

MICROBIOLOGIA

WANDA F. CANAS FERREIRA
JOÃO CARLOS F. DE SOUSA

COORDENAÇÃO

VOLUME I



Lidel, edições técnicas

LISBOA — PORTO — COIMBRA

<http://www.lidel.pt> (Lidel on-line)

E-mail: lidel.fca@mail.telepac.pt

Autores e editora agradecem às seguintes entidades
o apoio dado à edição desta obra:

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E DA TECNOLOGIA



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
Faculdade de Ciências Médicas

EDIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO:



edições técnicas, lda.



ESCRITÓRIO: Rua D. Estefânia, 183-r/c Dto - 1000 Lisboa

LIVRARIAS: LISBOA: Avenida Praia da Vitória, 14 - Telef. 01-354 14 18 - Fax 01-357 78 27

PORTO: Rua Damião de Góis, 452 - Telef. 02-59 79 95/93 - Fax 02-550 11 19

COIMBRA: Avenida Emídio Navarro, 11-2.º - Telef. 039-82 24 86 - Fax 039-82 72 21

© Lidel - Edições Técnicas, Setembro 1998
ISBN 972-757-024-0

Revisão científica - Nuno Taveira

Fotografias da capa - Frederico Moura Nunes e João Carlos F. de Sousa

Capa - Sara Levy Lima



Este pictograma merece uma explicação. O seu propósito é alertar o leitor para a ameaça que representa para o futuro da escrita, nomeadamente na área da edição técnica e universitária, o desenvolvimento massivo da fotocópia.

O Código do Direito de Autor estabelece que é crime punido por lei, a fotocópia sem autorização dos proprietários do *copyright*. No entanto, esta prática generalizou-se sobretudo no ensino superior, provocando uma queda substancial na compra de livros técnicos. Assim, num país em que a literatura técnica é tão escassa, os autores não sentem motivação para criar obras inéditas e fazê-las publicar, ficando os leitores impossibilitados de ter bibliografia em português.

Lembramos portanto, que é expressamente proibida a reprodução, no todo ou em parte, da presente obra sem autorização da editora.

Biotecnologia Microbiana

Nelson Lima

INTRODUÇÃO

Durante séculos os alimentos fermentados (e.g. vinho, vinagre, "sauerkraut" e iogurte) foram produzidos por microrganismos desconhecidos. Só no fim do século passado é que os princípios da microbiologia começaram a ser compreendidos, permitindo a cultura individual das espécies e o desenvolvimento de processos de produção em grande escala. Estas primeiras aplicações de microrganismos seleccionados para processos específicos deram origem à biotecnologia das fermentações.

A indústria moderna de fermentações, com estirpes seleccionadas e geneticamente melhoradas produz milhões de toneladas por ano de compostos úteis. Podemos definir quatro principais classes de compostos produzidos pela indústria: *metabolitos primários*; *metabolitos secundários*; *enzimas e microrganismos*. No Quadro 16.1 estão compilados exemplos destes compostos, pertencentes a estas principais classes, produzidos por diferentes microrganismos, bem como as suas respectivas aplicações industriais. A Figura 16.1 evidencia uma estimativa da distribuição das diferentes quatro grandes classes de enzimas microbianas produzidas pela indústria: proteases, carbohidrases, lipases e uma miscelânea de outras enzimas para fins analíticos, farmacêuticos e científicos.

A biotecnologia é uma área de aplicação do conhecimento das ciências da vida. A sua tecnologia envolve a aplicação de organismos ou componentes celulares para servir a indústria química e farmacêutica, servir a tecnologia alimentar e ambiental, e servir outras áreas tais

como, a agricultura, a energia, a recuperação de metais, etc. As principais etapas por nós consideradas num processo biotecnológico e as suas interdependências estão representadas na Figura 16.2.

MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima (Figura 16.2) utilizada como substrato para transformação constitui um aspecto importante a considerar tendo em atenção a sua adequabilidade ao processo, a sua abundância e o seu custo. Neste sentido, tem-se procurado utilizar desperdícios, efluentes ou subprodutos de outras actividades que a não serem aproveitados e reconvertidos constituiriam eles próprios uma séria ameaça ambiental. Resíduos celulósicos, efluentes da indústria dos lacticínios, hidrocarbonetos, entre outros, têm sido utilizados com vista a obter produtos de alto valor acrescentado.

ESTERILIZAÇÃO

A esterilização (Figura 16.2) da matéria-prima nem sempre é necessária num processo biotecnológico, principalmente quando o sistema é aberto. Temos, por exemplo, o caso do tratamento biológico de águas residuais e a compostagem. Nestes casos, o controlo dos contaminantes é feito naturalmente ou por manipulação das condições ambientais. No entanto, a partir dos anos 40, com o advento de novas técnicas e controlos de engenharia com vista ao aumento dos rendimentos e à

Quadro 16.1			
Principais produtos com interesse industrial produzidos por microrganismos			
Classes	Produtos	Aplicações	Microrganismos
Metabólitos Primários	Ác. cítrico	Acidulante, Antioxidante e Detergentes	<i>Aspergillus niger</i>
	Ác. glucônico e gluconato de cálcio	Indústria farmacêutica	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Penicillium sp.</i>
	Ác. itacônico	Detergentes e Plásticos	<i>Aspergillus itaconicus</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Ustilago zeae</i>
	Ác. fumárico	Acidulante	<i>Rhizopus arrhizus</i> <i>Candida blankii</i>
	Ác. glutâmico	Indústria alimentar	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Cephalosporium sp.</i>
	Triptofano	Indústria alimentar	<i>Hansenula anomala</i>
	Etanol	Bebidas e Solventes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Zymomonas sp.</i>
Metabólitos Secundários	Penicilinas G e V	Indústria farmacêutica	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	Penicilina N	Indústria farmacêutica	<i>Emericellopsis sp.</i>
	Cefalosporina C	Indústria farmacêutica	<i>Cephalosporium acremonium</i>
	Ác. fusídico	Indústria farmacêutica	<i>Fusidium coccineum</i>
Enzimas	Glucose oxidase	Produção de ácido glucônico e bebidas dietéticas	<i>Aspergillus niger</i>
	α -Amilase	Panificação	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i>
	β -Glucosidase	Sacarificação	<i>Trichoderma reesei</i>
	Celulases	Indústria alimentar	<i>Trichoderma reesei</i> <i>Cellulomonas sp.</i>
	Lipases	Indústria alimentar	<i>Mucor sp.</i> <i>Rhizopus sp.</i>
	Pectinases	Clarificação de sumos de fruta	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Botrytis cinerea</i>
	Proteases	Detergentes e Panificação	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus licheniformis</i>
	Invertase	Preparação de chocolates e caramelo	<i>Saccharomyces sp.</i>
	Lactase	Indústria alimentar	<i>Aspergillus niger</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>
Microrganismos	Proteína (<i>Single Cell Protein - SCP</i>)	Alimentação animal	<i>Fusarium sp.</i> <i>Candida utilis</i> <i>Paecilomyces sp.</i>
	Cogumelos	Indústria alimentar	<i>Agaricus campestris</i>
	Leveduras	Panificação	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

obtenção de produtos de química fina (e.g. enzimas, vitaminas e antibióticos), a esterilização tornou-se parte integrante dos processos biotecnológicos. Assim, com este processo, evita-se a invasão de microrganismos contaminantes que, por competição com os microrganismos industriais, afectariam a re-

lação dos nutrientes disponíveis. Evita-se, igualmente, que a composição final dos produtos desejados seja alterada pela presença de produtos contaminantes ou ainda, que se verifique degradação do produto desejado (e.g. a libertação pelos microrganismos contaminantes de proteases extracelulares pode levar

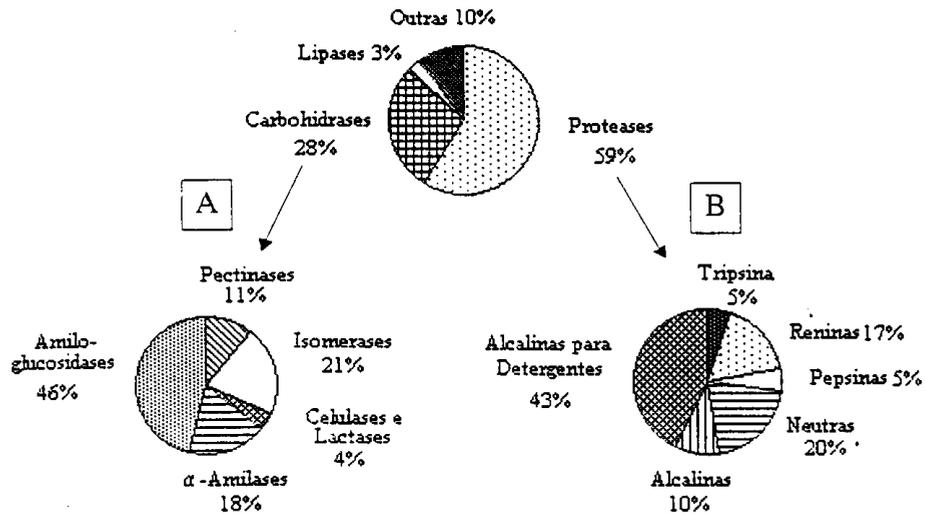


Figura 16.1 - Distribuição mundial da produção industrial das enzimas microbianas. A e B representam, respectivamente, a distribuição das carbohidrases e proteases.

à degradação das enzimas que se desejam produzir). Associado a todo o processo de esterilização do fermentador e do meio de cultura é necessário assegurar a pureza do inóculo a usar no processo fermentativo, bem como assegurar uma boa prática laboratorial que permita a que o manuseamento seja feito em condições de assépsia.

RASTREIO E SELECÇÃO

O rastreio e selecção dos microrganismos (Figura 16.2) é, no nosso ponto de vista, uma das etapas deste processo mais importantes e condicionantes. Sabendo da existência de milhares de microrganismos é tarefa difícil organizar programas de rastreio bem desenhados que permitam identificar e seleccionar os microrganismos com as potencialidades pré-definidas. A selecção de uma estirpe apropriada entre uma enorme variedade de espécies naturais de microrganismos requer um conhecimento geral de microbiologia combinado com conhecimentos de bioquímica que permitam saber como procurar o microrganismo e aonde o procurar.

Neste sentido, os contributos pioneiros de Martinus W. Beijerinck com a utilização

de culturas de enriquecimento para o isolamento de microrganismos com propriedades metabólicas específicas e de Albert J. Kluyver com a utilização de estudos comparativos de bioquímica, e a sua consequente origem de estudos de fisiologia microbiana, marcaram definitivamente a metodologia moderna de qualquer programa de rastreio industrial de microrganismos (Figura 16.3).

