

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE**  
**CAMPUS CASCAVEL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**

**DELEÇÃO PARCIAL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO ACE1 PARA OTIMIZAÇÃO  
DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Trichoderma reesei* RUT-C30**

**DÉBORA NAKADOMARI DUDEK**

**CASCAVEL**

**2017**

**DÉBORA NAKADOMARI DUDEK**

**DELEÇÃO PARCIAL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO ACE1 PARA OTIMIZAÇÃO  
DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Trichoderma reesei* RUT-C30**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações em saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller

**CASCADEL**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

D892d     Dudek, Débora Nakadomari  
Deleção parcial do fator de transcrição ACE1 para otimização da produção de celulasas por *Trichoderma reesei* RUT-C30./ Débora Nakadomari Dudek. — Cascavel, 2017.  
56 f.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller

Dissertação (Mestrado ) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

1. Fungo. 2. Cassete de deleção. 3. Transformação. 4. Material lignocelulósico. 5. Bioetanol. I. Maller, Alexandre. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.

CDD 21.ed. 615.1  
CIP – NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Beijo – CRB 9ª/965

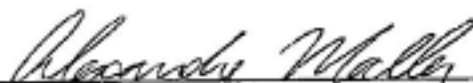
**DÉBORA NAKADOMARI DUDEK**

**DELEÇÃO PARCIAL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO ACE1 PARA OTIMIZAÇÃO  
DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Trichoderma reesei* RUT-C30**

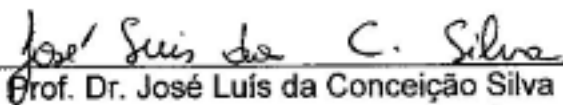
Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações em saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller

**BANCA EXAMINADORA:**



Prof. Dr. Alexandre Maller  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
UNIOESTE  
Orientador



Prof. Dr. José Luís da Conceição Silva  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
UNIOESTE



Profa. Dra. Ana Cláudia Paiva Alegre Maller  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
UNIOESTE

**CASCADEL**

**2017**

## BIOGRAFIA RESUMIDA

Débora Nakadomari Dudek, nascida em 24 de julho de 1987, na cidade de Londrina no Paraná. É formada em Farmácia pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE desde 2009. Fez especialização em análises clínicas e toxicológicas pela Faculdade Assis Gurgacz – FAG (2012) e atualmente é mestranda pelo programa de pós graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas pela UNIOESTE na linha de pesquisa intitulada “Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações em saúde”. Em suas experiências profissionais trabalhou como *trainee* de farmácia na empresa Palagas Comércio de Medicamentos LTDA no ano de 2010. No período de 2011 a 2015 atuou como farmacêutica analista clínica no Laboratório Parzianello, desempenhando as funções de gestora do sistema da qualidade e supervisora analista laboratorial nesta empresa. Retornou a trabalhar no Laboratório Parzianello no ano de 2016 desempenhando as mesmas funções anteriores. Desde 2013 trabalha como professora na Universidade Paranaense – UNIPAR, ministrando aulas para o curso de Biomedicina, Enfermagem e Psicologia. No ano de 2014 foi homenageada como professora nome de turma dos formandos de Biomedicina e foi paraninfa da turma de Biomedicina do ano de 2015.

*“Seu trabalho vai preencher uma parte grande da sua vida, e a única maneira de ficar realmente satisfeito é fazer o que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz. ”*

(Steve Jobs)

Dedico esta dissertação aos meus pais e familiares, que tanto apoiaram e incentivaram o meu crescimento profissional.

## **AGRADECIMENTOS**

No trabalho como na vida, é em equipe que se constroem os maiores impérios. Sem a colaboração de diversas pessoas, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta conquista, nada seria possível. Portanto, agradeço.

DEUS, não apenas por este momento, mas pela sua presença incondicional e plena em todos os dias de minha vida, principalmente nos momentos de dificuldade.

PAI, pelo apoio que me proporciona e o seu exemplo de coragem no dia a dia.

MÃE, pelo carinho com que enxugou minhas lágrimas, mas sempre me estimulou a continuar. E por sempre orar por mim.

FAMÍLIA, pelo afeto e incentivo nos dias mais difíceis.

PRIMOS e PRIMAS, por substituírem integralmente o amor de irmãos.

AMIGOS e AMIGAS, por partilharem lágrimas, pelo companheirismo e quando necessário, pela cumplicidade.

AMIGOS e AMIGAS do LABORATÓRIO de BIOQUÍMICA, por todos os momentos compartilhados e auxílio durante os experimentos.

CARLA, JULIANA e SANDRA, sem suas sinceras amizades, auxílio, apoio e alegria os obstáculos seriam mais árduos.

LETÍCIA e INDIANARA, por realizarem comigo este trabalho.

MESTRES, que com compreensão e paciência, souberam transmitir sua sabedoria.

MESTRES do LABORATÓRIO de BIOQUÍMICA, pelo auxílio durante os experimentos e transmissão de seus conhecimentos.

ALEXANDRE, meu orientador, pelo conhecimento passado, paciência, encorajamento constante e amizade.

BANCA EXAMINADORA, pela disponibilidade e atenção.

UNIOESTE, CNPq, CAPES e FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA, pelos recursos fornecidos.



# DELEÇÃO PARCIAL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO ACE1 PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Trichoderma reesei* RUT-C30

## RESUMO

O bioetanol de segunda geração emprega materiais lignocelulósicos na sua elaboração. Uma das etapas para a degradação destes materiais utiliza celulases produzidas por microrganismos. Dentre estes, o fungo *Trichoderma reesei* é um dos principais produtores de celulases utilizadas na indústria. A modificação genética deste fungo pode levar à otimização da produção de suas enzimas, diminuindo o custo e melhorando a fabricação de biocombustíveis. Desta forma, o objetivo do trabalho foi deletar a região dos motivos dedos de zinco no gene que codifica o fator de transcrição repressor de celulase ACE1 do fungo *T. reesei* RUT-C30, buscando a otimização na produção enzimática. Na construção dos primers para amplificação das regiões 5' e 3' de *ace1* e do marcador de seleção *hph*, que confere resistência à higromicina B, utilizou-se o site *Joint Genome Institute* – JGI e o programa BioEdit®. A construção do cassete de deleção com o vetor pRS426 foi mediado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* SC9721. Posteriormente, a construção do cassete, a transformação de *T. reesei* RUT-C30 foi realizada através de protoplasto e a confirmação desta transformação foi efetuada por amplificação de parte do *hph* utilizando os primers *hphNestF* e *hphNestR*. Após a transformação, com os mutantes obtidos, a atividade de endoglucanase, exoglucanase e celulase total foi quantificada com os substratos carboximetilcelulose (CMC), celulose microcristalina (Avicel®) e papel de filtro Whatman (PF), respectivamente. A produção enzimática e a eficiência na hidrólise da biomassa foram realizadas comparando-se a linhagem RUT-C30 aos mutantes. Após a construção do cassete de deleção, a amplificação de um fragmento de 3501 pb confirmou a formação do cassete. E, posteriormente à transformação da linhagem RUT-C30, o amplificado de 989 pb foi observado, confirmando a deleção da sequência alvo em 3 mutantes. Com o ensaio de atividade de celulases, as 3 linhagens transformadas mostraram maior produção enzimática quando comparadas à linhagem RUT-C30. Nessa comparação, foi observada diferença estatística significativa da linhagem RUT-C30 $\Delta$ *ace1*-1 com Avicel® e PF ( $p < 0,001$ ), da linhagem RUT-C30 $\Delta$ *ace1*-2 com CMC ( $p < 0,01$ ) e PF ( $p < 0,05$ ) e da linhagem RUT-C30 $\Delta$ *ace1*-3 com Avicel ( $p < 0,001$ ), CMC e PF ( $p < 0,01$ ). Os mutantes também apresentaram maior eficiência na hidrólise da biomassa, com aumento na liberação de açúcar entre 21 e 42%. Com base nos dados deste estudo, os mutantes apresentam-se promissores para a produção mais eficiente e viável de etanol. Apesar disso, testes adicionais devem ser realizados para melhor entendimento da aplicabilidade destes fungos a nível industrial.

**PALAVRAS CHAVE:** Fungo, cassete de deleção, transformação, material lignocelulósico, bioetanol.

# PARTIAL DELETION OF ACE1 TRANSCRIPTION FACTOR FOR OPTIMIZATION *Trichoderma reesei* RUT-C30 CELLULASE PRODUCTION

## ABSTRACT

Second generation bioethanol employs lignocellulosic materials in its preparation. One of the steps for these materials degradation utilizes cellulases produced by microorganisms. Among these, *Trichoderma reesei* fungus is one of the main cellulases producers used in industry. This fungus genetic modification can lead to enzymes production optimization, reducing cost and improving biofuels manufacture. Thus, the present work objective was delete the sequence encoding zinc fingers motifs of cellulase ACE1 repressor transcription factor from *T. reesei* RUT-C30 fungus, seeking enzymatic production optimization. In primers construction for amplification ACE1 regions 5' and 3' and the *hph* selection marker, which confers hygromycin B resistance, Joint Genome Institute - JGI site and the BioEdit® program were used. The deletion cassette with pRS426 vector construction was mediated by *Saccharomyces cerevisiae* SC9721 yeast. After the cassette construction, *T. reesei* RUT-C30 transformation was made by protoplast and this transformation confirmation was effected by part of the *hph* using hphNestF and hphNestR amplification primers. After transformation with mutants obtained, endoglucanase, exoglucanase and total cellulase activity was quantified with carboxymethylcellulose substrates (CMC), microcrystalline cellulose (Avicel®) and Whatman paper filter (PF), respectively. The enzymatic production and biomass hydrolysis efficiency were performed comparing RUT-C30 strain for mutants. After deletion cassette construction, a 3501 bp fragment amplification confirmed the cassette formation. Posteriorly, RUT-C30 strain transformation, a 989 bp amplification was observed, confirming the 3 mutants target sequence deletion. With cellulase activity assay, 3 transformed strain showed higher enzymatic production when compared to RUT-C30 strain. In this comparison, a significant statistical difference was observed of RUT-C30 $\Delta$ ace1-1 strain with Avicel® and PF ( $p < 0.001$ ) CMC ( $p < 0.01$ ), RUT-C30 $\Delta$ ace1-2 strain with CMC ( $p < 0,01$ ) e PF ( $p < 0,05$ ), and RUT-C30 $\Delta$ ace1-3 strain with Avicel ( $p < 0,001$ ), CMC and PF ( $p < 0,01$ ). The mutants also showed greater efficiency in biomass hydrolysis, with release sugar increase between 21 and 42%. Based on this study, mutants are promising for most efficient and viable ethanol production. Nevertheless, additional tests must be carried out to better understand these fungi applicability in the industrial level.

**KEY WORDS:** Fungus, deletion cassette, transformation, lignocellulosic material, bioethanol.

## SUMÁRIO

<b>PÁGINA DE APROVAÇÃO .....</b>	<b>i</b>
<b>BIOGRAFIA RESUMIDA .....</b>	<b>ii</b>
<b>CITAÇÃO .....</b>	<b>iii</b>
<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>09</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	
<b>2.1. Objetivo geral .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>11</b>
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	
<b>3.1 Biocombustível .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1.1 Bioetanol de segunda geração .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 <i>Trichoderma reesei</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.1 <i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30 .....</b>	<b>18</b>
<b>3.3 Transformação .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3.1 Dedos de zinco .....</b>	<b>20</b>
<b>4 ARTIGO – Deleção parcial do fator de transcrição ACE1 para otimização da produção de celulasas por <i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30 –Revista Biotechnology and Bioengineering – A1 em Farmácia .....</b>	<b>22</b>
<b>5 REFERÊNCIAS</b>	
<b>5.1 Fundamentação teórica .....</b>	<b>45</b>
<b>5.2 Artigo .....</b>	<b>49</b>

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Componentes da parede celular das plantas	.....	14
Figura 2 - Estrutura da celulose	.....	14
Figura 3 - Esquema da hidrólise enzimática da lignocelulose	.....	17

## 1 INTRODUÇÃO

A maioria das fontes para produção de combustíveis e eletricidade utilizados mundialmente é proveniente de recursos fósseis. Com a demanda energética crescendo a cada dia, a previsão de esgotamento desses recursos não restauráveis e o dano ambiental causado por eles, as fontes renováveis de combustíveis têm sido apontadas como uma opção para esta utilização acentuada. O bioetanol, ou seja, o etanol obtido a partir de resíduos de biomassa ou fontes reutilizáveis, representa uma destas alternativas.

