



PCF-UNIOESTE

Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS MUTANTES DO FUNGO  
*Trichoderma reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1**

**INDIANARA KAWANA BUENO**

**CASCAVEL – PR  
2018**

**INDIANARA KAWANA BUENO**

**CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS MUTANTES DO FUNGO**  
***Trichoderma reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre na Área de Concentração em Ciências Farmacêuticas, na Linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

**ORIENTADOR: PROF. DR. ALEXANDRE  
MALLER**

**CASCADEL - PR  
2018**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Sistema de Bibliotecas - UNIOESTE)

B94c	<p>Bueno, Indianara Kawana. Caracterização das linhagens mutantes do fungo <i>Trichoderma reesei</i> Rut-C30Δzface1 / Indianara Kawana Bueno. --- Cascavel (PR), 2018. 58 f.: il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2018, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Inclui Bibliografia</p> <p>1. <i>Trichoderma reesei</i>. 2. Deleção. 3. Celulase. 4. ACE1. 5. Bioetanol. I. Maller, Alexandre. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 615.1</p>
------	---

Rosângela A. A. Silva – CRB 9º/1810

**INDIANARA KAWANA BUENO**

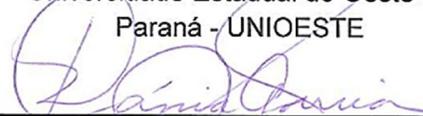
**CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS MUTANTES DO FUNGO  
*Trichoderma reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1**

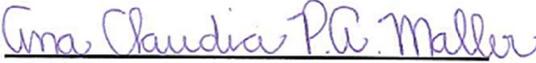
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre na Área de Concentração em Ciências Farmacêuticas, na Linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller

**BANCA EXAMINADORA:**

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

  
Prof. Dra. Rita de Cássia Garcia Simão  
Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná – UNIOESTE

  
Prof. Dra. Ana Claudia Paiva Alegre  
Maller  
Faculdade Assis Gurgacz - FAG

## **INDIANARA KAWANA BUENO**

### **BIOGRAFIA RESUMIDA**

Indianara Kawana Bueno, natural de Ubitatã, Paraná, Brasil, nascida no dia 31 de março de 1990, graduada em Farmácia pela Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, campus de Barra do Garças em abril de 2014. Ingressou no mercado de trabalho, ao atuar na Droga Raia em 2014. No ano de 2015, trabalhou como farmacêutica hospitalar na União Oeste Paranaense de Estudo e Combate ao Câncer – UOPECAN. De 2015 a 2017 atuou nas farmácias e drogarias Nissei. De 2016 a 2018 atuou também como mestranda no programa de Pós-graduação stricto sensu em Ciências Farmacêuticas. Desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas, com aplicações biotecnológicas e em saúde, orientada pelo Dr. Alexandre Maller.

“Faz forte ao cansado, e multiplica as forças ao que não tem nenhum vigor. Os jovens se cansam e se fatigam, e os moços de exaustos caem, mas os que esperam no Senhor renovam as suas forças, sobem com asas como águias, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam.”

*(Isaias 40:29-31)*

Dedico essa dissertação a minha avó Maria Carniatto, esse sonho sempre foi nosso, a estrada tornou-se muito mais difícil sem você ao meu lado, mas em sua memória, conseguimos.

Ofereço também a Deus, que me protege nas minhas batalhas e sempre ilumina meu caminho me mantendo na direção que o Senhor sabe que é melhor para mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, o centro e o fundamento de tudo. Ele me fez não desistir desse sonho e me acompanhou renovando a cada momento a minha força.

Agradeço ao meu avô, Antônio Ferreira, que juntamente com minha avó sempre foram meus maiores exemplos. Obrigada por cada incentivo e orientação, pelas orações em meu favor, pela preocupação para que estivesse sempre andando pelo caminho correto.

A minha mãe e toda minha família que sempre se faz presente, por todo amor e carinho. Obrigada por auxiliarem em todas as minhas escolhas, cada incentivo, ajuda e conselho foi inestimável pra mim.