Pelo que acabamos de referir, estamos a defender o rastreio racional onde existem critérios de pré-selecção e um programa de rastreio bem definidos que nos permitam seleccionar com simplicidade, especificidade, rapidez e baixos custos, um grande número de microrganismos com o fenótipo desejado e obter o produto industrialmente procurado. Pelo contrário, não defendemos o rastreio aleatório e não selectivo por este envolver um enorme número de isolamentos, ensaios e dispêndio de tempo e de dinheiro. Do êxito de um programa de rastreio e da correcta selecção de uma estirpe, depende, normalmente, as taxas obtidas do produto desejado criando um retorno financeiro compensador para a indústria. Encontrado o microrganismo procurado o passo seguinte é melhorar as suas capacidades.

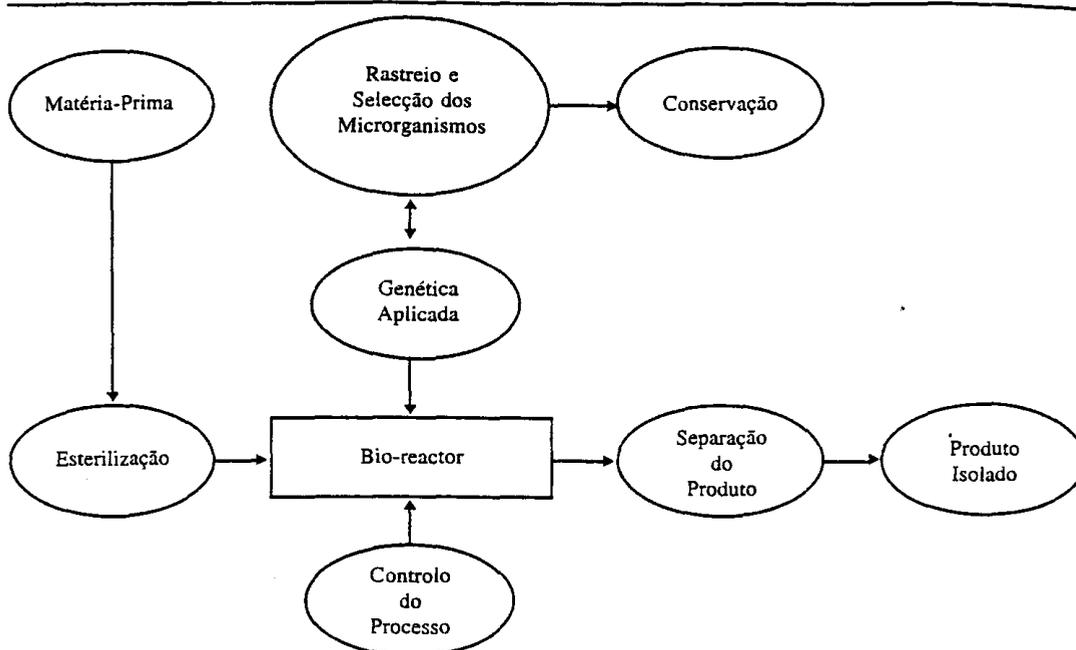


Figura 16.2 - Organograma de um processo biotecnológico.

GENÉTICA APLICADA

A genética aplicada (Figura 16.2) permite realizar modificações no microrganismo seleccionado para este produzir mais do produto desejado ou mesmo, mais recentemente, produzir novos produtos. Neste sentido, um longo e frutuoso trabalho tem sido realizado recorrendo a técnicas convencionais de genética: mutagénese, processos sexuais e parasexuais. A moderna tecnologia do DNA recombinante e outros contributos da Biologia Celular e Molecular têm sido relevantes no melhoramento das estirpes industriais.

As mutações espontâneas e induzidas são uma fonte de variação genética de grande impacto na microbiologia industrial, tendo em consideração que importantes microrganismos usados industrialmente (*e.g. Penicillium chrysogenum, Aspergillus oryzae*) não apresentam possibilidades de reprodução sexuada. Por esta razão, a variação meiótica é substituída por programas de mutagénese como única possibilidade de aumentar a produtividade dos microrganismos. A selecção das estirpes foi,

inicialmente, dependente da variabilidade espontânea encontrada dentro das populações naturais dos microrganismos. Actualmente, mesmo conhecendo um grande número de agentes mutagénicos físicos e químicos, a selecção de mutantes espontâneos continua a ser importante nos estádios iniciais de qualquer programa de melhoramento de microrganismos com interesse industrial. É o caso dos fungos produtores de micélio que, quando isolados do meio natural, normalmente, são heterocarióticos. A selecção de esporos isolados, uninucleados, leva a obter diferentes tipos de colónias em que algumas podem apresentar melhores características para o produto em questão.

Por outro lado, a submissão de estirpes à mutagénese física ou química permite obter, numa perspectiva industrial, dois tipos de mutações: mutações maiores e mutações menores. As primeiras, mutações maiores, envolvem a selecção de mutantes com uma alteração acentuada de um carácter genético com interesse prático. Como exemplo de mutações maiores temos a selecção do *Peni-*

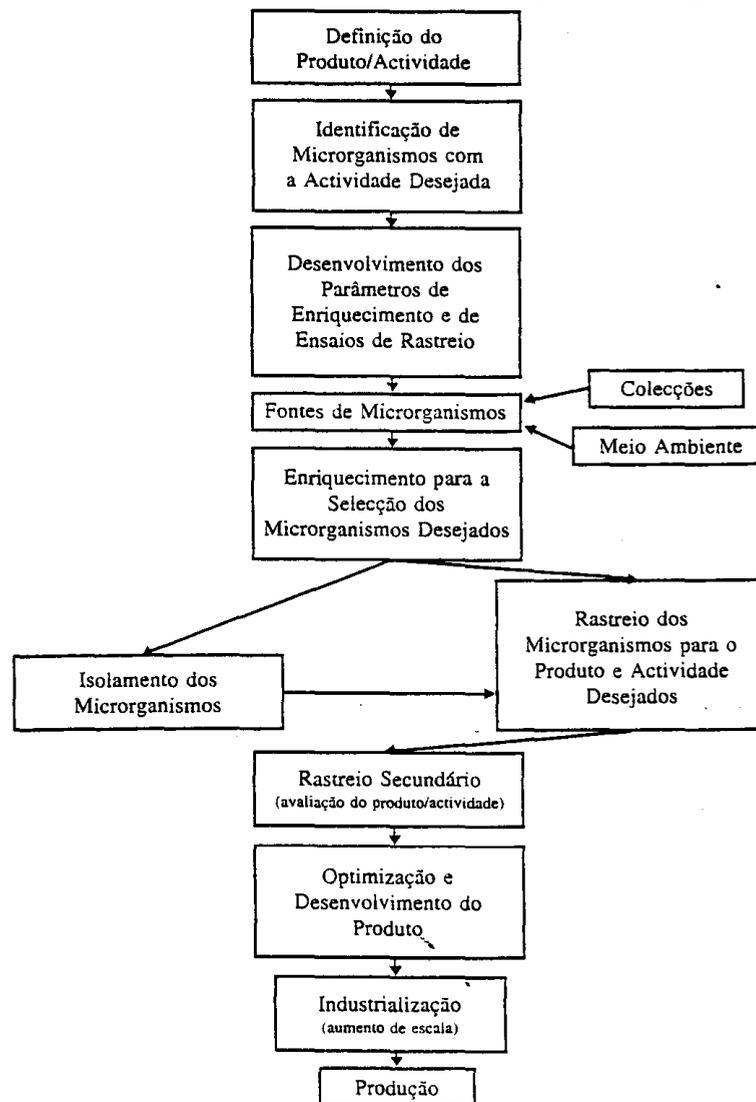


Figura 16.3 - Organograma de um processo de rastreio de microrganismos de interesse industrial (Adaptado de Steele e Stowers, 1991).

Penicillium chrysogenum não pigmentado com grande capacidade de produção de penicilina e as mutações de grande utilidade em trabalhos de genética que permitem a criação de marcas genéticas em estirpes (auxotrofia, resistência aos antibióticos e metais pesados, etc.). Pelo contrário, as mutações menores mostram alterações subtis num particular carácter genético levando ao melhoramento de 5 a 10% da formação do produto desejado. Por definição, este tipo de mutações

afecta a quantidade do produto sintetizado pelo que os mutantes distinguem-se fenotipicamente das estirpes parentais por esta característica (Elander, 1987).

O gradual melhoramento feito no *Penicillium chrysogenum* NRRL1951, genealogia da família das estirpes da Universidade de Wisconsin e da Indústria Lilly Lta, na produção da penicilina, é o melhor exemplo para as mutações menores (Figura 16.4).

A mutagénese clássica não pode ser totalmente substituída pelas novas técnicas do DNA recombinante. Por isso, a seguir aos métodos de rastreio e selecção, a mutagénese

daria brevicollis, *Sordaria fimicola* ou *Neurospora crassa*.

Como já referimos, poucos microrganismos com interesse industrial possuem a

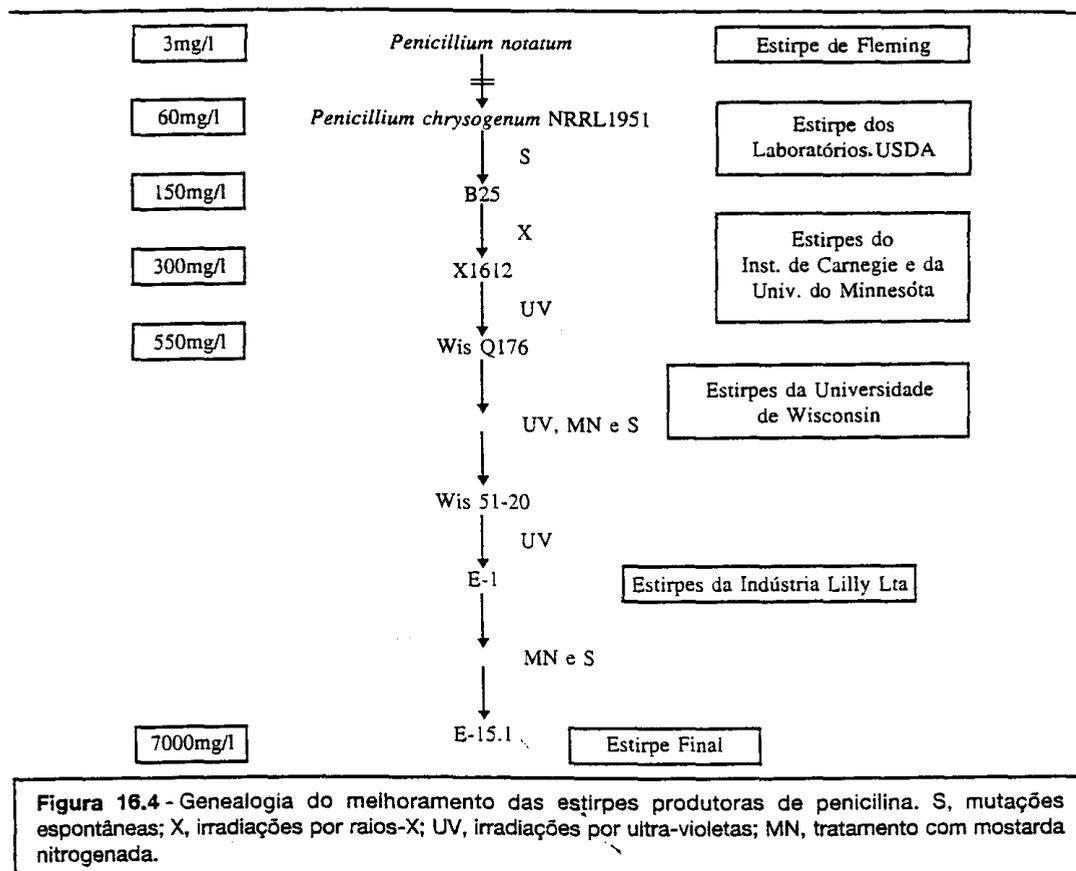


Figura 16.4 - Genealogia do melhoramento das estirpes produtoras de penicilina. S, mutações espontâneas; X, irradiações por raios-X; UV, irradiações por ultra-violetas; MN, tratamento com mostarda nitrogenada.

