



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Cleiton Márcio Pinto Braga

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO SOBRE A EXPRESSÃO  
DE GENES ASSOCIADOS À DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL  
DURANTE O CULTIVO DO FUNGO *Trichoderma harzianum* P49P11  
EM REATOR

SÃO CARLOS-SP

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Cleiton Márcio Pinto Braga

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO SOBRE A EXPRESSÃO  
DE GENES ASSOCIADOS À DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL  
DURANTE O CULTIVO DO FUNGO *Trichoderma harzianum* P49P11  
EM REATOR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadores:

Dra. Cristiane Sanchez Farinas  
Dr. José Geraldo da Cruz Pradella

SÃO CARLOS-SP

2018

**Cleiton Márcio Pinto Braga**

Tese de Doutorado submetida à  
Coordenação do Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia, da  
Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia

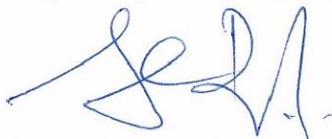
**Aprovado em: 15/05/2018**

**BANCA EXAMINADORA**



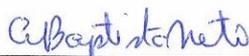
---

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas  
(Embrapa- Orientadora)



---

Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior  
(UFSCar)



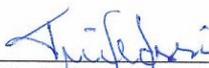
---

Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto  
(UNESP)



---

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha  
(UFSCar)



---

Dra. Thais/Suzane Milessi Esteves  
(UFSCar)

## AGRADECIMENTOS

Cordialmente agradeço:

A Deus, que me adotou por filho, pelo imensurável amor, afeto e misericórdia, por suportar-me e conduzir-me com Sua poderosa Mão, por nunca me ter desamparado e pelo precioso dom da fé.

A minha mãe, Rilza, por todo cuidado e, acima de tudo, pelo amor incondicional.

Aos meus familiares por toda ajuda e incentivo.

Aos meus amigos da graduação, por nossa preciosíssima fraternidade.

Aos meus amigos e irmãos na fé de Barão Geraldo (Campinas-SP), por todo amor e carinho.

A meus orientadores, Dr. José G. C. Pradella e Dra. Cristiane S. Farinas, pela confiança, paciência, ensinamentos e apoio.

A Priscila da Silva Delabona, por também ser uma orientadora e por todo suporte.

A todos os amigos, colegas e colaboradores do CTBE. Em especial a Raquel S. Scatolin, Márcia R. L. Carvalho e Rosenilda Senen, pelo carinho, abraços e pelas lágrimas e risadas compartilhadas.

À Mariane P. Zubieta e ao Douglas A. A. Paixão, pelo apoio em várias etapas.

À Thalita J. Bondancia pela gentileza em fazer o ensaio de DRX.

Ao Martin E. Kogle e ao Prof. Dr. Uffe H. Mortensen (Technical University of Denmark), que gentilmente cederam o plasmídeo pFC332 usado nesse trabalho, e ao Prof. Dr. Yosuke Shida (Nagaoka University of Technology) por esclarecer dúvidas sobre a mutação do gene cella.

Aos membros da banca de defesa, pois deram valiosas sugestões.

A muitas outras pessoas de bom coração que Deus colocou no meu caminho.

À UFSCar e ao PPG-Biotecnologia, pela realização do curso de doutorado e por todo o apoio.

Ao CNPEM e à Embrapa Instrumentação Agropecuária pela infraestrutura.

À CAPES (processos 88882.143386/2014-01 e 88882.143387/2017-01) e ao CNPq (processo 402797/2013-2), pelo suporte financeiro.

*"As misericórdias do Senhor são  
a causa de não sermos consumidos;  
porque as suas misericórdias não têm fim."*

(Lamentações 3:22)

## RESUMO

A biomassa vegetal é um recurso renovável com grande potencial para a obtenção de uma variedade de produtos, com distintas aplicações. A produção de biocombustíveis a partir da biomassa vegetal consiste em uma alternativa para aumentar a oferta de etanol e, assim, atender à crescente demanda mundial. O material lignocelulósico, que compõe a biomassa, é constituído principalmente por celulose, hemicelulose, pectina e lignina, as quais estão arrançadas de uma forma complexa, refletindo na dificuldade de degradação do material. Diversos grupos de enzimas necessitam ser empregados para que os carboidratos complexos sejam convertidos em açúcares fermentescíveis, os quais podem então ser transformados em produtos de interesse. No entanto, os custos de produção desses biocatalisadores são um obstáculo para a viabilidade econômica da rota bioquímica de conversão da biomassa vegetal. Um dos mecanismos para reduzir os custos é o melhoramento de linhagens produtoras, por exemplo, por meio da deleção de genes repressores e superexpressão de ativadores relacionados à produção das celulasas em geral. Para o fungo *Trichoderma reesei*, muitos trabalhos identificaram tais reguladores, como os ativadores *xyr1*, *ace2*, *ace3* e *lae1* e os repressores *cre1* e *ace1*. Entretanto, o fungo *T. harzianum* carece de estudos dessa categoria, tendo em vista que é apontado como um bom produtor de enzimas celulolíticas. A fim de melhor entender a dinâmica da expressão de genes associados à produção dessas enzimas, inicialmente, foram avaliados os perfis de produção das mesmas e de expressão de genes reguladores (*xyr1*, *ace1*, *ace2*, *cre1* e *lae1*) e de codificadores de hidrolases, ao longo do cultivo em biorreator, utilizando diferentes fontes de carbono. Verificou-se que a expressão foi significativamente maior em substratos celulósicos, os quais também proporcionaram maiores níveis de atividade enzimática. Além disso, um ensaio de hidrólise sugeriu que o complexo enzimático produzido pelo fungo foi específico ao substrato que o induziu. Por fim, foi montada uma estratégia para o melhoramento genético do fungo, por meio de uma mutação pontual no gene *cella* de  $\beta$ -glucosidase.

**Palavras-chave:** *Trichoderma harzianum*; celulase; biomassa; biorreator; mutação; *cella*.

## ABSTRACT

Plant biomass is a renewable resource with great potential for obtaining a variety of products with different applications. The production of biofuels from vegetable biomass is an alternative to increase ethanol supply and thus meet the growing demand in the world. The lignocellulosic material, which makes up the biomass, consists mainly of cellulose, hemicellulose, pectin and lignin, which are arranged in a complex way, reflecting in the difficulty of material degradation. Several groups of enzymes need to be employed so that the complex carbohydrates are converted into fermentable sugars, which can then be transformed into interest products. However, the production costs of these biocatalysts are an obstacle to economic viability of the plant biomass biochemical conversion path. One of the mechanisms to reduce costs is the improvement of producing strains, for example, by the deletion of repressor genes and overexpression of activators related to cellulase production. For the fungus *Trichoderma reesei*, many works have identified such regulators as the activators *xyl1*, *ace2*, *ace3* and *lae1* and *cre1* and *ace1* repressors. But, the fungus *T. harzianum* lacks studies of this category, considering that it is pointed out as a good producer of cellulolytic enzymes. In order to better understand the dynamics of the genes associated with them, initially the profiles of these enzyme production and of regulatory genes (*xyl1*, *ace1*, *ace2*, *cre1* and *lae1*) and hydrolases encoders expression were evaluated, along the bioreactor cultivation using different carbon sources. Expression was found to be significantly higher on cellulosic substrates, which also provided higher levels of enzymatic activity. In addition, a hydrolysis assay suggested that enzyme complex produced by the fungus was specific to the substrate that induced it. Finally, a strategy was set up for the fungus genetic improvement by means of a point mutation in the  $\beta$ -glucosidase *cella* gene.

**Keywords:** *Trichoderma harzianum*; cellulase; biomass; bioreactor; mutation; *cella*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estruturas heterogêneas de polissacarídeos de parede celular vegetal .....	15
<b>Figura 2</b>	Análise de cristalinidade pela técnica de Difração de Raio X (DRX) dos substratos BHD e Celufloc .....	26
<b>Figura 3</b>	Perfis de produção de enzimas, crescimento e consumo de substrato do <i>T. harzianum</i> cultivado em diferentes substratos .....	30
<b>Figura 4</b>	Visualização em "Heat Map" dos dados de expressão de genes de celulases e hemicelulases, bem como de genes reguladores, ao longo do tempo de culturas realizadas em biorreator com diferentes substratos .....	33
<b>Figura 5</b>	Correlação entre a expressão dos alvos analisados, empregando-se o coeficiente de Pearson (CP) .....	35
<b>Figura 6</b>	Níveis de atividade enzimática em cada reação do ensaio de especificidade, ao se utilizar extrato enzimático induzido com BHD (eBHD) ou Celufloc (eCEL) .....	39
<b>Figura 7</b>	Conversão de celulose e hemicelulose em açúcares simples (glicose, celobiose e xilose) após hidrólise realizada com extrato enzimático produzido a partir de cultivo com bagaço (BHD) ou Celufloc (CEL), empregando-se, como substrato da reação, 5% (m/v) de bagaço ou Celufloc, durante 24 a 48 horas de incubação .....	40
<b>Figura 8</b>	Perfil de proteínas dos extratos enzimáticos induzidos com BHD (eBHD) ou com Celufloc (eCEL) .....	44
<b>Figura 9</b>	Mapa do plasmídeo contendo o cassette para mutação do gene <i>cella</i> .....	51
<b>Figura 10</b>	Visualização dos fragmentos purificados antes da clonagem por Gibson ...	57

<b>Figura 11</b>	Amplificação dos diferentes fragmentos que compõem o cassette, a partir de plasmídeos extraídos das colônias de <i>E. coli</i> transformadas com o produto da reação isotérmica de Gibson .....	58
<b>Figura 12</b>	Visualização dos produtos de PCR para amplificação dos fragmentos do cassette marcador dividido ( <i>split marker</i> ) .....	59
<b>Figura 13</b>	Visualização de suspensão de protoplastos em microscópio óptico .....	60
<b>Figura 14</b>	Visualização dos produtos de PCR para confirmação da integração do cassette ao sítio desejado no genoma do fungo, com primers 'cella_genof' e 'cella_genor' .....	62

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	<b>Componentes da parede celular vegetal.....</b>	14
2.2	<b>Enzimas envolvidas na degradação da parede vegetal.....</b>	15
2.3	<b>Regulação transcricional de genes de celulases.....</b>	17
3	OBJETIVOS.....	19
3.1	<b>Objetivos específicos.....</b>	19
4	CAPÍTULO 1 - ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA .....	20
4.1	<b>Materiais e métodos.....</b>	20
4.1.1	Microrganismo e condições de cultivo.....	20
4.1.2	Análises de atividades enzimáticas, biomassa e expressão gênica.....	21
4.1.3	Ensaio de especificidade do complexo enzimático.....	23
4.1.4	Obtenção e caracterização dos substratos celulósicos .....	24
4.1.5	Métodos analíticos.....	26
4.1.5.1	<i>Atividades enzimáticas.....</i>	26
4.1.5.2	<i>Determinação de açúcares .....</i>	27
4.1.5.3	<i>Determinação de proteínas totais.....</i>	28
4.1.6	Análise de SDS-PAGE.....	28
4.2	<b>Resultados e discussão.....</b>	29
4.2.2	Monitoramento de atividade enzimática e crescimento em diferentes substratos	29
4.2.3	Avaliação da transcrição de genes relacionados com atividade celulolítica em diferentes substratos.....	32
4.2.3.1	<i>Expressão em substratos celulósicos.....</i>	32
4.2.3.2	<i>Expressão em glicose ou glicerol.....</i>	35
4.2.3.3	<i>Expressão em lactose.....</i>	36
4.2.3.4	<i>Expressão em sacarose.....</i>	38
4.2.4	Teste de especificidade do coquetel enzimático.....	39

5	CAPÍTULO 2 - ESTRATÉGIA DE MELHORAMENTO GENÉTICO .....	46
5.1	Material e métodos.....	47
5.1.1	Análise da sequência do gene cella.....	47
5.1.2	Construção do cassette para recombinação homóloga.....	48
5.1.3	Transformação.....	52
5.1.3.1	<i>Amplificação do cassette</i> .....	52
5.1.3.2	<i>Transformação de protoplasto mediada por PEG</i> .....	53
5.1.3.3	<i>Transformação por eletroporação</i> .....	54
5.1.4	Metodologias gerais.....	55
5.2	<b>Resultados e discussão</b> .....	56
5.2.1	Predição da localização subcelular.....	56
5.2.2	Construção do cassette para recombinação homóloga.....	57
5.2.3	Transformação do fungo.....	60
5.2.4	Confirmação da recombinação homóloga do cassette.....	62
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

## 1 INTRODUÇÃO

Combustíveis fósseis, como carvão, petróleo e gás natural, são altamente representativos na matriz energética mundial. Em 2014, 80,8% do consumo mundial de energia originaram-se dessas fontes (THE WORLD BANK, 2018). No entanto, a perspectiva de esgotamento das atuais reservas em exploração, assim como os efeitos negativos ao meio ambiente que resultam do seu uso, tem gerado preocupação. A fim de se reduzir a dependência por essa fonte de energia finita e de distribuição irregular entre as diversas partes do mundo, têm-se buscado fontes alternativas renováveis.

Entre as diversas alternativas relacionadas ao setor de transportes, o etanol se consagrou como o biocombustível mais utilizado (STICKLEN, 2008). O etanol é um combustível líquido com grande potencial para redução do consumo de derivados de combustíveis fósseis. Ele é produzido por meio da fermentação de açúcares obtidos a partir de materiais vegetais, sendo os mais tradicionais aqueles que contêm reserva de energia na forma de carboidratos relativamente de fácil conversão, como a sacarose do colmo da cana-de-açúcar e o amido do grão de milho. O Brasil e os Estados Unidos são os maiores produtores mundiais. Em 2017, a produção brasileira de álcool etílico total (hidratado e anidro) foi de 27,69 milhões de m<sup>3</sup> (MME, 2018).

Uma forma de aumentar a produção desse composto consiste no aproveitamento da biomassa vegetal (WYMAN, 1994), ou seja, dos seus componentes estruturais, representados pelo material lignocelulósico que compõe a parede celular vegetal. A produção mundial de lignocelulose em base seca é estimada em 10-50 bilhões de toneladas ao ano, o que corresponde a cerca de metade de toda a biomassa produzida ao redor do mundo. A lignocelulose é composta de até 75% de carboidratos e, estima-se que em breve ela se tornará em uma fonte essencial de carboidratos fermentescíveis para a produção de biocombustíveis, compostos químicos de alto valor de mercado e materiais biodegradáveis (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012).

Essa ampla utilização da biomassa contempla o conceito da biorrefinaria. Segundo o Laboratório Nacional de Energia Renovável dos EUA (NREL), a biorrefinaria é uma instalação que integra processos de conversão da biomassa e equipamentos para produzir combustíveis, energia, e químicos. O conceito da biorrefinaria é análogo às refinarias de petróleo atuais, as quais produzem diversos combustíveis e produtos a partir do petróleo. As biorrefinarias industriais tem sido identificadas como a rota mais promissora para a criação de uma nova bioindústria doméstica. Pela produção de múltiplos produtos, uma biorrefinaria

pode se beneficiar das diferenças dos componentes da biomassa e intermediários e maximizar os valores derivados de uma fonte de biomassa, enquanto também é capaz de se adaptar às mudanças das condições do mercado. Os produtos de alto valor aumentam a rentabilidade, enquanto os combustíveis de alto volume ajudam a suprir as necessidades energéticas nacionais (FOUST et al., 2008).

No entanto, a liberação de açúcares fermentescíveis a partir da lignocelulose consiste em um dos desafios de uma biorrefinaria baseada nesse material, devido a sua estrutura compacta e rígida, que resulta na recalcitrância da biomassa. Esta está intimamente relacionada com as características físicas e químicas da parede celular vegetal. A presença de lignina, hemiceluloses, pectina, cinzas, etc. e suas interconexões espaciais constituem-se em uma barreira que protege a celulose (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012).

Para o aproveitamento dos componentes do material lignocelulósico, é necessário que o mesmo seja submetido ao pré-tratamento, hidrólise/sacarificação e fermentação (WYMAN, 1994). O pré-tratamento tem por objetivo remover as barreiras da recalcitrância e aumentar a digestibilidade enzimática da celulose, pela alteração das composições químicas e das estruturas físicas do material (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012).

Quanto ao processo de sacarificação, ou seja, a conversão de carboidratos complexos em açúcares fermentescíveis, as principais abordagens para uma biorrefinaria contemplam a hidrólise enzimática, visto que o emprego de enzimas proporciona maiores rendimentos, menor formação de inibidores e menor exigência por equipamentos especiais (resistentes à corrosão), comparado a outros métodos, como o emprego de ácidos.

A etapa da hidrólise é tipicamente catalisada por coquetéis de enzimas, incluindo celulasas, hemicelulasas e outras enzimas acessórias, as quais degradam constituintes específicos da parede celular. A hidrólise enzimática tem aumentado o foco em diversos aspectos das celulasas, uma vez que elas desempenham um papel chave na determinação da economia do processo. Para a viabilidade econômica dos biocombustíveis, é imprescindível uma tecnologia custo-efetiva de produção de enzimas para degradar os polissacarídeos em açúcares fermentescíveis. Uma das abordagens consiste na busca por organismos que produzam maiores quantidades de celulase (MOHANRAM et al, 2013).

O fungo *Trichoderma reesei* (anamórfico de *Hipocrea jecorina*) é um dos mais eficientes produtores de enzimas celulotíticas e xilanolíticas, sendo usado em uma ampla gama de aplicações industriais, incluindo indústrias têxteis, de alimentação humana e animal, e papel e celulose. Face ao aumento da demanda pela produção de biocombustíveis a partir da lignocelulose, há um crescente interesse em se elevar a produção da celulase por *T. reesei*,

com o objetivo de reduzir os custos relativamente altos deste processo. Diversos trabalhos conseguiram realizar o melhoramento desse fungo utilizando-se mutagênese clássica e procedimentos de seleção. A disponibilidade de métodos sofisticados de manipulação genética e o sequenciamento recente do genoma do *T. reesei* têm possibilitado a introdução de métodos genéticos moleculares em programas de melhoramento, por exemplo, pela superexpressão de ativadores e supressão de repressores de genes de celulases (WANG et al, 2013).