Aos amigos conquistados nesses dois anos, por todos os momentos de incentivo e pelos muitos momentos de alegria. Juliana Pagnonceli, Juliana Moço, Larissa, Débora Dudek, Débora Jacomini, Carla e Letícia obrigada pela paciência, pelo sorriso, pelo abraço, pela mão que sempre se estendia quando eu precisava. Esta caminhada não seria possível sem vocês. Agradeço em especial a Débora N. Dudek que me passou este trabalho e me mostrou como dar continuidade a ele. Obrigada por me auxiliar até o último momento.

Aos colegas da turma 2016 do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por confiarem a mim a responsabilidade de representar a todos vocês.

Aos professores que partilharam seu conhecimento comigo, pelo zelo e dedicação que sempre dispensaram a mim.

Aos professores do laboratório de bioquímica, por todas as dúvidas sanadas.

Ao Dr. Wilsione Carneiro, da Universidade Federal de Mato Grosso pelo carinho especial. Obrigada por me dizer que eu era uma professora, e que meu futuro era ser sua colega. Seu conselho me incentivou a acreditar que ser professora era uma opção para mim. Agradeço também pela disposição em ser um dos membros da minha banca examinadora, novamente suas palavras me fizeram querer continuar andando por essa estrada.

A Dra. Juliana Moço Corrêa, pela amizade e todo ensinamento passado a mim nesses anos. Obrigada por aceitar ser membro da minha banca de defesa, estando comigo do começo ao fim do mestrado.

A Dra. Rita de Cássia Garcia Simão por todo o auxílio prestado durante esse projeto, sua ajuda foi essencial desde o início dessa etapa da minha formação. Obrigada pelas palavras de sabedoria dadas a mim quando eu mais precisava.

A Dra. Ana Claudia Paiva Maller por também aceitar fazer parte da minha banca. Obrigada por todos os conselhos, foram muito importantes para o término desse trabalho.

Ao meu orientador Dr. Alexandre Maller pela disponibilidade e paciência em me ensinar e pela orientação prestada para a realização desse mestrado.

A coordenação do PCF por toda atenção e respeito dispensados a mim.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, por esta oportunidade.

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

“Que todo o meu ser louve ao Senhor, e que eu não esqueça nenhuma das suas bênçãos!”

(Salmos 103:2)

## CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS MUTANTES DO FUNGO

### *Trichoderma reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1

#### Resumo

Com a depleção eminente das fontes de combustíveis fósseis, torna-se cada vez mais imprescindível a busca por fontes renováveis de energia. Neste âmbito, o Brasil tem destaque no cenário mundial, pois já utiliza o etanol a partir da cana-de-açúcar há algumas décadas. O etanol de segunda geração (2G) é produzido a partir da massa lignocelulolítica do vegetal, que é composta de celulose, hemicelulose e lignina. A hidrólise desses compostos necessita de um coquetel enzimático específico e de alto custo. Neste cenário, o fungo *Trichoderma reesei* ganha destaque, pois é um dos microrganismos com maior potencial para produção de enzimas hidrolíticas. Desta forma, as tentativas de aumentar a produção de celulasas desse fungo, torna a produção do bioetanol uma alternativa mais atrativa ao mercado. Este trabalho teve como objetivos confirmar a deleção da sequência que codifica o dedo de zinco do fator de transcrição do repressor de celulase ACE1 da linhagem *T. reesei* RUT-C30 e caracterizar a produção enzimática dessas linhagens mutantes denominadas *T. reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1. A confirmação de deleção ocorreu pela ausência de amplificação do gene *ace1* nos mutantes e amplificação de um fragmento de 479 pb na linhagem parental RUT-C30, quando utilizados os mesmos *primers* e condições de reação de PCR. A dosagem enzimática com os substratos carboximetilcelulose (CMC), celulose microcristalina (Avicel®) e papel de filtro Whatman (PF), mostraram que o RUT-C30 $\Delta$ zface1 tem a atividade celulolítica aumentada em até 3,2 vezes em Avicel e 2,1 vezes em CMC e PF em comparação à linhagem parental RUT-C30. Em 24 horas de hidrólise os mutantes apresentaram liberação de açúcar 1,4 vezes maior em relação ao RUT-C30. Estes resultados sugerem que a deleção parcial do fator de transcrição ACE1 é um proeminente caminho para a conquista de uma produção de bioetanol economicamente viável.

