

JANAINA APARECIDA TEIXEIRA

CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE *Penicillium  
griseoroseum*: ANÁLISE DO CARIÓTIPO, DA EXPRESSÃO DOS GENES *plg1* E  
*pgg2* E DA PRODUÇÃO DE PECTINA LIASE E POLIGALACTURONASE EM  
RESPOSTA AO pH DO MEIO

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Genética e  
Melhoramento, para obtenção de título  
de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2011

JANAINA APARECIDA TEIXEIRA

CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE *Penicillium griseoroseum*: ANÁLISE DO CARIÓTIPO, DA EXPRESSÃO DOS GENES *plg1* E *pgg2* E DA PRODUÇÃO DE PECTINA LIASE E POLIGALACTURONASE EM RESPOSTA AO pH DO MEIO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção de título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 23 de maio de 2011.

---

Prof<sup>a</sup> Marisa Vieira de Queiroz  
(Co-Orientadora)

---

Prof. Marcos Rogério Tótola

---

Prof. Ieso de Miranda Castro

---

Prof. Wendel Batista da Silveira

---

Prof<sup>a</sup> Elza Fernandes de Araújo  
(Orientadora)

*À Deus, por tudo.*

*Aos meus amados pais*

*Adebalde e Elza pelo apoio constante, pela  
compreensão e pelo incentivo em todas as etapas da  
minha vida.*

*À minha amada irmã*

*Jucilene pelo carinho e por todos os  
momentos compartilhados.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade oferecida para realização deste curso.

Ao CNPq, à FAPEMIG e à CAPES, pelo apoio financeiro.

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

Às professoras Marisa Vieira de Queiroz e Flávia Maria Lopes Passos pelos ensinamentos e pelos conselhos durante a realização deste trabalho.

À Doutora Virginia Maria Chaves Alves, pelos conselhos e pelo apoio.

Aos professores Marcos Rogério Tótolá, Wendel Batista da Silveira e Ieso de Miranda Castro, pela participação na banca examinadora.

A todos os professores que contribuíram para minha formação profissional.

À Doutora Eunize Maciel Zambolim pela disponibilização do laboratório e do aparelho para as análises de PCR em tempo real.

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

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Rose, Conceição, Edna e Rita, pelo atentimento, pela paciência e pela atenção para conosco em todos esses anos.

Aos meus inesquecíveis amigos do Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos pela boa convivência, pelos momentos de descontração, pelas

conversas, pelos cafezinhos e por me agüentarem durante esses anos. Levo vocês no coração.

Às técnicas e, também amigas, Jaqueline e Regina, pela organização, pelo suporte e pelo apoio, sempre quando precisei.

A todos os amigos dos outros laboratórios do Departamento de Microbiologia.

Ao meu querido amigo Guilherme Nogueira, pela ajuda, pelo companheirismo e pelas discussões em muitos dos experimentos.

Às amigas da equipe de trabalho: Thamy Livia e Marina Fassarella, pelos momentos em que me auxiliaram nos experimentos e pelas horas agradáveis que compartilhamos.

Ao meu querido amigo Daniel Bonoto, pelo apoio e pelo incentivo em todas as vezes que precisei, mesmo estando distante.

Aos meus queridos amigos, Maria Andréia, Leonardo Almeida, Francielle Martins, Maíra Freire, Jaqueline Carlos, Juliana Ribeiro, José Carlos, Luiz Eduardo, Otávio, Marcelo Mafra, Lygia, Júlio, Samuel e, manas: Alessandra, Ana Paula e Cassi pelo companheirismo e pela amizade, que levarei para sempre comigo, onde eu estiver.

Aos meus pais e à minha irmã, que são o meu porto seguro, sempre me apoiando e confortando nos momentos em que mais preciso. Vocês tornaram possível essa conquista. Obrigada por cuidarem de mim.

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

## **BIOGRAFIA**

JANAINA APARECIDA TEIXEIRA, filha de Adebalde Teixeira e Elza Maria Teixeira, nasceu na cidade de Visconde do Rio Branco, MG, em 27 de abril de 1982.

Ingressou na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, em fevereiro de 2000, concluindo a graduação em Ciências Biológicas, como Bacharel e Licenciada, em janeiro de 2005.

Em março de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, concluindo-o em março de 2007.

Em março de 2007, iniciou o curso de Doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| RESUMO .....  | ix |
| ABSTRACT .....  | xi |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL .....   | 1  |
| 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 12 |
| CAPÍTULO 1 .....  | 21 |
| Análise do cariótipo, do número de cópias e da expressão dos genes <i>plg1</i> e <i>pgg2</i> de linhagens recombinantes de <i>Penicillium griseoroseum</i> com alta produção de pectina liase e poligalacturonase ..... | 21 |
| Resumo.....   | 22 |
| 1. Introdução .....   | 23 |
| 2. Material e Métodos .....   | 26 |
| 2.1. Micro-organismos .....   | 26 |
| 2.2. Meios e condições de cultivo.....  | 26 |
| 2.3. Preparação dos protoplastos e inclusão em agarose .....  | 27 |
| 2.4. Avaliação do cariótipo por eletroforese em campo pulsado (PFGE) .....  | 27 |
| 2.5. Extração de DNA total.....   | 27 |
| 2.6. Análise por hibridização .....   | 28 |
| 2.6.1. Análise da região telomérica para determinação do número de cromossomos em <i>P. griseoroseum</i> .....  | 28 |

|   |    |
|---|----|
| 2.6.2. Localização cromossômica do gene <i>plg1</i> .....   | 29 |
| 2.7. Extração de RNA total e reações de transcriptase reversa dos genes <i>plg1</i> e <i>pgg2</i> nas linhagens PG63 e recombinante T20.....  | 29 |
| 2.8. Análise por PCR em tempo real .....  | 29 |
| 2.8.1 Quantificação relativa da expressão dos genes <i>plg1</i> e <i>pgg2</i> nas linhagens PG63 e recombinante T20.....  | 30 |
| 2.8.2 Quantificação absoluta do número de cópias dos genes <i>plg1</i> e <i>pgg2</i> e estimativa do tamanho do genoma de <i>P. griseoroseum</i> .....                              | 30 |
| 2.9. Ensaio enzimáticos de pectina liase e poligalacturonase .....  | 31 |
| 3. Resultados .....   | 33 |
| 3.1. Determinação do tamanho do genoma, do número de cromossomos e localização do gene <i>plg1</i> no genoma de <i>P. griseoroseum</i> .....  | 33 |
| 3.2. Análise do número de cópias dos genes <i>plg1</i> e <i>pgg2</i> e da produção de pectina liase e poligalacturonase nas linhagens recombinantes de <i>P. griseoroseum</i> ..... | 37 |
| 3.3. Avaliação da expressão dos genes <i>plg1</i> e <i>pgg2</i> nas linhagens recombinantes de <i>P. griseoroseum</i> .....   | 41 |
| 4. Discussão .....  | 46 |
| 5. Referências Bibliográficas .....   | 49 |
| CAPÍTULO 2 .....  | 54 |
| Efeito do pH do meio na produção e secreção de pectina liase e poligalacturonase produzidas por linhagens recombinantes de <i>Penicillium griseoroseum</i> .....                    | 54 |
| Resumo.....   | 55 |
| 1. Introdução .....   | 56 |
| 2. Material e Métodos .....   | 58 |
| 2.1. Micro-organismos.....  | 58 |
| 2.2. Meios e condições de cultivo.....  | 58 |
| 2.3. Avaliação da morfologia do micélio.....  | 59 |
| 2.4. Ensaio enzimáticos de pectina liase e poligalacturonase .....  | 59 |
| 2.5. Extração de RNA total e reações de transcriptase reversa dos genes <i>plg1</i> e <i>pgg2</i> nas linhagens PG63 e recombinante T20.....  | 60 |
| 2.6. Análise por PCR em tempo real da expressão dos genes <i>plg1</i> e <i>pgg2</i> .....   | 60 |
| 2.7. Preparo das amostras de proteínas .....  | 61 |
| 2.8. Determinação de proteína total e detecção por SDS-PAGE.....  | 62 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| 3.   | Resultados .....  | 63 |
| 3.1. | Efeito do pH na produção e secreção de PL e PG .....              | 63 |
| 3.2. | Avaliação da expressão dos genes <i>plg1</i> e <i>pgg2</i> .....  | 66 |
| 3.3. | Avaliação da secreção de proteínas totais.....                    | 69 |
| 3.4. | Avaliação da produção de biomassa e da morfologia do micélio..... | 72 |
| 4.   | Discussão .....   | 75 |
| 5.   | Referências Bibliográficas .....                                  | 78 |
| 4.   | CONCLUSÕES GERAIS .....   | 83 |

## RESUMO

TEIXEIRA, Janaina Aparecida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2011. **Caracterização de linhagens recombinantes de *Penicillium griseoroseum*: análise do cariótipo, da expressão dos genes *plg1* e *pgg2* e da produção de pectina liase e poligalacturonase em resposta ao pH do meio.** Orientadora: Elza Fernandes de Araújo. Co-Orientadores: Marisa Vieira de Queiroz, Flávia Maria Lopes Passos e Virgínia Maria Chaves Alves.

Os estudos genéticos e fisiológicos realizados com o isolado *Penicillium griseoroseum* CCT6421 ressaltam as vantagens para a sua aplicação como hospedeiro para produção de proteínas. A obtenção e análise de linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* com alta produção de pectina liase (PL) e poligalacturonase (PG) evidenciaram o eficiente sistema de secreção desse fungo, indicando a possibilidade de utilização deste como plataforma para produção de proteínas de interesse industrial. Entretanto, pouco é conhecido sobre a organização do genoma de *P. griseoroseum* e das linhagens recombinantes. Neste trabalho foi estimado o tamanho do genoma de *P. griseoroseum* entre 29,8 e 31,0 Mb, distribuídos em quatro cromossomos. O gene *plg1*, que codifica PL, está em cópia única no genoma de *P. griseoroseum* e foi localizado no cromossomo II (9,22 Mb). A linhagem recombinante T105, que possui cópias adicionais do gene *plg1* sob controle do promotor de *gpd* de *Aspergillus nidulans*, apresentou integrações nos cromossomos II, III e IV. As linhagens recombinantes T146 e T20 possuem, respectivamente, cópias adicionais do gene *pgg2* e dos genes *pgg2* e *plg1*, sob o controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans*. O gene *pgg2* codifica PG em *P.*

*griseoroseum*. A análise da expressão dos genes *plg1* e *pgg2*, nas linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* multi-cópias, mostrou que o aumento do número de cópias dos genes proporciona o aumento da produção enzimática. Uma cópia do gene *plg1*, sob o controle do promotor constitutivo, proporcionou um aumento de 200 vezes na expressão em relação ao gene endógeno e duas cópias do gene *pgg2*, também sob o controle do promotor constitutivo, proporcionaram um aumento de 1100 vezes na expressão em relação ao gene endógeno. A produção e secreção de PL e PG pelas linhagens recombinantes T105, T146 e T20 de *P. griseoroseum* são afetadas pelas condições de cultivo. As linhagens foram cultivadas em meio tamponado MMT (pH 6,8) e em meio não-tamponado MMNT (pH 6,3 – 3,0), para verificar a expressão dos genes *plg1* e *pgg2*, produção e secreção de PL e PG em diferentes tempos de cultivo. A transcrição dos genes *plg1* e *pgg2*, nas linhagens recombinantes, é constitutiva e não foi detectado variação em ambos os meios. No entanto, a quantidade de proteína total secretada variou em média  $7,8 \pm 1,1$   $\mu\text{g/mL}$  no meio MMT e  $3,25 \pm 1,50$   $\mu\text{g/mL}$  no meio MMNT. A análise por SDS-PAGE das proteínas do sobrenadante da cultura das linhagens possibilitou verificar uma maior quantidade de PL e PG secretada no meio MMT do que no meio MMNT. A secreção de PL e de PG foram afetadas pela variação do pH do meio, apresentando reduções nas atividades de 6,4 e 3,6 vezes, respectivamente, para a atividade detectada em meio MMNT em comparação ao meio MMT. A variação do pH do meio também alterou a morfologia da hifa e do micélio da linhagem recombinante T20, o que pode estar relacionado com a redução da secreção de PL e PG. Os resultados mostram que a maquinaria de transcrição, tradução e secreção de proteínas do fungo *P. griseoroseum* responde ao aumento do número de cópias de genes no genoma, observando-se as condições de cultivo.

## ABSTRACT

TEIXEIRA, Janaina Aparecida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May of 2011. **Characterization of recombinant strains of *Penicillium griseoroseum*: karyotype analysis, expression of *plg1* and *pgg2* genes and production of pectin lyase and polygalacturonase in response to medium pH.** Adviser: Elza Fernandes de Araújo. Co-advisers: Marisa Vieira de Queiroz, Flávia Maria Lopes Passos and Virgínia Maria Chaves Alves.

Genetic and physiological studies conducted with the isolate *Penicillium griseoroseum* CCT6421 emphasize the advantages for its application as a host for protein production. Obtaining and analysis of *P. griseoroseum* recombinant strains with high production of pectin lyase (PL) and polygalacturonase (PG) highlighted the efficient secretion system found in this fungus, indicating the possibility of its use as a platform for production of proteins of industrial interest. However, little is known about the genome organization of *P. griseoroseum* and its recombinant strains. In this work, it was estimated that the genome size of *P. griseoroseum* is between 29.8 and 31.0 Mb, distributed in four chromosomes. The *plg1* gene, that codifies PL, is in single copy in genome of *P. griseoroseum*, and was located on chromosome II (9.22 Mb). The recombinant strain T105, which has additional copies of the *plg1* gene under the control of *gpd* promoter of *Aspergillus nidulans*, showed integrations in chromosomes II, III and IV. The recombinant lineages T146 and T20 have additional copies of *pgg2* gene and *pgg2* and *plg1* genes, under the control of *gpd* promoter of *A. nidulans*, respectively. The gene *pgg2* codifies PG in *P. griseoroseum*. Analysis of *plg1* and *pgg2* gene expression, in multi-copy recombinant strains of *P.*

*griseoroseum*, showed that the increase of gene copy numbers provides the increased enzymatic production. One copy of *plg1* gene, under the control of constitutive promoter, provided an increase of 200 times in the expression in relation to the endogenous gene and two copies of the gene *pgg2*, also under the control of constitutive promoter, resulted in an increase in the expression of 1100 times in relation to the endogenous gene. The production and secretion of PL and PG by *P. griseoroseum* recombinant strains T105, T146 and T20 are affected by growing conditions. The strains were cultivated in buffered medium MMT (pH 6.8) and not buffered medium MMNT (pH 6.3-3.0) to verify the expression of *plg1* and *pgg2* genes, production and secretion of PL and PG in different periods. The transcription of *plg1* and *pgg2* genes in recombinant strains is constitutive and variation was not detected in both media. However, the amount of total protein secreted ranged on average  $7.8 \pm 1.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  on MMT and  $3.25 \pm 1.50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  on MMNT. The SDS-PAGE of supernatant proteins allowed detecting larger amount of PL and PG in MMT than in MMNT. The secretion of PL and PG were affected by variation of medium pH, presenting reduction of 6.4 and 3.6 times, respectively, on activity detected on MMNT compared to MMT. The medium pH variation also altered the hyphal and mycelium morphologies of recombinant strain T20, what can be related to the reduction of PL and PG secretion. These results show that the transcription, translation and protein secretion machinery of the fungus *P. griseoroseum* responds to increase of gene copy number in genome observing the cultivation conditions.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Com o avanço da biotecnologia, os fungos têm sido amplamente empregados para produção de enzimas de interesse industrial, tornando-se a principal fonte de enzimas e metabólitos (Wang *et al.*, 2005). A utilização de fungos filamentosos como hospedeiros para produção de proteínas, homólogas e heterólogas, baseia-se na eficiência desses micro-organismos em secretar grandes quantidades de proteínas nos meios de cultivo (Nevalainen *et al.*, 2005). Entretanto, além de se basear nos rendimentos da produção, a escolha de uma linhagem hospedeira para produção de proteínas de interesse industrial, deve levar em consideração as características genéticas, como o controle da regulação gênica (Punt *et al.*, 2002). Espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* vêm sendo consideradas hospedeiras eficientes para produção de proteínas recombinantes (Punt *et al.*, 2002; MacCabe *et al.*, 2002; Iwashita, 2002; Kanamasa *et al.*, 2003; Nevalainen *et al.*, 2005).

A partir da bioprospecção de fungos produtores de enzimas de interesse biotecnológico, Baracat *et al.* (1989) avaliaram diferentes fungos filamentosos quanto à atividade de pectinases e verificaram que o isolado de *Penicillium griseoroseum* CCT6421 apresentou atividade pectinolítica com reduzida atividade de celulase. A partir dessas informações, vários estudos foram conduzidos com *P. griseoroseum* para otimizar as condições de cultivo para a produção de enzimas pectinolíticas (Brumano *et al.*, 1993a; Brumano *et al.*, 1993b; Baracat-Pereira *et al.*, 1994; Minussi *et al.*, 1998). Posteriormente, outros trabalhos avaliaram a linhagem *P. griseoroseum* CCT6421 quanto à produção das micotoxinas patulina, citrinina e ocratoxina A nas mesmas condições de cultivo usadas para produção de pectinases (Ferreira, 2000; Vivan, 2002; Visôto, 2003). Esses autores relataram a ausência

dessas micotoxinas nas condições de cultivo para produção de pectinases, revelando o potencial do isolado para aplicação na indústria alimentícia.

As enzimas pectinolíticas compreendem um complexo de enzimas, capazes de catalisar a despolimerização de substâncias pécticas e pectinas encontradas nas paredes celulares dos vegetais. Dada a diversidade de substâncias pécticas e à variação na estrutura das pectinas há muitas enzimas pectinolíticas que atuam de forma coordenada para a completa degradação da pectina. Desse modo, as pectinases podem ser classificadas quanto à ação na cadeia principal da molécula da pectina, composta de homogalacturonana e quanto à ação na região ramificada, composta de ramnogalacturonanas I e II, e cadeias laterais (Lang e Dörnenburg, 2000; Gummadi e Panda, 2003; Jayani *et al.*, 2005; Yadav *et al.*, 2009). De acordo com o mecanismo de ação, as pectinases podem ser classificadas em: 1) pectinesterases, que removem os grupos metil da pectina; 2) despolimerases (hidrolases e liases), que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas das substâncias pécticas; e 3) protopectinases, que solubilizam, por meio de hidrólise, a forma insolúvel de protopectina para formar pectina e ácidos pectínicos (Kashyap *et al.*, 2001). Dentre as enzimas pectinolíticas mais estudadas estão as que atuam na cadeia principal, que incluem: 1) enzimas de desesterificação, como pectina metil esterases (PME, E.C. 3.1.1.11) e pectina acetil esterase (PAE, E.C. 3.1.1.6), que removem resíduos metoxi e acetil da pectina, produzindo ácido poligalacturônico; 2) enzimas de despolimerização, como as poligalacturonases (PG, E.C. 3.4.1.15), que hidrolisam as ligações  $\alpha - 1,4$  da pectina e as pectato liases (PAL, 4.2.2.2) e pectina liases (PL, 4.2.2.10), que quebram as ligações  $\alpha - 1,4$  da pectina pelo mecanismo de  $\beta -$  eliminação (Kashyap *et al.*, 2001; Gummadi e Panda, 2003; Yadav *et al.*, 2009). Na degradação por  $\beta$ -eliminação, a clivagem ocorre gerando uma dupla ligação entre C-4 e C-5 (Albersheim e Killias, 1962).

O interesse pelas pectinases vem de sua ampla aplicação industrial. As pectinases, principalmente as de origem microbiana, têm uma importante aplicação nos processos das indústrias de produção de sucos e vinhos, podendo ser empregadas nas etapas de preparação das frutas, como maceração ou extração de suco, na clarificação de vinhos e de sucos, dentre outras aplicações (Kashyap *et al.*, 2001; Hoondal *et al.*, 2002; Jayani *et al.*, 2005; Pedrolli *et al.*, 2009). Adicionalmente, essas enzimas possuem características como alta especificidade pelo substrato, catálise

controlada, além de serem biodegradáveis, reduzindo, assim, os problemas de toxicidade no ambiente e nos produtos (MacCabe *et al.*, 2002).

Nas indústrias alimentícias são utilizadas preparações enzimáticas contendo misturas das enzimas do complexo pectinolítico. Algumas dessas enzimas promovem, além da quebra da pectina, a sua desesterificação, como é o caso da pectina esterase (Alaña *et al.*, 1990; Lang e Dörnenburg, 2000). Essa desesterificação pode acarretar na produção de metanol e conseqüente volatilização dos ésteres responsáveis pelo sabor, sendo essas transformações indesejáveis para a indústria. A utilização de uma preparação enzimática composta preferencialmente por PL tem sido uma alternativa, uma vez que a PL é a única enzima do complexo pectinolítico capaz de clivar, sem ação prévia de outras enzimas, a ligação  $\alpha$ -1,4-glicosídica de pectinas altamente esterificadas (Alaña *et al.*, 1989). No entanto, para produtos alimentícios destinados ao consumo infantil, a PG é a mais indicada. A preparação de sucos de cenoura requer um tratamento mais brando, a maceração, ou seja, a separação de células inteiras. O tratamento enzimático mantém as células intactas, sendo que as vitaminas, a cor e o aroma são preservados e o conteúdo celular é protegido contra a oxidação (Lang e Dörnenburg, 2000; Gummadi e Panda, 2003).

Embora algumas pectinases sejam indicadas para propósitos específicos, como a PL e PG mencionadas anteriormente, algumas situações requerem que as enzimas pectinolíticas sejam combinadas. O uso de enzimas pode melhorar a estabilidade da opacidade nos néctares, assim como tornar eficiente a concentração de purês. Preparações de enzimas como Rapidase LIQ<sup>+</sup> (Gist-Brocades), Pectinex Ultra SP (Novo Nordisk) ou Rohapect TF (Rohm), que têm alta atividade de PG e PL combinadas com celulasas e hemicelulasas, diminuem a viscosidade, mantendo a estabilidade da opacidade (Kashyap *et al.*, 2001). Recentemente, poligalacturonases de *Aspergillus carbonarius* foram purificadas e utilizadas para produção de suco de maçã, levando a uma redução de 66% na viscosidade do suco (Nakkeeran *et al.*, 2011). No entanto, os autores concluíram que essa enzima, sozinha, não é adequada à aplicação industrial. Preparações contendo preferencialmente PG ou PL são obtidas por purificações de extratos de pectinases microbianas, ou por meio de linhagens que produzam preferencialmente essas enzimas em grandes quantidades (Lang e Dörnenburg, 2000). Contudo, a produção de diferentes enzimas por uma mesma linhagem é interessante, pois facilita a manipulação da cultura e evita problemas de

contaminação. Desse modo, pode-se utilizar a linhagem para a produção de uma ou outra enzima em maior quantidade.

Na literatura tem sido relatado que a expressão de genes que codificam enzimas pectinolíticas em *Aspergillus* e *Penicillium* é regulada em nível transcricional por condições ambientais, como fonte de carbono e pH, ocorrendo a indução por pectina e compostos pécnicos, e a repressão por glicose (Kusters-Van Someren *et al.*, 1991; Ribon *et al.*, 2002a; Bazzolli *et al.*, 2006; Trigui-Lahiani e Gargouri, 2007). Kusters-Van Someren *et al.* (1991 e 1992), ao avaliarem a expressão dos genes *pelA* e *pelB* de *Aspergillus niger*, verificaram que esses genes são regulados pelo mecanismo de indução pelo substrato e a repressão catabólica por açúcares simples, como glicose. Whitehead *et al.* (1995) caracterizaram a regulação de dois genes que codificam endopoligalacturonase, *pecA* e *pecB*, de *Aspergillus flavus*. Os autores verificaram que o gene *pecB* apresentou acúmulo de transcritos somente quando o fungo foi cultivado em pectina e na ausência de glicose. No entanto, foram detectados transcritos do gene *pecA* em micélio cultivado em glicose, em pectina e glicose ou em pectina. Os autores observaram que a expressão foi maior quando o micélio foi cultivado em pectina, comparado à expressão em glicose, concluindo que os genes *pecA* e *pecB* são controlados pelo mecanismo de indução por pectina.