O fungo *Trichoderma harzianum* é, por sua vez, um agente de biocontrole bem conhecido. A habilidade de biocontrole permite o fungo identificar e degradar paredes celulares. Diversos trabalhos sugerem um grande potencial para a utilização deste fungo na produção de enzimas celulolíticas, devido a sua habilidade de sintetizar altos níveis de  $\beta$ -glucosidase e endoglucanases (HORTA et al., 2014; DELABONA et al., 2013). Como muitos trabalhos envolvendo a manipulação genética já foram desenvolvidos para o *T. reesei*, é desejável empregar essas técnicas sofisticadas para o *T. harzianum* também, pois se trata de um fungo promissor e com poucos estudos dessa categoria.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

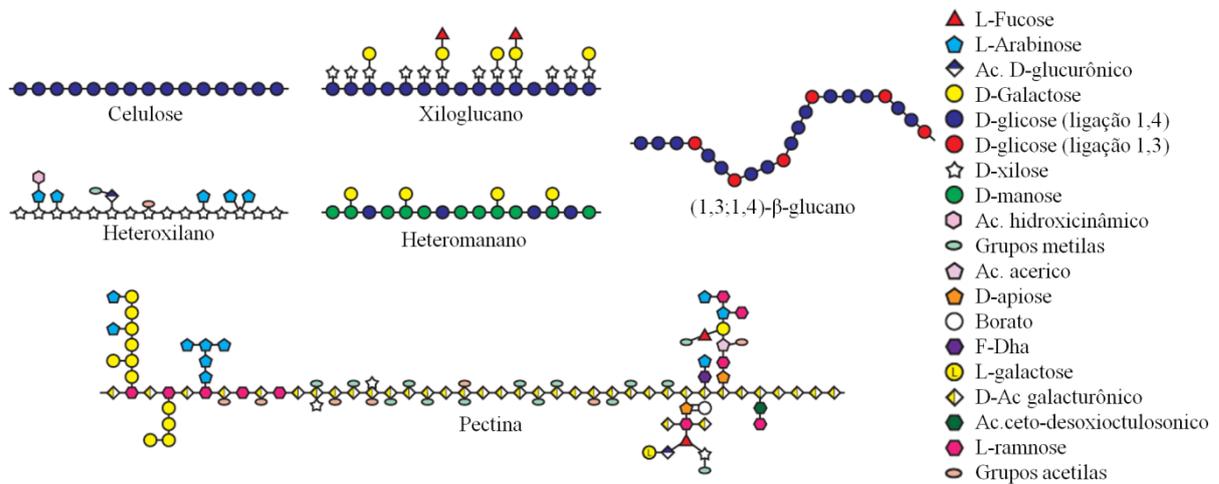
### 2.1 Componentes da parede celular vegetal

Entre os constituintes da parede celular vegetal, o componente principal e mais ubíquo é a celulose. Esta pode ser definida como um homopolissacarídeo linear com resíduos de glicose unidos por ligação do tipo  $\beta$ -1,4, sendo cada resíduo rotacionado em  $180^\circ$  em relação ao seu vizinho. Devido à configuração espacial das ligações ser alternada, a unidade de repetição da celulose é a celobiose (dímero). Suas cadeias são muito extensas, com cerca de 10 a 15 mil unidades e são agrupadas por meio de ligações de hidrogênio entre elas, o que origina os arranjos cristalinos denominados microfibrilas (NELSON; COX, 2006). E essas estruturas são as que proporcionam a alta resistência à tração, característica da parede celular (HELDT, 2005).

A hemicelulose é outro importante polissacarídeo da parede celular. Sua estrutura básica é representada por uma cadeia de  $\beta$ -1,4-xilano, uma estrutura linear constituída por resíduos de xilose. Algumas ramificações podem ocorrer nessa cadeia, por exemplo, com resíduos de arabinose, formando o arabinoxilano (AX), e também com ácido glucurônico, no caso do glucuronoarabinoxilano (GAX). Além desses, outros resíduos de açúcar podem formar uma variedade de estruturas, com diferentes padrões e graus de ramificação. Em plantas da família *Poaceae*, que inclui cereais e gramíneas, o teor de heteroxilano é muito mais elevado do que o de polissacarídeos pécticos (BURTON; GIDLEY; FINCHER, 2010).

A pectina também é um polissacarídeo não-celulósico, sendo encontrada em maiores quantidades em paredes vegetais primárias e em plantas dicotiledôneas. Os polissacarídeos pécticos abrangem polímeros compostos, em geral, formados por ácido galacturônico (em ligação  $\alpha$ -1,4) e ramnose. Ela é altamente ramificada, com diversidade de resíduos em suas cadeias laterais, entre os quais podem ser destacados a arabinose e a galactose (WALDRON; FAULDS, 2007). Alguns grupos carboxílicos são metilados e outros podem estar ligados a íons de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , sendo estes responsáveis também por promover a interação entre cadeias adjacentes. A pectina cria um gel e sua presença auxilia na elasticidade da parede (HELDT, 2005). A composição dos diversos polissacarídeos que formam a parede vegetal foi representada na **Figura 1**.

**Figura 1** – Estruturas heterogêneas de polissacarídeos de parede celular vegetal.



Fonte: adaptado de Burton, Gidley e Fincher (2010).

Por sua vez, a lignina é uma macromolécula de compostos fenólicos, sendo os principais, os alcoóis cumarílico, coniferílico e sinapílico. Ela encontra-se em paredes secundárias, aumentando a rigidez e a hidrofobicidade da estrutura (HELDT, 2005).

A parede celular também é composta por algumas proteínas, as quais podem desempenhar papel estrutural, interligando os componentes, ou atuar no controle do crescimento da parede (HELDT, 2005).

## 2.2 Enzimas envolvidas na degradação da parede vegetal

Os componentes da parede celular podem ser explorados para diversos fins, como a produção de combustíveis e de compostos bioativos com propriedades nutricionais. No entanto, sua complexidade exige diferentes mecanismos para que ela seja degradada. Devido à recalcitrância da estrutura, os microrganismos, que se alimentam da biomassa vegetal, produzem uma variedade de enzimas que agem na decomposição da mesma.

As enzimas endo-1,4- $\beta$ -glucanase, exo-1,4- $\beta$ -glucanase e as  $\beta$ -glucosidases são exemplos clássicos que agem sobre a celulose. As três atuam em sinergismo, visto que a atividade de endoglucanase rompe ligações internas da cadeia de celulose, de modo aleatório, formando cadeias com extremidades redutoras e não-redutoras. Tais extremidades são os alvos das enzimas exoglucanase, a qual produz celobiose. Por sua vez, este dissacarídeo é hidrolisado pela  $\beta$ -glucosidase, gerando glicose. Esta atividade de conversão da celobiose

reduz a inibição pelo produto que poderia afetar as outras duas enzimas (HORN *et al.*, 2012). Outras enzimas não classificadas como hidrolases também podem atuar sobre a celulose, como é o caso da monooxigenase AA9 (GH61) (HARRIS *et al.*, 2010).

Na hemicelulose, existe uma maior variedade de tipos de ligações glicosídicas, haja vista que ela possui resíduos de açúcares em maior diversidade, além de outros substituintes. Dessa forma, para sua degradação, existem, por exemplo: glicosil hidrolases, como  $\beta$ -xilosidase, endo- $\beta$ -xilânase,  $\alpha$ -glucuronidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase; carboidrato esterases, como feruloil esterase, acetil xilano esterase e glucoronil esterase; além das carboidrato liases (SWEENEY; XU, 2012).

A enzima endo- $\beta$ -xilânase age sobre as ligações entre os resíduos de xilose que se encontram na cadeia principal de xilano. A  $\beta$ -xilosidase hidrolisa xilobiose e outros xilooligossacarídeos, liberando xilose. A  $\alpha$ -glucuronidase e a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase atuam, respectivamente, sobre resíduos de ácido glucurônico e de arabinose. As carboidrato esterases agem sobre grupos esterificados ao longo da cadeia, liberando-os, como: ferulatos, que são liberados pelas feruloil esterases; grupos acetilas, pela acetil xilano esterase; glucoronilas, pela glucoronil esterase. As carboidrato liases são enzimas que também catalisam a ruptura de ligações glicosídicas, no entanto, não o fazem pelo mecanismo de hidrólise (SWEENEY; XU, 2012; BRAGA *et al.*, 2014). Entre as diferentes hemicelulases existe sinergismo, o qual também ocorre entre elas e as celulases, pois a decomposição da hemicelulose deixa as microfibrilas mais disponíveis para as celulases.

Como a pectina também possui uma natureza heterogênea, sua degradação exige a participação de diversos grupos de enzimas. Entre estas, podem-se destacar as poligalacturonases, pectina liases e pectina metil esterase. Por conta das ramificações laterais de arabinose e galactose, também se incluem no grupo a arabinofuranosidase e a galactosidase (SWEENEY; XU, 2012).

A lignina pode ser decomposta pelas enzimas oxidoredutases, como a lignina peroxidase, manganês peroxidase, lacase, entre outras. A remoção da lignina aumenta a acessibilidade dos polissacarídeos às enzimas que os degradam e diminui a inativação das mesmas, causada pela adsorção à lignina. Em contrapartida, as oxidoredutases podem gerar espécies reativas, que também podem atacar as próprias (hemi)celulases. Assim, os benefícios desses catalisadores na conversão da biomassa precisam ser melhor estudados (SWEENEY; XU, 2012).

### 2.3 Regulação transcricional de genes de celulases

Para a expressão dos genes de celulases, é necessária a presença de um indutor, isto implica forte regulação dos respectivos promotores. No fungo *Trichoderma reesei*, foram identificados alguns genes envolvidos na regulação transcricional de genes de celulases, de modo que se podem destacar três ativadores transcricionais positivos (XYR1, ACE2 e o complexo HAP 2/3/5) e dois repressores (ACE1 e o repressor catabólito carbono, CRE1) (KUBICEK et al., 2009).

O XYR1 (regulador da xilanase 1), uma proteína dedo de zinco binuclear que se liga ao motivo GGCTAA (organizado como uma repetição invertida), é o principal ativador da expressão de genes de celulase e hemicelulase. A deleção do gene *xyr1* elimina a indução de celulase, em cultivos com celulose ou soforose, provando desta forma seu papel essencial no processo de indução (KUBICEK et al., 2009).

O segundo ativador de celulose a ser caracterizado, o ACE2, também consiste em uma proteína da classe dedo de zinco binuclear. Durante o crescimento em celulose, a deleção do gene *ace2* levou à redução na cinética de indução de mRNAs de celulase e redução de 30% a 70% na atividade de celulase. No entanto, a indução de celulase pela soforose não foi afetada pela deleção do *ace2*. O ACE2, assim como o XYR1, liga-se ao sítio 5'-GGCTAATAA, presente no promotor de *cbh1*. Além disso, a ligação de ACE2 a seu promotor alvo tem como pré-requisitos a fosforilação e a dimerização dessa proteína (PORTNOY et al., 2011).

A expressão a partir do promotor de *cel6a* é dependente de uma caixa CCAAT ligada pelo complexo de proteína HAP2/3/5. As três proteínas do complexo mostraram-se também essenciais para a ligação do CAE (elemento de ativação de *cbh2*) no promotor de *cel6a* de *H. jecorina*. Esse complexo está relacionado com a geração de uma estrutura de cromatina aberta, necessária para a ativação completa da transcrição (PORTNOY et al., 2011).

O regulador negativo ACE1 contém três dedos de zinco tipo Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> e pode ligar-se a oito sítios contendo a sequência 5'-AGGCA espalhados ao longo do promotor de *cel7a*. A deleção de *ace1* resultou no aumento da expressão de todos os principais genes de celulase e hemicelulase, tanto em culturas induzidas por celulose quanto por soforose, indicando que ACE1 atua como um repressor da expressão de celulase e xilanase, e também de *xyr1*, durante o crescimento sobre D-xilose. Uma linhagem com deleção de ambos os

genes *ace1* e *ace2* expressou celulases e xilanases de modo semelhante à linhagem  $\Delta ace1$ , o que provavelmente se deve à atividade remanescente de XYR1 (KUBICEK et al., 2009).

Kubicek et al. (2009) propuseram que o ativador XYR1, que é inespecífico ao substrato, é aperfeiçoado por reguladores de transcrição mais específicos, como ACE1 e ACE2. Isso é coerente com o fato de XYR1 ligar-se a uma repetição invertida, seja como homo ou heterodímero, proporcionando assim a oportunidade para que proteínas específicas interajam com o promotor correspondente e/ou com XYR1, respectivamente. Por sua vez, o complexo HAP2/3/5 tem como papel o de um *enhancer* transcricional geral, aumentando a acessibilidade de outros fatores aos promotores de celulase.

O CRE1 é o principal fator de transcrição que medeia a repressão catabólica de carbono, um mecanismo que favorece a assimilação de fontes de carbono com altos rendimentos de energia, ao invés daquelas que rendem menos energia (PORTNOY et al., 2011). O fato de existir dois sítios de ligação de ACE1 e dez sítios de CRE1 na região a montante do gene *xyr1* sugere que o mesmo seja regulado por CRE1 e ACE1. Foi demonstrado que linhagens com deleção de *ace1* e *cre1* possuem maiores níveis de XYR1, indicando que ACE1 e CRE1 atuam como repressores da expressão de *xyr1* (MACH-AIGNER et al., 2008). Wang et al. (2013) também comprovaram que o *ace1* afeta negativamente a transcrição do *xyr1*.

Outro regulador é a proteína metiltransferase LAE1, a qual controla a expressão de celulases. Seiboth et al. (2012) construíram um mutante de *T. reesei* com deleção do gene *lae1* e observaram a completa perda da expressão de celulases, enzimas acessórias de degradação da celulose,  $\beta$ -glucosidases e xilanases. E, quando se promoveu o aumento da expressão de *lae1*, obteve-se um aumento na produção de celulase.

Häkkinen et al (2014.) identificaram um novo regulador, o qual foi identificado como *ace3*. A superexpressão desse gene resultou em um aumento significativo no nível transcricional e na atividade de celulase e xilanase, quando comparado à linhagem parental. Porém, a deleção de *ace3* foi prejudicial para a produção de celulase e diminuiu a produção de xilanase. Assim, pode-se considerar que o gene *ace3* codifica para um novo regulador principal da expressão de celulase e um modulador da expressão de enzimas que degradam o xilano. Desta forma, seu papel parece ser diferente do XYR1, o qual apresenta um papel principal tanto na degradação do xilano quanto da celulose.

### 3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil de expressão de genes associados à degradação da biomassa vegetal, bem como obter um mutante do fungo *Trichoderma harzianum* com maior capacidade de produção de enzimas celulolíticas.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Explorar o potencial da linhagem *Trichoderma harzianum* P49P11 isolada do solo da Região Amazônica, quanto à produção de enzimas que degradam a biomassa vegetal;
- Cultivar o microrganismo em reator convencional frente a diferentes substratos;
- Avaliar os níveis de atividade de FPase, xilanase e  $\beta$ -glucosidase ao longo dos cultivos;
- Avaliar o perfil de expressão de genes reguladores (*xyl1*, *ace1*, *ace2*, *cre1* e *lae1*) e de codificadores de hidrolases;
- Construir um cassette, para o melhoramento genético do fungo, por meio da mutação do gene *cell1a* de  $\beta$ -glucosidase;
- Transformar o microrganismo.

## 4. CAPÍTULO 1 - ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA

Neste capítulo foram descritas as atividades referentes à primeira fase do projeto. Nesta, o fungo *T. harzianum* foi cultivado em biorreator com diferentes substratos fontes de carbono. Ao longo do cultivo, foram avaliados os níveis de atividade enzimática e também o perfil de expressão de genes associados com a degradação da biomassa vegetal. O melhor entendimento da dinâmica da expressão auxiliou na escolha de uma estratégia para melhoramento genético do fungo. Esta segunda fase foi descrita no capítulo seguinte.

### 4.1 Materiais e métodos

#### 4.1.1 Microrganismo e condições de cultivo

No presente trabalho, foi utilizada a cepa *Trichoderma harzianum* P49P11, a qual fora isolada do solo da região Amazônica (DELABONA et al, 2012a). O fungo foi propagado em meio PDA (batata-dextrose-ágar, Acumedia) a 29 °C até completa conidiação. Os cultivos submersos foram realizados com meio líquido (padrão a todos os ensaios), adaptado de Mandels e Weber (1969), com a seguinte composição, para 1 L: 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,4 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,3 g uréia, 0,3 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,3 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,4 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,6 mg MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2 mg CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 1 g peptona; 1 mL Tween 80.

Para cada cultivo realizado em meio líquido com o fungo, o processo foi executado em duas etapas, sendo a primeira de pré-cultivo em shaker e a segunda de cultivo em reator. Para a primeira etapa, os conídios foram coletados com solução salina (0,9% NaCl, 0,05% Tween 80) a partir de placas com meio PDA. Foram adicionados 5x10<sup>8</sup> conídios a 50 mL de meio líquido, em Erlenmeyers de 250 mL. O meio do pré-cultivo foi composto por meio de Mandels suplementado com 62 mM de tampão biftalato de potássio (pH 5,0) e com 20 g/L de glicerol. Os frascos foram incubados em shaker orbital a 29 °C e 200 rpm de agitação. Este pré-cultivo foi mantido por 48 horas.

Após esse período, a cultura foi transferida para um biorreator de tanque agitado de 3L (BioFlo 115, NewBrunswick), em quantidade correspondente a 10% do volume final da cultura (1,80 L). O meio do reator fora suplementado com 20 g/L (concentração final) de diferentes fontes de carbono: celulose microcristalina (Celufloc 200); bagaço de cana

submetido a pré-tratamento hidrotérmico e deslignificação (BHD); glicose; glicerol; lactose; ou sacarose. O fermentador utilizado faz o controle automático de agitação, aeração, pH e temperatura. Tal controle foi importante para padronizar as condições de cultivo e evitar que alterações nesses parâmetros viessem a interferir na expressão dos genes.

Na realização dessa etapa, foi utilizado um impelidor de pás inclinadas tipo orelha de elefante com bombeamento para baixo (KOLLING, 2017). Inicialmente, foram programados os menores valores de agitação e aeração, os quais foram, respectivamente, de 200 rpm e 0,45 L.min<sup>-1</sup> (vazão volumétrica de ar). Para manter o nível de oxigênio dissolvido em, no mínimo, 30% de saturação de ar, foi empregada uma cascata em três fases sequenciais, aumentando-se: a agitação para até 350 rpm; a vazão volumétrica de ar para até 0,9 L.min<sup>-1</sup>; a suplementação com gás oxigênio de 0 a 100%. De modo que a fase seguinte só era acionada quando a anterior não era bastante para o nível de oxigênio dissolvido ser mantido. O pH foi fixado em 5,0 e controlado com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,4 M ou solução de NH<sub>4</sub>OH em água (1:3). A temperatura foi mantida a 29 °C e a formação de espuma foi controlada com adição de antiespumante polipropileno glicol. O cultivo foi mantido por até 96 horas.

#### 4.1.2 Análises de atividades enzimáticas, biomassa e expressão gênica

Ao longo do cultivo foram retiradas amostras, sendo parte centrifugada, para posterior determinação de atividade enzimática (a partir do sobrenadante) e biomassa (a partir do sedimentado). A outra parte da cultura foi filtrada em Miracloth (Merck), lavada com água purificada e o micélio foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C. Foram avaliados os níveis de atividade de FPase,  $\beta$ -glucosidase e xilanase e de proteína total. Para determinação de biomassa, 20 mL de cultura foram centrifugados a 3200xg por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi transferido e o sedimentado foi seco a 80 °C até massa constante; no caso dos substratos Celufloc e BHD, o material seco foi digerido com reagente ácido composto por ácidos acético a 80% (v/v) e nítrico na proporção de 10:1 (v/v), de acordo com o procedimento descrito por Gelain, Pradella e Costa (2015); a biomassa e o teor de substrato residual foram determinados por gravimetria.

O micélio congelado foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido e, em seguida, tratado com o reagente TRI Reagent (ZymoResearch) para extração do RNA total, o qual foi purificado com o kit Direct-zol RNA Mini Prep (Zymo Research). O RNA total foi quantificado em NanoDrop e 1000 ng foram utilizados para síntese de cDNA, com o emprego

do kit "SuperScript<sup>®</sup> III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR" (11752250, Invitrogen), para 20 µL de reação, seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, 10 ng de cDNA (equivalentes de RNA total) foram utilizados para uma reação de 10 µL contendo o reagente Syber Select Master Mix (4472908, Applied Biosystems) e os iniciadores (primers). A reação de qPCR foi executada no equipamento ViiA<sup>™</sup> 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Foram analisados os níveis de abundância dos transcritos relativos às proteínas: ACE1, CRE1, XYR1, LAE1 e ACE2 (fatores de transcrição); ENDO1, ENDO2 e ENDO3 (endoglucanase); CBH1 e CBH2 (celobiohidrolase); GH10 e GH11 (xilanase); GH61 (monooxigenase da família AA9); CE5 (carboxil esterase). A normalização foi realizada com o gene *sar1* (STEIGER; MACH; MACH-AIGNER, 2010). As sequências dos primers empregados encontram-se no **Quadro 1**. Foi realizada a otimização da concentração para cada par de primer. A quantificação foi realizada com o método de curva padrão, empregando-se as amostras de cDNA com diluição seriada. As condições dos ciclos de qPCR compreenderam 10 minutos iniciais a 95 °C para ativação da polimerase e desnaturação, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 60 s a 60 °C.

