, S. A., Appu-Rao, A. G. A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of, two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 35(2):115-23, 2002.
- Soares-Ramos, J. R. L. Atividade de poligalacturonase produzida por *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, MG: UFV, 39p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- Someren, M. A. K.; Harmsen, J. A. M.; Kester, C. M. e Visser, J. Structure of the *Aspergillus niger pelA* gene and its expression in *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.*, 20:293-299, 1991.
- Speacht, C. A.; Dirusso, C. C.; Novotny, C. P.; Ullrich, R. C. A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Analyt. Biochem.*, 119:158-163, 1982.
- van Gorgom, R. F. M.; Punt, P. J; Pouwels, P. H.; van den Hondel, C. A. M. J. J. A system analysis of expression signals in *Aspergillus*. *Gene*, 48:211-217, 1986.
- van Santen, Y.; Benen, J. A.; Schroter, K. H.; Kalk, K. H.; Armand, S.; Visser, J. e Dijkstra, B. W. 1.68 Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 274:30474-30480, 1999.
- Varavallo, M. A. Recombinantes com maior produção de pectinases e transformação em *Penicillium spp.* Viçosa, MG: UFV, 80p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- Visôto, L. E. Produção de ocratoxina A por fungos filamentosos isolados de café e por fungos produtores de pectinases. UFV, 43p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- Vivan, J. Produção da micotoxina citrinina por *Penicillium spp.* Viçosa, MG: UFV, 42p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa,

2002.

- Vries, J. A.; Voragen, A. G. L. J.; Rombouts, F. M.; Pilnik, W. Structural studies of apple pectins with pectinolytic enzymes. In: Fishman, M. M.; Jen, J. J. (eds). Chemistry and function of pectins (ACS Symposium series, vol. 310). American chemistry society, Washington DC, 38-48, 1986.
- Vries, R., Visser, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 65:497-522, 2001.
- Wongwicharn, A.; McNeil, B. e Harvey, L. M. Effect of oxygen enrichment on morphology, growth, and heterologous protein production in chemostat cultures of *Aspergillus niger* B1-D. Biotech. Bioeng., 65:416-424, 1999.
- Xavier-Santos, S.; Carvalho, C. C.; Bonfa, M.; Silva, R.; Capelari, M.; Gomes, E. Screening for pectinolytic activity of wood-rotting basidiomycetes and characterization of the enzymes. Fol. Microbiol., 49(1):46-52, 2004.

CONCLUSÕES

A seqüência TATATAA, presente na região promotora do gene *pgg1* (-93) de *P. griseoroseum*, deve corresponder a um TATA “box”, exercendo papel na montagem do complexo de início da transcrição.

A seqüência CCAAT, localizada a - 270 pb do códon de início da tradução do gene *pgg2* é responsável pela formação de complexo do fragmento de DNA 170 pb com proteínas nucleares, mostrando a funcionalidade dessa seqüência na regulação da expressão do gene *pgg2*.

O elemento CTACAGTG localizado a - 756 pb do códon de início da tradução, aparentemente, não representa um sítio para a ligação dos fatores de transcrição envolvidos na expressão do gene *pgg2* de *P. griseoroseum*, quando o fungo é cultivado na presença de sacarose e extrato de levedura.

A inativação do gene *pgg2* reduziu de 90% da atividade total de poligalacturonase nas linhagens transformantes T6 e T8 de *P. griseoroseum* quando cultivadas em pectina e extrato de levedura por 96 horas, não sendo detectada atividade de PG quando as linhagens foram cultivadas em sacarose e extrato de levedura nos tempos de 36 a 96 horas.

A transformação da linhagem PG63 de *P. griseoroseum* com o vetor de expressão pAN52pgg2 contendo o gene *pgg2* de *P. griseoroseum* sob o controle do promotor *gpd* e região terminadora *trpC* de *Aspergillus nidulans* resultou na obtenção de linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* com alta atividade de PG.

A linhagem recombinante 146 de *P. griseoroseum* apresentou crescimento similar ao observado para a linhagem PG63 em todas as condições de cultivo testadas.

O cultivo da linhagem recombinante 146 em meio mineral tamponado contendo glicose, caldo de cana ou sacarose 1% promoveu aumento da atividade de PG de até 12

vezes em relação à atividade determinada no sobrenadante de cultivo obtido com a linhagem PG63 quando cultivada em pectina e extrato de levedura.

A PG produzida pela linhagem recombinante 146 apresentou 100% de estabilidade quando armazenada por 5 semanas nas temperaturas de -20, 4 e 30°C e atividade ótima nas temperaturas de 30, 35, 40 e 45°C e pHs de 3,5, 4,0, 4,5 e 5,0, sendo recomendada para aplicação na indústria de processamento de sucos de frutas.