Em nosso laboratório, os genes que codificam poligalacturonase e pectina liase em *P. griseoroseum* foram estudados visando entender a sua organização e regulação. Ribon *et al.* (1999 e 2002b) relataram o isolamento, a partir do banco genômico de *P. griseoroseum*, e caracterização de dois genes que codificam PG em *P. griseoroseum*. O gene *pgg1* foi expresso apenas em pectina a partir de 72 horas de crescimento e o gene *pgg2* foi expresso em todos os tempos estudados a partir de 24 horas, tanto em pectina como em sacarose e extrato de levedura. As regiões codificadoras dos genes *pgg1* e *pgg2* possuem, respectivamente, 1251 e 1165 pares de nucleotídeos e ambas são interrompidas por dois íntrons. Um polipeptídeo de 376 aminoácidos foi deduzido, a partir do seqüenciamento do gene *pgg1*, e possui um possível sítio de glicosilação (Asn<sup>307</sup>) e massa molecular predita de 38,4 KDa. A proteína deduzida de *pgg2* possui 369 aminoácidos, 38,3 KDa e dois potenciais sítios de glicosilação (Asn<sup>300</sup> e Asn<sup>338</sup>). A identidade entre as proteínas PGG1 e PGG2 foi de 57,5%. Com base nas seqüências gênicas, os pontos isoelétricos calculados das proteínas PGG1 e PGG2 foram de, respectivamente, 5,31 e 8,31 (Ribon *et al.*,

2002b). Em um estudo posterior, Bazzoli *et al.* (2006) isolaram e caracterizaram dois genes que codificam pectina liase, *plg1* e *plg2*, em *P. griseoroseum* e verificaram que os genes são expressos por indução pelo seu substrato, a pectina. A região codificadora do gene *plg1* é composta de 1341 pb interrompida por dois íntrons, de 101 pb e 115 pb. O gene *plg2* é compreendido por uma seqüência de 1378 pb, contendo quatro íntrons, de 56, 60, 52 e 39 pb. As proteínas deduzidas PLG1 e PLG2, a partir do seqüenciamento dos genes *plg1* e *plg2*, apresentaram massas moleculares aparentes de 40,1 kDa e 40,5 kDa, e pontos isoelétricos (pI) deduzidos de 9,46 e 5,55, respectivamente. Um alto valor de pI é uma característica interessante para aplicação industrial, pois este em associação com o pH de atuação confere a enzima grande pontencial de uso na indústria de sucos de frutas ácidas.

Outros genes que codificam enzimas pectinolíticas em fungos filamentosos já foram isolados e caracterizados. Whitehead *et al.* (1995) isolaram e caracterizaram dois genes que codificam endopoligalacturonase, *pecA* e *pecB*, de *A. flavus*, um fungo fitopatogênico agronomicamente importante. O gene *pecA* possui 1228 pb, com dois íntrons de 58 pb e 81. O gene *pecB* possui 1217 pb interrompidos por dois íntrons de 65 pb e 54 pb. Posteriormente, Trigui-Lahiani e Gargouri (2007) isolaram o gene *pnl1* que codifica pectina liase em *Penicillium occitanis*, um fungo fitopatogênico. O gene *pnl1* se apresentou em cópia única no genoma. A seqüência desse gene foi caracterizada e revelou uma região reguladora de 1010 pb e uma região codificadora de 1314 pb, interrompida por quatro íntrons de tamanhos 52 pb (íntrons 1 e 3) e 51 pb (íntrons 2 e 4).

Algumas pectinases vêm sendo purificadas e caracterizadas, para se obter informações sobre as suas propriedades físico-químicas e, também, sobre sua ação catalítica por meio da análise da estrutura protéica (Alaña *et al.*, 1989; Silva *et al.* 1993; Pagès *et al.*, 2001; Niture *et al.*, 2004; Celestino *et al.*, 2006). A primeira pectina liase estudada foi purificada a partir de uma preparação de Pectinol R-10 (Albersheim e Killias, 1962). Posteriormente, outras pectina liases foram purificadas a partir do cultivo de micro-organismos como *Pseudomonas fluorescens* (Schlemmer *et al.*, 1987), *Penicillium italicum* (Alaña *et al.*, 1989) e *A. niger* (Sánchez-Torrez *et al.*, 2003). Armand *et al.* (2000) utilizaram mutagênese sítio-direcionada para alterar os aminoácidos conservados do sítio catalítico da endopoligalacturonase II (PGII) de *A. niger*. Os autores relataram, com base na estrutura cristalografica da PGII, que os aminoácidos Arg-256 e Lys-258 são importantes para a interação com o substrato,

sendo inferido que a ausência de interação desses dois aminoácidos e o substrato mudaria a geometria da distorção ideal do substrato, que resultaria na diminuição da  $V_{max}$ . Pouderoyen *et al.* (2003) avaliaram a processividade da endopoligalacturonase I (PGI) de *A. niger* por meio da análise da estrutura cristalografica dessa proteína. Esses autores observaram que a alteração de uma Arg 96 para uma serina elimina a processividade dessa enzima. Bazzolli *et al.* (2006), baseados nas seqüências nucleotídicas dos genes *plg1* e *plg2*, deduziram as seqüências de aminoácidos das proteínas PLG1 e PLG2 de *P. griseoroseum*. Os autores observaram que existem poucos resíduos conservados entre as pectina liases, diferentemente do que ocorre com as poligalacturonases. A região conservada (VWIDH) nas pectina liases, que pode estar envolvida com a função catalítica foi identificada somente para PLG2, mas essa seqüência não foi encontrada em PLG1. Pedrolli *et al.* (2010) purificaram e caracterizaram a exopoligalacturonase produzida por *Aspergillus giganteus*. Os autores observaram que a PG de *A. giganteus* é mais tolerante ao aumento da temperatura do que as PGI e PGII de *Aspergillus japonicus*. Também foi sugerido que os resíduos de cisteína da enzima possuem um papel crítico na catálise.

Melhoramento genético tem sido conduzido com fungos filamentosos com o objetivo de aumentar a produção de pectinases e reduzir os custos de produção das enzimas, utilizando fontes de carbono alternativas e mais viáveis economicamente, que as substâncias pécticas. A obtenção de linhagens superprodutoras de pectinases pode ser realizada por meio da manipulação do genoma do fungo, utilizando-se diversas estratégias como a mutação, a recombinação, seguidas de seleção (Leuchtenberger e Mayer, 1991; Fernandes-Salomão *et al.*, 1996; Solís *et al.*, 1997; Hadj-Taieb *et al.*, 2002; Varavallo *et al.*, 2007) e a re-introdução de genes visando ao aumento do número de cópias e ao aumento da expressão dos mesmos (Kusters-Van Someren *et al.*, 1991; Bussink *et al.*, 1992; Ribeiro, 2001; Lopes *et al.*, 2004; Daly e Hearn, 2005; Ribeiro, 2005; Cardoso *et al.*, 2008). A re-introdução no genoma de genes que codificam pectinases, por meio da manipulação genética pela tecnologia do DNA recombinante, tem sido utilizada com êxito para aumento da produção dessas enzimas em diversos fungos (Bussink *et al.*, 1991; Rutkowski *et al.*, 1991; Kusters-Van Someren *et al.*, 1991; Bussink *et al.*, 1992; Khanh *et al.*, 1992; Kusters-Van Someren *et al.*, 1992; Van den Hombergh *et al.*, 1997; Kitamoto *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2008). Entretanto, apesar dos transformantes apresentarem aumento do número de cópias do gene no genoma, o aumento na atividade enzimática nem

sempre é observada, uma vez que os genes são controlados por indução com o substrato.

Visando a eliminação da regulação a nível transcricional da síntese de pectinases, isto é, repressão catabólica por açúcares simples e indução por compostos pécnicos, promotores constitutivos vêm sendo empregados. A estratégia de substituição da região reguladora original (o promotor) por uma que seja constitutiva e eficientemente ativada tem mostrado bons resultados em vários fungos filamentosos. Alguns exemplos de promotores fortes e constitutivos utilizados são: o promotor do gene que codifica a piruvato quinase (*pki*) em *A. niger* (Kusters-Van Someren *et al.*, 1992); o promotor do gene que codifica a celulase (*cbh1*) em *Trichoderma reesei* (Margolles-Clark *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2010); o promotor do gene que codifica a histona H4 em *Penicillium funiculosum* (Belshaw *et al.*, 2002); e o promotor do gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) de *Aspergillus nidulans* (Kolar *et al.*, 1988; Mikkelsen *et al.*, 2003). Em vista disso, linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* têm sido construídas com superexpressão de PL e/ou PG, que podem ser cultivadas sob condições de repressão para as pectinases do tipo selvagem e, portanto, sintetizam uma única enzima pectinolítica, ao invés de um conjunto de diferentes pectinases (Ribeiro, 2005; Teixeira, 2007; Cardoso *et al.*, 2008). Linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* com aumento da produção de PL e PG, denominadas recombinantes T105, T146 e T20 foram obtidas em nosso laboratório (Araújo *et al.*, 2005; Araújo *et al.*, 2007; Cardoso *et al.*, 2008). A linhagem recombinante T105 possui cópias adicionais do gene *plg1*, sob controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans*. As linhagens T146 e T20 possuem, respectivamente, cópias adicionais do gene *pgg2* e dos genes *pgg2* e *plg1*, sob o controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans*. As linhagens foram caracterizadas quanto à produção enzimática, em sacarose ou caldo de cana, apresentando aumentos nas atividades enzimáticas de 15 vezes para a PG, na linhagem T146, e de 132 vezes para a PL, na linhagem T105, quando comparadas à linhagem selvagem.

Após a obtenção das linhagens recombinantes, torna-se necessária a realização de análises genéticas para verificar a estabilidade e o número de cópias do gene integrado. Para que as linhagens modificadas possam ser usadas na indústria, a utilização de plasmídeos integrativos e estáveis é essencial para produção da proteína de interesse. Em estudo, visando o desenvolvimento de ferramentas genéticas, para manipulação de plasmídeos em *Penicillium nalgiovense*, Fierro *et al.* (2004)

compararam a estabilidade entre plasmídeos integrativos e replicativos. Os autores observaram que 68 a 84% dos conídios conservaram o plasmídeo replicativo, após uma geração sem pressão seletiva. No entanto, o plasmídeo integrativo mostrou maior estabilidade (96,9%), a qual foi atribuída ao fato de que este se integra no genoma. Em várias pesquisas com micro-organismos, em que se objetiva a produção de algum metabólito secundário ou mesmo de proteínas, é comum a opção por vetores integrativos, como uma forma de tornar mais estáveis as modificações introduzidas no genoma (Kolar *et al.*, 1988; Van den Hombergh *et al.*, 1997; Belshaw *et al.*, 2002; Daly e Hearn, 2005).

A combinação de técnicas moleculares tem permitido identificar e caracterizar variações na estrutura dos genomas de espécies relacionadas e em uma mesma espécie, assim como, a re-introdução de seqüências de DNA exógenas. Exemplos de sucesso são descritos na literatura como no caso da localização e análise do agrupamento dos genes de biossíntese da penicilina, no qual Färber e Geisen (2000) estudaram o cariótipo molecular de *P. nalgiovense* e *Penicillium chrysogenum* utilizando a técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) em associação com a técnica de hibridização. Esses autores demonstraram que ambas as espécies tem um cariótipo similar, possuindo quatro cromossomos cada. Entretanto, há diferenças no tamanho dos cromossomos que é refletido na diferença de 7,6 Mb entre os genomas das duas espécies e, foi observado também que, há clara diferença entre a localização cromossomal do conjunto de genes para produção de penicilina. Leem *et al.* (2003) clonaram um fragmento de gene da fosfolipase D (*pld*) em *Coprinellus congregatus* pelo método REMI (integração mediada por enzima de restrição). Os autores observaram por meio do cariótipo de *C. congregatus*, que essa espécie tem sete cromossomos com tamanho numa faixa de 1,6 – 4,7 Mb e o gene *pld* está localizado no cromossomo IV. Essa combinação de técnicas poderá ser utilizada para caracterização das linhagens recombinantes de *P. griseoroseum*, uma vez que os genes, que codificam enzimas pectinolíticas na linhagem selvagem, são genes cópia-única e poderão ser diferenciadas as cópias endógenas e as cópias integradas por meio de transformação.

Dentre essas técnicas, a de PCR em tempo real tem se destacado como uma ferramenta importante para a compreensão da organização e funcionalidade do genoma de diversas espécies. Wilhelm *et al.* (2003) propuseram um método para estimação do tamanho do genoma por PCR em tempo real e utilizaram como padrão

de validação, espécies cujo genomas tinham sido completamente seqüenciado, para comprovar sua teoria. O método se baseia na utilização de genes que são cópia única no genoma, a partir do qual se pode calcular a quantidade de DNA correspondente ao tamanho haplóide (valor  $C$ ) de um genoma. O tamanho do genoma é calculado pela fórmula  $G = C \times N_A \times M_{pb}^{-1}$ , onde  $N_A$  é o número de Avogrado ( $6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ) e  $M_{pb}^{-1}$  é a média da massa molecular de um par de base ( $660 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Usando a técnica descrita acima, Zuccaro *et al.* (2009) estimaram o tamanho do genoma do fungo *Piriformospora indica* e confirmaram os resultados por meio do PFGE. Por meio da adequação da metodologia, Lee *et al.* (2008) determinaram o número exato de cópias do gene *rrn* (rDNA) no genoma de *Escherichia coli* K12, utilizando como normalizador o gene cópia única da D-1-deoxixilulose 5- fosfato sintase (*dxs*). Marx *et al.* (2009) apresentaram um método baseado na integração do vetor dentro do locus de rDNA e amplificação do vetor pós-transformação por repetidas seleções com concentrações crescentes de antibióticos. Os autores utilizaram PCR em tempo real para determinar o número de cópias de genes inseridos e amplificados no locus de DNA ribossomal e correlacionaram o aumento do número de cópias com o aumento da produção da proteína. Um estudo similar foi realizado por Nijland *et al.* (2010), ao analisarem o agrupamento de genes para biossíntese de penicilina em *P. chrysogenum*. Os autores conseguiram avaliar a expressão em linhagens multicópias e em linhagens isogênicas, comparando os efeitos de aumento da dosagem gênica na produção das proteínas. Outros trabalhos demonstraram, ainda, ser possível a utilização dessa técnica para correlacionar o número de cópias com o aumento da biomassa e da quantidade de zoósporos, por meio da análise da região ITS1 em fungos anaeróbios do rúmex (Lwin *et al.*, 2011). A diversidade de aplicação dessa técnica e a rapidez de diagnósticos vêm favorecendo a sua escolha em relação à outras técnicas.

O crescimento microbiano e a produção de metabólitos, incluindo as enzimas, são afetados por vários parâmetros como, a composição do meio de cultivo, inóculo, pH, temperatura, aeração e agitação, dentre outros. De acordo com estudos disponíveis na literatura, as variações no pH do meio podem interferir no crescimento do organismo e na produção de enzimas, sendo necessária a manutenção do pH para se obter uma produção e uma secreção eficiente das enzimas extracelulares (Brumano *et al.*, 1993a; Fawole e Odunfa, 2003; Patil e Dayanand, 2006). Alonso *et al.* (2005), ao estudarem as condições de cultivo de *Yarrowia*

*lipolytica* para produção de lipase, observaram que ocorria diminuição do pH do meio nas etapas iniciais de cultivo. Os autores observaram que, após a diminuição inicial ocorria a estabilização do pH, quando os nutrientes eram metabolizados pelas células. Wang *et al.* (2005) inferiram que o controle de pH do meio de cultivo pode diminuir a atividade de proteases extracelulares, aumentando-se, assim, o rendimento na produção de outras proteínas.

Uma vez obtida a linhagem recombinante e confirmada sua estabilidade genética, outro aspecto a ser levado em consideração é a produção e secreção de enzimas extracelulares. Em muitos micro-organismos, principalmente em fungos filamentosos, as condições de cultivo são fatores determinantes para produção de proteínas de interesse com o rendimento desejado (Wang *et al.*, 2005). Cardoso *et al.* (2010) e Gonçalves (2006) estudaram a produção de PL pela linhagem T105 cultivada em biorreator com volume de trabalho de 10 L. Alta atividade de PL foi obtida quando a linhagem T105 foi cultivada em sacarose comercial e em caldo de cana, que são fontes de carbono de baixo custo. Posteriormente, Gonçalves (2008) utilizou a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) para escalonar a produção de PL e PG, pela linhagem recombinante *P. griseoroseum* T20, em frascos com volume de trabalho de 200 mL e em biorreator com volume de trabalho de 10 litros, utilizando açúcar cristal (sacarose) como fonte de carbono. A máxima produção de PL ocorreu em 87,7 horas de cultivo e 15,7 g/L de sacarose. Nessa condição, a atividade estimada de PL foi de 2428 U/mL. A máxima produção de PG ocorreu em 83,8 horas. Nessa condição, a atividade estimada de PG foi de 9465 U/mL. Fontana *et al.* (2009) avaliaram a produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae*, empregando o desenvolvimento de experimento fatorial, usando biorreatores agitados e aerados mecanicamente. Após 96 horas de cultivo foi detectada uma atividade de 86,2 U/mL de endo-PG e 60,6 U/mL de exo-PG, sendo observado que condições mínimas de oxigenação proporcionaram o aumento da produção enzimática. Os autores concluíram ainda que a manutenção do pH do meio de cultivo não resultou em aumentos significativos nos níveis enzimáticos.

Várias abordagens têm sido empregadas para estudar a secreção de proteínas por fungos, sendo a fusão de proteínas, a estratégia mais bem sucedida até agora. Gordon *et al.* (2000) monitoraram a secreção de proteínas em *A. niger*, por fusionarem a glicoamilase e a GFP (GLA::sGFP). Nas linhagens transformadas obtidas, a fluorescência foi detectada na região da parede celular das hifas e no septo,

revelando maior intensidade na região apical da hifa. Posteriormente, esses transformantes foram submetidos à mutagênese com radiação UV. Três mutantes foram selecionados, pela incapacidade de formar halo de hidrólise e, ao serem analisados quanto à fluorescência, mostraram acúmulo intracelular de GLA::sGFP, não sendo detectado fluorescência na parede celular ou no septo. Os autores concluíram que esse sistema pode ser utilizado para estudar a dinâmica da secreção de proteínas *in vivo* e como ferramenta para isolamento de mutantes da via secretora geral. Vários estudos sobre a via de secreção em fungos filamentosos têm mostrado que a formação de vesículas de secreção ocorre na região subapical e avança para a extremidade da hifa (“Spitzenkörper”) (Gordon *et al.*, 2000; Masai *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2008). Tem sido assumido que as proteínas produzidas são secretadas pela mesma maquinaria que transporta as proteínas requeridas para o crescimento polarizado da hifa (Pel *et al.*, 2007). Desse modo, condições que afetam ou que modifiquem o crescimento normal das hifas, também podem afetar a secreção de proteínas. Segundo Braun e Vecht-Lifshitz (1991), a morfologia de fungos filamentosos pode variar entre duas formas: esféricas e filamentos livres, quando cultivados em fermentação submersa, tendo essas modificações grande efeito sobre a produção e secreção de proteínas. Masai *et al.* (2003) reportaram que a mudança de temperatura alterou a distribuição das vesículas de proteínas no espaço intracelular da hifa. Outros trabalhos relataram que o aumento do número de ramificações da hifa possibilitou o aumento da secreção de amilase, por linhagens mutantes de *A. oryzae* cultivadas em substrato sólido (Biesebeke *et al.*, 2005).

Considerando o potencial das linhagens recombinantes de *P. griseoroseum*, obtidas em nosso laboratório, como organismos produtores de enzimas pectinolíticas e a ampla aplicação industrial dessas enzimas, propõem-se a caracterização genética dessas linhagens. Portanto, os objetivos deste trabalho foram: determinar o tamanho do genoma e o número de cromossomos de *P. griseoroseum*, bem como a localização do gene *plg1* endógeno, que codifica para pectina liase; analisar o número de cópias e a expressão dos genes *plg1* e *pgg2*, sob o controle do promotor do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) de *A. nidulans*, integrados no genoma das linhagens recombinantes de *P. griseoroseum*; e avaliar a produção e secreção de PL e PG, a partir da análise do extrato celular e do sobrenadante da cultura das linhagens selvagem e recombinantes de *P. griseoroseum* cultivadas em meios com variação de pH.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaña, A., Alkorta, I., Llama, M.J., Serra, J.L. (1990) Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p. 3755-3759.
- Alaña, A., Gabilondo, A., Hernando, F., Moragues, M.D., Dominguez, J.B., Llama, M.J., Serra, J.L. (1989) Pectin lyase production by *Penicillium italicum* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55(6), p. 1612-1616.
- Albersheim, P., Killias, U. (1962) Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. *Archives of Biochemistry Biophysics*, v. 97 (1), p. 107-115.
- Alonso, F.O.M.; Oliveira, E.B.L.; Dellamora-Ortiz, G.M.; Pereira-Meirelles, F.V. (2005) Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 22 (1), p. 9-18.
- Araújo, E. F., Queiroz, M. V., Teixeira, J. A., Gonçalves, D. B., Bazzolli, D. M. S., Ribon, A. O., Ribeiro, J. B. (Inventores). (2007) Universidade Federal de Viçosa (Depositante). *Linhagem recombinante geneticamente modificada Penicillium griseoroseum T20 com maior produção de pectina liase e poligalacturonase, cassetes de expressão para a construção da linhagem recombinante, preparação enzimática e processo para produção da preparação enzimática*. Depósito de pedido de patente. PI 0705573-0.
- Araújo, E. F., Silva, D. O., Queiroz, M. V., Cardoso, P. G. (Inventores). (2005) Universidade Federal de Viçosa (Depositante). *Linhagem recombinante de Penicillium griseoroseum geneticamente modificada com aumento na produção de pectina liase*. Depósito de pedido de patente. PI0502515-0.
- Armand, S.; Wagemaker, M.J.M.; Sánchez-Torres, P.; Kester, H.C.M.; van Santen, Y.; Dijkstra, B.W.; Visser, J.; Benen, J.A.E. (2000) The active site topology of

- Aspergillus niger* endopolygalacturonase II as studied by site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275(1), p. 691-696.
- Baracat, M.C., Valentim, C., Muchovej, J.J., Silva, D.O. (1989) Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. *Biotechnology Letters*, v. 11 (12), p. 899-902.
- Baracat-Pereira, M.C., Coelho, J.L.C., Silva, D.O. (1994) Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose and yeast extract for degumming of natural fibers. *Letters in Applied Microbiology*, v. 18, p. 127-129.
- Bazzolli, D.M.S., Ribon, A. O. B., Queiroz, M. V., Araújo, E. F. ( 2006) Molecular characterization and expression profile of pectin-lyase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 52(11), p. 1070-1077.
- Belshaw, N.J.; Haigh, N.P.; Fish, N.M.; Archer, D.B.; Alcocer, M.J. (2002) Use of a histone H4 promoter to drive the expression of homologous and heterologous proteins by *Penicillium funiculosum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60 (4), p. 455-460.
- Biesebeke, R., Record, E., Biezen, N., Heerikhuisen, M., Franken, A., Punt, P.J., van den Hondel, C. A. M. J. J. (2005) Branching mutants of *Aspergillus oryzae* with improved amylase and protease production on solid substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 69, p. 44–50.
- Braun, S., Vecht-Lifshitz, S.E. (1991) Mycelial morphology and metabolite production. *Trends in Biotechnology*, v. 9, p. 63-68.
- Brumano, M.H.N., Coelho, J.L.C., Araújo, E.F., Silva, D.O. (1993a) Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* as a function of the inoculum and culture conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 9, p. 225-228.
- Brumano, M.H.N., Coelho, J.L.C., Araújo, E.F., Silva, D.O. (1993b) Pectin lyase activity of *Penicillium griseoroseum* related to degumming of ramie. *Revista de Microbiologia*, v. 24(3), p. 175-178.
- Bussink, H. J. D.; Buxton, F. P. e Visser, J. (1991) Expression and sequence comparison of the *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubigenensis* genes encoding polygalacturonase II. *Current Genetics*, v. 19, p. 467-474.
- Bussink, H. J. D.; Van Den Hombergh, J. P. T. W.; Van Den Ijssel, P. R. L. A. e Visser, J. (1992) Characterization of polygalacturonase-overproducing