A segunda geração de combustível é produzida a partir de materiais lignocelulósicos, que estão presentes no ambiente em abundância e possuem ótimo potencial de produção. Uma das etapas para a fabricação do bioetanol de segunda geração envolve a utilização de celulasas produzidas por diversos microrganismos, dentre eles, o fungo *Trichoderma* sp. Entretanto, a necessidade da utilização de celulasas para a elaboração deste combustível contribui significativamente com o custo final do produto. Com base nesta problemática, a otimização na produção de enzimas para diminuição no custo deste biocombustível está em constante pesquisa.

O fungo *Trichoderma reesei* é ótimo produtor de celulasas e algumas cepas mutantes, como o fungo transformado RUT-C30, já são mais eficientes na produção de celulasas do que o tipo selvagem. Esta linhagem do fungo apresenta um gene mutado que expressa o fator de transcrição CRE truncado, que é um regulador negativo para celulase. Visando isto, buscam-se constantemente diversas formas de melhoramento para a produção de celulasas através da transformação destes microrganismos. Com a utilização de métodos de manipulação genética, é possível modificar o microrganismo da maneira desejada, para a obtenção de mutantes adequados para as finalidades, como mutantes capazes de produzir maior quantidade de enzimas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Deletar a sequência que codifica o motivo dedo de zinco do fator de transcrição repressor de celulase ACE1 do fungo *T. reesei* linhagem RUT-C30, obtendo um transformante otimizado para a produção de celulase.

## 2.2 Objetivos específicos

- Construção do cassete de deleção para *ace1* mediado por levedura;
- Transformação da linhagem *T. reesei* RUT-C30;
- Confirmação da transformação no mutante;
- Análise da atividade enzimática para celulase dos mutantes;
- Hidrólise enzimática e dosagem de açúcar redutor dos mutantes.

## 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 3.1 Biocombustível

A economia mundial é altamente dependente de várias fontes fósseis, como petróleo, carvão, gás natural, etc. Esses recursos são utilizados para a produção de combustível, eletricidade, entre outros (SARKAR et al., 2012). A energia sustenta a civilização e tem sido responsável pelas mudanças econômicas radicais que transformaram o mundo ao longo dos últimos dois séculos e meio (WORLD ECONOMIC FORUM, 2013).

Devido ao aumento da população, a demanda energética está crescendo no mundo e as principais fontes de energia fósseis são não renováveis (GUPTA; VERMA, 2015). Esse consumo excessivo de combustíveis fósseis, principalmente em grandes centros urbanos, resultou na produção de níveis elevados de poluição durante as últimas décadas. Assim, o nível de gases do efeito estufa na atmosfera da Terra aumentou drasticamente, conduzindo a muitos efeitos negativos, como alterações climáticas, recuo de geleiras, aumento do nível do mar, perda da biodiversidade, entre outros (SARKAR et al., 2012; SAVALIYA; DHORAJIYA; DHOLAKIYA, 2015).

Uma vez que existe tendência ao esgotamento das fontes de combustíveis não renováveis, além da presença da emissão de gases, aquecimento global e a possibilidade do aumento de preços e flutuações inesperadas, reforça-se o interesse em alternativas renováveis e sustentáveis (MAGRO et al., 2016; MOOD et al., 2013). A bioenergia pode ser definida como renovável porque é obtida de materiais biológicos que podem ser cultivados repetidamente em sistema sustentável. Ela está associada aos processos fotossintéticos recentes, em oposição aos combustíveis fósseis, que são derivados de processos fotossintéticos de organismos que viveram no passado geológico (SOUZA et al., 2014). Os países veem os biocombustíveis como alternativa ou substituto para os produtos petrolíferos (GONELA; ZHANG, 2014). Dessa forma, os combustíveis renováveis também surgiram como importante estratégia sustentável

de energia e são considerados relevantes para a limitação de emissão de gases do efeito estufa, melhora da qualidade do ar e para encontrar novas fontes de energia (SAVALIYA; DHORAJIYA; DHOLAKIYA, 2015).

Dos combustíveis utilizados hoje, surgiram os de primeira, segunda e terceira geração. Os de primeira geração requerem um processo simples de fabricação, sendo produzidos a partir de açúcares, grãos e sementes. O etanol é extraído pela fermentação do açúcar de plantas cultivadas e amido contido em grãos de milho (60% extraído da cana de açúcar e 40% de outras culturas) e o biodiesel produzido a partir de plantas oleaginosas, como grãos de soja e mamona (GUPTA; VERMA, 2015; MAGRO et al., 2016). Dentre os de primeira geração, tem-se o etanol, biodiesel, biogás e biobutanol (GOMES et al., 2015; SARKAR et al., 2012).

Nos Estados Unidos, o etanol é primariamente produzido de matérias-primas do milho, enquanto no Brasil é principalmente produzido a partir do caldo de cana e do melaço. Juntos, esses dois países são responsáveis por 89% da produção global de etanol (LIMAYEM; RICKE, 2012). Como esses processos competem com fontes alimentares de consumo humano e ocupam terras agrícolas, os combustíveis de segunda e terceira geração estão em evolução (KLEIN et al., 2016). O etanol obtido a partir de resíduos da biomassa ou fontes renováveis é chamado de bioetanol e pode ser utilizado como combustível, matéria-prima química e solvente em diversas indústrias. Durante as últimas décadas, a produção de etanol a partir de biomassa recebeu maior atenção de todo o mundo (DOMINGUEZ-BOCANEGRA; TORRES-MUNOZ; LOPEZ, 2015).

Ao invés de milho nos Estados Unidos ou da cana de açúcar no Brasil, o etanol de segunda geração emprega materiais lignocelulósicos, que podem ser resíduos da planta usada na produção dos de primeira geração, culturas cultivadas com a destinação de produção de bioetanol, resíduos florestais, resíduos industriais ou resíduos sólidos (GOMES et al., 2015; IMAMOGLU; SUKAN, 2013). Essa segunda geração de etanol produzida a partir de materiais lignocelulósicos tem recebido maior atenção devido à abundância e imenso potencial para a conversão de açúcares em combustível. No entanto, existem obstáculos relevantes que precisam ser superados, tais como custo de produção, problemas de tecnologia e ambientais (RUIZ et al., 2012).

As algas formam uma biomassa para a produção de etanol de terceira geração, podendo ser utilizada na produção de bioenergia. Esses organismos crescem rapidamente, são livres de lignina e não são utilizados como alimento primário (JANG

et al., 2012). Apesar das vantagens, muitos desafios ainda impedem a produção de biocombustíveis com viabilidade comercial a partir destes organismos, como a seleção de espécies, desenvolvimento contínuo do sistema de produção, alcançando maior eficiência fotossintética, desenvolvimento de técnicas de cultivo para redução da evaporação e perdas de difusão de CO<sub>2</sub>, bem como a falta de dados para produção em larga escala (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Portanto, o etanol produzido a partir de materiais lignocelulósicos representa uma das principais vias para a elaboração da nova geração de biocombustíveis e estudos relacionados a sua produção estão em constante desenvolvimento.

### **3.1.1 Bioetanol de segunda geração**

O termo “biocombustíveis de segunda geração” se refere à produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (CHIARAMONT et al., 2012). Essa biomassa pode ser produzida a partir de materiais orgânicos, tais como palha, resíduos de madeira, resíduos agrícolas, madeira recuperada, serradura e madeira de baixo valor (DOMINGUEZ-BOCANEGRA; TORRES-MUNOZ; LOPEZ, 2015).

Contrariamente à primeira geração, o bioetanol emprega um substrato mais complexo, que não é facilmente acessível para a fermentação microbiana. Os materiais lignocelulósicos são compostos principalmente por celulose (40 – 60% do peso seco total), hemicelulose (20 – 40%), lignina (10 – 25%) e diversos materiais inorgânicos em quantidades variáveis (BAEYENS et al., 2015; GOMES et al., 2015; TAHERZADEH; KARIMI, 2007). A utilização dos componentes para conversão química e enzimática depende das várias frações da planta, bem como das diferentes fases de desenvolvimento e diferentes tipos de parede celular (BARAKAT; VRIES; ROUAU, 2013). A celulose é o principal componente da parede celular das plantas, juntamente com a hemicelulose e lignina (Figura 1). Ela consiste em longos polímeros de unidades de glicose com ligação  $\beta$  (1,4) (Figura 2). A celulose encontrada na parede celular da planta apresenta-se de forma cristalina, insolúvel em água, de grande extensão, e sua hidrólise conseqüentemente é um desafio para os saprófitas. Os microrganismos celulolíticos, bactérias e fungos filamentosos, produzem um conjunto de enzimas que hidrolisam sinergicamente a celulose cristalina em oligossacarídeos menores e finalmente em glicose (ILMÉN et al., 1997; MOOD et al., 2013). A hemicelulose, por outro lado, é menor (normalmente variando de centenas a milhares de unidades) e não é composta estritamente de cadeias lineares de glicose; pode-se encontrar, também, xilose, manose, galactose, ramnose e arabinose.



Diferentemente da celulose, a hemicelulose apresenta uma estrutura amorfa com frequente presença de ramificações, tornando-a possuidora de uma estrutura mais frágil e mais apropriada para a digestão. Finalmente, a lignina é um polímero composto por três compostos aromáticos principais: álcool p-cumaril, álcool coniferílico e álcool sinapílico (GOMES et al., 2015).

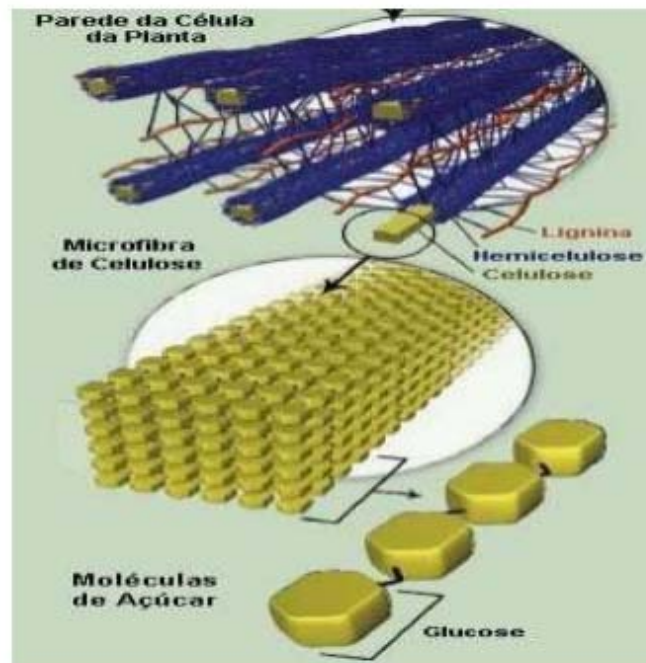


Figura 1 Componentes da parede celular vegetal (ARAÚJO JÚNIOR, 2014)

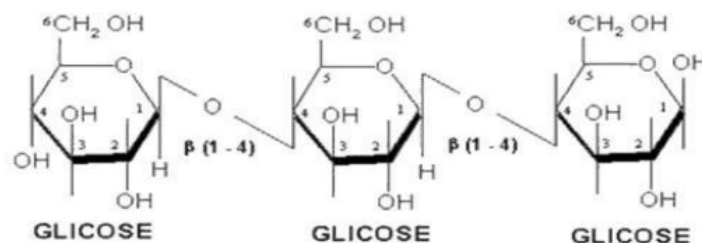


Figura 2 Estrutura da celulose (ARAÚJO JÚNIOR, 2014)

A lignocelulose é processada para a produção de bioetanol através de três grandes operações: pré-tratamento (para deslignificação, necessária para libertar celulose e hemicelulose antes da hidrólise), hidrólise da celulose e hemicelulose (para produzir açúcares fermentáveis, como a glicose, xilose, arabinose, galactose, manose) e a última etapa, que é a fermentação de açúcares redutores (RUIZ et al., 2012; SARKAR et al., 2012). O sucesso do etanol de segunda geração dependerá do desenvolvimento de tecnologias simples de pré-tratamento para diferentes biomassas lignocelulósicas como matéria-prima e na redução do custo enzimático, reforçando simultaneamente a eficiência da hidrólise da celulose (WI et al., 2015).

