ESTUDOS GENÉTICOS E PRODUÇÃO DE CELULASE
EM *Aspergillus niger*

GUSTAVO HENRIQUE GOLDMAN
BIOLOGO

ORIENTADOR : Prof. Dr. JOAO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de mestre em Agronomia. Área de
Concentração: Microbiologia Agrícola.

Piracicaba
Estado de São Paulo
Agosto - 1988

G621e Goldman, Gustavo Henrique
Estudos genéticos e produção de celulase em
Aspergillus niger. Piracicaba, 1988.
153p. ilus.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia

1. Enzima celulolítica. 2. Fungo - Celulase -
Produção. 3. Fungo - Genética. 4. Fungo - Proto-
plasto. I. Escola Superior de Agricultura "Luiz
de Queiróz", Piracicaba.

CDD 589.2

ESTUDOS GENETICOS E PRODUÇÃO DE CELULASE
EM *Aspergillus niger*

GUSTAVO HENRIQUE GOLDMAN

Aprovado em : 11.10.1988

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
Prof. Dr Sérgio Olavo Pinto da Costa	IB/USP
Prof. Dr. João Atilio Jorge	FMRP/USP

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Orientador

"Nada é fixo para aquele que
alternadamente pensa e sonha ..."

Gaston Bachelard

Para

Maria Helena

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. João Lúcio de Azevedo pela competente orientação recebida, assim como por sua presença amigável e estimulante.
- A Dra. Aline Pizzirani-Kleiner por sua amizade e pelas sugestões dadas durante o trabalho de tese.
- Aos técnicos do Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética - ESALQ - USP, com especial ênfase ao sr. Antônio José Rocha Campos.
- Ao sr. Alair de Oliveira pela ajuda na obtenção de algumas das fotos utilizadas neste trabalho.
- Aos funcionários da Biblioteca do Departamento de Genética - ESALQ - USP.
- Aos funcionários do Departamento de Genética - ESALQ - USP.
- A Maria Helena de Souza Goldman pelo carinho, afeição e paciência que me proporcionou durante todo o meu trabalho de tese.
- Ao CIAGRI - ESALQ - USP pela oportunidade de entrar em contato com a informática, além de possibilitar a redação dessa tese.
- Ao CENA - ESALQ - USP pela utilização da fonte de Co⁶⁰.
- Ao Biólogo Luis Anselmo Lopes pelo auxílio na utilização da fonte radioativa supra-citada.
- A Maria Helena P. Fungaro pelas estimulantes discussões sobre o fenômeno da parassexualidade.
- A Marisa Vieira Queiroz pelo auxílio na coloração dos núcleos de protoplastos.

- A Luzia Doreto Pacolla pelo auxílio nas técnicas eletroforéticas utilizadas, bem como pelas sugestões dadas após a leitura do manuscrito.
- Ao Cláudio Costa pelas discussões e sugestões sobre o isolamento e a regeneração de protoplastos.
- Ao José Sebastião Cunha Fernandes pelas sugestões de análise estatística.
- A Janete Magali de Araújo pelas sugestões dadas após a leitura do manuscrito original.
- Ao Dr. J.A. Jorge pelas sugestões efetuadas quanto a dosagem da produção de celulasas.
- A Dra. Helena Nevalainen pelo envio de sua tese de Ph.D., além das teses de Tuula Teeri e Merja Pentilla.
- Ao Dr. Mauricio Benevides dos Guaranys por sua amizade e estímulo constantes.
- Aos colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos, pelo agradável período de convivência.
- A CAPES - Ministério da Educação, pela bolsa de estudos fornecida durante o período de março de 1986 a fevereiro de 1988.
- A FAPESP - Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo, pela bolsa de estudos fornecida durante o restante do ano de 1988.
- Ao auxílio financeiro fornecido pela FINEP/PADCT durante o período de 1986 a 1987 e pelo STI-MIC a partir de 1988.

SUMARIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIV
RESUMO	XVII
SUMMARY	XX
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Celulases de fungos : Mecanismo e Modo de Ação	6
*2.1.1. Enzimas celulolíticas	6
2.1.2. Propriedades de enzimas celulolíticas	10
2.1.3. Modo de ação de celulases	12
2.1.4. Indução e Repressão	16
2.1.5. Métodos de ensaio da atividade celulolítica	19
2.2. Melhoramento Genético de Microorganismos	
Celulolíticos	19
2.2.1. Trichoderma sp	19
2.2.2. Outras espécies	34
2.2.3. A Tecnologia do DNA recombinante e a hidrólise da celulose	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Espécies utilizadas	43
3.1.1. Aspergillus niger NRRL-337	43

3.1.2. <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	43
3.2. Meios de Cultura e Soluções utilizadas	43
3.2.1. Meio mínimo (PONTECORVO et alii, 1953)	43
3.2.2. Meio completo (PONTECORVO et alii, 1953, modificado)	44
3.2.3. Meio mínimo líquido (PONTECORVO et alii, 1953)	44
3.2.4. Meio completo líquido (PONTECORVO et alii, 1953, modificado)	44
3.2.5. Meio Batata-glicose-Agar (BDA).....	44
3.2.6. Meio Czapek-Difco	44
3.2.7. Meio Corn-Meal Difco	45
3.2.8. Meio Sabouraud-Oxoid	45
3.2.9. Meio YGT (GAMBINO et alii, 1984)	45
3.2.10. Meio YG (GAMBINO et alii, 1984)	45
3.2.11. Meio de Farelo de Trigo (YOOISHIOKA et alii, 1982).	46
3.2.12. Solução de Vitaminas	46
3.2.13. Solução de Ácido Nucleico de leveduras	46
3.2.14. Solução de Caseína hidrolizada	47
3.2.15. Suplementos adicionados ao meio mínimo	47
3.2.16. Solução Salina (0,85 % p/v)	47
3.2.17. Solução de "Tween-80" (0,1 ou 10 % v/v)	47
3.2.18. Meio mínimo com 2 % (v/v) de meio completo	48
3.2.19. Solução de albumina 5 % (v/v) (ROBINOW & CATEN) ..	48
3.2.20. Solução de glicerina 50 % (v/v)	48
3.2.21. Solução de Giemsa	48

3.2.22. Tampão Fosfato 0,125 M pH 7,0	48
3.2.23. Tampão Fosfato 0,2 M pH 5,8	49
3.2.24. Tampão Fosfato 0,02 M pH 5,6	49
3.2.25. Tampão Fosfato pH 7,0	49
3.2.26. Tampão Acetato pH 4,4	50
3.2.27. Tampão Citrato 0,05 M pH 4,8	50
3.2.28. Solução DES (DUARTE, 1971)	51
3.2.29. Solução de nitrito de sódio	51
3.2.30. Estabilizadores Osmóticos	51
3.2.30.1. KCl 1,6 M	51
3.2.30.2. Outras soluções de KCl	51
3.2.30.3. MgSO ₄ 1,0 M	51
3.2.30.4. MgSO ₄ 0,5 M	52
3.2.30.5. Sorbitol 2,4 M	52
3.2.30.6. Sorbitol 1,2 M	52
3.2.31. Solução de Salicina 1 % p/v	52
3.2.32. Reagentes para a dosagem de proteínas (LOWRY et alii, 1959)	52
3.2.32.1. Reativo de Folin-Ciocalteu	52
3.2.32.2. Solução B	53
3.2.33. Reagente Ácido Dinitrosalicílico (DNS)	53
3.2.34. Reagentes usados para a eletroforese em gel de poliacrilamida	53
3.2.34.1. Estoque de acrilamida	53
3.2.34.2. Tampão do gel separador	53
3.2.34.3. Tampão do gel empilhador	54

3.2.34.4. Tampão do tanque	54
3.2.34.5. Tampão da amostra	54
3.2.34.6. Gel separador a 10 %	54
3.2.34.7. Gel empilhador a 4 %	55
3.2.34.8. Fixador PAGE	55
3.2.34.9. Corante para a caracterização de proteínas totais	55
3.2.34.10. Descorante	55
3.2.34.11. Substratos usados para a revelação de esterases	56
3.2.34.12. Corante para a caracterização de esterases	56
3.3. Sistema de filtro para técnica de enriquecimento	56
3.4. Uso de Palitos para transferência de colônias	56
3.5. Esterilização e incubação	56
3.6. Pré-inóculo	57
3.7. Verificação do crescimento em diferentes meios de cultivo	57
3.8. Verificação do número de núcleos por conídio	57
3.9. Verificação da estabilidade genética	58
3.10. Sobrevivência a mutagênicos	58
3.10.1. Sobrevivência à luz ultravioleta	58
3.10.2. Sobrevivência a radiação gama	59
3.10.3. Sobrevivência ao ácido nitroso	59
3.10.4. Sobrevivência ao DES	60
3.11. Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos ...	60
3.11.1. Mutantes auxotróficos e morfológicos obtidos	

com radiação gama	60
3.11.2. Enriquecimento de mutantes por filtração	62
3.11.3. Teste de reversão	62
3.12. Técnicas Genéticas	63
3.12.1. Obtenção de heterocários	63
3.12.2. Isolamento de colônias prototróficas	63
3.12.3. Haploidização de colônias prototróficas	63
3.13. Isolamento e regeneração de protoplastos	64
3.13.1. A partir da utilização do micélio (HAMLYN et alii, 1981 e BORGES, 1987)	64
3.13.2. A partir da utilização de tubos germinativos (GAMBINO et alii, 1984 e BORGES, 1987)	65
3.13.3. Coloração de protoplastos (BORGES, 1987)	66
3.13.4. Viabilidade de protoplastos	66
3.14. Determinação da Atividade celulolítica (YOSHIOKA et alii, 1982)	67
3.14.1. Determinação da atividade de Beta-Glucosidase (EC. 3.2.1.2.1.)	68
3.14.2. Determinação da atividade de Carboximetilcelulase (EC. 3.2.1.4.)	68
3.14.3. Determinação da atividade de Avicelase (EC. 3.2.1.91.)	69
3.14.4. Determinação da atividade do papel de filtro modificado ("Filter Paper Activity - FPA").....	69
3.15. Dosagem de proteínas (LOWRY et alii, 1959)	71
3.16. Técnicas Eletroforéticas (LAEMMLI, 1970 e	

PACCOLA-MEIRELLES, 1988)	71
3.16.1. Preparo da amostra para a eletroforese com revelação específica para esterases.....	71
3.16.2. Revelação da atividade de esterases em eletroforese	72
3.16.3. Preparo da amostra para eletroforese com revelação específica para celulasas	72
3.16.4. Revelação da atividade celulolítica em eletroforese (TEATHER & WOOD, 1982 e SHEIR-NEISS & MONTENECOURT, 1984)	73
3.16.5. Fixação e Coloração das Proteínas totais na eletroforese	73
3.17. Análise Estatística	73
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1. Verificação do crescimento em diferentes meios de cultivo	75
4.2. Verificação do número de núcleos por conídio	75
4.3. Verificação da estabilidade genética	79
4.4. Sobrevivência à mutagênicos	79
4.4.1. Sobrevivência à luz ultravioleta	80
4.4.2. Sobrevivência à radiação gama	80
4.4.3. Sobrevivência ao ácido nitroso	81
4.4.4. Sobrevivência ao DES	81
4.5. Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos	88
4.5.1. Mutantes auxotróficos e morfológicos obtidos com radiação gama através de isolamento total e enri-	

quecimento por filtração	88
4.5.2. Teste de reversão	89
4.6. Obtenção de diplóides	95
4.7. Isolamento e Regeneração de protoplastos	102
4.7.1. Viabilidade de protoplastos	110
4.8. Dosagem da atividade celulolítica	112
5. CONCLUSÕES	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
01 - Mecanismo de hidrólise enzimática da celulose proposto por REESE et alii (1950)	13
02 - Representação gráfica do modelo atual proposto para a hidrólise da celulose (Adaptado a partir de COUGHLAN, 1985a)	15
03 - Genealogia parcial de mutantes celulolíticos de T.reesei QM 6a (Adaptado a partir de MONTENECOURT et alii, 1979)	24
04 - Curvas-padrão	70
05 - Coloração de conídios de A.niger	78
06 - Curva de sobrevivência de conídios de A.niger a mutagênicos físicos	86
07 - Curva de sobrevivência de conídios de A.niger a mutagênicos químicos	87
08 - Mutantes morfológicos de A.niger	91
09 - Heterocários de A.niger obtidos através do cruzamento dos mutantes RGIT-127 x RGIT-171 e RGIT-112 x RGIT-171	96
10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida, com revelação específica para esterases, do cruzamento RGIT-206 x x RGIT-217	101
11 - Protoplastos de A.niger obtidos a partir do uso de micélio	107

Figura	Página
12 - Protoplastos de <i>A.niger</i> obtidos a partir do uso de tubos germinativos	108
13 - Viabilidade de protoplastos de <i>A.niger</i> em diferentes condições de armazenamento	111
14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida, com revelação específica para proteínas totais, dos sobrenadantes enzimáticos de <i>A.niger</i> e <i>T.reesei</i>	120
15 - Gel de agarose mais 1 % de carboximetilcelulose, demonstrando a atividade celulolítica de <i>A.niger</i> e <i>T.reesei</i> QM 9414	121

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
01 - Relação de microorganismos produtores de celulase de uso comercial potencial ou estabelecido (Adaptado a partir de COUGHLAN, 1985b).....	08
02 - Hidrólise de diferentes substratos por enzimas celulolíticas (Adaptado a partir de ENARI, 1983) ...	10
03 - Controles Genéticos e Bioquímicos que atuam na síntese e na atividade de celulases (Adaptado a partir de GHOSE & GHOSH, 1981)	16
04 - Métodos para a determinação da atividade celulolítica (Modificado a partir de COUGHLAN, 1985a)	20
05 - Métodos de seleção de mutantes regulatórios de <i>T.reesei</i> (Modificado a partir de NEVALAINEN, 1985)	23
06 - Crescimento de <i>A.niger</i> em diferentes meios de cultura	76
07 - Análise de variância do crescimento de <i>A.niger</i> em diferentes meios de cultura	77
08 - Percentagem de conídios de <i>A.niger</i> sobreviventes à radiação gama	82
09 - Percentagem de conídios de <i>A.niger</i> sobreviventes à luz ultravioleta	83
10 - Percentagem de conídios de <i>A.niger</i> sobreviventes ao ácido nítrico	84

Tabela

Página

11 - Percentagem de conídios de <i>A.niger</i> sobreviventes ao DES	85
12 - Mutantes morfológicos de <i>A.niger</i> obtidos através de irradiação com raios gama	90
13 - Mutantes auxotróficos simples de <i>A.niger</i> obtidos através de irradiação com raios gama	92
14 - Mutantes auxotróficos duplos de <i>A.niger</i> obtidos através de irradiação com raios gama	93
15 - Teste de reversão de mutantes de <i>A.niger</i>	94
16 - Cruzamentos realizados entre diferentes mutantes de <i>A.niger</i>	97
17 - Isolamento e regeneração de protoplastos de <i>A.niger</i> obtidos a partir da protoplastização do micélio (HAMLYN et alii, 1981)	103
18 - Isolamento e regeneração de protoplastos de <i>A.niger</i> obtidos a partir da protoplastização de tubos germinativos (GAMBINO et alii, 1984)	103
19 - Dosagem da atividade celulolítica específica de <i>A.niger</i>	113
20 - Dosagem da atividade celulolítica específica de <i>T.reesei</i> QM 9414	113
21 - Comparação da atividade celulolítica específica de <i>A.niger</i> e <i>T.reesei</i> QM 9414	114
22 - Análise de variância da comparação da atividade celulolítica específica de <i>A.niger</i> e <i>T.reesei</i>	114

Tabela

Página

23 - Dosagem da atividade celulolítica por mililitro de A.niger	115
24 - Dosagem da atividade celulolítica por mililitro de T.reesei QM 9414	115
25 - Comparação da atividade celulolítica por mililitro de A.niger e T.reesei QM 9414	116
26 - Análise de variância da comparação da atividade celulolítica por mililitro de A.niger e T.reesei	116
27 - Dosagem da concentração de proteínas por mililitro em A.niger e T.reesei QM 9414	117
28 - Análise de variância da dosagem da concentração de proteínas por mililitro	117

ESTUDOS GENÉTICOS E PRODUÇÃO DE CELULASE

EM *Aspergillus niger*

Autor: Gustavo Henrique Goldman

Orientador: Prof.Dr. João Lúcio de Azevedo

RESUMO

Neste trabalho foram realizados estudos genéticos e verificada a produção de celulase na linhagem industrial, produtora de amilase, de *Aspergillus niger* NRRL-337, com os seguintes objetivos : isolamento de mutantes auxotróficos e morfológicos nesta linhagem; verificação da ocorrência do ciclo parassexual; definição de um protocolo eficiente para o isolamento e a regeneração de protoplastos, e, determinação da atividade celulolítica em comparação com o mutante hipercelulolítico *Trichoderma reesei* QM 9414. Todos os objetivos acima enumerados visaram fornecer subsídios para posteriores estudos da genética básica, bem como para o estabelecimento de um programa de melhoramento genético nesta linhagem.

Foram feitas curvas de sobrevivência dos conídios de *A.niger* para a radiação gama, a luz ultravioleta, o ácido nitroso e o dietilsulfato. Através da irradiação com raios gama foram obtidos sete mutantes morfológicos, onze auxotróficos simples e quinze auxotróficos com dupla deficiência. O rendimento obtido no isolamento total de mutantes auxotróficos foi de 0,52 %, enquanto que no enriquecimento por filtração foi de 2,0 a 4,8 vezes maior.

A partir do teste de reversão realizado, verificou-se que os mutantes auxotróficos obtidos demonstraram uma alta estabilidade genética.

Com as marcas auxotróficas e morfológicas isoladas, foram feitas tentativas de cruzamento. Obtiveram-se películas heterocarióticas em todos os cruzamentos realizados. Através de diversas metodologias (medição do tamanho de conídios, crescimento em benlate e eletroforese em gel de poliacrilamida com revelação específica para esterases), não foi possível a definição da ocorrência de diplóides.

O protocolo mais eficiente para o isolamento de protoplastos foi obtido a partir da protoplastização do micélio, usando como estabilizador osmótico KCl 0,6 M. Em relação a regeneração, a melhor percentagem foi obtida a partir da protoplastização de tubos germinativos, usando no isolamento como estabilizador osmótico MgSO_4 0,5 M e na regeneração MgSO_4 0,5 M e Sorbitol 1,2 M. Com o uso de micélio, o número de núcleos por protoplasto não foi superior a dez (com o estabilizador osmótico KCl) ou foi próximo ou superior a dez (com o estabilizador osmótico MgSO_4). Os protoplastos isolados a partir do micélio com KCl 0,6 M e armazenados com este mesmo estabilizador a 4°C , apresentaram uma viabilidade de 60 % após 6 dias de armazenamento.

A.niger apresentou atividades de beta-glicosidase, carboximetilcelulase, avicelase e papel de filtro modificado similares a da linhagem *T.reesei* QM 9414. A partir de uma eletroforese em gel de poliacrilamida, com revelação específica

para celulasas, constatou-se que a abundância relativa da celulase produzida pela primeira espécie era similar a do mutante celulolítico.

GENETIC STUDIES AND CELLULASE PRODUCTION

BY *Aspergillus niger*

Author: Gustavo Henrique Goldman

Adviser: Dr. Joao Lucio de Azevedo

SUMMARY

In the present study, the amylase-producing industrial strain of *Aspergillus niger* NRRL-337 was studied genetically and for cellulase production with the following objectives: isolation of auxotrophic and morphological mutants of this strain; determination of the occurrence of the parasexual cycle; definition of an efficient protocol for the isolation and regeneration of protoplasts, and determination of cellulolytic activity in comparison with the hypercellulolytic mutant *Trichoderma reesei* QM 9414. By fulfilling the above objectives we intended to contribute to the study of basic genetics and to the establishment of a genetic improvement program for this strain.

Survival curves were obtained for *A.niger* conidia exposed to gamma radiation, UV light, nitrous acid, and diethylsulfate. Seven morphological mutants, eleven simple auxotrophic mutants and fifteen double-deficient auxotrophs were obtained by gamma irradiation. The yield of total isolation of auxotrophic mutants was 0.52 %, while the yield obtained by enrichment through filtration was 2.0 to 4.8 times higher. A

reversion test showed that the auxotrophic mutants obtained had high genetic stability.

Crosses were attempted with the auxotrophic and morphological markers isolated. Heterokaryotic mats were obtained in all crosses performed. Several methods used (measurement of conidial size, growth on benlate and polyacrilamide gel electrophoresis specific for esterases) did not permit the definition of the occurrence of diploids.

The most efficient protocol for protoplast isolation was obtained from protoplastization of mycelium using 0.6 M KCl as osmotic stabilizer. The best percentage of regeneration was obtained from protoplastization of germinative tubes, using 0.5 M MgSO_4 as stabilizer in the isolation, and 0.5 M MgSO_4 or 1.2 M Sorbitol in the regeneration. When mycelium was used, the number of nuclei per protoplast did not exceed ten (with the osmotic stabilizer KCl) or was close to or higher than ten (with the osmotic stabilizer MgSO_4). Protoplasts isolated from mycelium with 0.6 M KCl and stored at 4°C with the same stabilizer showed 60 % viability after 6 days of storage.

A.niger showed beta-glucosidase, carboxymethylcellulase, avicelase, and modification of filter paper assay similar to those of the strain *T.reesei* QM 9414. Polyacrilamide gel electrophoresis specific for cellulases showed that the relative abundance of cellulase produced by this species was similar to that of the cellulolytic mutant.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial tem ocasionado uma forte demanda na utilização dos recursos naturais do globo terrestre. Esta demanda tem se manifestado não só na maior necessidade de fontes alimentícias, como também, na maior valorização das fontes de energia existentes. Até o final do século XX, esta situação poderá se tornar ainda mais crítica, já que é esperada uma população mundial em torno de 6,8 bilhões de pessoas. Nesse sentido, a pesquisa científica deverá ser incrementada no tocante ao aumento da produtividade agropecuária e da elaboração de produtos alternativos, como por exemplo, o desenvolvimento de proteínas de unicelulares. Por outro lado, é bem conhecido que as fontes de gás natural e petróleo estão rapidamente se extinguindo. Logo, existe também a necessidade da busca de novas fontes de energia renovável. Nesse quadro, a contribuição potencial que poderá ser fornecida pela biomassa nos próximos decênios, surge como uma promessa significativa.

A biomassa tem sido definida como tudo que cresce, isto é, toda matéria orgânica com exceção dos combustíveis fósseis (STOUT, 1982). Alguns autores (BASSHAM, 1975 e STEPHENS & HEICHEL, 1975) estimam que a biomassa total existente na superfície terrestre esteja em torno de $1,8 \times 10^{12}$ toneladas e que $1,0 \times 10^{11}$ toneladas deste total sejam fornecidas cada ano como um resultado da fotossíntese. A celulose, o recurso orgânico

mais abundante existente na natureza, perfaz 40 % do total desta biomassa, ou seja, $7,2 \times 10^{11}$ toneladas, acarretando assim uma produtividade anual na síntese desse polímero biológico de $4,0 \times 10^{10}$ toneladas. Esta produtividade em termos do número de seres humanos existentes atualmente no mundo, ou ainda em termos energéticos, varia em torno de 70 kg de celulose por pessoa por dia ou $5,0 \times 10^4$ barris de petróleo por segundo (LUTZEN et alii, 1983). Na realidade, a biomassa terrestre armazenada tem uma energia total equivalente a aproximadamente 640 bilhões de toneladas de petróleo, isto é, igual ao total das reservas de combustíveis fósseis existentes (COUGHLAN, 1985a). Dentro desse contexto, a biomassa na forma de celulose, hemicelulose e lignina representa uma forma de se coletar e armazenar a energia solar e portanto um importante recurso material e energético.

A biomassa existente na forma de resíduos e lixo agrícolas, urbanos e industriais, que se acumula todo ano em grandes quantidades, resulta numa deterioração ambiental e numa perda de valiosos recursos energéticos. Nos Estados Unidos tem se avaliado que aproximadamente um bilhão de toneladas de resíduos sólidos são produzidos por ano (HUMPHREY et alii, 1977). Calcula-se que estes resíduos e lixo são compostos de 40 a 60 % de celulose, 15 a 30 % de hemicelulose e 10 a 30 % de lignina. Assim, seriam produzidos só nos Estados Unidos aproximadamente de 400 a 600 milhões de toneladas de resíduos celulósicos por ano. De acordo com estudos recentes, 2300 milhões de toneladas de resíduos domésticos, urbanos, industriais e agrícolas são produzidos todo ano na Comunidade Econômica Européia. Em relação

a produção de resíduos no mundo, estima-se que exceda dois bilhões de toneladas por ano (HUMPHREY et alii, 1977 e COUGHLAN, 1985a).

A utilização de resíduos celulósicos torna-se possível através da sua hidrólise por via ácida ou enzimática. São inúmeras as desvantagens do processo de hidrólise por via ácida: requisito adicional de calor; formação de subprodutos, tais como o furfural e a necessidade de um equipamento a prova de corrosão (GHOSE & GHOSH, 1979). Todas essas características proporcionam uma excelente oportunidade para o desenvolvimento de um processo de hidrólise por via enzimática. As aplicações econômicas potenciais da degradação enzimática da celulose são muitas. Entre elas, pode-se mencionar a produção de glicose, açúcares solúveis, etanol, xilose etc. Contudo nenhum processo significativo utilizando celulasas foi até agora desenvolvido por causa do alto custo da enzima no custo total do processo. Algumas análises econômicas (WILKE et alii, 1978; BRANDT, 1975 e GHOSE & GHOSH, 1979) calculam que este custo estaria em torno de 60 %. Isto ocorreria basicamente por dois motivos: a baixa produtividade das linhagens produtoras do complexo enzimático e a baixa especificidade da celulase por seu substrato, a celulose.

Para superar estes problemas, programas de melhoramento genético foram desenvolvidos, visando a seleção de microrganismos hipercelulolíticos, fundamentalmente fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma*. Estes programas de melhoramento têm utilizado técnicas de mutagênese, tais como a irradiação com luz ultravioleta, radiação gama, tratamento com nitrosoguanidina

etc. Como exemplo, com o desenvolvimento de mutantes microbianos já foi possível o aumento da atividade celulolítica 16 vezes em relação a atividade da linhagem parental de *Trichoderma reesei* QM 6a (GHOSE & GHOSH, 1979).