#### Palavras chaves

*Trichoderma reesei*; deleção; ACE1; celulase; bioetanol.

## CHARACTERIZATION OF THE CELLULOLYTIC PROFILE OF THE MUTANT STRAINS *Trichoderma reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1

### Abstract

The research for renewable energy sources became even more essential due the imminent depletion of the fossil fuel sources. In this context Brazil has a prominent position on the world stage, since it has already used ethanol from sugar cane for some decades. The second generation ethanol (2G) is produced from the lignocellulosic biomass of the vegetable, which is composed by cellulose, hemicellulose and lignin. The hydrolysis of these compounds requires a specific and high cost enzymatic cocktail. On this scenario, the *Trichoderma reesei* fungus gains spotlight, since it is one the microorganisms with the highest potential to produce hydrolytic enzymes. Therefore, the attempt to increase the cellulases production of this fungus is an important for the production of biofuels more attractive to the market. The aim of this work is to confirm the deletion of the sequence which codifies the zinc finger motif of the transcription factor ACE1 for cellulose repression from the *T. reesei* RUT-C30 strain and to characterize the enzymatic production of these mutant strains named *T. reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1. The enzymatic quantification was carried using the substrates carboxymethyl cellulose, microcrystalline cellulose and Whatman paper filter. The deletion confirmation occurred by the absence of the amplification gene *ace1* on the mutants and the amplification of a 429 pb fragment of the RUT-C30 parental strain when the same primers and PCR conditions where used. These results suggest that the deletion of the zinc finger motif of the from ACE1 transcription factor is a prominent way to achieve an economically viable production of bioethanol.

### Key words:

*Trichoderma reesei*; deletion; ACE1; cellulase; bioethanol.

## SUMÁRIO

<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>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>viii</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
3.1. Biomassa.....	4
3.2. Sistema celulolítico.....	7
3.3. <i>Trichoderma reesei</i> e seus mecanismos de controle de produção e expressão de celulasas.....	10
3.4. Isolamento de DNA e caracterização de linhagens.....	13
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
4.1. Meios e soluções utilizados.....	16
4.2. Linhagens.....	17

4.3. Crescimento das linhagens mutantes em meio suplementado com higromicina B.....	17
4.4. Extração do DNA genômico de <i>T. reesei</i> .....	17
4.5. Confirmação de deleção gênica.....	19
4.6. Características e taxa de crescimento das linhagens.....	19
4.7. Indução da produção enzimática por lactose.....	20
4.8. Testes de Hidrólise.....	21
4.9. Análise estatística.....	22
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
5.1. Crescimento das linhagens mutantes em meio suplementado com higromicina B.....	23
5.2. Extração de DNA e confirmação de deleção gênica.....	25
5.3. Características e taxa de crescimento das linhagens mutantes.....	28
5.4. Indução de produção enzimática por lactose.....	32
5.5. Testes de Hidrólise.....	36
5.5.1. Hidrólise em placa.....	36
5.5.2. Hidrólise de biomassa.....	38
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>41</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Diferenças entre hemicelulose e celulose.....	6
<b>Tabela 2</b>	Soluções e meios utilizados.....	16
<b>Tabela 3</b>	<i>Primers para amplificação da região codificadora do dedo de zinco do gene ace1</i> .....	19
<b>Tabela 4</b>	Medidas das médias (mm) do crescimento das colônias mutantes e parental.....	30