é o método mais efectivo para aumentar a taxa de formação de um produto. O maior obstáculo é que as mutações ocorrem com baixas frequências e têm de ser seleccionadas dentro de uma grande população de não mutantes.

No processo sexual, núcleos haplóides de sinais contrários fundem-se numa única célula. Esta nova célula diplóide, ao sofrer a meiose, terá rearranjos nos cromossomas resultante de *crossing-overs*. Esta recombinação homóloga é muito efectiva na produção de novos genótipos, razão pela qual tem sido utilizada na produção comercial de cogumelos de *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes* e *Volvariella volvacea*. São clássicos os estudos de genética (segregações e recombinações) usando *Sor-*

capacidade de se reproduzirem sexualmente. Os mecanismos parasexuais podem permitir uma recombinação génica em células vegetativas com aplicações práticas muito importantes em biotecnologia. Iremos referir, dentro destes processos parasexuais, os mecanismos de **conjugação**, **transdução**, **transformação** (Ver capítulo 8 – Genética Microbiana), **recombinação mitótica** e, por último, mas não menos importante, a **fusão de protoplastos**.

A **conjugação** é um processo em que a informação genética é transferida de uma célula bacteriana para outra por meio do contacto físico, célula-a-célula, através de um tubo de conjugação (Figura 16.5). Não se dá a fusão

celular nem se misturam os seus citoplasmas. Dá-se a passagem de DNA plasmídico da célula dadora para a célula receptora. As bactérias possuindo plasmídeos com o factor sexual F, são células dadoras ao passo que

molecular responsável pela informação genética era um ácido nucleico.

A transformação de fungos filamentosos surge com os trabalhos do grupo de E.L. Tatum na Universidade de Rockefeller no

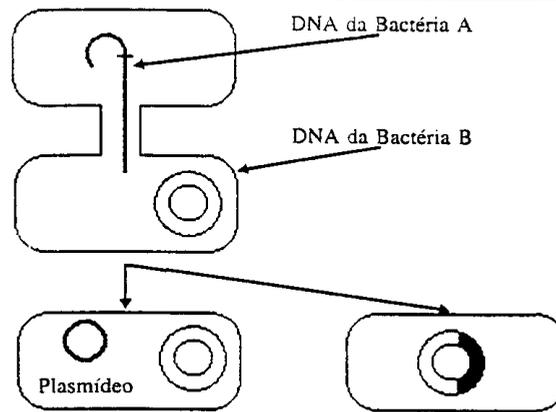


Figura 16.5 - Conjugação entre bactérias. Parte da informação genética da bactéria A passa para a bactéria B pelo tubo de conjugação. Este novo segmento de informação pode permanecer na bactéria B na forma de plasmídeo ou integrar-se permanentemente no cromossoma bacteriano.

as bactérias sem estes plasmídeos são células receptoras. Este mecanismo de transmissão de informação genética pode ser importante no disseminar de características, como por exemplo os factores de resistência a antibióticos, associadas a estes plasmídeos.

A **transformação** é a modificação do genótipo de um organismo em outro, pela introdução de DNA exógeno. A transformação foi descoberta por Griffith em 1928 e demonstrada em 1944 pelo grupo Avery, McCleod e McCarty do Instituto Rockefeller em Nova York. Esta transferência unidirecional de material genético originado numa célula e adquirido e mantido por outra, tem sido observada em diferentes tipos de células. O DNA a utilizar na transformação pode ser submetido *in vitro* a tratamentos e manipulações antes de ser introduzido na célula hospedeira capaz de ser transformada (competente). A transformação com DNA fágico é referida como **transfecção**. A transformação tornou-se um dos métodos principais em engenharia genética, usando plasmídeos ou DNA fágico como veículos transportadores dos genes desejados (vectores) e constituiu, historicamente, a primeira prova concludente de que a espécie

início da década de 70, com o uso da *Neurospora crassa* inositol-dependente e DNA nativo desta estirpe selvagem contendo a marca para o inositol. Desde então, e até aos nossos dias, os sistemas de transformação têm sido desenvolvidos no sentido de melhorar os vectores para a transformação, os procedimentos para a transformação, a regeneração e selecção dos transformantes, a análise dos transformantes e a análise das funções e regulações génicas.

Os vectores para transformação de fungos filamentosos apresentam, como componentes básicos, a marca que pode ser usada para selecção dos transformantes fúngicos e sequências de plasmídeos bacterianos que podem ser usados para selecção e propagação do vector na célula hospedeira. As marcas selectivas podem ser agrupadas em três grupos funcionais: 1) marcas auxotróficas, *i.e.*, genes que complementam mutações pré-existentes permitindo o crescimento prototrófico; 2) genes que fornecem uma nova função e permitem o crescimento em meio normalmente inibidor desse crescimento, (*e.g.* presença de antibióticos como a oligomicina – inibidor da ATP-sintetase mitocondrial – e o cloranfe-

nicol – inibidor da síntese das proteínas mitocondriais); 3) marcas mutagénicas que resultam da integração de fragmentos de DNA no genoma receptor em posições específicas, provocando mutações selectivas (e.g. disrupção génica). As marcas selectivas usadas na transformação de *Aspergillus niger* estão organizadas no Quadro 16.2.

Por outro lado, os genes podem ser mutados *in vitro* e as actividades dos novos alelos podem ser estudadas na presença ou ausência da actividade do alelo selvagem. Estas metodologias têm permitido também a produção de proteínas heterólogas com a utilização de promotores de *Aspergillus*. São exemplos os compostos de origem humana, interferão $\alpha 2$ e

Quadro 16.2			
Marcas selectivas para a transformação de <i>Aspergillus niger</i>			
Marca	Origem	Fenótipo	Referência
<i>hph</i>	<i>E. coli</i>	Resistência à higromicina B	Punt <i>et al.</i> , 1987
<i>oliC^R</i>	<i>A. niger</i>	Resistência à oligomicina	Ward <i>et al.</i> , 1988
<i>amdS⁺</i>	<i>A. nidulans</i>	Utilização da acetamida	Kelly e Hynes, 1985
<i>niaD⁺</i>	<i>A. niger</i>	Utilização do nitrato	Unkles <i>et al.</i> , 1989
<i>argB⁺</i>	<i>A. nidulans</i>	Síntese da arginina	Buxton <i>et al.</i> , 1985
<i>pyrG⁺</i>	<i>A. niger</i>	Síntese de pirimidina	Hartingsveldt <i>et al.</i> , 1987
<i>trpC⁺</i>	<i>A. nidulans</i>	Síntese do triptofano	Goosen <i>et al.</i> , 1989
<i>lacZ⁺</i>	<i>E. coli</i>	Actividade da β -galactosidase	Luo, 1992

O DNA usado na transformação, quando está dentro das células dos fungos filamentosos, tem como destino a sua integração no DNA cromossomal para se poder perpetuar gerando transformantes estáveis. Os plasmídeos podem integrar o genoma, quer em locais homólogos quer heterólogos. Local homólogo define-se como o local em que existe uma grande identidade entre as sequências do plasmídeo e do DNA genómico razão pela qual, este local favorece a integração do plasmídeo. Por sua vez pode verificar-se a integração heteróloga quando se usa plasmídeos com sequências de DNA com baixa identidade com o DNA genómico.

A tecnologia da transformação para fungos filamentosos abriu a oportunidade de estudar os mecanismos de controlo da expressão dos genes e das suas funções e actividades. Promotores e elementos regulatórios a eles associados podem ser fundidos com genes heterólogos e as suas actividades podem ser estudadas sem interferir nos genes endógenos.

a interleuquina 6, com a utilização do promotor da glucoamilase.

A **transdução** é um processo que envolve a transferência de material genético de uma célula e a sua incorporação por recombinação noutra célula através de um vector viral. Existem dois tipos de transdução: a generalizada e a específica. A transdução generalizada consiste no empacotamento accidental de um fragmento de DNA bacteriano dentro das partículas fágicas, quando ocorre um ciclo lítico de fagos temperados ou virulentos ou quando um fago temperado lisogénico é induzido para a lise. A transdução específica é mediada por fagos temperados, por exemplo do tipo λ , em que o profago invariavelmente se insere num local geneticamente bem definido do cromossoma bacteriano (*locus* específico). Neste caso, pode verificar-se a separação defeituosa do profago do DNA cromossómico da bactéria lisogénica e a consequente inclusão de genes bacterianos adjacentes ao ponto de integração por parte do DNA fágico. Assim, o

fago transdutor, ao infectar uma nova célula, transfere para esta, por transdução, genes cromossómicos da célula anterior (Archer, 1976).

A **recombinação mitótica** consiste num processo de mitose em que as células filhas diplóides apresentam uma combinação de genes diferentes das suas células parentais diplóides. Os cromossomas homólogos emparelham-se para que ocorra a mitose, e em que o cromatídeo de um cromossoma se recombina com o cromatídeo do cromossoma homólogo correspondente. Este tipo de permuta génica tem tido um particular interesse em fungos filamentosos. Nestes fungos, na fase vegetativa, um pequeno número de núcleos haplóides podem fundir para formar núcleos diplóides. Esta fase diplóide, no ciclo asexuado dos fungos, resulta de uma condição de heterozigotia. Assim, depois da fusão nuclear e do *crossing-over* mitótico com os núcleos diplóides criando trocas intercromossómicas, dá-se a haploidização onde os núcleos diplóides são reduzidos, por mitose, a núcleos haplóides. Esta recombinação mitótica torna possível a análise genética e o controlo dos cruzamentos em microrganismos sem ciclo sexuado. Comparando a eficiência entre a recombinação mitótica e a recombinação sexual (meiótica), verificamos que a primeira é muito menos efectiva do que a segunda. Este fenómeno de hibridização parasexual é conhecido em *Aspergillus oryzae*, *Penicillium chrysogenum* e *Cephalosporium acremonium* e manifesta-se, por exemplo, criando diferentes sectores fenotípicos numa colónia de *Aspergillus*.