O pré-tratamento envolve deslignificação da matéria-prima para tornar a celulose mais acessível na etapa de hidrólise, usando tratamento físico, físico-químico, químico e biológico, como auto-hidrólise, hidrólise ácida, explosão extrema e solventes orgânicos (BAEYENS et al., 2015; GOMES et al., 2015; SAMBUSITI, MONLAU, BARAKAT, 2016). A segunda etapa (hidrólise enzimática) também é importante e tem sido feita por microrganismos eficientes, que possuem a habilidade de secretar enzimas celulolíticas. Essas enzimas estão envolvidas na hidrólise de celulose em glicose. Diversas espécies microbianas de *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermonospora*, *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Ruminococcus*, *Erwinia*, *Acetovibro*, *Microbispora*, *Streptomyces* são capazes de produzir enzimas celulolíticas. Muitos fungos como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Phanerochaete*, *Humicola*, *Schizophillum* sp. também têm sido reportadas como produtores de celulasas (GUPTA; VERMA, 2015). Essas enzimas contribuem significativamente com o custo final do bioetanol, tornando-se o segundo elemento mais caro do processo global, após a matéria-prima (GOMES et al., 2015).

Os processos de pré-tratamento e hidrólise são projetados para otimizar a terceira etapa, o processo de fermentação. Este caminho biológico natural depende das condições e da matéria-prima utilizada e requer a presença de microrganismos para fermentar açúcar em álcool, ácido lático ou outros produtos finais. As leveduras industriais, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, são utilizadas há milhares de anos na indústria de cervejaria e vinho. Essa levedura também tem sido utilizada para a produção de biocombustível com base em açúcar e milho na fermentação primária. Posteriormente ao pré-tratamento e à hidrólise, a pasta celulósica é subsequentemente convertida em açúcares fermentáveis livres (LIMAYEM; RICKE, 2012). Outros microrganismos podem ser utilizados, como *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *Pichia stipitis*, *Candida brassicae*, *Mucor indicus*, *Fusariummoxys porum*, *Schizosaccharomyces pombe*, etc. Esses microrganismos, e principalmente *S. cerevisiae* e *S. pombe*, representam os organismos de escolha para produção industrial de etanol, por serem capazes de fermentar uma diversidade de açúcares para a produção de etanol em condições anaeróbicas (DOMINGUEZ-BOCANEGRA; TORRES-MUNOZ; LOPEZ, 2015; GUPTA; VERMA, 2015).

Dentre as operações necessárias para a produção de bioetanol, o fungo *Trichoderma* sp. tem se mostrado promissor no processo de hidrólise enzimática, uma vez que este fungo é excelente produtor de celulasas.

### 3.2 *Trichoderma reesei*

*Trichoderma reesei* (anamorfo *Hypocrea jecorina*) é um fungo filamentosso mesófilo que cresce aerobicamente no solo em biomassa vegetal morta (RIES et al., 2014). Inicialmente isolado a partir de tendas de algodão durante a II Guerra Mundial (GOMES et al., 2015), sendo denominado originalmente de QM6a, várias cepas mutantes foram derivadas a partir dele, incluindo RUT-C30 e QM9414. Essas linhagens são mais eficientes na produção de celulasas sob condições biotecnológicas do que a estirpe do tipo selvagem (RIES et al., 2014).

*T. reesei* é um fungo relevante para a biotecnologia, devido à sua notável capacidade de produzir amplo número de enzimas celulolíticas (LV; WANG; WEI, 2012; SILVA-ROCHA et al., 2014). Para garantir a sua sobrevivência em diferentes habitats, *T. reesei* deve detectar a celulose presente no meio ambiente, produzir celulasas para degradar o substrato insolúvel, transportar os produtos solúveis através da membrana citoplasmática e assimilar os açúcares. Além disso, o fungo deve responder a mudanças na composição nutricional do ambiente para competir com outros microrganismos (ANTONIÊTO et al., 2014).

Atualmente, *T. reesei* é o mais eficiente produtor de enzimas que degradam a parede celular de plantas (SCHUSTER et al., 2012). A sua alta performance celulolítica tem sido demonstrada devido à boa eficiência de adsorção da enzima ao substrato e devido a fatores de transcrição que aumentam a produção e secreção de proteínas (GOMES et al., 2015). As celulasas e polissacarídeos relevantes deste fungo têm recebido atenção fundamental em pesquisas e desenvolvimento tecnológico, devido ao seu grande potencial em converter lignocelulose, a mais abundante e renovável fonte de energia do planeta, em glicose e açúcares solúveis (FANG; XIA, 2015).

As celulasas produzidas por este fungo são utilizadas em diversos processos industriais, desde o biobranqueamento de têxteis e reciclagem de papel, até como aditivo em alimentos para animais (SCHUSTER et al., 2012). Devido à necessidade crescente de combustíveis alternativos, estas enzimas têm ganhado atenção por causa da sua capacidade de transformar biomassa lignocelulósica em biocombustíveis (STEIGER et al., 2011). O alto custo da produção de enzimas se tornou o principal entrave para o processo de comercialização em larga escala de celulasas. O desenvolvimento de melhores enzimas e o excesso de produção de celulasas têm sido considerados para atender a demanda de enzimas e o custo de produção (MENG; WEI; WANG, 2013).

O sistema celulolítico de *T. reesei* consiste em 3 diferentes tipos de enzimas: exoglucanases (celobiohidrolases), endoglucanases e  $\beta$ -glicosidases, que podem estar presentes em diversas isoformas. As celobiohidrolases são encontradas como os mais importantes componentes na mistura de celulases para hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica (FANG; XIA, 2015). As celobiohidrolases produzem celobiose pela hidrólise processiva das cadeias de celulose, sendo que as celobiohidrolases I (CBHI) clivam as extremidades redutoras e as celobiohidrolases II (CBHII) clivam as extremidades não redutoras. As endoglucanases clivam as cadeias de celulose em regiões não cristalinas. E as  $\beta$ -glicosidases clivam os oligossacarídeos produzidos pelas celobiohidrolases e endoglucanases e produzem glicose (KAWAI et al., 2013) (Figura 3). Adicionalmente, hemicelulases também são necessárias para hidrólise da biomassa vegetal, atuando na hidrólise de hemicelulose (CASTRO et al., 2014).

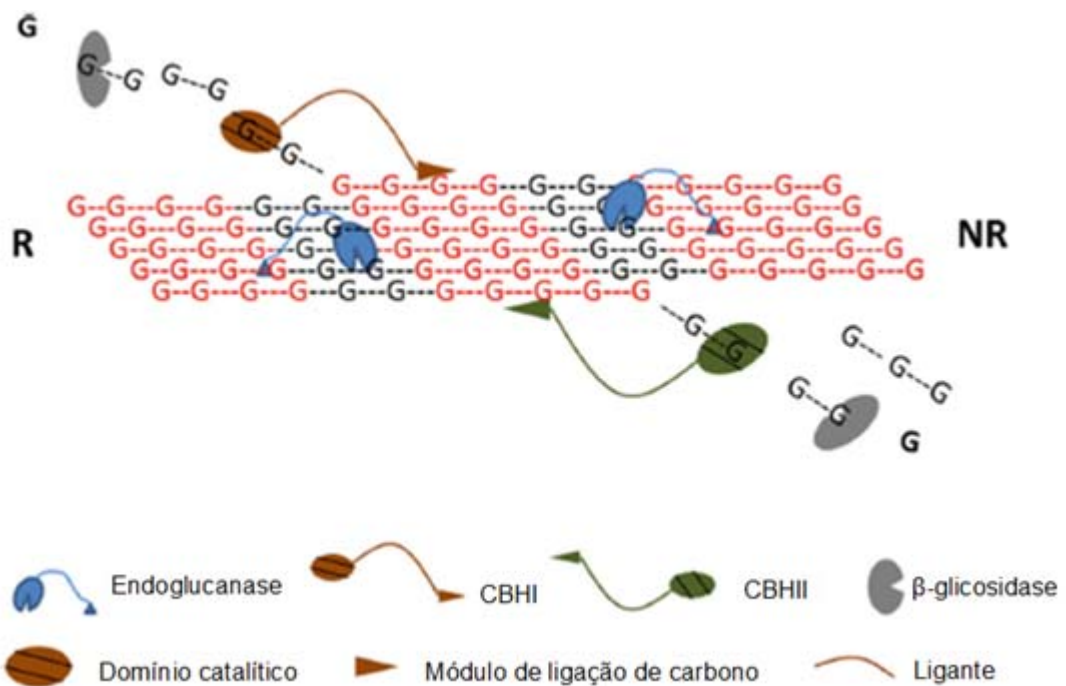


Figura 3 Esquema da hidrólise enzimática da lignocelulose (adaptada de GOMES et al. 2015). Símbolos: CBHI – celobiohidrolase I; CBHII – celobiohidrolase II; G – glicose; R – extremidade redutora; NR – extremidade não redutora.

O genoma de *T. reesei* compreende 9143 genes (KUBICEK, 2013) e a regulação dos genes que codificam celulases e hemicelulases tem sido extensivamente estudada. Cinco fatores de transcrição importantes nesse processo foram descritos. Como reguladores positivos, tem-se XYR1, ACE2 e complexo HAP

2/3/4 e reguladores negativos como ACE1 (repressor da expressão de celulase I) e CRE1 (repressor catabólico carbono) (CASTRO et al., 2014).

O papel repressor de ACE1 foi sugerido em estudos demonstrando que a deleção do *ace1* resulta em aumento da expressão de todos os principais genes de celulase e hemicelulase em culturas induzidas por sofrose e celulose. ACE1 também é repressor da expressão de *xyr1* durante o crescimento com D-xilose (PORTNOY et al., 2011). É sugerido que ACE1 é um fator específico para fungos filamentosos, uma vez que nenhuma similaridade significativa na sequência foi encontrada em banco de dados ou no genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Vale destacar que ACE1 contém sequências dedos de zinco do tipo Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> e também é capaz de se ligar *in vitro* a 8 sítios contendo a sequência 5' AGGCA ao longo dos 1.15 kb do promotor do gene da celobiohidrolase I (*cbh1*), auxiliando no controle dos genes da celulase (ARO et al., 2003).

CRE1 é um repressor catabólico de carbono que reprime os genes que codificam a celulase, na presença de glicose, para priorizar a absorção de açúcares facilmente metabolizáveis, como a glicose do meio de cultura. CRE1 suprime diretamente a transcrição de *cbh1* (RIES et al., 2014), sendo possível que a repressão catabólica do carbono em *T. reesei* ocorra por mecanismos similares ao existente em *Aspergillus* (STRAUSS et al., 1995).

O grande interesse no fungo *T. reesei* e as diversas informações elucidadas sobre ele durante os anos geraram o estudo e a produção de mutantes melhores produtores de celulasas, como ao mutante *T. reesei* RUT-C30.

### **3.2.1 *Trichoderma reesei* RUT-C30**

A cepa mutante de *T. reesei* RUT-C30 produz mais celulasas quando comparada ao tipo selvagem. Essa cepa hipercelulolítica produz cerca de 2,7 vezes a quantidade de proteínas extracelulares, tem 2,8 vezes mais atividade sobre papel filtro e tem o dobro de atividade de endoglucanases do que o tipo selvagem (SONG et al., 2016).

Em um estudo realizado pelo programa da Universidade de Rutgers, em Nova Jersey, um método eficiente foi utilizado em conjunto com ultravioleta (UV) e mutagênese química para gerar mutantes de QM6a com maior atividade de celulase. A cepa hipercelulolítica de RUT-C30 foi obtida através de um procedimento de 3 passos: mutação por luz UV, mutagênese por *N*-nitroguanidina e outra rodada de

mutagênese por UV, para posterior isolamento de RUT-C30 (PETERSON; NEVALAINEN, 2012).

A linhagem *T. reesei* RUT-C30 expressa uma forma truncada do gene *cre1* (*cre1-1*). Foi demonstrado que este transformante produz RNAm de celulase em meio contendo glicose e a transformação do gene *cre1* completo para esta cepa causa repressão da expressão de *cbh1* com glicose, demonstrando que CRE1 regula a expressão de celulase (ILMÉN; THRANE; PENTTILÄ, 1996; NAKARI-SETÄLÄ et al., 2009).