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Componentes da fração hemicelulose da biomassa.....	6
<b>Figura 2</b>	Ação sinérgica das celulases.....	8
<b>Figura 3</b>	Enzimas envolvidas no processo de hidrólise da hemicelulose.....	9
<b>Figura 4</b>	Principais mutantes gerados a partir da linhagem.....	11
<b>Figura 5</b>	Diâmetro do halo de crescimento micelial.....	20
<b>Figura 6</b>	Teste com corante vermelho Congo.....	22
<b>Figura 7</b>	Resistência a higromicina B.....	24
<b>Figura 8</b>	Comparação entre os métodos de extração adaptado de Doyle (1987) (a) e Bueno & Maller (b).....	26
<b>Figura 9</b>	Comparação das concentrações de DNA entre os protocolos adaptado de Doyle (1987) e Bueno & Maller.....	26
<b>Figura 10</b>	Comparação do grau de pureza dos DNAs entre os protocolos adaptado de Doyle (1987) e Bueno & Maller.....	27
<b>Figura 11</b>	Confirmação da deleção da região codificadora do dedo de zinco do fator de transcrição ACE1.....	28
<b>Figura 12</b>	Morfologia e crescimento das colônias RUT-C30 e RUT-C30 $\Delta$ zface1.....	29
<b>Figura 13</b>	Comparação entre as médias de crescimento micelial, dos mutantes em relação ao RUT-C30, durante 168 horas de incubação.....	31
<b>Figura 14</b>	Relação entre tempo de incubação e produção enzimática.....	33
<b>Figura 15</b>	Comparação da produção enzimática em 24 (a) e 48 horas (b) de indução por lactose.....	35
<b>Figura 16</b>	Halos de hidrólise com corante vermelho Congo. (a)- RUT-C30, (b)- RUT-C30 $\Delta$ zface1-1, (c)- RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 e (d)- RUT-C30 $\Delta$ zface1-3.....	36
<b>Figura 17</b>	Comparação entre os índices enzimáticos em 96 horas de incubação.....	37
<b>Figura 18</b>	Hidrólise de biomassa das linhagens mutantes em comparação a RUT-C30.....	38

## 1. INTRODUÇÃO

Com a escassez eminente do petróleo e sua total depleção prevista em algumas décadas, a busca por fontes renováveis de energia tem se tornado cada vez maior. Neste contexto, o Brasil tem destaque mundial, pois domina a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, que além de ser uma fonte renovável, possui menor emissão de gases poluentes na atmosfera e torna o país economicamente independente do mercado mundial de petróleo.

Com a crescente demanda de etanol levantou-se dois principais problemas, primeiramente a questão ambiental do descarte da grande quantidade de resíduos produzidos anualmente, que chega aproximadamente a 350 milhões de toneladas. O segundo problema é o aumento da área de plantio, pois a cana-de-açúcar é cultivada em terras de boa qualidade que poderiam ser utilizadas para o plantio de alimentos. Com o propósito de minimizar esse problema a biotecnologia tem despendido para a síntese do etanol de segunda geração (2G), este produto é fabricado a partir dos resíduos lignocelulósicos e sua produção dobraria a quantidade de etanol disponível ao consumo sem aumentar a área de plantio.

Neste interim, e considerando que os principais componentes da biomassa lignocelulósica é a hemicelulose e a celulose, a alta produção de enzimas que sejam capazes de hidrolisar essas substâncias, desperta um interesse industrial cada vez maior.

A busca do homem por uma energia sustentável despertou o interesse por encontrar formas econômicas de hidrolisar a biomassa. Apesar de existir métodos químicos de hidrólise, esse processo tem alto custo e baixo rendimento, então formas biológicas de hidrólise são alternativas mais econômicas e limpas, visto que não tem como resíduos, componentes nocivos ao meio ambiente.

Desde o isolamento do *Trichoderma reesei*, sua ação de degradar materiais não foi vista como um problema e sim como um recurso valioso. Este é um fungo filamentososo, que possui alto potencial para a produção de enzimas hidrolíticas, sendo assim amplamente utilizado na engenharia genética para a produção de mutantes que visam aumentar o rendimento de produção enzimática. A espécie *T. reesei* é a mais caracterizada e utilizada pela indústria para a produção de celulasas e hemicelulasas. Este trabalho caracterizou a morfologia e perfil de produção enzimática das linhagens mutantes *T. reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1, criadas a partir da deleção do motivo dedo de zinco de ligação ao DNA do fator de transcrição ACE1 na linhagem hiperprodutora de celulase RUT-C30. Essa deleção genética proporciona

maior eficiência da produção de enzimas hidrolíticas para a otimização da produção de bioetanol.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

A meta desse trabalho foi caracterizar a morfologia e o perfil de produção enzimática das linhagens mutantes do fungo *Trichoderma reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1, visando comprovar a otimização na produção celulolítica desta linhagem.