A **fusão de protoplastos** é um método utilizado para promover a recombinação genética em células que naturalmente não se cruzariam. A principal barreira para a recombinação entre fungos não idênticos é normalmente a parede celular. Uma vez removida a parede celular, e como as membranas citoplasmáticas têm afinidades e composições químicas idênticas, é possível induzir a fusão destas células criando células híbridas. Para Brenner *et al.* (1958), protoplastos são células osmoticamente frágeis resultantes da remoção completa de material

constituente da parede celular. Assim, os protoplastos podem ser manipulados para os fundir usando, para o efeito, compostos fusogénicos, polietilenoglicol (PEG) e iões de cálcio, ou campos eléctricos (electrofusão). A aplicação com sucesso da fusão de protoplastos depende: da escolha correcta de marcas genéticas complementares como auxotrofia, resistência a antibióticos e deficiências respiratórias que permitam facilmente isolar os protoplastos fusantes dos protoplastos parentais; da eficiência da preparação de protoplastos; da sua frequência de fusão e, ainda, da capacidade de regeneração dos protoplastos fundidos e do seu normal crescimento, aspecto relacionado, nalguns casos, com a intensidade de digestão enzimática da parede celular. No Quadro 16.3 apresentamos a metodologia para obter protoplastos em leveduras e em fungos filamentosos.

Quando Eddy e Williamson (1957) produziram protoplastos de *Saccharomyces carlsbergensis* com enzimas líticas de *Helix pomatia* (caracol), criaram possibilidades para a construção de híbridos intraespécies, interespecies e intergéneros através da fusão de protoplastos. *Saccharomyces cerevisiae* tem sido amplamente utilizada para fusões intraespecíficas. A Figura 16.6 apresenta o esquema, por nós desenvolvido experimentalmente, de fusão de protoplastos de leveduras floculantes com leveduras com maior resistência ao etanol.

Por outro lado, encontrámos trabalhos de fusão interespecíficas entre *Schizosaccharomyces pombe* e *Schizosaccharomyces octosporus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* e, finalmente, *Trichoderma koningii* e *Trichoderma reesei*. Quanto a exemplos de fusões intergenéricas, encontrámos entre *Trichoderma viride* e *Neurospora crassa*, entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*, entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomycopsis lipolytica*, entre *Candida tropicalis* e *Saccharomyces fibuligera*. Finalmente, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces diastaticus* foram usadas para obter híbridos entre estas espécies e *Pichia membranaefaciens*, *Hansenula capsulata* e *Schizosaccharomyces pombe*.

A fusão de protoplastos é um método com grande impacto e claras vantagens no me-

Quadro 16.3 Metodologia para obter protoplastos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e de <i>Aspergillus niger</i>	
<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>
1. Recolha de células em fase exponencial	1. Recolha de <i>pellets</i> jovens crescidos a partir de esporos
2. Tratamento das células com tampão: 0,1 M Tris/HCl pH7,0 0,01 M EDTA 0,6 M KCl 0,1 M β-Mercaptoetanol	2. Tratamento de <i>pellets</i> com tampão: 0,6 M MgSO ₄ .7H ₂ O 10 mM Tampão fosfato pH5,8
3. Digestão enzimática: 0,05 M Tampão fosfato pH7,5 0,6 M KCl 200 U Liticase/ml	3. Digestão enzimática: 10 mM Tampão fosfato pH5,8 1,2 M MgSO ₄ .7H ₂ O 20 mg Novozym 234/g micélio 15000 U β-Glucoronidase/g micélio 3 mg Albumina Sérica Bovina (BSA)/g micélio
	4. Isolamento dos protoplastos em gradientes de sorbitol

lhoramento de estirpes comerciais, permitindo ultrapassar os problemas característicos destas estirpes como a poliploidia (e, conseqüentemente, a sua redução na incidência de mutações fenotipicamente detectáveis), a incapacidade de esporulação e a baixa viabilidade dos esporos.

A tecnologia do DNA recombinante tem-se centrado na análise e manipulação do material genético *in vitro* permitindo, através de técnicas de clonagem o isolamento, purificação e amplificação selectiva de fragmentos discretos de DNA, oriundos de organismos vivos. Para a obtenção destes fragmentos podemos utilizar diferentes estratégias, como a digestão enzimática do DNA por enzimas de restrição, por fragmentação mecânica, a síntese de cDNA de cadeia dupla e, ainda, a síntese química directa.

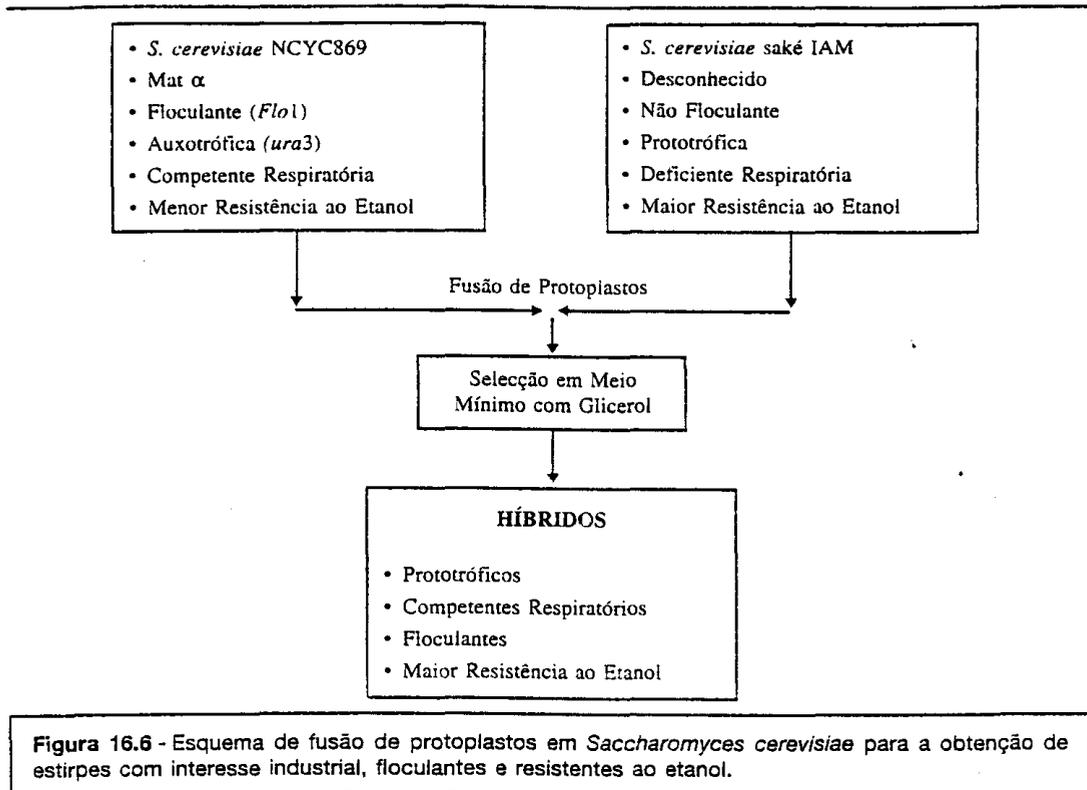
A etapa seguinte é a ligação do fragmento de DNA a um vector, entidade com capacidade de penetração e perpetuação numa célula hospedeira. Para tanto, pode recorrer-se a várias alternativas: terminações coesivas *ab initio* que espontaneamente aderem ao vector, introdução

de ligandos coesivos ou produção de extensões homopoliméricas.

Numa estratégia de clonagem é fundamental introduzir o vector com o fragmento de DNA a clonar numa célula hospedeira. Para o efeito recorre-se à transformação quando o vector é um plasmídeo, à transfecção quando utilizamos um DNA fágico recombinante ou, por último, ao empacotamento *in vitro* do DNA numa cápside fágica, seguido de transdução.

A selecção dos transformantes pode ser feita por complementação genética como é o sistema que utiliza o gene que codifica para a β-galactosidase (*lacZ*), pela perda ou ganho da resistência a um antibiótico específico, pela hidridização de DNA complementar ao DNA clonado e marcado de tal forma que permita a sua identificação. A análise por enzimas de restrição pode ser usada para determinar se o DNA clonado produz os mesmos fragmentos que a molécula de DNA clonada.

Toda esta estratégia de clonagem está resumida na Figura 16.7 onde se põe em evidência a construção do vector (V) a partir do



plasmídeo (P) e com a inserção do gene a clonar (G) que teve origem no fragmento de DNA (F) ou no RNA mensageiro (M). De referir ainda o facto de existirem um conjunto de enzimas que nos permitem optar por diferentes vias na metodologia do DNA recombinante. Enzimas de restrição (endonucleases), transcriptase reversa, fosfatase alcalina, ligase-DNA T4, enzima de Klenow, nucleases S1 e Bal 31, polimerases, exonucleases, metilases, topoisomerases, DNase e RNases, formam uma plêiade de enzimas que têm permitido desenvolver a tecnologia do DNA recombinante (Figura 16.7).

Desde o primeiro gene clonado no início da década de 70, passando pela primeira vacina animal até à produção de insulina humana, a tecnologia do DNA recombinante tem trazido novas perspectivas à indústria.

No entanto, continua a haver grandes lacunas na caracterização genética dos organismos mais importantes para a indústria, como é o

Aspergillus oryzae e o *Penicillium chrysogenum*. Dois destes aspectos têm sido a impossibilidade de obter vectores apropriados para estes organismos, *i.e.*, estáveis e com replicação autónoma, e a falta de compreensão detalhada dos principais passos de conversão enzimática em importantes processos industriais. Apesar de tudo, muito trabalho tem vindo a ser realizado no sentido de ultrapassar estas dificuldades. É de referir a obtenção, pelo grupo do Prof. Clutterbuck da Universidade de Glasgow, do plasmídeo ARp1 com capacidade de replicação autónoma em *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* e, consequentemente, com o aumento da frequência de transformação (super-transformantes) (Gems *et al.*, 1991).