- Aspergillus niger* transformants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 37, p. 324-329.
- Cardoso, P. G., Ribeiro, J. B., Teixeira, J. A., Queiroz, M. V., Araújo, E. F. (2008) Overexpression of the *plg1* gene encoding pectin lyase in *Penicillium griseoroseum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35 (3), p. 159-166.
- Cardoso, P. G., Teixeira, J. A., Queiroz, M. V., Araújo, E.F. (2010) Pectin lyase production by recombinant *Penicillium griseoroseum* strain 105. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 56 (10), p. 831-837.
- Celestino, S.M.C., Freitas, S.M., Medrano, F.J., Sousa, M.V., Filho, E.X.F. (2006) Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. *Journal of Biotechnology*, v. 123, p. 33-42.
- Chen, X., Liang, Y., Hua, J., Tao, L., Qin, W., Chen, S. (2010) Overexpression of bacterial ethylene-forming enzyme gene in *Trichoderma reesei* enhanced the production of ethylene. *International Journal of Biological Sciences*, v. 6(1), p. 96-106.
- Daly, R.; Hearn, M.T. (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, v. 18 (2), p. 119-138.
- Färber, P., Geisen, R. (2000) Karyotype of *Penicillium nalgiovense* and assignment of the penicillin biosynthetic genes to chromosome IV. *International Journal of Food Microbiology*, v. 58 (1-2), p. 59-63.
- Fawole, O.B.; Odunfa, S.A. (2003) Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 52 (4), p. 223-227.
- Fernandes-Salomão, T. M.; Amorim, A. C. R.; Chaves-Alves, V. M.; Coelho, J. L. C.; Silva, D. O. e Araújo, E. F. (1996) Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. *Revista de Microbiologia*, v. 27(1), p. 33-36.
- Ferreira, G. (2000) *Produção de patulina por Penicillium spp.* Viçosa, MG: UFV, 2000 - 54p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa.
- Fierro, F., Laich, F., García-Rico, R.O., Martín, F.J. (2004) High efficiency transformation of *Penicillium nalgiovense* with integrative and autonomously

- replicating plasmids. *International Journal of Food Microbiology*, v. 90, p.237-248.
- Fischer, R., Zekert, N., Takeshita, N. (2008) Polarized growth in fungi – interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Molecular Microbiology*, v. 68(4), p. 813–826.
- Fontana, R. C., Polidoro, T. A., Silveira, M. M. (2009) Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 4493–4498.
- Gonçalves, D.B. (2006) *Produção de pectina liase por uma linhagem recombinante de Penicillium griseoroseum e processamento de suco de frutas pelo extrato enzimático*. Viçosa, MG: UFV, 2006 - 41p. Monografia (Bacharelado em Bioquímica) - Universidade Federal de Viçosa.
- Gonçalves, D.B. (2008) *Produção de pectina liase e poligalacturonase pela linhagem recombinante Penicillium griseoroseum T20*. Viçosa, MG: UFV, 2008 - 76p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa.
- Gordon, C. L.; Khalaj, V.; Ram, A. F. J.; Archer, D. B.; Brookman, J. L.; Trinci, A. P. J.; Jeenes, D. J.; Doonan, J. H.; Wells, B.; Punt, P. J.; Van Den Hondel, C. A. M. J. J.; Robson, G. D. (2000) Glucoamylase: green fluorescent protein fusions to monitor protein secretion in *Aspergillus niger*. *Microbiology*, v. 146, p. 415-426.
- Gummadi, S.N. and Panda, T. (2003) Purification and biochemical properties of microbial pectinases – a review. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 987-996.
- Hadj-Taieb, N., Ayadi, M.; Trigui, S.; Bouabdallah, F.; Gargouri, A. (2002) Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CTI) of *Penicillium occitanis*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 662-666.
- Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N., Beg, Q.K. (2002) Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, p. 409-418.
- Iwashita K. (2002) Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94(6), p. 530-535.
- Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R. (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2931-2944.
- Kanamasa, S.; Mochizuki, M.; Takada, G.; Kawaguchi, T.; Sumitani, J.; Arai, M. (2003) Overexpression of *Aspergillus aculeatus* cellobiohydrolase I in

- Aspergillus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 95(6), p. 627-629.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., Tewari, R. (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, v. 77 (3), p. 215-227.
- Khanh, N.Q., Leidinger, K., Albrecht, H., Ruttkowski, E., Gottschalk, M. (1992) Effects of promoters on the enhancement of pectin methyl esterase expression in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, v. 14, p. 1047-1052.
- Kitamoto, N., Yoshino-Yasuda, S., Ohmiya, K., Tsukagoshi, N. (2001) Sequence analysis and overexpression of a pectin lyase gene (*pel1*) from *Aspergillus oryzae* KBN616. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 65, p. 209-212.
- Kolar, M.; Punt, P. J.; Van Den Hondal, C. A. M. J. J. e Schwab, H. (1988) Transformation of *Penicillium chrysogenum* using dominant selection markers and expression of an *Escherichia coli* lacZ fusion gene. *Gene*, v. 62, p. 127-134.
- Kusters-Van Somerem, M., Flipphi, M. Graaf, L., Van Den Broeck, H. Kester, H., Hinnen, A., Visser, J. (1992) Characterization of the *Aspergillus niger pelB* gene: structure and regulation of expression. *Molecular and General Genetics*, v. 234, p. 113-120.
- Kusters-Van Someren, M., Harmsen, J.A.M., Kester, H.C.M., Visser, J. (1991) Structure of the *Aspergillus niger pelA* gene and its expression in *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*, v. 20, p. 293-299.
- Lang, C.; Dörnenburg, H. (2000) Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, p. 366-375.
- Lee, C., Lee, S., Shin, S. G., Hwang, S. (2008) Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: absolute and relative quantification assays with *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 78, p. 371-376.
- Leem, Y. E., Ross, I. K., Choi, H. T. (2003) Tagging and localization of a phospholipase D gene in *Coprinellus congregatus* by restriction enzyme-mediated integration and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, v. p. 225, 285-289.
- Leuchtenberger, A. e Mayer, G. (1991) Synthesis of different pectinases by filamentous growing *Aspergillus niger* mutants. *Folia Microbiologica*, v. 36, p. 362-366.

- Lopes, F.J.F., Araujo, E.F., Queiroz, M.V. (2004) Easy detection of green fluorescent protein multicopy transformants in *Penicillium griseoroseum*. *Genetics and Molecular Research*, v. 3, p. 449-455.
- Lwin, K., O., Hayakawa, M., Ban-Tokuda, T., Matsui, H. (2011) Real-Time PCR Assays for Monitoring Anaerobic Fungal Biomass and Population Size in the Rumen. *Current Microbiology*, v. 62, p. 1147–1151.
- MacCabe, A.P., Orejas, M., Tamayo, E.N., Villanueva, A., Ramón, D. (2002) Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biotechnology*, v. 96, p. 43-54.
- Margolles-Clark, E., Harman, G. E. e Pentilă, M. (1996) Enhanced expression of endochitinase in *Trichoderma harzianum* with the *cbh1* promoter of *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 2152-2155.
- Marx, H., Mecklenbrauker, A., Gasser, B., Sauer, M., Mattanovich, D. (2009) Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. *FEMS Yeast Research*, v. 9, p. 1260–1270.
- Masai, K.; Maruyama, J.; Nakajima, H.; Kitamoto, K. (2003) *In vivo* visualization of the distribution of a secretory protein in *Aspergillus oryzae* hyphae using the RntA-EGFP fusion protein. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 67 (2), p. 455-459.
- Mikkelsen, L.; Sarrocco, S.; Lubeck, M.; Jensen, D. F. (2003) Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. *FEMS Microbiology Letters*, v. 223(1), p. 135-139.
- Minussi, R.C., Soares-Ramos, J.R.L., Coelho, J.L.C., Silva, D.O. (1998) Sugar-cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*. *Revista de Microbiologia*, v. 29, p. 246-250.
- Nakkeeran, E., Umesh-Kumar, S., Subramanian, R. (2011) *Aspergillus carbonarius* polygalacturonases purified by integrated membrane process and affinity precipitation for apple juice production. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 3293–3297.
- Nevalainen, H.K.M., Te'o, V.S.J., Bergquist, P.L. (2005) Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*, v. 23, p. 468-474.
- Nijland, J. G., Ebbendorf, B., Woszczyńska, M., Boer, R., Bovenberg, R.A.L., Driessen, A.J.M. (2010) Nonlinear biosynthetic gene cluster dose effect on penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76(21), p. 7109-7115.

- Niture, S.K., Pant, A. (2004) Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. *Microbiological Research*, v. 159, p. 305–314.
- Pagès, S.; Kester, H.C.M.; Visser, J.; Benen, J.A.E. (2001) Changing a single amino acid residue switches processive and non-processive behavior of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase I and II. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276(26), p. 33652-33656.
- Patil, S.R.; Dayanand, A. (2006) Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. *Bioresource Technology*, v. 97(16), p. 2054-2058.
- Pedrolli, D.B., Carmona, E.C. (2010) Purification and characterization of the exopolygalacturonase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 37, p. 567–573.
- Pedrolli, D.B., Monteiro, A.C., Gomes, E., Carmona, E.C. (2009) Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, v. 3, p. 9-18.
- Pel, H.J., *et al.* (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*. v. 25, p. 221–231.
- Pouderoyen, G. v.; Snijder, H.J.; Benen, J.A.E.; Dijkstra, B.W. (2003) Structural insights into the processivity of endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*. *FEBS Lettes*, v. 554, p. 462-466.
- Punt, P.J., Biezen, N.V., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J., Hondel, C.V.D. (2002) Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology*, v. 20 (5), p. 200-206.
- Ribeiro, J.B. (2001) *Isolamento e caracterização de genes que codificam poligalacturonase e transformação de Penicillium expansum*. Viçosa, MG, UFV, 2001 - 57p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa.
- Ribeiro, J.B. (2005) *Produção de poligalacturonase por linhagens recombinantes de Penicillium griseoroseum*. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2005 - 106p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa.
- Ribon, A. O. B., Queiroz, M. V., Araújo, E. F. (2002a) Structural organization of polygalacturonase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum*. *Genetics and Molecular Biology*, v. 25(4), p. 489-493.

- Ribon, A. O. B., Queiroz, M. V., Coelho, J. L. C., Araújo, E. F. (2002b) Differential expression of polygalacturonase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum* in different carbon sources. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 29 (3), p. 145-148.
- Ribon, A. O. B.; Coelho, J. L. C.; Barros, E. G. e Araújo, E. F. (1999) Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Penicillium griseoroseum*. *Biotechnology Letters*, v. 21, p. 395-399.
- Ruttkowski, E., Khanh, N.Q., Wientjes, F.J.; Gottschalk, M. (1991) Characterization of a polygalacturonase gene of *Aspergillus niger* RH5344. *Molecular Microbiology*, v. 5, p. 1353-1361.
- Sánchez-Torres, P.; Visser, J.; Benen, J.A.E. (2003) Identification of amino acid residues critical for catalysis and stability in *Aspergillus niger* family 1 pectin lyase A. *Biochemical Journal*, v. 370, p. 331-337.
- Schlemmer, A.F., Ware, C.F., Keen, N.T. (1987) Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Pseudomonas fluorescens* W51. *Journal of Bacteriology*, v. 169 (10), p. 4493-4498.
- Silva, D.O., Attwood, M.M., Tempest, D.W. (1993) Partial purification and properties of pectin lyase from *Penicillium expansum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 9(5), p. 574-578.
- Solís, S.; Flores, M.E.; Huitrón, C. (1997) Improvement of pectinase production by interspecific hybrids of *Aspergillus* strains. *Letters in Applied Microbiology*, v. 24, p. 77-81.
- Teixeira, J. A. (2007) *Obtenção e caracterização de linhagens recombinantes de Penicillium griseoreoseum com alta produção de pectina liase e poligalacturonase*. Viçosa, MG: UFV, 2007 - 70p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa.
- Trigui-Lahiani, H.; Gargouri, A. (2007) Cloning, genomic organisation and mRNA expression of a pectin lyase gene from a mutant strain of *Penicillium occitanis*. *Gene*, v. 388, p. 54-60.
- Van den Hombergh, J.P.; Fraissinet-Tachet, L.; van de Vondervoort, P.J.; Visser, J. (1997) Production of the homologous pectin lyase B protein in six genetically defined protease-deficient *Aspergillus niger* mutant strains. *Current Genetics*, v. 32 (1), p. 73-81.
- Varavallo, M.A.; Queiroz, M.V.; Lana, T.G.; Brito, A.T.R.; Gonçalves, D.B.; Araújo, E.F. (2007) Isolation of recombinant strains with enhanced pectinase

- production by protoplast fusion between *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 1-6.
- Visôto, L. E. (2003) *Produção de ocratoxina A por fungos filamentosos isolados de café e por fungos produtores de pectinases*. Viçosa, MG: UFV, 2003 - 43p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa.
- Vivan, J. (2002) *Produção da micotoxina citrinina por Penicillium spp.* Viçosa, MG: UFV, 2002 - 42p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa.
- Wang, L., Ridgway, D., Gu, T., Moo-Young, M. (2005) Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances*, v. 23, p. 115-129.
- Whitehead, M.P.; Shieh, M.T.; Cleveland, T.E.; Cary, J. W.; Dean, R. A. 1995. Isolation and characterization of polygalacturonase genes (*pecA* and *pacB*) from *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61 (9), p. 3316-3322.
- Wilhelm, J., Pingoud, A., Hahn, M. (2003) Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucleic Acids Research*, v. 31 (10), e56.
- Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., Yadav, K.D.S. (2009) Pectin lyase: a review. *Process Biochemistry*, v. 44(1), p. 1-10.
- Zuccaro, A., Basiewicz, M., Zurawska, M., Biedenkopf, D., Kogel, K. (2009) Karyotype analysis, genome organization, and stable genetic transformation of the root colonizing fungus *Piriformospora indica*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 46, p. 543-550.

## **CAPÍTULO 1**

**Análise do cariótipo, do número de cópias e da expressão dos genes *plg1* e *pgg2* de linhagens recombinantes de *Penicillium griseoroseum* com alta produção de pectina liase e poligalacturonase**

## Resumo

O fungo *Penicillium griseoroseum* apresenta potencial de aplicação em escala industrial, como hospedeiro para produção de proteínas homólogas e heterólogas. Neste trabalho foi estimado o tamanho do genoma de *P. griseoroseum* entre 29,8 e 31,0 Mb, distribuídos em quatro cromossomos. O gene *plg1*, que codifica pectina liase (PL), está em cópia única no genoma de *P. griseoroseum* e foi localizado no cromossomo II (9,22 Mb). A linhagem recombinante T105, que possui cópias adicionais do gene *plg1*, sob controle do promotor de *gpd* de *Aspergillus nidulans*, apresentou integrações nos cromossomos II, III e IV. As linhagens T146 e T20 possuem, respectivamente, cópias adicionais do gene *pgg2* e dos genes *pgg2* e *plg1*, sob o controle do promotor do gene *gpd* de *A. nidulans*. O gene *pgg2* codifica PG em *P. griseoroseum*. A análise da expressão dos genes *plg1* e *pgg2*, nas linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* multi-cópias, mostrou que o aumento do número de cópias dos genes proporciona o aumento da produção enzimática. Uma cópia do gene *plg1*, sob o controle do promotor constitutivo, proporcionou um aumento de 200 vezes na quantidade de transcritos em relação ao gene endógeno e duas cópias do gene *pgg2*, também sob o controle do promotor constitutivo, proporcionaram um aumento de 1100 vezes em relação ao gene endógeno. Estes resultados sugerem que a maquinaria de transcrição, tradução, e secreção de proteínas do fungo *P. griseoroseum* responde ao aumento do número de cópias de genes no genoma.

**Palavras chaves:** *Penicillium griseoroseum*; estrutura do genoma; expressão gênica; produção de proteínas; pectinases

## 1. Introdução

O fungo filamentosso *Penicillium griseoroseum* tem sido utilizado como hospedeiro para produção de proteínas homólogas e heterólogas. O isolado selvagem *P. griseoroseum* CCT6421 foi considerado como sendo promissor para produção de pectinases, tendo sido demonstrado a ausência de produção de micotoxinas como patulina, citrinina e ocratoxina A nas condições de cultivo para produção de pectinases (Baracat *et al.*, 1989; Cardoso *et al.*, 2010). Outra característica importante desse fungo é a ausência de proteases secretadas no meio de cultivo (Cardoso *et al.*, 2010). Essas características destacam a vantagem da sua aplicação como linhagem hospedeira, visando à produção de proteínas em escala industrial. Entretanto, pouco se conhece sobre a organização do genoma de *P. griseoroseum*, sendo a compreensão da organização do genoma e dos mecanismos da regulação gênica requisitos importantes para utilização de um organismo como hospedeiro para produção industrial de metabólitos de interesse.

Tendo em vista a utilização do *P. griseoroseum* como produtor de enzimas pectinolíticas e a aplicação dessas enzimas na indústria de sucos de frutas e vinhos, vários trabalhos foram realizados para aumentar a produção dessas enzimas (Baracat-Pereira *et al.*, 1994; Minussi *et al.*, 1998). Para entender a organização e regulação dos genes que codificam poligacturonase (PG) e pectina liase (PL) em *P. griseoroseum*, Ribon *et al.* (2002) e Bazzolli *et al.* (2006) isolaram e caracterizaram dois genes que codificam PG (*pgg2* e *pgg1*) e dois genes que codificam PL (*plg1* e *plg2*), respectivamente. Outros estudos mostraram que estes genes estão em cópias únicas no genoma e são regulados em nível transcricional, sendo induzidos por pectina e reprimidos por glicose (Bazzolli *et al.*, 2008; Ribon *et al.*, 2009). Os autores relataram que o nível de transcritos dos genes *pgg2* e *plg1* são mais elevados do que o nível de transcritos dos genes *pgg1* e *plg2*. Posteriormente, os genes *plg1* e *pgg2* foram caracterizados como responsáveis pela maior contribuição para produção de enzimas pectinolíticas em *P. griseoroseum*.

Trabalhos prévios mostraram o desenvolvimento de um sistema de transformação heteróloga utilizando o gênero *Penicillium*. Queiroz *et al.* (1998) desenvolveram um sistema de transformação heteróloga de um mutante de *P. griseoroseum* para a assimilação de nitrato com o gene *nia* de *F. oxysporum*. Para aumentar a produtividade da proteína de interesse em linhagens hospedeiras, a obtenção de linhagens multi-cópias para o gene alvo tem sido empregada com

sucesso, utilizando várias espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Thichoderma* e leveduras, como *Pichia pastoris* (Nevalainen *et al.*, 2005, Marx *et al.*, 2009). O aumento da produção de proteínas por essas linhagens tem sido alcançado pela utilização de vetores de expressão integrativos contendo o gene alvo sob controle de um promotor forte e constitutivo (Belshaw *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2010). Empregando-se essa estratégia, linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* com aumento na produção de PL e PG foram obtidas. As linhagens recombinantes denominadas T105, T146 e T20 possuem cópias adicionais dos genes *plg1* e *pgg2*, sob o controle do promotor forte e constitutivo do gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) e a região de terminação do gene que codifica a triptofano sintetase (*trpC*) de *Aspergillus nidulans* (Araújo *et al.*, 2005; Araújo *et al.*, 2007; Cardoso *et al.*, 2008). A linhagem recombinante T105 possui cópias adicionais do gene *plg1*, sob controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans*. As linhagens T146 e T20 possuem, respectivamente, cópias adicionais do gene *pgg2* e dos genes *pgg2* e *plg1*, sob o controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans*. As linhagens foram caracterizadas quanto à produção enzimática, em sacarose ou caldo de cana, apresentando aumentos nas atividades enzimáticas de 15 vezes para a PG, na linhagem T146, e de 132 vezes para a PL, na linhagem T105, quando comparadas à linhagem selvagem (Araújo *et al.*, 2007; Cardoso *et al.*, 2008).

A combinação de técnicas moleculares tem permitido identificar e caracterizar modificações na estrutura dos genomas de diferentes organismos, como a re-introdução de seqüências de DNA. A técnica de PCR em tempo real tornou-se uma ferramenta importante para a compreensão da organização e funcionalidade do genoma de diversas espécies modelos e de aplicabilidade industrial. A partir dessa técnica, vários métodos foram propostos, dentre eles um método para estimar o tamanho do genoma, utilizando-se genes cópias únicas no genoma (Wilhelm *et al.*, 2003). Por meio da adequação dessa metodologia, também tem sido possível determinar o número exato de cópias de um gene, utilizando como normalizador um gene cópia única (Whelan *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008; Nijland *et al.*, 2010).

Os estudos genéticos e fisiológicos realizados com o isolado *P. griseoroseum* CCT6421 ressaltam as suas vantagens para utilização do mesmo como hospedeiro para produção de proteínas. Visando ampliar o conhecimento sobre a organização do genoma e regulação gênica nas linhagens recombinantes de *P. griseoroseum*, foi conduzida a análise do tamanho do genoma e do número de cromossomos de *P.*

*griseoroseum*, bem como a localização do gene *plg1*, que codifica pectina liase, por meio das técnicas de eletroforese em campo pulsado (PFGE), hibridização e PCR em tempo real. Após a determinação do número de cópias dos genes *plg1* e *pgg2*, em linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* com aumento da expressão de pectina liase e poligalacturonase, foi possível inferir sobre o aumento do número de cópias dos genes e o aumento da produção enzimática. Além disso, a expressão dos genes *plg1* e *pgg2* na linhagem recombinante T20 foi analisada, mostrando a super expressão desses genes.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Micro-organismos**

A linhagem selvagem *P. griseoroseum* CCT6421, isolada na Universidade Federal de Viçosa, a linhagem mutante *P. griseoroseum* PG63 *niaD*<sup>-</sup>, obtida por Pereira *et al.* (2004) e as linhagens recombinantes *P. griseoroseum* T105 (Araújo *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2008), T146 (Araújo *et al.*, 2007) e T20 (Araújo *et al.*, 2007) foram utilizadas. A linhagem mutante *P. griseoroseum* PG63 *niaD*<sup>-</sup> possui o genoma idêntico ao da linhagem selvagem de *P. griseoroseum*, com exceção da deleção de 122 pb no gene *niaD*<sup>-</sup>, que codifica a nitrato redutase (Pereira *et al.*, 2004). As linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* T105 e T146 contêm, respectivamente, cópias adicionais do gene *plg1* e do gene *pgg2*. Em ambas as linhagens recombinantes, os genes *plg1* e *pgg2* estão sob o controle do promotor do gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) e a região de terminação do gene que codifica a triptofano sintetase (*trpC*) de *A. nidulans*. A linhagem recombinante de *P. griseoroseum* T20 é derivada da linhagem T105 e possui cópias adicionais de ambos os genes, *plg1* e *pgg2*, sob o controle do promotor do gene *gpd* e a região de terminação do gene *trpC* de *A. nidulans* (Araújo *et al.*, 2007).

### **2.2. Meios e condições de cultivo**

As linhagens foram cultivadas a 25°C por sete dias, em placas de Petri contendo meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA), para obtenção do inóculo em solução de Tween 80 a 0,2% (v/v). A padronização do inóculo foi feita pela contagem dos conídios em câmara de Neubauer. Para avaliar a expressão dos genes *plg1* e *pgg2*, 10<sup>6</sup> conídios por mililitro, obtidos das linhagens PG63 e recombinante T20, foram inoculados em meio líquido mínimo mineral tamponado (pH 6,8) contendo K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,98 g.L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,44 g.L<sup>-1</sup>; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 g.L<sup>-1</sup>, suplementado com MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,1 g.L<sup>-1</sup>, sacarose 10 g.L<sup>-1</sup> e extrato de levedura 0,6 g.L<sup>-1</sup>. As linhagens foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com volume de 100 mL e mantidas sob constante agitação de 150 rpm e temperatura de 25°C, durante um período de 120 horas. Amostras foram coletadas em intervalos de 12 horas ou quando mencionado. O micélio utilizado para a extração de RNA total e massa seca micelial foi obtido por filtração das culturas em peneira de 400 malhas/pol<sup>2</sup> (37 µm de poro). Os experimentos foram conduzidos com três repetições.

### **2.3. Preparação dos protoplastos e inclusão em agarose**

A obtenção de protoplastos foi baseada no método de Dias *et al.* (1999), com modificações. As linhagens foram cultivadas por 18-20 horas e a 800 mg de micélio foram adicionados 5 mL de estabilizador osmótico (tampão fosfato 10 mM; KCl 0,6 M) e 30 mg de “Lysing Enzymes” L1412 (SIGMA®). A mistura foi incubada a 80 RPM e 30°C, durante 3-4 horas. Os protoplastos foram filtrados em gaze estéril e lavados 2 vezes em 5 mL do estabilizador osmótico e a cada lavagem centrifugados a 2300 g durante 5 minutos. Os protoplastos foram ressuspensos para uma concentração final de  $10^7$  a  $10^8$  protoplastos.mL<sup>-1</sup>. A suspensão de protoplastos foi misturada a igual volume de solução de agarose 1,4% a 50°C, incluída em fôrmas próprias e incubadas a 4°C por 10 minutos. Os blocos de agarose contendo os protoplastos foram transferidos para tubos Eppendorfs contendo 1 mL de solução de NDS (N-lauroyl sarcosinato 1%; EDTA 50 mM pH 8,0; Tris HCl 10 mM) e 50 µL de proteinase K (20 mg/mL) e incubados a 50°C por 48 horas. Após lise dos protoplastos os blocos foram lavados 2 vezes em EDTA 50 mM pH 8,0 a 50°C por 30 minutos. Esse procedimento foi repetido duas vezes e os tubos contendo os blocos foram estocados em geladeira (4°C).