Segundo LUTZEN et alii (1983), o sistema celulolítico de *T.reesei* não é único, sendo que complexos celulolíticos mais eficientes podem ser produzidos a partir de diferentes espécies de *Aspergillus*. Por outro lado, tradicionalmente, diversas espécies de *Aspergillus* vêm sendo utilizadas como linhagens produtoras para fins industriais. Os produtos incluem enzimas - tais como amilases, pectinases e glicose oxidases -, ácidos orgânicos, antibióticos etc (BALL, 1984). Em adição, na indústria de alimentos as celulases de *Trichoderma* spp apresentam desvantagens devido a produção de micotoxinas por estas espécies. Em contraste, *Aspergillus niger* não é patogênico e a sua utilização é vista como segura.

Considerando estes fatos, os objetivos desse trabalho foram: a) a obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos em *Aspergillus niger* NRRL-337 - uma linhagem industrial produtora de amilase (HESSELTINE, 1986) ; b) a verificação da ocorrência do ciclo parassexual nesta linhagem; c) a definição de um protocolo eficiente para o isolamento e a regeneração de protoplastos e d) a determinação da atividade celulolítica em comparação com

-----

HESSELTINE, C.W., 1986. Correspondência pessoal.

Trichoderma reesei QM 9414. Todos os objetivos acima enumerados visam fornecer subsídios para posteriores estudos da genética básica, bem como, para o estabelecimento de um programa de melhoramento genético nesta linhagem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Celulases de fungos: Mecanismo e Modo de ação

2.1.1. Enzimas Celulolíticas

A celulose é o maior constituinte orgânico existente na natureza. Esta, é uma macromolécula biológica composta por subunidades de glicose unidas linearmente a partir de ligações beta-1,4, podendo alcançar uma extensão de 10000 subunidades com peso molecular de 1,5 milhões. Embora aparentemente apresente uma estrutura química simples, esta pode alcançar tal complexidade que partes da molécula são cristalinas. Na natureza, a celulose está organizada em fibrilas, que consistem de diversas moléculas de celulose arranjadas de forma paralela e ligadas por pontes de hidrogênio. Estas fibrilas estão envolvidas principalmente por lignina e hemicelulose.

A capacidade de utilizar a celulose como uma fonte de carbono e energia é encontrada entre eubactérias, mixobactérias, actinomicetos e fungos (COUGHLAN, 1985a). O sistema de enzimas celulolíticas de distintos microrganismos é frequentemente diferente, observando-se que alguns organismos são capazes de consumir a celulose nativa, enquanto outros não possuem esta capacidade. Em adição, muitos microrganismos que não são capazes de crescer em celulose nativa, produzem enzimas celulolíticas. Nestes microrganismos falta algum passo essencial para a

hidrólise da celulose nativa, contudo eles podem utilizar parcialmente a celulose degradada para seu crescimento. Tais organismos podem também, apesar de sua deficiência, ser interessantes para a produção industrial de enzimas celulolíticas específicas (ENARI, 1983). A Tabela 1 mostra uma relação de microorganismos produtores de celulase de uso comercial estabelecido ou potencial. Em bactérias, estas enzimas são frequentemente produzidas em pequenas quantidades (menor que $0,1 \text{ g.l}^{-1}$) ou, como no caso de *Clostridium thermocellum*, formam-se complexos multienzimáticos ligados (celulossoma), os quais são difíceis de romper sem a perda dos componentes individuais (KNOWLES, 1987). Já as celulases fúngicas são disponíveis em grandes quantidades (maior que 20 g.l^{-1}) e não parecem formar complexos físicos umas com as outras, contudo atuam em forte sinergismo, com será visto mais adiante.

A hidrólise enzimática da celulose cristalina é um processo complexo que requer a participação de diversas enzimas. As enzimas fúngicas, isto é, as enzimas celulolíticas formadas por *Trichoderma*, *Phanerochaete* (*Sporotrichum*) e *Fusarium* têm sido as mais bem estudadas. Embora existam diferenças nas propriedades das enzimas de diferentes fungos, as principais características de degradação da celulose são as mesmas. Algumas bactérias também produzem celulases, mas o mecanismo de hidrólise parece ser diferente daquele encontrado entre os fungos (ENARI, 1983). Existem três principais grupos de atividade celulolítica produzida por fungos (GHOSE & GHOSH, 1981; ERIKSSON, 1982; ENARI, 1983; COUGHLAN, 1985a e COUGHLAN, 1985b):

Tabela 1 - Relação de microorganismos produtores de celulase de uso comercial estabelecido ou potencial (Adaptado a partir de COUGHLAN, 1985b)

Grupo	Organismo	Grupo	Organismo
Bactérias	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> <i>Bacteroides cellulosolvens</i> <i>Bacteroides succinogenes</i> <i>Cellulomonas</i> spp <i>Cellvibrio fulvus</i> <i>Cellvibrio gilvus</i> <i>Cellvibrio vulgaris</i> <i>Clostridium thermocellulaseum</i> <i>Clostridium thermocellum</i> <i>Clostridium thermosporospora</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Ruminococcus albus</i>	Fungos (cont.)	<i>Myceliophthora thermophila</i> <i>Pellicularia filamentosa</i> <i>Penicillium citrinum</i> <i>Penicillium funiculosus</i> <i>Penicillium irensis</i> <i>Penicillium janthinellum</i> <i>Penicillium variabile</i> <i>Pestalotiopsis westerdijkii</i> <i>Polyporus adustus</i> <i>Polyporus tulipiferae</i> <i>(Irrex lacteus)</i> <i>Polyporus versicolor</i> <i>Poria</i> spp <i>Sporotrichum cellulophilum</i> <i>Sporotrichum dimorphosporum</i> <i>Sporotrichum pulverulentum</i> <i>(Crysosporium lignorum)</i> <i>Sporotrichum pruinosum</i> <i>Sporotrichum thermophile</i> <i>Talaromyces emersoni</i> <i>Thermoascus aurantiacus</i> <i>Thielavia terrestris</i> <i>Tranetes sanguinea</i> <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma koningii</i> <i>Trichoderma lignorum</i> <i>Trichoderma longibrachiatum</i> <i>Trichoderma pseudo-koningii</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Trichosporon cutaneum</i> <i>Trichosporon pullulans</i>
Actinomicetos	<i>Streptomyces griseus</i> <i>Thermoactinomyces</i> spp <i>Thermosporospora curvata</i> <i>Thermosporospora fusca</i>		
Fungos	<i>Agaricus bisporus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Botryodiplodia theobromae</i> <i>Chaetomium thermophilum</i> <i>Eupenicillium javanicum</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Hemicelia insolens</i> <i>Macrophoma phaseolina</i> <i>Myrothecium verrucaria</i>		

a. Endoglucanase (1,4-beta-D-glucano 4 - glucanohidrolase, EC 3.2.1.4) - hidrolisa ao acaso ligações glicosídicas beta-1,4. Ela não ataca celobiose mas hidrolisa celodextrinas, celulose ácida e celulosas substituídas como CMC (carboximetilcelulose) e HEC (hidroxietilcelulose). Algumas endoglucanases atuam na celulose cristalina. A especificidade desta enzima não deve ser muito alta já que ela prontamente ataca celulosas altamente substituídas.

b. Celobiohidrolase (1,4-beta-D-glucano celobiohidrolase, EC 3.2.1.91) - atua sobre a celulose, liberando unidades de celobiose do fim não-reduzido da cadeia. Esta enzima não ataca celulosas substituídas, o que reflete um maior grau de especificidade em relação ao substrato comparado com as endoglucanases. A celobiohidrolase hidrolisa celodextrinas mas não celobiose.

c. Beta-Glicosidase (Beta-D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) - hidrolisa celobiose e celo-oligossacarídeos para glicose. Esta enzima não ataca celulose ou celodextrinas de maior grau.

A Tabela 2 apresenta de forma resumida os substratos que são usados pelas diferentes enzimas celulolíticas.

Em adição a estas enzimas, uma atividade menor, a de glucano glicohidrolase (1,4-beta-D-glucano glicohidrolase, EC 3.2.1.74), tem sido relatada (ENARI, 1983). A enzima remove unidades de glicose do fim não-reduzido da cadeia. Ela ataca celulose ácida, celo-oligossacarídeos e carboximetilcelulose.

Tabela 2 - Hidrólise de diferentes substratos por enzimas celulolíticas (Adaptado a partir de ENARI, 1983)

Tipo de enzima	substratos				
	celulose cristalina	CMC *	celulose amorfa	celotetraose	celobiose
Endoglucanase	-	+	+	+	-
Celobiohidrolase	+	-	+	+	-
Beta-glicosidase	-	-	-	+	+

* CMC=Carboximetilcelulose

2.1.2. Propriedades de enzimas celulolíticas

Os estudos de purificação e fracionamento têm revelado que os três principais tipos de enzimas celulolíticas ocorrem em formas múltiplas (ENARI, 1983). O número de enzimas diferentes varia de organismo para organismo. Geralmente, o sistema de enzimas celulolíticas de fungos compreende de 4 a 8 endoglucanases, 1 a 3 celobiohidrolases e 1 a 3 beta-glicosidases diferentes (ENARI, 1983 e TEERI, 1987). A natureza e a origem desses isocomponentes têm sido objeto de muita discussão (ENARI, 1983; COUGHLAN, 1985a; COUGHLAN, 1985b; NEVALAINEN, 1985; TEERI, 1987 e PENTILLA, 1987). Esta discussão se refere as possibilidades de que a multiplicidade de componentes possa ser geneticamente determinada, ou ser causada por proteólise parcial, ou ainda, por glicosilação de uma cadeia polipeptídica comum.

Segundo COUGHLAN (1985a), todas as possibilidades parecem ocorrer.

Em *Scizophyllum commune*, as duas endoglucanases, EG1 e EG2, são diferentes somente na sequência do aminoácido N-terminal, possivelmente como resultado de processamento proteolítico (PAICE et alii, 1984). A modificação pós-secrecional de celulasas de *Trichoderma reesei* foi observada em alguns casos (NAKAYAMA et alii, 1976 e NIKU-PAARVOLA et alii, 1985), enquanto que também têm aparecido relatos de ausência de sinais de processamento proteolítico em cultivos prolongados (KAMMEL & KUBIECK, 1985). Dados de composição de aminoácidos e sequência primária confirmam a presença de diversas estruturas primárias ímpares, mas também são apresentadas notáveis similaridades entre algumas das endoglucanases (GRITZALI & BROWN, 1979 e TEERI, 1987). Não pode assim ser excluída a possibilidade de processamento proteolítico de celulasas no meio de cultura.

A maioria dos componentes enzimáticos são glicoproteínas que possuem um teor de carboidratos entre 1 e 10 % (ENARI, 1983). A glicosilação diferencial tem frequentemente sido proposta para explicar a heterogeneidade observada entre as celulasas (TEERI, 1987). Contudo, os glucanos usualmente não possuem carga elétrica e frequentemente são muito pequenos, levando-se em consideração as diferenças observadas no ponto isoelétrico e no peso molecular (KAMMEL & KUBIECK, 1985 e TEERI, 1987). Ainda uma outra explicação para o grande número de diferentes enzimas celulolíticas pode ser encontrada nas condições de crescimento usadas. Os indutores usados na produção de celulasas são

geralmente misturas de muitos carboidratos diferentes, assim como, de outros compostos. Desta forma, além das celulasas, outras hidrolases glicosídicas, tais como hemicelulasas, são também induzidas. É provável que algumas das enzimas tidas como celulasas sejam na realidade hemicelulasas; como exemplo, a alta atividade xilanolítica da endoglucanase I de *Trichoderma reesei* (SHOEMAKER et alii, 1983 e NIKU-PAAVOLA et alii, 1985). Por causa da sobreposição de atividades é difícil separar as celulasas verdadeiras e as hemicelulasas, o que pode dar a aparência de um maior número de componentes do que é na realidade necessário, como requisito mínimo, para a completa hidrólise da celulose pura (TEERI, 1987).

Segundo ENARI (1983), alguns autores distinguem entre dois tipos de beta-glicosidase: a celobiase verdadeira e a aril-beta-glicosidase. Quando as enzimas que participam na hidrólise da celulose são purificadas e caracterizadas, não existe evidência da atividade de duas diferentes beta-glicosidasas.

2.1.3. Modo de ação de celulasas

Durante muitos anos a hipótese de REESE et alii (1950) dominou o conhecimento do mecanismo de hidrólise enzimática da celulose. Segundo essa hipótese, inicialmente haveria uma sequência de ativação seguida pela sequência de reação hidrolítica (Figura 1). A ativação seria causada por um fator não-hidrolítico chamado C_1 e a hidrólise da celulose ativada efetuada por enzimas hidrolíticas chamadas C_x .

Figura 1 - Mecanismo de hidrólise enzimática da celulose proposto por REESE et alii (1950).

De acordo com esta hipótese, os microorganismos capazes de crescer em celulose cristalina, formariam enzimas C₁, enquanto que, microorganismos que degradassem somente celulose ácida ou celulosas substituídas, tais como CMC, não possuiriam esta enzima e somente produziriam enzimas C_x. A existência desse fator não-hidrolítico não tem sido confirmada. Contudo, o componente C₁ do filtrado de culturas de *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum*, *Cryosporium lignorum*, *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* e *Trichoderma reesei* foi isolado e demonstrado como sendo celobiohidrolase (COUGHLAN, 1985a). Entretanto, a existência de um componente não-hidrolítico essencial continua sendo discutida por alguns pesquisadores. Assim, HALLIWELL & RIAZ (1970) e HALLIWELL (1975) argumentam que um componente do sistema celololítico de *Trichoderma koningii* era requerido para a formação de fibras curtas a partir de algodão. Este componente parece ser independente das atividades de endoglucanase ou celobiohidrolase; no entanto, somente com ele é efetuada pouca solubilização. HALLIWELL (1965) sugeriu que a formação de fibras curtas era o estágio inicial no ataque de substratos recalcitrantes. GRIFFIN et alii (1984) isolaram, de preparações

comerciais de celulase de *Trichoderma reesei*, um fator que gera microfibrilas ou fibras curtas a partir de papel de filtro, sem causar a liberação de açúcares solúveis.

O conceito atual é de que três enzimas estão envolvidas: celobiohidrolase, endoglucanase e beta-glicosidase. Existe um sinergismo na ação hidrolítica entre a celobiohidrolase e a endoglucanase. Este sinergismo é alto com substratos altamente ordenados, mas baixo com substratos amorfos, tais como celulose ácida, e ausente com celulosas substituídas (ENARI, 1983). A Figura 2 mostra a representação gráfica do modelo atual proposto para a hidrólise enzimática da celulose. De acordo com este modelo, a endoglucanase atua sobre as regiões amorfas das fibras de celulose, assim abrindo novas extremidades de cadeia para o ataque da celobiohidrolase, a qual remove unidades de celobiose das extremidades não-reduzidas da cadeia. Desta forma, o sinergismo entre as duas enzimas resultaria do fato de que o novo substrato (extremidades de cadeias livres) para a celobiohidrolase é formado pela ação da endoglucanase. A beta-glicosidase posteriormente aumenta a hidrólise total através da remoção da celobiose, um produto final inibitório da endoglucanase e da celobiohidrolase (ENARI, 1983; WOOD, 1985; COUGHLAN, 1985a e 1985b e MARSDEN & GRAY, 1986).

Como já foi acima mencionado, o mecanismo de iniciação da degradação da celulose não foi ainda completamente esclarecido. É possível que um passo não-hidrolítico esteja envolvido na primeira reação, criando assim um substrato susceptível para a hidrólise.

Figura 2 - Representação gráfica do modelo atual proposto para a hidrólise enzimática da celulose (Adaptado a partir de COUGHLAN, 1985a).

2.1.4. Indução e Repressão

Por motivos de ordem econômica do metabolismo celular, cada enzima do complexo celulolítico está sujeita a controles genéticos e bioquímicos, respectivamente na sua síntese e atividade. Todas as três enzimas do complexo são induzíveis, sofrem repressão catabólica e inibição pelo produto final, como mostrado na Tabela 3 (BISARIA & GHOSE, 1981 e HANNELE-MERIVUORI et alii, 1985).

Tabela 3 - Controles genéticos e bioquímicos que atuam na síntese e na atividade de celulases (Adaptado a partir de BISARIA & GHOSE, 1981).

Enzima	inibição pelo produto final	repressão catabólica	indutor
celobiohidrolase	celobiose	glicose ou	celulose lactose
endoglucanase	ou	metabólitos	soforose
beta-glicosidase	glicose	da glicose	celobiose

Em todos os microrganismos estudados até hoje, a síntese de celulase é induzida pela presença de celulose e reprimida pela presença de glicose ou outros açúcares prontamente metabolizáveis existentes no meio de cultura (COUGHLAN, 1985b). Embora a natureza do real indutor não tenha ainda sido determinada, celulose, celobiose, soforose e lactose são todos bons indutores (Tabela 3). Desde que a celulose é insolúvel, o verdadeiro

indutor deve ser algum composto derivado da celulose.

O ponto de vista mais aceito em relação ao processo de indução, mas que ainda não foi ensaiado experimentalmente, é de que o organismo em questão produz uma quantidade baixa de celulase basal ou constitutiva. Esta, efetua alguma degradação da celulose, fazendo com que produtos solúveis, incluindo a celobiose, sejam absorvidos pela célula, onde são convertidos (talvez por beta-glicosidase) para o real indutor da síntese enzimática (GONG & TSAO, 1979). Sabe-se que a celobiose induz a síntese de celulase em *T.reesei* (MANDELS & REESE, 1958) e em *Sporotrichum pulverulentum* (ERIKSSON & HAMP, 1978). Contudo, ela é eficaz somente em altas concentrações. A lactose também é um bom indutor em algumas espécies, incluindo *T.reesei*, mas novamente somente em altas concentrações (GONG et alii, 1979). Por outro lado, a soforose (2-O-beta-glicopiranosil-D-glicose), em baixas concentrações, é um poderoso indutor da síntese de endoglucanase e celobiohidrolase em *T.reesei* (MANDELS et alii, 1982 e STERNBERG & MANDELS, 1979) e em *S.pulverulentum* (ERIKSSON & HAMP, 1978).

Além da atividade hidrolítica, as beta-glicosidases, em determinadas condições, catalizam transferências glicosídicas. Neste caso, a soforose poderia ser produzida por beta-glicosidase constitutiva dentro da célula, ou seja, através de uma transferência de um grupo glicosílico para a celobiose e a subsequente clivagem da ligação beta-1,4 (COUGHLAN, 1985b). Contudo, podem ser feitas as seguintes observações quanto a hipótese da soforose como o real indutor: a) o conjunto de

enzimas induzidas pelo dissacarídeo não é tão completo como aquele sintetizado na presença de celulose (STERNBERG & MANDELS, 1979); b) nem todas as espécies de *Trichoderma* respondem a soforose (MANDELS et alii, 1962); c) *Phanerochaete* sp não responde a indução por soforose (ERIKSSON & HAMP, 1978) e d) a soforose não atua como indutor nas bactérias *Acetivibrio cellulolyticus* e *Cellulomonas uda* (COUGHLAN, 1985a).

Em células procarióticas o mecanismo de repressão catabólica é bem conhecido. Em contraste, o mecanismo pelo qual a transcrição de genes de fungos é regulada não é completamente conhecido e deve ser mais complexo que o de células bacterianas (COUGHLAN, 1985a). Não existe concordância se o AMP cíclico está envolvido no controle da biossíntese da celulase. SUZUKI¹, citado por COUGHLAN (1985a), sugere que este não é o caso em *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*. MONTENECOURT et alii (1981) observam que o AMP cíclico também não participa na regulação da produção de celulase por *T.reesei*. GOKSOYR & ERIKSEN (1980) mencionam a possibilidade de que ATP antes que AMP cíclico seja em alguns casos a molécula reguladora. Por outro lado, FENNINGTON et alii (1984) observam que o AMP cíclico está envolvido na regulação da síntese da celulase.

---

¹ SUZUKI, H. Cellulase formation in *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*. In: Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. Editado por M.Bailey, T.M.Enari e M.Linko. SITRA, Helsinki, pags.115-169, 1975.

2.1.5. Métodos de ensaio das atividades celulolíticas

A Tabela 4 apresenta alguns dos métodos utilizados para a determinação das atividades celulolíticas. Estas determinações são complicadas tanto pela natureza das enzimas como da dos seus substratos. Todas as enzimas celulolíticas atacam as mesmas ligações glicosídicas beta-1,4 , sendo distintas somente na especificidade das estruturas que cercam a ligação (Tabela 2). Essas diferenças em especificidade não são absolutas, mas sim diferenças quantitativas na hidrólise de ligações em substratos distintos. Assim, pode ser difícil diferenciar entre as atividades de grupos diferentes de enzimas celulolíticas. Entretanto, diferenças na especificidade também existem dentro dos vários grupos de celulasas. A situação é ainda mais complicada pelo fato de que as atividades são usualmente determinadas em soluções contendo misturas de várias enzimas celulolíticas. Desde que as enzimas hidrolizam não somente os mesmos substratos, mas também atuam sinergisticamente, a atividade medida é grandemente influenciada pelas proporções em que as enzimas estão presentes (ENARI, 1983).

2.2. Melhoramento Genético de Microrganismos celulolíticos

2.2.1. *Trichoderma* spp

A participação das enzimas celulolíticas no custo total de um processo que utilize a celulose como matéria-prima está em torno de 60 % (WILKE et alii, 1976; BRANDT, 1975 e GHOSE & GHOSH, 1979). O principal objetivo de um programa de melhoramento genético que vise a produção de fungos hipercelulolíticos é a

Tabela 4 - Métodos para a determinação da atividade celulolítica

(Modificado a partir de COUGHLAN, 1985a).

Enzima ou sistema testado	Substrato usado	Produto ou propriedade medida
Celulase completa	Algodão	Liberação de açúcares redutores
	Avicel	Perda de peso
	Papel de filtro	Decréscimo na turbidez da solução
	"Solka floc"	Decréscimo na tensão das fibras
	Celulose com corante	Liberação do corante
	Celulose-ágar	Clarificação do ágar
Endoglucanase	CMCelulose	Liberação de açúcares redutores
	HEcelulose	Decréscimo na viscosidade
	Celso-oligos-sacarídeos e CMCelulose	Clarificação do ágar
Exocelobiohidrolase	Celulose amorfa	Açúcares redutores
	Celso-oligos-sacarídeos	Celobiose
	p-nitrofenil-beta-D-celobiosídeo	p-nitrofenol
Beta-glucosidase	Celobiose	Glucose
	Salicina	Saligenina
	p-nitrofenil-beta-D-celobio.	p-nitrofenol

redução desse alto custo. Os mutantes hipercelulolíticos, obtidos através de técnicas mutagênicas, vêm sendo produzidos desde o fim da década de sessenta, principalmente a partir do trabalho pioneiro desenvolvido no "U.S. Army Natick Development Center" e na Universidade de Rutgers, ambos nos Estados Unidos, e também no "VTT Biotechnical Laboratory", na Finlândia. A principal espécie utilizada nesses estudos é a linhagem selvagem QM 6a de *Trichoderma reesei*, isolada de uma cartucheira em apodrecimento encontrada nas florestas da Nova Guiné (AUGUSTINE, 1976). Embora esta linhagem não possua boa atividade de beta-glicosidase, que é altamente sujeita à repressão catabólica, as outras enzimas do sistema são produzidas em grandes quantidades.

Levando em consideração o rigoroso controle metabólico existente na produção e na atividade de enzimas celulolíticas, segundo MONTENECOURT et alii (1979) têm sido escolhidos sete procedimentos para a seleção de mutantes regulatórios de maior produção em *Trichoderma reesei*: a) mutantes resistentes à repressão catabólica ("desreprimidos"); b) mutantes resistentes à antimetabolitos; c) mutantes cujas características permitem a sua utilização nos fermentadores; d) linhagens alto produtoras revertentes de mutantes celulase-negativos; e) mutantes resistentes ao produto final; f) mutantes secretórios e g) mutantes constitutivos.

As técnicas de seleção desses mutantes hipercelulolíticos têm sido geralmente a utilização de redutores de colônia, tais como Oxgall, Phosphon D, rosa de bengala etc, em meios em que a única fonte de carbono é a celulose (MONTENECOURT

& EVELEIGH, 1977a e b; NEVALAINEN & PALVA, 1978 e BISARIA & GHOSE, 1981). O critério de seleção dos mutantes baseia-se no tamanho das zonas claras de degradação da celulose, comparativamente ao tamanho da zona clara do tipo selvagem (MONTENCOURT & EVELEIGH, 1977 a e b e BISARIA & GHOSE, 1981). Outros trabalhos escolhem também como critério de seleção o tamanho radial das colônias mutantes em relação ao tamanho das colônias do tipo selvagem (MACRIS, 1984a e 1984b).

As metodologias de seleção desenvolvidas para a detecção de mutantes regulatórios em *T.reesei* têm conduzido ao isolamento dos assim chamados mutantes "desreprimidos" ou "constitutivos" (MONTENCOURT et alii, 1979; MONTENCOURT et alii, 1981 ; SHOEMAKER et alii, 1981 e NEVALAINEN, 1985). Estas metodologias, que estão sumarizadas na Tabela 5, são plenamente válidas para outros microrganismos, como será demonstrado mais adiante.

A Figura 3, extraída de MONTENCOURT et alii (1979), mostra a genealogia parcial de mutantes celulolíticos de *T.reesei* QM 6a obtidos a partir da indução por diferentes agentes mutagênicos.