CONSERVAÇÃO

A conservação (Figura 16.2) é uma prática universal em todo o trabalho microbio-

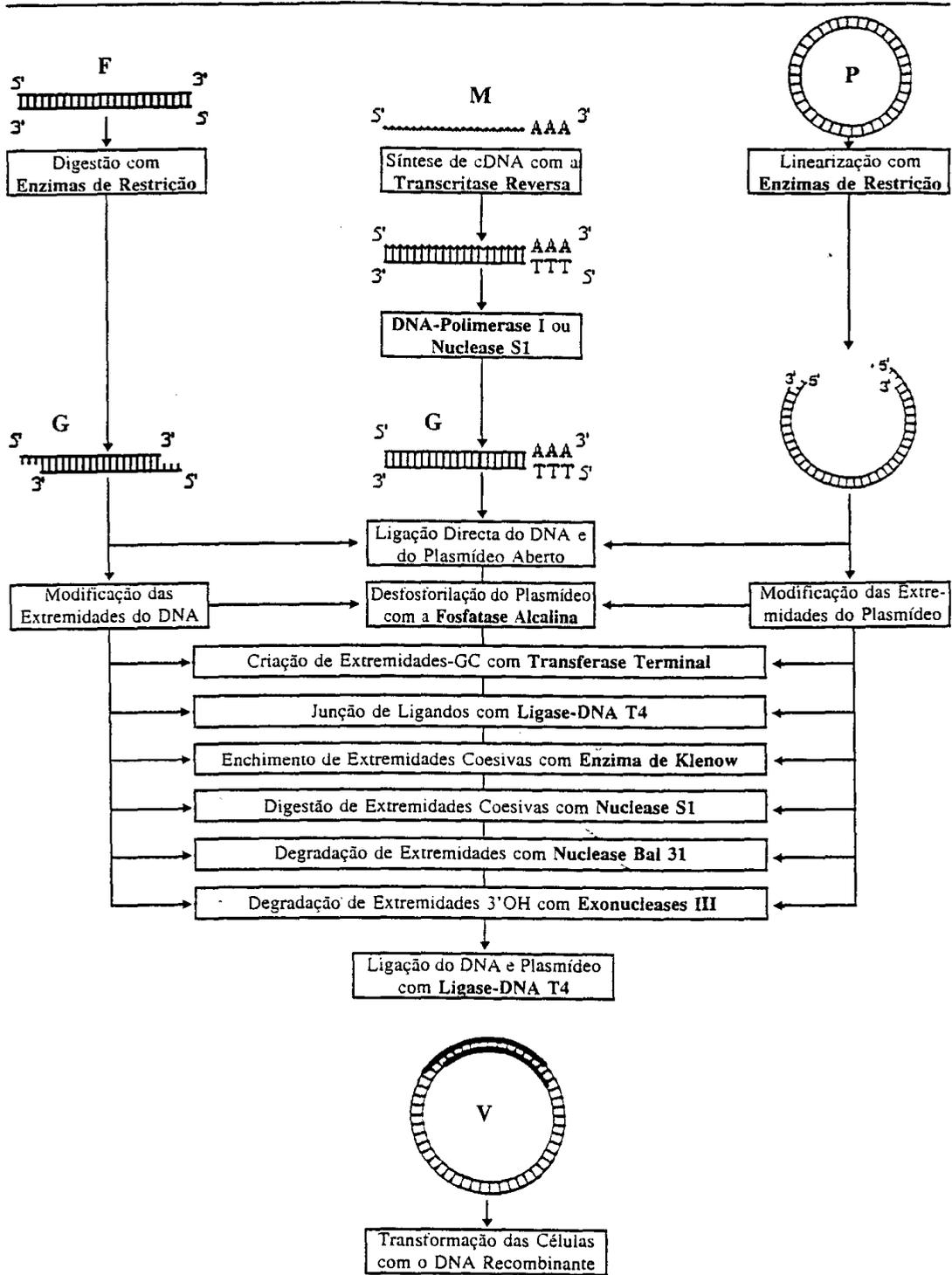


Figura 16.7 - Diferentes estratégias de construção de um vector e respectiva utilização de enzimas modificadoras do DNA. F: fragmento de DNA; M: RNA mensageiro; P: plasmídeo; G: gene a clonar; V: vector (Adaptado de Perbal, 1988).

lógico, uma vez que é necessário conservar os microrganismos com que se trabalha. O tipo de trabalho que é feito com os microrganismos pré-determina as necessidades da conservação, *i.e.*, e é necessário conservar os microrganismos só por um curto espaço de tempo teremos um problema, essencialmente, de manutenção mais do que de conservação; por outro lado, se é necessário conservar os microrganismos por um período ilimitado de tempo, como acontece nos depósitos das colecções de culturas tipo, a conservação passará a ser perpetuação.

A grande variedade de métodos usados para a manutenção e conservação dos microrganismos deriva, em parte, das diferentes escalas de tempo usadas para a conservação mas também da diversidade biológica dos mi-

crorganismos. Contudo, qualquer que seja o método de conservação, ele terá que manter a cultura viável, não contaminada e, por último, inalterada nas suas propriedades. Um quarto objectivo poderá ser adicionado aos já mencionados, quando se trata de serviços de colecções de culturas tipo, e que é, o de existir sempre um lote adequado e sistemas apropriados para a reposição de lotes, quando necessário. No Quadro 16.4 estão referidas algumas colecções de culturas fornecedoras de microrganismos para os trabalhos experimentais. Estas colecções são as principais responsáveis pela manutenção de estirpes industriais, ou com potencial interesse industrial, patenteadas.

Os métodos usados para a manutenção e conservação vão desde a subcultura dos mi-

Quadro 16.4
Colecções de culturas de microrganismos

Colecção de Cultura	Acrónimo da Colecção	Endereço
American Type Culture Collection	ATCC	12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA
International Mycological Institute	IMI	Bakeham Lane, Egham, Surrey TW 20 9TY, UK
National Collection of Yeast Cultures	NCYC	Norwich Laboratory, Colney Lane, Norwich NR4 7UA, UK
Portuguese Yeast Culture Collection	IGC	SA Biotecnologia, Fac. Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Quinta da Torre, 2825 Monte da Caparica, Portugal
Culture Collection of Algae and Protozoa	CCAP	Institute of Freshwater Ecology, The Farry House, Far Sawrey, Ambleside, Cumbria LA22 0LP, UK
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	DSMZ	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemanha
Centraalbureau voor Schimmelcultures	CBS	Oosterstraat 1, P.O. Box 273, 3740 AG Baarn, Holanda
North Regional Research Laboratory	NRRL	US Department of Agriculture, Peoria, Illinois, USA
Micoteca da Universidade do Minho	MUM	Centro de Engenharia Biológica, Campus de Gualtar, 4709 Braga Codex, Portugal
Colección Española de Cultivos Tipo	CECT	Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, 46100 Burjasot (Valencia), Espanha

croorganismos, passando pela secagem em areia, solo, gel de sílica ou discos de papel, pela liofilização ou pelo congelamento a -80°C com pérolas de vidro, a -140°C em azoto na fase de vapor, ou -196°C em azoto na fase líquida usando para o efeito crioprotectores.

Nas culturas de fungos filamentosos torna-se importante os métodos de luta e controlo contra os insectos da ordem Coleoptera, principalmente os géneros *Tyrotlyphus* e *Tarsonemus*, por serem predadores dos fungos filamentosos. Assim, para evitar quer a destruição das colecções quer as possíveis contaminações cruzadas, as precauções contra estes ácaros são: a higiene, a utilização de acaricidas (*e.g.* Acteltic, da ICI Agrochemicals), a fumigação com *p*-diclorobenzeno, a criação de barreiras mecânicas e químicas como a utilização, à volta das culturas, de óleo, água ou vaselina, a utilização de papel de cigarro colado com gelatina e sulfato de cobre na boca do tubo e, por último, a utilização de baixas temperaturas (4 a 8°C) para diminuir a propagação dos ácaros ou -18°C para destruir os ácaros e os seus ovos.

BIO-REACTORES

Os bio-reactores (Figura 16.2) são aparelhos onde os materiais são tratados para promover transformações bioquímicas por acção *in vivo* de células ou por acção *in vitro* de componentes celulares. Historicamente o primeiro fermentador no laboratório foi o balão Erlenmeyer com agitação. Com o desenvolvimento da produção da penicilina depois da II Grande Guerra, os fermentadores foram desenvolvidos passando pelos jarros de vidro com agitação até aos tanques de aço inoxidável com várias formas e tamanhos. Estes bio-reactores, existentes nos nossos dias para produção em grande escala, são versões resultantes de um estudo e melhoramento à escala laboratorial onde a optimização do processo envolve a minimização dos materiais de alimentação e de energia e a maximização da pureza e qualidade do produto desejado.

CONTROLO DO PROCESSO E ISOLAMENTO DO PRODUTO

O controlo do processo (Figura 16.2) aparece assim como vector fundamental na optimização da fermentação, permitindo dominar os parâmetros físicos e químicos associados ao processo. Neste sentido a instrumentação dos bio-reactores tem-se desenvolvido em direcção aos conhecimentos fisiológicos e bioquímicos dos seres vivos usados nas fermentações, permitindo controlar parâmetros como a temperatura, pH, oxigénio dissolvido é consumido, dióxido de carbono produzido, arejamento e agitação, produção de espuma, etc. Neste contexto, as diferentes variáveis do processo são monitorizadas permitindo a sua análise e controlo através de equipamentos de fermentação.

O processo de separação (Figura 16.2) relaciona-se com a fase de separação e purificação do produto originado pelo processo fermentativo. Como na maior parte dos processos biotecnológicos o produto desejado se encontra em baixas concentrações num grande volume de líquido, os processos de separação levam, numa primeira etapa, à separação da fase líquida e da fase sólida utilizando a sedimentação, a filtração, a centrifugação, etc.; e, noutra etapa, à purificação e concentração do produto a partir da fase líquida utilizando a evaporação, a destilação, a precipitação, a cromatografia de afinidade, de troca iónica ou de filtração em gel, etc. Esta etapa final no processo biotecnológico representa a maior percentagem dos custos de todo o processo. Um melhoramento na separação do produto melhorará a eficiência global do processo e consequentemente os custos a ele associados.

O produto isolado obtido a partir de um processo biotecnológico (Figura 16.2) deve apresentar estabilidade para poder ser guardado, atractivos na sua qualidade e preço ou na sua originalidade e inovação para poder ser industrializado. Como exemplos práticos da utilização da tecnologia do DNA recombinante e de todos os conceitos biotecnológicos já desenvolvidos, iremos apresentar a produção da insulina humana, através da transformação he-

teróloga, em *Escherichia coli* e a produção da enzima pectina metilesterase, através da transformação homóloga, em *Aspergillus niger*.

PRODUÇÃO DE INSULINA HUMANA EM *E. COLI*

No homem, um dos processos de manutenção da homeostase é da responsabilidade do sistema hormonal. Dentro das hormonas, encontramos a hormona insulina, pequena proteína formada por duas cadeias, a cadeia A de 21 aminoácidos e a cadeia B de 30 aminoácidos, ligadas entre si por duas pontes bissulfito. Esta proteína é sintetizada pelas células beta das Ilhôtas de Langerhans do pâncreas e tem a função de controlar o nível de glucose na corrente sanguínea (Figura 16.7). Uma deficiência na produção da insulina, traduz-se num conjunto de sintomas que pode levar à morte do indivíduo.

quência de aminoácidos da insulina humana. Assim, a insulina de porco é a mais próxima da insulina humana, substituindo na cadeia B na parte do c-terminal a treonina pela alanina ao passo que, a insulina de boi difere em três posições. A estas diferenças está associado o grau de imunogenicidade destas moléculas, sendo elevado no caso da insulina bovina comparativamente à de origem suína. Outro aspecto prático é a real dificuldade de produzir hormonas isentas de contaminantes de origem bovina ou suína. Ora, doentes tratados com estas hormonas acabam por desenvolver anticorpos contra a insulina. Em consequência destes problemas secundários encontramos, nos diabéticos, atrofia do tecido adiposo subcutâneo e uma necessidade crescente de aumento de dose de tratamento devido à insulina administrada ser neutralizada pela presença na circulação sanguínea de anticorpos contra a insulina.

