



Evento	Salão UFRGS 2013: SIC - XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2013
Local	Porto Alegre - RS
Título	Avaliação da produção de celulases em linhagens de <i>Penicillium echinulatum</i> modificadas por fusão recursiva de protoplastos.
Autor	MATHEUS NASCIMENTO DE FREITAS
Orientador	MARLI CAMASSOLA
Instituição	Universidade de Caxias do Sul

Os fungos estão sendo bastante estudados, uma vez que alguns são grandes produtores de enzimas celulolíticas e hemicelulíticas. O fungo *Penicillium echinulatum* tem-se mostrado relevante como alternativa na produção de enzimas para a indústria do etanol de segunda geração, pois apresenta um potencial de produção de Filter Paper Activity (FPA) e β -glicosidasas. Contudo, sua produção enzimática pode ser melhorada por meio de técnicas de melhoramento, tais como *genome shuffling*. Neste trabalho, utilizou-se a fusão de protoplastos para combinar genótipos de linhagens mutantes de *P. echinulatum*, combinando 4 linhagens derivadas da linhagens 9A02S1. A degradação parcial da parede celular foi realizada empregando-se enzimas líticas (Glucanex®) sobre o micélio das linhagens N15, K4, W3 e E10 de *P. echinulatum* crescidas em meio líquido, obtendo-se assim os protoplastos. Todas estas linhagens foram derivadas do parental 9A02S1. Foram usadas duplicatas de cada linhagem, onde parte foi inativada por calor (50°C), em banho-maria por 50 minutos e parte foi inativada com irradiação por luz UV por 10 min, utilizando-se o protocolo proposto por Cheng *et al.* (*Appl. Microbiol*, 2009; 107: p1837-1846.). A fusão dos protoplastos inativados foi induzida com solução de polietilenoglicol (PEG 4000 + Ca⁺⁺) e KCl como estabilizador osmótico. Os protoplastos fusionados cresceram em meio líquido de regeneração e após 24 h foi realizado o inóculo em placas de Petri com meio de cultura contendo celulose intumescida, a fim de avaliar os halos de hidrólise. Após sucessivos repiques buscando a ausência de setores, ou seja, mostrando estabilidade genética, os variantes obtidos foram submetidos ao processo de microfermentação em cultivo submerso para comparação de FPA de cada nova linhagem. As análises foram realizadas segundo método proposto por Ghose (GHOSE, *Appl. Chem*, 1987; 59: p257-268) com redução volumétrica proporcional. As linhagens 305 e 306 sobressaíram-se nas análises de FPA, apresentando FPA de 0,88 U/mL e 0,65 U/mL respectivamente, enquanto a linhagem parental apresentou 0,27 U/mL. Para avaliar as atividades enzimáticas, foram feitos experimentos em cultivo em estado sólido e submerso, objetivando mensurar as atividades de xilanases (BAILEY *et al.*, *Journal of Biotechnology*, 1992; 23: p257-270), β -glicosidasas (CHAHAL, *Appl. Environ Microbiol*, 1985; 49:205-210.) e endoglicanases (WOOD & BHAT, *Methods Enzymol*, 1988; 160: p87-112.). O experimento teve duração de 144 horas com coletas diárias após 48 horas do início do processo. Para corroborar com os resultados obtidos nas análises, foram feitos zimogramas para endoglicanases (SUN *et al.*, *Enzyme Microb Technol*, 2008; 42: p560-567) e β -glicosidasas (SCHWARZ *et al*, *Anal Biochem*, 1987; 164: p72-77.). Para o cultivo submerso, a linhagem 306 mostrou-se superior às demais para atividades de xilanases (1,03 U/mL) e FPA (0,98 U/mL) em 144h de cultivo. Para atividades de endoglicanases, as linhagens K4, W3 e 305 foram superiores ao parental 9A02S1 (7,88) em 96 h (10,84, 10,42 e 11,00 U/mL, respectivamente). No cultivo em estado sólido, para endoglicanases as linhagens W3, N15 e K4 apresentaram atividades de 12,65, 13,04, 12,04 U/mL, respectivamente, sendo superiores ao parental (9,35 U/mL) em 72h. Além disso, a linhagem K4 apresentou-se em 120h estatisticamente igual, se comparado a 144h e superior as demais linhagens nesse mesmo tempo para atividades de β -glicosidasas. A linhagem 305 mostrou-se superior para endoglicanases em 96h (14,44 U/mL). Avaliando os resultados obtidos nos zimogramas do cultivo submerso pode-se observar que as linhagens K4, N15 e 305 apresentaram em 96 h uma maior intensidade de bandas em 75kDa e 15kDa, além de apresentarem uma banda adicional, quando comparadas com a linhagem parental, com cerca de 70kDa. De maneira geral, a linhagem 306 apresentou resultados promissores em ambos os cultivos, sendo então escolhida para o próximo *round* de *genome shuffling*, conhecido como fusão recursiva.