

Obtenção de recombinantes entre mutantes de *Penicillium echinulatum* para a produção de celulases utilizando a técnica de fusão de protoplastos

Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia – Laboratório de Enzimas e Biomassa

Micael Montemezzo (PIBIC/CNPq), Tiago Selau Rodrigues, Edna Laís Bertin, Mauricio Bettio, Marli Camassola, Aldo José Pinheiro Dillon - mmontemezzo@ucs.br

1. Introdução

Celulase é um complexo de enzimas responsável pela hidrólise do polissacarídeo celulose até seu produto final, glicose. As celulases são aplicadas nas mais diversas áreas da indústria, tais como têxtil, de alimentos, veterinária, branqueamento da polpa de papel e na produção de biocombustíveis.

Para a redução dos custos de produção de enzimas celulolíticas, técnicas que envolvam a otimização dos processos de produção, e também técnicas de melhoramento genético das linhagens produtoras do complexo enzimático hidrolítico são de fundamental importância. Como ferramenta para essa melhoria no genoma microbiano, podemos destacar a fusão de protoplastos.

2. Objetivo

Realizar estudos empregando linhagens produtoras mutantes, visando a obtenção de linhagens recombinantes com maior potencial de secreção de enzimas pertencentes ao complexo hidrolítico celulases.

2. Materiais e Métodos

2.1. Linhagens

Foram utilizadas quatro linhagens provindas de outro programa de melhoramento genético da linhagem parental do fungo *Penicillium echinulatum* 9A02S1, que emprega o agente mutagênico H₂O₂. Essas linhagens foram denominadas M32, M35, A10 e E.