De acordo com a Figura 3, o primeiro mutante obtido , a partir da irradiação de conídios de *T.reesei* QM 6a com um acelerador linear, foi o QM 9123 (MANDELS et alii, 1971). Este mutante produz e secreta duas vezes mais celulase do que a linhagem parental. Os autores mantiveram armazenado o mutante QM 9123 por dois anos, com frequentes subculturas em meio de batata-glucose-ágar, e também no estado liofilizado; após este

Tabela 5 - Métodos de seleção de mutantes regulatórios de *T. reesei*

(Modificado a partir de NEVALAINEN, 1985)

Produto	Fonte de carbono/ substrato	Repressor Catabólico ou antimetabólito	Visualização
Celulase total	Celulose "Walseth"	Glicerol (2-5 %)	Zonas claras
	Celulose	2-deoxiglicose	maior crescimento radial das colônias
Endoglucanase	CMC	Glicerol ou Glicose (5 %)	zonas claras - precipitação com compostos quaternários de amônia
Beta-Glicosidase	Celobiose	2-deoxiglicose (0,2 %)	Tamanho das colônias: colônias "grandes" x colônias "pontuais"
Celulase produ- zida constitui- vamente	Fonte de carbono não indutora	Nenhum	a) cobertura seletiva com o substrato de detecção
			b) crescimento sobre filtro "nucleopore" + zonas claras sobre celulose

Figura 3 - Genealogia de mutantes celulolíticos de *Trichoderma reesei*. QM= U.S.Army (Natick), Massachusetts (EUA); RUT= Rutgers, New Jersey (EUA);

UV= radiação ultravioleta; NTG=nitrosoguanidina; eletrons de alta voltagem (A partir de MONTENECOURT et alii, 1979).

período, QM 9123 ainda possuía o dobro da atividade celulolítica do tipo parental, demonstrando assim uma boa estabilidade genética. Uma outra linhagem celulase negativa, QM 9136, foi isolada no mesmo trabalho. Esta linhagem, apesar de posteriores tratamentos mutagênicos, não sofreu reversão para o caráter produção de celulase.

Os mutantes celulase negativos têm prestado uma grande contribuição ao conhecimento dos processos regulatórios que envolvem a genética da produção de celulases. Nesse sentido, NEVALAINEN & PALVA (1978) isolaram mutantes, a partir da linhagem QM 9414, incapazes de hidrolizar a celulose, determinando também se outras enzimas, tais como xilanase, mananase e aril-beta-glicosidase, foram simultaneamente perdidas. Para isso, estes autores utilizaram nitrosoguanidina ou radiação gama como agente mutagênico e um sistema de enriquecimento de mutantes celulase negativos através do uso de nistatina. No processo de enriquecimento a seleção foi realizada em placas de petri em que a única fonte de carbono era celulose avicel, acrescida da concentração inibitória de nistatina. Assim, prototróficos capazes de crescer nesta fonte de carbono foram eliminados pela nistatina, havendo enriquecimento para os mutantes cel⁻. Neste trabalho, enquanto o isolamento total proporcionou um rendimento de 0,08 % para os mutantes cel⁻, o enriquecimento esteve entre 3 e 10 % . Estes mutantes cel⁻, crescidos em celulose "Solka floc", foram classificados em duas classes: o primeiro grupo consistiu de linhagens com atividades de celulase, mananase, xilanase e aril-beta-glicosidase extremamente baixas; as linhagens do outro

grupo têm baixa atividade de celulase, mananase e xilanase, mas com aril-beta-glicosidase a atividade é igual ou ainda superior à do tipo parental (QM 9414). O mutante QM 9136, isolado por MANDELS et alii (1971), parece pertencer ao primeiro grupo. Com o objetivo de determinar se um ou mais genes mutaram, revertentes foram induzidos com nitrosoguanidina a partir de ambos grupos de mutantes cel⁻. Não foram encontrados revertentes no primeiro grupo. MANDELS et alii (1971) também foram incapazes de isolar revertentes do mutante cel⁻ QM 9136. Contudo, revertentes foram isolados, com baixa frequência, do outro grupo de mutantes com baixa atividade celulolítica e alta atividade de aril-beta-glicosidase. Todas as atividades enzimáticas estudadas nos revertentes foram aproximadamente iguais ao nível da linhagem parental. Este fato indicou que somente um gene estava envolvido na mutação original. A falta de revertentes no outro grupo sugere que eles são mutantes múltiplos ou talvez sejam deleções onde foram suprimidos os genes estruturais para essas enzimas (NEVALAINEN & PALVA, 1978).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que uma mutação reversível de um só passo pode conduzir a perda de diversas enzimas (celulase, mananase e xilanase), sugerindo assim que esta mutação esteja envolvida num mecanismo regulatório comum para a produção de todas essas enzimas, enquanto aril-beta-glicosidase parece ser separadamente regulada. Uma outra evidência que corrobora este ponto de vista é a obtenção de revertentes do mutante cel⁻ QM 9977 (Figura 3). Estes revertentes, obtidos por MANDELS et alii (1971), deram origem a

série RUT-D com mutantes reversos beta-glicosidase positivos. Assim, os experimentos realizados com a produção de mutantes cel⁻ indicam que a síntese de beta-glicosidase está sobre controle individual (MONTENECOURT et alii, 1979).

NEVALAINEN et alii (1980), tratando com nitrosoguanidina conídios da linhagem QM 9414 de *T.reesei*, obtiveram um mutante denominado VTT-D-78085. Este mutante possui uma atividade celulolítica 2,5 a 3 vezes superior a da linhagem parental. Embora esta linhagem tenha esta atividade aumentada, sua utilização tecnológica foi dificultada por causa de sua instabilidade genética. BAILEY & NEVALAINEN (1981) deram continuidade ao programa de melhoramento desta linhagem, tendo em vista a obtenção de mutantes mais estáveis sem a perda do alto nível de atividade celulolítica produzida pela linhagem parental. Através da indução com nitrosoguanidina e radiação gama, foram isolados os mutantes VTT-D-80132 e VTT-D-80133, os quais apresentaram-se geneticamente estáveis e com uma atividade celulolítica similar a da linhagem parental.

Em um outro trabalho, VAN UDEN & BEJA LA COSTA (1980), objetivando o isolamento seletivo de mutantes de *T.reesei* com produção de beta-glicosidase aumentada, trataram os conídios da linhagem QM 9414 com luz ultravioleta e posterior semeadura em meio sólido com celulose mais 2-deoxiglicose. Foram obtidos neste trabalho dois mutantes denominados QM 9414 MCG 4 e QM 9414 MCG 5, os quais possuem atividade de beta-glicosidase ligada à célula ("cell-bound") por volta de cinco vezes superior a da linhagem parental. GHOSH et alii (1982), através do tratamento com

nitrosoguanidina de conídios da linhagem QM 9414 e posterior semeadura em meio sólido com celulose ácida mais 2-deoxiglicose, obtiveram o mutante denominado D1. Os conídios desta linhagem - parcialmente resistente à repressão catabólica - foram mutagenizados com nitrosoguanidina e luz ultravioleta, sendo semeados no mesmo meio de seleção descrito acima. A partir deste último tratamento, foi obtido o mutante denominado D1-6, o qual além de apresentar-se parcialmente resistente à repressão catabólica, possui uma atividade de papel de filtro três vezes superior a da linhagem QM 9414.

FARKAS et alii (1981), utilizando luz ultravioleta, irradiaram conídios da linhagem QM 9414. Foram obtidos os mutantes denominados M5, M6, MHC15 e MHC22, os quais exibiram uma atividade celololítica maior do que a linhagem parental. As hifas dos mutantes MHC15 e MHC22 apresentaram um maior grau de ramificação e menor espessura do que o tipo selvagem. Como a secreção das enzimas ocorre principalmente nas pontas das hifas e desde que os mutantes têm muito mais destas pontas por unidade de peso do micélio, isso poderia parcialmente explicar o aumento da secreção enzimática nesses mutantes. Em um outro trabalho, FARKAS et alii (1982) caracterizaram através de eletrofocalização as celulases dos mutantes acima obtidos em comparação com a linhagem QM 9414. Foram verificadas variações na composição peptídica, assim como, na abundância relativa dos componentes de endoglucanase e beta-glicosidase das preparações individuais de celulase.

MONTENECOURT et alii (1979), a partir de tratamento com

luz ultravioleta e posterior seleção em meio sólido com celulose mais 2-deoxiglicose, isolaram um mutante resistente à repressão catabólica denominado RUT-C 30. Este mutante é derivado da linhagem parental RUT- NG 14, que por sua vez é derivada da linhagem selvagem *T. reesei* QM 6a (MONTENECOURT & EVELEIGH, 1977b e MONTENECOURT et alii, 1980). Talvez essa linhagem seja, junto com a QM 9414, uma das linhagens mutantes derivadas da linhagem QM 6a, que mais possui estudos de otimização da produção de celulase em fermentadores e caracterização bioquímica das enzimas secretadas (TANGNU et alii, 1981; WATSON & NELLIGAN, 1983; WARZYWODA et alii, 1983; SHEIR-NEISS & MONTENECOURT, 1984 e ROBISON, 1984).

GHOSH et alii (1982 a e b) comparando, através de microscopia eletrônica, a quantidade de retículo endoplasmático existente nas linhagens QM 6a e RUT- C 30, relataram que a linhagem RUT- C 30 possui de 6 a 7 vezes maior quantidade de retículo durante a fase secretória do que a linhagem selvagem. Por outro lado, a quantidade de vacúolos e mitocôndrias é similar. Em adição as observações microscópicas, foram determinados o conteúdo total de fosfolípidios do micélio e a quantidade de nucleosídeo difosfatase (uma enzima marcadora existente no retículo endoplasmático). Os níveis de fosfolípidios e de nucleosídeo difosfatase observados na linhagem RUT- C 30 são aproximadamente o dobro daqueles da linhagem QM 6a. Desde que o retículo está envolvido na síntese extracelular de enzimas, o aumento em quantidade desta estrutura celular na linhagem RUT- C 30 poderia estar diretamente associado com a hiperprodução de

celulase. Contudo, RUT- C 30 também mostra maior síntese de outras enzimas extracelulares, como por exemplo, amilase e fosfatase ácida. Os autores sugerem a seguinte hipótese para explicar estes dados: esta quantidade aumentada de síntese proteica poderia ter sido o resultado de uma mutação de um só passo que "desativou" uma função regulatória que controla a síntese e a secreção de proteínas extracelulares.

MISHRA et alii (1982) e MISHRA & GOPALKRISHNAN (1984) descreveram um novo método para o isolamento de mutantes que produzem celulase constitutivamente. Estes autores, a partir do tratamento da linhagem QM 9414 com nitrosoguanidina, obtiveram um mutante denominado C-5. Enquanto a linhagem parental não produz celulase constitutivamente, este mutante a produz quando crescido em meios de cultura tendo como fonte de carbono glicose ou sacarose. A linhagem C-5 produz maior atividade de papel de filtro e endoglucanase que a linhagem parental, enquanto que os valores para a atividade de beta-glicosidase são similares. Estes valores de beta-glicosidase nas linhagem C-5 e QM 9414 indicam ou que esta enzima não é afetada por glicose e/ou é separadamente controlada em relação as outras enzimas na linhagem C-5. Beta-glicosidase foi produzida pela linhagem mutante na mesma quantidade tanto quando cresceu em glicose (0,62 U.I./ml) como em "solka-floc" (0,68 U.I./ml), sendo que a linhagem parental produz 0,66 U.I./ml quando crescida em um substrato indutor ("solka-floc"). A partir destes dados, os autores concluíram que a linhagem C-5 é totalmente constitutiva para a atividade de beta-glicosidase e somente parcialmente constitutiva para a

atividade das outras enzimas do complexo celulolítico. Mais uma vez - como nos estudos de revertentes a partir dos mutantes cel já acima mencionados -, estes dados sugerem uma regulação independente da enzima beta-glicosidase em relação a endoglucanase e celobiohidrolase, que parecem possuir uma regulação conjunta.

Um programa de melhoramento genético da linhagem QM 9414 foi desenvolvido também pelo grupo de pesquisa japonês da Kyowa Hakko Co., Ltd (MORIKAWA et alii, 1985; KAWAMORI et alii, 1985 e KAWAMORI et alii, 1986). A partir deste programa foram obtidos através de tratamento com nitrosoguanidina e posterior seleção em meio sólido com celulose mais glicose, os mutantes denominados KDD-10 e DGD-16. Estes dois mutantes produzem 1,5 vezes maior atividade de endoglucanase em meio com avicel mais glicose do que em meio somente com avicel como fonte de carbono. Um outro mutante denominado CDU-11, isolado através de tratamento com nitrosoguanidina, produz tres vezes maior atividade de beta-glicosidase do que a linhagem QM 9414.

Uma outra abordagem para a obtenção do aumento da atividade celulolítica é o isolamento de mutantes que são resistentes a antibióticos polienos ou fungicidas. Como estes agentes tóxicos atuam através de sua ligação seletiva aos esteróis da membrana plasmática, a seleção destes mutantes pode fornecer linhagens pleiotrópicas que sintetizem membranas modificadas, resultando assim num aumento da secreção proteica. GALLO et alii (1978) isolaram a linhagem MCG 77, a partir de *T.reesei* QM 9414, ou mais especificamente da linhagem TKO-41,

com tratamento com luz ultravioleta e seleção em meio com kabicidina. A linhagem MCG 77 foi também selecionada levando-se em consideração sua capacidade de clarear ágar-celulose numa placa de petri mais 8 % de glicerol, bem como, sua relativa liberdade da repressão do glicerol em cultura submersa. A linhagem MCG 77 apresenta resultados similares, em termos de fermentação para a produção de celulase, quando comparada com outros mutantes hipercelulolíticos, como por exemplo QM 9414 e NG 14. No entanto, esta linhagem cresce rapidamente em substratos solúveis, não havendo restrições na síntese de celulase; possui também uma maior taxa de metabolismo e produção enzimática (GALLO et alii, 1978). SCHIMENTI et alii (1986) isolaram a partir da linhagem QM 6a, através de tratamento com luz ultravioleta e posterior seleção em meios de cultura com doses crescentes de nistatina, mutantes resistentes a 8 e 10 microgramas por ml deste antibiótico. Estes mutantes denominados respectivamente CM6 e CMC6G, apresentaram em torno de 56 e 80 % maior atividade de endoglucanase, 27 e 60 % maior atividade de papel de filtro e 5 e 146 % maior atividade de beta-glicosidase do que o tipo selvagem.

SUH et alii (1986) obtiveram, através de tratamento da linhagem RL-P37 (SHEIR-NEISS & MONTENECOURT, 1984) com nitrosoguanidina, um mutante denominado LU-ts1. Comparado a linhagem parental, este mutante cresce bem nas temperaturas permissiva (25 graus centígrados) e não permissiva (37 graus centígrados). Contudo, a secreção de proteína total e celulases ativas foi significativamente reduzida no mutante a 37 graus centígrados. A análise de outras enzimas extracelulares

secretadas por LU-ts1 na temperatura não permissiva mostrou que a secreção de outras proteínas diferentes de celulase parece ser normal. Estes dados sugerem que a lesão pode ter ocorrido somente numa região regulatória que controla a secreção da celulase. Isto é corroborado pelo fato de que o efeito da temperatura sobre a secreção da celulase por LU-ts1 podia ser revertido pela simples mudança de temperatura (SUH et alii, 1986).

A técnica de fusão de protoplastos também tem sido usada visando o melhoramento genético da produção de celulase (TOYAMA et alii, 1984a e 1984b, e MANCZINGER & FERENCZY, 1985). TOYAMA et alii (1984a) realizaram a fusão de protoplastos obtidos de conídios imaturos de *Trichoderma reesei* com *Trichoderma viride* ou *Trichoderma koningii*, na presença de PEG 6000. Neste trabalho, alguns dos produtos de fusão obtidos apresentaram maior atividade de endoglucanase e beta-glicosidase do que as linhagens parentais. TOYAMA et alii (1984b) realizaram a fusão de protoplastos, a partir também de conídios imaturos e PEG 6000, das linhagens QM 9414 e QM 9136 de *T. reesei*. Um dos recombinantes obtidos neste trabalho apresentou duas vezes maior atividade de endoglucanase do que a linhagem QM 9414.

No Brasil existem alguns grupos trabalhando com o isolamento, através de mutagênese e seleção da variabilidade natural, de novas linhagens alto-produtoras de celulase, principalmente de *Trichoderma* spp e *Humicola* sp (esta espécie será mencionada mais adiante). FIGUEIREDO et alii (1985) desenvolveram um método semiquantitativo para a seleção de mutantes celulolíticos desreprimidos. THIEMANN (1985), através da

utilização de nitrosoguanidina, isolou mutantes de *Trichoderma* sp F13 que apresentaram uma atividade de papel de filtro seis vezes maior do que a linhagem parental. CASTRO et alii (1987), a partir de uma linhagem de *Trichoderma* sp, isolada de arquivo de papéis, obtiveram mutantes auxotróficos e morfológicos com tratamento com luz ultravioleta, os quais apresentaram maior atividade celulolítica do que a linhagem parental. GOLDMAN & AZEVEDO (1987) ensaiaram a atividade celulolítica de 88 linhagens de *Trichoderma* spp, isoladas de diferentes solos do estado de São Paulo, Brasil, comparativamente a linhagem QM 9414. Vinte e um isolados (23,9 %) não diferiram estatisticamente de *T. reesei* QM 9414. DILLON et alii (1988) após tratamento mutagênico das linhagens SA de *Trichoderma* sp (isolada de um coleóptero) e 2HH de *Penicillium* sp, com posterior semeadura em meio com celulose mais glicose, isolaram mutantes resistentes à repressão catabólica.

2.2.2. Outras espécies

A partir do final da década de 70 e início da década de 80, outras espécies microbianas não pertencentes ao gênero *Trichoderma* foram utilizadas para o melhoramento genético da produção de celulasas. Em 1976, STEWART & LEATHERWOOD isolaram um mutante bacteriano estável do gênero *Cellulomonas*, o qual era insensível à repressão catabólica. Segundo esses autores, este é o primeiro relato existente na literatura de síntese desreprimida estável de celulase em bactérias. Este mutante foi obtido através de tratamento da linhagem selvagem com nitrosoguanidina e posterior semeadura em meio basal mais 0,1 % de celulose e 0,5 %

de glicose. Este mutante tem se mantido estável através de sucessivas transferências, não havendo reversão para o fenótipo repressão catabólica. Este mesmo mutante foi usado com sucesso por HITCHNER & LEATHERWOOD (1980) para a produção de proteínas de unicelulares a partir de celulose.

SHEWALE & SADANA (1978) relataram a produção de celulase de um isolado de *Sclerotium rolfsii*, o qual produz quantidades de celulase comparáveis às aquelas produzidas por *T.reesei* e quantidades em torno de 20 vezes maiores de celobiase. Os mesmos autores, em um outro trabalho (SADANA et alii, 1979), selecionaram através de tratamento da linhagem selvagem com luz ultravioleta, um mutante de *S.rolfsii* que produz 2 a 2,5 vezes maior atividade de "FPA" (atividade de papel de filtro) do que a linhagem parental. Este mutante manteve seu fenótipo de atividade aumentada durante um ano, com frequentes subculturas em meio de batata-glicose-ágar ou armazenamento a 4 graus centígrados em estado liofilizado, sem apresentar reversão.

MACRIS (1984a e 1984b) induziu, através do uso de radiação gama, mutantes de *Alternaria alternata*. Os possíveis mutantes foram selecionados, numa primeira avaliação, a partir do seu crescimento radial; numa segunda avaliação em meio de cultura líquido, baseado na quantidade de beta-glicosidase excretada, foi selecionado um mutante não esporulante denominado M-7, o qual produz 4,9 vezes mais beta-glicosidase do que o tipo selvagem.

Penicillium pinophilum (*Penicillium funiculosum*) é uma espécie que tem sido muito estudada nos últimos anos para a produção de celulase, tanto sob o ponto de vista do melhoramento

genético como do fermentativo (WOOD et alii, 1984; JOGLEKAR & KARANTH, 1984; BROWN et alii, 1987a, 1987b e 1987c e LACHKE et alii, 1987). WOOD et alii (1984) isolaram, através do uso de luz ultravioleta e posterior semeadura num meio de cultura tendo como fonte de carbono palha delignificada mais 5 % de glicerol, um mutante denominado C22c. Este mutante, na presença de celulose mais 5 % de glicerol, apresenta uma síntese de beta-glicosidase e xilanase desreprimidas, contudo as atividades de "FPA" e endoglucanase foram somente ligeiramente desreprimidas. O efeito diferencial do glicerol sobre a repressão de beta-glicosidase e endoglucanase sugere mais uma vez que estas duas enzimas estão sobre controle independente. Dando continuidade ao programa de melhoramento, os mesmos autores isolaram, a partir do tratamento do mutante C22c com nitrosoguanidina, um mutante denominado NTG III/6, o qual possui uma atividade específica 3,2 vezes maior de endoglucanase, 1,5 vezes maior de "FPA", 2,6 vezes maior de beta-glicosidase e 3,5 vezes maior de xilanase, quando comparadas as do tipo selvagem. BROWN et alii (1987a), trataram com luz ultravioleta e nitrosoguanidina conídios da linhagem C22c, fazendo a seleção em placas com meio de palha delignificada mais 5 % de glicerol, 0,5 % de 2-deoxiglicose ou 10 micromolar de 1,5-gluconolactona. As linhagens selecionadas UVI/10, UVIII/16 e JAB/3b/15 produziram maiores rendimentos de enzima do que a linhagem C22c. Neste trabalho foram feitas observações sobre a morfologia, a partir de tubos germinativos com 18 horas de crescimento, do tipo selvagem e dos mutantes UVI/10, UVIII/16 e NTG III/6. Foi verificado que as ramificações das hifas, assim

como o seu diâmetro eram maiores nas linhagens mutantes. Novamente, como já foi citado no trabalho de FARKAS et alii (1981), foi sugerida a mesma hipótese do aumento da atividade enzimática estar ligado ao aumento do número de pontas hifais por unidade de peso do micélio. Com o mutante NTG III/6, estudos de fermentação têm sido realizados com o objetivo do aumento da produtividade enzimática através do estabelecimento de melhores condições de meio, pH, temperatura etc (BROWN et alii, 1987b e 1987c). Seguindo um outro programa de melhoramento JOGLEKAR & KARANTH (1984), também utilizando luz ultravioleta, isolaram um mutante de *P.funiculosum* denominado UV-49, o qual produz uma atividade cinquenta por cento maior de endoglucanase e "FPA" do que o tipo selvagem, enquanto a atividade de beta-glicosidase não é afetada. Este mutante tem características morfológicas diferentes do tipo selvagem.

ERIKSSON & JOHNSRUD (1983) isolaram mutantes do fungo *Sporotrichum pulverulentum* através da utilização de luz ultravioleta. Os mutantes denominados 6, 63, 9, E-5, E-1 e UV-18 mostraram atividades iguais ou superiores de endoglucanase, "FPA" e beta-glicosidase que a do tipo selvagem. As atividades celulolíticas obtidas, medidas como atividade de papel de filtro ("FPA"), são comparáveis àquela relatada para *T.reesei* QM 9414. Contudo, a atividade de beta-glicosidase foi aproximadamente seis vezes superior a de *T.reesei* QM 9414.

Estudos de melhoramento genético de microrganismos termofílicos produtores de celulase também têm sido realizados (FENNINGTON et alii, 1982; MOLONEY et alii, 1983; FENNINGTON et

alii, 1984; HAYASHIDA & MO, 1986 e RODRIGUES, 1987). Segundo FENNINGTON et alii (1982), considerando a escala industrial das bioconversões, existem as seguintes vantagens no uso de culturas termofílicas: a) redução dos problemas de contaminação; b) eliminação da maioria dos patógenos; c) os custos de resfriamento são grandemente reduzidos, e d) separação facilitada das fases líquidas e sólidas.

FENNINGTON et alii (1982) utilizando luz ultravioleta, nitrosoguanidina e etanometilsulfonato, obtiveram quatro linhagens mutantes de *Thermomonospora curvata* que produzem de 1,7 a 2,5 vezes a atividade de "FPA" e de 1,6 a 2,6 vezes a de "C"₁ (fibras de algodão) daquela do tipo selvagem. Em um outro trabalho com *T. curvata* FENNINGTON et alii (1984) isolaram, a partir do uso de etanometilsulfonato-luz ultravioleta e semeadura em placas com celulose mais 2-deoxiglicose, um mutante denominado G-11, o qual foi resistente a repressão catabólica. Segundo os autores, este é o primeiro relato da ocorrência de resistência a repressão catabólica descrito em um actinomiceto termofílico. Na ausência de repressores (por exemplo, glicose) no meio de cultura que tem celulose como fonte de carbono, este mutante apresentou somente 15 a 40 % maior atividade celulolítica do que o tipo selvagem. No entanto, quando são crescidos na presença de repressores, a produção de celulase do tipo selvagem foi reduzida de 60 a 80 %, enquanto que, a do mutante manteve-se relativamente constante. A resistência a repressão desenvolvida pelo mutante G-11 é devida em parte a sua capacidade de manter os níveis intracelulares de AMP cíclico (FENNINGTON et alii, 1984).

* MOLONEY et alii (1983) isolaram um mutante do fungo termofilico *Talaromyces emersonii* resistente à repressão catabólica. Este mutante foi isolado através de tratamento com nitrosoguanidina e luz ultravioleta, com posterior seleção respectivamente em meio com celobiose mais 2-deoxiglicose e celulose ácida mais glicose. Como resultado do tratamento com a nitrosoguanidina, foi isolado um mutante morfológico denominado UCG 42, com atividade de papel de filtro superior a do tipo selvagem.

Espécies do fungo termofilico *Humicola* têm sido muito estudadas quanto a produção de celulasas (YOSHIOKA et alii, 1980; CHAVES, 1982; YOSHIOKA et alii, 1982; ARAUJO et alii, 1983; HAYASHIDA & MO, 1986; MONTI & JORGE, 1986; POLIZELI & TERENCEI, 1986; FERREIRA & FÉLIX, 1986 e RODRIGUES, 1987). Sua importância está ligada principalmente as altas taxas de beta-glicosidase que são produzidas por estas espécies. HAYASHIDA & MO (1986) isolaram, através de tratamento com luz ultravioleta e nitrosoguanidina, um mutante de *Humicola grisea* var. *thermoidea* YH-78. Este mutante, também protease-negativo, apresentou maior atividade de endoglucanase do que a linhagem parental. RODRIGUES (1987) isolou um mutante morfológico denominado mor₁₃, através de tratamento com ácido nitroso, com produção de beta-glicosidase superior a do tipo selvagem.

