

XVII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS



MUTANTES PARA PRODUÇÃO DE CELULASE EM *Penicillium echinulatum* OBTIDOS COM EMPREGO DE H₂O₂, 2-DEOXYGLICOSE E MICROFERMENTAÇÕES



Maurício Bettio¹ (CNPq), Fátima Grasiela Pozzan¹ (FINEP), Tahila Andrighetti¹ (PIBIC-CNPq), Dra. Marli Camassola¹, Dr. Aldo José Pinheiro Dillon¹ (orientador) - mbettio@ucs.br

¹Universidade de Caxias do Sul - Laboratório de Enzimas e Biomassas - Instituto de Biotecnologia – Centro de Ciências Agrárias e Biológicas

INTRODUÇÃO

O maior desafio para a tecnologia do etanol de segunda geração é a disponibilidade de complexos enzimáticos contendo exoglicanases, endoglicanases e β -glicosidases que sejam eficientes e de custo suportável.

Neste contexto, a linhagem 9A02S1 de *Penicillium echinulatum* apresenta características hidrolíticas, secretoras, e de atividade enzimática, compatíveis às exigências do mercado produtor de biocombustíveis. Portanto, está sendo empregada em programa de melhoramento genético com uso de H₂O₂ como agente mutagênico e um processo de seleção de mutantes em meio suplementado com 2-deoxiglicose, além da utilização do método de microfermentações e micro-análises que visa aumentar a produtividade enzimática. Estudados para a secreção de FPA, endoglicanases e β -glicosidases foram realizados, em meios suplementados com sacarose e glicose.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem: Utilizou-se a linhagem de *Penicillium echinulatum* 9A02S1(DSM 18942), obtida a partir da linhagem 2HH, após várias etapas de mutagenese.

Mutagenese, Enriquecimento, Seleção e Microanálises : O tratamento mutagênico foi realizado com H₂O₂. A massa fúngica foi distribuída em placas com o meio suplementado com 0,5% de 2-deoxiglicose. As colônias que apresentaram halos de hidrólise em meio com celulose e 2-deoxiglicose foram selecionadas para estudos posteriores.

Para aprimorar o processo de seleção, aplicou-se a metodologia de Pozzan *et al* (2008). Foram realizadas microfermentações em tubos *ependorf*, empregando 1,5 mL de meio formulado com celulose intumescida (0,5% (m/v)), solução de sais minerais (MS) 10x concentrada (10% v/v), extrato de levedura (0,05% (m/v)), peptona bacteriológica (0,1% (m/v)) e Tween 80 (0,1% (v/v)).

Produção de Enzimas e Análises Enzimáticas: Foram produzidas enzimas em frascos Erlenmeyer de 100mL contendo 10% (v/v) 10x MS, 1% (m/v) de celulose micropulverizada, 0,2% (m/v) de farelo de soja, 0,5% (m/v) de farelo de trigo e 0,1% (v/v) de Tween80. Em alguns experimentos, este meio foi suplementado com glicose ou sacarose.

As atividades de FPA e endoglicanases foram determinadas conforme Ghose (1987) e a atividade de β -glicosidases conforme Chahal *et al* (1985). Uma unidade de FPA, endoglicanase ou β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 μ mol de açúcar redutor, medido como glicose por minuto, sobre as condições do teste.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após comparação em meio de halo (Figura 1), micro-análises e microfermentações entre as linhagens obtidas no processo de mutagenese, pode-se observar diferenças na quantidade de açúcares redutores liberados entre alguns clones (Figura 2). Após estes testes, apenas a linhagem S1M29 mostrou-se promissora em cultivo submerso realizado em Erlenmeyer (Figura 3).

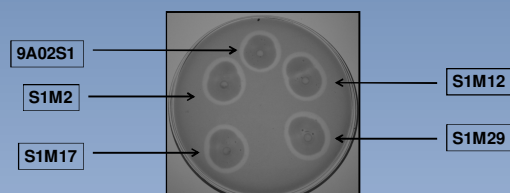


Fig.1 Meio de detecção de halos de hidrólise para comparação de clones.

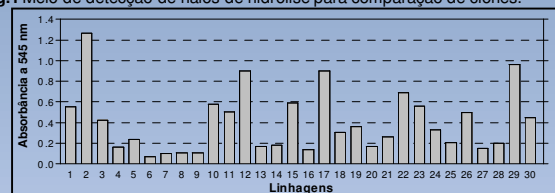


Fig.2 Açúcares redutores liberados de papel de filtro Whatman nº1 por enzimas produzidas por linhagens mutantes de *P. echinulatum* 9A02S1 em microfermentações. A linhagem de número 30 representa o parental (9A02S1) e as demais linhagens são denominadas S1M.

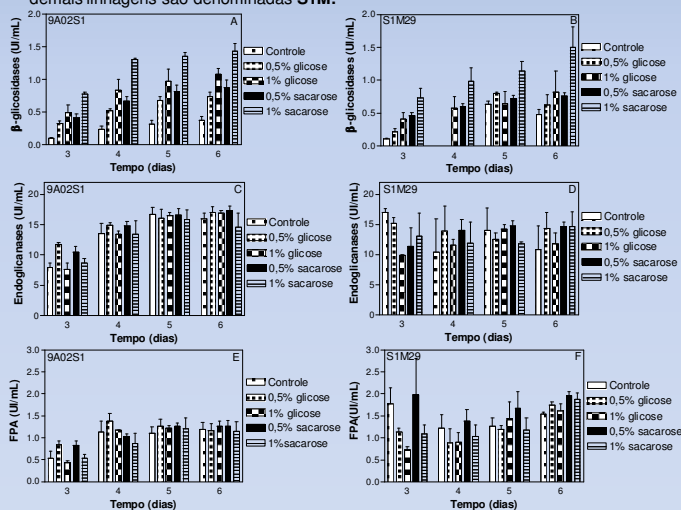


Fig.2 Atividade de β -glicosidases (A e B), endoglicanases (C e D) e FPA (E e F) determinadas em cultivos na presença de glicose e sacarose pelo parental 9A02S1 (à esquerda) no clone S1M29 (à direita).

CONCLUSÃO

Os dados do presente trabalho mostram claramente que as metodologias de melhoramento genético e de seleção empregadas, permitem isolar variantes para a secreção de celulases em *P. echinulatum*. Além disso, o novo clone S1M29 de *P. echinulatum* torna-se o melhor mutante celulolítico desta espécie e os resultados obtidos permitem sugerir que um meio formulado com 0,5% de sacarose permite obter um complexo celulolítico favorável para a hidrólise da celulose, devido a precocidade de suas enzimas, além de apresentar atividade de β -glicosidase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chahal, D. S. (1985). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 49, p. 205-210.
- Ghose, T. K. (1987). *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, p. 257-268.
- Pozzan, F. G.; Andrighetti, T.; Camassola, M. e Dillon, A. J. P. (2008). *Anais do VIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática*, Rio de Janeiro.