A partir dos dados obtidos, foi também calculado o coeficiente de Pearson (CP), para avaliar o nível de correlação entre os diferentes transcritos.

**Quadro 1.** Iniciadores utilizados nos ensaios de expressão gênica.

Identificação	Sequência (5'-3')	Concentração (nM) na reação de qPCR	Atividade da proteína correspondente
ACE1_F	AAGGATTTTGAGCCCATGTTC	100	Regulador negativo
ACE1_R	GTGCCATAAAGATCAAGGTCTTCTC	100	
ACE2_F	CTGCACTGTTCCGGATTGC	100	Regulador positivo
ACE2_R	ACACGCCATGACAAGATTCAAC	600	
CBH1_F	GGAAGTTACTCCAATGACCGATATG	300	Exoglucanase
CBH1_R	AACCGGGTCCGTAGAAGGA	300	
CBH2_F	AGCCCGACTCTCTTGCAAAC	600	Exoglucanase
CBH2_R	TGCGTGATGGCGTAATTAATG	600	
CE5_F	CAGTGGAGTTGGAGAAGCGTC	300	Carboxil esterase
CE5_R	GTTCCGGGATGAGAGTTGACA	300	
CRE1_F	TCACACTCCCATCGCAACTC	300	Repressor catabólito do carbono
CRE1_R	CGTGTTGTGCTGCAGAGACA	300	
ENDO1_F	AGCAGCGTATCTCCACGACT	100	Endoglucanase
ENDO1_R	CAGGGCAGAGTTGAGAGGTC	100	
ENDO2_F	GCCACTACCATGTCTACCTCCAAC	300	Endoglucanase
ENDO2_R	TCAGTCCCACAGCCAAAATC	300	
ENDO3_F	TCCTTCAGTCAGCAACAATCTCT	300	Endoglucanase
ENDO3_R	GACATTGGGATAGGACTTGACG	600	
GH10_F	AACACTCCTTTCCCTGGCCT	300	Endoxilânase
GH10_R	GTGCCCCAGTACTTCTTTCCAT	300	
GH11_F	AATCTACGGTTGGTCTCGCA	300	Endoxilânase
GH11_R	CTGCCGTCAGATGTAACCTCA	300	
GH61_F	ATCTGTCAAGGCCGGAGATTC	300	Monooxigenase (AA9)
GH61_R	ATCGCCGTTGCAGTTAGCTAAG	300	
LAE1_F	AAGTCCTGGCCGTCGATCT	100	Regulador positivo
LAE1_R	TCCCACTGTGGTGTCCAGTCTAC	100	
SAR1_F	TGTTCTGGGTCTCGATAATGC	300	GTPase
SAR1_R	TCCTCAGAAGTAGGGTGGAGAGTAG	300	
XYR1_F	ACAGGGACTACTGGGCCAATC	600	Regulador positivo
XYR1_R	AATGGGCACAAGGATGTAAACC	600	

#### 4.1.3 Ensaio de especificidade do complexo enzimático

Objetivou-se também averiguar se o coquetel enzimático produzido pelo fungo seria específico ao substrato que o induz, por meio de um teste de hidrólise em microtubos. Inicialmente, o *T. harzianum* foi cultivado em reator contendo meio suplementado com 20 g/L de BHD ou Celufloc, nas mesmas condições dos cultivos anteriores. O extrato enzimático bruto foi obtido coletando-se o sobrenadante após 72 horas de cultivo, sendo o mesmo

avaliado quanto aos níveis de atividade sobre diversos substratos: papel filtro (FPase); pNPC (celobiohidrolase), CMC (endoglucanase), pNPG ( $\beta$ -glucosidase),  $\beta$ -glucano, xilano (xilase), arabinoxilano de trigo, liquenano. Também foi determinado o teor de proteína total.

Uma vez feita a determinação dos níveis de atividade, foram montadas reações de hidrólise contendo: 5% (m/v) de substrato (BHD ou Celufloc); extrato enzimático para uma carga de 5 FPU por grama de substrato; 38,25 mM de tampão citrato de sódio pH 4,8; 0,02% de azida de sódio. Foi utilizado um tubo tipo Eppendorf de 2 mL contendo um volume de líquido final de 1,4 mL. As amostras foram incubadas a 50 °C por até 48 horas, em um Thermomixer (Eppendorf), empregando-se 1000 rpm de agitação (BRAGA et al., 2014). O ensaio de hidrólise foi realizado em duplicata e as determinações analíticas em triplicata.

Posteriormente, foram mensurados os açúcares redutores produzidos na hidrólise. Nesse ensaio, o bagaço utilizado fora moído em moinho Pulverisette 14 (Fritsch), passando primeiro por uma peneira com abertura de malha de 2 mm e depois por outra de 0,2 mm.

#### 4.1.4 Obtenção e caracterização dos substratos celulósicos

Um dos substratos utilizados foi o bagaço de cana submetido a pré-tratamento hidrotérmico e seguido de deslignificação (BHD). As condições do pré-tratamento foram as descritas por Santucci et al (2015) e a deslignificação foi realizada com NaOH, como descrito por Rocha et al (2012). A Celufloc 200 foi adquirida da empresa Celuflok Indústria e Comércio de Celulose Ltda.

Foi realizada a determinação dos teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas do BHD e da Celufloc. Essa análise foi realizada por colaboradores técnicos do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), em Campinas-SP, seguindo a metodologia descrita por Sluiter et al (2016). A caracterização está apresentada na **Tabela 1**.

**Tabela 1** – Caracterização do substratos celulósicos quanto aos componentes da biomassa.

Descrição	Extrativos (%) <sup>*</sup>	Cinzas (%)	Lignina total (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Balanco de massa (%)
<b>BHD</b>	N.Q	7,08	8,04	85,80	1,61	102,54
Desvio padrão (%)		0,35	0,32	0,64	0,07	0,05
<b>Celufloc</b>	N.Q	0,15	0,97	86,01	14,91	102,03
Desvio padrão (%)		0,04	0,08	0,49	0,22	0,76

(N.Q) Não quantificado.

Além disso, foram feitas análises de índice de cristalinidade, empregando-se a Difração de Raio X (DRX), em um equipamento Shimadzu 6000, com radiação CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ), no intervalo de ângulo  $2\theta$  variando de  $5-40^\circ$  e velocidade de  $2^\circ/\text{min}$ , operando a potência de 900 W (30 kV x 30mA).

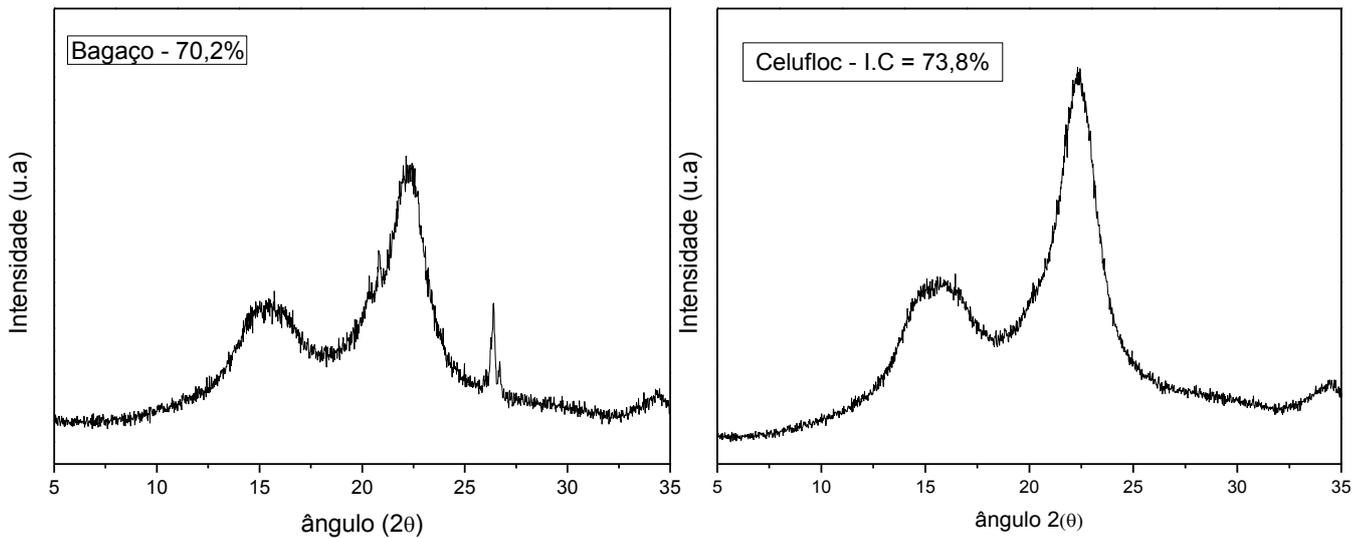
O índice de cristalinidade foi calculado pelo método de Segal et al. (1959), de acordo com a equação clássica proposta por eles:

$$IC(\%) = \left( \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \times 100$$

sendo que: ' $I_{002}$ ' é atribuída à intensidade máxima do plano de difração ( $2\theta$ ), correspondente a região cristalina da celulose e ' $I_{am}$ ' corresponde à intensidade de difração  $2\theta = 18^\circ$ , atribuída à celulose amorfa.

O ensaio de DRX foi gentilmente realizado por Thalita J. Bondancia, nas instalações da Embrapa Instrumentação Agropecuária, em São Carlos-SP. Os resultados dessa análise estão apresentados na **Figura 2**.

**Figura 2** – Análise de cristalinidade pela técnica de Difração de Raio X (DRX) dos substratos BHD e Celufloc.



#### 4.1.5 Métodos analíticos

##### 4.1.5.1 Atividades enzimáticas

A atividade de celulase sobre papel filtro (FPase) foi determinada segundo método descrito por Ghose (1987), com algumas modificações. O papel filtro utilizado foi o Whatman nº 1. A reação foi incubada por 60 minutos a 50 °C. O tampão empregado foi o citrato de sódio a 50 mM, pH 4,8. A reação foi paralisada com a adição do reagente DNS e foram avaliados os açúcares redutores, sendo a atividade expressa em unidade de FPase (FPU).

A atividade de xilanase foi medida sobre o substrato xilano de faia. A mistura da reação foi composta por: 50 µL de substrato (0,5%), 40 µL de tampão (citrato de sódio a 50 mM; pH 4,8) e 10 µL de extrato enzimático diluído. Após 10 minutos de incubação a 50 °C, houve adição de 100 µL de reagente DNS. Foram mensurados os açúcares redutores pelo método de DNS.

As atividades sobre os substratos carboximetilcelulose (CMC), β-glucano de cevada, arabinoxilano de trigo e liquenano (cadeia de glicose com ligações β-1,3 e β-1,4) foram mensuradas da mesma forma que a de xilanase.

A atividade de β-glucosidase foi determinada sobre o substrato *p*-nitrofenol-β-D-glucopiranosídeo (pNPG), baseando-se no método descrito por Zhang, Hong e Ye (2009).

No ensaio, foram misturados 80  $\mu\text{L}$  de pNPG a 1 mM (em tampão citrato de sódio a 50 mM, pH 4,8) e 20  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático diluído. A mistura foi incubada a 50 °C por 10 minutos. A reação foi parada com a adição de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 1,0 M. A leitura foi realizada a 400 nm e a curva padrão foi construída com *p*-nitrofenol.

A atividade de celobiohidrolase (CBH) foi determinada sobre *p*-nitrofenol- $\beta$ -D-celobiosídeo (pNPC). A reação foi composta por: 50  $\mu\text{L}$  de substrato a 5 mM, 40  $\mu\text{L}$  de tampão (citrato de sódio a 50 mM, pH 4,8) e 10  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático. A mistura foi incubada a 50 °C por 10 minutos. A reação foi também paralisada com acréscimo de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . A leitura foi realizada a 400 nm e a curva padrão foi construída com *p*-nitrofenol.

A quantificação do produto foi baseada em curva de glicose (ou xilose para xilanase), para os ensaios usando polissacarídeos como substrato, e em curva de *p*-nitrofenol, para os ensaios com substratos sintéticos.

Em todos os casos, 1 unidade internacional (UI) de atividade enzimática foi definida como a quantidade responsável pela liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto, nas condições empregadas. Os resultados foram expressos em UI por unidade de volume de extrato enzimático bruto.

#### 4.1.5.2 Determinação de açúcares

Os açúcares redutores foram quantificados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller (1959). A leitura foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro padrão ou leitor de microplacas. A curva padrão foi construída com glicose, xilose ou lactose, dependendo da finalidade.

A determinação de açúcares (glicose, xilose, celbiose e arabinose) para algumas amostras foi realizada por método empregando HPLC, de acordo com procedimento descrito por Rocha e colaboradores (2012). Essa análise foi executada por colaboradores do CTBE.

#### 4.1.5.3 Determinação de proteínas totais

As concentrações de proteína foram determinadas em microplacas, empregando-se o método de Bradford (1976), em menor escala. Para quantificação, foi utilizada a albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

#### 4.1.6 Análise de SDS-PAGE

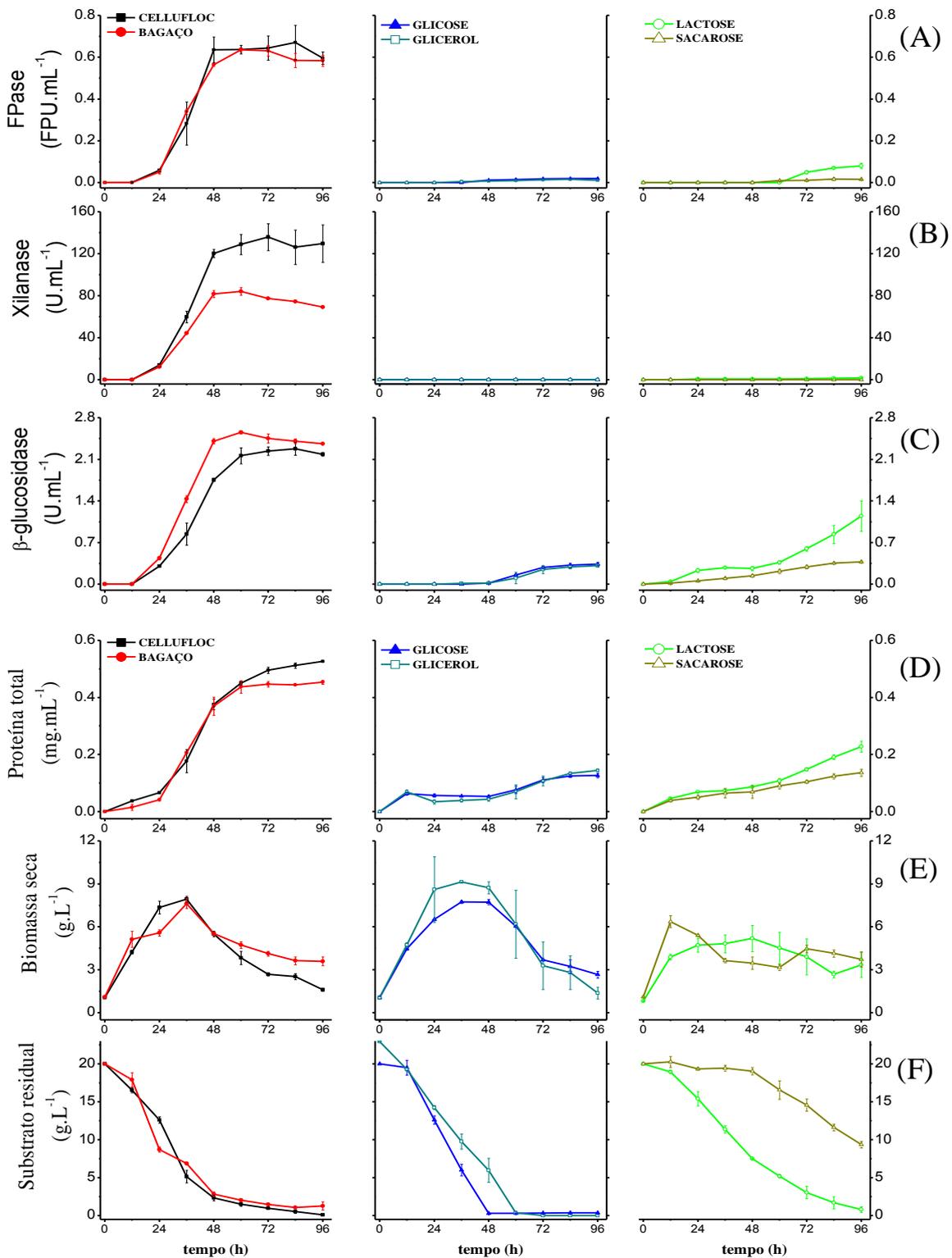
A partir dos cultivos realizados para o ensaio de especificidade ao substrato, com BHD ou Celufloc, foram obtidos os extratos enzimáticos. Estes extratos foram submetidos à Eletroforese em Gel SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE, na sigla em inglês). O procedimento seguiu as instruções descritas por Sambrook e Russel (2001). Os géis foram preparados com 5% de poliacrilamida para o gel de empacotamento e 12% para o gel de separação. As amostras foram padronizadas pelo teor de proteína, sendo aplicados 0,9 µg e 3 µg de proteína total, de cada extrato, em diferentes poços. O gel foi submetido a uma tensão de 120 V por até 1 hora e 30 minutos. Por fim, o gel foi corado com solução de nitrato de prata. O padrão de massa molecular utilizado foi o *PageRuler Prestained Protein Ladder* (código 26616, Thermo Scientific). A estimativa do tamanho das bandas do gel seguiu a metodologia descrita por Hames (1998).

## 4.2 Resultados e discussão

### 4.2.2 Monitoramento de atividade enzimática e crescimento em diferentes substratos

O *T. harzianum* foi pré-cultivado em glicerol por 48 horas e em seguida transferido para um biorreator contendo uma determinada fonte de carbono (Celufloc, BHD, glicose, glicerol, lactose ou sacarose) a 20 g/L. O cultivo foi mantido por 96 horas e, ao longo desse período, foram acompanhados os níveis de atividade de FPase, xilanase e  $\beta$ -glucosidase, bem como a concentração de proteína total, o crescimento e a concentração de substrato residual. Os dados referentes a essas medidas foram apresentados na **Figura 3**.

**Figura 3** – Perfis de produção de enzimas, crescimento e consumo de substrato do *T. harzianum* cultivado em diferentes substratos.



Legenda: Atividades enzimáticas expressas por volume de extrato enzimático bruto: (A) sobre papel filtro (FPase); (B) sobre xilano (xilanase); (C) sobre p-nitrofenil-b-D-glucopiranosídeo (b-glucosidase). (D) concentração de proteína total no extrato enzimático bruto. (E) biomassa seca por volume de cultura. (F) concentração de substrato por volume de cultura. As barras de erro referem-se ao desvio padrão entre duplicatas biológicas.

A partir da **Figura 3**, é possível observar que os substratos celulósicos (Celufloc e BHD) foram os indutores mais potentes das enzimas analisadas. Além disso, os perfis de atividade enzimática e proteína total foram muito próximos, quando se comparam Celufloc e BHD um com o outro. Além disso, considerando cada substrato (celulósico) em separado, as curvas de atividades e proteína total também seguiram um mesmo padrão. A atividade de xilanase foi a única que apresentou uma diferença significativa entre os substratos celulósicos. Com Celufloc, a atividade de xilanase atingiu o nível de  $135,85 \pm 12,76$  U/mL em 72 horas, enquanto que com BHD, o pico foi de  $84,16 \pm 3,58$  UI/mL em 60 horas de cultivo.

