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

Micael Montemezzo (PIBIC/CNPq), Tiago Selau Rodrigues, Edna Laís Bertin, Mauricio Bettio, Marli Camassola, Aldo José Pinheiro Dillon

Um dos maiores desafios enfrentados na atualidade no setor de etanol a partir de lignocelulósicos é a diminuição nos custos de produção do complexo enzimático hidrolítico. Visando contribuir para resolver esta problemática, métodos de melhoramento genético e processos fermentativos são utilizados. Para o melhoramento genético das linhagens fúngicas produtoras de enzimas, métodos de mutagênese e fusão de protoplastos são importantes ferramentas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de fusionantes entre linhagens resultantes por mutagênese da linhagem 9A02S1 de *Penicillium echinulatum*, denominadas M32, M35, A10 e E, que apresentaram maior atividade enzimática quando comparados ao parental. Na metodologia utilizada, baseada em outros usos com sucessos para o melhoramento de produtos microbianos de interesse, vários genótipos são induzidos a fusionarem em uma única etapa. Para a obtenção de protoplastos, uma solução com o produto enzimático comercial Glucanex® foi utilizada, a fim de hidrolisar a parede celular. Esses protoplastos foram inativados com calor de 50ºC, e a duplicata dos mesmos, com inativação a partir de irradiação ultravioleta, antes da etapa da fusão, que foi induzida com solução de PEG4000 e Ca++. Após 24 horas em meio líquido de regeneração contendo KCl 0,6M, esses heterocários foram selecionados em meio contendo celulose intumescida. Os clones que apresentaram maiores halos de hidrólise foram submetidos à análise de microfermentação e mensuração da capacidade de liberar açúcares redutores dos filtrados enzimáticos. Nesta etapa foi possível a seleção de 4 clones fusionantes, que apresentaram maior liberação de açúcares redutores de papel de filtro nas microfermentações W3 (1,73 $mg.mL^{-1}$), E10 (1,67 $mg.mL^{-1}$), K4 (1,62 $mg.mL^{-1}$) e N15 (1,98 $mg.mL^{-1}$). Posteriormente a essa etapa, os clones citados foram analisados quanto a sua produção enzimática, que em comparação ao parental, os clones N15, K4 e E10 apresentaram maiores secreções de β-glicosidases, no sexto dia de cultivo. Com esse resultado, pode-se verificar que a metodologia utilizada foi eficiente para a obtenção de variantes com valores aumentados para a secreção enzimática.