

Mutagênese para a obtenção de mutantes hiperprodutores de Filter Paper Activity e com produção reduzida de β -glicosidase

Tahila Andrighetti, Fátima Grasiela Pozzan, Maurício Bettio, Marli Camassola, Aldo J.P.Dillon.

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL – INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA – LABORATÓRIO DE ENZIMAS E BIOMASSA

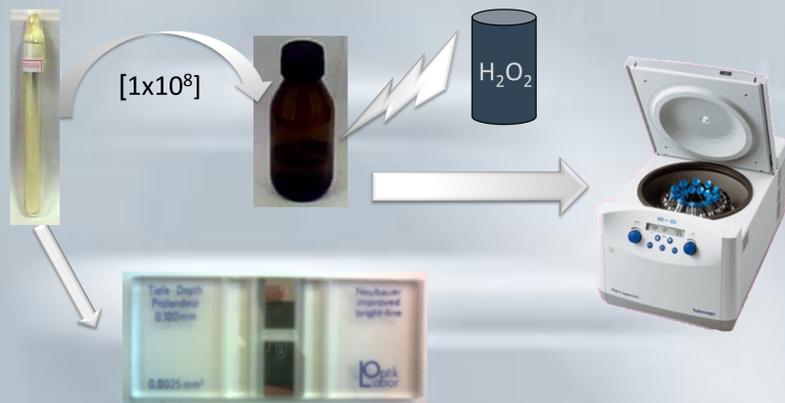
INTRODUÇÃO

O trabalho de melhoramento genético de microorganismos produtores de celulasas tem contribuído para a diminuição dos custos do complexo enzimático, destinados a hidrólise de resíduos lignocelulósicos. Neste trabalho, a técnica de mutagênese com H_2O_2 foi empregada para a obtenção de mutantes de *Penicillium echinulatum* com hiperprodução de Filter Paper Activity (FPA), mas com baixa produção de β -glicosidase, para assim, diminuir a repressão catabólica causada pelo produto da hidrólise da β -glicosidase – a glicose.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Mutagênese

- Uma suspensão com concentração de 1×10^8 esporos/mL foi tratada com 20 μ L de H_2O_2 30% por 30 segundos
- Depois, foi centrifugada (500 rpm por 10 minutos) e foi adicionado 2 mL de CMC 0,1% e 200 μ L de 2-deoxyglucose 5%.



- Depois de 24 horas, esta suspensão foi diluída em concentrações de 1:10, 1:100 e 1:1000
- A suspensão foi plaqueada nos meios:
 - Celulose com ou sem glicose (65 ml 2.5% swollen cellulose, 5 ml salt medium, 30 ml water, 0.1g yeast extrat, 0.1g de peptone, 2 g ágar, 0.1% Triton X 100, with or without 1% glucose)
 - CMC com e sem 2-deoxyglucose (2g agar, 10 mL salt medium, 0.1g peptone, 1g yeast extrat, 1g de carboxymethylcellulose (CMC), 90 mL water, with or without 2-deoxyglucose)
- Mantidas a 28°C por 15 dias

2.2. Screening por comparação de halos

- Para comparar a hidrólise da linhagem parental com a hidrólise da linhagem mutante, as linhagens foram repicadas para meio de 1% de celulose e 1% de glicose, usando um tubo de Zeni.

2.3. Screening por microfermentação

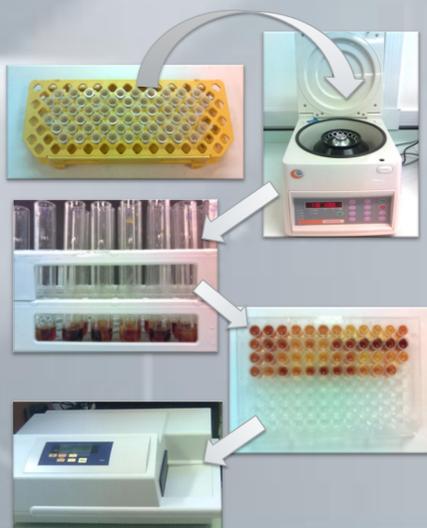
2.3.1. Microfermentação

- 1.5 mL de meio de crescimento e produção foi adicionado a Eppendorfs, onde as melhores colônias, selecionadas pela comparação de halos são inoculadas em duplicatas e, então, cobertas com gaze e algodão e mantidas a 28°C por 4 dias.