A partir da extensa revisão realizada não foi possível constatar a ocorrência de trabalhos de melhoramento genético da produção de celulase em espécies de *Aspergillus*. Isto não é compreensível levando-se em consideração a grande importância

industrial desta espécie, inclusive na produção de celulases (GOKSOYR & ERIKSEN, 1980). Somente foram encontrados dois trabalhos (MACRIS et alii, 1985 e ARAUJO & D'SOUZA, 1986). MACRIS et alii (1985) descreveram uma ação sinérgica cruzada entre as celulases dos mutantes celulolíticos *Alternaria alternata* M7 (acima descrito) e *Aspergillus ustus* M-35, quando crescidos em meios com algodão ou palha como fonte de carbono. *A.ustus* M-35 foi obtido através da indução com radiação gama. Não são descritas neste trabalho comparações entre as atividades celulolíticas do tipo selvagem de *A.ustus* e do mutante denominado M-35. ARAUJO & D'SOUZA (1986) relataram a caracterização cromatográfica de celulases de *Aspergillus terreus* ATCC 52430 e de alguns mutantes obtidos, a partir desta linhagem, através de tratamento com luz ultravioleta e nitrosoguanidina. Também não são descritas neste trabalho comparações entre as atividades celulolíticas destas linhagens.

2.3. A Tecnologia do DNA recombinante e a hidrólise da celulose

Atualmente existem diversos trabalhos onde as técnicas de clonagem gênica estão sendo aplicadas para o melhor conhecimento do sistema celulolítico (ARMENTROUT & BROWN, 1981; SHOEMAKER et alii, 1983; TEERI et alii, 1983; PENTTILA et alii, 1984; SKIPPER et alii, 1985; NEVALAINEN, 1985; PARK & PACK, 1986; NAKAMURA et alii, 1986; COPPOLECCHIA et alii, 1987; CHEN et alii, 1987; LOVE & STREIFF, 1987; KNOWLES et alii, 1987; TEERI, 1987;

PENTTILA, 1987 e PENTTILA et alii, 1987).

O gene que codifica a celobiohidrolase I (CBH I) foi clonado por SHOEMAKER et alii (1983) e TEERI et alii (1983), sendo que toda a sequência nucleotídica deste gene foi publicada. Os genes de celobiohidrolase II (CBH II) e endoglucanase II (EG II) foram isolados e caracterizados a partir de um banco genômico construído tendo como vetor o fago Lambda (NEVALAINEN, 1985 e TEERI, 1987). Segundo KNOWLES et alii (1987), já foram clonados os genes da celulase das seguintes espécies de fungos : a) uma beta-glicosidase de *Aspergillus niger*; b) uma beta-glicosidase de *Candida pelliculosa*; c) uma beta-glicosidase de *Kluyveromyces fragilis*; d) uma celobiohidrolase de *Phanerochaete chrysosporium*; e) uma endoglucanase de *Schizophyllum commune* e f) duas celobiohidrolases (genes *cbh 1* e *cbh 2*) e duas endoglucanases (genes *eg 11* e *eg 13*) de *Trichoderma reesei*. Contudo, não é conhecido ainda se os genes que codificam a produção de celulase estão ligados ou separados, no mesmo cromossoma ou em cromossomas diferentes.

PENTTILA (1987) construiu cinco linhagens diferentes de levedura, expressando em *Saccharomyces cerevisiae* os genes que codificam para a produção de CBH I, CBH III, EG I e EG III de *Trichoderma reesei*, bem como, o gene da beta-glicosidase de *Aspergillus niger*. Todas as leveduras recombinantes foram capazes de hidrolisar substratos celulósicos presentes no meio de cultura. No mesmo trabalho, a cópia (cDNA) do gene *eg 1* de *T.reesei* foi transferida para uma linhagem de levedura usada na indústria cervejeira. Esta transferência foi feita através de um

plasmídeo multicópia e também por integração cromossômica. A levedura glucanolítica construída foi capaz de eficientemente hidrolisar beta-glucanos presentes no mosto. Isto fez com que fossem introduzidas melhorias no processo de fabricação da cerveja, já que os beta-glucanos presentes em excesso na cevada causam problemas de filtração, precipitação e turbidez na cerveja já pronta (NEVALAINEN, 1988).

NEVALAINEN, H., 1988. Comunicação pessoal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Espécies utilizadas

3.1.1. *Aspergillus niger* NRRL-337

Microorganismo celulolítico fornecido pelo Dr. Tobias José Barreto Menezes (ITAL-Campinas-SP), originário do "Northern Regional Research Laboratories" - Peoria - Illinois - Estados Unidos.

3.1.2. *Trichoderma reesei* QM 9414

Mutante celulolítico isolado no "U.S. Army Natick Development Center" - Natick - Estados Unidos (MANDELS et alii, 1971).

3.2. Meios de Cultura e Soluções utilizadas

3.2.1. Meio Mínimo (PONTECORVO et alii, 1953b)

NaNO ₃	5,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,0 g
Agar Difco	15,0 g
Água Destilada	1000 ml
O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10 % (p/v)	

3.2.2. Meio Completo (PONTECORVO et alii, 1953b, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

Foram adicionados ao meio minimo:

Peptona.....	2,0 g
Caseina hidrolizada.....	1,5 g
Extrato de Levedura.....	0,5 g
Solução de Vitaminas.....	1,0 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10 % (p/v)

3.2.3. Meio Mínimo Líquido (PONTECORVO et alii, 1953b)

Foi preparado segundo o item 3.2.1., não sendo adicionado o ágar.

3.2.4. Meio Completo Líquido (PONTECORVO et alii, 1953b, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

Foi preparado segundo o item 3.2.2., não sendo adicionado o ágar.

3.2.5. Meio Batata-Glicose-Agar (BDA) - "Difco Laboratories"

Infusão de batata.....	200,0 g
Glicose.....	20,0 g
Agar.....	15,0 g

A concentração foi de 3,9 % e o pH final foi de 5,6.

3.2.6. Meio Czapek-Difco - "Difco Laboratories"

Sacarose.....	30,0 g
Nitrato de sódio.....	3,0 g

Fosfato de Potássio..... 1,0 g
 Sulfato de Magnésio..... 0,5 g
 Cloreto de Potássio..... 0,5 g
 Sulfato Ferroso..... 0,01 g
 A concentração foi de 3,5 % e o pH final foi de 7,3.

3.2.7. Meio Corn-Meal Difco - "Difco Laboratories"

Infusão de Corn-Meal..... 50,0 g
 Agar..... 15,0 g
 A concentração foi de 1,7 % e o pH final foi de 6,0.

3.2.8. Meio Saboraud-Oxoid - "Oxoid Ltd"

Peptona Micológica..... 10,0 g
 Glicose ..... 40,0 g
 Agar..... 15,0 g
 A concentração foi de 6,5 % e o pH final foi de 5,6.

3.2.9. Meio YGT (Gambino et alii, 1984)

Extrato de Levedura..... 5 g
 Glicose..... 20 g
 Tween 80..... 0,2 %
 Água destilada..... 1000 ml
 O pH final foi de 6,8.

3.2.10. Meio YG (Gambino et alii, 1984)

A preparação foi feita de forma idêntica ao Meio YGT (item 3.2.9.), sendo que o Tween 80 não foi acrescentado.

3.2.11. Meio de Farelo de Trigo (YOSHIOKA et alii, 1982)

Farelo de Trigo..... 5,0 g
 Água destilada..... 5,0 ml

3.2.12. Solução de Vitaminas

Biotina..... 0,20 mg
 Ácido p-aminobenzóico..... 10,0 mg
 Tiamina..... 50,0 mg
 Piridoxina..... 50,0 mg
 Ácido nicotínico..... 100,0 mg
 Riboflavina..... 100,0 mg
 Água destilada esterilizada..... 100,0 ml

A solução foi posteriormente esterilizada em banho-maria por 15 minutos e guardada no refrigerador a 4 graus centígrados em frasco escuro, sob clorofórmio.

3.2.13. Solução de Ácido Nucleico de Leveduras

Ácido Nucleico de Leveduras: 2 g em 15 ml de solução 1 N de HCl

Ácido Nucleico de Leveduras: 2 g em 15 ml de solução 1 N de NaOH

Ambas soluções foram aquecidas em banho-maria por 20 minutos, misturadas e o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 10 % (p/v). As soluções foram filtradas e completou-se o volume para 40 ml, logo após sendo conservado no refrigerador a 4 graus centígrados, sob clorofórmio.

3.2.14. Solução de Caseína Hidrolizada

Foi preparada a solução dissolvendo-se 100 mg de caseína hidrolizada em 10 ml de água destilada esterilizada. Esta foi aquecida em banho-maria por 15 minutos e a seguir conservada em refrigerador a 4 graus centígrados.

3.2.15. Suplementos adicionados ao meio mínimo

Os estoques de suplementos foram preparados, adicionando-se cada um deles em frascos escuros contendo 10 ml de água destilada esterilizada. Estes foram posteriormente aquecidos por 15 minutos e conservados no refrigerador a 4 graus centígrados.

3.2.16. Solução Salina (0,85 % p/v)

NaCl.....	0,85 g
Água Destilada.....	100,0 ml

A solução foi distribuída em frascos (9 ml por frasco), sendo a seguir autoclavada.

3.2.17. Solução de "Tween-80" (0,1 ou 10 % v/v)

"Tween-80".....	0,1 ou 10,0 ml
Água destilada.....	100,0 ml

A solução foi distribuída em tubos de ensaio (2,5 ml por tubo), que foram a seguir autoclavados e mantidos no refrigerador a 4 graus centígrados.

3.2.18. Meio Mínimo com 2 % (v/v) de Meio Completo

Ao meio mínimo foi adicionado meio completo numa proporção de 2 % (v/v). As soluções resultantes foram distribuídas 2,5 ml por tubo de ensaio e esterilizadas.

3.2.19. Solução de Albumina 5 % (v/v) (ROBINOW & CATEN, 1969)

A solução de albumina foi obtida adicionando-se 5 % de clara de ovo à água destilada esterilizada. A solução foi mantida no refrigerador, em frasco escuro, a 4 graus centígrados.

3.2.20. Solução de Glicerina 50 % (v/v)

Glicerina..... 500 ml
 Água destilada..... 500 ml
 A solução foi mantida a temperatura ambiente.

3.2.21. Solução de Giemsa

Foi dissolvida uma parte de Giemsa em sessenta e seis partes de glicerina a 60 graus centígrados e após esfriamento, misturou-se com sessenta e seis partes de metanol. Esta solução foi mantida a temperatura ambiente.

3.2.22. Tampão Fosfato 0,125 M pH 7,0

KH₂PO₄ ..... 5,304 g
 K₂HPO₄ ..... 10,614 g
 Água destilada..... 100 ml
 O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 10 % (p/v)

3.2.23. Tampão Fosfato 0,2 M pH 5,8

Solução A:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ..... 24,0 g
 Água destilada..... 1000 ml

Solução B:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ..... 71,6 g
 Água destilada..... 1000 ml

Na obtenção da solução tampão 0,2 M pH 5,8, misturou-se uma proporção de nove para um das soluções A e B respectivamente. O pH foi ajustado com as soluções A e B e completado até 1000 ml com água destilada.

3.2.24. Tampão Fosfato 0,02 M pH 5,6

Solução A:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ..... 2,76 g
 Água destilada..... 1000 ml

Solução B:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ..... 3,56 g
 Água destilada..... 1000 ml

Na obtenção da solução tampão 0,02 M pH 5,6, misturou-se uma proporção de nove para um das soluções A e B respectivamente. O pH foi ajustado com as soluções A e B e completado até 1000 ml com água destilada.

3.2.25. Tampão Fosfato pH 7,0

Solução A:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ..... 3,73 g

Água destilada..... 1000 ml

Solução B:

KH_2PO_4 ..... 2,40 g

Água destilada..... 1000 ml

Na obtenção da solução tampão pH 7,0, misturou-se uma proporção de sete para três das soluções A e B respectivamente.

3.2.26. Tampão Acetato pH 4.4

Solução de ácido acético: 1,155 ml em 100 ml de água destilada

Solução de acetato de sódio: 1,64 g em 100 ml de água destilada

Foram autoclavadas separadamente as duas soluções e no momento de serem usadas, foram misturadas 12,75 ml da solução de ácido acético e 12,25 ml da solução de acetato de sódio (em frasco esterilizado).

3.2.27. Tampão citrato pH 4,8 0,05 M

Solução de ácido cítrico 0,05 M: pesar 10,505 g de ácido cítrico, dissolver em 800 ml de água destilada e completar o volume para 1000 ml

Solução de citrato de sódio 0,05 M: pesar 14,705 g de citrato de sódio, dissolver em 800 ml de água destilada e completar o volume para 1000 ml

Tomar 500 ml da solução de citrato de sódio e adicionar a solução de ácido cítrico até o pH atingir o valor de 4,8.

3.2.28. Solução de Dietilsulfato (DES) (DUARTE, 1971)

DES ..... 0,1 ml

Solução "Tween-80" 10 % v/v..... 4,9 ml

3.2.29. Solução de nitrito de sódio

Nitrito de sódio 0,345

Água destilada ..... 10 ml

O nitrito de sódio foi pesado e depois adicionado na água destilada esterilizada.

3.2.30. Estabilizadores osmóticos

3.2.30.1. KCl 1,6 M

Dissolveu-se 119,2 g de KCl em aproximadamente 330,0 ml de solução A de Tampão Fosfato 0,2 M. Agitou-se em agitador magnético até a dissolução total e levou-se ao potenciômetro adicionando-se solução B de Tampão fosfato 0,2 M até o pH 5,8. Completar o volume até 1000 ml com tampão fosfato 0,2 M pH 5,8.

3.2.30.2. Outras soluções de KCl

Soluções de KCl 1,4 , 1,2 , 0,8 , 0,7 e 0,6 M foram feitas a partir da diluição da solução de KCl 1,6 M com tampão fosfato 0,2 M pH 5,8.

3.2.30.3. MgSO_4 1,0 M

Dissolveu-se 246,47 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ em um pequeno volume de solução B de tampão fosfato 0,02 M. Utilizou-se a solução A de tampão fosfato 0,02 M para ajustar o pH para 5,6.

Completoou-se o volume final para 1000 ml com tampão fosfato 0,02 M pH 5,6.

3.2.30.4. MgSO_4 0,5 M

Diluiu-se na proporção 1:1 a solução MgSO_4 1,0 M em tampão fosfato 0,02 M.

3.2.30.5. Sorbitol 2,4 M

Sorbitol ..... 43,72 g

Tris/HCl 0,01 N pH 5,8 ..... 100 ml

3.2.30.6. Sorbitol 1,2 M

Sorbitol ..... 21,86 g

Tris/HCl 0,01 N pH 5,8 ..... 100 ml

3.2.31. Solução de salicina (D-Salicin, Riedel-de-Haen) 1 % p/v

Dissolveu-se 1 g de salicina em aproximadamente 80 ml de tampão citrato 0,05 M pH 4,8. Adicionou-se 1 ml de solução de mertiolate 1 % v/v e completou-se o volume para 100 ml com tampão citrato 0,05 M pH 4,8. Estocar a 4 graus centígrados.

3.2.32. Reagentes para a dosagem de proteínas (LOWRY et alii, 1959)

3.2.32.1. Reativo de Folin-Ciocalteu (Laborclin Ltda.)

O reativo foi diluído 1:1 em água destilada.

3.2.32.2. Solução B

Solução de Na_2CO_3 em NaOH 0,1 N ..... 100 ml

Solução de CuSO_4 1 % ..... 1 ml

Solução de tartarato de Na e K ..... 1 ml

A solução foi preparada no momento de ser usada.

3.2.33. Reagente ácido dinitrosalicílico (DNS)

Ácido 3,5 dinitrosalicílico ..... 10,6 g

Hidróxido de sódio ..... 19,4 g

Água destilada ..... 1416 ml

Dissolveu-se os reagentes acima e adicionou-se:

Tartarato de Sódio e Potássio ..... 306,0 g

Fenol (aquecer a 50 graus centígrados) .. 7,6 ml

Metabissulfito de sódio ..... 8,3 g

Estocou-se a 4 graus centígrados.

3.2.34. Reagentes usados para a eletroforese em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970 e PACCOLA-MEIRELLES et alii, 1988)

3.2.34.1. Estoque de Acrilamida

Acrilamida ..... 75 g

N,N-metilene-bis-acrilamida ..... 2 g

Água destilada ..... 250 ml

Filtrou-se e manteve-se a 4 graus centígrados.

3.2.34.2. Tampão do Gel Separador pH 8,9

Tris ..... 45,75 g

Titulou-se com HCl 1 N até atingir o pH 8,9. Completou-se o volume com água destilada para 100 ml; filtrou-se e armazenou-se a temperatura ambiente.

3.2.34.3. Tampão do Gel Empilhador pH 6,8

Tris ..... 7,475 g

Titulou-se com HCl 1 N até atingir o pH 6,8. Completou-se o volume com água destilada para 100 ml; filtrou-se e armazenou-se a temperatura ambiente.

3.2.34.4. Tampão do Tanque

Tris ..... 63,2 g

Glicina ..... 39,9 g

Água destilada ..... 1000 ml

Filtrou-se e armazenou-se a temperatura ambiente. No momento do uso, este tampão foi diluído 1:10 com água destilada.

3.2.34.5. Tampão da amostra

Glicerol ..... 5,0 ml

Tampão do Gel empilhador ..... 2,5 ml

Azul de Bromofenol ..... cristais

Completou-se com água destilada para o volume de 25 ml e armazenou-se a - 20 graus centígrados.

3.2.34.6. Gel Separador a 10 %

Tampão do Gel Separador ..... 3,0 ml

Acrilamida (item 3.2.35.)	10,0 ml
Água destilada	16,8 ml
Persulfato de amônio a 10 %	0,225 ml
N,N,N',N'-tetrametilenodiamina (TEMED)	01 ml

3.2.34.7. Gel Empilhador a 4 %

Tampão do Gel empilhador	1,5 ml
Acrilamida (item 3.2.35.)	2,0 ml
Água destilada	11,4 ml
Persulfato de amônio a 10 %	0,112 ml
TEMED	0,015 ml

3.2.34.8. Fixador PAGE

Metanol	45,0 ml
Ácido Acético	10,0 ml
Água destilada	45,0 ml

3.2.34.9. Corante para a caracterização de proteínas totais

Azul de Coomassie ("Brilhamt Blue R-250")	0,1 mg
Fixador PAGE	100 ml

3.2.34.10. Descorante

Metanol	5,0 ml
Ácido acético	7,0 ml
Água destilada	88,0 ml

3.2.34.11. Substratos usados para a revelação de esterases

a) alfa-naftil acetato 1% p/v em solução aquosa de acetona 50 %

b) beta-naftil acetato 1% p/v em solução aquosa de acetona 50 %

Armazenou-se a 4 graus centígrados.

3.2.34.12. Corante para a caracterização de esterases

"Fast Blue RR" ..... 50,0 mg

Tris-HCl 0,5 M pH 7,1 ..... 5,0 ml

alfa-naftil acetato (item 3.2.34.11.) ..... 0,75 ml

beta-naftil acetato (item 3.2.34.11.) ..... 0,75 ml

Água destilada ..... 43,5 ml

Preparou-se somente no momento de ser usado.

3.3. Sistema de filtro para técnica de enriquecimento

No interior de funis de vidro foram fixadas 6 camadas de gaze com auxílio de fita crepe. Este conjunto foi envolto em papel alumínio e esterilizado.

3.4. Uso de palitos para transferência de colônias

Foram utilizados palitos roliços para transferir conídios no caso de inoculação em placas.

3.5. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e as soluções utilizadas foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 graus centígrados. A temperatura de incubação foi de 28 graus centígrados.

3.6. Pré-inóculo

Os conídios usados em todas as pré-inoculações foram obtidos a partir do crescimento prévio de *A.niger* ou *T.reesei* QM 9414 em tubos inclinados com meio completo durante 72 horas. A partir deste material, foi feita uma suspensão de conídios em "Tween-80" 0,1 % e com auxílio da câmara de Neubauer, o número de conídios por ml foi estimado.

3.7. Verificação do crescimento em diferentes meios de cultivo

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Czapek, meio mínimo, BDA, "Corn Meal", meio completo e Sabouraud. A inoculação de *A.niger*, com agulha de platina, foi feita no centro da placa de cada respectivo meio de crescimento. Foi feita a avaliação do crescimento radial em milímetros com 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas de crescimento.

3.8. Verificação do número de núcleos por conídios (ROBINOW & CATEN, 1969)

Uma alçada de conídios de *A.niger* cultivados durante 72 horas em meio completo foi distribuída em laminulas com albumina 5 % (v/v). As laminulas foram fixadas 120 minutos na seguinte solução: três partes de álcool etílico absoluto mais uma parte de ácido acético glacial P.A.. Em seguida, foram lavadas (imersas) cinco minutos com álcool etílico 95 % e trinta minutos com álcool etílico 70 %. As laminulas foram colocadas numa solução de HCl 1 N a 60 graus centígrados, durante 10 minutos. Após esse período,

foram lavadas três vezes com água destilada e colocadas numa solução de 1:10 de Giemsa mais tampão fosfato 0,125 M pH 7,0, durante 20 minutos. Depois foram lavadas com o tampão e postas em lâminas com uma gota de tampão fosfato 0,125 M pH 7,0, sendo levadas para observação ao microscópio ótico.

3.9. Verificação da estabilidade genética

A inoculação de *A.niger*, com agulha de platina, foi feita em placas com meio completo. O inóculo foi feito a partir de uma colônia isolada. As placas foram incubadas por 96 horas, visando a verificação da possibilidade de liberação de setores.

3.10. Sobrevivência a mutagênicos

3.10.1. Sobrevivência à luz ultravioleta

Uma suspensão de conídios de *A.niger*, obtida de acordo com o item 3.6., foi diluída em solução salina 0,85 % para a concentração de $1,0 \times 10^5$ conídios por ml. O volume de 10 ml dessa suspensão de conídios foi colocado numa placa de petri, previamente esterilizada, à distância de 14 cm da fonte de luz ultravioleta da marca Mineralight-115 volts da Ultra-Violet Prod. Inc. (San Gabriel-Calif.-U.S.A.). Antes do início da irradiação, uma alíquota de 1,0 ml do volume da placa foi retirada para que pudesse servir como controle. A placa foi exposta durante 1, 2, 4, 8 e 16 minutos à fonte de luz ultravioleta. Uma alíquota de 1,0 ml foi retirada da placa após cada período de irradiação. Essas alíquotas, assim como a do controle, foram convenientemente diluídas em solução salina 0,85 % e 0,1 ml de cada diluição foi

semeada em placas com meio completo. Toda a irradiação e as posteriores diluições do material foram feitas no escuro (somente com uma luz amarela), sendo que as placas foram protegidas por papel opaco durante 24 horas e incubadas de imediato durante 48 horas. A contagem de colônias isoladas foi feita após esse período.

3.10.2. Sobrevivência a Radiação Gama

Uma suspensão de conídios de *A.niger*, obtida de acordo com o item 3.6., foi diluída em solução salina 0,85 % para a concentração de $8,0 \times 10^6$ conídios por ml. Tubos de ensaio com o volume de 4,0 ml desta concentração de conídios, foram irradiados com raios gama (Fonte de ^{60}Co - CENQ-USP), a uma distância da fonte de 30 cm, com uma taxa de dose de 2370 Gray por hora. As doses acumulativas foram de 100, 200, 400, 800 e 1000 Gray. O controle foi um tubo com o mesmo volume que não foi irradiado. Após a irradiação, aliquotas de 1,0 ml foram retiradas de cada tubo, convenientemente diluídas em solução salina 0,85 % e 0,1 ml de cada diluição semeada em placas com meio completo. A contagem de colônias isoladas foi feita após 72 horas de crescimento.

3.10.3. Sobrevivência ao Ácido Nitroso (SIDDIQI, 1962)

Uma suspensão de conídios de *A.niger*, obtida de acordo com o item 3.6., foi diluída em solução salina 0,85 % para uma concentração aproximada de $1,0 \times 10^7$ conídios por ml.

Foi feita a seguinte concentração de ácido nitroso (distribuído em tubos de ensaio):

	<u>Tratamento</u>	<u>Controle</u>
Sol.nitrito de sódio	0,33 ml	-
sol.acetato pH 4,4	9,17 ml	9,50 ml
susp. conídios	0,50 ml	0,50 ml

Após o período de incubação de 20, 40, 80 e 120 minutos em banho-maria a 28 graus centígrados, 1,0 ml de cada tubo foi convenientemente diluído em tampão fosfato 0,125 M pH 7,0, sendo 0,1 ml de cada diluição semeada em placas com meio completo, as quais foram incubadas na estufa por 72 horas.

3.10.4. Sobrevivência ao DES (DUARTE, 1971)

Uma suspensão de conídios de *A.niger*, obtida de acordo com o item 3.6., foi diluída em solução salina 0,85 % para a concentração aproximada de $1,5 \times 10^7$ conídios/ml.

Foi inoculado em cada tubo com 5,0 ml de solução DES (item 3.2.28.), 1,0 ml da suspensão de conídios. O controle do experimento foi feito a partir de um tubo com 5,0 ml de solução "Tween-80" 10 % mais 1,0 ml da suspensão de conídios. Os tubos inoculados foram mantidos em banho-maria a 28 graus centígrados durante 30, 60, 90, 120 e 150 minutos. Após esses períodos, uma alíquota de 1,0 ml foi retirada de cada tubo e convenientemente diluída, sendo 0,1 ml de cada diluição semeada em placas com meio completo. As placas foram incubadas na estufa por 72 horas.