Os substratos glicose e glicerol também apresentaram os perfis próximos entre si, com um leve aumento de proteína total e  $\beta$ -glucosidase após 48 horas, quando também se observou uma redução na biomassa e o esgotamento total (no caso da glicose) ou parcial (no caso do glicerol) da fonte de carbono. A glicose é reconhecidamente um substrato repressor, em altas taxas de crescimento, e o glicerol é considerado um substrato neutro, o qual, a princípio, não induz nem reprime os genes de celulasas. Ilmén *et al.* (1997) realizaram um estudo sobre fontes de carbono e sua relação com a expressão de celulasas em *Trichoderma reesei*. Eles concluíram que o glicerol pode ser considerado uma fonte de carbono neutra, quanto à expressão de celulasas, pois adicionaram 1-2 mM de sofrorose após 72 horas de cultivo com de glicerol (2% inicial) e isso provocou altos níveis de expressão de celulasas.

Nas condições de ensaio empregadas, lactose e sacarose também não foram bons indutores de FPase e xilanase. No cultivo com lactose, observou-se que a produção de  $\beta$ -glucosidase, cujo perfil foi equivalente ao de proteína total, foi a maior ( $1,15 \pm 0,26$  UI/mL) entre os substratos solúveis, porém foi cerca de metade da produção conseguida com os celulósicos. A taxa de consumo de lactose e sacarose foi a menor entre todos os casos, em especial a de sacarose, a qual aumentou somente após 48 horas de cultivo.

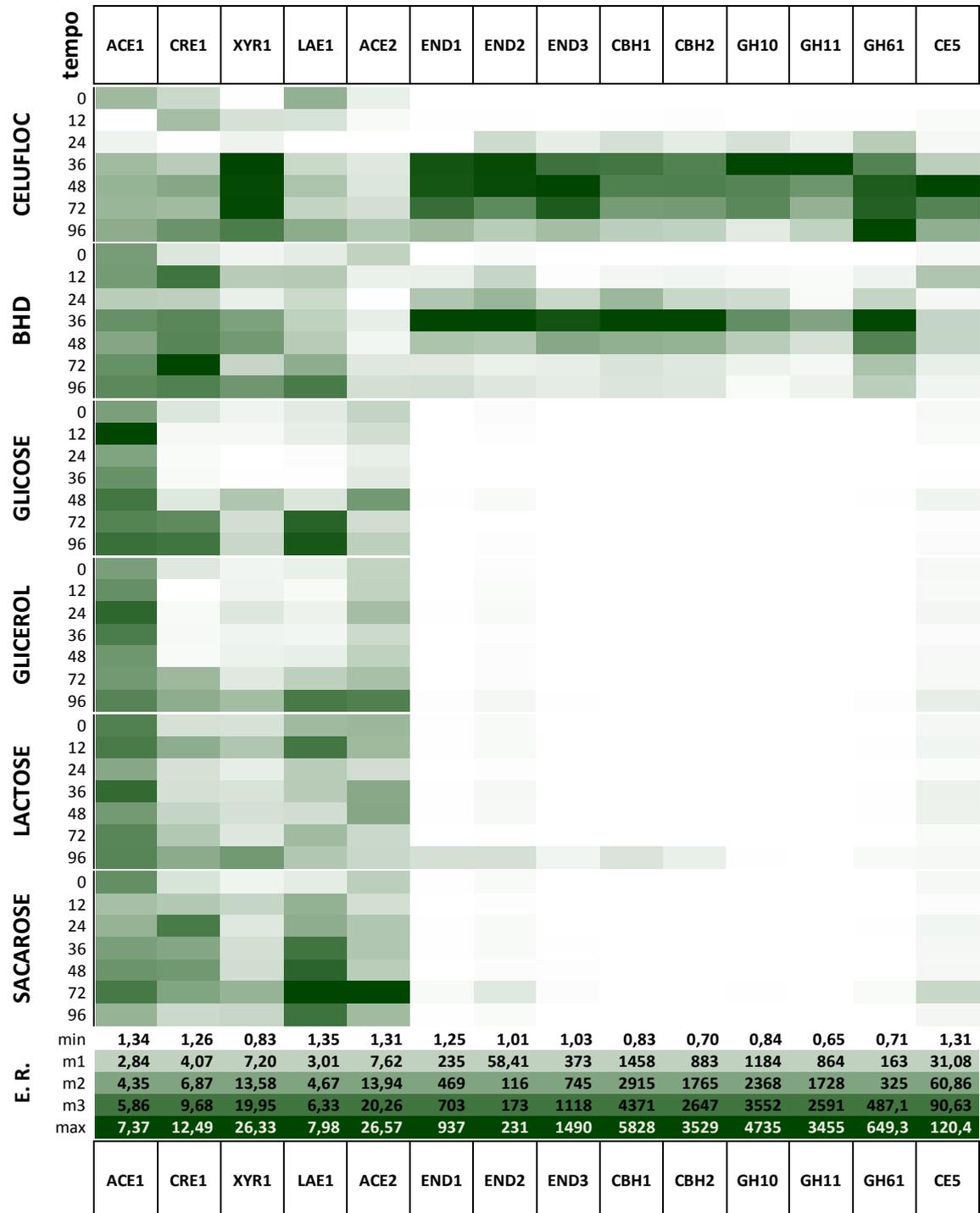
Delabona *et al.* (2012a) e Horta *et al.* (2014), observaram maiores níveis das atividades avaliadas sobre a lactose, comparados aos presentes resultados. O nosso pré-cultivo foi realizado com glicerol, enquanto o de Horta *et al.* com lactose. Em ensaios com sacarose realizados em Erlenmeyes, os cultivos em que o pré-cultivo também foi realizado com sacarose apresentaram um nível um pouco maior de FPase do que aquele com pré-cultivo com glicerol (dados não mostrados). Isso indica que a adaptação ao substrato na fase de pré-cultivo (germinação de conídios e crescimento de micélio) tem um impacto positivo na produção de enzimas. Porém, vale ressaltar que, mesmo com essa "ambientação", a atividade de FPase permaneceu inferior à atividade observada nos cultivos com substratos celulósicos.

### 4.2.3 Avaliação da transcrição de genes relacionados com atividade celulolítica em diferentes substratos

#### 4.2.3.1 *Expressão em substratos celulósicos*

O fungo *T. harzianum* P49P11 foi cultivado em biorreator, utilizando-se diferentes fontes de carbono. Ao longo do cultivo, foram monitorados o crescimento, os níveis de atividades enzimáticas e também a expressão de genes relacionados com tais atividades. A partir dos dados de expressão diferencial, foi construído um gráfico, o qual está apresentado na **Figura 4**. Pode-se observar que os mais elevados níveis de expressão dos genes de enzimas ocorreram nos cultivos com substratos celulósicos. Isso corrobora com os resultados de atividade (**Figuras 3-A/B/C**), indicando que tais substratos foram os indutores mais potentes, nas condições de ensaio empregadas. Além disso, os picos de expressão dos genes de enzimas ocorreram em sua maioria após 36 horas e alguns após 48 horas de cultivo. Uma das exceções é o gene de GH61, o qual, em Celufloc, apresentou uma expressão crescente ao longo do tempo, com pico em 96 horas de cultivo.

**Figura 4** – Visualização em "Heat Map" dos dados de expressão de genes de celulasas e hemicelulasas, bem como de genes reguladores, ao longo do tempo de culturas realizadas em biorreator com diferentes substratos.



Legenda: (E. R., expressão relativa) as médias correspondem aos níveis de expressão relativos a uma amostra comum, considerando cada alvo analisado. (min) menor valor de expressão; (m1, m2, m3) valores intermediários entre "min" e "max"; (max) maior valor de expressão. A normalização foi realizada com o gene *sar1*. Os ensaios foram realizados em duplicata biológica. BHD: bagaço submetido a pré-tratamento hidrotérmico e deslignificação.

Alguns genes tiveram uma expressão muito elevada, comparando-se a uma mesma amostra, como é o caso do gene de CBH1 e o de CBH2, os quais foram, respectivamente, 2900 vezes e 1633 vezes mais expressos em Celufloc do que em glicose (36 horas). O promotor do *cbh1* de *T. reesei* é também considerado forte, sendo em alguns casos utilizado para expressão heteróloga (LIU et al., 2008).

O XYR1 foi o regulador positivo com a expressão mais pronunciada. Após 36 horas de cultivo em Celufloc, por exemplo, a expressão do XYR1 foi 24 vezes maior do que a observada em glicose, considerando o mesmo período. O transcrito do *xyr1* apresentou um nível mais estável em Celufloc, a partir de 36 horas, do que em BHD, o que parece ter refletido na expressão dos genes de enzimas.

No período de 12 a 72 horas de cultivo em Celufloc, foi observada uma alta correlação ( $CP > 0.84$ ) entre os dados do XYR1 e dos genes de ENDO1, ENDO2, ENDO3, CBH1, CBH2, GH10, GH11, GH61, calculada por coeficiente de Pearson (CP), o que corrobora com o fato de este ser considerado o principal regulador positivo na expressão dos genes celulolíticos. Um dado interessante foi que a correlação entre o XYR1 e CBH1 ( $CP = 0,94$ ) ou CBH2 ( $CP = 0,97$ ) foi maior que entre o XYR1 e GH11 ( $CP = 0,84$ ), considerando o período de 12 a 72 horas de cultivo com Celufloc. Sendo que esse gene da xilanase GH11 possui alta homologia com o gene *xyn1* de *T. reesei*. Derntl et al. (2013) observaram uma alta correlação entre o nível de transcrito do *xyr1* e de *cbh1* ou *cbh2*, enquanto isso não ocorreu entre o *xyr1* e *xyn1* e *xyn2*, genes de xilanases (família GH11). Eles verificaram que, em *T. reesei*, o sítio de ligação do XYR1 ocorre 14 vezes dentro de 1 kb da região promotora do *cbh1* e 4 vezes dentro da região promotora do *xyn1*, o que pode ajudar a explicar o resultado da correlação. Vale lembrar que os ensaios de Derntl et al. (2013) foram feitos com substratos simples (soforose, xilose ou glicose), enquanto que os dados discutidos do presente trabalho são de um substrato complexo, a partir do qual podem ser gerados tanto soforose quanto xilose, ao mesmo tempo.

Para abarcar todos os substratos analisados, foram calculados os coeficientes de Pearson entre os todos os alvos, considerando os períodos de cultivo de 12 a 72 horas, como apresentado na **Figura 5**. Os dados contidos nessa **Figura 5** reforçam o papel do XYR1 como um dos principais reguladores positivos na expressão dos genes de interesse.

**Figura 5** – Correlação entre a expressão dos alvos analisados, empregando-se o coeficiente de Pearson (CP).

	ACE1	CRE1	XYR1	LAE1	ACE2	END1	END2	END3	CBH1	CBH2	GH10	GH11	GH61	CE5
ACE1	1,000	-0,084	-0,176	0,166	0,510	-0,223	-0,264	-0,243	-0,271	-0,228	-0,294	-0,246	-0,271	-0,160
CRE1	-0,084	1,000	0,336	0,627	-0,028	0,257	0,240	0,249	0,270	0,290	0,170	0,147	0,329	0,283
XYR1	-0,176	0,336	1,000	0,146	-0,021	0,864	0,838	0,880	0,775	0,801	0,883	0,863	0,830	0,849
LAE1	0,166	0,627	0,146	1,000	0,460	-0,082	-0,084	-0,088	-0,117	-0,100	-0,119	-0,101	-0,100	0,042
ACE2	0,510	-0,028	-0,021	0,460	1,000	-0,284	-0,278	-0,291	-0,357	-0,325	-0,299	-0,249	-0,347	-0,074
CP =	-1	0	1	<b>Legenda</b>										

Legenda: Os valores correspondem ao coeficiente de Pearson (CP). Foram considerados os dados de todos os substratos e os tempos de amostragem de 12 a 72 horas.

Como mencionado no item 4.2.2, a atividade de xilanase foi a que apresentou a diferença mais significativa, ao se comparar os substratos celulósicos. Avaliando os dados de expressão dos genes de xilanase, em 36 horas, os níveis de expressão de GH10 e GH11 foram, respectivamente, 1,6 e 2 vezes maior em Celufloc, comparando o mesmo período do cultivo com BHD. Além disso, após 36 horas, a expressão desses genes em BHD apresentou uma queda mais acentuada. De 36 para 48 horas, a expressão de GH10 e a de GH11 reduziram, respectivamente, 33,5% e 42,2%, em Celufloc. Paralelamente, essa redução foi de 54,6% e 66,4%, em BHD.

Quanto aos outros reguladores positivos, o ace2 apresentou uma expressão baixa nos substratos celulósicos, quando comparado a outros substratos. O lae1 também não foi expresso de forma significativa em Celufloc ou BHD.

#### 4.2.3.2 Expressão em glicose ou glicerol

Os menores níveis de expressão dos genes de enzimas foram observados no ensaio com glicose, um substrato reconhecido como repressor, uma vez que é a fonte de carbono preferencial. Foi possível observar um nível mais alto do regulador negativo ace1, desde o início do ensaio. No período de 36 para 48 horas de cultivo, observou-se um aumento na expressão do xyr1 (8,2 vezes), ace2 (3,6 vezes) e lae1 (1,6 vezes) e, sutilmente, dos genes de enzimas, seguido de queda, nos períodos subsequentes. Esse tempo (48 h) coincide com a depleção da glicose no meio. É possível que esse aumento tenha-se dado pelo processo de

*starvation*. Ilmén et al. (1997) observaram uma derrepressão, após cultivar o *T. reesei* por 24 horas a mais, depois que houve o esgotamento da glicose no meio.

Durante o cultivo com glicerol, também não se observou expressão significativa dos genes de enzimas, permanecendo os mesmos em seus níveis basais, muito semelhante ao cultivo com glicose. Isso reforça a necessidade de um indutor apropriado para uma alta expressão dos genes de interesse.

Em relação ao *cre1*, embora seja um regulador negativo para muitos genes de celulases e correlatos, ele tem um perfil de expressão peculiar. Haja vista que ele foi mais expresso em condições indutoras do que repressora. Ilmén et al. (1996) observaram que há um menor nível de transcrito de *cre1* em *T. reesei* e em *T. harzianum*, quando cultivados em glicose do que em celulose. Isso ocorre devido a autorregulação do *cre1*, em cuja região 5'URR (região regulatória a montante) existem sítios de ligação do CRE1.

Vale ressaltar que, o nível de transcrito do *cre1* não necessariamente corresponde com a quantidade de CRE1 ativo, uma vez que, para sua atuação como repressor, é preciso haver uma modificação pós-traducional (como fosforilação) e sua translocação do citoplasma para o núcleo. A glicose é o substrato que promove o recrutamento nuclear do CRE1, em maior quantidade e em menor tempo. Apesar de não ser tão potente quanto a glicose, o glicerol também desencadeia o recrutamento do CRE1 (LICHIOUS et al., 2014). Esta característica do glicerol põe em dúvida se ele é de fato um substrato neutro.

Segundo Vautard-Mey, Cotton e Fèvre (1999), essa mudança na localização subcelular do CRE1 regulada pela glicose é conservada em fungos, sendo observada também em *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus nidulans* e *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 4.2.3.3 Expressão em lactose

A lactose não se mostrou um bom indutor, nas condições de cultivo aplicadas. Considerando o cultivo até 72 horas, a maioria dos genes analisados tiveram uma expressão estável e próxima da observada no pré-cultivo em glicerol. Entretanto, no período de 96 horas, verificou-se um aumento de 3,6 vezes na expressão do *xyr1*, em relação ao período de 72 horas, o qual foi acompanhado de um aumento expressivo na expressão dos seguintes alvos, em ordem decrescente: CBH1, CBH2, ENDO1, ENDO3, ENDO2, GH10, GH61 e GH11. O gene de CBH1, por exemplo, teve sua expressão aumentada em 65 vezes, chegando a atingir uma diferença de expressão da ordem de 866 vezes em relação à amostra de referência (pré-

cultivo utilizado no ensaio em reator com glicerol). Nessa transição de 72 para 96 horas, a expressão dos reguladores positivos *lae1* e *ace2* praticamente não se alterou, bem como a expressão de *CE5*.

Apesar de não ser um indutor tão eficiente quanto a sofrose, a lactose é muito utilizada para indução de celulasas em *T. reesei*, por ser um substrato solúvel e viável. Muitos trabalhos com *T. reesei* descrevem cultivos realizados com 1% de lactose inicial (SEIBOTH et al., 2005; BISCHOF et al., 2013), observando-se um aumento de 15.000 vezes na expressão de *cbh1* já em 24 horas (XU et al., 2014). Sabe-se que a concentração da lactose no meio e uma baixa taxa de crescimento são importantes para a indução de celulasas (SEIBOTH et al., 2007). Segundo Farkas et al. (1987), para uma dada cepa de *T. reesei*, a indução da síntese de celulasas começa quando a concentração de lactose está abaixo de 7 g/L e a síntese pode ser mantida com até 2 g/L desse substrato.

No presente trabalho, foi utilizada uma concentração inicial de 20 g/L de lactose, o que pode ter prejudicado a indução. Nos ensaios de Delabona et al. (2012) com *T. harzianum*, a concentração inicial foi de 1%, porém, ainda assim, a atividade de FPase foi cerca de 0,2 FPU/mL. Horta et al. (2014) cultivaram o *T. harzianum* utilizando 1% inicial de lactose e observaram um nível de 0,43 FPU/mL após 96 horas. No entanto, é importante considerar que, no caso do trabalho de Horta et al. (2014), o pré-cultivo foi realizado com lactose, o que pode ter contribuído para uma adaptação do fungo a esse substrato.

Vale ressaltar que, nos trabalhos citados de Delabona et al. (2012b) e Bischof et al. (2013), a indução de (hemi)celulasas foi maior nos cultivos com substratos celulósicos do que com lactose.

Uma dúvida que pode ser levantada é se essa expressão tardia tem como causa a concentração ideal de lactose ou o estado fisiológico do fungo, isto é, se o mesmo estava em processo de *starvation*. Entretanto, a magnitude do aumento de expressão de celulasas observada no final do cultivo em lactose não ocorreu com outros substratos, como glicose e glicerol, cuja concentração foi exaurida após 48 horas de cultivo. Trabalhos futuros poderão ser realizados para estudar se menores concentrações de lactose podem induzir a síntese de celulasas de modo mais eficiente em *T. harzianum*.

#### 4.2.3.4 Expressão em sacarose

Nas condições de ensaio empregadas, a sacarose também não se mostrou uma fonte de carbono indutora dos genes analisados. No tempo de amostragem de 72 horas, houve um aumento na expressão de ENDO1, ENDO2 e CE5, bem como de LAE1, ACE2, e XYR1. Por exemplo, de 48 para 72 horas, houve um aumento de 5 vezes na expressão da ENDO1. Ainda assim, a expressão em Celufloc foi 25 vezes maior, comparando com a sacarose, após 72 horas de cultivo.

Em um estudo com *Neurospora crassa*, a sacarose foi usada como substrato de crescimento, na fase de pré-cultivo. Em seguida, induziram a expressão de celulasas, cultivando o fungo em celulose microcristalina (Avicel). A sacarose foi considerada como um substrato neutro, o qual não induz nem reprime a expressão de genes celulolíticos (ZNAMEROSKI et al., 2012).

No entanto, alguns autores relataram melhora na produção de celulasas quando a sacarose foi adicionada ao meio contendo uma fonte indutora. Por exemplo, quando Delabona et al. (2012a) adicionaram sacarose ao meio com bagaço de cana. Neste caso, a adição da sacarose pode ter prolongado o crescimento do fungo. Semelhantemente, Seyis e Aksoz (2005) adicionaram 0,2% de melação (rico em sacarose) ao meio com 1% de xilano (um substrato indutor), o que adiantou em seis dias (de 13 para 7 dias) o pico de produção de xilanase, em termos de atividade específica, da cepa *T. harzianum* 1073 D3.