2.2. Metodologia

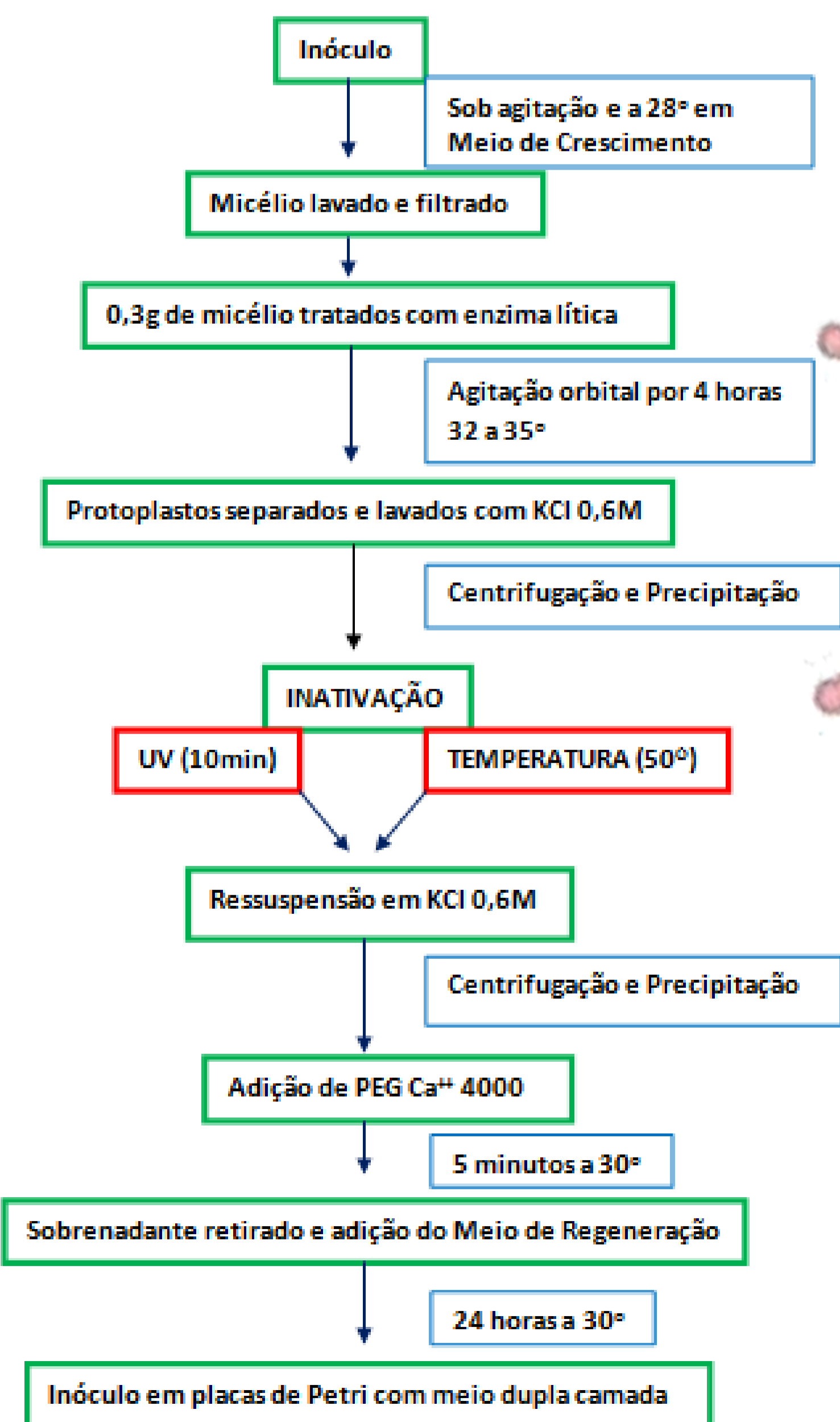


Figura 1: Esquema da metodologia utilizada para a obtenção dos protoplastos e para o experimento de fusão dos mesmos.

Após o crescimento em placa, as colônias foram submetidas ao primeiro *screening*, que visa a obtenção de linhagens com a presença de significativos halos de hidrólise. Repiques sucessivos foram feitos para a estabilização gênica dos clones. As linhagens com maior halo foram analisadas conforme o método proposto por GHOSE (1987). Dessa forma, se pode selecionar as melhores linhagens, que posteriormente foram testadas em estado submerso para a mensuração de sua atividade enzimática.