### 3.3 Transformação

A melhoria de cepas é um importante foco de investigação em curso, porque pode aumentar sua produtividade e alargar sua aplicação potencial (STEIGER et al., 2011). A fim de desenvolver mutantes de *T. reesei* com alto nível de produção enzimática, existe um grande interesse em elucidar os mecanismos moleculares que controlam a expressão de genes de celulase em resposta às condições ambientais (SILVA-ROCHA et al., 2014).

No passado, a criação de novas cepas fúngicas era conseguido através da combinação da mutagênese clássica, na qual o fungo é exposto a diferentes agentes mutagênicos, como raios X, raios  $\gamma$ , raio UV, ou produtos químicos, como *N*-metil-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (NTG) e etilmetasulfonato (SEM), em combinação com diferentes procedimentos de triagem para isolar cepas que superexpressam celulases. Com a disponibilidade de métodos de manipulação genética e a decodificação do genoma de *T. reesei*, ferramentas de genética molecular foram introduzidas para realizar essas mutações (SEIBOTH; IVANOVA; SEIDL-SEIBOTH, 2011). Contudo, essas abordagens não são tão eficientes como as disponíveis para leveduras e bactérias, devido à complexidade adicional dos fungos filamentosos, como morfologia multicelular, diferenciação celular, espessura das paredes celulares de quitosana e falta de plasmídeos adequados (LIU et al., 2015).

Uma técnica chave para avaliar as funções dos genes e para alterar as características das cepas dos fungos é a inativação de genes por eliminação sistemática ou nocaute. A utilização de um marcador é essencial para distinguir células fúngicas que foram transformadas e as não transformadas. Genes marcadores podem também conferir resistência a antibióticos ou completar a auxotrofia e assim permitir a seleção de células transformadas (SEIBOTH; IVANOVA; SEIDL-SEIBOTH, 2011).

A recombinação homóloga tem sido a principal abordagem para a produção de cepas de *T. reesei* com nocaute em diferentes níveis de sucesso. Os recentes avanços no desenvolvimento de métodos têm resultado na geração de alto rendimento de nocaute ou substituição de genes das cepas por estratégias eficientes, aumentando a eficiência de recombinação homóloga e permitindo a deleção de genes sequenciais (PETERSON; NEVALAINEN, 2012).

Após a obtenção dos mutantes, são necessários vários tipos de análises. O primeiro passo é tipicamente a verificação dos mutantes através de reação em cadeia da polimerase (PCR), posteriormente outros testes podem ser realizados, como variações fenotípicas e alguns índices bioquímicos (JIANG et al., 2013).

As técnicas de modificação genética envolvem o conhecimento do DNA do microrganismo que se deseja trabalhar e a maneira como é regulado esse DNA. As proteínas regulatórias geralmente se ligam em sequências de DNA específicas, chamadas de motivos de ligação do DNA. Dentre elas, destacam-se o motivo hélice-volta-hélice e os dedos de zinco. Possuindo esses conhecimentos, torna-se possível a alteração genética da maneira desejada (NELSON; COX, 2014).

### 3.3.1 Dedos de zinco

Muitas proteínas de ligação ao DNA têm várias cópias de pequenos domínios dobrados independentemente, que contêm regiões conservadas com cisteínas e histidinas coordenadas com zinco. Essas moléculas são comumente chamadas de proteínas dedos de zinco (BROWN, 2005). Os dedos de zinco variam amplamente em termos de estrutura, assim como em função, variando na ligação do DNA ou RNA, interações com proteína e associações de membrana (LAITY; LEE; WRIGHT, 2001).

As proteínas de ligação ao DNA coordenadas com zinco podem ser subdivididas em pelo menos 3 classes, com base na sua estrutura e forma de coordenação do zinco: (i) uma classe é caracterizada pela presença do motivo Cys<sub>6</sub>-zinco (às vezes chamado de Cys<sub>6</sub> aglomerado binuclear), que pode ser encontrado em reguladores metabólicos dos fungos (por exemplo na levedura GAL4); (ii) a segunda classe contém dedos de zinco Cys<sub>2</sub>Cys<sub>2</sub> (ou Cys<sub>4</sub>) com a sequência consenso conservada de ligação zinco de Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>13</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys, que são encontradas principalmente em receptores hormonais para esteróides (por exemplo, receptor para glicocorticóides); (iii) a terceira classe contém o domínio clássico dos dedos de zinco Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>, que está presente em grande número de proteínas regulatórias representadas em quase todos os ramos da árvore evolucionária. Os

elementos conservados da sequência são (Tyr,Phe)-X-Cys-X<sub>2</sub>-5-Cys-X<sub>3</sub>-(Tyr,Phe)-X<sub>5</sub>-Leu-X<sub>2</sub>-His-X<sub>3</sub>-5-His (em que X representa qualquer aminoácido) (PAPWORTH; KOLASINSKA; MINCZUK, 2006).

Proteínas contendo os dedos de zinco clássico Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> são as mais abundantes nos genomas eucarióticos. Muitas dessas proteínas são fatores de transcrição que funcionam por reconhecerem sequências específicas de DNA. Modificação nas sequências ligantes *in vivo* podem causar profundas consequências funcionais e fisiológicas (LAITY; LEE; WRIGHT, 2001; NELSON; COX, 2014).

Uma vez que o gene *ace1* de *T. reesei* possui regiões dedos de zinco Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>, a modificação deste motivo de ligação ao DNA altera a forma da regulação da expressão gênica deste fungo, tornando-o um mutante.



#### 4 ARTIGO

Revista Biotechnology and Bioengineering – A1 em Farmácia

### **DELEÇÃO PARCIAL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO ACE1 PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Trichoderma reesei* RUT-C30**

Débora Nakadomari Dudek<sup>1</sup>, Indianara Kawana Bueno<sup>1</sup>, Leticia Mara Rasbold<sup>1</sup> e Alexandre Maller<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brasil*

*Autor correspondente: Alexandre Maller*

*Rua Universitária, 2069, Bairro Faculdade, Cascavel – PR – Brasil – CEP 85819-110*

*+55 45 3220-3216*

*email: [alexandre.maller@unioeste.br](mailto:alexandre.maller@unioeste.br)*

## DELEÇÃO PARCIAL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO ACE1 PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Trichoderma reesei* RUT-C30

### RESUMO

O bioetanol de segunda geração emprega materiais lignocelulósicos degradados por celulases microbianas na sua produção. O fungo *Trichoderma reesei* é um dos principais microrganismos produtores de celulases utilizados na indústria e a modificação genética deste fungo pode levar à otimização na obtenção de suas enzimas, diminuindo o custo e melhorando a produção de biocombustíveis. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi deletar a sequência que codifica o motivo dedo de zinco do fator de transcrição repressor de celulase ACE1 do fungo *T. reesei* RUT-C30. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar as regiões 5' e 3' da sequência alvo e do marcador de seleção *hph*, que confere resistência à higromicina B, foram produzidos utilizando-se o site *Joint Genome Institute* – JGI e o programa BioEdit®. Após a amplificação dos fragmentos, a construção do cassete de deleção com o vetor pRS426 foi realizada através da recombinação mediada por levedura *Saccharomyces cerevisiae* SC9721. Os protoplastos do fungo *T. reesei* foram transformados com o cassete de deleção por choque térmico e a confirmação desta transformação foi efetuada por amplificação de parte do marcador de seleção *hph*. Após, a produção de celulases foi mensurada pela dosagem da atividade enzimática dos substratos carboximetilcelulose (CMC), celulose microcristalina (Avicel®) e papel de filtro Whatman (PF). Posteriormente à construção do cassete de deleção, a amplificação de um fragmento de 3501 pb confirmou a formação do cassete e a transformação da linhagem RUT-C30 foi confirmada com a amplificação do fragmento de 989 pb referente a parte do marcador de seleção em 3 mutantes. Em ensaios de atividade enzimática, os mutantes mostraram melhor atividade de celulase quando comparados à linhagem RUT-C30. A produção de celulases do fungo *T. reesei* RUT-C30 transformado comparado à linhagem RUT-

C30 foi mensurada. Nessa comparação, foi observada diferença estatística significativa da linhagem RUT-C30 $\Delta ace1-1$  com Avicel<sup>®</sup> e PF ( $p < 0,001$ ), da linhagem RUT-C30 $\Delta ace1-2$  com CMC ( $p < 0,01$ ) e PF ( $p < 0,05$ ) e da linhagem RUT-C30 $\Delta ace1-3$  com Avicel ( $p < 0,001$ ), CMC e PF ( $p < 0,01$ ). Da mesma forma, todos os mutantes apresentaram maior produção de açúcar redutor ( $p < 0,001$ ) após teste de hidrólise da biomassa em 24h e 72h, quando comparados ao RUT-C30 não mutado. Sendo assim, os mutantes obtidos no trabalho são promissores nos estudos para a produção de bioetanol.

**Palavras-chave:** fungo, cassete de deleção, transformação, material lignocelulósico, bioetanol.

## INTRODUÇÃO

A economia mundial é altamente dependente de várias fontes fósseis não renováveis, como petróleo, carvão, gás natural, etc. Esses recursos são utilizados para a produção de combustível, eletricidade, entre outros (Sarkar et al., 2012). Com a tendência ao esgotamento das fontes de combustíveis não renováveis, além da presença da emissão de gases, aquecimento global e a possibilidade do aumento de preços e flutuações inesperadas, reforça-se o interesse em alternativas renováveis e sustentáveis de fontes energéticas (Magro et al., 2016; Mood et al., 2013).

Os biocombustíveis surgiram como importante estratégia sustentável de energia (Savaliya et al., 2015). O bioetanol tem recebido maior atenção devido à abundância e imenso potencial para a conversão de açúcares em combustível. No entanto, existem obstáculos relevantes que precisam ser superados, tais como custo de produção, problemas tecnológicos e ambientais (Ruiz et al., 2012). O termo “combustíveis de segunda geração” se refere à produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (Chiaramont et al., 2012), proveniente de resíduos vegetais oriundos da produção de etanol de primeira geração, culturas destinadas à

produção de bioetanol, resíduos florestais, resíduos industriais ou resíduos sólidos (Gomes et al., 2015; Imamoglu, Sukan, 2013).

O etanol de segunda geração emprega um substrato mais complexo, que não é facilmente acessível para a fermentação microbiana. Esses materiais são lignocelulósicos e compostos principalmente por celulose (40 – 60% do peso seco total), hemicelulose (20 – 40%), lignina (10 – 25%) e diversos materiais inorgânicos em quantidades variáveis (Baeyens et al., 2015; Gomes et al., 2015; Taherzadeh, Karimi, 2007).

A lignocelulose dos substratos é processada para a produção de bioetanol através de três grandes operações: pré-tratamento (para deslignificação, necessária para libertar celulose e hemicelulose antes da hidrólise), hidrólise da celulose e hemicelulose (para produzir açúcares fermentáveis, como a glicose, xilose, arabinose, galactose, manose) e, a última etapa, a fermentação de açúcares redutores (Ruiz et al., 2012; Sarkar et al., 2012). O processo de hidrólise enzimática tem sido realizado por microrganismos que possuem a habilidade de secretar enzimas celulolíticas (Gupta, Verma, 2015). Os microrganismos celulolíticos, bactérias e fungos filamentosos, produzem um conjunto de enzimas que hidrolisam sinergicamente a celulose cristalina em oligossacarídeos menores e finalmente em glicose (Ilmén et al., 1997; Mood et al., 2013).

*Trichoderma reesei* (anamorfo *Hypocrea jecorina*) é um fungo relevante para a biotecnologia, devido a sua notável capacidade em produzir amplo número de enzimas celulolíticas (Lv et al., 2012; Silva-Rocha et al., 2014). *T. reesei* é um fungo filamentoso mesófilo, que cresce aerobicamente no solo em biomassa vegetal morta (Ries et al., 2014). As celulases produzidas por esse fungo são utilizadas para diversos processos industriais, desde o biobranqueamento de têxteis, reciclagem de papel até como aditivo em alimentos para animais (Schuster et al., 2012). Devido à necessidade crescente de combustíveis alternativos, essas

enzimas têm ganhado atenção por causa da sua capacidade de transformar biomassa lignocelulósica em biocombustíveis (Steiger et al., 2011).