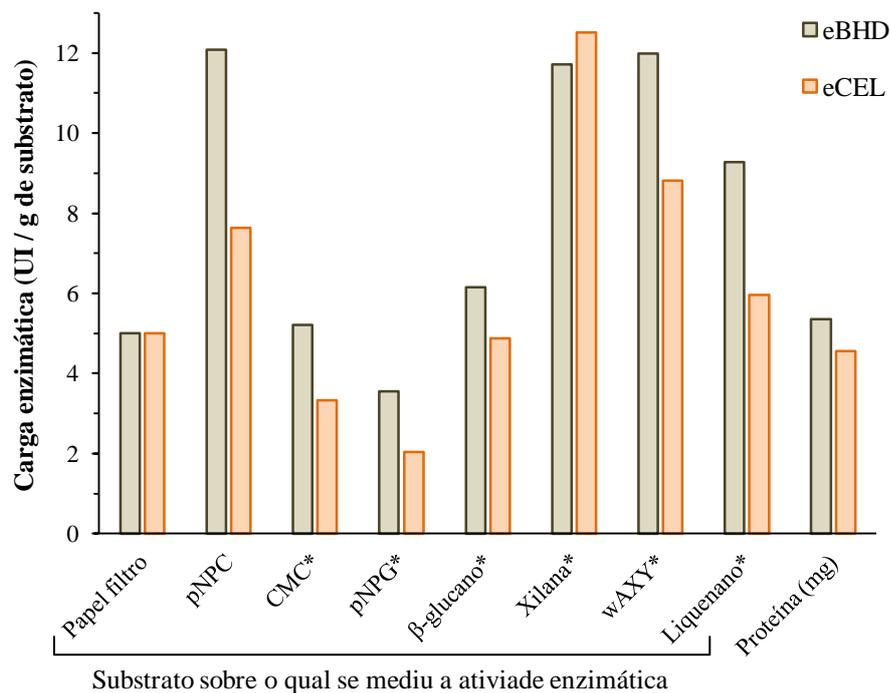
Segundo DRUZHININA et al. (2011), os genomas de *Hypocrea jecorina* (*T. reesei*), *H. atroviridis*, *H. virens*, contêm genes de invertases intracelulares, mas não extracelulares. Dessa forma, a sacarose deve ser assimilada por meio de permease de sacarose antes de ser hidrolisada.

Assim como no caso da lactose, parece ser importante o processo de adaptação ao substrato. Em testes em shaker, foram realizados dois pré-cultivos paralelos, sendo um com glicerol (padrão) e outro com sacarose. Posteriormente, o fungo foi cultivado com sacarose apenas. Nas amostras cujo pré-cultivo foi com sacarose, observou-se um maior nível de FPase, porém, este ainda foi menor do que aqueles alcançados com substratos celulósicos (dados não mostrados). Futuros ensaios poderão ser conduzidos, variando-se a concentração de substrato, por exemplo, a fim de esclarecer se a possível indução que ocorre está relacionada com o estado fisiológico em um dado período, ou se de fato a sacarose é capaz de induzir genes de celulase.

#### 4.2.4 Teste de especificidade do coquetel enzimático

Foi realizado um teste de hidrólise para averiguar se o coquetel enzimático produzido pelo fungo é específico ao substrato que o induz. Para tanto, o *T. harzianum* foi cultivado em reator contendo meio suplementado com BHD ou Celufloc. Após 72 horas de cultivo, o sobrenadante foi coletado e o extrato enzimático foi avaliado quanto aos níveis de atividade sobre diversos substratos padrões. Em seguida, foram montadas reações de hidrólise contendo os extratos mencionados e BHD ou Celufloc como substrato-alvo. O volume de extrato adicionado em cada reação foi nivelado de modo a se obter 5 FPU por grama de substrato. Por conseguinte, foram calculados os níveis das demais atividades presentes em cada reação, os quais foram apresentados na **Figura 6**.

**Figura 6** – Níveis de atividade enzimática em cada reação do ensaio de especificidade, ao se utilizar extrato enzimático induzido com BHD (eBHD) ou Celufloc (eCEL).



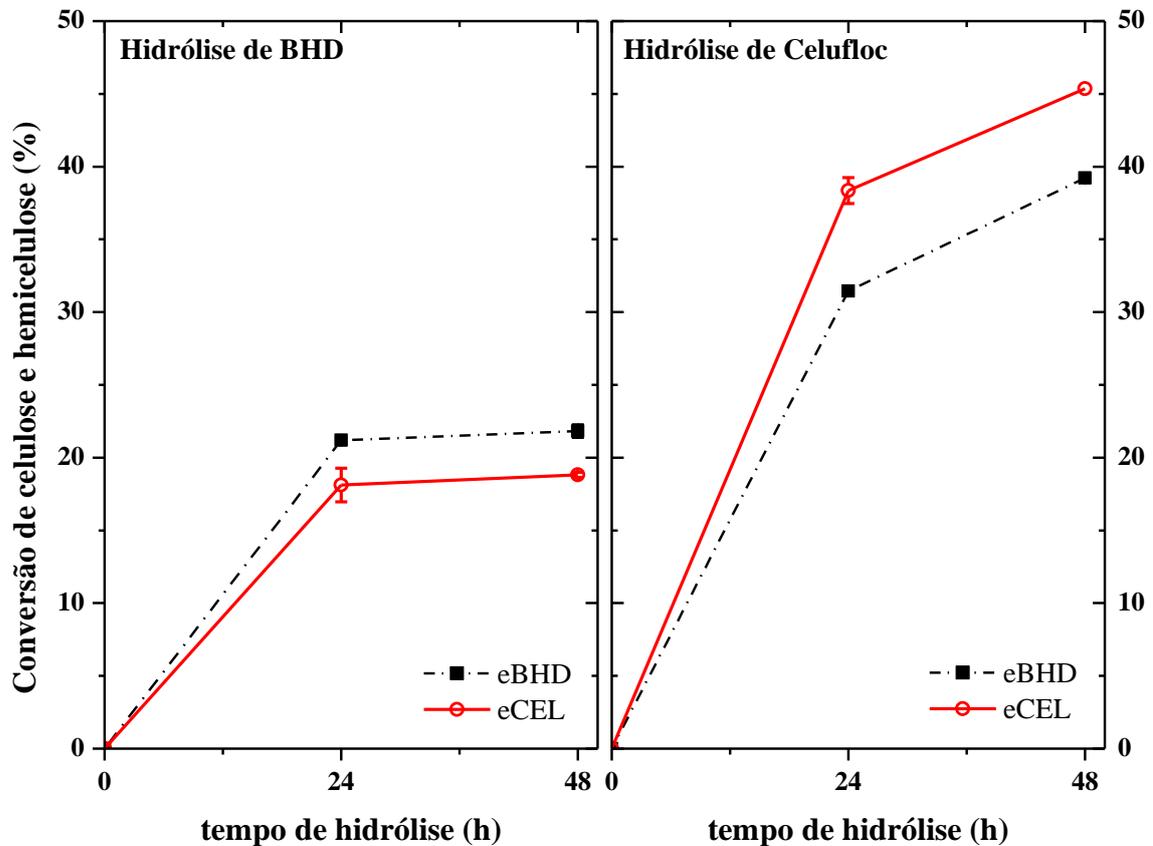
Legenda: Os níveis de atividade foram expressos em UI por grama de substrato a ser hidrolisado (BHD ou Celufloc), sendo que os valores reais devem ser calculados multiplicando-se a atividade (UI/g) sobre o substrato: CMC\* (carboximetilcelulose) por 10; pNPG\* (p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo) por 10; β-glucano\* por 100; xilana\* por 100; wAXY\* (arabinoxilano de trigo) por 10; liquenano\* por 10. pNPC: p-nitrofenil-β-D-celobiosídeo.

O nivelamento baseado na atividade de FPase fez com que as amostras contendo o extrato induzido com BHD (eBHD) tivessem uma carga enzimática maior, com 17,3% a mais de proteína total. Em teoria, a adição do eBHD proporcionou uma atividade

sobre pNPC (de celobiohidrolase) 58,2% maior, comparando com o eCEL. Da mesma maneira, 56,1% maior sobre CMC (endoglucanase), 73,9% sobre pNPG ( $\beta$ -glucosidase), 26,0% sobre  $\beta$ -glucano, 36,0% sobre arabinosilano e 55,7% maior sobre liquenano. A única atividade, dentre as avaliadas, em que a adição do extrato induzido com Celufloc sobressaiu-se foi a de xilanase, com uma diferença de 6,8% a mais dessa medida.

Após a adição dos extratos enzimáticos, as reações de hidrólise foram incubadas por até 48 horas, sendo então determinadas (por HPLC) as concentrações de glicose, celobiose e xilose liberadas a partir do substrato. Baseando-se nisso, foi calculada a conversão de polissacarídeos (celulose e hemicelulose) em açúcares simples (glicose, celobiose e xilose) para cada condição, como apresentado na **Figura 7**.

**Figura 7** – Conversão de celulose e hemicelulose em açúcares simples (glicose, celobiose e xilose) após hidrólise realizada com extrato enzimático produzido a partir de cultivo com bagaço (eBHD) ou Celufloc (eCEL), empregando-se, como substrato da reação, 5% (m/v) de bagaço ou Celufloc, durante 24 a 48 horas de incubação.



Legenda: As barras de erro referem-se aos desvios padrões de reações em duplicata. Quando necessário, foram realizados os devidos descontos da quantidade de açúcar presente no extrato enzimático e liberado pelo substrato da hidrólise (controles).

A análise da **Figura 7** permite algumas considerações. Por exemplo, o substrato BHD foi mais recalcitrante que a Celufloc, o que pode ser verificado de duas formas. Independente do extrato adicionado, a conversão do BHD foi menor que a da Celufloc, cujo rendimento foi de até 45,3%, enquanto que o rendimento máximo da hidrólise do BHD foi de até 21,8%. Além disso, a decomposição do bagaço estagnou-se em 24 horas, ao passo que a da Celufloc continuou até 48 horas, respectivamente, o menor e o maior períodos de incubação avaliados. Isso pode estar relacionado com a composição e estrutura do material.

Segundo Kumar et al. (2018), os processos termoquímicos, aos quais a biomassa vegetal é submetida durante a etapa de pré-tratamento, contribuem para que a interação entre a celulose e o complexo lignina-hemicelulose, que a recobre, torne-se mais reforçada. Dessa forma, a estrutura fica mais recalcitrante e mais difícil de ser decomposta. Para a obtenção de ambos substratos, houve o emprego de altas temperaturas no pré-tratamento, principalmente no caso do bagaço.

Ao se verificar a composição dos substratos (**Tabela 1**), observa-se que os teores de celulose foram muito próximos entre si. A Celufloc apresentou 86,01% de celulose, enquanto que o BHD, 85,80%. Além disso, os índices de cristalinidade foram parecidos entre eles (**Figura 2**). Dessa forma, a celulose parece não ser um parâmetro adequado para distinguir esses substratos. O BHD apresentou um teor de 8,04% de lignina e 1,61% de hemicelulose. Por sua vez, a Celufloc possuiu 0,97% de lignina e 14,91% de hemicelulose. Assim, a maior quantidade de lignina residual parece ter contribuído de forma mais significativa para a recalcitrância do bagaço.

De acordo com Yang et al. (2011), todos os constituintes da parede celular vegetal são de alguma forma modificados pelos pré-tratamentos, dependendo das tecnologias e condições aplicadas, o que dificulta deduzir se a alteração de microfibrilas de celulose, a remoção de hemiceluloses, a modificação ou realocação da lignina ou ainda outros efeitos sobre o substrato são os responsáveis por aumentar a eficiência enzimática. A remoção da hemicelulose aumenta a digestão enzimática da celulose, já que aquela constitui uma barreira sobre esta. Além disso, vale ressaltar que as cadeias de hemicelulose são extensivamente acetiladas em muitos tipos de biomassa e que a deacetilação pode até triplicar a digestibilidade da hemicelulose (YANG et al., 2011). Entretanto, outros estudos apontam que a redução da cristalinidade e a remoção da lignina são mais importantes que a remoção de grupos acetilas (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000).

A lignina dificulta a acessibilidade à celulose e também diminui a atividade de celulases, visto que ela adsorve proteínas da fase aquosa (YANG et al., 2011). Mediante o exposto, o fato de o rendimento da hidrólise do BHD ter sido menor que o da Celufloc pode dever-se ao maior teor de lignina no BHD.

Como verificado nesse ensaio de hidrólise, a Celufloc foi mais acessível, independente do extrato enzimático, permitindo uma maior liberação de açúcares redutores, comparado ao BHD. A hidrólise da Celufloc aumentou no intervalo entre 24 e 48 horas de incubação, enquanto que a de BHD estagnou em 24 horas. Assim, pode-se presumir que, quando se realiza o cultivo do fungo, a Celufloc é um substrato mais acessível e que fornece moléculas indutoras (como a celobiose) por mais tempo que o BHD. Isto remete ao fato de que a indução dos genes de enzimas ocorre por um tempo maior no cultivo com Celufloc, em relação ao cultivo com BHD. Vide ensaios com Celufloc e BHD após 36 horas (**Figura 4**).

Outra observação pertinente sobre os dados da **Figura 7** consiste no fato de que o extrato hidrolisou mais o respectivo substrato no qual o fungo fora cultivado. Isso também foi verificado por Brink et al. (2014), que cultivaram duas cepas de *Aspergillus niger* e duas de *Trichoderma reesei* em bagaço de cana ou palha de trigo e utilizaram os extratos obtidos em ensaios de sacarificação dos mesmos substratos. Eles verificaram que o complexo enzimático produzido foi adaptado para a sacarificação do substrato disponível, em todas as cepas.

Quando se considera a hidrólise do BHD, é possível que a melhor performance do eBHD deva-se à sua maior carga enzimática, como mencionado anteriormente. Não se descarta, porém, a possibilidade de que outras enzimas ou proteínas acessórias tenham sido induzidas especialmente durante o cultivo com BHD. Ao se observar a hidrólise da Celufloc, é bem nítido o melhor desempenho do eCEL, apesar da sua menor carga enzimática, em termos de proteína total, no ensaio. Como mencionado, a única atividade, dentre as avaliadas, que o eCEL proporcionou maior nível em relação ao eBHD foi a de xilanase. Além disso, ao se voltar para os dados de expressão gênica (**Figura 4**), averigua-se que a expressão da CE5 (acetil xilano esterase) foi 4,2 vezes maior (após 48 horas de cultivo) em Celufloc, comparado a BHD. A atividade dessa enzima remove os grupos acetilas ao longo da cadeia do xilano, facilitando o acesso de outras enzimas que degradam a hemicelulose e, por conseguinte, das que atacam a celulose também.

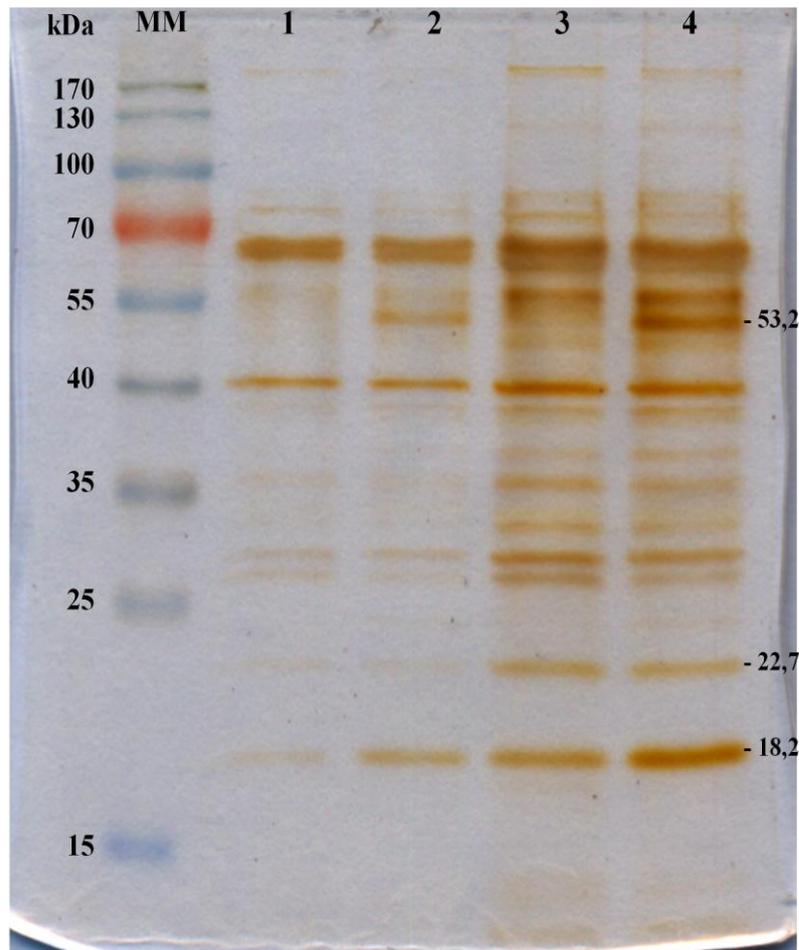
A especificidade observada dos extratos também pode ser discutida em relação à hemicelulose. Embora não se tenham dados mais completos da composição dos substratos (teor de arabinose, ácido glucurônico), algumas considerações podem ser feitas sobre os

materiais de origem. A Celufloc é produzida a partir do eucalipto, cujo principal tipo de xilano é o glucuronoxilano, em cujas ramificações está ligado o ácido D-glucurônico em grandes quantidades (HEROLD et al., 2013). Já a hemicelulose do bagaço tem como representante o glucuronoarabinoxilano, o qual possui substituições laterais de unidades de arabinose e de ácido 4-O-metil-glucurônico ao longo da cadeia de xilose (CARVALHO et al. 2017). Considerando a biomassa como um todo, o bagaço de cana (*in natura*) possui 1,8 vez mais xilose e 6,5 vezes mais arabinose, comparado a eucalipto. Este, por sua vez, possui 3,2 vezes mais de ácidos urônicos e 1,6 vez a mais de galactose que o bagaço (CARVALHO et al. 2015). Todavia, é importante ressaltar que os processos termoquímicos empregados na produção da Celufloc e do BHD podem ter alterado essas proporções dos substituintes. Relembrando também que a Celufloc apresentou maior teor de hemicelulose (**Tabela 1**), podendo os seus componentes servirem de indutores para a expressão das enzimas hidrolíticas. Observando-se os dados de determinação de açúcares por HPLC liberados no ensaio de hidrólise (especificidade), verificou-se uma liberação de até 0,72 mM de arabinose a partir da Celufloc, enquanto que, na sacarificação do BHD, não houve detecção. Essa concentração de arabinose, embora baixa, pode ter contribuído para a indução de alguma enzima diferenciada.

Em *T. reesei*, sabe-se que a xilose é indutora de genes de xilanase. Herold et al. (2013) demonstraram que a arabinose também induz a expressão de xilanase, de uma maneira dependente do XYR1, além de arabinofuranosidase e  $\beta$ -xilosidase. Além disso, o *T. reesei* possui genes de  $\alpha$ -metil-glucuronidases e glucuronil-xilanases. Tais enzimas, caso sejam expressas em *T. harzianum* também, podem ter um impacto significativo na conversão dos substratos estudados.

Outras enzimas não avaliadas certamente contribuíram para a especificidade dos extratos a seu substrato indutor. A fim de se verificar o perfil de proteínas dos extratos enzimáticos em questão, os mesmos foram avaliados por SDS-PAGE (**Figura 8**), padronizando-se as amostras por proteína total.