### **2.4. Avaliação do cariótipo por eletroforese em campo pulsado (PFGE)**

O gel foi preparado usando *Chromosomal grade agarose* (Bio-Rad) 0,8% em TBE 0,5 X (Tris-Borato 45,0 mM, EDTA 1,0 mM pH 8). O tampão foi trocado a cada 48 horas e mantido a temperatura constante de 10°C. A corrida foi conduzida no equipamento CHEF-DRII – Bio-Rad com corrente de 1,2 Vcm<sup>-1</sup> e os pulsos, divididos em três blocos: B1 8400-13000 s, 75 h; B2 3300-5400s, 90 h; B3 2000-2700, 45 h. Após separação dos cromossomos, o gel foi tratado com 100 mL de água destilada contendo 5 µL de solução de brometo de etídeo (10 mg/mL) por 30 a 60 minutos e depois colocado em água destilada por pelo menos 30 minutos. Em seguida, o gel foi analisado e a imagem foi digitalizada em aparelho de fotodocumentação apropriado.

### **2.5. Extração de DNA total**

O DNA total foi extraído conforme Specht *et al.* (1982), com modificações. O micélio (1,0 g) foi triturado em nitrogênio líquido e transferido para microtubo contendo 400 µL de tampão de extração (Tris 50 mM pH 8,0; EDTA 20 mM pH 8,0;

NaCl 250 mM; SDS 1%), o qual foi incubado a 70°C durante 30 minutos. Adicionaram-se 350 µL de acetato de potássio 5 M e incubou-se em banho de gelo por 30 minutos. A mistura foi centrifugada a 10000 g/10 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Adicionou-se metade do volume de fenol-clorofórmio, sob leve agitação, mantendo em banho de gelo. Centrifugou-se a 13000 g/ 5 min, transferiu-se a fase superior para um novo tubo e adicionou-se metade do volume de isopropanol; incubou-se a -20°C durante 2 horas. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 13000 g durante 5 minutos e os ácidos nucléicos lavado com álcool 70%, secos a temperatura ambiente e ressuspensos em água miliQ autoclavada. Adicionaram-se 2 µL de RNAase (10 mg/mL concentração-estoque), incubando à 37°C durante 30 minutos.

## **2.6. Análise por hibridização**

Ambos, o DNA total e o DNA cromossomal, após separação por eletroforese em gel de agarose, foram transferidos para uma membrana de náilon (Duralon-UV<sup>TM</sup>, Stratagene) por capilaridade, segundo as recomendações de Sambrook *et al.* (1989). Previamente à transferência, o gel foi tratado com solução de desnaturação (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M) e de neutralização (Tris-HCl 0,5 M pH 7,0; NaCl 1,5 M) pelo período de 1 hora para cada tratamento.

### **2.6.1. Análise da região telomérica para determinação do número de cromossomos em *P. griseoroseum***

O DNA total do *P. griseoroseum* foi clivado com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Eco*RI e *Sma*I e os fragmentos gerados foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose a 0,8% para análise da região telomérica. Essas enzimas não possuem sítios de clivagem no fragmento da região telomérica utilizado como sonda. A hibridização (Southern, 1975) foi feita durante 18 horas a 38°C, utilizando o kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche<sup>®</sup>, Roche Applied Science), seguindo as recomendações do fabricante para condições de baixa extrinsecência. A membrana foi lavada duas vezes em SSC 2X e SDS 0,1% a 25°C durante 5 minutos e 2 vezes em SSC 1X e SDS 0,1% a 55°C durante 15 minutos. A marcação da sonda foi feita por meio de PCR do fragmento de 225 pb obtido do pTel13 (Levis *et al.*, 1997), que contém uma região da extremidade telomérica de *Botrytis cinerea*.

### **2.6.2. Localização cromossômica do gene *plg1***

A membrana contendo o DNA cromossomal foi hibridizada por 18 horas a 65°C com a sonda contendo a região codificadora do gene *plg1* (Bazzolli *et al.*, 2006) marcado radioativamente com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]d-ATP, empregando-se o “Random Prime IT Labeling Kit” (Stratagene). A membrana foi lavada duas vezes em SSC 2X e SDS 0,1% durante 20 minutos e 2 vezes em SSC 1X e SDS 0,1% durante 10 minutos a 65°C. A membrana foi exposta ao filme XOMAT K (Kodak), mantida à temperatura de -80°C e, após, foi revelada a autoradiografia.

### **2.7. Extração de RNA total e reações de transcriptase reversa dos genes *plg1* e *pgg2* nas linhagens PG63 e recombinante T20**

O RNA total foi extraído utilizando-se reagente Trizol, T9424 (TRI Reagent, Sigma®). O micélio foi triturado em nitrogênio líquido e 200 mg foram transferidos para microtubo de centrífuga, contendo 1,0 mL de Trizol e 150  $\mu$ L de PVP-40 (Polyvinyl pyrrolidona - 40, Sigma®) a 20%. Após homogeneização em agitador de tubos, centrifugou-se a 15000 g por 20 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionando-se 200  $\mu$ L de clorofórmio. Após nova homogeneização, centrifugou-se a 15000 g por 20 minutos e a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 250  $\mu$ L de solução de precipitação (citrato de sódio 0,8 M; cloreto de sódio 1,2 M) e 250  $\mu$ L de isopropanol. A mistura foi colocada em repouso em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 15000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com álcool 80%. O sedimento foi ressuspenso em 40  $\mu$ L de água DEPC autoclavada, incubado por 10 minutos a 65°C e armazenado a -80°C.

As reações de transcriptase reversa foram realizadas utilizando-se o kit “Im Prom-II™ Reverse Transcription System” (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

### **2.8. Análise por PCR em tempo real**

O PCR em tempo real foi usado para quantificar o número de seqüências alvo dos genes *plg1* e *pgg2*. Os experimentos de quantificação relativa e absoluta foram conduzidos no sistema de PCR em tempo real 7300/7500 (Applied Biosystems, California, USA). As seqüências de oligonucleotídeos utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 1. Os oligonucleotídeos foram desenhadas no programa *Primer*

*Express* software (Applied Biosystems, California, USA), com base na seqüência dos genes *plg1* (AF502279.1) e *pgg2* (AF195113.2) depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

### 2.8.1 Quantificação relativa da expressão dos genes *plg1* e *pgg2* nas linhagens PG63 e recombinante T20

Para quantificar a expressão dos genes *plg1* e *pgg2*, foram utilizadas as amostras de cDNA das linhagens *P. griseoroseum* PG63 e recombinantes T20, obtidas no item 2.7. Para cada reação de PCR foram utilizados 1 µL da mistura de cDNA, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA) para concentração final de 1X, em um volume final de 25 µL por reação. O gene de  $\gamma$ -actina de *P. griseoroseum* foi utilizado como normalizador referência. O cálculo da quantificação relativa foi realizado de acordo com o método do  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  proposto por Livak e Schmittgen (2001). Os testes para a eficiência de amplificação e validação dos experimentos foram realizados como descrito por Pfaffl (2001). Os experimentos foram repetidos três vezes para cada ponto testado, utilizando três preparações de RNA total obtido de amostras biológicas independentes.

Tabela 1: Seqüência de oligonucleotídeos para as reações de PCR em tempo real

| Alvos            | Oligonucleotídeos | Seqüência 5'→3'        | T <sub>m</sub> | Produto do PCR |
|------------------|-------------------|------------------------|----------------|----------------|
| <i>plg1</i>      | Plg1B_F           | GGACATGATCTGGATCGAATCA | 54,3°C         |                |
|                  | Plg1B_R           | TGGAGATAGTGACACGCTTGGA | 57,8°C         | 100 pb         |
| <i>pgg2</i>      | Pgg2A_F           | GAACATCTCCGGCCTTAACG   | 55,8°C         |                |
|                  | Pgg2A_R           | CCTCGCTGTTGTCGATGGT    | 57,6°C         | 101 pb         |
| $\gamma$ -actina | Act1_F            | TGGGAGCTTCGGTCAAGAGA   | 58,0°C         |                |
|                  | Act1_R            | ACCAACTGGGACGACATGGA   | 58,6°C         | 100 pb         |

### 2.8.2 Quantificação absoluta do número de cópias dos genes *plg1* e *pgg2* e estimativa do tamanho do genoma de *P. griseoroseum*

Para preparação da curva padrão de DNA foram utilizados os plasmídeos pAN52plg1 (6,75 kb) e pAN52pgg2 (6,55 kb), que contêm, respectivamente, os

genes *plg1* (1,39 kb) e *pgg2* (1,19 kb) de *P. griseoroseum* (Ribon *et al.*, 2002; Bazzolli *et al.*, 2006). A extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando-se o kit Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps – DNA Purification System (Promega). As amostras de DNA total e plasmidial foram quantificadas pela absorvância a 260 nm e 280 nm em espectrofotômetro, sendo utilizadas as amostras com razão de pureza entre 1,8 e 1,9.

A concentração em massa (g) e o tamanho dos plasmídeos foram convertidos para a concentração em número de cópias utilizando a seguinte equação, proposta por Whelan *et al.* (2003):

$$\text{DNA (número de cópias)} = \frac{\text{quantidade de DNA (g)} \times 6,02 \times 10^{23} \text{ (cópias.mol}^{-1}\text{)}}{\text{tamanho do DNA (pb)} \times 660 \text{ (g.mol}^{-1}.\text{pb}^{-1}\text{)}}$$

As amostras padrão de DNA plasmidial foram diluídas em uma razão de ordem 1:10. Oito diluições seriais numa faixa de  $4 \times 10^1$  a  $4 \times 10^7$  cópias/ $\mu\text{L}$  do plasmídeo pAN52plg1 e  $6 \times 10^1$  a  $6 \times 10^7$  cópias/ $\mu\text{L}$  do plasmídeo pAN52pgg2 foram utilizadas na construção das curvas-padrão. A equação  $y = ax + b$  ( $R^2$ ), obtida a partir da curva de calibração para o gene *plg1*, foi  $y = -3,32x + 39,924$  (0,99) e para o gene *pgg2* foi  $y = -3,317x + 37,028$  (0,97). Para cada reação de PCR foram utilizados 5  $\mu\text{L}$  da mistura de DNA (DNA total ou DNA plasmidial diluído 1:5), 0,2  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA) para concentração final de 1X, em um volume final de 25  $\mu\text{L}$  por reação.

O tamanho do genoma foi estimado com base no valor  $C$ , calculado como descrito por Wilhelm *et al.* (2003). A quantidade de DNA que corresponde ao tamanho haplóide (valor  $C$ ) foi derivada da razão da massa de DNA ( $m$ , determinada pela absorvância UV) pelo número de cópias da seqüência alvo ( $N$ , determinada por PCR em tempo real), ou seja,  $C = m \times N^{-1}$ . O tamanho do genoma foi calculado por  $G = C \times N_A \times M_{\text{pb}}^{-1}$ , onde  $N_A$  é o número de Avogrado ( $6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ) e  $M_{\text{pb}}^{-1}$  é a média da massa molecular de um par de base ( $660 \text{ g.mol}^{-1}$ ).

## 2.9. Ensaio enzimáticos de pectina liase e poligalacturonase

A atividade de PL foi determinada, conforme descrito por Albersheim e Killias (1962). A mistura de reação continha 1,5 mL do sobrenadante da cultura e 1 mL de pectina cítrica P-9135 (SIGMA<sup>®</sup>) 2,5% (p/v) em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  50

mM, pH 6,8. A mistura foi incubada a 40°C por 30 minutos. Alíquotas de 0,5 mL da mistura de reação foram retiradas nos tempos 0 e 30 minutos de incubação e adicionadas em 4,5 mL de HCl 0,01 N, para interrupção da reação, sendo a absorvância medida a 235 nm. Uma unidade de PL (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir nanomoles de  $\Delta^{4,5}$  galacturonídeo por minuto de reação, utilizando-se o coeficiente de extinção molar  $5550 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para o cálculo (Albersheim, 1966).

A atividade de PG foi determinada, baseando-se na dosagem de açúcar redutor, segundo o método do DNS (ácido dinitrossalicílico) descrito por Miller (1959). A mistura de reação continha 0,5 mL do sobrenadante da cultura e 1,5 mL de ácido poligalacturônico P-3889 (SIGMA<sup>®</sup>) a 1,3% (p/v) em tampão acetato de sódio e NaCl 2,5 M, pH 4,8. A mistura foi incubada a 40°C por 20 minutos. Alíquotas de 0,125 mL da mistura de reação foram retiradas nos tempos 0 e 20 minutos de incubação e adicionadas em 0,5 mL de DNS, para interromper a reação. Ácido galacturônico G- 2125 (SIGMA<sup>®</sup>) foi utilizado para obtenção da curva padrão. Uma unidade de PG (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir micromoles de ácido galacturônico por minuto de reação.

### 3. Resultados

#### 3.1. Determinação do tamanho do genoma, do número de cromossomos e localização do gene *plg1* no genoma de *P. griseoroseum*

O cariótipo do fungo *P. griseoroseum* foi determinado por PFGE e mostrou um padrão consistindo de quatro bandas cromossômicas, com tamanhos estimados de 11,44 Mb (I), 9,22 Mb (II), 6,24 Mb (III) e 4,12 Mb (VI), calculados com base no padrão de bandas de *Schizosaccharomyces pombe* (Figura 1A). O tamanho do genoma de *P. griseoroseum* estimado por meio de PFGE foi de aproximadamente 31,0 Mb. A banda correspondente ao cromossomo de 11,44 Mb não ficou bem definida, portanto, para confirmar o número de cromossomos de *P. griseoroseum*, o DNA total dessa linhagem foi clivado com diferentes enzimas de restrição e hibridizado com a sonda contendo um fragmento de 225 pb correspondente à região telomérica de *B. cinerea* obtida do pTel13 (Figura 2). Pode ser observado para cada enzima um padrão de oito bandas marcadas, indicando que cada duas bandas correspondem a um cromossomo. Portanto, o número total de quatro cromossomos foi confirmado a partir do perfil de bandas obtidas na hibridização.

Para determinar a localização cromossômica do gene *plg1* e a integração das cópias do vetor de expressão pAN52plg1, os cromossomos das linhagens de *P. griseoroseum* PG63 e recombinante T105 foram separados por PFGE e transferidos para membrana de náilon. A membrana foi hibridizada com o fragmento contendo a região codificadora do gene *plg1* marcado com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]d-ATP. O resultado indica que o gene *plg1* se localiza no cromossomo II (9,22 Mb) da linhagem de *P. griseoroseum* e as bandas marcadas observadas para a linhagem recombinante T105 são devidas a integrações ectópicas do pAN52plg1 nos cromossomos II, III e IV (Figura 1B).

A estimativa do tamanho do genoma haplóide por meio da PCR em tempo real requer a quantificação absoluta de um gene cópia única no genoma. O gene *plg1* (Bazzolli *et al.*, 2006), estudado aqui, está presente em cópia única no genoma da linhagem *P. griseoroseum* selvagem e foi utilizado para estimar o tamanho do genoma desta espécie. A eficiência dos oligonucleotídeos Plg1B (F e R) no PCR em tempo real foi de  $99,7 \pm 0,5\%$ , portanto, foram selecionados para a análise. O controle negativo e a análise da curva de *melting* realizados com a reação de PCR confirmaram a ausência de amplificações inespecíficas e de acúmulo de dímeros de oligonucleotídeos. O tamanho do genoma estimado para a linhagem *P. griseoroseum*

selvagem, a partir de três experimentos independentes, foi de 29,8 Mb a 31,0 Mb (Tabela 2). Este resultado foi semelhante ao resultado obtido a partir da análise do cariótipo desse fungo (Figura 1).

Tabela 2: Estimativa do tamanho do genoma haplóide da linhagem *P. griseoroseum* selvagem

| Alvo        | Concentração da amostra (ng/μL) | Curva de Calibração <sup>a</sup><br>$y=ax+b$ ( $R^2$ ) | Número de cópias alvo | $\Gamma$ (pb)      | $C$ (pg) |
|-------------|---------------------------------|--|-----------------------|--------------------|----------|
| <i>plg1</i> | 15                              | -3,32x+39,924 (0,99)                                   | $4,6 \times 10^5$     | $29,8 \times 10^6$ | 0,033    |
| <i>plg1</i> | 45                              | -3,32x+39,924 (0,99)                                   | $1,33 \times 10^6$    | $31,0 \times 10^6$ | 0,034    |

a – curva dos CT versus o log do n° de cópias. a, *slope*; b, interseção;  $R^2$  coeficiente de correlação.

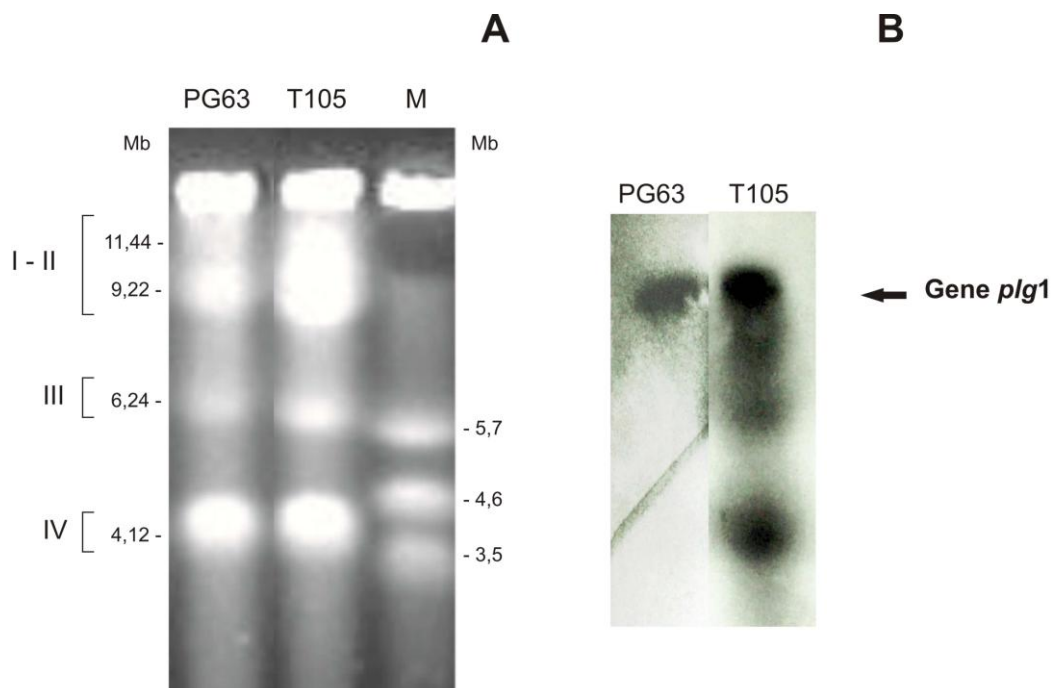


Figura 1: Cariótipo do *P. griseoroseum* PG63 e do recombinante T105 e localização do gene *plg1*. (A) Análise em gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE) mostrando a distribuição cromossômica nas linhagens de *P. griseoroseum* PG63 e recombinante T105. (B) Hibridização do gene *plg1* marcado radioativamente. A seta indica a localização do gene *plg1* endógeno no cromossomo II de *P. griseoroseum*. M - Marcador de tamanho *Schizosaccharomyces pombe* (5,7; 4,6 e 3,5 Mb).

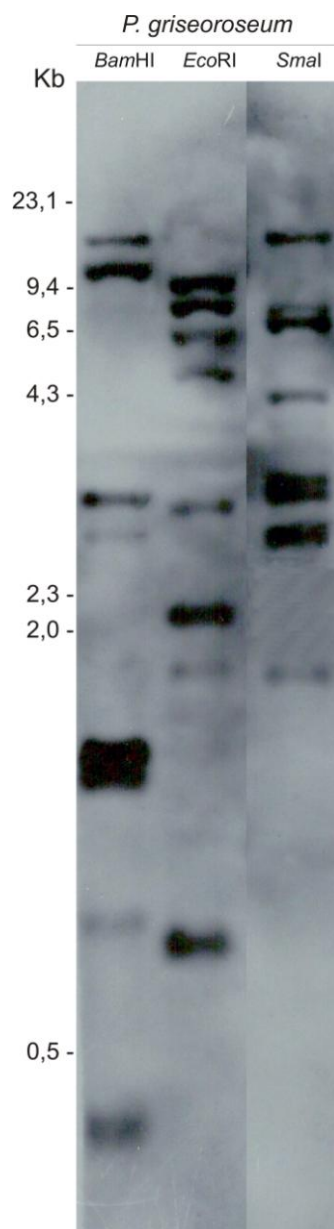


Figura 2: Análise da hibridização da região telomérica de *P. griseoroseum*. Autoradiografia do DNA total da linhagem *P. griseoroseum* selvagem clivado com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI e *Sma*I e hibridizado com a sonda contendo parte da região telomérica obtida do pTel13.

### **3.2. Análise do número de cópias dos genes *plg1* e *pgg2* e da produção de pectina liase e poligalacturonase nas linhagens recombinantes de *P. griseoroseum***

As linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* T105, T146 e T20 são caracterizadas por apresentarem elevada produção de pectina liase (PL) e poligalacturonase (PG). Estas linhagens foram geneticamente modificadas e contêm cópias adicionais dos genes *plg1* e *pgg2*, sob o controle do promotor do gene *gpd* e a região de terminação do gene *trpC* de *A. nidulans*. Para analisar a relação entre aumento do número de cópias destes genes nessas linhagens com a produção enzimática, o número de cópias dos genes *plg1* e *pgg2* foi determinado por meio da quantificação absoluta por PCR em tempo real. A Figura 3 representa o número de cópias dos genes *plg1* e *pgg2*, calculado para as linhagens *P. griseoroseum* selvagem, mutante PG63 *niaD*<sup>-</sup> e recombinantes T105, T146 e T20, normalizado para o número de cópias destes genes para a linhagem selvagem. Os genes *plg1* e *pgg2* foram, anteriormente, isolados e caracterizados, sendo reportado serem genes cópia única no genoma de *P. griseoroseum* (Ribon *et al.*, 2002; Bazzolli *et al.*, 2006). A linhagem mutante *P. griseoroseum* PG63 *niaD*<sup>-</sup> obtida por Pereira *et al.* (2004) possui o genoma idêntico ao da linhagem selvagem, com exceção da deleção de 122 pb no gene *niaD*, que codifica a nitrato redutase. Portanto, PG63 foi utilizado como controle para validar a técnica de qPCR descrita para determinação do número de cópias. Foi observado que as linhagens recombinantes T105 e T20 possuem, respectivamente, cinco e duas cópias do gene *plg1*, enquanto que, as linhagens recombinantes T146 e T20 possuem duas e três cópias do gene *pgg2*, respectivamente.

A Figura 4 mostra a atividade de PL e de PG no sobrenadante da cultura das linhagens recombinantes T105, T146 e T20. As linhagens recombinantes T105 (5 cópias de *plg1*) e T20 (2 cópias de *plg1*) apresentaram, respectivamente,  $4168 \pm 590$  U/mL e  $2412 \pm 354$  U/mL de PL, enquanto que, a linhagem recombinante T146 não apresentou atividade de PL, pois não possui cópias adicionais desse gene, somente o gene *plg1* endógeno, que depende de indução. Para a atividade de PG foi observado que as linhagens T146 (2 cópias de *pgg2*) e T20 (3 cópias de *pgg2*) apresentaram  $99818 \pm 13390$  U/mL e  $164669 \pm 15052$  U/mL, respectivamente. A linhagem T105 não apresentou atividade de PG, uma vez que possui somente o gene *pgg2* endógeno,

que depende de indução. O aumento do número de cópias proporcionou um aumento de 1,7 vezes na produção enzimática tanto para PL quanto para PG, respectivamente, nas linhagens recombinantes T105 em relação à T20 e T20 em relação à T146.