### 2.2. Objetivos específicos

- Confirmar a deleção parcial do gene *ace1*;
- Caracterizar o crescimento, produção enzimática e morfologia das linhagens;
- Determinação da atividade das celulasas;
- Verificar a hidrólise de biomassa.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Biomassa

Em média 80% da energia gerada no mundo provêm dos combustíveis fósseis, como o petróleo, carvão mineral, gás natural, além de energia nuclear. Estas fontes de energia não são renováveis e suas reservas estão se esgotando rapidamente. Além das previsões estimarem que em algumas décadas as reservas de combustíveis fósseis sofrerão total depleção (POPP et al., 2014; RAGHUWANSHI *et al.*, 2014; GUPTA; VERMA, 2015), também há um grande impacto ambiental na utilização desses combustíveis. Como o aumento no desmatamento e as alterações climáticas provocadas pela queima desses combustíveis, que libera para a atmosfera gases poluentes responsáveis pelo efeito estufa (PEREIRA Jr. et al., 2008). Neste contexto, a busca por fontes renováveis de energia vem aumentando exponencialmente. A utilização da água, vento, sol e biomassa, servem como alternativa para a produção de combustíveis. O material celulósico além de ser renovável é a fonte de carbono mais abundante no mundo (LIMING; XUELIANG, 2004), e por isso em pouco tempo será uma das principais fontes de energia produzidas e consumidas no mundo (SANTOS, 2012). Esta será uma das fontes alternativas mais importantes para a indústria, tendo em vista que todos os combustíveis provenientes do petróleo podem ser substituídos por fontes de biomassa, como a cana-de-açúcar, milho, arroz entre outras. A biomassa já se apresenta como matéria-prima predominante de energia em alguns países, como a Quênia, Índia, Brasil, entre outros da América do Sul (SARKAR et al. 2012).

O Brasil ganha destaque mundial por utilizar o álcool como principal combustível, pois coloca o país em uma situação favorável, tanto na maior independência do petróleo, quanto na redução de gases poluentes emitidos para a atmosfera (MAPA, 2010). Só no ano de 2003, deixou-se de emitir 27,5 milhões de toneladas de CO<sub>2</sub> na atmosfera. De 2003 a janeiro de 2010, este valor chegou a 83,5 milhões de toneladas (MACEDO et al. 2008).

Devido a crescente demanda mundial de álcool, o Brasil terá que expandir a área de plantio da cana-de-açúcar. Esse plantio é realizado em terras aráveis de boa qualidade que poderia ser utilizada para o plantio de alimentos, e se menos alimentos serão plantados, então eles poderão se tornar cada vez mais caros (KOHLHEPP 2010; AGUIAR 2014).

A fim de evitar uma expansão desenfreada das áreas de cultivo, tem-se empregado técnicas biotecnológicas que permitam utilizar a biomassa lignocelulósica residual da cana-de-açúcar para produção do bioetanol de segunda geração. A produção do etanol gera muitas toneladas de resíduos de cana-de-açúcar, e todo esse resíduo tem um enorme potencial de conversão de açúcares em combustível (PEREIRA Jr. et al., 2008; RUIZ et al., 2012).

A utilização do bagaço da cana-de-açúcar pode dobrar a quantidade de litros produzidos por hectare. Um hectare de cana-de-açúcar produz de 6.000 a 7.000 litros de etanol. Com a utilização do bagaço, esse rendimento pode chegar entre 12.000 e 15.000 litros por hectare (ROCHA, 2011).