Sabendo que as necessidades de insulina são cada vez maiores, quer pelo crescente número de diabéticos quer pela necessidade de

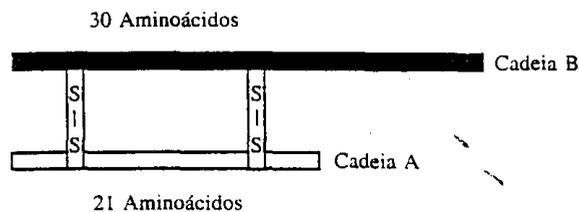


Figura 16.7 - Representação esquemática da estrutura da molécula de insulina humana.

Em 1922, com a possibilidade do isolamento e purificação da insulina a partir do pâncreas de animais de abate para o consumo humano (e.g. porco e boi), criou-se o tratamento clínico da diabetes *mellitus* através de programas de injeção desta hormona permitindo, assim, aliviar fortemente o sofrimento deste tipo de doentes. De notar que 1 a 2% da população da Europa e da América sofre da diabetes e que 20% destes doentes são dependentes da insulina.

Por outro lado, as moléculas de insulina de origem animal diferem, ligeiramente, na se-

maiores doses para o seu tratamento; sabendo que a produção necessária de insulina pelo fornecimento dos pâncreas de animais não está garantida no futuro; sabendo, igualmente, que há uma impossibilidade de eliminar os problemas secundários criados pela utilização da insulina animal, a procura da utilização da insulina humana e da sua produção em grande escala criaram fortes motivações científicas, terapêuticas e comerciais para concretizar este desiderato.

Neste contexto, e ultrapassados os primeiros receios existentes no início da década

de 70 sobre a utilização do DNA recombinante, o primeiro passo para a produção de insulina por bactérias foi dado quando Ullrich *et al.* (1977) prepararam RNA mensageiro de células das Ilhôtas de Langerhans de rato para, posteriormente, sintetizarem o cDNA com a ajuda da enzima transcriptase reversa. Com estas moléculas clonaram plasmídeos quiméricos em *E. coli*. Uma colónia desta bactéria transformada e produtora de insulina foi seleccionada e crescida para isolar em grande escala o plasmídeo. Depois do fragmento de cDNA ter sido isolado do plasmídeo que o continha, e ter sido determinada a sequência de nucleótidos, foi possível identificar a região completa codificadora da pró-insulina do rato, identificar parte da sequência pré-peptídica e, finalmente, identificar a sequência inteira da região 3' terminal do mRNA não traduzido.

Um ano mais tarde, Villa-Komaroff *et al.* (1978) evoluíram com este trabalho, utilizando o plasmídeo pBR322 e cDNA com a informação da pró-insulina de rato. Obtêm clones identificados por ensaios radio-imunológicos. Estas bactérias eram capazes de segregar a insulina, ainda que esta fosse muito imperfeita por conter grandes porções da proteína (β -lactamase) codificada pelas sequências adjacentes do local de clonagem. Contudo, estes dois trabalhos pioneiros demonstraram, experimentalmente, a possibilidade de proteínas de rato serem produzidas por bactérias através da tecnologia do DNA recombinante.

Os passos seguintes foram dados por Goeddel *et al.* (1979) e encontram-se sumariados na Figura 16.8.

Estes investigadores clonaram no gene da β -galactosidase presente no plasmídeo bacteriano o gene sintético da cadeia A ou da cadeia B da insulina humana contendo, para cada caso, um resíduo extra para a metionina na extremidade 5'. Esta estratégia, permitiu separar as cadeias de insulina, A ou B, dos fragmentos da β -galactosidase contidos nas proteínas recombinantes, por tratamento proteolítico com brometo de cianogénio que ataca especificamente os resíduos de metionina (as cadeias A e B não possuem este aminoácido). As cadeias A e B foram pos-

teriormente sujeitas a processo de purificação por HPLC. Esta estratégia de clonagem permitiu igualmente colocar os genes sintéticos das cadeias A ou B sob o controlo de um forte promotor (*lac*) induzido na presença da galactose e na completa ausência de glucose.

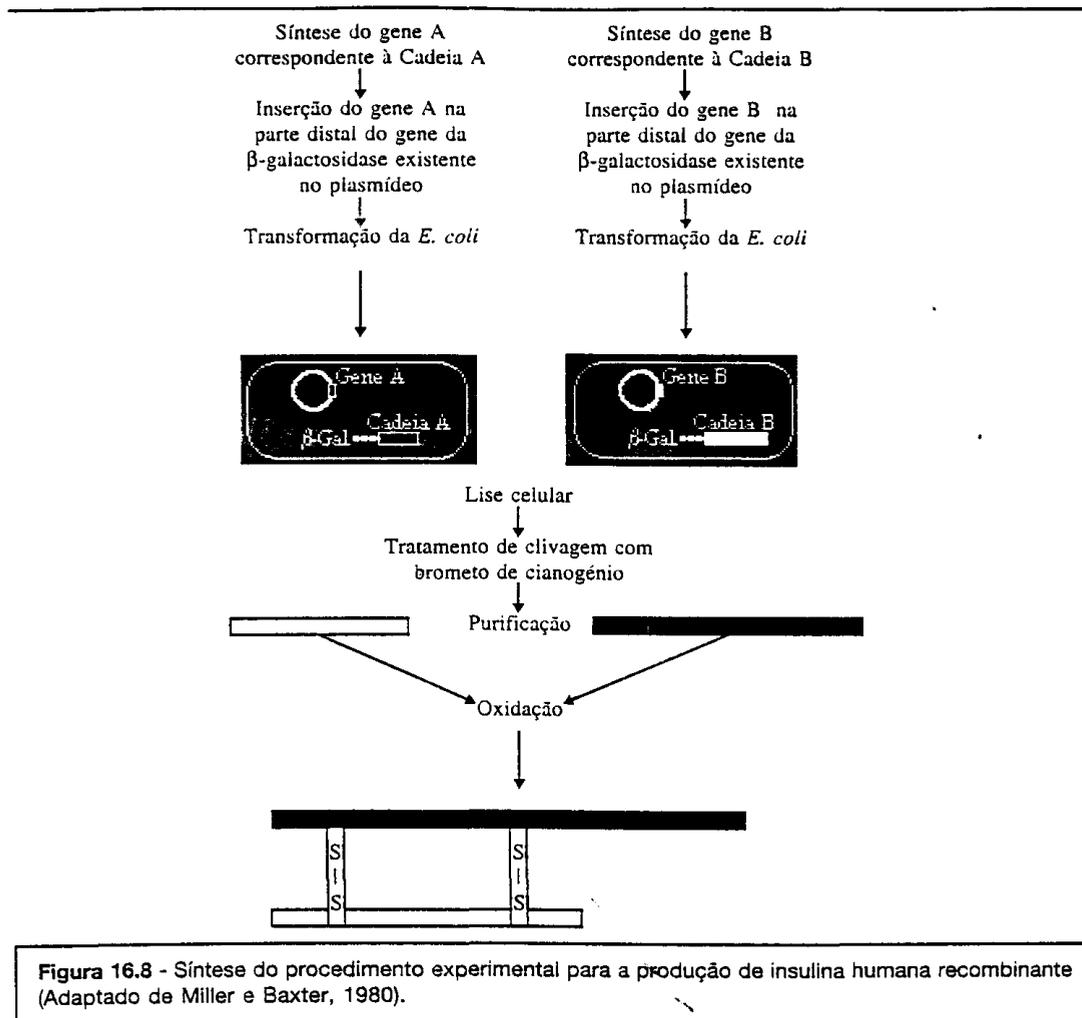
Estes resultados experimentais permitiram que indústrias como a Eli Lilly & Co. em colaboração com Genetech Inc., tenham adoptado esta metodologia para produzirem e comercializarem a insulina humana recombinante. Assim, em 1982 é lançada no mercado pela Genetech Inc. a primeira insulina humana recombinante - a Humulin. Este produto mostrou-se isento de proteínas de *E. coli*, endotoxinas e pirógenos, com comportamento químico e físico em tudo idêntico à insulina isolada do pâncreas humano e com actividade biológica normal.

Mais recentemente, como alternativa ao procedimento descrito, foi adoptada a utilização do gene da molécula precursora da insulina, a pró-insulina, clonado em *E. coli*. Após purificação desta molécula, a insulina nativa surge como derivado da pró-insulina pela digestão provocada pela tripsina e carboxipeptidase β .

PRODUÇÃO DE PECTINASE EM *ASPERGILLUS NIGER*

A moderna tecnologia de sumos de frutos e de vegetais utiliza uma grande variedade de matérias-primas maximizando o seu aproveitamento, procurando ainda aumentar a rapidez do processo e o fornecimento de uma vasta gama de produtos finais. Alguns destes aspectos foram alcançados através do melhoramento dos sistemas ou da introdução de novos processos industriais bem como de novos equipamentos. Em muitas destas novas abordagens o uso de enzimas tornou-se uma prática corrente.

As enzimas são responsáveis por alterações nos alimentos, durante o crescimento dos produtos, colheita, armazenamento, processamento e subsequente revenda. Muitas destas enzimas induzem alterações não fa-



voráveis ao normal processamento industrial destes alimentos. No entanto, enzimas há que promovem alterações desejáveis melhorando as qualidades do produto alimentar. É neste equilíbrio entre as actividades enzimáticas e a duração da sua actuação que a indústria alimentar, e em particular a da indústria dos sumos de frutos, tem desenvolvido a sua tecnologia e as características dos seus produtos.

As pectinases são as enzimas que ocupam maior destaque neste sector industrial sendo utilizadas com diferentes objectivos (Quadro 16.5).

O substrato para estas enzimas é formado por um complexo grupo coloidal, natural, lo-

calizado principalmente na lamela média da célula vegetal. Estes hidratos de carbono são formados quimicamente pelo ácido poligalacturónico com extensões variáveis de metoxilação. O ácido pectico é formado pelo ácido poligalacturónico praticamente isento de grupos metilo ao passo que o ácido pectínico apresenta grandes porções esterificadas com grupos metilo. Pectatos e pectinatos são os sais respectivos dos dois ácidos atrás referidos. Por outro lado, a pectina é uma mistura hidrossolúvel de ácidos pectínicos capaz de formar géis quando aquecida e, em condições de grande concentração de açúcares e ambiente ácido, esta propriedade gelificante está na origem do fabrico das geleias.