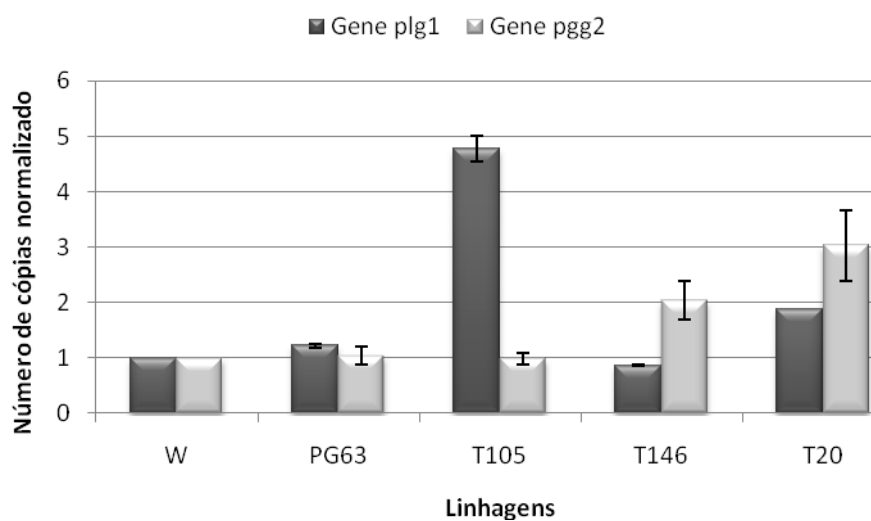


Figura 3: Análise do número de cópias dos genes *plg1* e *pgg2*. Determinação do número de cópias dos genes *plg1* e *pgg2* das linhagens *P. griseoroseum* selvagem (W), mutante PG63 e recombinantes T105, T146 e T20. Os valores estão normalizados para o número de cópias dos genes *plg1* e *pgg2* para a linhagem selvagem de *P. griseoroseum*. Os resultados representam as médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

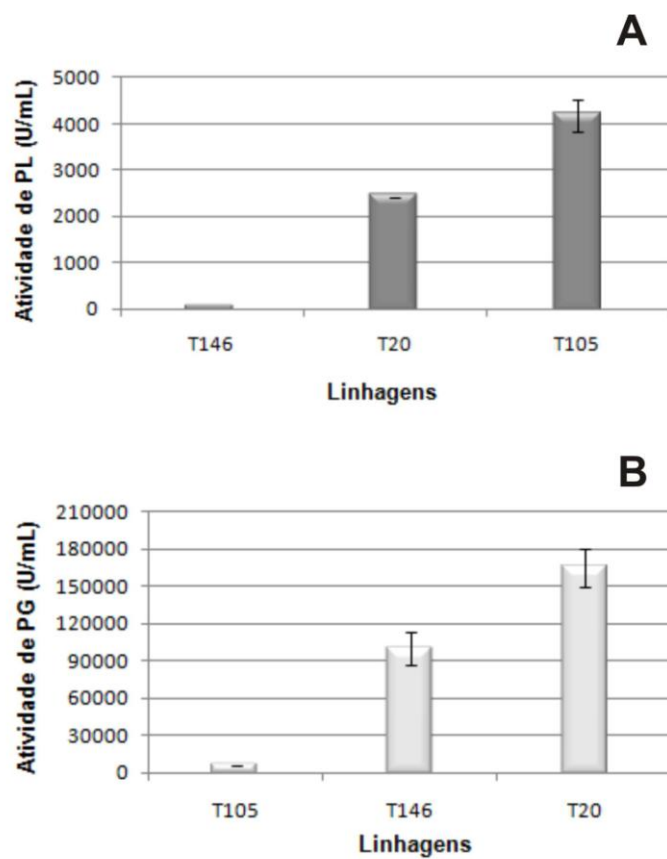


Figura 4: Atividade de PL e de PG no sobrenadante da cultura das linhagens recombinantes T105, T146 e T20. Atividade de PL (A) e PG (B). Os resultados representam as médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes

### 3.3. Avaliação da expressão dos genes *plg1* e *pgg2* nas linhagens recombinantes de *P. griseoroseum*

A linhagem recombinante T20 foi selecionada para análise da expressão dos genes *plg1* e *pgg2*, pois possui cópias adicionais de ambos os genes sob o controle do promotor do gene *gpd* de *A. nidulans*. A linhagem *P. griseoroseum* PG63 foi utilizada como controle para a expressão dos genes *plg1* e *pgg2* endógenos. Considerando que na linhagem T20, a regulação desses dois genes está submetida aos mesmos fatores transcricionais, o objetivo deste experimento foi avaliar se há diferença de expressão entre os dois genes. A Figura 5 mostra a variação na expressão do gene *plg1*, massa micelial seca e atividade de PL ao longo do tempo de 120 horas de cultivo. Pode ser observado que o acúmulo máximo de transcrito do gene *plg1* ocorre em 24 horas de cultivo, mas um elevado nível de expressão é mantido ao longo do cultivo, havendo redução da quantidade de transcritos no tempo de 120 horas (Figura 5A). A curva de crescimento das linhagens PG63 e recombinante T20 estão apresentadas na Figura 5B. A maior massa micelial seca foi observada no tempo de 72 horas de cultivo, ocorrendo um decréscimo na massa micelial seca após esse tempo, sugerindo a ocorrência de autólise do micélio devida ao esgotamento dos nutrientes no meio de cultivo. A atividade enzimática de PL detectada no sobrenadante da cultura apresenta um aumento gradual ao longo do tempo de cultivo, sendo a maior atividade ( $2367 \pm 316$  U/mL) em 120 horas (Figura 5C). A expressão do gene *pgg2* apresentou um perfil semelhante ao observado para o gene *plg1* (Figura 6). O maior acúmulo de transcrito do gene *pgg2* ocorreu em 24 horas de cultivo, mantendo-se um elevado nível de expressão ao longo do tempo de cultivo, e após 120 horas de cultivo ocorrem redução na quantidade de transcritos (Figura 6A). A atividade enzimática de PG apresentou um aumento gradual, sendo detectada a maior atividade ( $178095 \pm 18271$  U/mL) após 72 horas de cultivo (Figura 6C).

Ao comparar a expressão entre as linhagens PG63 e T20, utilizando a expressão do gene *plg1* na linhagem PG63 como normalizador, pôde-se observar que a cópia do gene *plg1*, sob o controle do promotor de *gpd*, proporciona um aumento de 200 vezes na expressão em relação ao gene endógeno (Figura 7A). Enquanto que, o gene *pgg2*, sob o controle do promotor de *gpd*, proporcionou um aumento de 1100 vezes na expressão em relação ao gene endógeno (Figura 7B). A diferença observada entre o aumento da expressão do gene *pgg2* comparado ao gene *plg1*, ambos

inseridos no genoma da linhagem recombinante T20, pode ser devida a diferença no número de cópias de 2 para 1, respectivamente, para os genes *pgg2* e *plg1*.

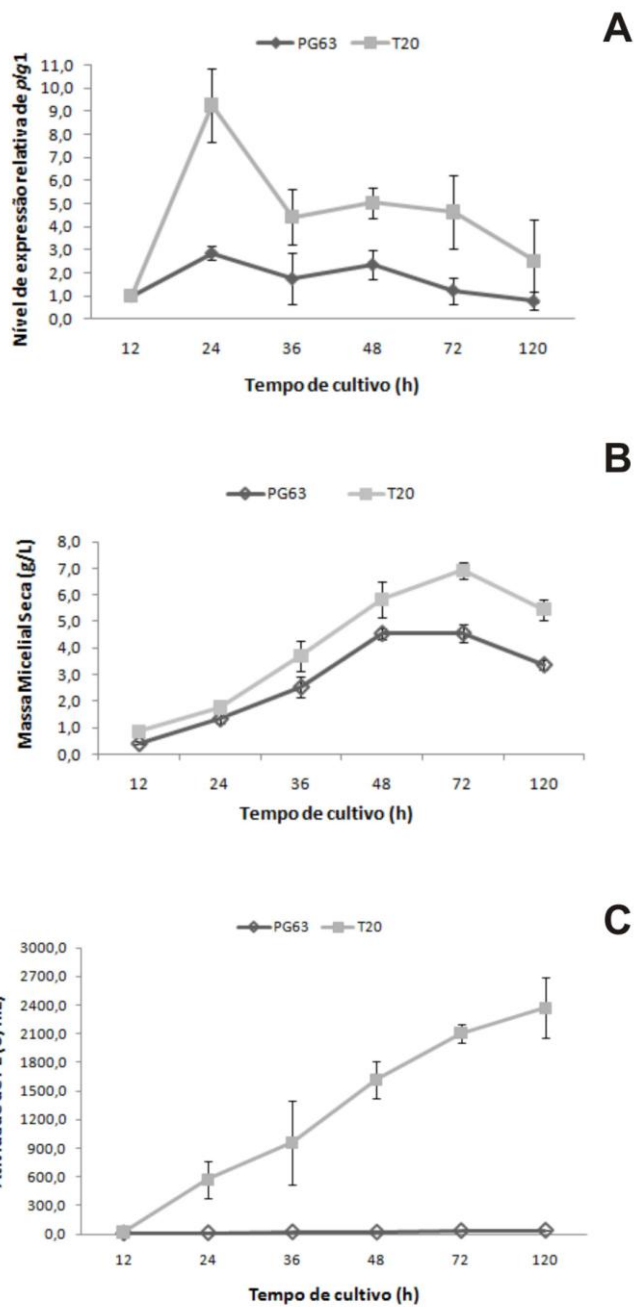


Figura 5: Análise da expressão relativa do gene *plg1*, da curva de crescimento e da atividade de PL das linhagens PG63 e recombinante T20. (A) Nível de expressão relativa ao tempo inicial de 12 horas. (B) Massa micelial seca. (C) Atividade de PL no sobrenadante da cultura. Os resultados representam as médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

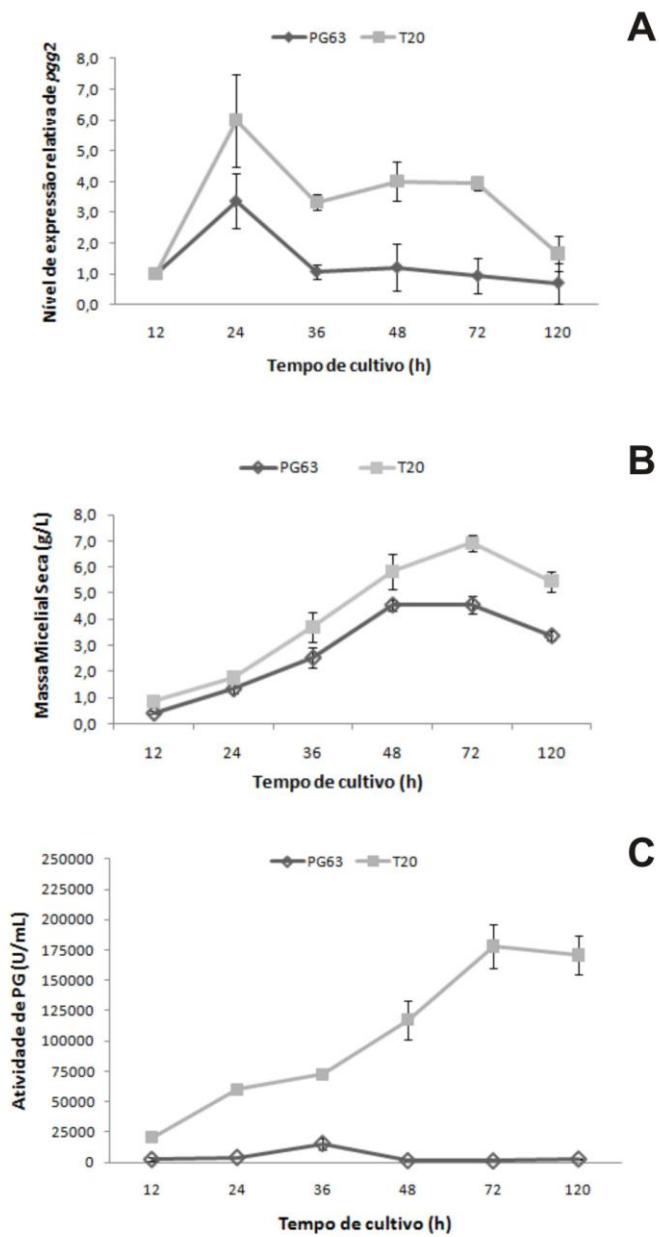


Figura 6: Análise da expressão relativa do gene *pgg2*, da curva de crescimento e da atividade de PG das linhagens PG63 e recombinante T20. (A) Nível de expressão relativa ao tempo inicial de 12 horas. (B) Massa micelial seca. (C) Atividade de PG no sobrenadante da cultura. Os resultados representam as médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

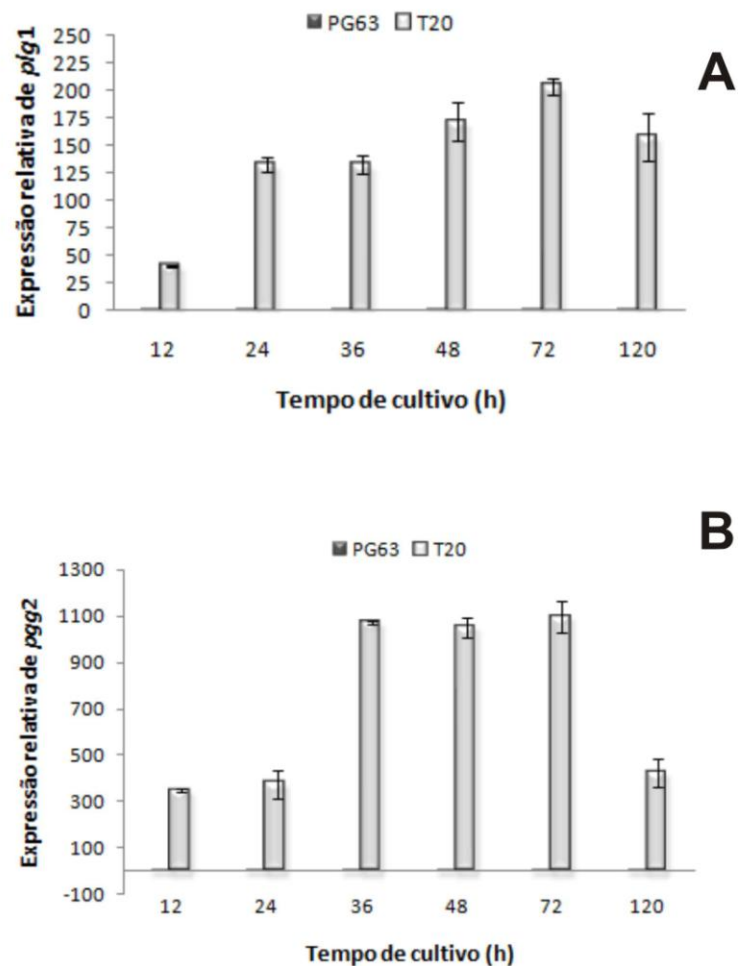


Figura 7: Análise da expressão dos genes *plg1* e *pgg2* da linhagem recombinante T20 relativa à expressão desses genes na linhagem PG63. Análise comparativa entre a quantidade de transcritos dos genes *plg1* (A) e *pgg2* (B) no micélio das linhagens PG63 e recombinante T20, cultivadas em meio contendo sacarose  $10 \text{ g L}^{-1}$  e extrato de levedura  $0,6 \text{ g L}^{-1}$ . Os resultados representam as médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

#### 4. Discussão

Este trabalho descreve pela primeira vez o cariótipo e o tamanho do genoma do fungo *P. griseoroseum*, assim como a localização cromossômica do gene *plg1*, que codifica pectina liase. Além disso, foi avaliada a expressão dos genes *pgg2* e *plg1* em linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* multi-cópias para estes genes. Vários trabalhos têm demonstrado que a utilização de técnicas moleculares combinadas tem permitido uma ampla compreensão da organização e funcionalidade do genoma de diversas espécies-modelo e de aplicabilidade industrial. Neste estudo foi mostrado que *P. griseoroseum* possui um genoma em torno de 31,0 Mb distribuído em quatro cromossomos, determinado pela combinação das técnicas de PFGE (Figura 1A), hibridização (Figuras 1B e 2) e por PCR em tempo real (Tabela 2). Estas técnicas possibilitaram determinar a localização do gene de *plg1* no cromossomo II de *P. griseoroseum* e das cópias adicionais do pAN52plg1 na linhagem recombinante de *P. griseoroseum* T105 integrados nos cromossomos II, III e IV. O tamanho do genoma estimado para esta espécie esta de acordo com os estudos realizados para outras espécies do gênero, como *Penicillium notatum* (32,1 Mb), *Penicillium chrysogenum* (32,8 a 34,1 Mb) e *Penicillium nalgiovense* (26,5Mb) (Fierro *et al.*, 1993; Färber e Geisen, 2000). Para as três espécies acima, foi estimado por meio de PFGE que os respectivos genomas têm tamanhos similares e estão distribuídos em quatro cromossomos, variando de 4,0 a 5,0 Mb para os menores cromossomos e 9,0 a 11,0 Mb para os maiores.

Em trabalhos prévios, Ribon *et al.* (2002) e Bazzolli *et al.* (2006) isolaram e caracterizaram, respectivamente, os genes *pgg2* e *plg1*, reportando serem ambos genes cópias únicas no genoma deste fungo. Deste modo, a estimativa do tamanho do genoma de *P. griseoroseum* por PCR em tempo real com base na amplificação do gene *plg1* foi possível. O método, proposto por Wilhelm *et al.* (2003), tem sido aplicado com sucesso para diversos organismos. As técnicas utilizadas neste trabalho permitiram obter resultados semelhantes, indicando que o tamanho do genoma de *P. griseoroseum* está na faixa de 29,8 a 31,0 Mb (Tabela 2). Apesar de essas técnicas fornecerem um conjunto de informações sobre a estrutura e organização do genoma, isoladamente elas possuem limitações que podem subestimar ou superestimar os resultados. Portanto, a combinação de técnicas moleculares permite uma maior acurácia dos valores obtidos.

O aumento na produção enzimática como resultado do aumento do número de cópias dos genes-alvo tem sido obtido com sucesso por vários autores, particularmente em espécies de *Aspergillus*, *Thichoderma* e em algumas leveduras, como *Pichia pastoris*. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o aumento do número de cópias dos genes *plg1* e *pgg2* levou ao aumento da atividade de PL e PG. A razão de aumento da atividade de PL foi de 1,7 vezes maior para a linhagem T105 (5 cópias de *plg1*) em relação à obtida para a linhagem T20 (2 cópias de *plg1*). A atividade de PG na linhagem T20 (3 cópias do *pgg2*) foi 1,7 vezes maior em comparação com a linhagem T146 (2 cópias do *pgg2*). Em *P. pastoris* e em outras leveduras, foi observada uma correlação positiva entre o número de cópias e a produção de proteínas de interesse. No entanto, foi observado que essa correlação pode atingir um platô ou que o aumento do número de cópias pode ser prejudicial para a produção (Marx *et al.*, 2009). Além disso, um crescente número de trabalhos tem reportado que o aumento da produção de proteínas pode não ocorrer, em razão de suprimento insuficiente de proteínas regulatórias ou de fatores transcricionais, essenciais ao processo (Nevalainen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010). Limitações do processo de secreção de proteínas, desde a montagem e dobramento, modificações pós-traducionais, formação de vesícula de transporte e exportação para fora da célula, também vêm sendo relacionadas ao aumento ou diminuição da produção de proteínas (Punt *et al.*, 2002; Daly e Hearn, 2005; Rocha *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010). Portanto, é possível que a produção de proteínas chegue a um limite para certo número de cópias do gene, de modo que o aumento da transcrição e da tradução não é acompanhado pelo aumento da secreção, o que pode explicar a diferença da produção de PL entre as linhagens T105 e T20.

A análise de expressão dos genes *plg1* e *pgg2* na linhagem recombinante T20 mostrou um perfil semelhante (Figuras 5A e 6A). Este foi um resultado esperado, uma vez que ambos os genes *plg1* e *pgg2*, inseridos no genoma da linhagem T20, estão sob o controle do promotor do gene *gpd* de *A. nidulans*. No entanto, tem sido relatado para linhagens multicópias que a variação no nível de expressão pode ser devida ao efeito de posições no genoma e não somente ao controle da regulação na região promotora (Cardoso *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010). Alguns pesquisadores estão utilizando a estratégia de inserir e aumentar o número de cópias dos genes-alvo em regiões altamente ativas do genoma, como o locus de DNA ribossomal, e com isso conseguem obter o aumento da produção de proteínas (Marx *et al.*, 2009). No

entanto, as diferenças observadas para a produção de PL e PG na linhagem recombinante T20 devem ser atribuídas ao processo de secreção das respectivas proteínas e não a diferenças na expressão dos genes.

A redução da expressão dos genes *plg1* e *pgg2*, após 72 horas de cultivo, ocorrem juntamente com a redução de massa micelial seca na linhagem recombinante T20 (Figuras 5 e 6). Estes resultados podem ser explicados pelo esgotamento da fonte de carbono do meio de cultivo. Em trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório foi mostrado que, após 30 horas de cultivo, a sacarose e a glicose residual do meio não são detectadas. De acordo com Silva-Udawatta e Cannon (2001), durante o período do consumo da fonte de carbono disponível, têm-se início a síntese dos carboidratos de reserva, glicogênio e trealose. No entanto, para as células cultivadas em sistema de fermentação em batelada são observadas a redução da transcrição de muitos dos genes, quando o glicogênio é metabolizado (Werner-Washburne *et al.*, 1993). Estudos realizados com fungos e leveduras, avaliando a regulação dos genes que codificam a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, mostraram que este gene é regulado em resposta à fonte de carbono, sendo observada redução da quantidade de transcritos quando a quantidade de glicose diminuiu (Pavlovic e Hörz, 1988; Wolff e Arnau, 2002). Embora o promotor de *gpd* de *A. nidulans* tenha expressão constitutiva, a exaustão de nutrientes afeta sua regulação, fazendo com que diminua a expressão após a fase estacionária do crescimento micelial na linhagem recombinante *P. griseoroseum* T20.

Portanto, o genoma do fungo *P. griseoroseum* permite o aumento do número de cópias do gene alvo, respondendo de forma eficiente com a maquinaria de transcrição e secreção das proteínas. Este fungo foi caracterizado pela ausência de proteases secretadas no meio de cultivo, característica desejável em linhagens utilizadas como hospedeira para produção de proteínas (Cardoso *et al.*, 2010). A ausência de proteases no meio contribui para a estabilidade da enzima secretada e, desse modo, possibilita que a enzima permaneça no sobrenadante da cultura por todo período. *P. griseoroseum* apresenta grande potencial e características adequadas à aplicação industrial para ser utilizado como linhagem hospedeira, pois possui um mecanismo de reconhecimento genético que possibilita a transformação heteróloga e apresenta um eficiente sistema de produção e secreção de proteínas.

## 5. Referências Bibliográficas

- Albersheim, P. (1966) Pectin lyase from fungi. *Methods in Enzymology*, v. 8, p. 628-635.
- Albersheim, P., Killias, U. (1962) Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. *Archives of Biochemistry Biophysics*, v. 97 (1), p. 107-115.
- Araújo, E. F., Queiroz, M. V., Teixeira, J. A., Gonçalves, D. B., Bazzolli, D. M. S., Ribon, A. O., Ribeiro, J. B. (Inventores). (2007) Universidade Federal de Viçosa (Depositante). *Linhagem recombinante geneticamente modificada Penicillium griseoroseum T20 com maior produção de pectina liase e poligalacturonase, cassetes de expressão para a construção da linhagem recombinante, preparação enzimática e processo para produção da preparação enzimática*. Depósito de pedido de patente. PI 0705573-0.
- Araújo, E. F., Silva, D. O., Queiroz, M. V., Cardoso, P. G. (Inventores). (2005) Universidade Federal de Viçosa (Depositante). *Linhagem recombinante de Penicillium griseoroseum geneticamente modificada com aumento na produção de pectina liase*. Depósito de pedido de patente. PI0502515-0.
- Baracat, M.C., Valentim, C., Muchovej, J.J., Silva, D.O. (1989) Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. *Biotechnology Letters*, v. 11 (12), p. 899-902.
- Baracat-Pereira, M.C., Coelho, J.L.C., Silva, D.O. (1994) Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose and yeast extract for degumming of natural fibers. *Letters in Applied Microbiology*, v. 18, p. 127-129.
- Bazzolli, D.M.S., Ribon, A. O. B., Queiroz, M. V., Araújo, E. F. (2006) Molecular characterization and expression profile of pectin-lyase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 52(11), p. 1070-1077.
- Bazzolli, D.M.S., Ribon, A.O.B., Reis, K.C.P., Queiroz, M. V., Araújo, E. F. (2008) Differential expression of *plg* genes from *Penicillium griseoroseum*: *plg1* a pectinolytic gene is expressed en sucrose and yeast extract. *Journal of Applied Microbiology*, v. 105, p. 1595-1603.
- Belshaw, N.J.; Haigh, N.P.; Fish, N.M.; Archer, D.B.; Alcocer, M.J. (2002) Use of a histone H4 promoter to drive the expression of homologous and heterologous proteins by *Penicillium funiculosum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60 (4), p. 455-460.