O genoma de *T. reesei* compreende 9143 genes (Kubicek, 2013). Cinco fatores de transcrição importantes que codificam celulasas e hemicelulasas foram descritos; como reguladores positivos, têm-se XYR1, ACE2 e o complexo HAP 2/3/4 e reguladores negativos, como ACE1 (repressor da expressão de celulase I) e CRE1 (repressor catabólico carbono) (Castro et al., 2014). ACE1 contém sequências dedos de zinco do tipo Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> e também é capaz de se ligar *in vitro* a 8 sítios, contendo a sequência 5' AGGCA ao longo dos 1.15 kb do promotor da celobiohidrolase 1 (*cbh1*) (Aro et al., 2003). Uma cepa mutante de *T. reesei* foi desenvolvida e é capaz de produzir mais celulasas quando comparada ao tipo selvagem, sendo denominada *T. reesei* RUT-C30. Esta linhagem hipercelulolítica produz cerca de 2,7 vezes a quantidade de proteínas extracelulares, tem 2,8 vezes mais atividade de papel filtro e tem o dobro de atividade de endoglucanases do que o tipo selvagem (Song et al., 2016). A linhagem *T. reesei* RUT-C30 expressa uma forma truncada do gene *cre1* (*cre1-1*), que é um regulador negativo para celulase (Ilmén et al., 1996; Nakari-Setälä et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi deletar a sequência que codifica o motivo dedo de zinco do fator de transcrição repressor de celulase ACE1 do fungo *T. reesei* linhagem RUT-C30, obtendo um transformante otimizado para a produção de celulase.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Linhagens e plasmídeos**

A linhagem de *T. reesei* RUT-C30 foi utilizada como alvo dos experimentos. Esse fungo é armazenado em meio ágar extrato de malte (MEX - 0,3% de extrato de malte; 0,5% de peptona micológica; 1,5% de ágar e 1% de glicose com pH final de 5,4) e repiques periódicos a cada 15 dias para manutenção da cepa são realizados. Essa linhagem possui o fator de

transcrição repressor CRE1 truncado. Para construção do cassete de deleção, foi utilizado o vetor pRS426 (Christianson et al., 1992), assim como a linhagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SC9721).

### **Construção dos primers e ampliações das regiões 5' e 3' de *ace1* e do marcador de seleção *hph***

Para promover apenas uma deleção parcial, na região dos motivos dedos de zinco do fator de transcrição ACE1, primers específicos foram gerados para as sequências que flanqueiam esta região do gene. A sequência genética de *ace1* de *T. reesei* sob número de acesso 75418 depositada no site *Joint Genome Institute – JGI* (<http://genome.jgi-psf.org/>) foi utilizada para geração da sequência fasta e para tradução da sequência de DNA deste gene foi utilizado o programa BioEdit® (versão 7.1.3.0). Posteriormente, as sequências das regiões dos motivos dedos de zinco: (Tyr, Phe)-X-Cys-X2-5-Cys-X3-(Tyr, Phe)-X5-Leu-X2-His-X3-5-His foram procuradas para construção dos primers. A fim de permitir a recombinação mediada por levedura para a montagem do vetor de deleção, sequências complementares específicas foram adicionadas aos primers para amplificação das regiões 5' e 3', que flanqueiam a sequência alvo, com o auxílio do banco de dados gerado por Schuster e colaboradores (2012). Os primers utilizados para amplificar as regiões 5' e 3' que flanqueiam a sequência alvo e o marcador de seleção *hph*, que confere resistência à higromicina B, são mostrados na Tabela I. Para amplificação das regiões 5' e 3', a amostra utilizada foi o fungo *T. reesei* QM6a e, para amplificação do *hph*, utilizou-se o *pAku70*. A mistura da reação em cadeia da polimerase (PCR) conteve 2,5 µL de tampão Taq DNA polimerase, 0,5 µL de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP) (10 mM), 1,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µL de Primer Forward (100 pmol/µL), 0,5 µL de Primer Reverse (100 pmol/µL), 1 µL de amostra DNA (0,2 µg/ µL), 1,0 µL de Taq DNA polimerase e 18,5 µL de água MilliQ. Nas seguintes temperaturas: 1 ciclo de 95° C por 3min;

35 ciclos de 94° C por 30s, 60° C por 30s e 72° C por 2min; 1 ciclo de 10min a 72° C e 4° C infinito. Posteriormente, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,7%, acrescido de 2,5 µL de brometo de etídio (1 mg/mL). Os amplificadores foram purificados utilizando o kit PureLink® (Invitrogen) seguindo as orientações do fabricante.

### **Construção do cassete de deleção mediado por levedura (*Saccharomyces cerevisiae* SC9721)**

Para a construção do cassete de deleção para *T. reesei*, foi utilizado o marcador de seleção *hph* (Figura 1). O vetor plasmidial utilizado para a montagem do cassete de deleção por recombinação mediada por levedura foi o pRS426. Antes da transformação, o vetor foi linearizado através da reação de digestão com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI.

A metodologia utilizada para construção do cassete de deleção foi adaptada de Mota Júnior (2008) e Colot et al. (2006). Preparou-se um pré-inóculo da levedura em 10 mL de meio YPD (1% de extrato de levedura; 2% de peptona e 2% de glicose), que foi incubado por 16h a 30° C sob agitação de 200 rpm. No dia seguinte, foram inoculados 2,5 mL desse pré-inóculo em 100 mL do meio YPD e incubado por 4h nas condições anteriores. Posteriormente, o inóculo foi centrifugado a 5000 g por 5min, o precipitado ressuscitado em 20 mL de água estéril e o processo de centrifugação foi repetido. O precipitado foi ressuscitado com 1 mL de uma solução 1x de tampão TE (100 mM de Tris-HCl, 100 µM de EDTA) e acetato de lítio 1 M. Após, 100 µL das células competentes foram adicionadas ao mix 1, que continha os fragmentos 5' e 3', que flanqueiam a sequência alvo, marcador de seleção (*hph*), vetor pRS426 digerido e 100 µg de esperma de salmão. Foram adicionados à mistura 600 µL do mix 2 (800 µL de polietilenoglicol (PEG) 3550 50%, 100 µL de acetato de lítio 1 M e 100 µL de água Milli-Q). A homogeneização foi realizada por inversão e a mistura incubada a 30° C por 30min sob agitação de 200 rpm. Adicionou-se 70 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), misturou-se por

inversão e a mistura foi incubada a 42° C por 15min, seguidos de 2 minutos em banho de gelo. Após, acrescentou-se 700 µL de água Milli-Q e misturou-se por inversão. Outra centrifugação foi realizada por 30s a 6080 g. Foram descartados 800 µL do sobrenadante e o restante plaqueado em meio SC-URA (*Saccharomyces cerevisiae* menos uridina - 0,7% de YNB (Yeast Nitrogen Base) sem aminoácidos; 2% de glicose; 1,7% de ágar e os aminoácidos: 0,01% de leucina; 0,01% de lisina; 0,01% de triptofano e 0,005% de histidina) com auxílio de alça de Drigalski. A incubação foi realizada a 30° C por 3 – 4 dias para crescimento de colônias visíveis das leveduras. Como controles do experimento, foram realizados controle negativo I, com somente levedura e água, controle negativo II, com o vetor aberto e esperma de salmão, e controle positivo, com vetor fechado e esperma de salmão.

A metodologia para extração do DNA genômico da levedura após a construção do cassete de deleção foi seguida conforme descrita por Mota Júnior (2008). A etapa seguinte consistiu na realização de PCR utilizando Taq DNA polimerase *High Fidelity*<sup>®</sup> (Invitrogen), segundo as condições descritas anteriormente com modificações no tempo de extensão de 4min e utilização dos primers ace1hph5F e ace1hph3R.

### **Transformação de *T. reesei* RUT-C30**

Após a montagem do cassete de deleção, foi realizada a transformação dos protoplastos da linhagem de *T. reesei* RUT-C30 de acordo com Schuster et al. (2012). Para o preparo dos protoplastos, a linhagem desejada do fungo foi inoculada em MEX e incubada a 30° C por 4 dias. Com metade da placa de fungo recém-crescido, foi preparado 1 mL de solução de esporos (0,8% de NaCl e 0,05% de Tween 80). Novas placas com meio MEX foram utilizadas para colocação de discos de celofane estéreis para posterior adição de 50 µL da solução de esporos. Para cada linhagem, foram feitas 5 placas que foram incubadas a 30° C por 16-20h. Em uma placa de Petri de 90 mm foram pipetados 3 mL da solução de lise (0,075 g de “lysing enzymes”



de *Trichoderma harzianum*<sup>®</sup> – Sigma Aldrich em 15 mL de solução A - 0,1 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 M de sorbitol e água Milli-Q pH 5,6) e adicionado um disco de celofane com o fungo germinado; acrescentou-se novamente 3 mL da solução de lise e outro disco de celofane na mesma placa, até completar 5 camadas de celofanes. A placa foi incubada por 90min a 30° C com agitação suave para homogeneização da solução de lise. Após, os discos de celofane foram retirados, deixando o micélio dentro da placa. Com o auxílio de ponteiros de 1 mL, a suspensão com o micélio foi pipetada e filtrada em lã de vidro e funil estéril para um tubo de 50 mL. Depois, a lã de vidro foi lavada com 10 mL da solução A. O tubo foi centrifugado a 380 g por 10min a 4° C com rotor *swing out*. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuscitado em 4 mL de solução B gelada (50 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 1 M de sorbitol, 10 mM de Tris-HCL pH 7,5 e água Milli-Q). Outra centrifugação a 380 g por 10min a 4° C em rotor *swing out* foi realizada; o sobrenadante foi descartado e os protoplastos foram ressuscitados em 600  $\mu\text{L}$  de solução B. Em uma lâmina, foram colocados 3  $\mu\text{L}$  da solução com os protoplastos e 2  $\mu\text{L}$  de água estéril próximo aos protoplastos que foram cobertos com lamínula. Assim, foi realizada a visualização do rompimento dos protoplastos por plasmólise, atestando a viabilidade dos mesmos.

Para transformação dos protoplasto da linhagem do *T. reesei*, um tubo de 15 mL foi acrescentado 100  $\mu\text{g}$  do cassete de deleção, 200  $\mu\text{L}$  da suspensão de protoplastos e 50  $\mu\text{L}$  da solução de PEG 6000 (25% PEG 6000, 50 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 e água Milli-Q). Foram adicionados mais 2 mL de PEG, realizada agitação orbital suave do tubo e incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se ainda 4 mL da solução B e foi realizada agitação cuidadosa. Posteriormente, foi acrescentado 1 mL desta solução em 4 mL de meio overlay (2% agarose, 1 M sorbitol, meio mínimo [0,01% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,6%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,3% de citrato de trisódio.  $2\text{H}_2\text{O}$ ; 1% de glicose; 2 mL de solução traços de elementos 50 X, que continha 0,025% de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,007% de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01% de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,0085% de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ] e reagente de seleção [100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de

higromicina] quando necessário) previamente aquecido a 48° C, sendo agitado brevemente e adicionado sobre placas preparadas com meio Botton (2% ágar, 1 M sorbitol meio mínimo e reagente de seleção quando necessário) por metodologia de *pour plate*. A incubação foi a 30° C por 4 dias. Após o crescimento visível dos transformantes, estes foram removidos e transferidos para diversas placas com meio MEX com reagente de seleção e incubados a 30° C por alguns dias até esporulação. A partir destas placas, foi preparada uma solução de esporos que foi inoculada com auxílio de alça de Drigalski em meio MEX acrescido de 0,1% de Triton X-100 para obtenção de colônias isoladas. As colônias crescidas foram inoculadas em placas com meio MEX acrescido de reagente de seleção e incubadas a 30° C até esporulação para extração do DNA genômico de *T. reesei*.

### **Confirmação da deleção de *ace1* de *T. reesei* RUT-C30**

A transformação da linhagem de *T. reesei* foi confirmada através de PCR realizado com oligonucleotídeos para amplificação do gene *hph* utilizado como marcador de seleção (Primer *hphNest F* e Primer *hphNest R*) (Tabela II). A mistura da PCR conteve 12,5 µL de GoTaq® Long PCR Master Mix, 0,5 µL de cada um dos primers (100 pmol/µL), 1,0 µL do DNA de *T. reesei* RUT-C30 mutado (0,15µg/µL) e 10,5 µL de água Milli-Q. Nas seguintes temperaturas: 1 ciclo de 95° C por 3min, 35 ciclos de 95° C por 30s, 55° C por 30s e 72° C por 1min30s. Seguidos de 1 ciclo de 10min a 72° C e 4° C infinito. Posteriormente, as amostras foram submetidas a eletroforese para verificação do produto de amplificação.