2.4.2. Microanálise de FPA

- As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi usado para a análise de FPA.
- Foi feita uma redução do método de Ghose (1987)
 - 200 μ L de tampão citrato 50mM, 100 μ L de amostra, 25mg de papel filtro Whatman n.1, colocados a 50°C por 1h.
- Então, foi adicionado 600 μ L de solução DNS e os tubos foram fervidos por 5min e lidos a 545nm



2.5. Cultivo submerso

- Conídios das melhores linhagens selecionadas por microfermentação foram inoculadas em triplicatas em frascos com 100 mL de meio de produção. Agitaram a 28°C por 6 dias.
- Foram feitas análises de filter paper activities, endoglicanases (de acordo com Ghose (1987)) e atividades de β -glicosidase (Chahal (1985))



RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção em 2DOG e comparação de halos

- Foi observado crescimento de algumas linhagens em meio de 2-deoxyglucose com diferenças morfológicas
- Essas linhagens foram repicadas para meio com celulose e 1% de glicose e mostraram halos maiores que os do parental

3.2. Microfermentação e microanálise de FPA

- Os mutantes que apresentaram maior absorvância do que o parental nas microanálises feitas foram submetidos a cultivo submerso.
- Dentre essas, as linhagens S1A9, S1E, S15E e S16E, mostraram maior valor de absorvância em relação ao parental.

3.3. Cultivo submerso

- Foi observado altos níveis de β -glicosidase, endoglicanases e FPases para a linhagem S1E.
- As linhagens S1A9, S15E e S16E mostraram baixos níveis de celulasas em relação ao parental. Além disso, essas linhagens mostraram ainda maior deficiência em produção de β -glicosidase, como mostrado na Figura 1.

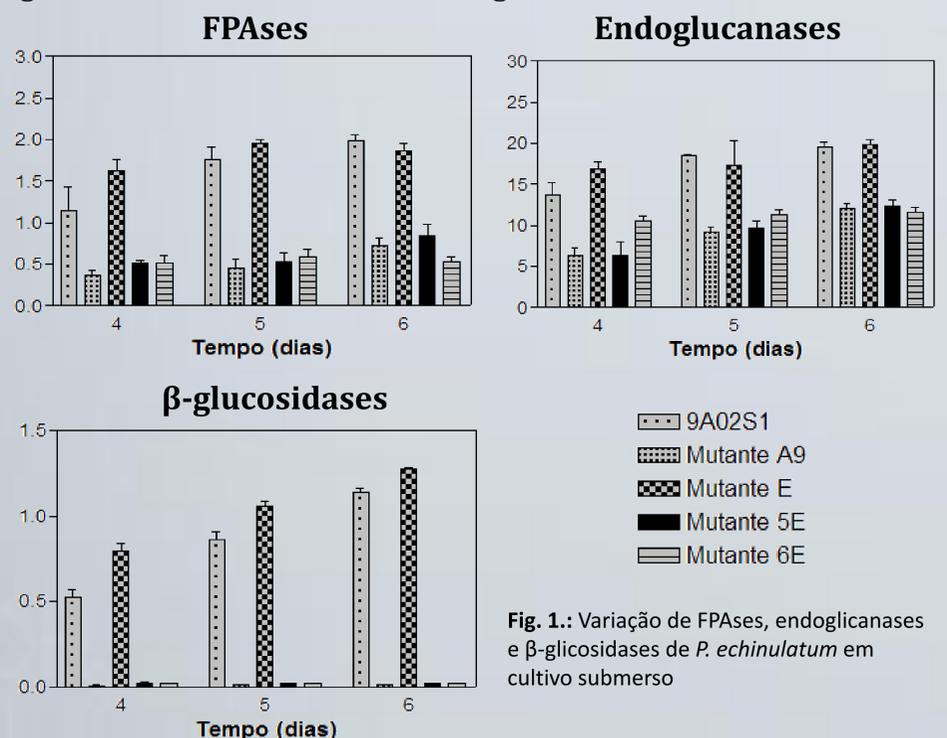


Fig. 1.: Variação de FPases, endoglicanases e β -glicosidases de *P. echinulatum* em cultivo submerso

3.4. A vantagem da deficiência na produção de β -glicosidase

- A vantagem da deficiência na produção dos níveis de β -glicosidase é que, uma vez que os níveis da enzima são baixos, os dissacarídeos não serão degradados, então os níveis de glicose serão baixos, diminuindo a repressão catabólica..

CONCLUSÃO

O sucesso deste trabalho é justificado pela contribuição do conhecimento sobre a seleção de novos mutantes com alto potencial de produção de celulasas. Além disso, o desenvolvimento da metodologia para seleção de linhagens por microfermentação é uma contribuição importante para a biotecnologia e contribui para tornar economicamente viável a produção de etanol a partir de resíduos lignocelulolíticos.