- Cardoso, P. G., Ribeiro, J. B., Teixeira, J. A., Queiroz, M. V., Araújo, E. F. (2008) Overexpression of the *plg1* gene encoding pectin lyase in *Penicillium griseoroseum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35 (3), p. 159-166.
- Cardoso, P. G., Teixeira, J. A., Queiroz, M. V., Araújo, E.F. (2010) Pectin lyase production by recombinant *Penicillium griseoroseum* strain 105. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 56 (10), p. 831-837.
- Chen, X., Liang, Y., Hua, J., Tao, L., Qin, W., Chen, S. (2010) Overexpression of bacterial ethylene-forming enzyme gene in *Trichoderma reesei* enhanced the production of ethylene. *International Journal of Biological Sciences*, v. 6(1), p. 96-106.
- Daly, R.; Hearn, M.T. (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, v. 18 (2), p. 119-138.
- Dias, E. S.; Queiroz, M. V.; Cardoso, P. G.; Barros, E. G. e Araújo, E. F. (1999) Transformation of *Penicillium expansum* with a heterologous gene which confers resistance to benomyl. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 15, p. 513-514.
- Färber, P., Geisen, R. (2000) Karyotype of *Penicillium nalgiovense* and assignment of the penicillin biosynthetic genes to chromosome IV. *International Journal of Food Microbiology*, v. 58 (1-2), p. 59-63.
- Fierro, F., Gutiérrez, S., Díez, B., Martín, J.F. (1993) Resolution of four large chromosomes in penicillin-producing filamentous fungi: the penicillin gene cluster is located on chromosome II (9.6 Mb) in *Penicillium notatum* and chromosome I (10.4 Mb) in *Penicillium chrysogenum*. *Molecular and General Genetics*, v. 241(5-6), p. 573-578.
- Lee, C., Lee, S., Shin, S. G., Hwang, S. (2008) Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: absolute and relative quantification assays with *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 78, p. 371–376.
- Levis, C., Giraud, T., Dutertre, M., Fortini, Brygoo, Y. (1997) Telomeric DNA of *Botrytis cinerea*: a useful tool for strain identification. *FEMS Microbiology Letters*, v. 157, p. 267-272.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods*, v. 25, p. 402-408.

- Lopes, F.J.F., Araujo, E.F., Queiroz, M.V. (2004) Easy detection of green fluorescent protein multicopy transformants in *Penicillium griseoroseum*. *Genetics and Molecular Research*, v. 3, p. 449-455.
- Marx, H., Mecklenbrauker, A., Gasser, B., Sauer, M., Mattanovich, D. (2009) Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. *FEMS Yeast Research*, v. 9, p. 1260–1270.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428.
- Minussi, R.C., Soares-Ramos, J.R.L., Coelho, J.L.C., Silva, D.O. (1998) Sugar-cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*. *Revista de Microbiologia*, v. 29, p. 246-250.
- Nevalainen, H.K.M., Te'o, V.S.J., Bergquist, P.L. (2005) Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*, v. 23, p. 468-474.
- Nijland, J. G., Ebbendorf, B., Woszczynska, M., Boer, R., Bovenberg, R.A.L., Driessen, A.J.M. (2010) Nonlinear biosynthetic gene cluster dose effect on penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76(21), p. 7109-7115.
- Pavlovic, B., Horz, W. (1988) The chromatin structure at the promoter of a glyceraldehyde phosphate dehydrogenase gene from *Saccharomyces cerevisiae* reflects its functional state. *Molecular and Cellular Biology*, v. 8 (12), p. 5513-5520.
- Pereira, J. F., Queiroz, M. V., Lopes, F. J., Rocha, R. B., Daboussi, M. J., Araújo, E. F. (2004) Characterization, regulation, and phylogenetic analyses of the *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase gene and its use as selection marker for homologous transformation. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 50(11), p. 891-900.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29 (9), e45.
- Punt, P.J., Biezen, N.V., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J., Hondel, C.V.D. (2002) Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology*, v. 20 (5), p. 200-206.
- Queiroz, M. V.; Barros, A. O.; Barros, E. G.; Guimarães, W. V. e Araújo, E. F. (1998) Transformation of *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase mutant with

- the *nia* gene from *Fusarium oxysporum*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 44, p. 1-3.
- Ribon, A. O. B., Queiroz, M. V., Araújo, E. F. (2002) Structural organization of polygalacturonase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum*. *Genetics and Molecular Biology*, v. 25(4), p. 489-493.
- Ribon, A. O. B.; Ribeiro, J. B.; Gonçalves, D. B.; Queiroz, M. V.; Araújo, E. F. (2009) Gel mobility shift scanning of pectin-inducible promoter from *Penicillium griseoroseum* reveals the involvement of a CCAAT element in the expression of a polygalacturonase gene. *Genetics and Molecular Biology*, v. 32 (1), p. 129-132.
- Rocha, S.N., Abrahão-Neto, J., Cerdán, M.E., González-Siso, M.I., Gombert, A.K. (2010) Heterologous expression of glucose oxidase in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Microbial Cell Factories*, v. 21, p. 9-4.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2 ed. Cold spring harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory, s.n.p.
- Silva, T. M., *et al.* (2010) Tunicamycin inhibition of N-glycosylation of  $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus niveus*: partial influence on biochemical properties. *Biotechnology Letters*, v. 32, p. 1449–1455.
- Silva-Udawatta, M. N. D., Cannon, J. F. (2001) Roles of trehalose phosphate synthase in yeast glycogen metabolism and sporulation. *Molecular Microbiology*, v. 40(6), p. 1345–1356.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, v. 98, p. 503-517.
- Specht, C.A., Dirusso, C.C., Novotny, C.P., Ullrich, R.C. (1982) A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Analytical Biochemistry*, v. 119 (1), p. 158-163.
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C., Singer, R. A. (1993) Stationary Phase in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, v. 57 (2), p. 383-401.
- Whelan, J.A., Russell, N.B., Whelan, M.A. (2003) A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, v. 278 (1-2), p. 261-269.

- Wilhelm, J., Pingoud, A., Hahn, M. (2003) Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucleic Acids Research*, v. 31 (10), e56.
- Wolff, A.M., Arnau, J. (2002) Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*) and use of the *gpd1* promoter for recombinant protein production. *Fungal Genetics and Biology*, v. 35, p. 21–29.
- Zuccaro, A., Basiewicz, M., Zurawska, M., Biedenkopf, D., Kogel, K. (2009) Karyotype analysis, genome organization, and stable genetic transformation of the root colonizing fungus *Piriformospora indica*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 46, p. 543-550.

## **CAPÍTULO 2**

**Efeito do pH do meio na produção e secreção de pectina liase e poligalacturonase produzidas por linhagens recombinantes de *Penicillium griseoroseum***

## Resumo

Pectina liase (PL) e poligalacturonase (PG) são enzimas que desempenham um importante papel na degradação da pectina e, portanto, vêm sendo aplicadas nas indústrias de sucos de frutas e de vinhos. Desse modo, linhagens recombinantes com alta produção dessas enzimas vêm sendo requeridas, assim como a padronização das condições de cultivo. As linhagens recombinantes de *Penicillium griseoroseum* T105, T146 e T20, são caracterizadas por produzirem, respectivamente, PL, PG e, PL e PG em grande quantidade. Essas linhagens foram cultivadas em meio tamponado MMT (pH 6,8) ou em meio não-tamponado MMNT (pH 6,3 – 3,0), contendo sacarose 1%, para verificar a expressão dos genes *plg1* e *pgg2*, a produção e a secreção de PL e PG ao longo do cultivo. A transcrição dos genes *plg1* e *pgg2*, nas linhagens recombinantes, é constitutiva e o não foi detectado variação em ambos os meios. No entanto, a quantidade de proteína total secretada variou de  $7,8 \pm 1,1$   $\mu\text{g/mL}$  no MMT e  $3,25 \pm 1,50$   $\mu\text{g/mL}$  no MMNT. A análise por SDS-PAGE das proteínas do sobrenadante das culturas possibilitou verificar uma maior quantidade de PL e PG secretadas no MMT do que no MMNT. A secreção de PL e de PG foi afetada pela variação do pH do meio, apresentando reduções na atividade de 6,4 e 3,6 vezes, respectivamente, para a atividade detectada em MMNT em comparação ao MMT. Foram observadas alterações na morfologia da hifa e do micélio, em resposta à variação do pH do meio de cultivo, o que pode explicar a redução na secreção de PL e PG.

**Palavras chaves:** *Penicillium griseoroseum*; pectina liase; poligalacturonase; secreção de proteínas; morfologia do micélio

## 1. Introdução

Em razão de sua versatilidade metabólica, os fungos têm apresentado grande potencial para aplicações industriais, incluindo a produção de proteínas (Nevalainen *et al.*, 2005). Espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* são hospedeiros eficientes para produção de proteínas homólogas e heterólogas (MacCabe *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2010; Matsushita-Morita *et al.*, 2010; Nijland *et al.*, 2010). Além de serem organismos capazes de secretar proteínas em grandes quantidades, também são capazes de realizar as modificações pós-traducionais, como glicosilações, dissulfidações, entre outras (Wang *et al.*, 2005). Tais características os tornam excelentes biofábricas de enzimas e de outros metabólitos.

A partir da bioprospecção de fungos produtores de enzimas de interesse biotecnológico, Baracat *et al.* (1989) avaliaram diferentes fungos filamentosos quanto à atividade de pectinases e verificaram que o isolado de *Penicillium griseoroseum* apresentou atividade de pectinase com reduzida atividade de celulase. Pectina liase (PL, E.C. 4.2.2.10) e poligalacturonase (PG, E.C. 3.4.1.15) fazem parte do grupo das pectinases que estão envolvidas na degradação da pectina, um dos carboidratos mais abundantes na natureza, presentes na parede das células vegetais (Jayani *et al.*, 2005; Yadav *et al.*, 2009). Estas enzimas têm uma importante aplicação nos processos das indústrias alimentícias de produção de sucos e de vinhos, podendo ser empregadas nas etapas de maceração ou extração de suco das frutas, na clarificação de vinhos, dentre outras aplicações (Kashyap *et al.*, 2001; Pedrolli *et al.*, 2009).

Visando a avaliação da produção de pectinases e a obtenção de uma linhagem para produção dessas proteínas em escala industrial, aspectos fisiológicos e genéticos do isolado *P. griseoroseum* CCT6421 foram estudados (Brumano *et al.*, 1993; Baracat-Pereira *et al.*, 1994; Ribon *et al.*, 2002a). Os genes *plg1* e *pgg2*, que codificam pectina liase e poligalacturonase, respectivamente, foram isolados e caracterizados, visando entender a organização e regulação em *P. griseoroseum* (Ribon *et al.*, 2002b; Bazzolli *et al.*, 2006; Bazzolli *et al.*, 2008). Em nosso laboratório, foram obtidas linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* com aumento da produção de PL e PG, denominadas recombinantes T105, T146 e T20 (Araújo *et al.*, 2005; Araújo *et al.*, 2007; Cardoso *et al.*, 2008). A linhagem recombinante T105 possui cópias adicionais do gene *plg1*, sob controle do promotor de *gpd* de *Aspergillus nidulans*. As linhagens T146 e T20 possuem, respectivamente, cópias

adicionais do gene *pgg2* e dos genes *pgg2* e *plg1*, sob o controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans*. As linhagens foram caracterizadas quanto à produção enzimática, em sacarose ou caldo de cana, apresentando aumentos nas atividades enzimáticas de 15 vezes para a PG, na linhagem T146, e de 132 vezes para a PL, na linhagem T105, quando comparadas à linhagem selvagem (Araújo *et al.*, 2007; Cardoso *et al.*, 2008).

Determinar as condições de cultivo da linhagem recombinante é essencial, pois o crescimento e a produção enzimática são afetados por uma variedade de fatores (Wang *et al.*, 2005). Abordagens para aumentar a produção de enzimas compreendem algumas modificações nas condições de cultivo, como a agitação (El-Enshasy *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2010), pH do meio de cultura (Mainwaring *et al.*, 1999; González-López *et al.*, 2006), e concentração de macro e de micronutrientes (Papagianni *et al.*, 1999), dentre outras. Essas modificações nas condições de cultivo podem levar a alterações na morfologia do micélio, podendo com isso afetar a produção de metabólitos da célula (Braun e Vecht-Lifshitz, 1991). A morfologia de fungos filamentosos pode variar entre duas formas: esférica e em filamentos livres, quando cultivados em fermentação submersa. A forma esférica de micélio apresenta algumas vantagens como, a diminuição da viscosidade da cultura e facilidade na separação sólido-líquido. Entretanto, a forma esférica pode causar grande limitação da transferência de massa de gases para a região central do micélio, podendo resultar em autólise nessa região (El-Enshasy *et al.*, 2006).

Após a obtenção e análise da linhagem recombinantes de *P. griseoroseum* T146, esta foi caracterizada pelo aumento da produção de PG (Araújo *et al.*, 2007). No entanto, esta linhagem foi cultivada em meio não-tamponado e, portanto, sujeito a variação do pH. Nessa condição, a atividade de PG não foi detectada no sobrenadante da cultura. Considerando-se a regulação do gene *pgg2* sob controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans*, ou seja, regulação constitutiva na linhagem recombinante T146, especula-se quais seriam as possíveis explicações para a ausência de atividade enzimática no sobrenadante da cultura. Desse modo, a produção e secreção de PL e PG foi avaliada, a partir da análise do extrato celular e do sobrenadante da cultura das linhagens selvagem e recombinantes de *P. griseoroseum* cultivadas em meio de cultivo tamponado e não tamponado. Foram observadas diferenças significativas nas duas condições de cultivo, indicando que na secreção de PL e PG a manutenção do pH do meio próximo à neutralidade (pH 6,8) leva ao aumento da produção e secreção dessas enzimas.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Micro-organismos

A linhagem selvagem *P. griseoroseum* CCT6421, isolada na Universidade Federal de Viçosa, a linhagem mutante *P. griseoroseum* PG63 *niaD*<sup>-</sup>, obtida por Pereira *et al.* (2004) e as linhagens recombinantes *P. griseoroseum* T105 (Araújo *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2008) e T146 (Araújo *et al.*, 2007) e T20 (Araújo *et al.*, 2007) foram utilizadas. A linhagem mutante *P. griseoroseum* PG63 *niaD*<sup>-</sup> possui o genoma idêntico ao da linhagem *P. griseoroseum* selvagem, com exceção da deleção de 122 pb no gene *niaD*, que codifica a nitrato redutase (Pereira *et al.*, 2004). As linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* T105 e T146 contêm, respectivamente, cópias adicionais do gene *plg1* e do gene *pgg2*. Em ambas as linhagens recombinantes, os genes *plg1* e *pgg2* estão sob o controle do promotor do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) e a região de terminação do gene da triptofano sintetase (*trpC*) de *A. nidulans*. A linhagem recombinante de *P. griseoroseum* T20 é derivada da linhagem T105 e possui cópias adicionais de ambos os genes *plg1* e *pgg2*, sob o controle do promotor do gene *gpd* e a região de terminação do gene *trpC* de *A. nidulans* (Araújo *et al.*, 2007).

### 2.2. Meios e condições de cultivo

As linhagens foram cultivadas a 25°C por sete dias, em placas de Petri contendo meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA), para obtenção do inóculo em solução de Tween 80 a 0,2% (v/v). A padronização do inóculo foi feita pela contagem dos conídios em câmara de Neubauer. Para avaliar a expressão dos genes *plg1* e *pgg2* e a produção de PL e PG, 10<sup>6</sup> conídios por mililitro foram inoculados em 100 mL de meio mínimo mineral tamponado líquido – MMT – (pH 6,8), contendo K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,98 g.L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,44 g.L<sup>-1</sup>; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 g.L<sup>-1</sup>, suplementado com MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,1 g.L<sup>-1</sup> e a fonte de carbono; ou cultivadas em meio mínimo mineral não-tamponado líquido – MMNT – (pH 6,3 – 3,0) contendo K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,0 g.L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,64 g.L<sup>-1</sup>; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 g.L<sup>-1</sup>, suplementado com MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,1 g.L<sup>-1</sup> e a fonte de carbono. As linhagens recombinantes foram cultivadas em sacarose 10 g.L<sup>-1</sup>. As linhagens selvagem e mutante PG63 foram cultivadas em meio mínimo contendo sacarose 10 g.L<sup>-1</sup> e extrato de levedura 0,6 g.L<sup>-1</sup>. As culturas foram mantidas sob constante agitação de 150 rpm e temperatura de 25°C, em frascos Erlenmeyer de 250 mL, durante um período de 120 horas. As amostras foram

coletadas em intervalos de 12 horas ou quando mencionado. O meio de cultivo contendo a massa micelial foi filtrado em peneira de 400 malhas/pol<sup>2</sup> (37 µm de poro) e o sobrenadante da cultura foi armazenado a -20°C. O micélio foi utilizado para a extração de RNA total e para determinação da massa seca micelial. Os experimentos foram conduzidos em três repetições.

### **2.3. Avaliação da morfologia do micélio**

Para a análise da morfologia do micélio, a linhagem recombinante T20 foi cultivada em meio MMT (pH 6,8) e MMNT (pH 6,3 – 3,0), durante um período de 120 horas de cultivo. A coleta das amostras foi realizada a cada 24 horas. O micélio fresco foi imobilizado entre lâmina e lamínula. Em seguida, as amostras foram observadas em microscópio óptico (Olympus, modelo BX50) acoplado a uma câmera fotográfica (Olympus, SN: Q20868). A imagem foi visualizada em aumento óptico de 4X e 100X. Para digitalização da imagem, utilizou-se o software – Q Color 3.

### **2.4. Ensaio enzimáticos de pectina liase e poligalacturonase**

A atividade de PL foi determinada, conforme descrito por Albersheim e Killias (1962). A mistura de reação continha 1,5 mL do sobrenadante da cultura e 1 mL de pectina cítrica P-9135 (SIGMA<sup>®</sup>) 2,5% (p/v) em tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, pH 6,8. A mistura foi incubada a 40°C por 30 minutos. Alíquotas de 0,5 mL da mistura de reação foram retiradas nos tempos 0 e 30 minutos de incubação e adicionadas em 4,5 mL de HCl 0,01 N, para interrupção da reação, sendo a absorvância medida a 235 nm. Uma unidade de PL (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir nanomoles de Δ<sup>4,5</sup> galacturonídeo produzidos por minuto de reação, utilizando-se o coeficiente de extinção molar 5550 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para o cálculo (Albersheim, 1966).

A atividade de PG foi determinada, baseando-se na dosagem de açúcar redutor, segundo o método do DNS (ácido dinitrossalicílico) descrito por Miller (1959). A mistura de reação continha 0,5 mL do sobrenadante da cultura e 1,5 mL de ácido poligalacturônico P-3889 (SIGMA<sup>®</sup>) a 1,3% (p/v) em tampão acetato de sódio e NaCl 2,5 M, pH 4,8. A mistura foi incubada a 40°C por 20 minutos. Alíquotas de 0,125 mL da mistura de reação foram retiradas nos tempos 0 e 20 minutos de incubação e adicionadas em 0,5 mL de DNS, para interromper a reação. Ácido galacturônico G- 2125 (SIGMA<sup>®</sup>) foi utilizado para obtenção da curva padrão. Uma

unidade de PG (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir micromoles de ácido galacturônico liberados por minuto de reação.

### **2.5. Extração de RNA total e reações de transcriptase reversa dos genes *plg1* e *pgg2* nas linhagens PG63 e recombinante T20**

O RNA total foi extraído utilizando-se reagente Trizol, T9424 (TRI Reagent, Sigma<sup>®</sup>). O micélio foi triturado em nitrogênio líquido e 200 mg foram transferidos para um microtubo de centrífuga, contendo 1,0 mL de Trizol e 150 µL de PVP-40 (Polyvinyl pyrrolidona - 40, Sigma<sup>®</sup>) a 20%. Após homogeneização em agitador de tubos, centrifugou-se a 15000 g por 20 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionando-se 200 µL de clorofórmio. Após nova homogeneização, centrifugou-se a 15000 g por 20 minutos e a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 250 µL de solução de precipitação (citrato de sódio 0,8 M; cloreto de sódio 1,2 M) e 250 µL de isopropanol. A mistura foi colocada em repouso em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 15000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com álcool 80%. O sedimento foi ressuspenso em 40 µL de água DEPC autoclavada, incubado por 10 minutos a 65°C e armazenado a -80°C.

As reações de transcriptase reversa foram realizadas utilizando-se o kit “Im Prom-II<sup>™</sup> Reverse Transcription System” (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

### **2.6. Análise por PCR em tempo real da expressão dos genes *plg1* e *pgg2***

O PCR em tempo real foi usado para quantificar o número de seqüências alvo dos genes *plg1* e *pgg2*, utilizando as amostras de cDNA da linhagem recombinante T20. Para cada reação de PCR foram utilizados 1 µL da mistura de cDNA, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA) para concentração final de 1X, em um volume final de 25 µL por reação. O gene de  $\gamma$ -actina de *P. griseoroseum* foi utilizado como normalizador endógeno. O cálculo da quantificação relativa foi realizado de acordo com o método do  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  proposto por Livak e Schmittgen (2001). Os testes para a eficiência de amplificação e validação dos experimentos foram realizados como descrito por Pfaffl (2001). Os experimentos foram repetidos três vezes para cada ponto testado, utilizando três preparações de RNA total obtido de amostras biológicas independentes.

Os experimentos de quantificação relativa foram conduzidos no sistema de PCR em tempo real 7300/7500 (Applied Biosystems, California, USA). As seqüências de oligonucleotídeos utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 1. Os oligonucleotídeos foram desenhadas no programa *Primer Express* software (Applied Biosystems, California, USA), com base na seqüência dos genes *plg1* (AF502279.1) e *pgg2* (AF195113.2) depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Tabela 1: Seqüência de oligonucleotídeos para as reações de PCR em tempo real

| Alvos            | Oligonucleotídeos | Seqüência 5'→3'        | T <sub>m</sub> | Produto do PCR |
|------------------|-------------------|------------------------|----------------|----------------|
| <i>plg1</i>      | Plg1B_F           | GGACATGATCTGGATCGAATCA | 54,3°C         |                |
|                  | Plg1B_R           | TGGAGATAGTGACACGCTTGGA | 57,8°C         | 100 pb         |
| <i>pgg2</i>      | Pgg2A_F           | GAACATCTCCGGCCTTAACG   | 55,8°C         |                |
|                  | Pgg2A_R           | CCTCGCTGTTGTCGATGGT    | 57,6°C         | 101 pb         |
| $\gamma$ -actina | Act1_F            | TGGGAGCTTCGGTCAAGAGA   | 58,0°C         |                |
|                  | Act1_R            | ACCAACTGGGACGACATGGA   | 58,6°C         | 100 pb         |

## 2.7. Preparo das amostras de proteínas

A obtenção da amostra de proteínas intracelulares foi realizada segundo metodologia descrita por Carberry *et al.* (2006), com modificações. Para obtenção do extrato celular, o micélio foi lavado com água destilada e retirado o excesso de água. Um grama de micélio foi triturado em nitrogênio líquido e ressuspendido em 5 mL de tampão de lise (Tris HCl 10 mM; NaCl 50 mM; EDTA 20 mM, glicerol 10% (v/v); Ditiotreitól (DTT) 30 mM, PMSF 1 mM; pH 7,5). A mistura foi centrifugada a 10000 g durante 30 minutos a 4°C para remoção dos restos celulares. Após esse procedimento, as amostras foram avaliadas quanto à atividade residual de PG e PL no extrato celular, como descrito no item 2.4.

Para a análise em SDS-PAGE, as proteínas do sobrenadante da cultura foram precipitadas utilizando-se TCA 10% (v/v) e acetona 50% (v/v) a -20°C e centrifugadas a 15000 g durante 5 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado, seco a temperatura ambiente e ressuspendido em tampão de desnaturação.

## **2.8. Determinação de proteína total e detecção por SDS-PAGE**

A quantificação de proteína total foi realizada por meio do método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino para a construção da curva-padrão. O perfil protéico das linhagens foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). O gel de separação (12,5% acrilamida) e o gel empilhador (4% de acrilamida) foram feitos segundo Laemmli (1970). As amostras foram desnaturadas em tampão (Tris-HCl 60 mM pH 6,8; glicerol 10%; SDS 2,3%;  $\beta$ -mercaptoetanol 2%; azul de bromofenol 1%) a 100°C durante 10 minutos. O gel foi submetido a 60 volts, durante 4 horas em tampão (Tris-HCl 72 mM, pH 8,5; glicina 576 mM; SDS 0,24%), 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 12 horas. As amostras foram concentradas para 15  $\mu$ g de proteína total, utilizando-se TCA 10% (v/v) e acetona 50% (v/v), antes de serem aplicadas no gel. M1 – marcador de massa molecular protéica da Fermentas (1,0 mg/mL); M2 – marcador de massa molecular protéica médio da Promega (0,5 mg/mL).