3.11. Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos

3.11.1. Mutantes auxotróficos e morfológicos obtidos com radiação gama

Uma suspensão de conídios de *A.niger*, obtida de acordo com o item 3.6., foi diluída em solução salina 0,85 % e irradiada com uma dose de 800 Grey de raios gama, a partir da mesma fonte de ⁶⁰Co já descrita no item 3.10.2. Após a irradiação, 0,1 ml de diluições apropriadas foram semeadas em meio completo e incubadas por 72 horas. Depois destas colônias terem esporulado, estas foram transferidas, com auxílio de palitos roliços esterilizados, para placas com meio mínimo (26 pontos). Após 48 horas de incubação, os blocos de ágar dos pontos em que não houve crescimento foram transferidos novamente para placas com meio completo. Após 72 horas de incubação, os conídios destas colônias foram mais uma vez transferidos para placas com meio mínimo. Não havendo crescimento em meio mínimo, as colônias foram consideradas como sendo mutantes auxotróficos. Os mutantes morfológicos foram selecionados através da observação visual da morfologia das colônias.

Tendo em vista o ensaio das deficiências nutritivas dos mutantes obtidos, placas com meio mínimo sólido mais 0,1 ml de cada uma das soluções de caseína hidrolizada, de ácidos nucleicos, de vitaminas e de extrato de levedura foram feitas. Os mutantes auxotróficos foram inoculados nas placas acima e estas foram incubadas por 48 horas. Desta forma, o crescimento dos mutantes em uma das placas e não em meio mínimo, indicou a deficiência de cada um, sendo então posteriormente transferidos para placas com meio mínimo mais cada um dos aminoácidos, meio mínimo mais cada um dos ácidos nucleicos e cada uma das vitaminas separadamente. Para obtenção de duplos mutantes foi seguido o

mesmo critério acima com exceção de que o requisito nutricional referente a mutação simples foi adicionado ao meio mínimo.

3.11.2. Enriquecimento de mutantes por filtração

Após o tratamento apropriado com radiação gama (item 3.10.2.) , 2,0 ml de salina 0,85 % com uma suspensão determinada de *A.niger* foram incubados num erlenmeyer de 250 ml com 50 ml de meio mínimo e incubados 12 horas em agitador rotatório a 28 graus centígrados. Após 12 horas, os 50 ml foram filtrados no sistema de filtro para técnica de enriquecimento (item 3.3.) num erlenmeyer de 250 ml esterilizado e incubados a 28 graus centígrados/150 rpm. Este procedimento foi repetido mais duas vezes , sendo que o volume do ultimo filtrado foi centrifugado a aproximadamente 2900 x g/15 minutos. O precipitado foi ressuspensão em 4 ml de solução salina 0,85 % . Os passos que sucederam estas etapas foram iguais aos já descritos no item 3.11.1.

3.11.3. Teste de Reversão

A partir de um pré-inóculo crescido 72 horas em tubos inclinados com meio completo, suspensões de conídios dos mutantes de *A.niger* foram feitas em solução "Tween-80" 0,1 % e com auxílio da câmara de Neubauer, o número de conídios por ml foi estimado. Concentrações em torno de 10^7 a 10^8 por ml foram obtidas, sendo 0,1 ml da suspensão de cada um dos mutantes semada em meio mínimo. No caso de mutantes com dupla deficiência, um dos respectivos suplementos foi adicionado ao meio mínimo. O

crescimento de colônias foi verificado após 96 horas de incubação.

3.12. Técnicas Genéticas (PONTECORVO et alii, 1953b)

3.12.1. Obtenção de heterocários

Os conídios de linhagens duplo auxotróficas foram misturadas em tubos de ensaio contendo meio mínimo líquido com meio completo líquido na proporção de 2 %. Após 5 a 9 dias de incubação, a película desenvolvida na superfície do líquido foi seca em papel de filtro esterilizado e transferida para placas de petri contendo meio mínimo sólido.

3.12.2. Isolamento de colônias prototróficas

Conídios foram coletados de setores heterocarióticos em solução de "Tween-80" e semeados em placas de petri contendo meio mínimo sólido. Foram utilizadas concentrações de 10^6 a 10^7 conídios por placa, sendo o número de conídios estimado em câmara de Neubauer. As placas foram incubadas por 5 a 7 dias. As colônias que cresceram isoladas, com coloração de conídios e morfologia uniformes, foram selecionadas e seus conídios transferidos para meio mínimo sólido através de semeadura. Após 4 a 6 dias foi observado o crescimento de colônias isoladas, que no critério seletivo adotado deveria ter a coloração de conídios e a morfologia semelhantes à colônia original.

3.12.3. Haploidização de colônias prototróficas (HASTIE, 1970)

Utilizou-se como agente haploidizante o benlate (metil-1-

(butilcarbamoil)-2-benzimidazol carbamato), nas concentrações de 0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 e 2,0 microgramas por ml de meio completo. Os possíveis diplóides foram inoculados por ponto nas placas de meio completo mais benlate.

3.13. Isolamento e regeneração de protoplastos

3.13.1. A partir da utilização do micélio (HAMLYN et alii, 1981 e BORGES, 1987)

Uma suspensão de conídios de *A.niger*, obtida de acordo com o item 3.6., foi diluída em solução salina 0,85 % para a concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios por ml.

Um ml dessa suspensão de conídios foi inoculado em erlenmeyers de 250 ml com 50 ml de meio completo líquido, incubados em agitador rotatório (150 rpm) durante 18 horas à 28 graus centígrados. Após esse período, o micélio foi filtrado à vácuo em papel de filtro e lavado com 10 ml de KCl 0,6, 0,7 ou 0,8 M; $MgSO_4$ 0,5 M ou Sorbitol 1,2 M. O peso úmido do micélio foi determinado e montado o seguinte sistema lítico (em erlenmeyer de 50 ml):

- a) solução osmótica (KCl 1,6, 1,4 ou 1,2 M; $MgSO_4$ 1,0 M ou Sorbitol 2,4 M) : 5,0 ml
- b) novozym 234 ("Novo Industries"): 12,5 mg
- c) Celulase CP ("John & Sturge"): 12,5 mg
- d) micélio úmido: 200 mg

Incubou-se durante 3 horas a 28 graus centígrados em agitador rotatório (150 rpm). Após as 3 horas, os protoplastos foram coletados através de centrifugação a $400 \times g/30$ segundos.

Utilizou-se o sobrenadante, sendo o precipitado descartado. O sobrenadante foi centrifugado à 2900 g/10 minutos e o precipitado lavado duas vezes (a 2900 x g/10 minutos) com o estabilizador em uso. Na última lavagem, o precipitado foi ressuspenso com 4 ml do estabilizador em uso e feita a contagem em câmara de Neubauer. Os protoplastos foram semeados em placas com meio de regeneração (meio completo+KCl 0,6 M; meio completo+KCl 0,7 M; meio completo+KCl 0,8 M; meio completo+MgSO₄ 0,5 M ou meio completo+Sorbitol 1,2 M) e incubados por 72⁴ horas. Após esse período, a viabilidade dos protoplastos foi estimada, sendo expressa através da taxa de regeneração dos mesmos.

3.13.2. A partir da utilização de tubos germinativos (GAMBINO et alii, 1984 e BORGES, 1987)

Uma suspensão de conídios de *A.niger*, obtida de acordo com o item 3.6., foi diluída em solução salina 0,85 % para a concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios/ml.

Um ml dessa suspensão de conídios foi inoculado em erlenmeyers de 250 ml com 50 ml de meio YGT (item 3.2.9.), incubados em agitador rotatório (150 rpm) durante 9 horas a 28 graus centígrados. Após esse período, os tubos germinativos foram filtrados à vácuo e lavados com 10 ml de água destilada esterilizada. O peso úmido dos tubos germinativos foi determinado e montado o seguinte sistema lítico (em erlenmeyer de 50 ml):

a) meio YG (item 3.2.10): 2,0 ml

b) solução osmótica (MgSO₄ 1,0 M ou Sorbitol 2,4 M): 2,0 ml

c) novozym 234 ("Novo Industries")⁴: 12,5 mg

d) celulase CP ("John & Sturge"): 12,5 mg

e) tubos germinativos: 200 mg

Incubou-se durante 1 hora a 28 graus centígrados em agitador rotatório (150 rpm). Os passos que sucederam estas etapas foram iguais aos já descritos no item 3.13.1., com exceção de que os protoplastos foram semeados em placas com os seguintes meios de regeneração: meio completo+MgSO₄ 1,0 M ou meio completo+Sorbitol 1,2 M.

3.13.3. Coloração de protoplastos (BORGES, 1987)

Duas a três gotas do precipitado obtido na primeira centrifugação (400 x g / 30 segundos) dos itens 3.13.1. e 3.13.2. foram colocadas em lâminas bem limpas, inclinadas aproximadamente 45 graus. Estas lâminas foram deixadas por 15 minutos à temperatura ambiente para secagem, sendo após esse período imersas, por 5 minutos, em metanol absoluto. Após, as lâminas foram parcialmente secas (a temperatura ambiente) e imersas em HCl 1 N por 2 minutos à 60 graus centígrados, lavadas em água corrente e água filtrada. Sobre a lâmina foi colocada uma camada de tampão fosfato 0,02 M pH 7,0, gotejando-se 3 a 5 gotas de Giemsa e deixando corar por 2 minutos. Lavou-se em água corrente e depois que as lâminas secaram fez-se a montagem com laminula.

3.13.4. Viabilidade de Protoplastos

Foram isolados protoplastos a partir da metodologia descrita no item 3.13.1., sendo que o estabilizador osmótico usado foi KCl 0,6 M. O volume final de 4,0 ml da suspensão de protoplastos foi dividido em três partes, sendo as mesmas

centrifugadas a $2900 \times g$ /10 minutos e o "pellet" ressuspenso com respectivamente 3,0 ml de KCl 0,6 M, KCl 0,9 M e KCl 1,2 M. As três suspensões de protoplastos foram armazenadas a 4 graus centígrados. Aliquotas de 0,5 ml foram retiradas depois de 1, 2, 3, 6 e 12 dias, semeadas em meio de regeneração (meio completo+KCl 0,6 M) e incubadas por 72 horas. Após esse período, a percentagem de protoplastos viáveis foi estimada a partir do controle de regeneração em KCl 0,6 M (tempo zero), sendo expressa através da taxa de regeneração dos mesmos.

3.14. Determinação da atividade celulolítica (YOSHIOKA et alii, 1982 e MANDELS et alii, 1976)

De acordo com o item 3.6., foram feitas suspensões de conídios de *A.niger* e *T.reesei* QM 9414. Estas suspensões foram diluídas em solução salina 0,85 % para a concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios/ml.

Três erlenmeyers de 125 ml com o meio de farelo de trigo (item 3.2.12.) foram inoculados com 1 ml cada, dessa suspensão de conídios e incubados 96 horas a 28 graus centígrados. Após esse período, a extração das enzimas celulolíticas foi realizada com 30 ml de água destilada (a 4 graus centígrados) por frasco. Os frascos permaneceram num banho de gelo durante 4 horas, sendo o seu conteúdo agitado com um bastão de vidro de 40 em 40 minutos. Feita a extração, o material foi filtrado em funil com gaze, sendo o filtrado centrifugado a $12000 \times g$ /30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi conduzido aos ensaios enzimáticos e a dosagem de proteínas. Todas as análises

espectrofotométricas foram feitas num espectrofotômetro da marca Micronal B-382. Em todos os ensaios enzimáticos a glicose foi utilizada como padrão (Figura 4A) e a atividade enzimática expressa como número de atividades por mg de proteínas totais. Definiu-se a unidade enzimática como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 micromol de açúcar redutor por minuto.

3.14.1. Determinação da atividade de Beta-Glicosidase (EC. 3.2.1.2.1.)

O sistema para a determinação da atividade de Beta-Glicosidase foi feito em tubos de ensaio contendo por tubo: 2,5 ml de solução de salicina 1 % (item 3.2.30) acrescidos de 2,5 ml do sobrenadante obtido no item 3.14. mais uma gota de tolueno. Este tubos foram incubados em banho-maria a 50 graus centígrados. Em tempos determinados, uma aliquota de 1,0 ml foi retirada de cada tubo e misturada com 1,0 ml de DNS, homogeneizado em vortex e levado a um banho de água fervente por cinco minutos. Em seguida, o material foi esfriado e adicionados 14 ml de água destilada, sendo a leitura realizada em 540 nanômetros ("Blanck" = tempo 0).

3.14.2. Determinação da atividade de Carboximetilcelulase (EC. 3.2.1.4.)

O sistema para a determinação da atividade de carboximetilcelulase foi feito em tubos de ensaio contendo por tubo: 2,5 ml de tampão citrato 0,05 M pH 4,8 acrescidos de 2,5 ml do sobrenadante obtido no item 3.14. mais 50 mg de CMC (Fluka AG,

Chem.Fab.) mais uma gota de tolueno. Os passos que sucederam estas etapas foram iguais aos já descritos no item 3.14.1.

3.14.3. Determinação da atividade de Avicelase (EC. 3.2.1.91.)

O sistema para a determinação da atividade de avicelase foi feito em tubos de ensaio contendo por tubo: 2,5 ml de tampão citrato 0,05 M pH 4,8 mais 2,5 ml do sobrenadante obtido no item 3.14. mais 50 mg de celulose microcristalina (Cellulose D-microcrystalline, Avicel, Riedel-de Haen) mais uma gota de tolueno. Os passos que sucederam estas etapas foram iguais aos já descritos no item 3.14.1.

3.14.4. Determinação da atividade do Papel de Filtro modificada ("Filter Paper Activity - FPA" modificado)

O sistema para a determinação da atividade de papel de filtro foi feito em tubos de ensaio contendo por tubo: 5,0 ml de tampão citrato 0,05 M pH 4,8 mais 2,5 ml do sobrenadante obtido no item 3.14. mais 0,1 g de papel de filtro Whatman número 1 mais uma gota de tolueno. Os passos que sucederam estas etapas foram iguais aos já descritos no item 3.14.1.

3.15. Dosagem de Proteínas (LOWRY et alii, 1959)

Uma aliquota de 1,0 ml do sobrenadante obtido no item 3.14. foi misturada com 2,5 ml de álcool etílico absoluto e deixada durante aproximadamente 12 horas a 6 graus centígrados. Após esse período, o material foi centrifugado a 700 x g/15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado colocado em banho-maria por um minuto, sendo após esse período ressuspenso

Figura 4 - Curvas-padrão de Soroalbuminabovina-SAB (A) e Glicose (B).

com 1,0 ml de NaOH 1,0 N.

A dosagem das proteínas foi feita da seguinte maneira:

Vol.sobren. após precip. (ml)	Sol.B (item 3.2.31.2.) (ml)	Folin (item 3.2.31.1.) (ml)	H ₂ O destil. (ml)
0 ("Blanck")	5,0	0,5	1,0
0,1	5,0	0,5	0,9
0,2	5,0	0,5	0,8

Após a adição da solução B, os tubos foram agitados e permaneceram 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, o reagente de Folin foi adicionado, os tubos foram agitados e permaneceram 30 minutos à temperatura ambiente. Foi feita a leitura da absorbância a 660 nm. A soroalbumina bovina ("Cryst. research grade > 99,0 % - SERVA") foi utilizada como padrão (Figura 4B) e a concentração de proteínas expressa como mg/ml.

3.16. Técnicas Eletroforéticas (LAEMMLI, 1970 e PACCOLA-MEIRELLES et alii, 1988)

3.16.1. Preparo da amostra para a eletroforese com revelação específica para esterases

De acordo com o item 3.6., foram feitas suspensões de mutantes de *A.niger*, assim como dos possíveis diplóides obtidos a

partir da metodologia descrita no item 3.12.. Uma aliquota destes conídios foi cultivada em frascos de 250 ml com 50 ml de meio completo líquido. Após a incubação por 72 horas, a película formada foi filtrada à vácuo em filtro de Buchner e lavada três vezes com água destilada. O micélio foi levemente seco com papel de filtro e pesado. Para cada 300 mg de micélio foi adicionado 1,0 ml de tampão do gel empilhador (item 3.2.34.3.). O micélio foi triturado em homogeneizador elétrico e deixado em banho de gelo durante 12 horas. Em seguida o extrato foi centrifugado a $12000 \times g$ /20 minutos. Uma parte do extrato proteico (0,5 ml) foi misturada com uma parte do tampão da amostra (0,5 ml) (item 3.2.34.5.). Foram aplicados 50 microlitros de cada amostra nas canaletas do gel. A eletroforese foi feita em 100 Volts até o material atingir o gel separador; a partir deste ponto a voltagem foi alterada para 200 Volts até o final da corrida (aproximadamente 3 horas).

3.16.2. Revelação da atividade de esterases em eletroforese

O gel de poliacrilamida foi imerso na solução do corante para a caracterização de esterases (item 3.2.34.11.) por 15 minutos a temperatura ambiente até as bandas aparecerem. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada e fixado em uma solução aquosa de glicerol 10 % v/v.

3.16.3. Preparo da amostra para eletroforese com revelação específica para celulasas

Uma aliquota de 0,5 ml dos sobrenadantes de *A.niger* ou

T. reesei QM 9414 (item 3.14.) foi misturada com 0,5 ml do tampão da amostra (item 3.2.35.5.). Foram aplicados 50 microlitros de cada amostra por cavidade do gel. Os passos que sucederam estas etapas foram iguais aos já descritos no item 3.16.1.

3.16.4. Revelação da Atividade Celulolítica em Eletroforese (TEATHER & WOOD, 1982 e SHEIR-NEISS & MONTENECOURT, 1984)

Após a eletroforese (item 3.14.), um outro gel de 1 % de agarose mais 1 % de carboximetilcelulose (Fluka AG, Chem. Fab.) foi cuidadosamente colocado sobre o gel de poliacrilamida e incubado 30 minutos a 50 graus centígrados. Após este período, o gel de agarose mais carboximetilcelulose foi imerso em uma solução de Vermelho Congo 0,1 % por 15 minutos e então lavado com NaCl 1 M.

3.16.5. Fixação e Coloração das Proteínas totais na Eletroforese

O gel de poliacrilamida foi imerso na solução do corante Coomassie-Blue G-250 (item 3.2.35.9.) por uma noite. Após este período, o gel foi sucessivamente descorado com o descorante do item 3.3.35.10. por 48 horas.

3.17. Análise Estatística

Para a verificação do crescimento de *A.niger* em diferentes meios de cultivo (item 3.5.), foi realizada a análise de variância da medida dos diâmetros das colônias crescidas nos diferentes meios. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (GOMES, 1985).

No caso da dosagem enzimática (item 3.15.), o delineamento experimental utilizado foi um fatorial inteiramente casualizado (GOMES, 1985).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Verificação do crescimento em diferentes meios de cultivo

Em estudos genéticos de microrganismos é importante a definição de meios de cultivo mínimo e completo, tendo em vista por exemplo trabalhos com a obtenção de mutantes auxotróficos e complementação de marcas genéticas. A Tabela 6 apresenta os resultados do crescimento de *A.niger* em diferentes meios de cultivo, enquanto a Tabela 7 apresenta a análise de variância deste experimento. De acordo com a Tabela 6, não houve diferença significativa ao nível de 5 % pelo teste Tukey, entre o crescimento radial obtido no Meio Completo (MC) (PONTECORVO et alii, 1953b) e no meio Sabouraud; os crescimentos radiais nos meios Czapek e "Corn Meal" (CM) também não mostraram diferença significativa. Optou-se pela utilização do MC descrito por PONTECORVO et alii (1953) como o meio completo para o crescimento de *A.niger*. Embora no meio Czapek tenha havido um crescimento radial superior ao do Meio Mínimo descrito por PONTECORVO (1953b), foi feita a opção pelo MM como o meio mínimo para o crescimento de *A.niger* porque neste meio a esporulação ocorreu 24 horas antes e em maior número do que no meio Czapek.

4.2. Verificação do número de núcleos por conídio

A partir da avaliação de 500 conídios de *A.niger*, obteve-se uma frequência de 21,4 % de conídios uninucleados, 77,2 % de conídios binucleados e 1,4 % de conídios trinucleados. A Figura 5 mostra a coloração dos núcleos de conídios de *A.niger*.

Tabela 6 - Crescimento de *A.niger* em diferentes meios de cultura.

	Tempo (horas) *					
	24	48	72	96	120	144
MM	4,3	16,0	27,3	35,3	42,6	57,5 c
CZAPEK	0	19,3	35,0	49,6	62,0	76,3 b
MC	7,7	22,7	54,0	78,0	89,0	89,0 a
BDA	9,7	34,0	54,0	63,3	68,6	76,3 b
CM	7,7	30,3	34,6	46,5	57,5	70,0 b
SABOURAUD	9,0	37,5	62,5	75,5	80,5	85,0 a

MM=meio mínimo; MC=meio completo; BDA= batata-glucose-ágar;
 CM= "corn meal"

* Os resultados são expressos em mm

* * Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao
 nível de 5 % pelo teste Tukey

Tabela 7 - Análise de variância do crescimento de *A.niger* em diferentes meios de cultura.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Meios	5	1883,65	376,73	3,11**
Resíduo	12	137,92	11,49	
Total	17	2021,57		

C.V. = 4,5 %

* * significativo ao nível de 5 % pelo teste Tukey

Figura 5 - Coloração de conídios de *A.niger* (aumento de 200 X)

4.3. Verificação da Estabilidade Genética

Segundo BONATELI (1977), a instabilidade genética em microrganismos industriais pode ser dividida em dois tipos: no primeiro, a instabilidade estaria ligada a variações na produção de um determinado metabólito por uma mesma linhagem quando são feitas diversas fermentações, sendo caracterizada por flutuações na produção; no segundo tipo, seria devido ao aparecimento, em determinada linhagem, de derivativos com produção alterada, frequentemente com diminuição acentuada da produção. No presente estudo foi dada ênfase a ocorrência do segundo tipo de instabilidade. Segundo BALL (1985), várias podem ser as causas deste tipo de instabilidade: diploidia parcial ou total, duplicações, mutações instáveis, fatores citoplasmáticos, sequências de inserção etc. Ainda segundo o mesmo autor, a estabilidade genética é de fundamental importância nos processos de bioconversão à nível industrial.

A partir da metodologia descrita no item 3.9., não foram observados setores em todas as 100 colônias ensaiadas em placas de petri com meio completo, demonstrando assim que esta linhagem de *A.niger* possui uma boa estabilidade genética.

4.4. Sobrevivência à Mutagênicos

Segundo BURNETT (1975), geralmente é verificado que um efetivo rendimento de mutantes é somente conseguido quando a proporção de sobreviventes do material exposto ao agente mutagênico é muito baixa, assim como 1 a 5 % ou menor ainda.

Assim, foram determinados no presente trabalho a dose ou o tempo de tratamento adequados para a obtenção de mutantes, que proporcionasse aproximadamente 5 % de sobrevivência de conídios de *A.niger*.

4.4.1. Sobrevivência à Radiação Gama

A Tabela 8 e a Figura 6A mostram os dados referentes a curva de sobrevivência de conídios de *A.niger* à radiação gama. A percentagem de 5 % de sobrevivência foi obtida aproximadamente com um tratamento de 800 Gray. FUNGARO (1984), trabalhando com os conídios de uma linhagem de *A.niger*, observou uma dose de radiação, suficiente para a obtenção de 5 % de sobrevivência, comparável à obtida com a linhagem utilizada no presente trabalho.

4.4.2. Sobrevivência à Luz Ultravioleta

A Tabela 9 e a Figura 6B mostram os dados referentes a curva de sobrevivência de conídios de *A.niger* à luz ultravioleta. A percentagem de 5 % de sobrevivência foi obtida aproximadamente aos 10 minutos de tratamento. A linhagem utilizada no presente trabalho demonstrou ser mais sensível à luz ultravioleta do que a linhagem 10V10 de *A.niger*, que apresentou 5 % de sobrevivência aproximadamente aos 25 minutos de tratamento. Mesmo assim, o tempo de tratamento obtido com a linhagem NRRL-337 foi bem superior àquele obtido para *Aspergillus nidulans* (PIZZIRANI-KLEINER, 1981) e *Metarhizium anisopliae* (BAGALHI, 1987). Isso é

explicado a partir do fato de que a irradiação ultravioleta é um poderoso agente mutagênico para fungos com esporos hialinos, não o sendo para aqueles com esporos fortemente pigmentados, como é o caso de *A.niger* (BURNETT, 1975).

4.4.3. Sobrevivência ao Ácido Nitroso

A Tabela 10 e a Figura 7A mostram os dados referentes à curva de sobrevivência de conídios de *A.niger* ao ácido nitroso. A percentagem de 5 % de sobrevivência foi obtida aproximadamente aos 80 minutos de tratamento. Comparando-se este tempo de tratamento com os 10 minutos obtidos por PIZZIRANI (1977) para o tratamento de conídios de *Aspergillus nidulans* com o mesmo agente mutagênico, pode-se afirmar que *A.niger* apresenta uma grande resistência ao ácido nitroso.

4.4.4. Sobrevivência ao Dietilsulfato (DES)

A Tabela 11 e a Figura 7B mostram os dados referentes à curva de sobrevivência de conídios de *A.niger* ao DES. A percentagem de 5 % de sobrevivência foi obtida aproximadamente aos 90 minutos de tratamento. Quando estes resultados são comparados com aqueles obtidos por DUARTE (1971), que tratou conídios de *Aspergillus nidulans* com DES, verifica-se que *A.niger* mostra uma resistência aproximadamente três vezes maior a este agente mutagênico do que *A.nidulans*.

Tabela 8 - Percentagem de conídios de *A.niger* sobreviventes a radiação gama (os dados constituem a média de três repetições)

Dose (Gray)	Conídios viáveis/ml	% relativa de sobrevivência
0	$3,5 \times 10^6$	100,00
100	$2,5 \times 10^6$	71,43
200	$1,9 \times 10^6$	54,29
400	$7,2 \times 10^5$	20,57
800	$7,6 \times 10^4$	2,17
1000	$2,8 \times 10^4$	0,80

Tabela 9 - Percentagem de conídios de *A.niger* sobreviventes
à luz ultravioleta (os dados constituem
média de três repetições)

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml	% relativa de sobrevivência
0	$2,3 \times 10^4$	100,00
1	$1,6 \times 10^4$	69,57
2	$1,5 \times 10^4$	65,21
4	$1,0 \times 10^4$	43,48
8	$1,5 \times 10^3$	6,52
16	$3,5 \times 10^2$	1,52

Tabela 10 - Percentagem de conídios de *A.niger* sobreviventes
ao ácido nitroso (os dados constituem a média de três
repetições)

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml	% relativa de sobrevivência
0	$2,0 \times 10^5$	100,00
20	$1,8 \times 10^5$	90,00
40	$1,0 \times 10^5$	50,00
80	$6,5 \times 10^3$	3,25
120	$5,5 \times 10^2$	0,28
160	$3,0 \times 10^2$	0,15

Tabela 11 - Percentagem de conídios de *A.niger* sobreviventes

ao DES (os dados constituem a média de três repetições)

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml	% relativa de sobrevivência
0	$1,5 \times 10^6$	100,00
30	$1,1 \times 10^6$	73,33
60	$5,6 \times 10^5$	37,33
90	$2,1 \times 10^5$	14,00
120	$1,1 \times 10^3$	0,07
150	0	0,00

Figura 6 - Curva de sobrevivência de conídios de *A.niger* a mutagênicos físicos. A. Radiação Gama; B. Luz Ultravioleta.