Quadro 16.5 Aplicações de pectinases comerciais na tecnologia de sumos de frutos e vegetais	
Aplicação	Efeito
Clarificação	A despectinização dos sumos permite a sua concentração sem gelificação e sem desenvolver turbidez
Maceração	A desintegração por separação celular permite obter bases de néctar e alimentos para bebés
Liquefação	A solubilização de sólidos é aumentada quando os produtos são tratados com pectinases em combinação com celulases
Outras	A preparação e limpeza de maçãs para o fabrico de marmeladas e doces; aumento na recuperação de óleo da polpa de azeitonas e amendoim

As pectinases formam um grupo de enzimas que incluem: enzimas de desesterificação – a pectina metilesterase (PME) – e as enzimas de despolimerização – as poligalacturonases (PG) e as pectato/pectina liases (PL) – (Figura 16.9).

A enzima pectina metilesterase tem o nome sistemático de pectina pectil-hidrolase (EC 3.1.1.11) e pertence ao grupo das enzimas carboxiléster-hidrolases. Na literatura surge vulgarmente, para esta enzima, expressões como pectinesterase, pectina desmetoxilase e pectina

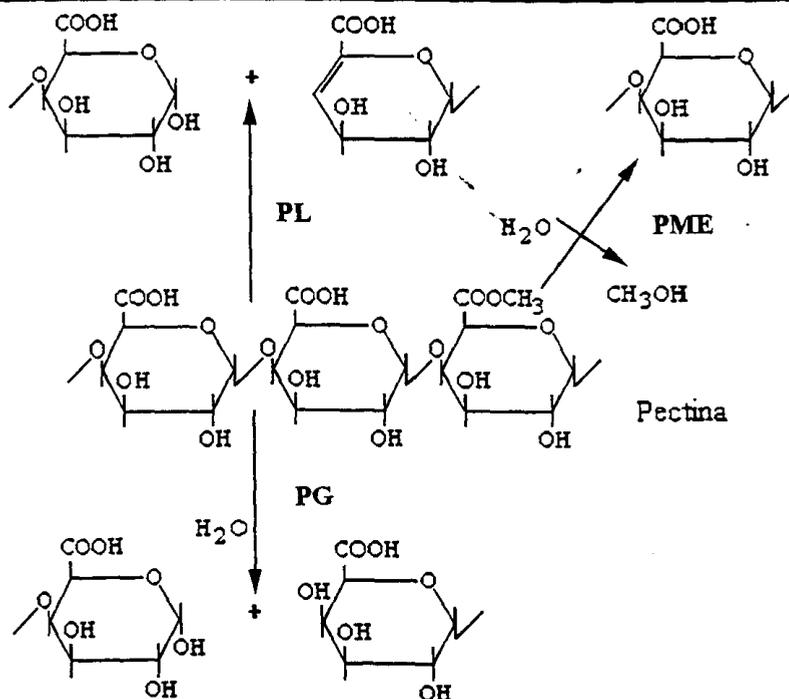


Figura 16.9 - Atividades catalíticas das pectinases. PME - enzima pectina metilesterase; PG - enzima poligalacturonase e PL - enzima pectina liase.

metoxilase. Esta enzima catalisa a hidrólise dos grupos metilo dos resíduos dos ácidos D-galacturónicos da pectina com libertação de metanol. Este processo de desesterificação é de extrema importância na degradação da pectina tornando o polímero susceptível ao cálcio devido à formação de grupos carboxilo livres.

As enzimas, colectivamente chamadas poligalacturonases [EC 3.2.1.15, poli(1->4- α -D-galacturonido)-glucanohidrolase], actuam hidroliticamente nas ligações (1->4)- α -D-glucosídicas dos substratos de natureza péctica. Estas enzimas formam quatro grupos de acordo com as suas preferências para pectina ou pectato e de acordo com a sua actuação terminal ou aleatória nas ligações (1->4)- α -D-glucosídicas.

As enzimas pectina/pectato liases [respectivamente, EC 4.2.2.10, poli(metoxi-D-galacturonido) liase e EC 4.2.2.2, poli(1->4- α -D-galacturonido) liase] catalisam a quebra das ligações (1->4)- α -D-glucosídicas de D-galacturonanos pelo mecanismo da β -eliminação. Este mecanismo transeliminativo remove o átomo de hidrogénio da posição C5 com a formação de uma dupla ligação para estabilização da nova molécula.

As pectinases têm sido encontradas nas plantas superiores, nomeadamente, nos frutos como o tomate, a laranja e o limão, maçã, tabaco, etc. No entanto, tem-se observado que numerosos microrganismos produzem pectinases, sendo os fungos filamentosos aqueles que maior destaque merecem. Temos como exemplos *Penicillium chrysogenum* [trabalho pioneiro em pectinases realizado por Phaff (1947)], *Monilia laxa*, *Sclerotinia sclerotiorum*, os *Botrytis allii*, *B. cinerea* e *B. squamosa*, *Verticillium albo-atrum* e *V. dahliae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma reesei* e, finalmente, os *Aspergilli*, como o mais importante grupo produtor destas enzimas. Dentro deste grupo *A. niger* é aquele que maior atenção tem tido devido aos seus múltiplos usos industriais.

A maioria das pectinases microbianas são induzidas pela pectina e ácido péctico, e apresentam um pH óptimo dentro dos valores 3-4, ao passo que para as enzimas nativas das plantas superiores encontram-se valores de pH compreendidos entre 7-8.

Uma vez que as pectinases têm vindo a adquirir uma maior importância nos processos industriais, tem-se verificado uma preocupação em compreender os seus mecanismos de regulação e expressão génica levando ao isolamento e sequenciação dos genes que codificam para a pectina metilesterase em *A. niger* RH5344 (Khanh *et al.* 1990, e Khanh *et al.*, 1992) e para a poligalacturonase em *A. niger* RH5344 (Ruttkowski *et al.*, 1990). Para pectato liase de *A. nidulans* foram realizados estudos de regulação do gene *peIA* por Dean e Timberlake (1989).

Neste sentido, em consequência do advento da tecnologia do DNA recombinante para os fungos filamentosos, o grupo alemão Khanh e Ruttkowski, já citado, em estreita colaboração com a Rohm GmbH, principal produtora industrial de pectinases comerciais a nível mundial, isolaram o gene *pmeA* (pectina metilesterase) de *A. niger*. Para este efeito utilizaram um banco genómico criado em fagos λ EMBL3 e, das cerca de 106 placas fágicas recombinantes sujeitas à hibridização com uma sonda contendo o gene *pmeA*, obtiveram 38 clones fágicos que foram purificados. Este gene *pmeA* de cDNA utilizado como sonda, foi obtido por síntese com a ajuda da enzima transcriptase reversa, depois de *A. niger* ter sido cultivado em condições indutivas, ou seja, em meio de pectina, e o seu mRNA ter sido isolado e purificado em colunas de celulose oligo-dT.

O gene *pmeA* de cDNA apresentou uma sequência de 993 pares de bases correspondente a uma proteína de 314 aminoácidos e a um sinal peptídico n-terminal de 17 aminoácidos. Esta sequência (Figura 16.10) está disponível pelo número X52902 no banco de dados da EMBL (*European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg*). Por outro lado, o gene genómico isolado do clone fágico 71 mostrou ser formado por sete exões e seis intrões, e a sequência nucleotídica das regiões codificadoras serem idênticas às encontradas no gene obtido *via* cDNA.

Após este trabalho, o gene *pmeA* foi inserido no plasmídeo pSTA10 contendo o gene de selecção da nitrato redutase (*niaD*) de *A. niger*. Este novo plasmídeo foi utilizado

para transformação de *A. niger* auxotrófico para o nitrato. Os transformantes obtidos, capazes de crescerem em meio de nitrato, mostraram por *Southern* que tinham integrado o plasmídeo no seu genoma e que a capacidade de segregar a enzima pectina metilesterase tinha aumentado, na melhor das situações, de 25 vezes. Verificou-se, para este caso, que o aumento da produção enzimática estava associado ao número de cópias do gene *pmeA* integradas no genoma do fungo.

Apesar deste aumento de produção enzimática ser significativo em termos de produção industrial, mais tarde foi utilizado o mesmo gene *pmeA* para o colocar sobre controlo de diferentes promotores. Assim, o promotor da desidrogenase gliceraldeído-3-

-fosfato (*gpd*) de *A. nidulans* e o promotor da α -amilase (*amy*) de *A. oryzae* foram utilizados para a construção de novos plasmídeos de expressão. A selecção destes promotores está relacionada com o conhecimento experimental de serem, nos seus respectivos fungos, promotores muito eficientes na expressão destas duas enzimas. Após transformação de *A. niger* com estes novos vectores, foram encontradas actividades enzimáticas surpreendentes, ou seja, 200 vezes superiores ao encontrado em *A. niger* selvagem. Estes resultados demonstraram que, através da tecnologia do DNA recombinante, foi possível obter rendimentos consideráveis na produção desta enzima, muito superiores a qualquer programa que perspectivasse somente o melhoramento do processo industrial.