### **Produção de enzimas**

Para a produção enzimática, utilizou-se a metodologia adaptada de Ahamed e Vermette (2008). As culturas de *T. reesei* RUT-C30 transformadas foram inoculadas em Erlenmeyer de 125 mL com 20 mL de meio de cultura para produção de celulase (1% celulose; 1% extrato de

levedura; 1% glicose; 0,03%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,2%  $KH_2PO_4$ ; 0,14%  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0,04%  $CaCl_2$ ; 4 mL de solução traços de elementos 50X), e incubadas a 30° C sob agitação orbital de 150 rpm por 24h. Após este período, adicionou-se 5 mL do meio para produção de celulase sem glicose e celulose, com adição de 25% de lactose em cada Erlenmeyer. E incubou-se novamente nas mesmas condições por mais 24 h. As culturas obtidas dos meios líquidos foram filtradas a vácuo em funil de Büchner e papel de filtro Whatman n° 1, obtendo-se um filtrado livre de células, utilizado para a determinação das atividades de celulase.

### **Ensaio enzimáticos**

Para verificar a atividade da celulase (endoglucanase, exoglucanase e celulase total), foram utilizados carboximetilcelulose (CMC), celulose microcristalina (Avicel®) e papel de filtro Whatman (PF) como substratos, respectivamente. A metodologia de dosagem foi a descrita por Miller (1959) através do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). O sistema foi padronizado por uma curva de calibração de glicose de 0,1 a 1,0 mg/mL. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de glicose por minuto dentro das condições de ensaio.

### **Hidrólise da biomassa**

Para identificar a eficiência na hidrólise da biomassa pelos extratos enzimáticos de cada mutante, comparados com a linhagem RUT-C30, foi utilizada a metodologia descrita por Damásio (2016) (comunicação oral). Utilizou-se 20 mg de bagaço de cana moída, 0,2 mg de proteína do extrato e quantidade suficiente de tampão acetato de sódio 100 mM pH5,0 para uma reação final de 1,5 mL. As amostras foram incubadas a 30° C e alíquotas foram retiradas com 24 e 72 h, seguido de fervura por 10min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas

por 10min a 10.000 g e o sobrenadante foi utilizado para dosagem de açúcar redutor, segundo Miller (1959) com o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

### **Reprodutibilidade e análise estatística dos resultados**

A análise estatística ANOVA foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 7.02. Em caso de significância estatística e dependendo do experimento, as médias foram comparadas de acordo com o teste de Bonferroni.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Montagem e obtenção do cassete de deleção**

O cassete de deleção foi montado por recombinação mediada pela levedura *S. cerevisiae* SC9721, com os fragmentos das regiões 5' e 3' purificados, o marcador de seleção *hph* purificado e o plasmídeo pRS426 previamente digerido e purificado.

Posteriormente à transformação da levedura, procedeu-se à extração do DNA genômico, resultando em 4 amostras dessa extração. Utilizaram-se as amostras, na concentração de 0,15 µg/µL, para amplificação do cassete de deleção com Taq DNA polimerase High Fidelity<sup>®</sup> (Invitrogen). O produto de amplificação do cassete foi de 3501 pares de base, fornecendo duas amostras purificadas (Figura 2).

### **Transformação de *T. reesei* RUT-C30 e confirmação da deleção de *ace1***

Após a transformação da linhagem RUT-C30 de *T. reesei*, realizou-se a extração do DNA genômico do fungo. Obtiveram-se três amostras, as quais foram denominadas RUT-C30Δ*ace1*-1, RUT-C30Δ*ace1*-2 e RUT-C30Δ*ace1*-3.

A presença do cassete de deleção foi confirmada através da amplificação do marcador de seleção *hph*, para os três transformantes conforme mostrado na Figura 3. O fragmento

observado foi de 989 pares de base, confirmando a inserção do marcador de seleção e consequente deleção parcial de *ace1* nos mutantes.

### **Produção de celulases pelos mutantes**

Os resultados obtidos da atividade enzimática e desvio após análise estatística, comparando-se o fungo *T. reesei* RUT-C30 aos mutantes RUT-C30 $\Delta ace1$ -1, RUT-C30 $\Delta ace1$ -2 e RUT-C30 $\Delta ace1$ -3 e seus substratos Avicel<sup>®</sup>, CMC e PF, são apresentados na Figura 4.

Para o mutante RUT-C30 $\Delta ace1$ -1 houve diferença estatística significativa na produção de celulase com os substratos Avicel<sup>®</sup> e PF ( $p < 0,001$ ). Com o mutante RUT-C30 $\Delta ace1$ -2, o resultado foi significativo estatisticamente para os substratos CMC ( $p < 0,01$ ) e PF ( $p < 0,05$ ). E da linhagem RUT-C30 $\Delta ace1$ -3, o resultado foi estatisticamente significativo para todos os substratos, com Avicel<sup>®</sup> ( $p < 0,001$ ) e CMC e PF ( $p < 0,01$ ).

A linhagem *T. reesei* RUTC-30 é melhor produtora de celulases quando comparada ao fungo selvagem QM6a, porque possui o fator de transcrição CRE truncado (Song et al., 2016, Nakari-Setälä et al., 2009). Os mutantes produzidos neste trabalho possuem, além do CRE truncado, a deleção de parte do fator de transcrição ACE1, responsável pela regulação negativa da produção de celulase. Conforme comparado estatisticamente com RUT-C30, o RUT- C30 $\Delta ace1$ -1 apresentou maior produção de exoglucanase e celulose total nos ensaios com Avicel e PF. O RUT-C30 $\Delta ace1$ -2 mostrou melhor atividade de endoglucanase e celulase total quando comparado ao RUT-C30 com os substratos CMC e PF. Ainda, o RUT- C30 $\Delta ace1$ - 3 obteve melhores resultados para exoglucanase, endoglucanase e celulase total com os 3 substratos (Avicel, CMC e PF).

A literatura reporta que a deleção do gene *ace1* mostra alteração no crescimento destas linhagens em cultura. Segundo Aro et al. (2003), o crescimento das cepas com  $\Delta ace1$  foi superior quando comparado ao crescimento da cepa sem deleção e a cepa deletada foi capaz de

degradar celulose mais eficientemente. Este relato está de acordo com o encontrado no presente estudo, no qual ocorreu aumento da produção de celulasas quando comparado ao RUT-C30 não mutado. Além disso, este resultado demonstra que o gene *ace1* está ligado à regulação da produção de celulasas, corroborando o que está descrito na literatura (Castro et al., 2014; Portnoy et al., 2011).

### **Hidrólise da biomassa**

Na dosagem de açúcar redutor para verificar a eficiência da hidrólise da biomassa do bagaço de cana triturado, quando comparada a linhagem RUT-C30 com os mutantes, todos tiveram maior liberação de açúcar (Figura 5). Observam-se diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre a eficiência na hidrólise pela linhagem RUT-C30 e os mutantes RUT-C30 $\Delta ace1$ -1, RUT-C30 $\Delta ace1$ -2 e RUT-C30 $\Delta ace1$ -3 no tempo de 24 h e 72 h.

O RUT-C30 $\Delta ace1$ -1 apresentou atividade celulolítica 21% maior nos tempos de 24 e 72h, quando comparado ao RUT-C30. A linhagem RUT-C30 $\Delta ace1$ -2 apresentou a mesma liberação do anterior em 24h, mas mostrou aumento de 24% em 72h. O mutante RUT-C30 $\Delta ace1$ -3 obteve a maior eficiência de hidrólise no experimento, de 42% com 24h.

Uma das principais fontes de energia renovável para os biocombustíveis é a conversão de carboidratos derivados de plantas em bioetanol. Uma das etapas para produção deste combustível é a hidrólise de polissacarídeos de parede celular utilizando enzimas, como as celulasas (Souza et al., 2013). A hidrólise da celulose produz glicose que será utilizada no processo de produção de bioetanol (Buckeridge et al., 2012).

O fungo *T. reesei* RUT-C30 foi produzido com o objetivo de aumentar a produção de celulase (Borin et al., 2015). Os fungos provenientes das mutações realizadas no trabalho, quando comparados à linhagem RUT-C30, apresentaram maior produção de açúcar redutor, o que indica maior potencial para melhor produção de bioetanol em escala industrial.

Nos diversos ramos da indústria, como na produção de combustíveis, produtos químicos, alimentos, bebidas, rações para animais, nos processos têxteis, no beneficiamento da polpa e do papel e na agricultura, o potencial biológico associado às celulases garante a sua aplicação (Mehboob et al., 2014). Estratégias para reduzir o custo da produção do bioetanol são realizadas e o pré-tratamento biológico da biomassa lignocelulósica para produção de etanol é um destes processos (García-Torreiro et al., 2016). A maior produção de celulase devido à modificação genética da linhagem fúngica de *T. reesei* RUT-C30, evidentemente melhorará a viabilidade para a produção de bioetanol.

A modificação genética para melhorar a produção de celulases pelo fungo *T. reesei* é uma realidade e o aumento de pesquisas neste contexto torna o fungo muito promissor para a sua utilização na produção de bioetanol.

## **CONCLUSÃO**

A deleção parcial do gene *ace1* no fungo *T. reesei* RUTC-30, que possui CRE1 truncado, aumentou a produção de exoglucanase, endoglucanase e celulase total. Esse resultado torna o fungo promissor para a utilização na produção de bioetanol. No entanto, são necessários testes adicionais para verificar a viabilidade de sua aplicação em processos fermentativos em escala industrial.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecimento à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Araucária.

## TABELAS

Tabela I – Primers para amplificação das regiões 5', 3' e *hph*.

Primer	Sequência (5' - 3')	T <sub>m</sub> (°C)*	Amplificado (pb)
ace1hph5F	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGGC ATGAACAAACAAGAGCCTG	70,8	958
ace1hph5R	ATCCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAACAC AGCTCCTCGGGGGTGGCG	70,3	
ace1hph3F	CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGACGGC TGGACCTATGTCCGCACC	69,6	1021
ace1hph3R	GCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGCGC TCAACTCAAGCCTGCTGCTG	70,1	
hphF	GTCGGAGACAGAAGATGATATTGAAGGAGC	59,8	1447
hphR	GTTGGAGATTCAGTAACGTTAAGTGGAT	56,9	

\* T<sub>m</sub> °C – Temperatura de melting em graus Celsius.



Tabela II Primers para amplificação de parte do gene do *hph*.

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5' - 3')</b>	<b>Tm (°C)*</b>	<b>Amplificado (pb)</b>
hphNest F	GCGATTTGTGTACGCCCGACAG	60,8	989
hphNest R	CGCCCTTCCTCCCTTTATTTC	55,7	

\* Tm °C – Temperatura de melting em graus Celsius.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da construção do vetor mediado por levedura *S. cerevisiae* e confirmação da inserção do cassete de deleção (modificado de Schuster et al., 2012).

Figura 2 – Produto de amplificação do cassete de deleção. Símbolos: L – DNA Ladder<sup>®</sup> 1Kb Ludwig Biotec; 1 – amostra 1; 2 – amostra 2.

Figura 3 – Confirmação da inserção do cassete de deleção no fungo transformado. Símbolos: L – DNA Ladder 1Kb Ludwig Biotec<sup>®</sup>; 1 – RUT-C30 $\Delta$ *ace1*-1; 2 – RUT-C30 $\Delta$ *ace1*-2; 3 - RUT-C30 $\Delta$ *ace1*-3 e 4 – controle positivo da reação (*hph*).

Figura 4 – Comparação entre RUT-C30 e mutantes para Avicel<sup>®</sup>, CMC e PF. Símbolos: \* p <0,05; \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001.

Figura 5 – Comparação da hidrólise da biomassa de cana de açúcar e produção de açúcar redutor entre RUT-C30 e mutantes. Símbolos: \*\*\* p <0,001.