**Figura 8** – Perfil de proteínas dos extratos enzimáticos induzidos com BHD (eBHD) ou com Celufloc (eCEL).



Legenda: (MM) marcador de massa molecular; (1) e (2) 0,9 µg de proteína total do eBHD e do eCEL, respectivamente, aplicado em cada poço do gel; (3) e (4) 3 µg de proteína total do eBHD e eCEL, respectivamente, aplicado em cada poço. Ao lado esquerdo da figura, encontram-se as massas moleculares em kDa do marcador. Os valores '53,2', '22,7' e '18,2' são as massas estimadas em kDa para algumas bandas.

Analisando-se a **Figura 8**, é possível verificar que ambos os extratos apresentaram um perfil parecido, mas com algumas particularidades. No eCEL, há uma banda de 53,2 kDa (valor estimado) bem nítida, a qual tem uma intensidade muito menor no eBHD. Além disso, existe uma banda de 18,2 kDa (valor estimado) mais forte no eCEL do que no eBHD. Vale ressaltar que a identificação de proteínas apenas visualizando as bandas do gel não é precisa, pois cada banda pode ser um conjunto de vários tipos de proteínas. Outrossim, a glicosilação das proteínas nem sempre é constante, o que pode gerar diferentes estimativas entre os trabalhos. E, como os padrões utilizados foram pré-corados, o tamanho dos padrões também não é preciso. Entretanto, algumas observações podem ser feitas.

Benoliel, Torres e Moraes (2013) analisaram o extrato enzimático do *T. harzianum* cultivado com bagaço de cana por SDS-PAGE e fizeram um zimograma. Eles observaram atividade de celulase (sobre CMC) nas bandas de aproximadamente 50 e 20 kDa. Eles supuseram que a banda de 20 kDa pode corresponder à endoglucanase III, descrita por Generoso et al. (2012), a qual não possui o CBM (módulo de ligação à celulose). Além disso, foi detectada atividade de xilanase nas bandas de 20 kDa e em outras de aproximadamente 75 kDa.

A banda de 18,2 kDa poderia ser atribuída à xilanase, uma vez que esta apresentou uma atividade mais diferenciada, comparando o eCEL com o eBHD. Futuros trabalhos, empregando espectrometria de massas, poderão avaliar esses dois extratos de uma forma mais minuciosa e, assim, ajudar a elucidar qual enzima ou proteína acessória contribuiu para a especificidade de cada complexo enzimático.

## 5 CAPÍTULO 2 - ESTRATÉGIA DE MELHORAMENTO GENÉTICO

Em fungos produtores de celulasas, existem mecanismos de indução e repressão que agem em sincronia para regular a síntese dessas enzimas, mediante a disponibilidade de substrato. Tal regulação é essencial para a sobrevivência do microrganismo, pois permite a manutenção do seu equilíbrio energético. Contudo, isso consiste em uma barreira para a produção de enzimas a nível industrial. Dessa forma, diversas estratégias são elaboradas para superar essa questão, como, por exemplo, a manipulação de fatores de transcrição.

No entanto, modificações isoladas dificilmente atingem o objetivo de se obter linhagens mutantes capazes de produzir elevados níveis de enzimas celulolíticas. Diante disso, Yao et al. (2015) usaram três estratégias simultâneas de manipulação genética no fungo *Penicillium oxalicum*. Eles deletaram o gene *creA*, que codifica para o repressor de amplo espectro CreA, e o gene de uma  $\beta$ -glucosidase, uma vez que sua atividade de hidrólise diminui a concentração de um substrato indutor (celobiose), enquanto aumenta a de um repressor (glicose). Além disso, eles fizeram a superexpressão do regulador positivo *clrB*. Assim, eles tentaram bloquear algumas vias de repressão e elevar o nível da indução. Com isso, observaram, no sobrenadante da cultura do mutante, um aumento de 10 vezes na concentração de proteína total (secretada) e de 20 vezes na atividade de FPase. Porém, a transformação de fungos filamentosos é uma etapa desafiadora, o que torna inevitável que ela seja feita passo a passo.

Com relação ao objeto de estudo, o *T. harzianum*, foram realizadas algumas modificações genéticas, no intuito de aumentar a produção de enzimas que decompõem a biomassa vegetal. Delabona et al. (2017) conseguiram a superexpressão do *xyr1*, um dos principais reguladores positivos, e observaram um aumento de 66% na atividade de FPase. Tamietti et al. (2017) fizeram a deleção do *cre1*, o que permitiu um aumento de 2 vezes na atividade de endoglucanase (sobre CMC) e de 2,7 vezes na de xilanase. Em *T. reesei*, a deleção do *cre1* provoca retardo no crescimento e alterações na morfologia da célula (NAKARI-SETÄLÄ, 2009). Por isso, no presente trabalho, foi dada prioridade para a manipulação da  $\beta$ -glucosidase de *T. harzianum* como um passo inicial.

A  $\beta$ -glucosidase converte a celobiose em glicose, mas também é capaz de produzir, por atividade de transglicosilação, celooligômeros, os quais podem induzir a expressão de genes celulolíticos. Shida et al (2015) observaram que a cepa *T. reesei* PC-3-7,

um mutante superprodutor de celulase, possui uma mutação pontual no gene de  $\beta$ -glucosidase cella, o que acarretou na substituição de uma aminoácido (V409F). Os autores estudaram essa substituição e verificaram que a enzima modificada apresentou uma atividade muito reduzida de hidrólise da celobiose, porém foi capaz de produzir alguns produtos de transglicosilação.

Mediante o exposto, neste capítulo está apresentada a estratégia de melhoramento genético elaborada para reproduzir essa mutação no gene cella de *T. harzianum* P49P11.

## 5.1 Material e métodos

### 5.1.1 Análise da sequência do gene cella

A estratégia de melhoramento genético aqui proposta para o fungo *T. harzianum* foi baseada no trabalho de Shida et al. (2015). Eles avaliaram o impacto de uma substituição de aminoácido na enzima  $\beta$ -glucosidase Cell1A sobre a produção de celulases em *T. reesei*. A partir dos dados do genoma das linhagens de *T. reesei* disponibilizados pelo JGI (*Joint Genome Institute*) (<https://genome.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>), coletou-se a sequência da enzima em questão (ID 120749). Em seguida, comparando a sequência desta proteína por BLAST no JGI, encontrou-se uma sequência com 88,7% de identidade de aminoácidos, no genoma do *T. harzianum* (<https://genome.jgi.doe.gov/Triha1/Triha1.home.html>), a qual corresponde à proteína com ID 107669.

Além disso, verificou-se que o aminoácido substituído na proteína do *T. reesei* refere-se ao aminoácido de número 408, na sequência de *T. harzianum*. Assim, fez-se necessária a mutação do códon 'GTG' para 'TTC', a fim de que um resíduo de valina (V) fosse substituído por um de fenilalanina (F).

As sequências peptídicas da Cell1A, tanto do *T. reesei* quanto do *T. harzianum*, foram avaliadas quando à predição da localização subcelular. Para tanto, foram utilizadas algumas ferramentas de bioinformática, como por exemplo: DeepLoc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc-1.0/>), KnowPredsiteII (<http://bioapp.iis.sinica.edu.tw/KnowPred/index.html>), MultiLoc2 (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc2>) e DISTILL (<http://distill.ucd.ie/distill/>).

### 5.1.2 Construção do cassette para recombinação homóloga

Para que a mutação desejada fosse realizada no genoma de *T. harzianum*, foi necessário a construção de um cassette, o qual é composto por: uma sequência codificante do gene com a mutação inserida, braços de homologia 5' e 3' e um marcador de seleção (para o fungo). Assim, as diferentes partes do cassette foram amplificadas por reação de PCR e, posteriormente, clonadas no vetor pUC18a.

Inicialmente, foi realizada a extração de DNA do fungo *T. harzianum* P49P11. Uma alíquota de 50 µL de suspensão de esporos foi inoculada em 50 mL de meio Mandels, suplementado com 20 g/L de glicerol. O Erlenmeyer contendo o meio de cultura foi incubado em shaker a 29 °C, com agitação de 200 rpm, por 24 horas. Após esse período, a cultura foi filtrada em filtro Miracloth, o micélio retido foi lavado com água ultrapura, seco com papel e transferido para um almofariz, onde foi macerado em nitrogênio líquido. O pó fino resultante da trituração foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, ao qual se adicionou 800 µL de tampão de extração (NaCl 1,4 M; Tris-HCl pH 7,5 10 mM; EDTA 5 mM), seguindo-se o procedimento descrito por Seiboth et al. (2004). O DNA genômico foi ressuspenso em água ultrapura autoclavada e quantificado em NanoDrop.

Para amplificação do gene *cella* selvagem, foi realizada uma reação de PCR com a enzima Platinum SuperFi DNA Polymerase (código 12351-010, Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante. Nessa reação, foram utilizados 70 ng de DNA genômico para uma reação de 20 µL. Os iniciadores utilizados foram '*cella\_genof*' e '*cella\_genor*' (**Quadro 2**).

O seguinte programa foi utilizado: desnaturação inicial (98 °C por 30 segundos); 25 ciclos de desnaturação (98°C por 10 segundos), anelamento (65,3 °C por 10 segundos) e extensão (72 °C por 2 minutos e 46 segundos); extensão final (72 °C por 5 minutos); por fim, uma etapa de espera a 4 °C.

Em seguida, a reação do gene *cella* foi diluída cem vezes e utilizada como amostra para amplificação de três partes do cassette: fragmentos 1, 2 e 4. O fragmento 1 foi amplificado com os iniciadores '*Frag1Gib\_For*' e '*Frag1Gib\_Rev*', o fragmento 2 com '*Frag2Gib\_For*' e '*Frag2Gib\_Rev*' e o fragmento 4 com '*Frag4Gib\_For*' e '*Frag4Gib\_Rev*'. As sequências dos iniciadores (primers) e as temperaturas de anelamento empregadas foram apresentadas no **Quadro 2**. Os oligonucleotídeos dos fragmentos do cassette foram desenhados com o emprego da ferramenta NEBuilder (<https://nebuilder.neb.com/>), a qual

possibilitou um sequência homóloga de 35 pb (mínimo) compartilhada entre os fragmentos adjacentes.

**Quadro 2** – Iniciadores (primers) utilizados ao longo do trabalho.

Primer	Sequência 5' 3'	Temperatura de anelamento	Finalidade
cella_genof	GATTCCCGAAGACGAAGAGTCG	65,3 °C	Amplificação do gene cella selvagem ou confirmação da integração do cassette ao genoma do fungo
cella_genor	TGAAGGAGATTACGGCTTCCAAG		
Hph_meioF	TCACGCCATGTAGTGTATTGACC		
Frag1Gib_For	ACGGCCAGTGCCAAGCTTGAATGGGACATTGTCGATGATTCG	63,0 °C	Amplificação do Fragmento 1 do cassette
Frag1Gib_Rev	AAAGTATCCCTTGACGTTGAATCCGTCTAGCGTCGC		
Frag2Gib_For	GCGACGCTAGACGGATTCAACGTCAAGGGATACTT TGC	61,3 °C	Amplificação do Fragmento 2 do cassette
Frag2Gib_Rev	ACGCAGGAAAGAACATGTGAAGGATGAAGACGAT GATGATG		
Frag3Gib_For	TCATCGTCTTCATCCTTCACATGTTCTTTCTGCGTT ATC	62,0 °C	Amplificação do Fragmento 3 do cassette
Frag3Gib_Rev	ACATCCCAAGGCGGCTAAAAGTGAATGCTAGTGG AGGTC		
Frag4Gib_For	TCCACTAGCATTACACTTTTAGCCGCCTTGGGATGT TTC	65,1 °C	Amplificação do Fragmento 4 do cassette
Frag4Gib_Rev	GCAGGCATGCTTAATTAATTGGTCATCATGTCGTAT CGAGTC		
pUC18Gib_F	ATACGACATGATGACCAATTAATTAAGCATGCCTG CAGGTCG	68,0 °C	Amplificação do vetor pUC18a
pUC18Gib_R	CTCGACAATGTCCCATTCAAGCTTGGCACTGGCCGT		
Frag1_espF	GAATGGGACATTGTCGAGTATTCG	64,5 °C	Amplificação do cassette inteiro
Frag4_espR	TTGGTCATCATGTCGTATCGAGTC		
splitbr5_R	CTCGAGGGCGAAGAATCTC	64,3°C	Amplificação do fragmento 5' do cassette <i>split marker</i>
splitbr3_F	GATGTTGGCGACCTCGTATTG	64,1 °C	Amplificação do fragmento 3' do cassette <i>split marker</i>

O fragmento 3 (marcador de resistência à higromicina) foi amplificado com os iniciadores 'Frag3Gib\_For' e 'Frag3Gib\_Rev' a partir do plasmídeo pFC332 (NØDVIG et al.,

2015). O vetor pUC18a foi linearizado por PCR com os iniciadores 'pUC18Gib\_F' e 'pUC18Gib\_R'.

As reações de PCR de cada componente do cassete seguiram as recomendações do fabricante. Os produtos das reações foram aplicados em gel de agarose, o qual foi submetido à eletroforese. As bandas de interesse foram cortadas do gel e purificadas com o kit de purificação da Promega (código A9281), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram eluídas em água ultrapura e concentradas em SpeedVac (Eppendorf).

Um vez realizada a purificação dos fragmentos e do vetor linearizado, fez-se uma reação com o kit Gibson Assembly (código E2611, New England Biolabs), de acordo com as recomendações do fabricante. Nessa reação, foi utilizado 0,135 pmol de cada fragmento e 0,036 pmol do vetor linearizado, o que permitiu uma razão inseto/vetor de 3,78. O microtubo contendo a mistura da reação foi incubado a 50 °C por 80 minutos.

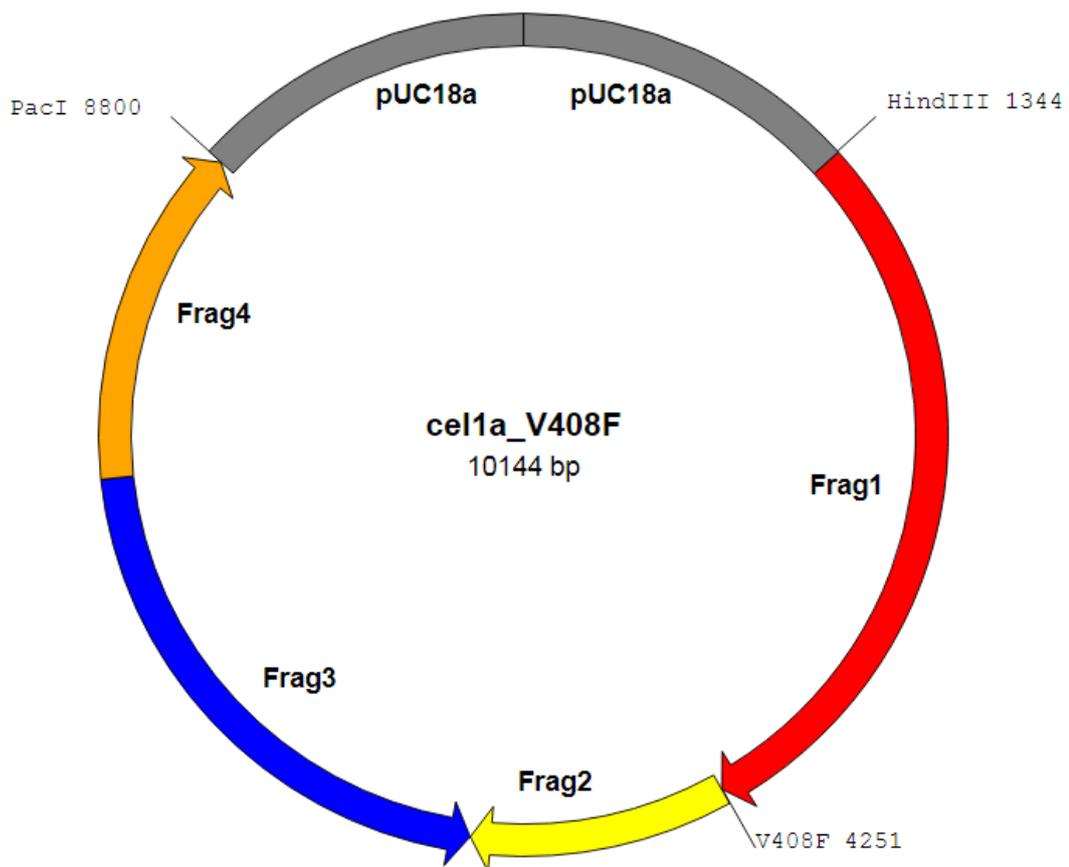
Posteriormente, foi realizada a transformação de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . A reação de Gibson foi diluída três vezes em água ultrapura e 1  $\mu$ L da solução resultante foi adicionado a 50  $\mu$ L de suspensão de células eletrocompetentes. Foi dado um pulso em eletroporador (Bio-Rad) e, em seguida, foram adicionados 950  $\mu$ L de meio SOC. A suspensão foi incubada a 37 °C por 1 hora e uma alíquota de 100  $\mu$ L foi inoculada em meio LB-ágar suplementado com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. A placa foi incubada em estufa a 37 °C, de um dia para o outro. Então, com auxílio de palitos, algumas colônias das placas foram transferidas para microtubos contendo 20  $\mu$ L de solução de glicerol 10% (v/v). Dessa suspensão resultante, 1  $\mu$ L foi utilizado como amostra para 10  $\mu$ L de reação de PCR de colônia, na qual foram empregados os primers 'Frag1Gib\_For' e 'Frag4Gib\_Rev', com o seguinte programa: uma etapa de desnaturação inicial (98 °C por 40 segundos); 30 ciclos de desnaturação (98 °C por 10 segundos), anelamento (64 °C por 10 segundos) e extensão (72 °C por 3 minutos e 45 segundos); e uma etapa de extensão final (72 °C por 5 minutos). Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v).

Das onze colônias testadas, quatro foram selecionadas, sendo então realizada a extração de DNA plasmidial (kit Promega, código A1223) e uma série de reações de PCR para detectar a amplificação dos fragmentos 1, 2, 3 e 4 que compõem o cassete. As condições das reações foram semelhantes às empregadas para amplificação dos fragmentos a partir do DNA genômico. Para uma reação de PCR de 10  $\mu$ L, 2 ng de DNA plasmidial foram adicionados. Os produtos também foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v).

Um dos plasmídeos analisados foi selecionado para o sequenciamento. Nessa etapa, foram utilizados vários primers, com uma distância aproximada de 400 bases entre suas extremidades 5', de forma que todo o cassette foi coberto. As reações de sequenciamento foram realizadas por colaboradores especialistas do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Campinas-SP. A técnica empregada foi baseada no método descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977).

Uma representação do plasmídeo contendo o cassette foi produzida por meio da ferramenta online *Draw Custom Plasmid Map* (<http://www.rf-cloning.org/savvy.php>) (**Figura 9**).

**Figura 9.** – Mapa do plasmídeo contendo o cassette para mutação do gene *cell1a*.



Legenda: (Frag 1-4) diferentes fragmentos que compõem o cassette; (pUC18a) região correspondente ao vetor pUC18a. Em destaque: sítios de restrição de algumas enzimas e sítio com a mutação desejada (V408F).

### 5.1.3 Transformação

#### 5.1.3.1 Amplificação do cassette

Um vez obtido o cassette e feito o sequenciamento do mesmo, procedeu-se com a etapa de transformação, para inseri-lo no interior da célula do hospedeiro (*T. harzianum*) e, por mecanismos de recombinação homóloga, haver a permuta do gene selvagem pelo gene modificado (V408F).