A quantidade de resíduos lignocelulósico gerado no Brasil por ano chega à média de 350 milhões de toneladas (PEREIRA JR, 2008). Estima-se que para cada tonelada de cana-de-açúcar que é processada, são geradas por volta de 140 Kg de palha e 140 Kg de bagaço (SANTOS 2012).

O principal componente da biomassa vegetal é a lignocelulose, sendo constituída pela celulose, hemicelulose e lignina. Os polissacarídeos compõem cerca de 70% da massa seca, e estão entremeados pela lignina (LEE, 1997; IVANOVA *et al.*, 2013).

A celulose compõe de 23% a 50% da matéria vegetal seca, é um polímero linear de alto peso molecular, de até 15.000 unidades de  $\beta$ -D-glicoses que se unem por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 carbono-carbono (ARANTES & SADDLER, 2010). A celulose é uma estrutura rígida e suas ligações intramoleculares formam fibrilas, que se associam e formam as fibras de celulose. As fibrilas possuem regiões com alto grau de cristalinidade e regiões com menor grau de ordenação, chamadas de regiões amorfas. Essas regiões têm menor resistência e maior flexibilidade, e devido a isso essas regiões são os alvos de enzimas hidrolíticas (VÁSQUEZ et al., 2007).

A hemicelulose corresponde entre 15% a 45% do vegetal seco, é formada de cadeias lineares ou ramificadas de açúcares, que inclui majoritariamente aldopentoses, como a xilose e a arabinose e aldohexoses, como glicose, manose e galactose. Contém também ácidos hexurônicos, como os ácidos D-4-*o*-metilglucurônico,  $\beta$ -D-glucurônico, e  $\beta$ -D-galacturânico, representados na Figura 1 (KOOTSTRA et al., 2009; MORAIS, 2005). As hemiceluloses possuem alto peso molecular, de 100 a 200 unidades glicosídicas, é mais suscetível à hidrólise, pois não possuem regiões cristalinas (SUN & CHENG, 2005).

A Tabela 1 mostra as principais características da celulose e da hemicelulose. Saber essas diferenças é extremamente necessário para definir as melhores estratégias para a produção de bioetanol a partir da biomassa (PEREIRA Jr. et al. 2008).

A lignina é uma macromolécula formada por unidades de fenilpropano que estabelecem ligações cruzadas entre si. Os precursores primários da lignina são o álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (LEMOS, 2001).

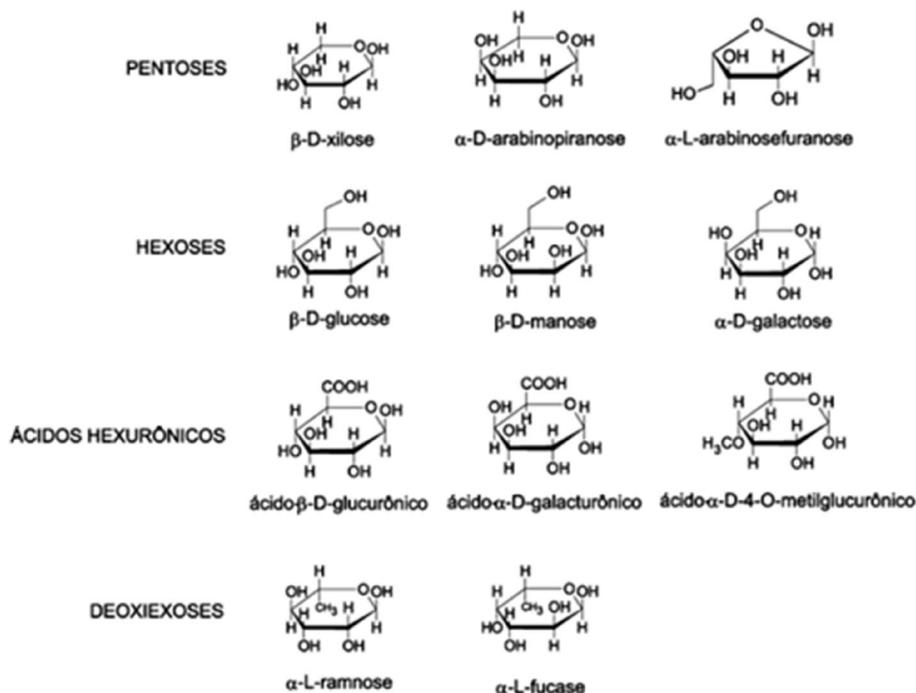


Figura 1 Componentes da fração hemicelulose da biomassa (modificado de MORAIS, 2005).