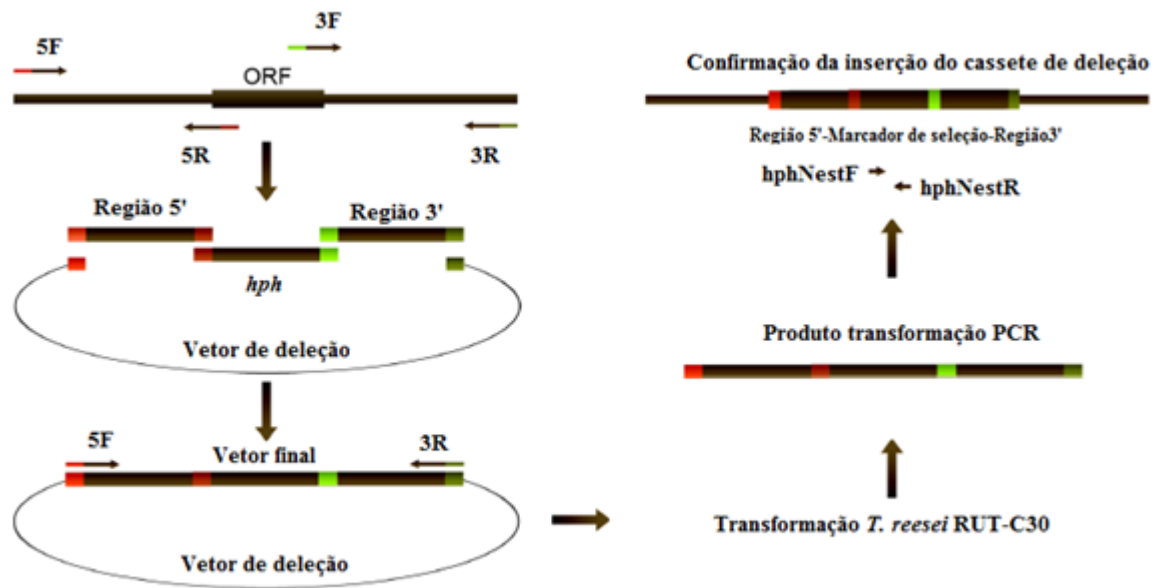


Figura 1

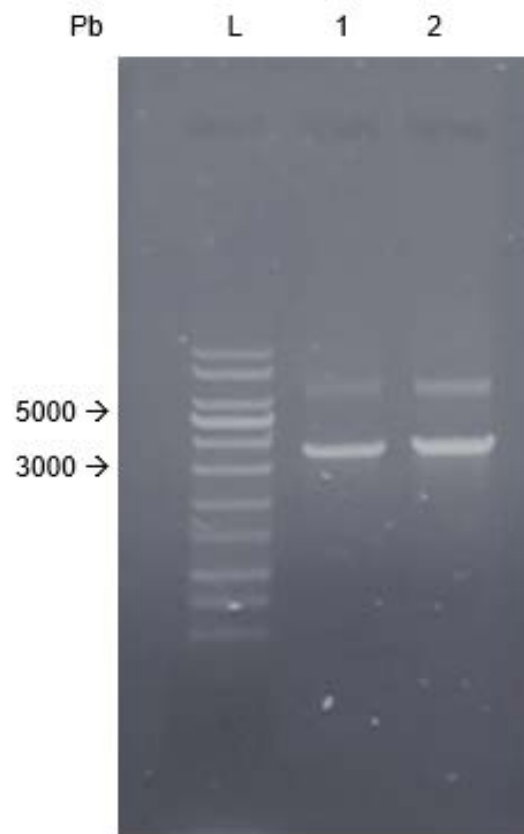


Figura 2

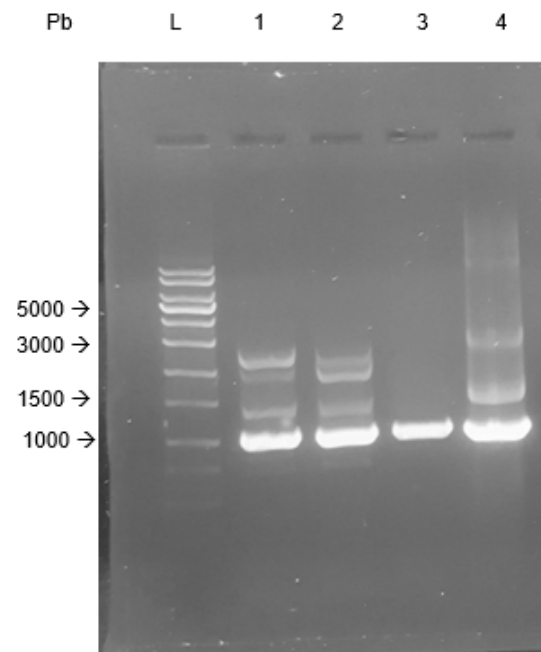


Figura 3

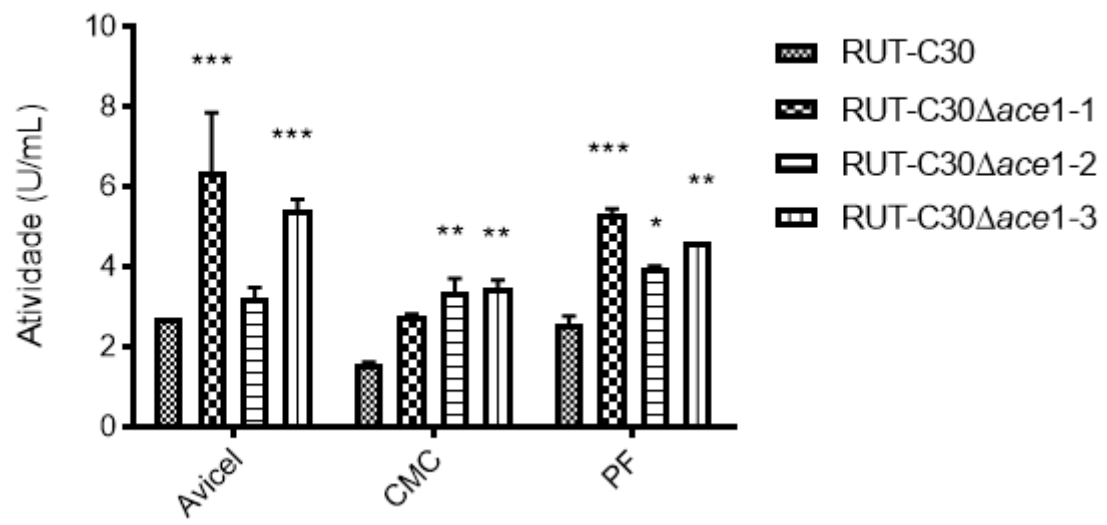


Figura 4

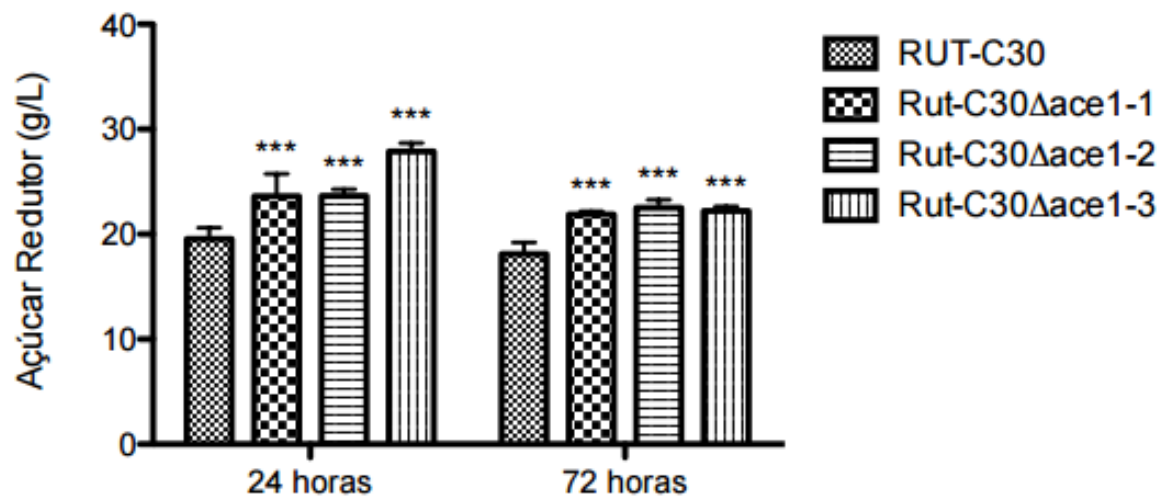


Figura 5

## 5 REFERÊNCIAS

### 5.1 Fundamentação teórica

ANTONIÊTO, A. C. C.; CASTRO, L dos S.; SILVA-ROCHA, R.; PERSINOTI, G. F.; SILVA, R. N. Defining the genome-wide role of CRE1 during carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* using RNA-Seq analysis. **Fungal genetics and biology**. v. 73, p. 93 – 103, 2014.

ARAÚJO JÚNIOR, C. P. **Painéis de fibras elaborados a partir da casca do coco verde sem adição de resinas aglutinantes**. 2014. 83 f. Tese (Mestrado em engenharia e ciências de materiais) – Universidade Federal do Ceará. 2014.

ARO, N.; ILMÉN, M.; SALOHEIMO, A.; PENTILLÄ, M. ACE1 of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. **Applied and environmental microbiology**. v. 69, n. 1, p. 56 – 65, 2003.

BAEYENS, J.; KANG, Q.; APPELS, L.; DEWIL, R.; LV, Y.; TAN, T. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in energy and combustion science**. v. 47, p. 60 – 88, 2015.

BARAKAT, A.; VRIES, H. de; ROUAU, X. Dry fractionation process as an importante step in current and future lignocellulose biorefineries: a review. **Bioresource technology**. v. 134, p. 362 – 373, 2013.

BRENNAN, A.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, p. 557 – 577, 2010.

BROWN, R. Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. **Current opinion in structural biology**. v. 15, p. 94 – 98, 2005.

CASTRO, L. dos S.; ANTONIÊTO, A. C. C.; PEDERSOLI, W. R.; SILVA-ROCHA, R.; PERSINOTI, G. F.; SILVA, R. N. Expression pattern of cellulolytic and xylanolytic genes regulated by transcriptional factors XYR1 and CRE1 are affected by carbono source in *Trichoderma reesei*. **Gene expression patterns**. v. 14, p. 88 – 95, 2014.

CHIARAMONTI, D.; PRUSSI, M.; FERRERO, S.; ORIANI, L.; OTTONELLO, P.; TORRE, P.; CHERCHI, F. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production and development of na innovative method. **Biomass and bioenergy**. v.46, p. 25 – 35, 2012.

DOMINGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; TORRES-MUNOZ, J. A.; LOPEZ, R. A. Production of bioethanol from agro-industrial wastes. **Fuel**. v. 149, p. 85 – 89, 2015.

FANG, H.; XIA, L. Cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* and its application in enzymatic hydrolysis of agricultural residues. **Fuel**. v.143, p. 211 – 216, 2015.

GOMES, D.; RODRIGUES, A. C.; DOMINGUES, L.; GAMA M. Cellulase recycling in biorefineries – is it possible? **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 99, p. 4131 – 4143, 2015.



GONELA, V.; ZHANG, J. Design of the optimal industrial symbiosis system to improve bioethanol production. **Journal of cleaner production** v. 64, p. 513 – 534, 2014.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 41, p. 559 – 578, 2015.

ILMÉN, M.; SALOHEIMO, A.; ONNELA, M.; PENTTILÄ, M. 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 form. **Mol. gen. genet.** v. 251, n. 4, p. 451 – 460, 1996.

IMAMOGLU, E.; SUKAN, F. V. Scale-up and kinetic modeling for bioethanol production. **Bioresource technology**. v. 144, p. 311 – 320, 2013.

JANG, J. S.; CHO, Y.; JEONG, G.; KIM, S. Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. **Bioprocess. biosyst. eng.** v. 35, p. 11 – 18, 2012.

JIANG, D.; ZHU, W.; WANG, Y.; SUN, C.; ZHANG, K.; YAHG, J. Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: recent advances and new strategies. **Biotechnology advances**. v. 31, p. 1562 – 1574, 2013.

KAWAI, T.; NAKAZAWA, H.; IDA, N.; OKADA, H.; OGASAWARA, W.; MORIKAWA, Y.; KOBAYASHI, Y. A comprehensive analysis of the effects of the main component enzymes of cellulase derived from *Trichoderma reesei* on biomass saccharification. **J. ind. microbiol. biotechnol.** v. 40, p. 805 – 810, 2013.

KLEIN, M. GRIESS, O.; PULIDINDI, I. N.; PERKAS, N.; GEDANKEN, A. Bioethanol production from *Ficus religiosa* leaves using microwave irradiation. **Journal of environmental management**. v.177, p. 20 – 25, 2016.

KUBICEK, C. P. Systems biological approach towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. **Journal of biotechnology**. v.163, p. 133 – 142, 2013.