Para a transformação, foi utilizada amostra de DNA com uma das seguintes apresentações:

##### a) cassette linear amplificado por PCR

Neste caso, foram realizadas reações de PCR contendo 15 ng do plasmídeo para cada 50 µL de reação, a qual seguiu as descrições já mencionadas, sendo empregados os primers 'Frag1\_espF' e 'Frag4\_espR'.

Na maioria das transformações, os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose, o qual foi submetido à eletroforese e, em seguida, as bandas foram purificadas com kit comercial (código A9281, Promega). Isso permitiu ter um DNA mais puro, porém, em pouca quantidade, disponibilizando de 7 a 11 µg de amostra (a partir de 1 mL de reação de PCR), para cada transformação.

Em apenas uma das tentativas, o cassette amplificado por PCR foi precipitado com isopropanol e ressuspenso em Tris-HCl pH 8,0 a 1 mM. Esse procedimento permitiu que a transformação de protoplasto fosse feita com 35 µg de DNA (a partir de 250 µL de reação de PCR).

O cassette nessa apresentação linear foi utilizado em transformações tanto por eletroporação quanto por protoplasto.

##### b) plasmídeo circular 'cella V408F'

Esse plasmídeo contém o cassette clonado no vetor pUC18a e serviu de amostra para a amplificação do cassette por PCR. Ele foi obtido por extração de DNA plasmidial a partir de células de *E. coli*. O plasmídeo foi utilizado em transformações tanto por eletroporação quanto por protoplasto.

c) cassete do tipo marcador dividido (*split marker*)

Este tipo de cassette foi obtido a partir de reações de PCR separadas, com o emprego de dois pares de primers, os quais geraram dois fragmentos, 5' e 3'. Estes dividem o cassette no gene do marcador de seleção e compartilham uma região de 613 pb de homologia, baseado no trabalho de Wang et al. (2010). O fragmento 5' foi gerado com os iniciadores 'Frag1\_espF' e 'splitbr5\_R' e o fragmento 3', com 'splitbr3\_F' e 'Frag4\_espR'. As condições das PCRs foram as mesmas já descritas. Por fim, os produtos foram precipitados com acetato de sódio e etanol absoluto e ressuspensos em solução Tris-HCl pH 8,0 a 1 mM.

As amostras foram concentradas em concentrador a vácuo, sob refrigeração, a fim de se atingir uma concentração adequada para a etapa de transformação. Para esta, fez-se necessário adicionar, no máximo, 10 µL de solução contendo cerca de 10 µg de DNA.

#### 5.1.3.2 *Transformação de protoplasto mediada por PEG*

Inicialmente, o fungo foi inoculado em placa com meio PDA, a qual foi incubada em estufa a 29 °C por até sete dias. Dez mL de solução de Tween (0,05% v/v de Tween 80; 0,9% m/v de NaCl) foram adicionados à placa e foi realizada a raspagem com alça de inoculação. Em seguida, a suspensão de conídeos foi filtrada em funil de Büchner com placa porosa (porosidade de 40-100 µm) para retenção das hifas. Cinquenta a oitenta µL da suspensão filtrada foram inoculados em discos de celofane dispostos sobre meio PDA, seguido de espalhamento com alça de Drigalski. As placas contendo os discos foram incubadas em estufa a 28 °C durante 16 a 20 horas.

Após o período de germinação dos conídeos, cinco discos de celofane foram transferidos para uma placa de Petri de vidro contendo 18 mL de solução de lise e removidos após o desprendimento do fungo. As placas foram mantidas a 30 °C em shaker orbital a 90 rpm por duas ou quatro horas. A suspensão de protoplastos foi filtrada em lã de vidro e lavada com Solução A (**Quadro 3**).

**Quadro 3** – Composição de soluções e meios utilizados na etapa de transformação.

Solução	Composição
Solução A	Sorbitol a 1,2 M; $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 5,6) a 0,1 M
Solução de lise	7,5 g/L de enzima lítica (Sigma L-1412) em Solução A
Solução B	Sorbitol a 1 M; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 50 mM; Tris-HCl (pH 7,5) a 10 mM
Solução PEG	25% (m/v) de PEG (polietilenoglicol) 6000; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 50 mM; Tris-HCl (pH 7,5) a 10 mM
Meio inferior	30 g/L de extrato de malte; 15 g/L de ágar; 182,2 g/L de sorbitol; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina
Meio superior	30 g/L de extrato de malte; 15 g/L de agarose; 182,2 g/L de sorbitol; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina

A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 4000xg e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado foi ressuspensão em 4 mL de Solução B gelada. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimentado ressuspensão em 500  $\mu\text{L}$  de Solução B gelada. Em seguida, preparou-se a mistura de transformação, adicionando-se a um tubo: 200  $\mu\text{L}$  de solução de protoplasto, 10  $\mu\text{L}$  de DNA purificado e 50  $\mu\text{L}$  de Solução PEG gelada. A mistura foi incubada em gelo por vinte minutos e, logo após, adicionaram-se 2 mL de Solução PEG à temperatura ambiente. Foi feita uma incubação por cinco minutos, depois 4 mL de Solução B foram adicionados, completando assim a mistura da transformação.

Posteriormente, 1 mL da mistura da transformação foi adicionado a 5 mL de meio superior a 48 °C, vertendo-se em placas já contendo meio inferior geleificado. As placas foram incubadas a 28 °C em estufa, sendo acompanhado o crescimento das colônias. Estas foram, então, transferidas para novas placas contendo o meio MEX (30 g/L de extrato de malte; 15 g/L de ágar) ou PDA com 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de higromicina.

O procedimento descrito acima foi baseado no trabalho de Seiboth et al. (2012).

### 5.1.3.3 Transformação por eletroporação

Para a transformação por eletroporação, foi utilizada uma placa com meio PDA, na qual o fungo crescera por sete dias, havendo formação de conídios por toda a

superfície. A esta placa, foram adicionados 10 mL de solução salina (0,9% m/v de NaCl; 0,05% v/v de Tween 80). A suspensão resultante foi filtrada em funil de vidro com placa porosa, agitada vigorosamente em vortex e transferida para um Erlenmeyer contendo 100 mL de meio YPD (1% m/v de extrato de levedura, 2% m/v de peptona, 2% m/v de glicose). A cultura foi incubada em shaker a 30 °C por 6,5 horas, com 300 rpm de agitação. Em seguida, os conídios foram coletados por centrifugação e lavados com solução de sorbitol a 1,1 M. Por fim, as células foram ressuspensas em 300 µL de sorbitol a 1,1 M, sendo mantidas sob refrigeração.

Posteriormente, 10 µL de solução de DNA foram adicionados a 75 µL da suspensão de células e a mistura foi incubada em gelo por 30 minutos. Depois, a suspensão foi transferida para uma cubeta de eletroporação (com espaçamento de 0,2 cm) esterilizada. Em um eletroporador (Bio-Rad), foi ajustada a seguinte configuração: 1,8 kV, 800 Ω e 25 µF (SCHUSTER et al., 2012); e então foi dado um pulso do tipo decaimento exponencial. Após isso, rapidamente foram adicionados 400 µL de sorbitol a 1,1 M gelado e 125 µL de meio YPD. A suspensão foi transferida para um tubo de 2 mL, o qual foi incubado a 28 °C, com 800 rpm de agitação em Thermomixer (Eppendorf). Depois de 1 hora de incubação, duas alíquotas de 150 µL foram inoculadas em placas com meio MEX (3% m/v de extrato de malte, 1,5% m/v de ágar e 0,1% v/v de Triton X-100) suplementado com 50 µg/mL de higromicina. E após 14 horas de incubação (sem agitação), mais duas alíquotas foram coletadas e plaqueadas em meio seletivo.

Além da configuração descrita, foi realizado mais um teste de eletroporação de protoplastos descongelados, sendo empregada uma tensão de 560 V. Essa menor voltagem foi descrita por Goldman et al. (1990), que utilizaram um campo de força de 2,8 kV/cm.

#### 5.1.4 Metodologias gerais

As atividades rotineiras relacionadas à biologia molecular, quando não descritas, seguiram as recomendações de Sambrook e Russel (2001), tais como eletroforese em gel de agarose, preparo de células competentes de *E. coli*, entre outras.

## 5.2 Resultados e discussão

### 5.2.1 Predição da localização subcelular

A estratégia para obtenção de uma linhagem mutante de *T. harzianum* teve como base o estudo de Shida et al. (2015), que avaliaram o efeito de uma mutação pontual (V409F) no gene da  $\beta$ -glucosidase Cel1A sobre a produção de celulases em *T. reesei*. A partir da sequência desse gene, foi encontrada a proteína ortóloga no genoma do *T. harzianum*. Com o objetivo de avaliar se a localização celular dessa proteína era a mesma nas duas espécies, foram utilizadas algumas ferramentas de bioinformática. Os resultados encontrados estão apresentados na **Tabela 2** e indicam a probabilidade de que a proteína em questão seja direcionada para um determinado sítio celular.

**Tabela 2** – Predição da localização subcelular da  $\beta$ -glucosidase Cel1A (BGLII).

Preditor	Microrganismo	
	<i>T. reesei</i>	<i>T. harzianum</i>
DeepLoc*	<u>Localização</u> : citoplasma (0,57) ou peroxissomo (0,13); <u>Tipo</u> : solúvel (0,94) ou membrana (0,06)	<u>Localização</u> : citoplasma (0,627) <u>Tipo</u> : solúvel (0,94) ou membrana (0,06)
KnowPredsiteII**	extracelular (60,0);	extracelular (60,0)
MultiLoc2*		
- LowRes	via secretória (0,67); citoplasma (0,22);	via secretória (0,63); citoplasma (0,25);
- HighRes	vacúolo (0,59); citoplasma (0,27);	citoplasma (0,87); peroxissomo (0,11);
DISTILL	via secretória (baixa confiança)	citoplasma (média confiança)

Legenda: (\*) o valor indicado corresponde à probabilidade da predição, sendo o valor máximo igual a 1,0; (\*\*) o valor indicado corresponde à maior pontuação recebida entre as diferentes possibilidades de localização.

Como pode ser visto na **Tabela 2**, houve algumas diferenças entre os resultados dos preditores. Sendo que alguns deles concluíram que a Cel1A do *T. reesei* seria extracelular. Entretanto, Soloheimo et al. (2002) comprovaram experimentalmente que essa enzima encontra-se no citoplasma em *T. reesei*. Assim, o preditor que permitiu um resultado

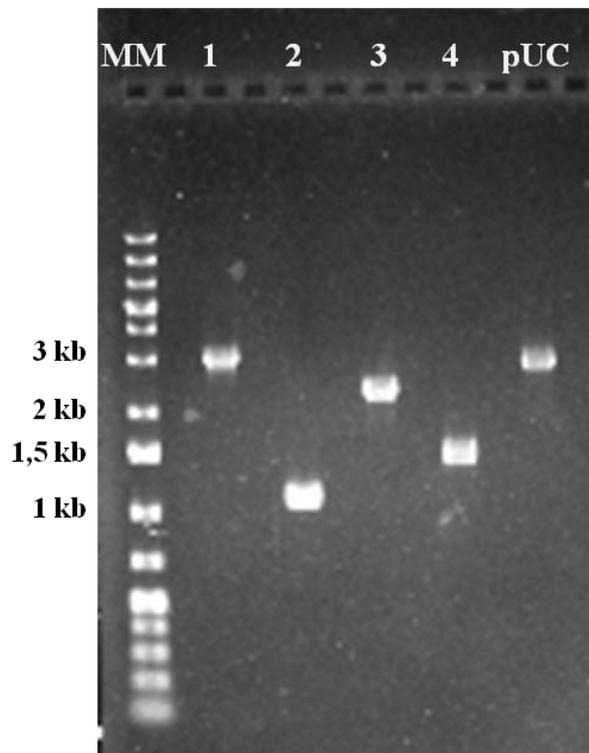
de maior confiança foi o DeepLoc. Este predisse também que a CellA de *T. harzianum* deve encontrar-se no citoplasma.

Uma vez esclarecida essa dúvida, foi arquitetada uma estratégia para a construção de um cassette, visando à mutação pontual (V408F) no gene cella selvagem de *T. harzianum*.

### 5.2.2 Construção do cassette para recombinação homóloga

Inicialmente, foi construído um cassette para que o gene-alvo fosse modificado. Cada fragmento do cassette foi amplificado por reação de PCR e purificado a partir de gel de agarose, cujo resultado foi conferido por uma nova eletroforese (**Figura 10**). O tamanho da banda de todos os produtos foi compatível com o esperado. Em seguida, esses fragmentos foram reunidos, formando um plasmídeo, mediante o emprego da reação isotérmica de Gibson.

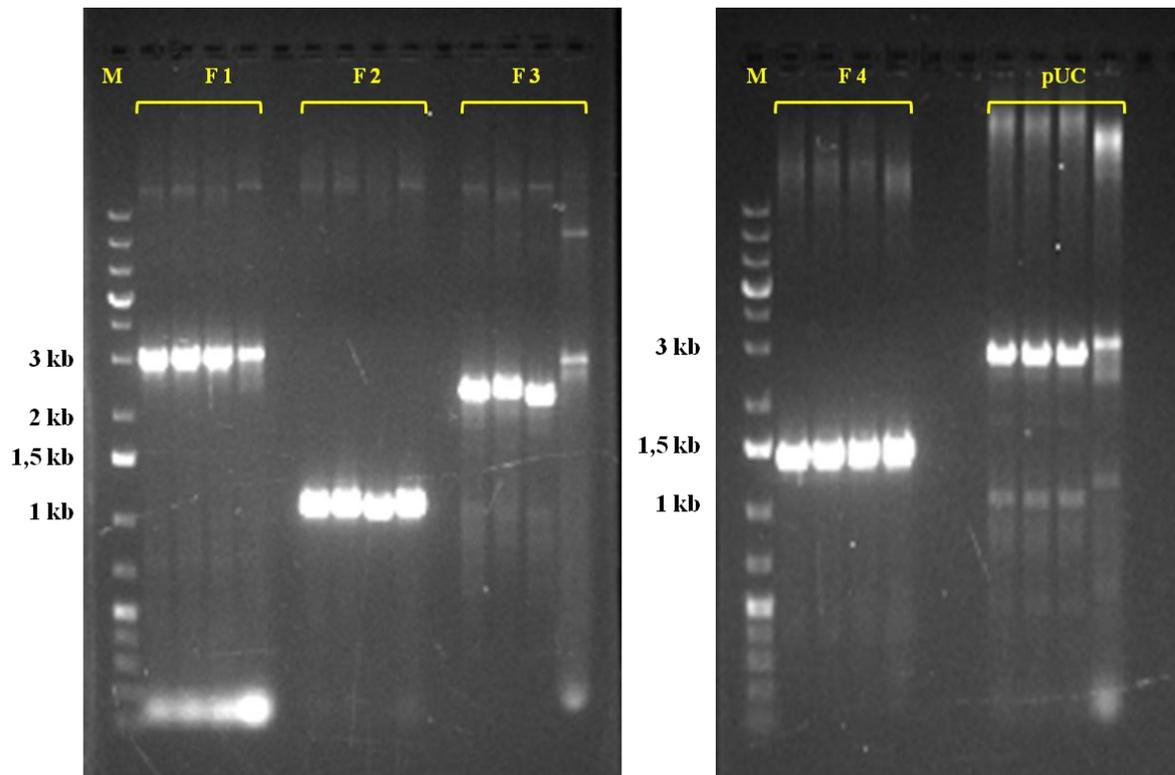
**Figura 10** – Visualização dos fragmentos purificados antes da clonagem por Gibson.



Legenda: (MM) Marcador de massa molecular; (1) fragmento 1; (2) fragmento 2; (3) fragmento 3 (hph); (4) fragmento 4; (5) vetor pUC18a linearizado. Gel corado com brometo de etídeo.

Após a montagem do cassette pelo método de Gibson, o produto da reação, um plasmídeo circular foi utilizado como amostra para transformar células de *E. coli*. Em seguida, a cultura foi plaqueada em meio seletivo e nove colônias foram isoladas. A partir dessas nove, foi realizada PCR de colônia para verificar a amplificação do cassette. Então, foram selecionadas quatro colônias, cujo DNA plasmidial foi empregado como amostra para uma série de reações de PCR, para verificar a presença de cada fragmento do cassette (**Figura 11**). Uma vez feita essa confirmação, um dos plasmídeos foi encaminhado para o sequenciamento e usado como amostra para as etapas seguintes.

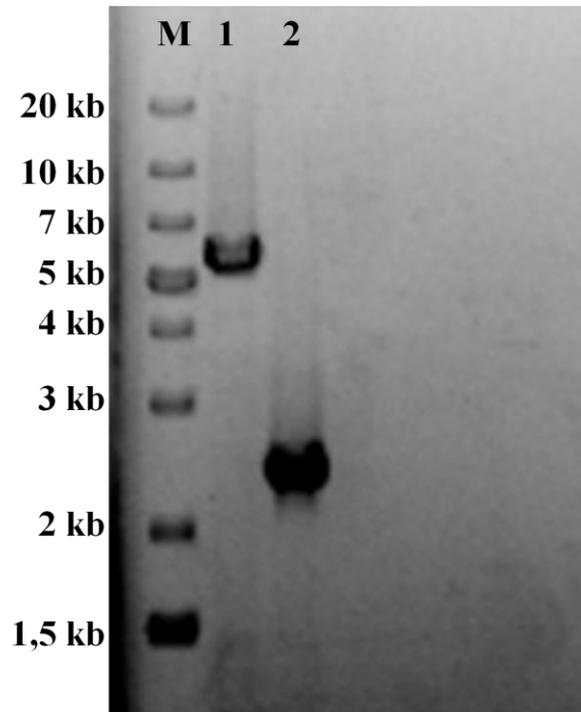
**Figura 11** – Amplificação dos diferentes fragmentos que compõem o cassette, a partir de plasmídeos extraídos das colônias de *E. coli* transformadas com o produto da reação isotérmica de Gibson.



Legenda: (M) Marcador de massa molecular; (F 1) amplificação do fragmento 1; (F 2) fragmento 2; (F 3) fragmento 3 (hph); (F 4) fragmento 4; (pUC) vetor pUC18a linearizado. Gel corado com brometo de etídeo.

Antes das etapas de transformação, o cassette foi amplificado por PCR. Uma das estratégias foi utilizar o cassette com marcador dividido (*split marker*), amplificando-se os fragmentos 5' e 3'. Os produtos de PCR foram aplicados em um gel de agarose e submetidos à eletroforese, como apresentado na **Figura 12**. As bandas foram coerentes com seus respectivos tamanhos esperados: 5682 pb para o fragmento 5' e 2391 pb para o fragmento 3'.

**Figura 12.** Visualização dos produtos de PCR para amplificação dos fragmentos do cassette marcador dividido (*split marker*).