ATG	GTT	AAG	TCA	ATT	CTT	GCA	TCC	GTT	CTC	TTT	GCA	GCG	ACC
M	V	K	S	I	L	A	S	V	L	F	A	A	T
GCG	CTG	GCC	GCG	AGC	CGC	ATG	ACG	GCT	CCT	TCC	GGT	GCG	ATT
A	L	A	A	S	R	M	T	A	P	S	G	A	I
GTT	GTT	GCC	AAG	TCC	GGA	GGT	GAC	TAC	GAC	ACG	ATC	AGC	GCT
V	V	A	K	S	G	G	D	Y	D	T	I	S	A
GCC	GTT	GAT	GCT	CTC	AGC	ACG	ACT	TCG	ACC	GAG	ACC	CAG	ACC
A	V	D	A	L	S	T	T	S	T	E	T	Q	T
ATC	TTC	ATT	GAG	GAG	GGA	TCC	TAC	GAC	GAG	CAG	GTG	TAT	ATT
I	F	I	E	E	G	S	Y	D	E	Q	V	Y	I
CCC	GCC	CTC	AGT	GGA	AAG	CTG	ATT	GTC	TAC	GGT	CAG	ACT	GAG
P	A	L	S	G	K	L	I	V	Y	G	Q	T	E
GAC	ACT	ACC	ACC	TAC	ACC	AGC	AAC	CTG	GTC	AAC	ATC	ACC	CAC
D	T	T	T	Y	T	S	N	L	V	N	I	T	H
GCC	ATC	GCT	TTG	GCC	GAT	GTC	GAC	AAT	GAC	GAT	GAG	ACT	GCA
A	I	A	L	A	D	V	D	N	D	E	T	A	A
ACC	CTC	CGT	AAC	TAC	GCT	GAA	GGC	TCG	GCC	ATC	TAC	AAC	CTC
T	L	R	N	Y	A	E	G	S	A	I	Y	N	L
AAC	ATT	GCC	AAC	ACC	TGC	GGT	CAG	GCC	TGC	CAC	CAG	GCT	CTC
N	I	A	N	T	C	G	Q	A	C	H	Q	A	L
GCC	GTG	AGC	GCC	TAT	GCC	AGC	GAG	CAG	GGA	TAC	TAC	GCC	TGC
A	V	S	A	Y	A	S	E	Q	G	Y	Y	A	C
CAG	TTC	ACC	GGA	TAC	CAG	GAC	ACC	CTT	CTG	GCT	GAG	ACC	GGC
Q	F	T	G	Y	Q	D	T	L	L	A	E	T	G
TAC	CAG	GTT	TAC	GCC	GGA	ACC	TAC	ATC	GAG	GGT	GCC	GTC	GAC
Y	Q	V	Y	A	G	T	Y	I	E	G	A	V	D
TTC	ATC	TTT	GGA	CAG	CAC	GCC	CGC	GCC	TGG	TTC	CAC	GAG	TGC
F	I	F	GTC	Q	H	A	R	A	W	F	H	E	C
GAC	ATC	CGC	GTC	CTC	GAG	GGC	CCC	AGC	TCC	GCC	TCC	ATC	ACC
D	I	R	V	L	E	G	P	S	S	A	S	I	T
GCC	AAC	GGC	CGC	TCC	TCC	GAG	TCG	GAC	GAC	TCT	TAC	TAC	GTG
A	N	G	R	S	S	E	S	D	D	S	Y	Y	V
ATC	CAC	AAG	TCC	ACC	GTC	GCT	GCT	GCT	GAT	GGC	AAC	GAT	GTT
I	H	K	S	T	V	A	A	A	D	G	N	D	V
TCC	TCC	GGC	ACC	TAC	TAC	CTC	GGC	CGC	CCC	TGG	TCC	CAG	TAC
S	S	G	T	Y	Y	L	G	R	P	W	S	Q	Y
GCT	CGC	GTC	TGC	TTC	CAG	AAG	ACC	TCC	ATG	ACC	GAT	GTG	ATC
A	R	V	C	F	Q	K	T	S	M	T	D	V	I
AAC	CAC	CTC	GGC	TGG	ACT	GAG	TGG	TCG	ACC	TCC	ACC	CCC	AAC
N	H	L	G	W	T	E	W	S	T	S	T	P	N
ACC	GAG	AAC	GTC	ACC	TTT	GTT	GAA	TAC	GGC	AAC	ACC	GGC	ACT
T	E	N	V	T	F	V	E	Y	G	N	T	G	T
GGC	GCT	GAG	GGT	CCC	CGT	GCT	AAC	TTC	TCT	TCT	GAG	CTG	ACT
G	A	E	G	P	R	A	N	F	S	S	E	L	T
GAG	CCC	ATC	ACT	ATC	TCT	TGG	CTT	CTC	GGA	TCT	GAC	TGG	GAG
E	P	I	T	I	S	W	L	L	G	S	D	W	E
GAC	TGG	GTT	GAT	ACT	AGC	TAC	ATC	AAC	IAA	STOP			
D	W	V	D	T	S	Y	I	N					

Figura 16.10 - Sequência de nucleótidos e sequência deduzida de aminoácidos do gene *pmeA* de *A. niger* (Khanh et al., 1990).



PALAVRAS-CHAVE

Aspergillus niger, Bio-reactores, Biotecnologia microbiana, Conjugação, Controlo do processo, Conservação, *Escherichia coli*, Esterilização, Fusão de protoplastos, Genética aplicada, Insulina humana, Isolamento do produto, Matéria-prima, Microrganismos, Mutagénese, Pectina metilesterase, Processos parasexuais, Processos sexuais, Purificação do produto final, Rastreio racional, Recombinação mitótica, Transdução, Transfecção, Transformação, Tecnologia do DNA recombinante.



RESUMO

A **biotecnologia microbiana** é uma área aplicada das ciências da vida e tecnologia que envolve aplicações práticas de **microrganismos** ou das suas componentes celulares para servir a indústria química e farmacêutica e servir a tecnologia alimentar e gestão ambiental.

Colocando os **bio-reactores** no centro de um processo biotecnológico típico, encontramos uma forte ligação entre a **matéria-prima** e o **produto final**. Nesta estratégia considera-se muito importante a existência apropriada de microrganismos seleccionados a partir de programas de **rastreio racional** e sujeitos a uma correcta **conservação** para, numa fase seguinte, poderem ser melhorados no seu potencial biotecnológico.

Para este efeito, a **genética aplicada** permite realizar modificações no microrganismo de modo a que este produza mais do produto desejado ou mesmo, mais recentemente, produza novos produtos. As técnicas utilizadas que permitem esse melhoramento vão desde a **mutagénese**, **processos sexuais** e **processos parasexuais** (**conjugação**, **transdução**, **transformação**, **transfecção**, **recombinação mitótica** e **fusão de protoplastos**) até à **tecnologia do DNA recombinante**.

Para completar a visão sobre o processo é discutido os princípios do **controlo do processo**, da **esterilização** do substrato bem como, os importantes processos a jusante do bio-reactor: o **isolamento do produto** e a sua **purificação**.

A produção da **insulina humana** em *Escherichia coli* e a produção da enzima **pectina metilesterase** em *Aspergillus niger* utilizando, respectivamente, a transformação heteróloga e a transformação homóloga, são dois exemplos práticos apresentados sobre a importância crescente da tecnologia do DNA recombinante nos processos industriais.



PERGUNTAS DE REVISÃO

1. Nas fermentações quais são as fases a montante e a jusante do bio-reactor? Em que consiste cada uma delas?
2. Quais são os diferentes processos parasexuais utilizados no melhoramento genético de estirpes com interesse biotecnológico? Em que consiste cada um deles?
3. Quais as principais etapas na tecnologia do DNA recombinante?
4. Qual o papel desempenhado pelas diferentes enzimas utilizadas na tecnologia do DNA recombinante?
5. Quais os principais passos utilizados para a produção industrial da insulina humana por *E. coli*?
6. Quais os benefícios da indústria das enzimas, ao procurar novos microrganismos ou ao usar microrganismos geneticamente modificados?

Bibliografia:

- 1 - Archer, L. I. (1976). *Genética molecular*. Edições Brotéria, Lisboa.
- 2 - Brenner, S., Dark, F. A., Gerhardt, P., Jeynes, M. H., Kandler, O., Kellenberger, E., Klieneberger-Nobel, E., McQuillen, K., Rubios-Huertos, M., Salton, M. R. J., Strange, R. E., Tomcsik, J. E. & Weibull, C. (1958). *Bacterial protoplasts*. *Nature* (London) 181, 1713-1716.
- 3 - Buxton, F. P., Gwynne, D. I. & Davies, R. W. (1985). *Transformation of Aspergillus niger using the argB gene of Aspergillus nidulans*. *Gene*, 37, 207-214.
- 4 - Dean, R. A. & Timberlake, W. E. (1989). *Regulation of the Aspergillus nidulans pectate lyase gene (pelA)*. *The Plant Cell*, 1, 275-284.
- 5 - Eddy, A. A. & Williamson, D. H. (1957). *A method for isolating yeast protoplasts*. *Nature* (London) 179, 1252-1253.
- 6 - Elander, R. P. (1987). *Microbial screening, selection and strain improvement*. In «Basic Biotechnology», Bu'Lock, J., Kristiansen, B. (Eds.), pp. 217-251, Academic Press, London.
- 7 - Gems, D., Johnstone, I. L. & Clutterbuck, A. J. (1991). *An autonomously replicating plasmid transforms Aspergillus nidulans at high frequency*. *Gene*, 98, 61-67.
- 8 - Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. & Riggs, A. D. (1979). *Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 106-110.
- 9 - Goosen, T., van Engelenburg, F., Debets, F., Swart, K., Bos, K. & van den Broek, H. (1989). *Tryptophan auxotrophic mutants in Aspergillus niger: inactivation of the TrpC gene by cotransformation mutagenesis*. *Mol. Gen. Genet.*, 219, 282-288.
- 10 - Hartingsveldt, W., Mattern, I. E., van Zeijl, C. M. J., Pouwels, P. H. & van den Hondel, C. A. M. J. J. (1987). *Development of a homologous transformation system for Aspergillus niger based on the pyrG gene*. *Mol. Gen. Genet.*, 206, 71-75.
- 11 - Kelly, J. M. & Hynes, M. J. (1985). *Transformation of Aspergillus niger by the amdS gene of Aspergillus nidulans*. *EMBO J.*, 4, 475-479.
- 12 - Khanh, N. Q., Albrecht, H., Ruttkowski, E., Löffler, F., Gottschalk, M. & Jany, K.-D. (1990). *Nucleotide and derived amino acid sequence of a pectinesterase cDNA isolated from Aspergillus niger strain RH5344*. *Nucleic. Acids Res.*, 18, 4262.
- 13 - Khanh, N. Q., Leidinger, K., Albrecht, H., Ruttkowski E. & Gottschalk, M. (1992). *Effects of promoters on the enhancement of pectin methyl esterase expression in Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.*, 14, 1047-1052.
- 14 - Luo, X. (1992). *Klonierung von promotoren aus Aspergillus niger NRRL322 und ihre funktionalität in einem expressionssystem*. Dr. rer. nat. Dissertation, T.H. Darmstadt, Darmstadt.
- 15 - Miller, W. L. & Baxter, J. D. (1980). *Recombinante DNA - A new source of insuline*. *Diabetologia*, 18, 431-436.
- 16 - Perbal, B. (1988). *A practical guide to molecular cloning*. 2nd Edition, p. 81, John Wiley & Sons, New York.
- 17 - Phaff, H. J. (1947). *The production of exocellular pectic enzymes by Penicillium chrysogenum*. I. On the

- formation and adaptive nature of polygalacturonase and pectinestarese. *Archs Biochem.*, 13, 67-81.
- 18 - Punt, P. J., Oliver, R. P., Dingemans, M. A., Pouwels, P. H. & van den Hondel, C. A. M. J. J. (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*, 56, 117-124.
- 19 - Ruttkowski, E., Labitzke, Khanh, N. Q., Löffler, F., Gottschalk, M. & Jany, K.-D. (1990). Cloning and DNA sequence analysis of a polygalacturonase cDNA from *Aspergillus niger* RH5344. *Biochem. Biophys. Acta*, 1087, 104-106.
- 20 - Steele, D. B. & Stowers, M. D. (1991). Techniques for selection of industrially important microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, 89-106.
- 21 - Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W. J. & Goodman, H. M. (1977). Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. *Science*, 196, 1313-1319.
- 22 - Unkles, S. E., Campbell, E. I., Carrez, D., Grieve, C., Contreras, R., Fiers, W., van den Hondel, C. A. M. J. J. & Kinghorn, J. R. (1989). Transformation of *Aspergillus niger* with the homologous nitrate reductase gene. *Gene*, 78, 157-166.
- 23 - Villa-Komaroff, L., Efstratiadis, A., Broome, S., Lomedico, P., Tizard, R., Naber, S. P., Chick, W. L. & Gilbert, W. (1978). A bacterial clone synthesizing proinsulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 3727-3731.
- 24 - Ward, M., Wilson, L. J., Carmona, C. L. & Turner, G. (1988). The *oliC3* gene of *Aspergillus niger*: isolation, sequence and use as a selectable marker for transformation. *Curr. Genet.*, 14, 37-42.