### **3. Resultados**

#### **3.1. Efeito do pH na produção e secreção de PL e PG**

Para verificar o efeito da variação do pH do meio de cultivo sobre a produção e secreção de PL e PG, as linhagens *P. griseoroseum* selvagem, PG63 e recombinantes T105, T146 e T20 foram cultivadas em meio tamponado MMT (pH 6,8) e em meio não tamponado MMNT (pH 6,3 – 3,0), contendo sacarose 10 g.L<sup>-1</sup>, durante um período de 72 horas. Para isso, a atividade enzimática de PL e PG foram avaliadas no extrato celular e no sobrenadante da cultura das linhagens (Figura 1). A atividade de PL foi detectada no sobrenadante e no extrato celular das linhagens recombinantes T105 e T20, quando cultivadas em meio MMT (Figura 1A). No entanto, quando as linhagens foram cultivadas em meio MMNT, a atividade de PL foi detectada apenas no extrato celular (Figura 1B). Estes resultados indicam que a PL foi produzida, mas a secreção dessa enzima foi afetada pela acidificação do meio MMNT. A atividade de PG foi detectada no sobrenadante e no extrato celular das linhagens T146 e T20, quando cultivadas em meio MMT (Figura 1C). Entretanto, quando as linhagens foram cultivadas em meio MMNT, houve baixa detecção da atividade de PG no extrato celular ou no sobrenadante, indicando que a produção e secreção desta enzima foram afetadas pela acidificação do meio (Figura 1D).

Para avaliar qual é a variação no pH dos meios MMT e MMNT ao longo do tempo de cultivo, as linhagens *P. griseoroseum* selvagem, PG63 e recombinante T20 foram cultivadas durante um período de 120 horas em regime de batelada. O pH dos meios MMT e MMNT foi avaliado a cada 24 horas (Tabela 2). O pH do meio MMT manteve-se na faixa de pH 6,8 – 5,0, apresentando pequena variação ao longo do tempo de cultivo.. No entanto, a variação do pH do meio MMNT foi significativamente maior do que no meio MMT, variando da faixa de pH 6,3 – 2,8. Nas primeiras 24 horas, foi observada uma redução do valor do pH inicial de 6,3 para 3,9 no meio MMNT cultivados com as linhagens T20, selvagem e PG63. A linhagem recombinante T20 foi utilizada nos experimentos posteriores, uma vez que esta possui a produção concomitante de PL e PG.

Tabela 2: Variação do pH do meio de cultivo inoculado com as linhagens *P. griseoroseum* selvagem (W), PG63 e recombinante T20 em meio MMT (pH 6,8) e MMNT (pH 6,3 - 3,0). Os resultados representam as médias aritméticas de três repetições experimentais

| Tempo de cultivo (h) | W                |                   | PG63 |      | T20  |      |
|----------------------|------------------|-------------------|------|------|------|------|
|                      | MMT <sup>a</sup> | MMNT <sup>a</sup> | MMT  | MMNT | MMT  | MMNT |
| 0                    | 6,80             | 6,30              | 6,80 | 6,30 | 6,80 | 6,30 |
| 24                   | 6,38             | 4,01              | 6,38 | 3,55 | 6,39 | 3,89 |
| 48                   | 6,00             | 3,12              | 4,99 | 2,89 | 5,55 | 3,19 |
| 72                   | 6,44             | 3,04              | 5,94 | 2,86 | 5,89 | 2,81 |
| 96                   | 6,21             | 3,46              | 6,19 | 2,92 | 6,11 | 2,92 |
| 120                  | 6,55             | 3,41              | 6,46 | 2,89 | 6,33 | 2,95 |

a- acrescido de extrato de levedura 0,6 g.L<sup>-1</sup>.

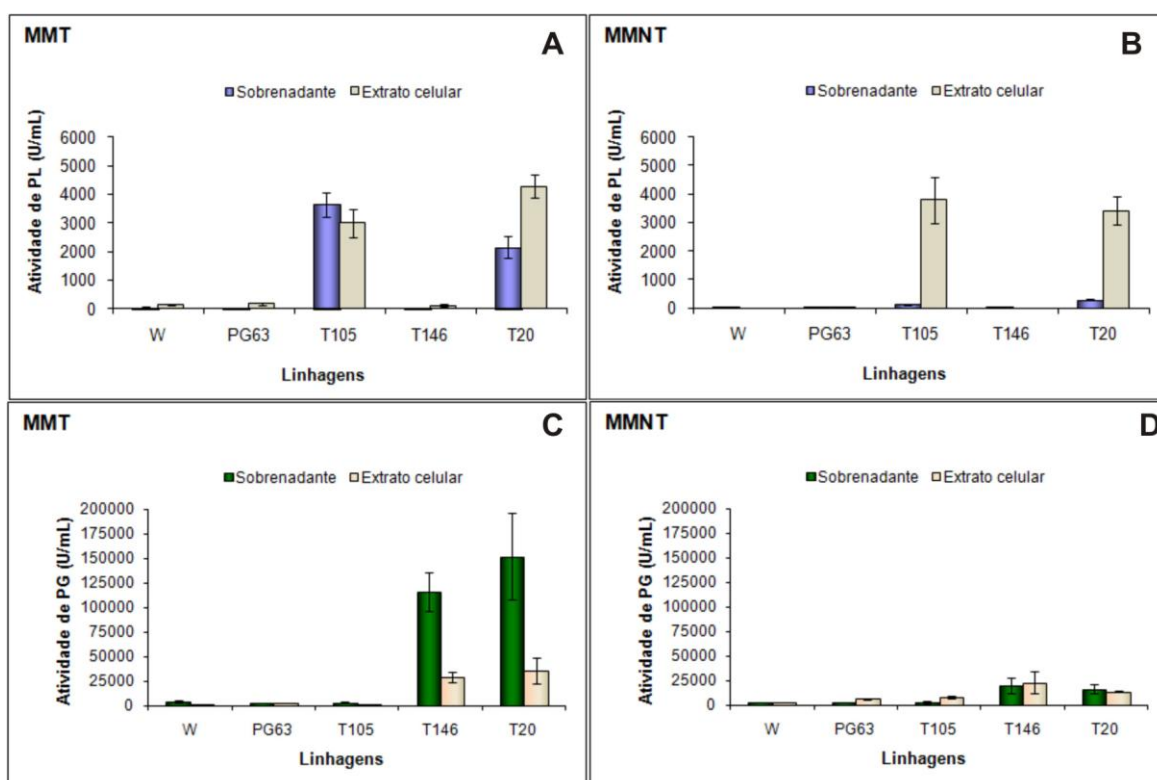


Figura 1: Atividade de PL e PG no extrato celular e no sobrenadante das culturas. Detecção da atividade residual de PL e PG no extrato celular e sobrenadante das linhagens *P. griseoroseum* selvagem (W), PG63 e recombinantes T105, T146 e T20, cultivadas em meio MMT (pH 6,8) e MMNT (pH 6,3 – 3,0), durante 72 horas. Atividade de PL em meio MMT (A) e MMNT (B); Atividade de PG em meio MMT (C) e MMNT (D); W- acrescido de extrato de levedura 0,6 g.L<sup>-1</sup>. Os resultados representam as médias ± desvio padrão de três experimentos independentes.

### 3.2. Avaliação da expressão dos genes *plg1* e *pgg2*

O RT PCR foi realizado para constatar se ocorre alteração da expressão dos genes *plg1* e *pgg2*, ambos sob o controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans*, quando as linhagens recombinantes foram cultivadas em meio com variação do pH. Para isso foi analisada a expressão na linhagem PG63, que possui a expressão desses genes sob o controle do promotor endógeno e na linhagem recombinante T20, que possui a expressão desses genes sob controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans*. Foram observadas, em ambas as linhagens, a presença dos transcritos dos genes *plg1* e *pgg2* nos tempos analisados de 24, 72 e 120 horas, para o cultivo tanto em meio MMT como em meio MMNT (Figura 2). Após a detecção dos transcritos dos genes *plg1* e *pgg2*, a expressão destes foi avaliada na linhagem recombinante T20, para verificar se ocorre alteração na quantidade dos transcritos, em resposta à variação do pH do meio. Ambos os genes apresentaram um padrão de expressão similar nos dois meios de cultivo, MMT e MMNT, sendo observado um maior nível de expressão em 24 horas de cultivo e uma redução da expressão em 120 horas de cultivo (Figura 3). Os resultados mostram que a expressão dos genes *plg1* e *pgg2*, sob controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans*, inseridos no genoma da linhagem recombinante T20, não sofreu modificação na maioria dos tempos analisados, ou seja, a variação do pH do meio de cultivo não afetou a expressão a nível de transcrição.

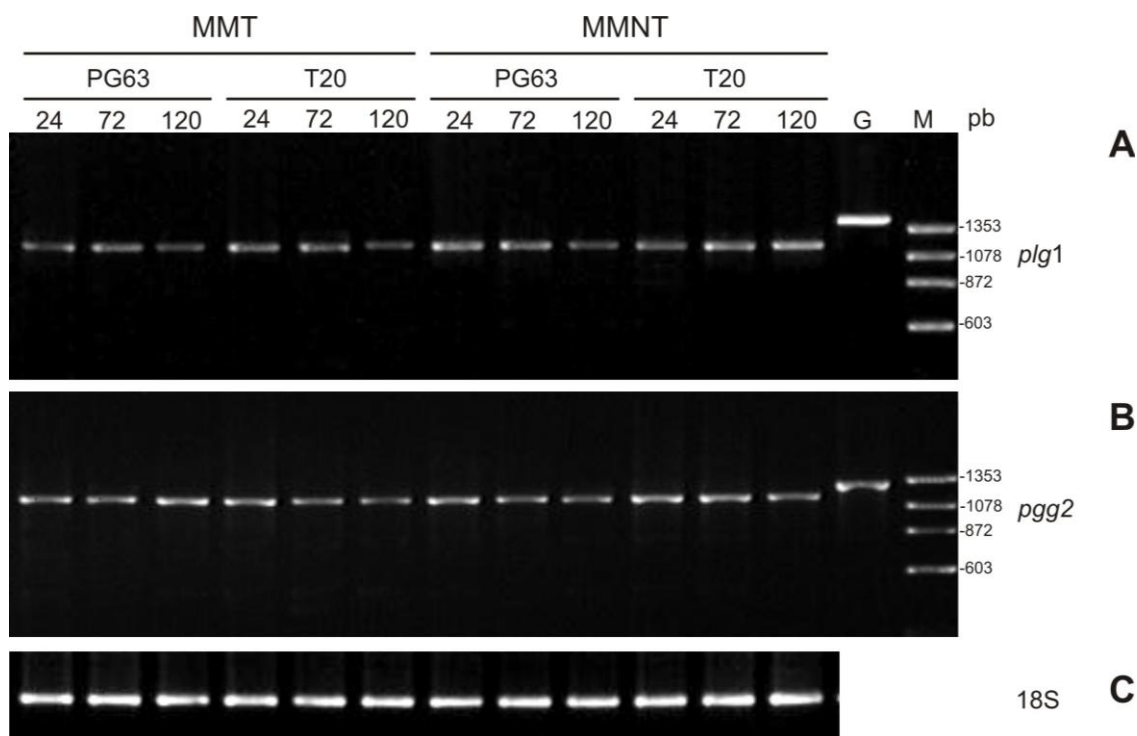


Figura 2: Expressão dos genes *plg1* e *pgg2* em meio MMT e MMNT. Detecção dos transcritos dos genes *plg1* e *pgg2* nas linhagens *P. griseoroseum* PG63 e recombinante T20, cultivadas em MMT (pH 6,8) e MMNT (pH 6,3 - 3,0), durante 24, 72 e 120 horas. (A) Expressão do gene *plg1*; (B) Expressão do gene *pgg2*; (C) Expressão do gene 18S ribossômico usado como controle do RT-PCR. G – DNA genômico. M – marcador de tamanho, DNA  $\Phi$ X/*Hae*III.

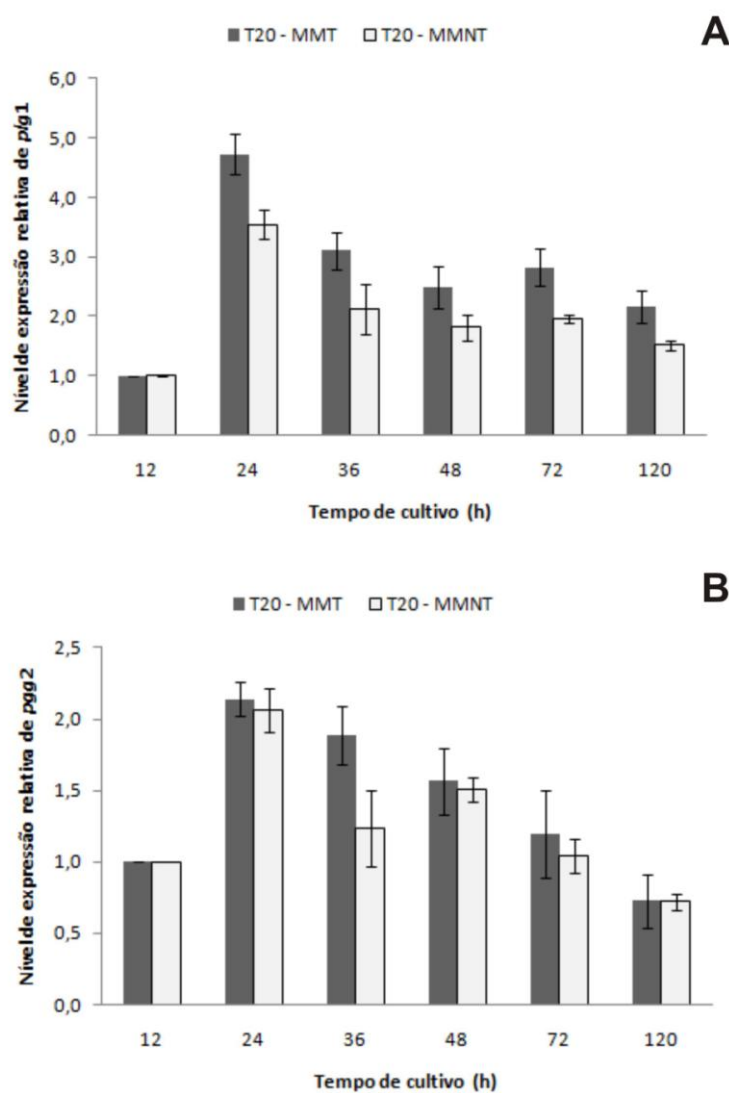


Figura 3: Expressão relativa dos genes *plg1* e *pgg2* nos meios MMT e MMNT. Avaliação da quantidade de transcritos dos genes *plg1* e *pgg2* no micélio da linhagem recombinante T20 cultivada em MMT (pH 6,8) e MMNT (pH 6,3 - 3,0), durante um período de 120 horas. Expressão relativa dos transcritos do gene *plg1* (A) e do gene *pgg2* (B). Os resultados representam as médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

### 3.3. Avaliação da secreção de proteínas totais

Para avaliar o efeito do pH do meio na secreção de proteínas, a proteína total nos sobrenadantes das culturas das linhagens *P. griseoroseum* selvagem, PG63 e recombinantes T105, T146 e T20 foi quantificada. As diferenças na produção de proteína total e nas atividades específicas de PL e PG podem ser observadas na Tabela 3. O valor da atividade específica (U/ $\mu$ g) foi obtido pela razão entre a atividade total (U/mL) e a quantidade de proteína total ( $\mu$ g/mL). As linhagens recombinantes T105 e T20 apresentaram, respectivamente, 6,4 e 3,3 vezes mais atividade específica de PL em meio MMT do que no meio MMNT. Em relação à PG, as linhagens T146 e T20 apresentaram, respectivamente, atividade específica de PG em meio MMT, maior 3,0 e 3,6 vezes, do que em meio MMNT. A quantidade de proteína total secretada variou de  $7,8 \pm 1,1$   $\mu$ g/mL no meio MMT e  $3,25 \pm 1,50$   $\mu$ g/mL no meio MMNT. No entanto, não houve diferença na quantidade de proteína total observada no sobrenadante da linhagem *P. griseoroseum* selvagem em ambos os meios de cultivo. Isto pode ser explicado pela utilização do extrato de levedura como suplemento nos dois meios de cultivo para a linhagem selvagem. O extrato de levedura tem em sua composição 48,6% de proteínas, 0,4% de lipídeos, 25,6% de carboidratos, 3,3% fibras, 11,7% de cinzas, entre outros (Hisano *et al.*, 2008). Os resultados mostram que a secreção de proteína total é afetada pelo pH do meio de cultivo.

Para avaliar o efeito do pH do meio na secreção de PL e PG, a proteína total presentes no sobrenadante das linhagens *P. griseoroseum* selvagem, PG63 e recombinantes T105, T146 e T20 foi analisada por SDS-PAGE. A Figura 4 mostra os perfis protéicos do sobrenadante das culturas das linhagens nos meios MMT e MMNT. As bandas de maior intensidade correspondem à PL (~36 kDa) e à PG (~38 kDa) observadas, principalmente, nos perfis das linhagens T105, T146 e T20, como relatado em trabalhos anteriores (Araújo *et al.*, 2007; Cardoso *et al.*, 2008). As amostras foram padronizadas para conterem a mesma quantidade de proteína total e, deste modo, possibilitar a comparação entre a secreção de proteínas nos dois meios. A intensidade das bandas correspondentes à PL e à PG no meio MMT (Figura 4A) é maior quando comparadas à intensidade das bandas no meio MMNT (Figura 4B). Isto implica que existe maior quantidade de PL e PG no meio MMT do que no meio MMNT. Estes resultados confirmam que a secreção destas proteínas é alterada em

função da variação do pH do meio, o que pode explicar em parte a ausência de atividade de PL e de PG no sobrenadante das culturas (Figura 1B e 1D).

Tabela 3: Atividade específica de PL e PG e proteína total nos sobrenadantes da cultura das linhagens *P. griseoroseum* selvagem (W), PG63 e recombinantes T105, T146 e T20, em meio MMT e MMNT, durante 72 horas. Os resultados representam as médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes

| Linhagens      | MMT                                     |   |                              | MMNT                                    |   |                              |
|----------------|---|---|------------------------------|---|---|------------------------------|
|                | Atividade específica de PL (U/ $\mu$ g) | Atividade específica de PG (U/ $\mu$ g) | Proteína total ( $\mu$ g/mL) | Atividade específica de PL (U/ $\mu$ g) | Atividade específica de PG (U/ $\mu$ g) | Proteína total ( $\mu$ g/mL) |
| W <sup>a</sup> | 6,4                                     | 594                                     | 7,5 $\pm$ 1,3                | 1,98                                    | 530                                     | 6,1 $\pm$ 2,5                |
| PG63           | 2,3                                     | 386                                     | 6,5 $\pm$ 1,1                | 1,08                                    | 1380                                    | 2,3 $\pm$ 0,8                |
| T105           | 295,3                                   | 405                                     | 8,3 $\pm$ 1,7                | 46,44                                   | 1072                                    | 2,7 $\pm$ 0,5                |
| T146           | 2,0                                     | 16324                                   | 7,1 $\pm$ 2,2                | 0,54                                    | 5465                                    | 3,7 $\pm$ 0,6                |
| T20            | 228,9                                   | 16170                                   | 9,4 $\pm$ 1,1                | 70,02                                   | 4479                                    | 4,3 $\pm$ 2,3                |

W- *P. griseoroseum* selvagem

a – crescido em meio contendo extrato de levedura 0,6 g.L<sup>-1</sup>.

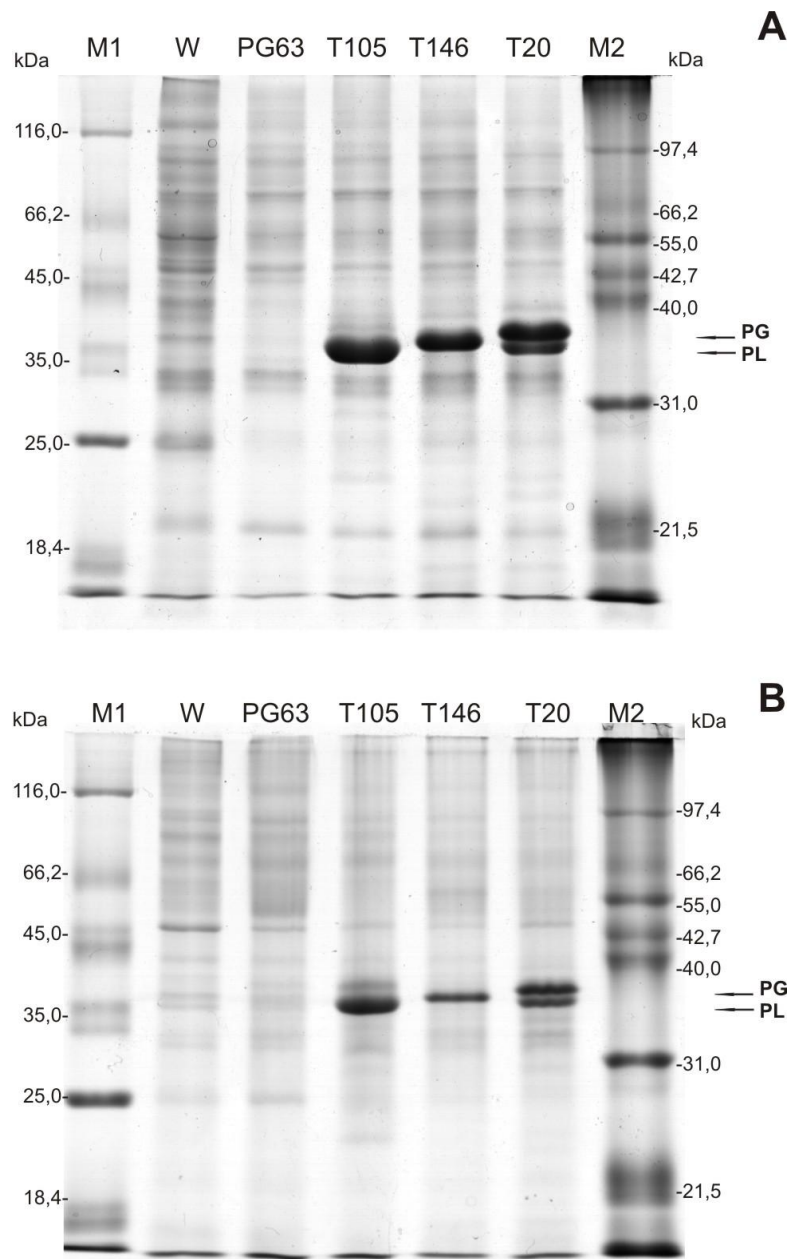


Figura 4: Perfil de proteínas extracelulares das linhagens cultivadas em meio MMT e MMNT. Comparação entre o perfil protéico do sobrenadante da cultura das linhagens *P. griseoroseum* selvagem (W), PG63 e recombinantes T105, T146 e T20, cultivadas em (A) MMT - pH 6,8 e em (B) MMNT pH 6,3 – 3,0. As setas indicam a posição de PG (~38 kDa) e PL (~36 kDa). W- acrescido de extrato de levedura 0,6 g.L<sup>-1</sup>. M – marcador de massa molecular protéica.

### 3.4. Avaliação da produção de biomassa e da morfologia do micélio

Após verificar que a produção e secreção de PL e PG eram afetadas pelo pH do meio de cultivo, a produção de biomassa das linhagens *P. griseoroseum* selvagem, PG63 e recombinantes T105, T146 e T20 foi mensurada ao longo do tempo de cultivo nos meios MMT e MMNT. A produção de biomassa foi mensurada a cada 24 horas, até obtenção de massa seca micelial constante, que ocorreu durante o período de cultivo de 120 horas. A produção de biomassa no meio MMT foi de 1,3 a 2,7 vezes maior do que a obtida no meio MMNT (Figura 5). Estes resultados mostram que a produção de biomassa é inibida pela acidificação do meio de cultivo.