3. Resultados e Discussões

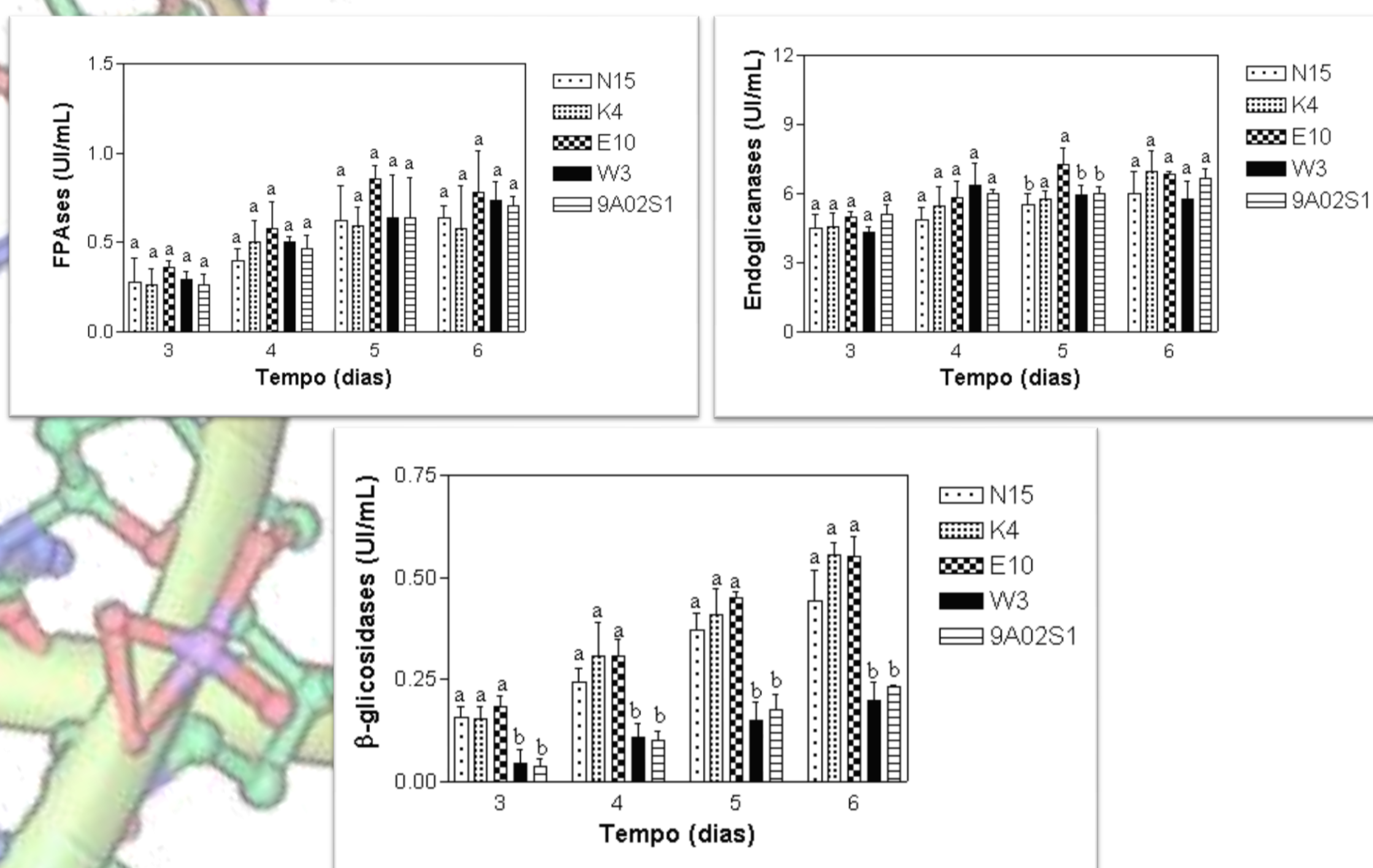


Figura 2: Análise do caldo enzimático do cultivo submerso realizado em frascos mantidos sob agitação coletados do 3º ao 6º dia após inóculo. FPases (A), Endoglicanases (B) e β-glicosidase (C).

Segundo os gráficos mostrados acima, a atividade de β-glicosidase (Figura 2. C) teve seu pico no 6º dia, sendo mais expressiva nas linhagens K4, E10 e N15, quando comparadas ao parental (9A02S1). Já nas atividades de FPases e Endoglicanases (Figura 2. A e B), a melhora na secreção dessas enzimas não se mostraram significativas.

4. Conclusões

Com a análise dos dados do presente trabalho, nas condições estudadas, é possível concluir que, o método de obter variantes genéticas, através da fusão de protoplastos, induzida entre 4 linhagens de mutantes obtidas do parental *P. echinulatum* (9A02S1) tem potencial para ser empregada em programas de melhoramento genético para gerar melhores linhagens produtoras de celulases.

5. Referências Bibliográficas

- DILLON, Aldo J. P et al. 2008. Generation of recombinants strains to cellulases production by protoplast fusion between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**. 43: 403-409
- GHOSE, T.K . 1987.Measurement of cellulase activities. **Pure. and Appl Chem**. 59:257--268.
- CHENG, Xin Song Yanfei et al. 2009. Genome shuffling improves production of cellulase by *Penicillium decumbens* JU-A10 . **Applied Microbiology**. 107: 1837-1846.
- MANCZINGER, L., FERENCZY, L. 1985. Somatic cell fusion of *Trichoderma reesei* resulting in new genetic combination. **Appl. Microbiol. Biotechnol**.22:72-76

6. Apoio