Figura 7 - Curva de sobrevivência de conídios de *A.niger* a mutagênicos químicos. A. Acido Nitroso ; B. DES.

4.5. Obtenção de Mutantes Auxotróficos e Morfológicos

4.5.1. Mutantes Auxotróficos e Morfológicos obtidos com Radiação Gama através de isolamento total e enriquecimento por filtração

A nomenclatura utilizada para a classificação dos mutantes isolados foi a seguinte: RGIT - isolamento total e RGEF - enriquecimento por filtração. O tempo adequado para o enriquecimento por filtração foi previamente determinado como sendo de 12 horas, de acordo com a metodologia do item 3.11.2.

A Tabela 12 e a Figura 8 mostram os mutantes morfológicos obtidos. Foram isolados sete mutantes morfológicos, sendo quatro relativos a coloração dos conídios, dois relativos ao arranjo do conidióforo e um à morfologia colonial.

A Tabela 13 apresenta os mutantes auxotróficos isolados com uma deficiência simples. Foram isolados onze mutantes auxotróficos simples, sendo que os mutantes RGIT-172, RGIT-173 e RGIT-217 apresentam também marcas morfológicas. A Tabela 14 mostra os mutantes auxotróficos isolados com uma dupla deficiência. Foram isolados quinze mutantes auxotróficos com dupla deficiência.

O rendimento obtido no isolamento total foi de 0,52 %, enquanto que, no enriquecimento por filtração foi de 2,0 a 4,8 vezes maior. Estes últimos valores são coerentes com os dados verificados para *Ophiostoma multiannulatum* (FRIES, 1947), *Aspergillus awamori* (FUNGARO, 1984) e *Metarhizium anisopliae* (SILVEIRA & AZEVEDO, 1984 e BAGALHI, 1987). No entanto estes valores são bem superiores àqueles obtidos para o isolamento de

mutantes auxotróficos em *A.niger* 10V10 por BONATELLI et alii (1982) e MASIERO (1988).

Em relação a técnica do enriquecimento por filtração, não foi observada uma predominância de mutantes com requisito para aminoácidos, como relatado por SILVEIRA & AZEVEDO (1984) e BAGALHI (1987). SILVEIRA & AZEVEDO (1984) e FUNGARO (1984) citam também que a obtenção de mutantes a partir desta técnica foi ineficiente para o isolamento de mutantes com deficiência para vitaminas, já que estes autores não obtiveram estas marcas com este método. No presente trabalho, isso não foi observado já que foram isolados, a partir do enriquecimento por filtração, mutantes com deficiência respectivamente para biotina e ácido nicotínico (Tabela 14). Possivelmente, estas características devem estar ligadas ao material biológico utilizado, não sendo devidas ao método empregado.

4.5.2. Teste de Reversão

A maioria dos mutantes auxotróficos ensaiados apresentou uma taxa de reversão menor que um em 10^6 a 10^7 conídios por ml. Os mutantes RGEF-115, RGIT-171 e RGEF-211 apresentaram uma maior taxa de reversão, ou seja, maior que um em 10^6 a 10^7 conídios por ml (Tabela 15). Os resultados demonstram uma boa estabilidade genética nos mutantes auxotróficos obtidos.

Tabela 12 - Mutantes morfológicos de *A.niger* obtidos através de
irradiação com raios gama

Mutantes	Fenótipo
RGEF-1	a coloração dos conídios é marrom escuro
RGIT-2	a coloração dos conídios é marrom médio
RGIT-1	a coloração dos conídios é marrom claro
RGIT-217 *	a coloração dos conídios é branca
RGIT-4	o arranjo dos conidióforos é menos espaçado
RGIT-5	o arranjo dos conidióforos é menos espaçado
RGEF-3	o diâmetro da colônia é reduzido

* o mutante RGIT-217 possui uma deficiência auxotrófica para
leucina

Figura 8 - Mutantes morfológicos de *A.niger* (5 dias de crescimento a 28 ° C). A. Linhagem Selvagem; B. RGEF-1; C. RGIT-2; D. RGIT-1; E. RGIT-217; F. RGIT-4; G. RGIT-5 e H. RGEF-3.

Tabela 13 - Mutantes auxotróficos simples de *A.niger* obtidos através de irradiação com raios gama

Mutantes	Fenótipo *
RGIT-16	pro1
RGIT-23	ths1
RGIT-31	ade1
RGEF-10	arg1
RGEF-11	nic1
RGEF-25	bio1
RGEF-30	cit1
RGEF-41	leu1
RGIT-172	pro1 mcl
RGIT-173	pro1 mes
RGIT-217	leu2 bra

* Os simbolos ade, arg, bio, cit, leu, pro e ths representam respectivamente deficiências nutricionais para adenina, arginina, citosina, leucina, prolina e tiosulfato, enquanto os simbolos mcl, mec e bra representam respectivamente a coloração de conídios marrom claro, marrom escuro e branco.

Tabela 14 - Mutantes auxotróficos duplos de *A.niger* obtidos através de irradiação com raios gama

Mutantes	Fenótipo *	Descendência
RGEF-110	bio1 arg1	RGEF-25
RGEF-112	bio1 lis1	RGEF-25
RGEF-120	bio1 lev1	RGEF-25
RGEF-115	leu1 lev2	RGEF-41
RGEF-127	leu1 ths1	RGEF-41
RGIT-151	leu1 bio2	RGEF-41
RGIT-157	leu1 arg2	RGEF-41
RGIT-211	leu1 lis2	RGEF-41
RGIT-213	leu1 nic1	RGEF-41
RGIT-158	pro1 met1	RGIT-16
RGIT-171	pro1 phe1	RGIT-16
RGIT-191	pro1 arg3	RGIT-16
RGIT-196	pro1 bio3	RGIT-16
RGIT-206	pro1 mcl lis3	RGIT-16
RGIT-209	pro1 mcl met2	RGIT-16

* Os símbolos arg, bio, lev, leu, lis, met, nic, pro, phe e ths representam respectivamente deficiências nutricionais para arginina, biotina, extrato de levedura, leucina, lisina, metionina, ácido nicotínico, prolina, fenilalanina e tiosulfato, enquanto o símbolo mcl representa a coloração de conídios marrom claro.

Tabela 15 - Teste de reversão de mutantes de *A.niger*

Mutantes	Frequência de reversão em 10 ⁶ a 10 ⁷ conídios/ml
RGEF-16	< 1
RGEF-23	< 1
RGEF-31	< 1
RGEF-11	< 1
RGEF-25	< 1
RGEF-30	< 1
RGEF-41	< 1
RGEF-110	< 1
RGEF-112	< 1
RGEF-120	< 1
RGEF-115	> 1
RGEF-127	< 1
RGIT-151	< 1
RGIT-157	< 1
RGIT-211	> 1
RGIT-213	< 1
RGIT-158	< 1
RGIT-171	> 1
RGIT-191	< 1
RGIT-196	< 1
RGIT-206	< 1
RGIT-209	< 1

4.6. Obtenção de diplóides

No presente trabalho foi feita a tentativa de obtenção de diplóides através da verificação da ocorrência do ciclo parassexual nesta linhagem. A sequência de eventos deste ciclo pode ser sumarizada da seguinte forma: a) fusão de núcleos (formação do diplóide); b) recombinação mitótica e c) haploidização (BURNETT, 1975). Segundo FINCHAM et alii (1979), existem dois critérios que são geralmente usados para o isolamento de diplóides a partir do ciclo parassexual: a obtenção de setores que apresentam segregação dos marcadores - isto naturalmente ou através da indução com agentes haploidizantes - e a medição do tamanho dos conídios, já que haplóides podem ser distinguidos de diplóides pelo tamanho dos seus conídios.

A Tabela 16 mostra os cruzamentos efetuados entre diferentes mutantes de *A.niger*, enquanto a Figura 9 mostra heterocários originados destes cruzamentos. A partir da metodologia descrita no item 3.12.2., foram selecionadas em meio mínimo aproximadamente cinco colônias de cada heterocário. Nestas colônias foi tentada a haploidização através do uso de benlate (item 3.12.3.). Estas colônias, tidas como possíveis diplóides, não apresentaram setores em presença de benlate.

Foi também feita a medida do diâmetro dos conídios dos mutantes parentais e dos prováveis diplóides, obtidos nos cruzamentos realizados (Tabela 16). Não foi constatada diferença no tamanho das diferentes classes de conídios. Segundo ROSIM et alii (1978), existem algumas evidências de que este critério de medição do tamanho de conídios - como diferenciação entre

Figura 9 - Heterocários de *A.niger* obtidos através do cruzamento dos mutantes RGIT-127 x RGIT-171 (à esquerda) e RGIT-112 x RGIT-171 (à direita).

Tabela 16 - Cruzamentos realizados entre diferentes mutantes de
A.niger.

Cruzamentos	no de conídios por 6 placa de MM (x 10)	Presença de heterocários
RGIT-127 x RGIT 206 (leu1 ths1 x pro1 mcl lis3)	2,80	+
RGIT-127 x RGIT-171 (leu1 ths1 x pro1 phe1)	2,12	+
RGIT-112 x RGIT-171 (bio1 lis1 x pro1 phe1)	1,00	+
RGIT-171 x RGIT-217 (pro1 phe1 x leu2 bra)	1,00	+
RGIT-211 x RGIT-209 (leu1 lis2 x pro1 mcl met2)	2,15	+
RGIT-211 x RGIT-213 (leu1 lis2 x pro1 met1)	1,38	+
RGIT-206 x RGIT-217 (pro1 mcl lis3 x leu2 bra)	1,50	+

haplóides e diplóides - não é muito válido em *Aspergillus niger*. Estes autores determinaram as diferenças de tamanho de conídios em haplóides, diplóides e heterocários de três linhagens de *A.niger*. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a classificação de linhagens haplóides e diplóides de *A.niger* com base no tamanho de conídios não é confiável.

BONATELLI (1977) descreve uma situação semelhante a ocorrida: em diversos cruzamentos efetuados entre mutantes de *A.niger* 10V10, não houve crescimento de colônias que pudessem ser classificadas como diplóides; no entanto, houve crescimento residual e de algumas colônias isoladas, que revelaram ser heterocarióticas. Diferentemente, as colônias isoladas de cada cruzamento entre os mutantes de *A.niger* NRRL-337 não parecem ser heterocarióticas já que não apresentam, quando semeadas em meio completo, setores não-recombinantes derivados da segregação dos núcleos dos tipos parentais.

A partir dos resultados obtidos, colocam-se assim as seguintes possibilidades: a) não houve a formação de heterocário, mas sim um processo de sintrofismo durante a combinação dos conídios na tentativa de cruzamento, ou, b) houve obtenção de colônias diplóides, sendo que estas possuem uma alta estabilidade genética (nesse caso o uso de benlate não conseguiu induzir a haploidização).

A hipótese do sintrofismo foi ensaiada da seguinte maneira: os conídios dos diferentes mutantes usados em cada cruzamento (Tabela 16) foram semeados em placas com meio mínimo 5×10^{-1} (aproximadamente 10^5 conídios . ml⁻¹ por mutante por placa) e

incubados 7 dias a 28 graus centígrados. A semeadura foi feita de forma a representar cada cruzamento da Tabela 16. Após o período de incubação, não houve crescimento em qualquer das placas com meio mínimo. Desta forma, realmente ocorreu a formação de heterocário nos cruzamentos efetuados, descartando assim a hipótese do sintrofismo.

No caso da hipótese de colônias diplóides altamente estáveis, seria interessante a utilização de outros agentes haploidizantes, como por exemplo o para-fluorfenilalanina e o cloroneb (LHOAS, 1961 e AZEVEDO et alii 1977), com o intuito da verificação da ocorrência de setores recombinantes, nos possíveis diplóides selecionados. Como não foi possível a obtenção deste agentes haploidizantes, optou-se por uma outra metodologia para a avaliação do estado de ploidia das colônias selecionadas. Segundo PACCOLA-MEIRELLES et alii (1988), a eletroforese, principalmente de perfis isoenzimáticos, permite em fungos a verificação da presença do estado diplóide de bandas específicas aos tipos parentais. Ainda segundo os mesmos autores, esta técnica é de grande valia para a caracterização desses diplóides intra ou interespecíficos obtidos por meio de técnicas convencionais, ou por fusão de protoplastos.

Com o objetivo de se averiguar a existência de diplóides altamente estáveis entre os clones de possíveis diplóides selecionados, foram feitas eletroforeses em gel de poliacrilamida, com revelação específica para esterases (Item 3.16.2.), de todos os cruzamentos realizados (Tabela 16). A Figura 10 mostra uma dessas eletroforeses feita a partir do

cruzamento RGIT-206 x RGIT-217. Não houve diferença entre o padrão de distribuição de alfa e beta esterases entre as colônias tidas como diplóides e os respectivos mutantes parentais. Todas as eletroforeses realizadas apresentaram o mesmo padrão de distribuição de bandas da Figura 10. Também não ocorreram bandas com maior densidade do que aquelas dos tipos parentais. Desta forma, não foi possível através dessa metodologia definir-se a ocorrência de diplóides.

Uma outra possibilidade que poderia ser levantada é que a metodologia utilizada para a constatação da parassexualidade nesta linhagem não é a adequada. Esta possibilidade parece ser extremamente remota já que o método descrito por ROPER (1952), foi usado com sucesso em *Aspergillus niger* por PONTECORVO (1952), PONTECORVO et alii (1953a e b), LHOAS (1961 e 1967), CHANG & TERRY (1973), BONATELLI (1981, 1982 e 1983), VALENT (1985) e MASIERO (1988). Por outro lado, o processo de seleção em meio mínimo, utilizado no presente trabalho, poderia estar selecionando recombinantes prototróficos haplóides. Estes recombinantes seriam produzidos a partir de um núcleo diplóide altamente instável. Neste processo - o qual foi denominado parameiose por BONATELLI et alii (1983) -, estes núcleos diplóides heterozigotos apresentariam uma alta taxa de recombinação e haploidização ainda em estágio de hifas heterocarióticas, devido a sua instabilidade. Este fenômeno já foi descrito em relação a *A.niger* (BONATELLI et alii, 1983) e *Metarhizium anisopliae* (BAGALHI, 1987), sendo possível sua ocorrência na instabilidade de diplóides observada

206= mutante parental RGIT-206

217= mutante parental RGIT-217

1 = possível diplóide 1

2 = possível diplóide 2

3 = possível diplóide 3

4 = possível diplóide 4

5 = possível diplóide 5

6 = heterocário

Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida, com revelação específica para esterases, do cruzamento RGIT-206 x RGIT-217.

em outras espécies como *Penicillium patulum* e *Cephalosporium acremonium* (CALAM et alii, 1973 e BALL & HAMLYN, 1982).

Posteriores estudos genéticos realizados na linhagem NRRL-337 de *A.niger* poderiam ser feitos levando-se em consideração a utilização de diferentes estratégias de seleção dos conídios derivados dos heterocários.

Segundo BALL (1984), existem poucos estudos básicos de mutagênese em microorganismos de interesse industrial. Geralmente, extrapolações são feitas a partir de estudos realizados em organismos modelos. BOS (1987) cita também que a genética básica de *Aspergillus niger* permanece mal explorada, apesar da importância biotecnológica desta espécie de fungo. Levando-se em consideração a potencialidade industrial da linhagem NRRL-337 - que é inclusive usada na produção de amilase, como já foi anteriormente citado -, os resultados obtidos contribuíram para o melhor conhecimento da genética básica desta espécie.

4.7. Isolamento e Regeneração de Protoplastos

As Tabelas 17 e 18 apresentam os resultados referentes ao isolamento e a regeneração de protoplastos de *A.niger*. O protocolo em que foi isolado o maior número de protoplastos foi aquele usado por HAMLYN et alii (1981) com KCl 0,6 M ($3,25 \times 10^{-7}$ protoplastos . ml⁻¹). Segundo DAVIS (1985), um grande número de estabilizadores osmóticos, que incluem sais inorgânicos, açúcares e açúcares alcoólicos, tem sido usados como estabilizadores no isolamento de protoplastos de fungos. É bem conhecido que o tipo

Tabela 17 - Isolamento e regeneração de protoplastos de *A.niger* obtidos a partir da protoplastização do micélio (HAMLIN et alii, 1981)

Concentração dos Estabilizadores	Número de Protoplastos (X 10 ⁶ . ml ⁻¹)	Meios de Regeneração	Porcentagem de Regeneração
KCl 0,6 M	32,5	meio completo + KCl 0,6 M	11,40
KCl 0,7 M	10,0	meio completo + KCl 0,7 M	19,50
KCl 0,8 M	5,6	meio completo + KCl 0,8 M	2,30
MgSO ₄ 0,5 M	0,6	meio completo + MgSO ₄ 0,5 M	14,30
Sorbitol 1,2 M	2,5	meio completo + Sorbitol 1,2 M	23,30

Tabela 18 - Isolamento e regeneração de protoplastos de *A.niger* obtidos a partir da protoplastização de tubos germinativos (GAMBINO et alii, 1984)

Concentração dos Estabilizadores	Número de Protoplastos (X 10 ⁶ . ml ⁻¹)	Meios de Regeneração	Porcentagem de Regeneração
MgSO ₄ 0,5 M	0,83	meio completo + MgSO ₄ 0,5 M	53,30
		meio completo + Sorbitol 1,2 M	58,00
Sorbitol 1,2 M	3,30	meio completo + MgSO ₄ 0,5 M	5,40
		meio completo + Sorbitol 1,2 M	6,40

e a concentração do estabilizador podem influenciar tanto o rendimento como a estabilidade dos protoplastos, dependendo também do organismo. Não existe nenhum estabilizador "universal" disponível para todas as espécies de fungos (DAVIS, 1985). Em geral, sais inorgânicos são mais apropriados para o isolamento de protoplastos de fungos filamentosos que açúcares, sendo que açúcares alcoólicos são mais apropriados para leveduras (DAVIS, 1985). Isto tem sido confirmado por MUSILKOVA & FENCL (1968), DAVIS et alii (1977), THOMAS & DAVIS (1980), HAMLYN et alii (1981), ROKEM et alii (1986) e BORGES (1987), em relação a diferentes linhagens de *Aspergillus niger*. Isto foi confirmado também em relação a linhagem de *A.niger* utilizada no presente trabalho, já que maiores rendimentos foram obtidos com o uso do estabilizador osmótico KCl do que com o estabilizador Sorbitol e $MgSO_4$. Por outro lado, o estabilizador Sorbitol proporcionou maior número de protoplastos do que o estabilizador $MgSO_4$, durante a protoplastização do micélio (Tabela 17).

BORGES (1987) obteve um maior rendimento de protoplastos com $MgSO_4$ 0,5 M a partir do uso de tubos germinativos de *A.niger* 10V10 (GAMBINO et alii, 1984). Como este protocolo utiliza juntamente com a enzima - e na presença do estabilizador osmótico - um pequeno volume de "Tween-80", a autora concluiu que a presença deste detergente certamente favoreceu a obtenção de um maior número de protoplastos. Como pode ser verificado na Tabela 18, o rendimento com o uso de tubos germinativos, a partir do protocolo de GAMBINO et alii (1984), foi menor que aquele obtido em todas as concentrações do estabilizador KCl

usadas no isolamento de protoplastos a partir do micélio (Tabela 17). Desta forma, o uso de "Tween-80" não favoreceu, na linhagem de *A.niger* utilizada no presente trabalho, a obtenção de um maior rendimento no número de protoplastos.

A definição de protocolos em que se obtenham maiores rendimentos no isolamento de protoplastos é essencial para o sucesso das técnicas de transformação genética e fusão de protoplastos em fungos filamentosos. Levando-se em consideração os resultados obtidos, o protocolo mais apropriado para estes estudos é aquele em que os protoplastos foram isolados a partir do micélio com o uso do estabilizador KCl 0,6 M.

Segundo PEBERDY (1979a), o processo de reconstituição da parede e subsequente regeneração tem sido o aspecto de protoplastos de fungos mais intensivamente estudado. Uma frequência de regeneração de 100 % nunca foi relatada, sendo que esta pode ser bastante variável em uma única espécie (PEBERDY, 1979b). Não se conhecem as razões pelas quais a frequência de regeneração é tão variável. No presente trabalho, as maiores taxas de regeneração foram obtidas a partir do protocolo de GAMBINO et alii (1984), usando como estabilizador osmótico $MgSO_4$ 0,5 M durante a protoplastização de tubos germinativos (Tabela 18). Embora BORGES (1987) tenha relatado que Sorbitol 1,2 M também estimulou a regeneração de protoplastos em *A.niger* 10V10 isolados a partir de tubos germinativos, só foi apresentada regeneração com o estabilizador $MgSO_4$ quando os protoplastos foram isolados com Sorbitol 1,2 M mais 50 mM de $MgSO_4$. No presente trabalho, não existe explicação plausível para as baixas

taxas de regeneração obtidas quando os protoplastos foram isolados na presença de Sorbitol 1,2 M e regenerados em $MgSO_4$ 0,5 M ou Sorbitol 1,2 M (Tabela 18).

A partir do uso do micélio, os estabilizadores $MgSO_4$ 0,5 M e Sorbitol 1,2 M apresentaram taxas de regeneração de valor aproximado aquela obtida com KCl 0,7 M (Tabela 17). Houve uma diferença interessante no protocolo de HAMLYN et alii (1981), a partir do uso do estabilizador KCl em diferentes concentrações (Tabela 17). O estabilizador KCl 0,7 M apresentou praticamente o dobro da taxa de regeneração de KCl 0,6 M (19,50 % contra 11,40 %), enquanto que KCl 0,8 M teve somente 2,30 % de regeneração. Isso mostra como uma mesma espécie de fungo pode reagir de forma tão drástica a uma ligeira variação da concentração de um mesmo estabilizador osmótico.

As Figuras 11A e 11B mostram a coloração de núcleos de protoplastos de *A.niger* obtidos a partir do micélio (HAMLYN et alii, 1981). Nas duas figuras podem ser notados protoplastos de tamanhos e número de núcleos variáveis. Segundo NECAS & SVOBODA (1985), em fungos uninucleados o protoplasto é igual ao conteúdo essencial de uma célula (ou seus múltiplos se a célula está se dividindo); por outro lado, em fungos miceliais são formados protoplastos de estrutura mais heterogênea, com número variado de núcleos e outras organelas celulares. Esta heterogeneidade pode ocorrer através de uma distribuição desigual do conteúdo citoplasmático em uma única região da hifa ou ser resultado da liberação do protoplasto em diferentes partes do gradiente fisiológico da hifa (NECAS & SVOBODA, 1985). Os protoplastos

A.

B.

Figura 11 - Protoplastos de *A.niger* obtidos a partir do uso de micélio. A. Estabilizador osmótico KCl (Aumento de 1000X); B. Estabilizador osmótico $MgSO_4$ (Aumento de 400 X).

Figura 12 - Protoplastos de *A.niger* obtidos a partir do uso de tubos germinativos (Aumento de 400 X).

isolados com o estabilizador KCl apresentaram em média um número de núcleos por protoplasto não superior a dez. Os protoplastos isolados com o estabilizador $MgSO_4$ apresentaram em média um número de núcleos próximo ou superior a dez, inclusive chegando alguns a apresentar vinte e cinco núcleos. Estes últimos resultados são coerentes com aqueles observados por BORGES (1987) em *A.niger* 10V10, que utilizando $MgSO_4$ como estabilizador, encontrou protoplastos com até 32 núcleos. PEBERDY (1979b) relatou também que quando protoplastos de *Aspergillus nidulans* são obtidos com o estabilizador $MgSO_4$ apresentam um maior número de núcleos do que quando obtidos com KCl.

Como pode ser notado na figura 11B, os protoplastos isolados com $MgSO_4$ apresentaram-se altamente vacuolados e de grande tamanho. Esta mesma observação já foi feita por PEBERDY (1979b) com *A.nidulans* e BORGES (1987) com *A.niger*, em relação ao uso de $MgSO_4$ como estabilizador osmótico no isolamento de protoplastos. Embora não exista ainda explicação plausível para este efeito, PEBERDY (1979b) sugeriu que o fenômeno é inteiramente osmótico ou que outros fatores, tais como a ligação do cátion às paredes hifais, possam estar envolvidos. Provavelmente, o grande diâmetro dos protoplastos obtidos através deste protocolo poderia favorecer estudos genéticos de micromanipulação.

A Figura 12 mostra a coloração de núcleos de protoplastos de *A.niger* obtidos a partir de tubos germinativos (GAMBINO et alii, 1984). Os protoplastos isolados com $MgSO_4$ apresentaram em média um número de núcleos não superior a

quatro; foram isolados protoplastos anucleados, de um, dois e três núcleos. Estes protoplastos são de menor tamanho e menos heterogêneos quando comparados com os protoplastos obtidos a partir do micélio, o que pode representar um dado importante para posteriores estudos genéticos nesta linhagem.