A morfologia de fungos filamentosos cultivados em fermentação submersa pode variar entre duas formas: micélios esféricos e/ou filamentos livres. Esta alteração na morfologia do micélio tem grande efeito sobre a produção de metabólitos secundários e enzimas (Braun e Vecht-Lifshitz, 1991). Portanto, a morfologia do micélio da linhagem *P. griseoroseum* T20, cultivada em meio MMT (pH 6,8) e MMNT (pH 6,3 - 3,0), foi avaliada em diferentes tempos de cultivo. Após 24 horas de cultivo, a forma esférica do micélio se apresenta em formação, sendo observado um micélio com a região central mais compacta, quando o cultivo foi realizado em meio MMNT (Figura 6a e 6e). O micélio na forma esférica foi predominante nas culturas em relação à forma de filamentos livres, sendo visualizada em todos os tempos de cultivo. Após 72 horas de cultivo, a forma esférica encontrada no meio MMT é semelhante à encontrada no meio MMNT (Figura 6b e 6f). Entretanto, após 120 horas de cultivo, houve diferenças entre o micélio cultivado no meio MMT e o micélio cultivado no meio MMNT. As esferas miceliais cultivadas no meio MMT são maiores, mais compactas e com hifas menores; as cultivadas no meio MMNT apresentaram uma região central menor e compacta envolvida por hifas alongadas (Figura 6c e 6g). Após 96 horas de cultivo, as hifas dos fungos cultivados no meio MMT apresentaram filamentos espessos, enquanto que as produzidas no meio MMNT apresentaram um estreitamento maior e afinamento nas extremidades (Figura 6d e 6h). Os resultados mostram que o pH do meio tem influência sobre a morfologia das hifas e do micélio da linhagem recombinante T20, ao longo do tempo de cultivo. Estas modificações podem estar relacionadas à diminuição da secreção de PL e de PG, quando as linhagens foram cultivadas em meio MMNT.

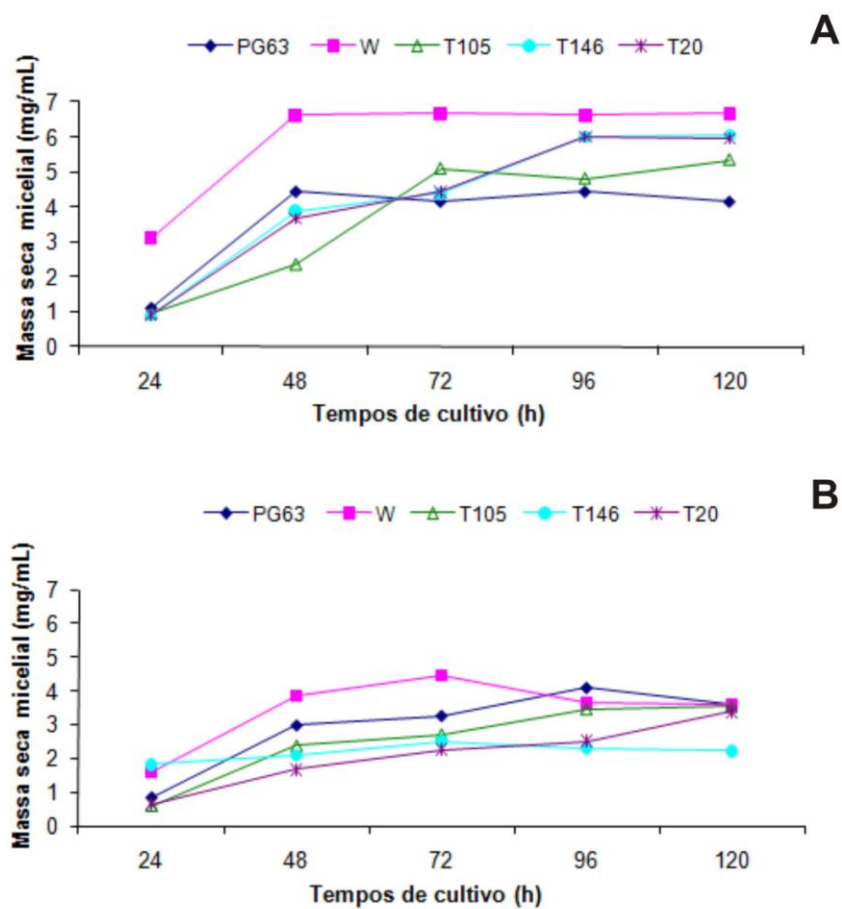


Figura 5: Efeito do pH na produção de biomassa. Avaliação da massa seca micelial das linhagens *P. griseoroseum* selvagem (W), PG63 e recombinantes T105, T146 e T20, cultivadas em (A) MMT- pH 6,8 e em (B) MMNT - pH 6,3 - 3,0. W- acrescido de extrato de levedura 0,6 g.L<sup>-1</sup>. Os resultados representam as médias aritméticas de três repetições experimentais.

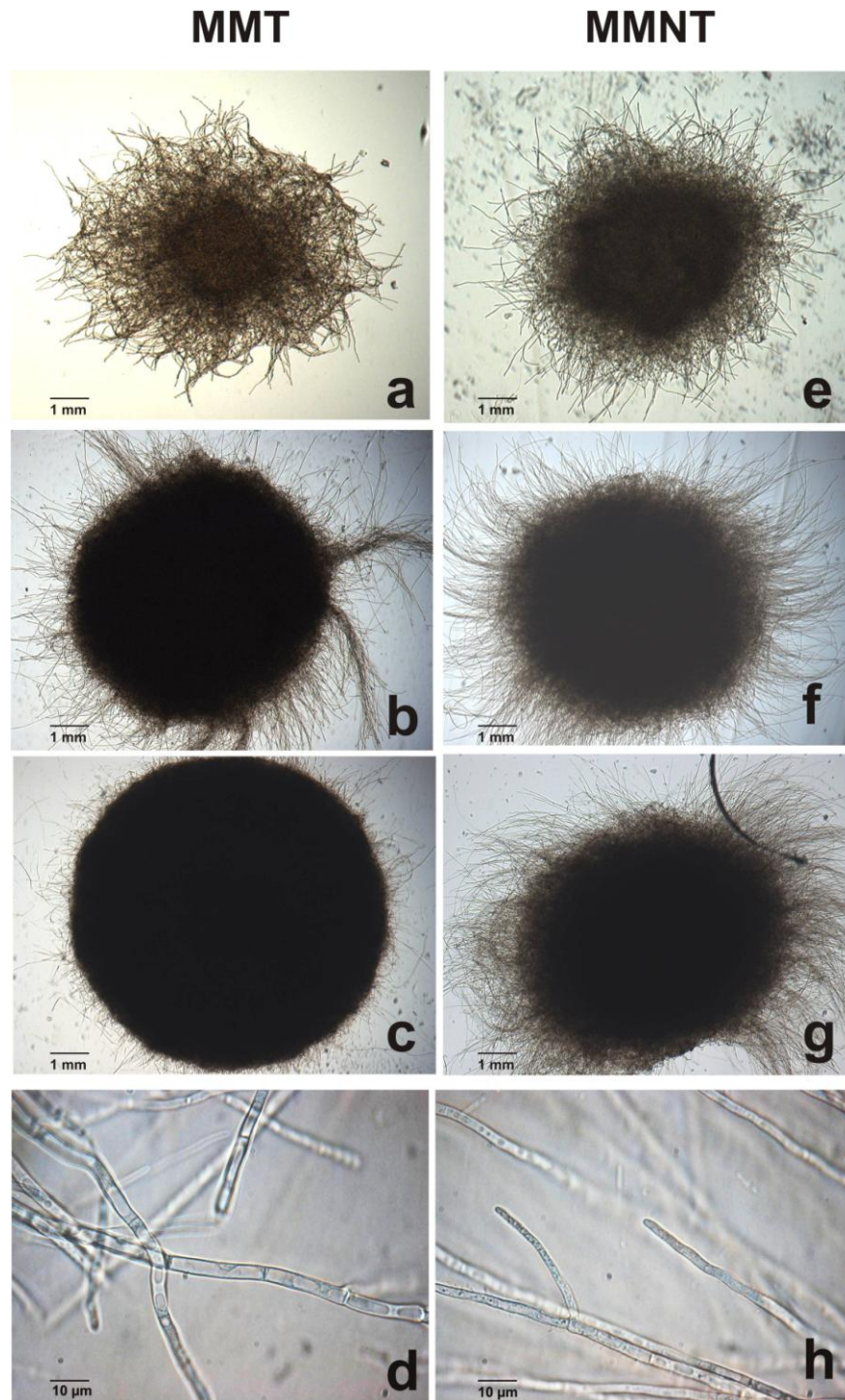


Figura 6: Efeito do pH na morfologia do micélio. Avaliação da morfologia micelial da linhagem *P. griseoroseum* T20, cultivada em MMT - pH 6,8 e MMNT - pH 6,3 - 3,0, durante um período de 24h (a; e), 72h (b; f), 120h (c; g); morfologia das hifas em 96h de cultivo(d; h).

#### 4. Discussão

Os fungos filamentosos são geralmente considerados capazes de secretar grandes quantidades de proteínas, sendo esperado ocorrer a secreção simultaneamente com o crescimento da extremidade da hifa (Geysens *et al.*, 2009). A forma e morfologia do micélio estão relacionadas à produção enzimática, consistindo em alvo de estudo em várias pesquisas. Neste trabalho foi avaliado o efeito da variação do pH do meio na produção e secreção de PL e PG das linhagens de *P. griseoroseum* selvagem, PG63 e recombinantes T105, T146 e T20, sendo observado também modificação na morfologia do micélio dessas linhagens em resposta ao pH.

Ao avaliar a atividade de PL e de PG produzidas pelas linhagens recombinantes cultivadas em meio sem manutenção do pH foi observada redução na atividade. Os resultados obtidos com o cultivo no meio MMNT, no qual o pH final do meio após 72 horas de cultivo atingiu pH 2,8, mostraram uma diminuição da atividade de PL e de PG produzidas pelas linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* (Figura 1). Em alguns casos a redução do pH do meio pode diminuir a produção protéica, no entanto, isto pode variar de acordo com a enzima a ser produzida (Kim *et al.*, 2001). A produção de ácido cítrico e de lisozima por *Aspergillus niger* ocorre em pH ácido (pH 2,0 - 4,5), enquanto, a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* é aumentada em pH 6,0 - 5,0 (Papagianni *et al.*, 1999; Mainwaring *et al.*, 1999; Kim e Song, 2009). Na literatura, tem sido mostrado que o pH do meio de cultivo tem grande efeito na regulação de muitos genes em fungos filamentosos, sendo regulados, principalmente, pela proteína PacC, que é ativada em pH alcalinos e reprime os genes expressos em condições ácidas (Denison, 2000; Vautard-Mey e Fèvre, 2003). No entanto, para os genes que codificam gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em fungos não tem sido observada a região reguladora para proteína PacC, mas tem sido reportado que a expressão deste gene é afetada pela redução da fonte de carbono no meio (Wolff e Arnau, 2002; Liao *et al.*, 2008). A análise quantitativa da expressão dos genes *plg1* e *pgg2*, sob controle do promotor do gene *gpd* de *A. nidulans* na linhagem recombinante T20, mostrou que estes não são afetados pela variação do pH do meio (Figura 3), mas a expressão diminui gradativamente com o tempo de cultivo.

Entre as modificações decorrentes da alteração do pH do meio de cultivo que afetam a produção enzimática, podem ser citadas a regulação gênica, modificações pós-traducionais, bem como a morfologia do micélio. Tem sido relatado que, a

principal causa da heterogeneidade dentro do micélio é devida a limitações da difusão de nutrientes e oxigênio entre as hifas altamente compactadas (Papagianni, 2004). Essa limitação pode afetar a produção de biomassa na região central do micélio e causar autólise celular. A autólise celular pode liberar proteases intracelulares para o meio de cultivo, afetando a estabilidade da proteína secretada. A produção de biomassa pelas linhagens *P. griseoroseum* selvagem, PG63 e recombinantes T105, T146 e T20 apresentaram diferenças quando comparado o cultivo no meio MMT e MMNT (Figura 5). No entanto, após a estabilização do crescimento micelial não foram observados redução da biomassa, indicando que não houve autólise celular durante o tempo de cultivo de 120 horas. A diferença na quantidade de proteína total observada para o cultivo nos dois meios (Tabela 3), não pode ser devida a atividade proteolítica, uma vez que não foi detectada atividade proteolítica no sobrenadante da cultura de *P. griseoroseum* nas condições de produção de PL e de PG (Cardoso *et al.*, 2010).

O micélio cultivado em fermentação submersa pode exibir diferentes morfologias, variando entre as formas de micélio livre e as formas de micélio compacto esférico, cada forma sofre distinta influencia das condições do meio de cultivo (Braun e Vecht-Lifshitz, 1991; Grim *et al.*, 2005). Em 24 horas de cultivo foi observada a formação de micélios esféricos em ambos os meios testados, no entanto, pode ser observada uma compactação maior na região central do micélio esférico cultivado em meio MMNT (Figura 6). A formação de micélios esféricos maiores tem sido relacionada a aumento da produtividade, no entanto, o micélio muito grande ou muito compacto em sua região central tendem a reduzir a produção devida à limitação de massas de oxigênio para a região central mais interna do micélio esférico (Feng *et al.*, 2004; Kim e Song, 2009). A formação de micélio esféricos maiores foi observado no cultivo em meio MMT, no qual não houve grande variação do pH inicial 6,8. Nestas condições foi verificada maior secreção da enzima, mostrados na análise das proteínas do sobrenadante da cultura das linhagens (Figura 4). A compactação do interior do micélio cultivado no meio MMNT (pH 6,3 – 3,0), pode explicar a redução da secreção de PL e PG para o meio.

Portanto, as diferenças observadas na produção e secreção de PL e PG pelas linhagens recombinantes em ambos os meios tamponado (pH 6,8) e não-tamponado (pH 6,3 – 3,0) podem ser atribuídas à alteração da morfologia da hifa e do micélio em ambiente ácido. Sendo importante atentar para a particularidade de cada

linhagem e suas distintas respostas às condições de cultivo, quando se deseja aumentar a produção enzimática. *P. griseoroseum* é um fungo que tem grande potencial de aplicação como linhagem hospedeira para produção de proteínas em escala industrial. Deste modo, as informações obtidas neste trabalho contribuem para direcionar a adequação das condições de cultivo e, com isso, melhorar a produção e secreção das proteínas de interesse.

## 5. Referências Bibliográficas

- Albersheim, P. (1966) Pectin lyase from fungi. *Methods in Enzymology*, v. 8, p. 628-635.
- Albersheim, P., Killias, U. (1962) Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. *Archives of Biochemistry Biophysics*, v. 97 (1), p. 107-115.
- Araújo, E. F., Queiroz, M. V., Teixeira, J. A., Gonçalves, D. B., Bazzolli, D. M. S., Ribon, A. O., Ribeiro, J. B. (Inventores). Universidade Federal de Viçosa (Depositante). *Linhagem recombinante geneticamente modificada Penicillium griseoroseum T20 com maior produção de pectina liase e poligalacturonase, cassetes de expressão para a construção da linhagem recombinante, preparação enzimática e processo para produção da preparação enzimática*. 2007. Depósito de pedido de patente. PI 0705573-0.
- Araújo, E. F., Silva, D. O., Queiroz, M. V., Cardoso, P. G. (Inventores). (2005) Universidade Federal de Viçosa (Depositante). *Linhagem recombinante de Penicillium griseoroseum geneticamente modificada com aumento na produção de pectina liase*. Depósito de pedido de patente. PI0502515-0.
- Baracat, M.C., Valentim, C., Muchovej, J.J., Silva, D.O. (1989) Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. *Biotechnology Letters*, v. 11 (12), p. 899-902.
- Baracat-Pereira, M.C., Coelho, J.L.C., Silva, D.O. (1994) Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose and yeast extract for degumming of natural fibers. *Letters in Applied Microbiology*, v. 18, p. 127-129.
- Bazzolli, D.M.S., Ribon, A. O. B., Queiroz, M. V., Araújo, E. F. (2006) Molecular characterization and expression profile of pectin-lyase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 52(11), p. 1070-1077.
- Bazzolli, D.M.S., Ribon, A.O.B., Reis, K.C.P., Queiroz, M. V., Araújo, E. F. (2008) Differential expression of *plg* genes from *Penicillium griseoroseum*: *plg1* a pectinolytic gene is expressed en sucrose and yeast extract. *Journal of Applied Microbiology*, v. 105, p. 1595-1603.
- Bradford, M.M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254.

- Braun, S., Vecht-Lifshitz, S.E. (1991) Mycelial morphology and metabolite production. *Trends in Biotechnology*, v. 9, p. 63-68.
- Brumano, M.H.N., Coelho, J.L.C., Araújo, E.F., Silva, D.O. (1993) Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* as a function of the inoculum and culture conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 9, p. 225-228.
- Carberry, S., Neville, C. M., Kavanagh, K. A., Doyle, S. (2006) Analysis of major intracellular proteins of *Aspergillus fumigatus* by MALDI mass spectrometry: Identification and characterization of an elongation factor 1B protein with glutathione transferase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 341, p. 1096-1104.
- Cardoso, P. G., Ribeiro, J. B., Teixeira, J. A., Queiroz, M. V., Araújo, E. F. (2008) Overexpression of the *plg1* gene encoding pectin lyase in *Penicillium griseoroseum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35 (3), p. 159-166.
- Cardoso, P. G., Teixeira, J. A., Queiroz, M. V., Araújo, E.F. (2010) Pectin lyase production by recombinant *Penicillium griseoroseum* strain 105. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 56 (10), p. 831-837.
- Chen, X., Liang, Y., Hua, J., Tao, L., Qin, W., Chen, S. (2010) Overexpression of bacterial ethylene-forming enzyme gene in *Trichoderma reesei* enhanced the production of ethylene. *International Journal of Biological Sciences*, v. 6(1), p. 96-106.
- Denison, S.H. (2000) pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v. 29, p. 61-71.
- El-Enshasy, H., Kleine, J., Rinas, U. (2006) Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 2103-2112.
- Feng, K., Rou, T., Liu, B., Tzeng, Y., Chang, Y. (2004) Effect of fungal pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 34, p. 22-25.
- Geysens, S., Whyteside, G., Archer, D. B. (2009) Genomics of protein folding in the endoplasmic reticulum, secretion stress and glycosylation in the aspergilla. *Fungal genetics and biology*, v. 46, p. S121-S140.

- González-López, C.I., Ortiz-Castellanos, L., Ruiz-Herrera, J. (2006) The ambient pH response rim pathway in *Yarrowia lipolytica*: identification of *YIRIM9* and characterization of its role in dimorphism. *Current Microbiology*, v. 53, p. 8–12.
- Grimm, L.H., Kelly, S., Krull, R., Hempel, D.C. (2005) Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 69, p. 375–384.
- Hisano, H., Sampaio, F. G., Barros, M. M., Pezzato, L. E. (2008) Composição nutricional e digestibilidade aparente da levedura íntegra, da levedura autolisada e da parede celular pela tilápia-do-nilo. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9b(1), p. 43-49.
- Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R. (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2931-2944.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., Tewari, R. (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, v. 77 (3), p. 215-227.
- Kim, S., Leem, Y., Kim, K., Choi, H. (2001) Cloning of an acidic laccase gene (clac2) from *Coprinus congregates* and its expression by external pH. *FEMS Microbiology Letters*, v. 195, p. 151-156.
- Kim, Y., Song, H. (2009) Effect of pellet morphology on enzyme activities involved in phthalate degradation. *The Journal of Microbiology*, v. 47 (4), p. 420-424.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685.
- Liao, X., Fang, W., Zhang, Y., Fan, Y., Wu, X., Zhou, Q., Pei, Y. (2008) Characterization of a highly active promoter, PBbgpd, in *Beauveria bassiana*. *Current Microbiology*, v. 57, p. 121–126.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods*, v. 25, p. 402-408.
- MacCabe, A.P., Orejas, M., Tamayo, E.N., Villanueva, A., Ramón, D. (2002) Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biotechnology*, v. 96, p. 43-54.
- Mainwaring, D. O., Wiebe, M. G., Robson, G. D., Goldrick, M., Jeenes, D. J., Archer, D. J., Trinci, A. P. J. (1999) Effect of pH on hen egg white lysozyme

- production and evolution of a recombinant strain of *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology*, v. 75, p. 1-10.
- Matsushita-Morita, M., Furukawa, I., Suzuki, S., Yamagata, Y., Koide, Y., Ishida, H., Takeuchi, M., Kashiwagi, Y., Kusumoto, K.-I. (2010) Characterization of recombinant prolyl aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, p. 156-165.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428.
- Minussi, R.C., Coelho, J.L.C., Baracat-Pereira, M.C., Silva, D.O. (1996) Pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum*: effect of tea extract, caffeine, yeast extract, and pectin. *Biotechnology Letters*, v. 18 (11), p. 1283-1286.
- Nevalainen, H.K.M., Te'o, V.S.J., Bergquist, P.L. (2005) Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*, v. 23, p. 468-474.
- Nijland, J. G., Ebbendorf, B., Woszczynska, M., Boer, R., Bovenberg, R.A.L., Driessen, A.J.M. (2010) Nonlinear biosynthetic gene cluster dose effect on penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76(21), p. 7109-7115.
- Papagianni, M. (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, v. 22, p. 189-259.
- Papagianni, M., Matthey, M., Berovic, M., Kristiansen, B. (1999) *Aspergillus niger* Morphology and citric acid production in submerged batch fermentation: Effects of culture pH, phosphate and manganese levels. *Food Technology and Biotechnology*, v. 37(3), p. 165-171.
- Pedrolli, D.B., Monteiro, A.C., Gomes, E., Carmona, E.C. (2009) Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, v. 3, p. 9-18.
- Pereira, J. F., Queiroz, M. V., Lopes, F. J., Rocha, R. B., Daboussi, M. J., Araújo, E. F. (2004) Characterization, regulation, and phylogenetic analyses of the *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase gene and its use as selection marker for homologous transformation. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 50(11), p. 891-900.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29 (9), e45.

- Ribon, A. O. B., Queiroz, M. V., Araújo, E. F. (2002b) Structural organization of polygalacturonase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum*. *Genetics and Molecular Biology*, v. 25(4), p. 489-493.
- Ribon, A. O. B., Queiroz, M. V., Coelho, J. L. C., Araújo, E. F. (2002a) Differential expression of polygalacturonase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum* in different carbon sources. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 29 (3), p. 145-148.
- Vautard-Mey, G., Fèvre, M. (2003) Carbon and pH modulate the expression of the fungal glucose repressor encoding genes. *Current Microbiology*, v. 46, p. 146–150.
- Wang, L., Ridgway, D., Gu, T., Moo-Young, M. (2005) Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances*, v. 23, p. 115-129.
- Wolff, A.M., Arnau, J. (2002) Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*) and use of the *gpd1* promoter for recombinant protein production. *Fungal Genetics and Biology*, v. 35, p. 21–29.
- Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., Yadav, K.D.S. (2009) Pectin lyase: a review. *Process Biochemistry*, v. 44(1), p. 1–10.

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

O isolado *P. griseoroseum* CCT6421 possui um genoma de 31,02 Mb e apresenta quatro cromossomos: I – (11,44 Mb); II – (9,22 Mb); III (6,24 Mb) e IV (4,12 Mb), estimados por meio das técnicas de PFGE, hibridização e PCR em tempo real.

O gene *plg1*, cópia única no genoma, se localiza no cromossomo II (9,22 Mb) da linhagem de *P. griseoroseum*.

A linhagem recombinante T105 possui 4 cópias adicionais do gene *plg1*, sob controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans* integradas em regiões ectópicas nos cromossomos II, III e IV.

As linhagens recombinantes T105 e T20 possuem, respectivamente, quatro e uma cópia do gene *plg1*, sob controle do promotor do gene *gpd* e a região de terminação do gene *trpC* de *A. nidulans*.

As linhagens recombinantes T146 e T20 possuem, respectivamente, uma e duas cópias do gene *pgg2*, sob controle do promotor do gene *gpd* e a região de terminação do gene *trpC* de *A. nidulans*.

As atividades de PL e de PG, no sobrenadante da cultura das linhagens, aumentaram com o aumento do número de cópias dos respectivos genes, *plg1* e *pgg2*, nas linhagens recombinantes T105, T146 e T20, mas não proporcionalmente ao aumento do número de cópias.

A quantidade de transcritos dos genes *plg1* e *pgg2*, ambos sob controle do promotor de *gpd* de *A. nidulans*, aumentou, respectivamente, 200 vezes e 1100 vezes

na linhagem recombinante T20 comparada à expressão na linhagem PG63, quando cultivada em meio contendo sacarose e extrato de levedura.

A variação do pH do meio de cultivo afeta a secreção de PL e de PG pelas linhagens recombinantes T105, T146 e T20 de *P. griseoroseum*. Entretanto, a expressão dos genes *plg1* e *pgg2*, sob controle do promotor de *gpd*, na linhagem recombinante T20 não é afetada pela variação do pH do meio em nível de transcrição.

A secreção de proteínas totais é reduzida em meio com pH ácido, sendo também observado uma menor quantidade de PL e PG na análise por SDS-PAGE.

A morfologia da hifa e do micélio da linhagem recombinante T20 foi afetada pela variação do pH do meio de cultivo não tamponado.

A utilização do meio de cultivo tamponado propicia maior produção e secreção das enzimas PL e PG, pelas linhagens recombinantes de *P. griseoroseum* T105, T146 e T20.