LAITY, J. H.; LEE, B. M.; WRIGHT, P. E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. **Current opinion in structural biology**. v. 11, p. 39 – 46, 2001.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in energy and combustion science**. v. 38, p. 449 – 467, 2012.

LIU, R.; CHEN, L.; JIANG, Y.; ZHOU, Z.; ZOU G. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. **Cell Discovery**. 2015. 1, 15007; doi:10.1038/celldisc.2015.7

- LV, D.; WANG, W.; WEI, D. Construction of two vectors for gene expression in *Trichoderma reesei*. **Plasmid**. v. 67, p. 67 – 71, 2012.
- MAGRO, F. G.; DECESARO, A.; BERTICELLI, R.; COLLA, L. M. Produção de bioetanol utilizando microalgas: uma revisão. **Semina: Ciências exatas e tecnológicas**. v. 37, n. 1, p. 159 – 174, 2016.
- MENG, F.; WEI, D.; WANG, W. Heterologous protein expression in *Trichoderma reesei* using the *cbh1* promoter. **Plasmid**. v. 70, p. 272 – 276, 2013.
- MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H. TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M. ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pre treatment. **Renewable and sustainable energy reviews**. v. 27, p. 77 – 93, 2013.
- NAKARI-SETÄLÄ, T.; PALOHEIMO, M.; KALLIO, J.; VEHMAANPERÄ, J.; PENTILLÄ, M.; SALOHEIMO, M. Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production. **Applied and environmental microbiology**. v. 75, n. 14, p. 4853 – 4860, 2009.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Regulação da expressão gênica. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014. p.1155 – 1198.
- PAPWORTH, M.; KOLASINSKA, P.; MINCZUK, M. Designer zinc-finger proteins and their applications. **Gene**. v. 366, p. 27 – 38, 2006.
- PETERSON, R.; NEVALAINEN, H. *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement. **Microbiology**. v. 158, p. 58 – 69, 2012.
- PORTNOY, T.; MARGEOT, A.; LINKE, R.; ATANASOVA, L.; FEKETE, E.; SÁNDOR, E.; HARTL L.; KARAFFA, L.; DRUZHININA, I. S.; SEIBOTH, B.; CROM, S. L.; KUBICEK, C. P. Differential regulation of the cellulase transcription factors XYR1, ACE2, and ACE1 in *Trichoderma reesei* strains producing high and low levels of cellulase. **Eukaryotic cell**. v. 10, n. 2, p. 262 – 271, 2011.
- RIES, L.; BELSHAW, N. J.; ILMÉN, M. PENTTILÄ, M. E.; ALAPURANEN, M.; ARCHER, D. B. The role of CRE1 in nucleosome positioning within the *cbh1* promoter and coding regions of *Trichoderma reesei*. **Appl, microbiol.. biotechnol.** v. 98, p. 749 – 762, 2014.
- RUIZ, H. A; SILVA, D. P.; RUZENE, D. S.; LIMA, L. F.; VICENTE, A. A. TEIXEIRA, J. A. Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain – effect of process conditions. **Fuel**, v. 95, p. 528-536, 2012.
- SAMBUSITI, C.; MONLAU, F.; BARAKAT, A. Bioethanol fermentation as alternative valorization route of agricultural digestate according to a biorefinery approach. **Bioresource technology**. v. 2012, p. 289 – 295, 2016.
- SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable energy**, v. 37, p.19 – 27, 2012.

SAVALIYA, M. L.; DHORAJIYA, B. D.; DHOLAKIYA, B. Z. Recent advancement in production of liquid biofuels from renewable resources: a review. **Res. Chem. Intermed.** v. 41, p. 475 – 509, 2015.

SCHUSTER, A.; BRUNO, K. S.; COLLETT, J. R.; BAKER, S. E.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P.; SCHMOLL, M. A versatile toolkit for high throughput functional genomics with *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for biofuels**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2012.

SEIBOTH, B.; IVANOVA, C.; SEIDL-SEIBOTH, V. *Trichoderma reesei*: a fungal enzyme producer for cellulosic biofuels. Biofuel production – recent developments and prospects. In: BERNARDES, M. A. dos S. **Biofuel production recent developments and prospects**. Croatia: Intech, 2011. p. 309 – 340.

SILVA-ROCHA, R.; CASTRO, L. dos S.; ANTONIÉTO, A. C. C.; GUAZZARONI, M. E.; PERSINOTI, G. F.; SILVA, R. N. Deciphering the cis-regulatory elements for XYR1 and CRE1 regulators in *Trichoderma reesei*. **Plusone**. v.9, n. 6, 2014. e99366

SONG, Y.; WI, S. G.; KIM, H. M.; BAE, H. Cellulosic bioethanol production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) using hydrogen peroxide-acetic acid (HPAC) pretreatment. **Bioresource technology**. v. 214, p. 30 – 36, 2016.

SOUZA, A. P.; GRANDIS, A.; LEITE, D. C. C.; BUCKERIDGE, M. S. Sugarcane as a bioenergy source: history, performance, and perspectives for second-generation bioethanol. **Bioenerg. res.** v.7, p. 24 – 35, 2014.

STEIGER, M. G.; VITIKAINEN, M.; USKONEN, P.; BRUNNER, K.; ADAM, G.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M.; SALOHEIMO, M.; MACH, R. L.; MARCH-AIGNER, R. Transformation system for *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) that favors homologous integration and employs reusable bidirectionally selectable markers. **Applied and environmental microbiology**. v. 77, n. 1, p. 114 – 121, 2011.

STRAUSS, J.; MACH, R. L.; ZEILINGER, S.; HARTLER, G.; STÖFFLER, G.; WOLSCHEK, M.; KUBICEK, C. P. Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. **Federation of European biochemical societies letters**. v. 376, p. 103 – 107, 1995.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v. 2, n.4, p. 707-738, 2007.

WI, S. G.; CHO, E. J.; LEE, D.; LEE, S. J.; LEE, Y. J.; BAE, H. Lignocellulose conversion for biofuel: a new pretreatment greatly improves downstream biocatalytic hydrolysis of various lignocellulosic materials. **Biotechnol. biofuels**. v. 8, p. 228 – 239, 2015.

WORLD ECONOMIC FORUM. **Energy transitions: past and future**. Energy vision, 2013.

## 5.2 Artigo

Ahamed A, Vermette P. 2008. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochem Eng J* 40:399-407.

Aro N, Ilmén M, Saloheimo A, Penttilä M. 2003. ACE1 of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. *Appl Environ Microbiol* 69(1):56-65.

Baeyens J, Kang Q, Appels L, Dewil R, Lv Y, Tan T. 2015. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Prog Energy Combust Sci* 47:60-88.

Borin GP, Sanchez CC, de Souza AP, de Santana ES, de Souza AT, Leme AFP, Squina FM, Buckeridge M, Goldman GH, Oliveira JVC. 2015. Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. *Plos One* 1-20.

Buckeridge MS, Souza AP, Arundale RA, Anderson-Teixeira KJ, de Lucia E. 2012. Ethanol from sugarcane in Brazil: a "Midway" strategy for increasing ethanol production while maximizing environmental benefits. *GCB Bioenergy* 4:119-126.

Castro LS, Antoniêto ACC, Pedersoli WR, Silva-Rocha R, Persinoti GF, Silva RN. 2014. Expression pattern of cellulolytic and xylanolytic genes regulated by transcriptional factors XYR1 and CRE1 are affected by carbon source in *Trichoderma reesei*. *Gene expression patterns* 14:88-95.

Chiaramonti D, Prussi M, Ferrero S, Oriani L, Ottonello P, Torre P, Cherchi F. 2012. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production and development of a innovative method. *Biomass Bioenergy* 46:25-35.

Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P. 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110:119-122.

Colot HV, Park G, Turner GE, Ringelberg C, Crew CM, Litvinkoya L, Weiss RL, Borkovich KA, Dunlap JC. 2006. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *PNAS* 103(25):10352-10357.

García-Torreiro M, López-Abelairas M, Lu-Chau TA, Lema JM. 2016. Fungal pretreatment of agricultural residues for bioethanol production. *Ind Crops Prod* 89:486-492.

Gomes D, Rodrigues AC, Domingues L, Gama M. 2015. Cellulase recycling in biorefineries – is it possible? *Appl Microbiol Biotechnol* 99:4131-4143.

Gupta A, Verma JP. 2015. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable Sustainable Energy* Ver 41:559-578.

Ilmén M, Saloheimo A, Onnella ML, Penttilä ME. 1997. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 63(4):1298-1306.

Imamoglu E, Sukan FV. 2013. Scale-up and kinetic modeling for bioethanol production. *Bioresour Technol* 144:311-320.

Kubicek CP. 2013. Systems biological approach towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. *J Biotechnology* 163:133-142.

Lv D, Wang W, Wei D. 2012. Construction of two vectors for gene expression in *Trichoderma reesei*. *Plasmid* 67:67-71.

Magro FG, Decesaro A, Berticelli R, Colla LM. 2016. Produção de bioetanol utilizando microalgas: uma revisão. *Semina: Ciências exatas e tecnológicas* 37(1):159-174.

Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31(3):426-428.

Mehboob N, Asad MJ, Asgher M, Gulfraz M, Mukhtar T, Mahmood RT. 2014. Exploring thermophilic cellulolytic enzyme production potential of *Aspergillus fumigatus* by the solid-state fermentation of wheat straw. *Appl Biochem Biotechnol* 172(7):3646-3655.

Mood SH, Golfeshan AH, Tabatabaei M, Jouzani GS, Najafi GH, Gholami M, Ardjamand M. 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pre treatment. *Renewable Sustainable Energy Rev* 27:77-93.

Mota Júnior, A. O. Caracterização molecular do gene *ncsA* de *Aspergillus fumigatus*. 2008. 122 f. Tese (Doutorado em biologia celular e molecular) - Faculdade de medicina - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2008.

Nakari-Setälä T, Paloheimo M, Kallio J, Vehmaanperä J, Penttilä M, Saloheimo M. 2009. Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production. *Appl Environ Microbiol* 75(14):4853-4860.

Portnoy T, Margeot A, Linke R, Atanasova L, Fekete E, Sándor E, Hartl L, Karaffa L, Druzhinina IS, Seiboth B, Crom, SL, Kubicek P. 2011. Differential regulation of the cellulase transcription factors XYR1, ACE2, and ACE1 in *Trichoderma reesei* strains producing high and low levels of cellulase. *Eukariotic cell*. 10(2):262-271.

Ries L, Belshaw NJ, Ilmén M, Penttilä ME, Alapuranen M, Archer DB. 2014. The role of CRE1 in nucleosome positioning within the *cbh1* promoter and coding regions of *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:749-762.

Ruiz HÁ, Silva DP, Ruzene DS, Lima LF, Vicente AA, Teixeira JA. 2012. Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain – effect of process conditions. *Fuel* 95:528-536.

Sarkar, N, Ghosh SK, Bannerjee S, Aikat K. 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable energy* 37:19-27.

Savaliya ML, Dhorajiya BD, Dholakiya BZ. 2015. Recent advancement in production of liquid biofuels from renewable resources: a review. *Res Chem Intermed* 41:475-509.

Schuster A, Bruno KS, Collett JR, Baker SE, Seiboth B, Kubicek CP, Schmoll M. 2012. A versatile toolkit for high throughput functional genomics with *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Biofuels* 2(1):1-10.

Silva-Rocha R, Castro LS, Antoniêto ACC, Guazzaroni ME, Persinoti FG, Silva RN. 2014. Deciphering the cis-regulatory elements for XYR1 and CRE1 regulators in *Trichoderma reesei*. *PlusOne* 9(6) e99366.

Song Y, Wi SG, Kim HM, Bae HJ. 2016. Cellulosic bioethanol production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) using hydrogen peroxide-acetic acid (HPAC) pretreatment. *Bioresour Technol* 214:30-36.

Souza AP, Leite, DCC, Pattathil S, Hahn MG, Buckeridge MS. 2013. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. *Bioenergy Res* 6(2):564-579.

Steiger MG, Vitikainen M, Uskonen P, Brunner K, Adam G, Pakula T, Penttilä M, Saloheimo M, Mach RL, Mach-Aigner AR. 2011. Transformation system for *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) that favors homologous integration and employs reusable bidirectionally selectable markers. *Appl Environ Microbiol* 77(1):114-121.

Taherzadeh MJ, Karimi K. 2007. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources* 2(4):707-738.