4.7.1. Viabilidade de Protoplastos

Este experimento foi feito baseando-se numa sugestão de FERENCZY (1987) de que se os protoplastos de fungos filamentosos fossem armazenados em estabilizadores osmóticos de maior concentração do que aquela em que foram obtidos, eles teriam um maior tempo de viabilidade. A Figura 13 apresenta os resultados referentes a viabilidade de protoplastos de *A.niger* em diferentes condições de armazenamento. Os tratamentos com KCl 0,9 e 1,2 M diminuíram a viabilidade dos protoplastos em comparação com o tratamento em KCl 0,6 M. Após 2 dias, houve a diminuição de aproximadamente 50 % nos tratamentos com KCl 0,9 e 1,2 M, enquanto que em KCl esta viabilidade se manteve por volta de 90 %. Depois de 6 dias, os protoplastos armazenados em KCl 0,6 M ainda apresentavam uma viabilidade em torno de 60 %. Após 12 dias, não houve diferença entre os tratamentos. Embora, a sugestão feita por FERENCZY não tenha sido verificada nesta linhagem de *A.niger*, nas condições experimentais utilizadas, os resultados obtidos mostram que protoplastos isolados a partir de micélio com o uso do estabilizador KCl 0,6 M e armazenados com

-----
FERENCZY, L., 1987. Sugestão pessoal feita ao Dr. João Lúcio de Azevedo.

Figura 13 - Viabilidade de protoplastos de *A. niger* em diferentes condições de armazenamento

este mesmo estabilizador a quatro graus centígrados, apresentam uma viabilidade de 60 % após 6 dias de armazenamento. Esta informação poderá ser útil em futuros experimentos de transformação genética com esta linhagem.

4.8. Dosagem da atividade celulolítica.

Esta metodologia foi desenvolvida de acordo com o item 3.14.

Segundo VITOLLO (1988), o cultivo semi-sólido foi usado pela primeira vez em 1894 para a produção de amilase fúngica em escala industrial. Em geral, a fermentação semi-sólida é usada para a obtenção de pectinases, amilase fúngica e coalhos microbianos. No ocidente existe uma só indústria de grande porte baseada em cultura semi-sólida de microrganismos para a produção de enzimas (VITOLLO, 1988). Neste trabalho utilizou-se a fermentação semi-sólida tendo em vista a dosagem das enzimas do complexo celulolítico. O farelo de trigo foi escolhido devido a sua importância como substrato em muitas fermentações industriais, principalmente na produção de amilase.

As Tabelas 19, 20 e 21 mostram os dados referentes a dosagem da atividade celulolítica específica (micromoles de açúcar redutor por miligrama de proteína) de *A.niger* e *T.reesei* QM 9414, enquanto que as Tabelas 23, 24 e 25 mostram os dados referentes a dosagem da atividade celulolítica por ml (micromoles de açúcar redutor por mililitro de sobrenadante enzimático) das duas espécies. As análises de variância para

Tabela 19 - Dosagem da atividade celulolítica específica de *A.niger* (cada experimento é a média de três repetições)

Experimento	Beta-glicosidase *	Carboximetilcelulase *	Avicelase *	"FPA" modificado *
I	36,4	10,9	11,5	12,7
II	26,0	8,0	8,3	10,3
III	30,7	9,9	9,7	10,6
IV	36,8	10,0	10,9	12,3
Média	32,5 ± 4,4	9,7 ± 1,0	10,1 ± 1,2	11,5 ± 1,0

* atividade expressa em micromoles de açúcar redutor por miligrama de proteína total

Tabela 20 - Dosagem da atividade celulolítica específica de *T.reesei* QM 9414 (cada experimento é a média de três repetições)

Experimentos	Beta-glicosidase *	Carboximetilcelulase *	Avicelase *	"FPA" modificado *
I	38,1	12,1	12,6	11,9
II	26,5	10,2	11,2	10,2
III	18,2	11,6	12,9	14,5
IV	29,4	9,7	10,5	10,2
Média	28,1 ± 7,1	10,9 ± 1,0	11,8 ± 1,0	11,7 ± 1,8

* atividade expressa em micromoles de açúcar redutor por miligrama de proteína total

Tabela 21 - Comparação da atividade celulolítica específica de *A.niger* e *T.reesei* QM 9414 (os dados constituem a média de quatro repetições)

	Beta-glicosidase *	Carboximetilcelulase *	Avicelase *	"FPA" modificado *
<i>A.niger</i>	32,5 ± 4,4 a	9,7 ± 1,0 a	10,1 ± 1,2 a	11,5 ± 1,0 a
<i>T.reesei</i>	28,1 ± 7,1 a	10,9 ± 1,0 a	11,8 ± 1,0 a	11,7 ± 1,8 a

* atividade expressa em micromoles de açúcar redutor por miligrama de proteína total

** atividades enzimáticas seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste Tukey

Tabela 22 - Análise de variância da comparação da atividade celulolítica específica de *A.niger* e *T.reesei*.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Linhagem	1	0,842	0,842	0,08 n.s.
Atividade	3	2245,430	748,477	69,39
Interação	3	47,081	15,694	1,45 n.s.
Resíduo	24	316,366	13,181	
Total	31	2609,718		

n.s. = não significativo ao nível de 5 % pelo teste Tukey

Tabela 23 - Dosagem da atividade celulolítica por mililitro de *A.niger* (cada experimento é a média de três repetições)

Experimentos	Beta-glicosidase *	Carboximetilcelulase *	Avicelase *	"FPA" modificado
I	41,0	12,4	13,4	14,6
II	40,6	12,4	12,7	15,8
III	37,7	12,3	12,0	13,1
IV	41,8	13,2	14,4	16,3
Média	$40,3 \pm 1,6$	$12,6 \pm 0,4$	$13,1 \pm 0,9$	$15,0 \pm 1,2$

* atividade expressa em micromoles de açúcar redutor por mililitro de sobrenadante enzimático

Tabela 24 - Dosagem da atividade celulolítica por mililitro de *T.reesei* QM 9414 (cada experimento é a média de três repetições)

Experimentos	Beta-glicosidase *	Carboximetilcelulase *	Avicelase *	"FPA" modificado *
I	57,7	18,3	18,9	18,0
II	51,7	19,8	21,9	19,8
III	27,9	17,6	19,6	21,9
IV	56,8	18,8	20,3	19,7
Média	$48,5 \pm 12,1$	$18,6 \pm 0,8$	$20,2 \pm 1,1$	$19,9 \pm 1,4$

* atividade expressa em micromoles de açúcar redutor por mililitro de sobrenadante enzimático .

Tabela 25 - Comparação da atividade celulolítica por mililitro de *A.niger* e *T.reesei* OM 9414 (os dados constituem

a média de quatro repetições)

	Beta-glicosidase *	Carboximetilcelulase *	Avicelase *	"FPA" modificado *
<i>A.niger</i>	40,3 ± 1,6 a	12,6 ± 0,4 a	13,1 ± 0,9 a	15,0 ± 1,2 a
<i>T.reesei</i>	48,5 ± 12,1 b	18,6 ± 0,8 b	20,2 ± 1,1 b	19,9 ± 1,4 b

* atividade expressa em micromoles de açúcar redutor por mililitro de sobrenadante enzimático

* * atividades enzimáticas seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste Tukey

Tabela 26 - Análise de variância da comparação da atividade celulolítica por mililitro

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Linagem	1	343,873	343,873	14,27 **
Atividade	3	4665,231	1555,077	64,55 **
Interação	3	12,281	4,094	0,17
Resíduo	24	622,16	25,942	
Total	31	5643,54		

* * significativo ao nível de 5 % pelo teste Tukey

Tabela 27 - Dosagem da concentração de proteínas por mililitro em *A.niger* e *T.reesei* OM 9414 (cada experimento

é a média de três repetições)

Experimentos *	I	II	III	IV	Média **
<i>A.niger</i>	1,18	1,58	1,24	1,32	$1,33 \pm 0,15$ b
<i>T.reesei</i>	1,56	1,95	1,53	1,94	$1,75 \pm 0,20$ a

* unidade expressa em miligramas de proteínas por mililitro

** as concentrações de proteínas seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste Tukey

Tabela 28 - Análise de variância da dosagem da concentração de proteínas por mililitro

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamentos	1	0,3445	0,3445	8,1 **
Resíduo	6	0,2537	0,0420	
Total	7	0,5982		

* * significativo ao nível de 5 % pelo teste Tukey

essas duas características encontram-se respectivamente nas Tabelas 22 e 26. Como pode ser notado mais nitidamente nas Tabelas 21 e 22, as atividades específicas de beta-glucosidase, carboximetilcelulase, avicelase e "FPA" modificado de *A.niger* são estatisticamente diferentes, ao nível de 5 % pelo teste Tukey, das mesmas atividades enzimáticas observadas em *T.reesei* QM 9414. Por outro lado, mais especificamente a partir das Tabelas 25 e 26, pode ser verificado que todas as atividades celulolíticas por ml de *T.reesei* QM 9414 se diferenciam estatisticamente, ao nível de 5 % pelo teste Tukey, daquelas de *A.niger*. Isso pode ser melhor compreendido observando-se a dosagem da concentração de proteínas por ml nos extratos enzimáticos das duas espécies (Tabelas 27 e 28). *T.reesei* apresenta uma concentração de proteínas 23 % superior a de *A.niger*. Desta forma, essa diferença na concentração de proteínas dos sobrenadantes enzimáticos das duas espécies, explica as diferenças observadas nas atividades celulolíticas específica e por ml. Um aspecto interessante que poderia ser ressaltado é o fato de que antes da dosagem proteica - através da metodologia descrita por LOWRY (1959) - houve a precipitação das proteínas através de álcool etílico absoluto (item 3.15.). Este procedimento é essencial visto que existem substâncias de menor peso molecular - que poderiam estar presentes nos sobrenadantes enzimáticos - que interagem com o reagente de Folin, dando um "falso Lowry" (COOPER, 1977). Inicialmente a precipitação foi tentada com uma solução aquosa de ácido tricloroacético (TCA) 20 % p/v misturado com a amostra do sobrenadante enzimático na proporção de 1:1. Após 12 horas a 4

graus centígrados houve precipitação de proteínas somente no extrato de *T.reesei* QM 9414. Ensaiou-se o aumento da concentração de TCA até 50 % e não ocorreu precipitação no extrato de *A.niger*. Não existe explicação plausível para esta diferença do efeito do TCA na precipitação de proteínas nos dois sobrenadantes enzimáticos.

A atividade celulolítica de *A.niger* pode ser similar àquela de *T.reesei* QM 9414, ou simplesmente um artefato motivado pela alta concentração de proteínas excretadas por esta última espécie - segundo NEVALAINEN (1985), *T.reesei* é entre as espécies de fungos atualmente conhecidas, aquela que mais excreta proteínas. Com o objetivo de verificar esta hipótese, foi feita uma eletroforese, com os sobrenadantes enzimáticos das duas espécies, em gel de poliacrilamida com revelação específica para celulasas (item 3.16.4.). A partir desta técnica é possível se ter uma idéia semi-quantitativa da abundância relativa das celulasas das duas espécies (SHEIR-NEISS & MONTENECOURT, 1984).

A Figura 14 mostra uma eletroforese em gel de poliacrilamida, com revelação para proteínas totais (item 3.16.5.), dos sobrenadantes enzimáticos de *A.niger* e *T.reesei* QM 9414. A Figura 15 mostra um gel de agarose mais carboximetilcelulose 1 %, em que a atividade celulolítica das duas espécies foi comparada. Esta metodologia de revelação da atividade celulolítica foi descrita no item 3.16.4. . Observando-se as Figuras 14 e 15, pode ser verificado que as celulasas de *A.niger* apresentam uma maior mobilidade relativa (MR) do que as celulasas de *T.reesei* QM 9414. Embora as celulasas de *A.niger*

Figura 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida, com revelação para proteínas totais, dos sobrenadantes enzimáticos de *A.niger* e *T.reesei* QM 9414 (quatro repetições por espécie). As setas menores indicam a posição das celulases das duas espécies, enquanto que as setas maiores indicam a direção da "corrida" eletroforética.

Figura 15 - Gel de Agarose mais 1 % de Carboximetilcelulose, demonstrando a atividade celulolítica de *A.niger* e *T.reesei* QM 9414 (quatro repetições por espécie). As setas indicam a atividade celulolítica das duas espécies.

apresentem uma maior MR, não podem ser feitas afirmações quanto a diferenças no peso molecular porque na técnica presentemente utilizada (item 3.16.), não foi separado o efeito de carga do efeito de peso molecular. Segundo COOPER (1977), numa eletroforese num gel de poliacrilamida, hipoteticamente duas proteínas de pesos moleculares diferentes podem migrar em direção ao anodo com a mesma velocidade se as suas diferenças de tamanho são balanceadas através de compensação nas diferenças de carga. Ainda segundo o mesmo autor, com o objetivo de separar-se o efeito de carga do efeito de peso molecular, geralmente é adicionada às soluções dos géis empilhador e separador, assim como na do tampão do tanque, dodecil sulfato de sódio (SDS). Esta substância, que tem uma carga negativa, liga-se às regiões hidrofóbicas das proteínas fazendo com que as mesmas apresentem carga líquida negativa (COOPER, 1977); desta forma, somente o efeito do peso molecular estará presente na "corrida" eletroforética.

Comparando-se as atividades celulolíticas de *A.niger* e *T.reesei* QM 9414 (Figura 15), pode-se constatar que não existe diferença na abundância relativa das celulasas das duas espécies. Assim, embora *T.reesei* apresente maior excreção de proteínas do que *A.niger* (Tabela 27), os resultados obtidos indicam que a atividade celulolítica das duas espécies é semelhante.

Existem na literatura muitos trabalhos de verificação da produção de celulase em diferentes espécies do gênero *Aspergillus* (ALLEN & STERNBERG, 1980; GARG & NEELAKANTAN, 1982 a, b e c; ALLEN & ANDREOTTI, 1982; STEWART et alii, 1983; PANDA et alii,

1983 e WASE et alii, 1985), contudo a espécie *A.niger* não tem sido muito explorada. No caso desta espécie, são conhecidos diversos trabalhos de purificação e propriedades bioquímicas de suas celulasas (CLARKE & STONE, 1965; IKEDA et alii, 1973 a e b; HURST et alii, 1977 a,b e 1978). Entretanto, o potencial de linhagens desta espécie quanto a produção de celulasas tem sido demonstrado por alguns autores (GOKSOYR & ERIKSEN, 1980; LUTZEN et alii, 1980 e GOLDMAN et alii, 1988).

Segundo GOKSOYR & ERIKSEN (1980), as celulasas de *A.niger* representam uma parcela significativa da produção anual de 45 toneladas desta enzima no Japão. LUTZEN et alii (1983) comparando a ação enzimática de uma preparação comercial de celulase ("Celluclast") de *T.reesei* com a atividade celulolítica de outras espécies microbianas, mostraram que complexos enzimáticos mais eficientes podem ser produzidos a partir de diferentes espécies de *Aspergillus*, entre elas algumas de *A.niger*. GOLDMAN et alii (1988) ensaiaram a atividade celulolítica de 28 linhagens selvagens do grupo *A.niger* em comparação com a linhagem industrial de *T.reesei* QM 9414. Vinte e uma linhagens não mostraram diferença estatística significativa da atividade celulolítica da linhagem QM 9414. CARDOSO (1988) isolou a partir do solo, uma linhagem de *A.niger* solubilizadora de fosfatos, que quando comparada com *T.reesei* QM 9414, apresentou uma atividade celulolítica também semelhante.

A.niger é conhecido também como bom produtor de beta-glucosidase, enquanto a produção desta enzima em *T.reesei* é relativamente baixa (STERNBERG et alii, 1977). Neste sentido, a linhagem de *A.niger* utilizada no presente trabalho, não apresentou uma boa produção de beta-glicosidase já que a mesma não se diferenciou daquela de *T.reesei* QM 9414 (Tabelas 21 e 22).

Levando-se em consideração o fato de que a linhagem QM 9414 de *T.reesei* é derivada de um programa de melhoramento genético, enquanto a linhagem de *A.niger* utilizada no presente trabalho é selvagem, um posterior programa de melhoramento genético poderia aumentar significativamente a produção de celulasas nesta linhagem de *A.niger*. Um outro aspecto interessante é que *A.niger* vem sendo tradicionalmente usado pelas indústrias para a produção de enzimas, como por exemplo pectinases, glucose oxidase, assim como celulasas (BALL, 1984). Algumas linhagens desta espécie são aprovadas para o uso industrial pela "FOOD AND DRUG ADMINISTRATION" nos Estados Unidos ("FDA-USA"): essas linhagens não são tóxicas, sendo inclusive usadas pelas indústrias alimentícias. Isto é importante desde que o uso de celulasas de *Trichoderma* spp não é recomendável nestas indústrias, já que há produção de micotoxinas.

5. CONCLUSÕES

Os estudos genéticos e bioquímicos realizados com a linhagem industrial NRRL-337 de *Aspergillus niger*, permitem as seguintes conclusões:

- A) os meios completo e mínimo descritos por PONTECORVO et alii (1953) apresentaram-se adequados para o crescimento da linhagem e os estudos genéticos nela realizados.
- B) na obtenção de mutantes auxotróficos a técnica do enriquecimento por filtração foi mais eficiente que a do isolamento total.
- C) a linhagem apresenta uma alta estabilidade genética, mesmo considerando-se que 77,2 % dos conídios são binucleados. Os mutantes auxotróficos obtidos também possuem alta estabilidade genética.
- D) Cruzamentos, através do ciclo parassexual, de diversos mutantes com marcas auxotróficas e morfológicas, produziram heterocáries, mas não foi possível a caracterização de colônias diplóides.
- E) no isolamento e regeneração de protoplastos, o melhor protocolo para a obtenção de protoplastos foi aquele em que se utilizou o micélio com KCl 0,6 M como estabilizador osmótico. A melhor percentagem de regeneração foi obtida a partir de tubos germinativos, usando no isolamento como

estabilizador osmótico MgSO_4 0,5 M e na regeneração MgSO_4 ou Sorbitol 1,2 M.

- f) foram obtidos protoplastos com menor número de núcleos durante a protoplastização de tubos germinativos do que com a protoplastização do micélio.
- g) protoplastos isolados a partir de micélio com o estabilizador KCl 0,6 M e armazenados com este mesmo estabilizador a 4 graus centígrados, apresentaram uma viabilidade de 60 % após 6 dias de armazenamento.
- h) a linhagem de *A.niger* apresentou atividades de beta-glicosidase, carboximetilcelulase, avicelase e papel de filtro modificado similares a da linhagem QM 9414 de *Trichoderma reesei*.
- i) a partir de uma eletroforese em gel de poliacrilamida, com revelação específica para celulase, dos extratos da cultura de *A.niger* e *T.reesei*, constatou-se que a abundância relativa da celulase produzida pela primeira espécie era similar a do mutante celulolítico.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, A.L. & ANDREOTTI, R.L. Continuous culture of *Aspergillus phoenicis* QM 329 for the production of cellobiase. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 2747-51, 1982.

ALLEN, A.L. & STERNBERG, D. Beta-glucosidase production by *Aspergillus phoenicis* in stirred-tank fermentors. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 10: 189-97, 1980.

ARAÚJO, E.F.; BARROS, E.G.; CALDAS, R.A.; SILVA, D.O. Beta-glucosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus, *Humicola* sp. *Biotechnology Letters*, 5: 781-84, 1983.

ARAÚJO, A. & D'SOUZA, J. Characterization of cellulolytic enzyme components from *Aspergillus terreus* and its mutant. *Journal of Fermentation Technology*, 64: 463-7, 1986.

ARMENTROUT, R.W. & BROWN, R.D. Molecular cloning of genes for cellobiose utilization and their expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41: 1355-62, 1981.

AUGUSTINE, N.R. Technology transfer from military requirements to public need. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6: 1-8, 1976.

- AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. Exercícios práticos de genética. São Paulo, Ed. Nacional, 288 p.
- AZEVEDO, J.L.; SANTANA, E.P.; BONATELLI, JR., R. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-oxathiin in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 48: 163-72, 1977.
- BAGALHI, E. Parameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1987, 124 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BAILEY, M.J. & NEVALAINEN, K.M.H. Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulase. *Enzyme and Microbial Technology*, 3: 153-57, 1981.
- BALL, C. Filamentous Fungi. In: Ball, C., ed. Genetics and breeding of industrial microorganisms. CRC Press, Capítulo 7, pags. 159-88, 1984.
- BALL, C. Melhoramento Genético de microrganismos. In: AZEVEDO, J.L., ed. Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética, Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, pags. 77-82, 1985.
- BALL, C. & HAMLYN, P.F. Genetic recombination studies with *Cephalosporium acremonium* related to the production of the industrially important antibiotic Cephalosporin C. *Revista Brasileira de Genética*, 5: 1-13, 1982.

BASSHAM, J.A. General considerations. Biotechnology and Bioengineering Symposium, 5: 27-42, 1975.

BISARIA, V.S. & GHOSE, T.K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. Enzyme and Microbial Technology, 3: 90-104, 1981.

BONATELLI, JR., R. Estabilidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1977, 126 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

BONATELLI, JR., R. Parassexualidade e Produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1981, 91 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

BONATELLI, JR., R.; AZEVEDO, J.L.; VALENT, G.V. Citric acid production by *Aspergillus niger* mutants. Revista Brasileira de Genética, 5: 483-92, 1982.

BONATELLI, JR., R.; AZEVEDO, J.L.; VALENT, G.V. Parassexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. Revista Brasileira de Genética, 6: 399-405, 1983.

BORGES, M.I. Técnicas de protoplastização e isolamento de DNA de alto peso molecular de *Aspergillus niger*. Campinas, 1987. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).

BOS, C.J. Mutant collection and master strains of *Aspergillus niger*. Fungal Genetics Newsletter, 34: 27, 1987.

- BRANDT, D. Remarks on the process economics of enzymatic conversion of cellulose to glucose. Biotechnology and Bioengineering Symposium, 5: 253-74, 1975.
- BROWN, J.A.; COLLIN, S.A.; WOOD, T.M. Enhanced enzyme production by the cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum*, mutant strain NTG III/6. Enzyme and Microbial Technology, 9: 176-80, 1987a.
- BROWN, J.A.; COLLIN, S.A.; WOOD, T.M. Development of a medium for high cellulase, xylanase and beta-glucosidase production by a mutant strain (NTG III/6) of the cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum*. Enzyme and Microbial Technology, 9: 355-60, 1987b.
- BROWN, J.A.; FALCONER, D.J.; WOOD, T.M. Isolation and properties of mutants of the fungus *Penicillium pinophilum* with enhanced cellulase and beta-glucosidase production. Enzyme and Microbial Technology, 9: 169-75, 1987c.
- BURNETT, J.H. Mycogenetics. J. Wiley & Sons, 1975.
- CALAM, C.T.; DAGLISH, L.B.; GAITSKELL, W.S. Hybridization experiments with *Penicillium patulum* and *Fusarium moliniforme*. In: VANEK, Z.; HOSTALEK, Z.; CUDIN, J., eds. Genetics of industrial microorganisms, vol.I. Elsevier, Amsterdam, pages. 265-82, 1973.
- CASTRO, U.G.; MOURA, S.B.; LINARDI, V.R. Obtenção de mutantes em

linhagens de *Trichoderma* sp pela ação de ultravioleta e medida da atividade celulolítica. In: XIV Reunião Anual de Genética de Microorganismos, Goiânia, GO, Brasil, Anais, 1987.

CHANG, L.T. & TERRY, C.A. Intergenic complementation of glucoamylase and citric acid production in two species of *Aspergillus*. *Applied Microbiology*, 25: 890-95, 1973.

CHAVES, V.M.G. Características fisiológicas de um fungo termófilo isolado de compostagem e propriedades de seu complexo celulase. Viçosa, 1982, 60 p. (Mestrado - Universidade Federal de Viçosa).

CHEN, C.M.; GRITZALI, M.; STAFFORD, D.W. Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology*, 5: 274-78.

CLARKE, A.E. & STONE, B.A. Beta-glucan hydrolases from *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal*, 96: 793-801, 1965.

COOPER, T.G. The tools of biochemistry. John Wiley & Sons, Inc., 423 pp., 1977.

COPPOLECCHIA, R.; DESSI, M.R.; GIACOMINI, A.; LEPIDI, A; MASTROMEI, G.; NUTI, M.P.; POLSINELLI, M. Cloning in *E.coli* of a *Streptomyces* cellulase gene. *Biotechnology Letters*, 9: 495-500, 1987.

COUGHLAN, M.P. Cellulose hydrolysis: the potential, the problems and relevant research at Galway. In: Cellulase: COUGHLAN,

M.P., ed. Production, properties and applications. Biochemical Society Transactions, 61th Meeting, Galway. Society Host, 1985a.

COUGHLAN, M.P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. In: RUSSELL, G.E., ed. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. Intercept Ltd, capitulo 2, volume 3, pags. 32-109, 1985b.

DAVIS, B. Factors influencing protoplast isolation. In: PEBERDY, J. & FERENCZY, L., eds., FUNGAL PROTOPLASTS. Marcel Dekker, Inc., pags 45-71, 1985.

DAVIS, B.; D'AVILLES PAIXAO, M.T.; DEANS, S.G.; SMITH, J.E. Protoplast formation from giant cells of *Aspergillus niger*. Transactions of the British Mycological Society, 69: 207-12, 1977.

DILLON, A.J.P.; BERTARELLO, A.L.; DAHMER, C.E. Produção de celulasas em mutantes de fungos celulolíticos. In: XV Reunião Anual de Genética de Microorganismos, Piracicaba, SP, Brasil, Anais, 1988.

DUARTE, F.A.M. Genetic and allied effects of certain esters of inorganic acids in *Aspergillus nidulans*. Experientia, 27: 966-67, 1971.

ENARI, T.-M. Microbial cellulases. In: FOGARTY, W.M., ed. Microbial enzymes and biotechnology. Applied Science

Publishers, capítulo 4, pags. 183-223, 1983.

ERIKSSON, K.-E. Degradation of cellulose. *Experientia*, 38: 156-59, 1982.

ERIKSSON, K.-E. & HAMP, S.G. Regulation of endo-1,4-beta-D-glucanase production in *Sporotrichum pulverulentum*, *European Journal of Biochemistry*, 90: 183-90, 1978.

ERIKSSON, K.-E. & JOHNSRUD, S.C. Mutants of the white rot fungus *Sporotrichum pulverulentum* with increased cellulase EC - 3.2.1.4 and beta-D-Glucosidase EC - 3.2.1.21 production. *Enzyme Microbial Technology*, 5: 425-29, 1983.