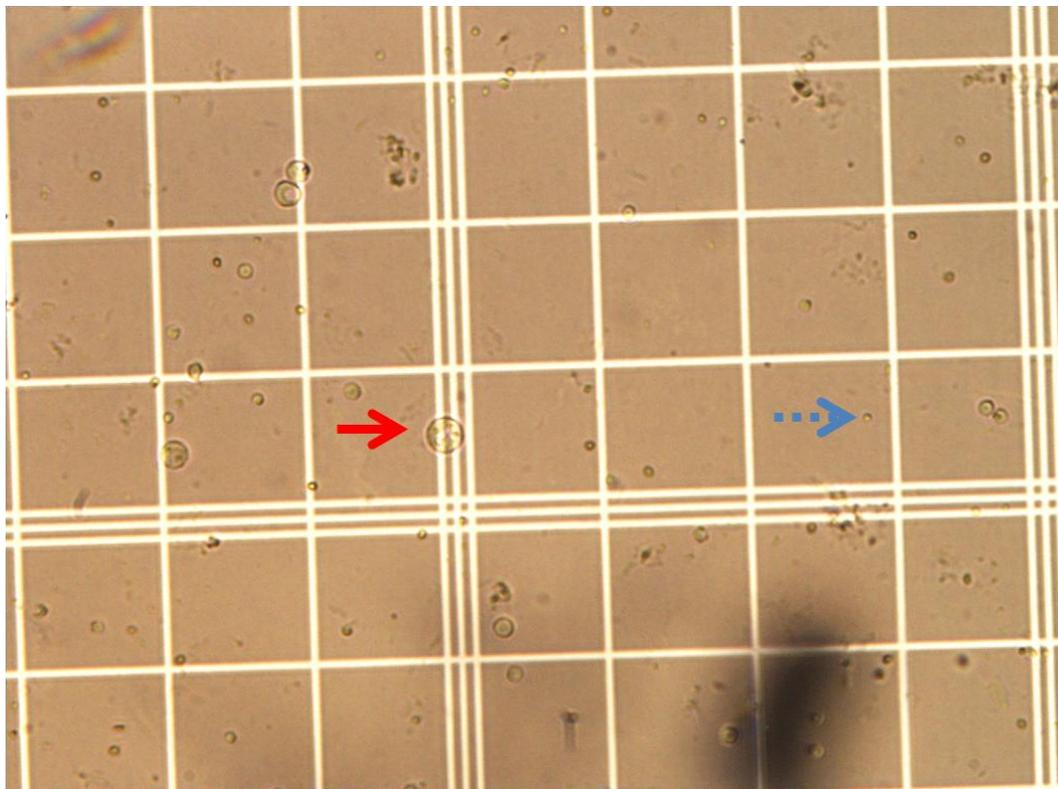


Legenda: (M) marcador para referência do tamanho das bandas de DNA; (1) fragmento 5'; (2) fragmento 3'. Os números à esquerda da figura correspondem ao tamanho das bandas do marcador. O gel foi corado com brometo de etídio.

### 5.2.3 Transformação do fungo

Uma vez que o cassette para recombinação homóloga foi obtido, foram realizadas algumas tentativas de transformação do fungo. Os métodos de transformação empregados foram a eletroporação de conídios germinados e a técnica de transformação de protoplastos mediada por PEG (**Figura 13**). Além disso, a amostra de DNA utilizada foi de três formas diferentes: produto de PCR do cassette; plasmídeo circular, em que o cassette foi clonado no vetor pUC18a; e cassette do tipo marcador dividido (*split marker*).

**Figura 13** – Visualização de suspensão de protoplastos em microscópio óptico.



Legenda: a seta contínua (vermelha) indica o protoplasto, enquanto a seta tracejada (azul), o esporo.

Ao longo do processo de transformação, foram isoladas centenas de colônias capazes de crescer em meio seletivo (com antibiótico higromicina) e foi realizada a extração de DNA de dezenas delas. A partir dessas amostras, reações de PCR foram feitas para tentar detectar a ocorrência da integração do cassette ao sítio desejado no genoma do fungo.

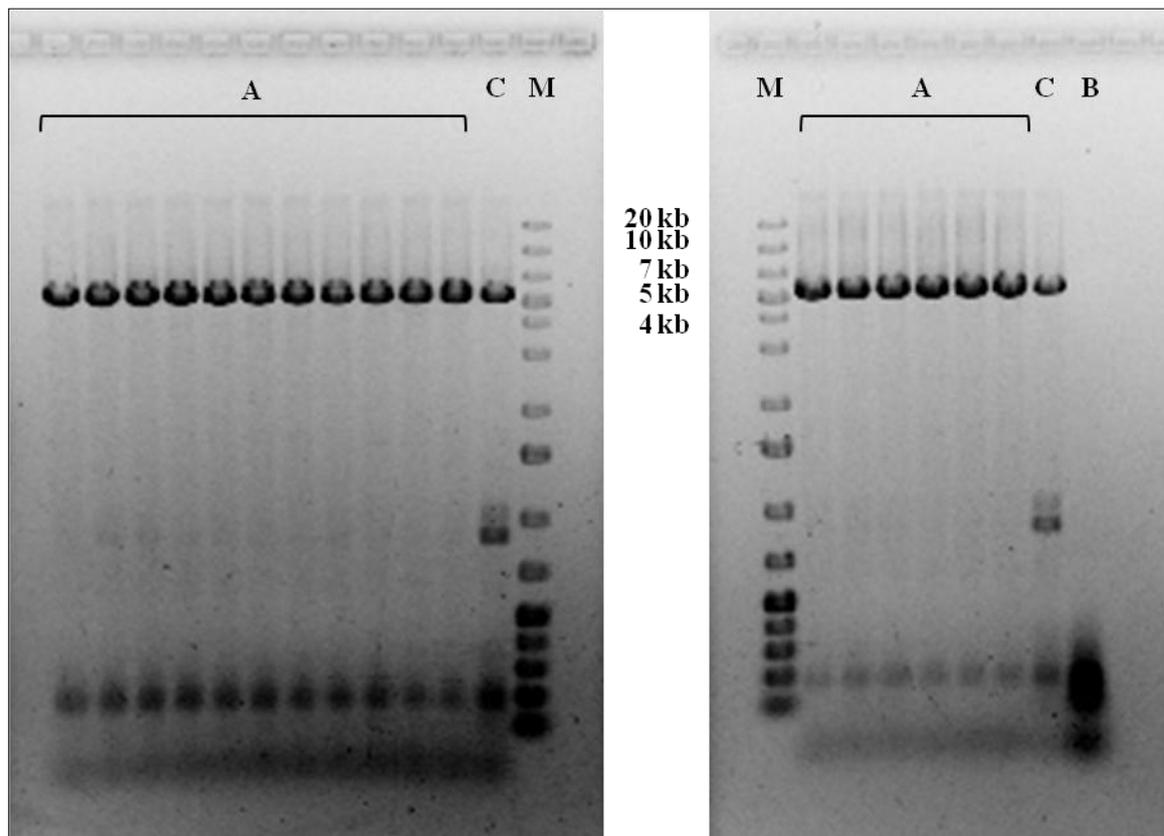
Vale ressaltar que, ao se utilizar o cassette *split marker* como amostra de DNA para a transformação, apenas uma colônia foi capaz de manter-se em meio seletivo (com higromicina). Quando o cassette inteiro (produto de PCR) ou o plasmídeo foram empregados,

muitas colônias foram resistentes ao antibiótico, em repicagens sucessivas. Com relação ao método de transformação, a eletroporação de conídios germinados rendeu menos colônias, comparado a PEG-protoplasto, porém uma maior porcentagem delas foi capaz de resistir à seleção, ao longo do processo. A eletroporação de protoplastos não possibilitou o crescimento de colônia alguma em meio seletivo.

#### 5.2.4 Confirmação da recombinação homóloga do cassette

Ao longo das várias estratégias de transformação do fungo, foram isoladas diversas colônias em meio seletivo (higromicina) e foi realizada a extração de DNA das mesmas. Uma das formas utilizadas para a confirmação da recombinação homóloga do cassette, no sítio desejado, foi por meio de reação de PCR, empregando-se um par de primers externos ao cassette (*cella\_genof* e *cella\_genor*). Os produtos das reações utilizando tais primers foram analisados por eletroforese em gel de agarose, como pode ser visto na **Figura 14**.

**Figura 14** – Visualização dos produtos de PCR para confirmação da integração do cassette ao sítio desejado no genoma do fungo, com primers '*cella\_genof*' e '*cella\_genor*'.



Legenda: (M) marcador para referência do tamanho das bandas de DNA; (A) amostras de diferentes colônias isoladas após a transformação do fungo; (B) controle da reação de PCR sem amostra de DNA; (C) produto da reação contendo o DNA do fungo selvagem como controle. Os números no centro da figura correspondem ao tamanho das bandas do marcador. O gel foi corado com brometo de etídio.

O amplicon esperado seria de 7678 pb, caso a recombinação acontecesse, ou de 5524 pb, caso não. Este último corresponde também ao resultado esperado para a amostra

contendo o DNA do fungo selvagem. Como pode ser visto na **Figura 14**, as bandas amplificadas referentes aos possíveis transformantes (A) apresentaram o mesmo tamanho daquela correspondente ao fungo selvagem (C).

Além disso, foram realizadas reações de PCR com os primers 'hph\_meioF', o qual se anela no gene do marcador de seleção, e 'cella\_genor', o mesmo descrito anteriormente. O tamanho esperado para o amplicon gerado a partir desse par de iniciadores era de 2174 pb. Porém, em nenhuma amostra, a partir das colônias isoladas ao longo das transformações, detectou-se a amplificação, com o emprego desses oligonucleotídeos. Dessa forma, não foi possível obter um fungo transformado, em que houve a integração do cassette no sítio de interesse, ou seja, no gene *cella*.

Possivelmente, as colônias que se mostraram resistentes ao antibiótico integraram o cassette em regiões aleatórias do genoma, incorporando o gene marcador de seleção. Deste modo, é necessário otimizar a metodologia da transformação, para o *T. harzianum*, e utilizar outras técnicas, como a de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, foi avaliada a influência de diferentes fontes de carbono sobre a produção de enzimas e sobre a expressão de genes associados à decomposição da biomassa vegetal, pelo fungo *Trichoderma harzianum* P49P11.

Verificou-se que substratos celulósicos, como Celufloc e BHD, foram os que possibilitaram os maiores níveis de expressão e de atividades enzimáticas. Nesse contexto, o regulador positivo XYR1 foi confirmado como um dos principais atuantes, de maneira que sua expressão, além de ocorrer em altos níveis, comparado aos demais reguladores, apresentou uma elevada correlação com a dos genes de enzimas hidrolíticas.

Os resultados obtidos nessa etapa guiaram a escolha de uma estratégia para o melhoramento genético do fungo. Assim, foi construído um cassette, visando à substituição de um aminoácido na  $\beta$ -glucosidase Cel1A (BGLII). No entanto, não foi possível obter uma linhagem mutante. Em trabalhos futuros, espera-se que, com o emprego de novas técnicas de transformação, como por exemplo, a mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, seja possível atingir esse objetivo. E, uma vez confirmado o efeito positivo dessa mutação, a cepa obtida poderá servir de ponto de partida para que mais modificações sejam feitas, como a superexpressão de *xyr1* e/ou de outros reguladores positivos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENOLIEL, B.; TORRES, F.A.G.; MORAES, L.M.P. A novel promising *Trichoderma harzianum* strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura. **SpringerPlus**, v. 2, 2013.

BISCHOF, R. et al. Comparative analysis of the *Trichoderma reesei* transcriptome during growth on the cellulase inducing substrates wheat straw and lactose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1-17, 2013.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, C. M. P. et al. Addition of feruloyl esterase and xylanase produced on-site improves sugarcane bagasse hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 316-324, 2014.

BRINK, J. et al. Synergistic effect of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* enzyme sets on the saccharification of wheat straw and sugarcane bagasse. **Biotechnology Journal**, v. 9, p. 1329-1338, 2014.

BURTON, R. A.; GIDLEY, M. J.; FINCHER, G. B. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. **Nature Chemical Biology**, v. 6, p. 724-732, 2010.

CARVALHO, D.M. et al. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 118-126, 2015.

CARVALHO, D.M. et al. Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 223-234, 2017.

CHANG, V.S; HOLTZAPPLE, M.T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, p. 5-37, 2000.

DELABONA, P. S. et al. Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 500-507, 2013.

DELABONA, P. S. et al. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 517-521, 2012b.

DELABONA, P. S. et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012a.

DELABONA, P. S. et al. The relation between *xyr1* overexpression in *Trichoderma harzianum* and sugarcane bagasse saccharification performance. **Journal of Biotechnology**, v. 246, p. 24-32, 2017.

DERNTL, C. et al. Mutation of the Xylanase regulator 1 causes a glucose blind hydrolase expressing phenotype in industrially used *Trichoderma* strains. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1-11, 2013.

DOS SANTOS CASTRO, L. et al. Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, 2014.

DRUZHININA, I. S. et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 749-759, 2011.

FARKAS, V. et al. Induction of cellulase in *Trichoderma reesei* grown on lactose. **Acta Biotechnologica**, v. 7, p. 425-429, 1987.

FOUST, T. D. et al. The biorefinery. In: HIMMEL, M. E. **Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy**. Blackwell Publishing, 2008.

GELAIN, L.; PRADELLA, J. G. C.; COSTA, A. C. Mathematical modeling of enzyme production using *Trichoderma harzianum* P49P11 and sugarcane bagasse as carbon source. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 101-107, 2015.

GENEROSO, W.C. et al. Recombinant expression and characterization of an endoglucanase III (cel12a) from *Trichoderma harzianum* (Hypocreaceae) in the yeast *Pichia pastoris*. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 1544-1557, 2012.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOLDMAN, G. H. et al. Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse. **Current Genetic**, v. 17, p. 169-174, 1990.

HÄKKINEN, M. et al. Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 1-21, 2014.

HAMES, B. D. **Gel electrophoresis of protein: a practical approach**. 3.ed. Oxford: Oxford University Press, 1998. 372 p.

HARRIS, P. V. et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, p. 3305-3316, 2010.

HELDT, H. W. **Plant biochemistry**. 3.ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. 630 p.

HEROLD, S. et al. Xylanase gene transcription in *Trichoderma reesei* is triggered by different inducers representing different hemicellulosic pentose polymers. **Eukaryotic Cell**, v. 12, p. 390-398, 2013.

HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 45, p. 1-12, 2012.

HORTA, M. A. C. et al. Transcriptome profile of *Trichoderma harzianum* IOC- 3844 induced by sugarcane bagasse. **PLOS ONE**, v. 9, p.1-17, 2014.

ILMÉN, M. et al. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 4, p.1298-1306, 1997.

ILMÉN, M.; THRANE, C.; PENTTILÄ, M. The glucose repressor gene cre1 of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant forms. *Mol. Gen. Genet.*, v. 251, p. 451-460, 1996.

KOLLING, D. **Ampliação de escala do processo de produção de enzimas lignocelulolíticas por fungo filamentoso em fermentação submersa**. 2017. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

KUBICEK, C.P. et al. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnology for Biofuels**, v.2, p 1-14, 2009.

KUMAR, R. et al. Cellulose-hemicellulose interactions at elevated temperatures increase cellulose recalcitrance to biological conversion. **Green Chemistry**, v. 20, p. 921-934, 2018.

LICHIUS, A. et al. Nucleo-cytoplasmic shuttling dynamics of the transcriptional regulators XYR1 and CRE1 under conditions of cellulase and xylanase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Molecular Microbiology**, v. 94, p. 1162-1178, 2014.

LIU, T. et al. Improved heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* by cellobiohydrolase I gene (*cbh1*) promoter optimization. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 40, p. 158-165, 2008.

MACH-AIGNER, A. R. et al. Transcriptional regulation of *xyr1*, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 6554-6562, 2008.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MME - Ministério de Minas e Energia. **Resenha Energética Brasileira: ano base 2017**. Brasília, MME, 2018. 31p.

MOHANRAM, S. et al. Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. **Sustainable Chemical Processes**, v. 1, p. 1-12, 2013.

NAKARI-SETÄLÄ, T. et al. Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4853-4860, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

NØDVIG, C. S. et al. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.

PEREIRA, B. M. P. et al. Cellulase on-site production from sugar cane bagasse using *Penicillium echinulatum*. **BioEnergy Research**, v. 6, p. 1052-1062, 2013.

PORTNOY, T. et al. The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. **BMC Genomics**, v. 10, p. 262-271, 2011.

ROCHA, G. J. M. et al. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 274-279, 2012.

SALOHEIMO, M. et al. Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei*  $\beta$ -glucosidase BGLII (CellA). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4546-4553, 2002.

SANGER, F; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3.ed. New York: CSH Laboratory Press, 2001. 2100p.

SANTUCCI, B. S. et al. Autohydrolysis of hemicelluloses from sugarcane bagasse during hydrothermal pretreatment: a kinetic assessment. **BioEnergy Research**, v. 8, p. 1778-1787, 2015.

SCHUSTER, A. et al. A versatile toolkit for high throughput functional genomics with *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, 2012.

SEGAL, L. et al. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, p. 786-794, 1959.

SEIBOTH, B. et al. Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. *Fungal Biology Reviews*, v. 21, p. 42-48, 2007.

SEIBOTH, B. et al. Role of the bga1-encoded extracellular b-galactosidase of *Hypocrea jecorina* in cellulase induction by lactose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 851-857, 2005.

SEIBOTH, B. et al. The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulase induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose. **Molecular Microbiology**, v. 51, p. 1015-1025, 2004.

SEIBOTH, B. et al. The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Molecular Microbiology**, v. 84, p. 1150–1164, 2012.

SEYIS, I.; AKSOZ, N. Xylanase production from *Trichoderma harzianum* 1073 D3 with alternative carbon and nitrogen sources. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, p. 37-40, 2005.

SHIDA, Y. et al. The impact of a single-nucleotide mutation of *bgl2* on cellulase induction in a *Trichoderma reesei* mutant. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, 2015.

STEIGER, M. G.; MACH, R. L.; MACH-AIGNER, A. R. An accurate normalization strategy for RT-qPCR in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Journal of Biotechnology**, v. 145, p. 30-37, 2010.

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 433-443, jun. 2008.

SLUITER, J. B. et al. Evaluation of Brazilian sugarcane bagasse characterization: an interlaboratory comparison study. **Journal of AOAC International**, v. 99, p. 579-585, 2016.

SWEENEY, M. D.; XU, F. Biomass converting enzymes as industrial biocatalysts for fuels and chemicals: recent developments. **Catalysts**, v. 2, p. 244-263, 2012.

TAMIETTI, M. S. et al. Enhancement of *Trichoderma harzianum* CFAM-422 for cellulase and hemicellulase production by deletion of the carbon catabolite repressor gene *cre1*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 21.; SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 12., Aracaju, 2017. Anais... [S.l.]: Galoá, 2017. p. 1-4.

THE WORLD BANK. **Fossil fuel energy consumption**. Disponível em: <<https://data.worldbank.org/indicator/EG.USE.COMM.FO.ZS?end=2015&start=1960>>. Acesso em: 2 de maio de 2018.

VAUTARD-MEY, G.; COTTON, P.; FÈVRE, M. Expression and compartmentation of the glucose repressor CRE1 from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 266, p. 252-259, 1999.

WALDRON, K.W.; FAULDS, C.B. Cell wall polysaccharides: composition and structure. In: KAMERLING, J.P. **Comprehensive glycoscience: from chemistry to system biology**. Oxford: Elsevier, 2007.

WANG, S. et al. Enhancing cellulase production in *Trichoderma reesei* RUT C30 through combined manipulation of activating and repressing genes. **Ind Microbiol Biotechnol**, v. 40, p. 633-641, 2013.

WANG, Y. et al. Agrobacterium-mediated gene disruption using split-marker in *Grosmannia clavigera*, a mountain pine beetle associated pathogen. **Current Genetics**, v. 56, p. 297-307, 2010.

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 50, p. 3-15, 1994.

XU, J. et al. Intracellular  $\beta$ -Glucosidases CEL1a and CEL1b are essential for cellulase induction on lactose in *Trichoderma reesei*. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 8, p. 1001-1013, 2014.

YANG, B. et al. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v. 2, p. 421-450, 2011.

YAO, G. et al. Redesigning the regulatory pathway to enhance cellulase production in *Penicillium oxalicum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, 2015.

ZHANG, Y. H. P.; HONG, J.; YE, X. Cellulase assays. **Methods in Molecular Biology**, v. 581, p. 213-231, 2009.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefinery**, v. 6, p. 465-482, 2012.

ZNAMEROSKI, E. A. et al. Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellodextrins. **PNAS**, v. 109, p. 6012-6017, 2012.