FARKAS, V.; JALANKO, A.; KOLAROVA, N. Characterization of cellulase complexes from *Trichoderma reesei* QM 9414 and its mutants by means of analytical isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 706: 105-10, 1982.

FARKAS, V.; LABUDOVA, I.; BAUERS, S.; FERENCZY, L. Preparation of mutants of *Trichoderma viride* with increased production of cellulase. *Folia Microbiologica*, 26: 129-32, 1981.

FENNINGTON, G.; LUPO, D.; STUTZENBERGER, F. Enhanced cellulase production in mutants of *Thermomonospora curvata*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 2487-97, 1982.

FENNINGTON, G.; NEUBAUER, D.; STUTZENBERGER, F. Cellulase biosynthesis in a catabolite repression-resistant mutant of

- Thermomonospora curvata*. Applied and Environmental Microbiology, 47, 1: 201-4, 1984.
- FERREIRA, FILHO, E.X. & FELIX, C.R. Isolation and characterization of the intracellular and extracellular forms of beta-glucosidase of *Humicola nigricans*. Arquivos de Biologia e Tecnologia, 29: 46, 1986.
- FIGUEIREDO, D.M.M.; PAVANI, B.S.C.; THIEMANN, J.E.. Metodo em placa para a selecao de linhagens celulolíticas alto produtoras. In: XII Reuniao Anual de Genetica de Microrganismos, Ouro Preto, MG, Brasil, Anais, 1985.
- FINCHAM, J.R.S.; DAY, P.R.; RADFORD, A. Fungal genetics. Blackweel Scientific Publications, 636 pags., 1979.
- FRIES, N. Experiments with different methods of isolating physiological mutations of filamentous fungi. Nature, 159: 199, 1947.
- FUNGARO, M.H.P. Caracterização genética e dados citológicos em *Aspergillus niger* van Tieghem e *Aspergillus awamori* Nakazawa. Piracicaba, 1984. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- GALLO, B.J.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C.; RUY, D.; MANDELS, M. Cellulase production by a new mutant strain of *Trichoderma reesei* MCG 77. Biotechnology and Bioengineering Symposium, 8: 89-102, 1979.

GAMBINO, J.; LAWRENCE, G.B.; MORRIS, M.R. Effects of mitotic and tubulin mutations on microtubule architecture in actively growing protoplasts of *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Cell Biology*, 99: 830-38, 1984.

GARG, S.K. & NEELAKANTAN, S. Production of SCP and cellulase by *Aspergillus terreus* from bagasse substrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 2407-17, 1982a.

GARG, S.K. & NEELAKANTAN, S. Studies on the properties of cellulase enzyme from *Aspergillus terreus* GN1. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 737-42, 1982b.

GARG, S.K. & NEELAKANTAN, S. Effect of nutritional factors on cellulase enzyme and microbial protein production by *Aspergillus terreus* and its evaluation. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 109-25, 1982c.

GHOSE, T.K. & GHOSH, P. Cellulase production and cellulose hydrolysis. *Process Biochemistry*, 14: 11, 1979.

GHOSH, A.; AL-RABIAI, S.; GHOSH, B.K. Increased endoplasmic reticulum content of a mutant of *Trichoderma reesei* (RUT-C 30) in relation to cellulase synthesis. *Enzyme and Microbial Technology*, 4: 110-3, 1982.

GHOSH, V.K.; GHOSE, T.K.; GOPALKRISHNAN, K.S. Improvement of *T. reesei* strain through mutation and selective screening techniques. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 241-3, 1982.

GOKSOYR, J. & ERIKSEN, J. Cellulase. In: ROSE, A.H., ed. Microbial Enzymes and Bioconversions, volume 5: Economic Microbiology. Academic Press, pags. 283-330, 1980.

GOLDMAN, G.H. & AZEVEDO, J.L. A simple screening of the cellulolytic activity of *Trichoderma* spp isolates in comparison with *T.reesei* QM 9414. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 30: 267-73, 1987.

GOLDMAN, G.H.; FUNGARO, M.H.P.; AZEVEDO, J.L. The evaluation of the cellulolytic activity in some strains of *Aspergillus niger* group. *Revista de Microbiologia*, 19 (no prelo).

GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. Livraria Nobel S.A., 466 pags., 1985.

GONG, C.T.; LADISCH, M.R.; TSAO, C.T. Biosynthesis, purification and mode of action of cellulases of *Trichoderma reesei*. *Advances in Chemistry Series*, 181: 261-87, 1979.

GONG, C.S. & TSAO, C.T. Cellulase and biosynthesis regulation. *Annual Reports on Fermentation Processes*, 3: 111-39, 1979.

GRIFFIN, H.; DINTZIS, F.R.,; KRULL, L.; BAKER, F.L. A microfibril generating factor from the enzyme complex of *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Bioengineering*, 26: 296-300, 1984.

GRITZALI, M. & BROWN, R.D., Jr. The cellulase system of *Trichoderma*. The relationship between purified extracellular enzymes from induced or cellulose-grown cells. *Advances in*

Chemistry Series, 181: 237-60, 1979.

HALLIWELL, G. Hydrolysis of fibrous cotton and reprecipitated cellulose by cellulolytic enzymes from soil microorganisms. Biochemical Journal, 95: 270-81, 1965.

X HALLIWELL, G. Mode of action of components of the cellulase complex in relation to cellulolysis In: BAILEY, M; ENARI, T.M.; LINKO, M., eds., Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose, pags. 319-36. SITRA, Helsinqui, 1975.

HALLIWELL, G. & RIAZ, M. The formation of short fibres from native cellulose by components of *Trichoderma koningii* cellulase. Biochemical Journal, 116: 35-42, 1970.

HAMLYN, P.F.; BRADSHAW, R.E.; MELLON, F.M.; SANTIAGO, C.M.; WILSON, J.M.; PEBERDY, J.F. Efficient protoplast isolation from fungi commercial enzymes. Enzyme and Microbial Technology, 3, 1981.

HANNELE-MERIVUORI, K.M.; SIEGLER, J.A.S.; MONTENECOURT, B.S. Regulation of cellulase byosynthesis and secretion in fungi. In: COUGHLAN, M.P., ed. Cellulase: production, properties and applications. Biochemical Society Transactions, 611th Meeting, Galway. Society Host Colloquium, 1985.

HASTIE, A.C. Benlate-induced instability of *Aspergillus nidulans* diploids. Nature, 226: 77, 1970.

HAYASHIDA, S. & MO, K. Production and characteistics of avicel-

desintegrating endoglucanase from a protease-negative *Hemicella* *grisea* var. *thermoidea* mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, 51: 1041-46, 1986.

HITCHNER, E.V. & LEATHERWOOD, J.M. Use of a cellulase-derepressed mutant of *Cellulomonas* in the production of a single-cell protein product from cellulose. *Applied and environmental Microbiology*, 39: 382-86, 1980.

HUMPHREY, A.; MOREIRA, A.; ARMIGER, W.; ZABRISKIE, D. Production of single-cell protein from cellulose wastes. In: GADEN, JR., E.L. & Humphrey, A.E. , eds., *Single-cell protein from renewable and non-renewable resources*. John Wiley & Sons, pags. 45-64, 1977.

HURST, P.L.; NIELSEN, J.; SULLIVAN, P.A.; SHEPHERD, M.G. Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal*, 165: 33-41, 1977a.

HURST, P.L.; SULLIVAN, P.A.; SHEPHERD, M.G. Chemical modification of a cellulase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal*, 167: 549-56, 1977b.

HURST, P.L.; SULLIVAN, P.A.; SHEPHERD, M.G. Substrate specificity and mode of action of a cellulase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal*, 169: 389-95, 1978.

IKEDA, R.; YAMAMOTO, T.; FUNATSU, M. Purification and some physical properties of acid cellulase from *Aspergillus niger*.

Agriculture and Biological Chemistry, 37: 1153-59, 1973a.

IKEDA, R.; YAMAMOTO, T.; FUNATSU, M. Chemical and enzymatic properties of acid cellulase produced by *Aspergillus niger*. Agriculture & Biological Chemistry, 37: 1169-75, 1973b.

JOGLEKAR, A.N. & KARANTH, N.G. Studies on cellulase production by a mutant - *Penicillium funiculosum* UV-49. Biotechnology and Bioengineering, 26: 1079-84, 1984.

KAMMEL, W.P. & KUBIECK, C.P. Absence of postsecretional modification in extracellular proteins of *Trichoderma reesei* during growth on cellulose. Journal of Applied Biochemistry, 7: 138-44, 1985.

KAWAMORI, M.; ADO, Y.; TAKASAWA, S. Preparation and application of *Trichoderma reesei* mutants with enhanced beta-glucosidase. Agriculture and Biological Chemistry, 50: 2477-82, 1986.

KAWAMORI, M.; MORIKAWA, Y.; SHINSHA, Y.; TAKAYAMA, K.; TAKASAWA, S. Preparation of mutants resistant to catabolite repression of *Trichoderma reesei*. Agriculture and Biological Chemistry, 49: 2875-79, 1985.

KNOWLES, J.; LEHTOVAARA, P.; TEERI, T. Cellulase families and their genes. Trends in Biotechnology, 5: 255-61, 1987.

LACHKE, A.H.; SRINIVASAN, M.C.; DESHMUKH, S.S.; DESHPANDE, M.V. Strain selection criteria for *Penicillium funiculosum* in enzymic hydrolysis of lignocellulose. Biotechnology Letters,

9: 147-150, 1987.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-85, 1970.

LHOAS, P. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with para-fluorophenylalanine. *Nature*, 190: 744, 1961.

LHOAS, P. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in *Aspergillus niger*. *Genetical Research*, 10: 45-61, 1967.

LOVE, D.R. & STREIFF, M.B. Molecular cloning of a beta-glucosidase gene from an extremely thermophilic anaerobe in *E.coli* and *B.subtilis*. *Bio/Technology*, 5: 384-87, 1987.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurements with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-75, 1951.

LUTZEN, N.W.; NIELSEN, M.H.; OXENBOELL, K.M.; SCHULEIN, M.; STENTEBJERG-OLESEN, B. Cellulases and their application in the conversion of lignocellulose to fermentable sugars. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London. B. Biological Sciences*, 300: 283-92, 1983.

MACRIS, B.J. Production and characterization of cellulase and beta-glucosidase from a mutant of *Alternaria alternata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 560-5, 1984a.

MACRIS, B.J. Enhanced cellulase and beta-glucosidase production

- by a mutant of *Alternaria alternata*. *Biotechnology and Bioengineering*, 26: 194-6, 1984b.
- MACRIS, B.J.; PASPALIARI, M.; KEKOS, D. Production and cross-synergistic action of cellulolytic enzymes from certain fungal mutants grown on cotton and straw. *Biotechnology Letters*, 7: 369-72, 1985.
- MANCZINGER, L. & FERENCZY, L. Somatic cell fusion of *Trichoderma reesei* resulting in new genetic combinations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22: 72-6, 1985.
- MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6: 21-33, 1976.
- MANDELS, M.; PARRISH, F.W.; REESE, E.T. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma reesei*. *Journal of Bacteriology*, 83: 400-8, 1962.
- MANDELS, M. & REESE, E.T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *Journal of Bacteriology*, 79: 816-26, 1958.
- MANDELS, M.; WEBER, J.; PARIZEK, R. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*. *Applied Microbiology*, 21: 152-4, 1971.
- MARSDEN, W.L. & GRAY, P.P. Enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic materials. *Critical Reviews in Biotechnology*, 3: 235-76, 1986.

- MASIERO, M. Parassexualidade e produção de amiloglicosidase em *Aspergillus niger*. Campinas, 1988 (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).
- MISHRA, S.; GOPALKRISHNAN, K.S.; GHOSE, T.K. A constitutively cellulase-producing mutant of *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 251-4, 1982.
- MISHRA, S. & GOPALKRISHNAN, K.S. New method for isolation of cellulase constitutive mutants in *Trichoderma reesei* and partial characterization of one. *Journal of Fermentation Technology*, 62: 495-500.
- MOLONEY, A.P.; HACKETT, T.J.; CONSIDINE, P.J.; COUGHLAN, M.P. Isolation of *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 with enhanced cellulase activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 5: 260-4, 1983.
- MONTENECOURT, B.S. & EVELEIGH, D.E. Semiquantitative plate assay for determination of cellulase production of *Trichoderma viride*. *Applied and Environmental Microbiology*, 33: 178-83, 1977.
- MONTENECOURT, B.S. & EVELEIGH, D.E. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Applied and Environmental Microbiology*, 34: 777-82, 1977.
- MONTENECOURT, B.S.; KELLEHER, T.J.; EVELEIGH, D.E.; PETTERSON, L.G. Biochemical nature of cellulases from mutants of

Trichoderma reesei. Biotechnology and Bioengineering Symposium, 10: 15-26, 1980.

MONTENECOURT, B.S.; NHLAGO, S.D.; TRIMINO VAZQUEZ, H.; CUSKEY, S.; SCHAMHART, D.H.J.; EVELEIGH, D.E. Regulatory controls in relation to overproduction of fungal cellulases. In: HOLLAENDER, A.; RABSON, R.; ROGERS, P.; SAN PIETRO, A.; VALENTINE, R.; WOLFE, R., Eds. Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals, Plenum Publishing Company, pags. 33-53, 1981.

MONTENECOURT, B.S.; SCHAMHART, D.H.J.; EVELEIGH, D.E. Mechanisms controlling the synthesis of the *Trichoderma reesei* cellulase system. In: BERKELEY, R.C.W.; GOODAY, G.W.; ELLWOOD, D.C., eds., Microbial polysaccharides and polysaccharases. Academic Press, Capitulo 14, pags. 327-37, 1979.

MONTI, R. & JORGE, J.A. Cellulase production in *Humicola* sp RP.17. Arquivos de Biologia e Tecnologia, 29: 42, 1986.

MORIKAWA, Y.; KAWAMORI, M.; ADO, Y.; SHINSHA, Y.; ODA, F.; TAKASAWA, S. Improvement of cellulase production in *Trichoderma reesei*. Agriculture and Biological Chemistry, 49: 1869-71, 1985.

MUSILKOVA, M. & FENCL, Z. Some factors affecting the formation of protoplasts in *Aspergillus niger*. Folia Microbiologica, 13: 235-9, 1968.

NAKAMURA, K.; MISAWA, N.; KITAMURA, K. Sequence of a cellulase

gene of *Cellulomonas uda* CB4. *Journal of Bacteriology*, 4: 247-54, 1986.

NAKAYAMA, M.; TOMITA, Y.; SUZUKI, H.; NISIZAWA, K. Partial proteolysis of some cellulase components from *Trichoderma viride* and substrate specificity of the modified products. *Journal of Biochemistry*, 79: 955-66, 1976.

NECAS, O. & SVOBODA, A. Cell wall regeneration and protoplast reversion. In: PEBERDY, J.F. & FERENCZY, L., eds. *Fungal protoplasts - applications in biochemistry and genetics*. Marcel Dekker, Inc., pags. 115-33, 1985.

NEVALAINEN, K.M.H. Genetic improvement of enzyme production in industrially important fungal strains. Technical Research Centre of Finland, Publications 39, Helsinki, Finlandia, 53 p., 1985.

NEVALAINEN, K.M.H. & PALVA, E.T. Production of extracellular enzymes in mutants isolated from *Trichoderma viride* unable to hydrolyse cellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, 35: 11-6, 1978.

NEVALAINEN, K.M.H.; PALVA, E.T.; BAILEY, M.J. A high cellulase-producing mutant strain of *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2: 59-60, 1980.

NIKU-PAAVOLA, M.-L.; LAPPALAINEN, A.; ENARI, T.-M.; NUMMI, M. A new appraisal of the endoglucanases of the fungus *Trichoderma*

reesei. Biochemical Journal, 231: 75-81.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.L. Manual de técnicas eletroforéticas em microrganismos. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 54 p., 1988.

PRICE, M.G. & JURASEK, L. Structural and mechanistic comparison of some Beta (1-4) glycoside hydrolases. Advances in Chemistry Series, 181: 361-74, 1979.

PANDA, T.; BISARIA, V.S.; GHOSE, T.K, Studies on mixed fungal culture for cellulase and hemicellulase production. Part 1: optimization of medium for the mixed culture of Trichoderma reesei D1-6 and Aspergillus wentii Pt 2804. Biotechnology Letters, 5: 767-72, 1983.

PARK, S.H. & PACK, M.Y. Cloning and expression of a Bacillus cellulase gene in Escherichia coli. Enzyme and Microbial Technology, 8: 725-8, 1986.

PEBERDY, J.F. Wall biogenesis by protoplasts. In: BURNETT & TRINCI, eds. Fungal walls and hyphal growth. Cambridge University Press, pages. 49-70, 1979a.

PEBERDY, J.F. Fungal protoplasts: isolation, reversion, and fusion. Annual Review of Microbiology, 33: 21-39, 1979b.

PENTTILA, M. Construction and characterization of cellulolytic yeasts. Technical Research Centre of Finland, Publications 41, Helsinki, Finlândia, 1987.

PENTTILA, M.E.; NEVALAINEN, K.M.H.; RAYNAL, A.; KNOWLES, J.K.C.

Cloning of *Aspergillus niger* genes in yeast. Expression of the gene coding *Aspergillus* beta-glucosidase. *Molecular and General Genetics*, 194: 494-9, 1984.

> PENTTILA, M.; NEVALAINEN, H.; RATTO, M.; SALMINEN, E.; KNOWLES, J. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungi *Trichoderma reesei*. *Gene*, 61: 155-64, 1987.

PIZZIRANI, A.A. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, 1977 (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).

PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Efeito do gene bin A1 na formação de conídios de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1981. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).

POLIZELI, M.L.T.M. & TERENCEI, H.F. Study of the beta-glucosidase activity of the fungus *Humicola* sp. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 29: 44, 1986.

PONTECORVO, G. Non-random distribution of multiple mitotic crossing-over among nuclei of heterozygous diploid *Aspergillus*. *Nature*, 170: 204-5, 1952.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; FORBES, E. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *Journal of*

General Microbiology, 8: 198-210, 1953a.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MAC DONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, 5: 141-238, 1953b.

REESE, E.T.; SIU, R.G.H.; LEVINSON, H.S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. Journal of Bacteriology, 59: 485-97, 1950.

ROBINOW, C.F. & CATEN, C.E. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. Journal of Cell Science, 5: 403-31, 1969.

ROBISON, P.D. Cellulase and xylanase production by *Trichoderma reesei* RUT C-30. Biotechnology Letters, 6: 119-22, 1984.

RODRIGUES, E.C. Caracterização citogenética e bioquímica do fungo celulolítico *Humicola* sp. Piracicaba, 152 p., 1987. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).

ROPER, J.A. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. Experientia, 8: 14-15, 1952.

ROKEM, J.S.; KLEIN, D.; TODER, H.; ZOMER, E. Degradation of fungal cell wall taking into consideration the polysaccharide composition. Enzyme and Microbial Technology, 8: 588-92, 1986.

ROSIM, R.T.; GARCIA JUNIOR, O.; BARACHO, I.R. Tamanho de conídios e núcleos em linhagens haplóides e diplóides de *Aspergillus*

- niger. *Ciência e Cultura*, 30: 487-92, 1978.
- SADANA, J.C.; SHEWALE, J.G.; DESHPANDE, M.V. Enhanced cellulase production by a mutant of *Sclerotium rolfsii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 38: 730-3, 1979.
- SCHIMENTI, J.; GARRETT, T.; MONTENECOURT, B.S.; EVELEIGH, D.E. Selection of hypercellulolytic mutants of *Trichoderma reesei* based on resistance to nystatin. *Mycologia*, 75: 876-80, 1983.
- SHEIR-NEISS, G. & MONTENECOURT, B.S. Characterization of the secreted cellulases of *Trichoderma reesei* wild type and mutants during controlled fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20: 46-53, 1984.
- SHEWALE, J.G. & SADANA, J.C. Cellulase and beta-glucosidase production by a basidiomycete species. *Canadian Journal of Microbiology*, 24: 1204-16, 1978.
- SHOEMAKER, S.P.; RAYMOND, J.C.; BRUNER, R. Cellulase: diversity amongst improved *Trichoderma* strains. In: HOLLAENDER, A.; RABSON, R.; ROGERS, P.; SAN PIETRO, A.; VALENTINE, R.; WOLFE, R., eds. *Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals*, Plenum Publishing Company, pags. 89-109, 1981.
- SHOEMAKER, S.; SCHWEIKART, V.; LADNER, M.; GELFAND, D.; KWON, S.; MYAMBO, K.; INNIS, M. Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase from *Trichoderma reesei* strain L27. *Bio/Technology*, 1: 691-96, 1983.

- SIDDIQI, O.H. Mutagenic action of nitrous acid on *Aspergillus nidulans*. *Genetic Research*, 3: 303-14, 1962.
- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Isolation of auxotrophic mutants of *Metarhizium anisopliae* by the filtration enrichment technique. *Revista Brasileira de Genética*, 7: 1-8, 1984.
- SKIPPER, N.; SUTHERLAND, M.; DAVIES, R.W.; KILBURN, D.; MILLER, R.C.; WARREN, A.; WONG, R. Secretion of a bacterial cellulase by yeast. *Science*, 230: 958-60, 1965.
- STEPHENS, G. & HEICHEL, G.H. Agricultural and forest products as sources of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 5: 27-42, 1975.
- STERNBERG, D. & MANDELS, G.R. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *Journal of Bacteriology*, 139: 761-69, 1979.
- STERNBERG, D.; VIJAYAKUMAR, P.; REESE, E.T. Beta-glucosidases: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Canadian Journal of Microbiology*, 23: 139-47, 1977.
- STEWART, B.J. & LEATHERWOOD, J.M. Derepressed synthesis of cellulase by *Cellulomonas*. *Journal of Bacteriology*, 128: 609-15, 1976.
- STEWART, J.C.; LESTER, A.; MILBURN, B.; PARRY, J.B. Xylanase and cellulase production by *Aspergillus fumigatus* fresemus. *Biotechnology Letters*, 5: 543-48, 1983.

STOUT, B.A. Agricultural biomass for fuel. *Experientia*, 38: 145-51, 1982.

SUH, D.H.; SANDS, J.A.; MONTENECOURT, B.S. Temperature sensitive mutant of *Trichoderma reesei* defective in secretion of cellulase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25: 277-84, 1986.

TANGNU, S.K.; HARVEY, W.B.; WILKE, C.R. Enhanced production of cellulase, hemicellulase, and beta-glucosidase by *Trichoderma reesei* (RUT C-30). *Biotechnology and Bioengineering*, 23: 1837-49, 1981.

TEATHER, R.M. & WOOD, P.J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental microbiology*, 43: 777-80, 1982.

TEERI, T. The cellulolytic enzyme system of *Trichoderma reesei* - Molecular cloning, characterization and expression of the cellobiohydrolase genes. Technical Research Centre of Finland, Publications 38, Helsinki, Finlandia, 52 p., 1987.

TEERI, T.; SALOVUORI, I.; KNOWLES, J. The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology*, 1: 696-99, 1983.

THIEMANN, J.E. Celulases de *Trichoderma*: desenvolvimento, produção e inovações no seu uso industrial. *Arquivos de*

Biologia e Tecnologia, 28: 203, 1985.

THOMAS, K. & DAVIS, B. The effect of calcium on protoplast release from species of *Aspergillus*. *Microbios*, 28: 69-80, 1980.

TOYAMA, H.; YAMAGUCHI, K.; SHINMYO, A.; OKADA, H. Protoplast fusion of *Trichoderma reesei*, using immature conidia. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 363-68, 1984.

TOYAMA, H.; YOKOYAMA, T. SHINMYO, A.; OKADA, H. Interspecific protoplast fusion of *Trichoderma*. *Journal of Biotechnology*, 1: 25-35, 1984.

VALENT, G.U. Isolamento e análise genética de mutantes com alteração na produção de amiloglicosidase em *Aspergillus niger*. Campinas, p., 1985 (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).

VAN UDEN, N. & BEJA LA COSTA, M. Use of 2-deoxiglucose in the selective isolation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced beta-glucosidase production. *Biotechnology and Bioengineering*, 22: 2429-32, 1980.

VITOLLO, M. Obtenção e uso de enzimas industriais. *Biotecnologia*, 15. Boletim editado pela Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1988.

WARZYWODA, M.; VANDECASTEELE, J.P.; POURQUIÉ, J. A comparison of genetically improved strains of the cellulolytic fungus

- Trichoderma reesei*. *Biotechnology Letters*, 5: 243-46, 1983.
- WASE, D.A.J.; MC MANAMEY, W.J.; RAYMAHASAY, S.; VAID, A.K.
Comparisons between cellulase production by *Aspergillus fumigatus* in agitated vessels and in air-lift fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 1166-72, 1985.
- WATSON, T.G. & NELLIGAN, I. Pilot scale production of cellulase by *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Biotechnology Letters*, 6: 119-22, 1983.
- WILKE, C.R.; YANG, R.D.; VON STOCKAR, U. Preliminary cost analysis for enzymatic hydrolysis of newprint. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6: 155-76, 1976.
- WOOD, T.M. Properties of cellulolytic enzyme systems. In: COUGHLAN, M.P., ed., *Cellulases: production, properties and applications*. *Biochemical Society Transactions*, 611th Meeting, Galway, Society Host Colloquium, 1985.
- WOOD, T.M.; HOFFMAN, R.M.; BROWN, J.A. Enzymatic conversion of the carbohydrates of straw into soluble sugars. In: FERRERO, G.L.; FERRANTI, M.P.; NAVEAU, H., eds., *Anaerobic digestion and carbohydrate hydrolysis of waste*. Commission of the European Community, Elsevier Applied Publishers, pages. 125-135, 1984.
- YOSHIOKA, H.; ANRAKU, S-I.; HAYASHIDA, S. Production and purification of a novel type of CMCase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* YH-78. *Agriculture and Biological Chemistry*,

46: 75-82, 1982.

YOSHIOKA, H. & HAYASHIDA, S. Purification and properties of beta-glucosidase from *Humicola insolens* YH-8. *Agriculture and Biological Chemistry*, 44: 1729-35, 1980