Tabela 1 Diferenças entre hemicelulose e celulose (modificado de PEREIRA Jr. Et al., 2008).

CELULOSE	HEMICELULOSE
Unidades de glicose unidas entre si.	Unidades de diferentes pentoses e hexoses ligadas entre si.
Alto grau de polimerização (1000 a 15000 unidades de glicose).	Baixo grau de polimerização (60 a 300 unidades de açúcares).
Forma arranjo fibroso.	Não forma arranjo fibroso
Apresenta regiões amorfas e cristalinas.	Apresenta somente regiões amorfas.
É atacada lentamente por ácido inorgânico diluído a quente.	É atacada rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente.
É insolúvel em álcalis.	É solúvel em álcalis.

A lignina forma um complexo robusto e uma rede parcialmente cristalina. Não há produção de etanol a partir dessa macromolécula, no entanto sua metabolização é fundamental para o sucesso da hidrólise, pois a lignina dificulta o acesso à celulose (PEREIRA Jr.et al., 2008).

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica inclui pré-tratamento, hidrólise e fermentação (RUIZ et al., 2012). O pré-tratamento desorganiza a estrutura cristalina da macro e micro fibrila para libertar as cadeias poliméricas de celulose e hemicelulose. Esse processo também pode modificar os poros do material, permitindo a penetração das enzimas nas fibras a fim de torna-las passíveis a ação das enzimas hidrolíticas (TAHERZADEH; KARIMI, 2007). A hidrólise é um dos principais processos para fabricação do bioetanol, e pode ser química ou biológica. Devido ao alto custo e baixo rendimento do processo químico, a hidrólise biológica é a preferida. A hidrólise biológica pode reduzir aproximadamente 40% do valor de produção do álcool a partir da biomassa (BENDIG; WEUSTER-BOTZ, 2013). Nesse tipo de hidrólise, são utilizados microrganismos que secretam enzimas capazes de realizar a quebra da celulose, ou seja, enzimas que realizam a hidrólise de celulose em glicose. Muitos fungos estão sendo reportados para esse uso, como o *Trichoderma*, *Phanerochaete* e *Penicillium*. Por fim têm-se a fermentação biológica, na qual a glicose é convertida em etanol através de microrganismos, como o *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehatae* e *Escherichia coli* (GUPTA; VERMA, 2015).

### 3.2. Sistema celulolítico

Hidrólise é a quebra de ligações químicas na presença de água, com inclusão de um hidrogênio e uma hidroxila as moléculas separadas (SZENGYEL, 2000). As enzimas hidrolíticas são produzidas em grande quantidade por algumas bactérias anaeróbicas e por fungos filamentosos (AGUIAR; LUCENA, 2011). As hidrolases, que despolimerizam a polpa de celulose, podem ser divididas em celulases e hemicelulases (THONGEKKAEW et al., 2008).

As celulases podem ser divididas em três grupos de acordo com seu local de ação no substrato celulósico: endoglicanases (EnG), celobiohidrolases (CBH) ou exoglicanases (ExG) e  $\beta$ -glicosidases (BG) (KOBBLITZ, 2008).

As endoglicanases (Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanases - E. C. 3.2.1.4), são responsáveis por iniciar a hidrólise da celulose, atuam randomicamente na região

amorfa, clivando ligações  $\beta$ -1,4 na região central da molécula, liberando oligossacarídeos (DIENES et al., 2004; FLORENCIO, 2011).

As exoglicanases (exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase, EC 3.2.1.91), atuam nas extremidades da molécula, liberando unidades de celobiose. Essa enzima é constituída por celobiohidrolase (CBH) e glucano-hidrolase (GH).

A GH hidrolisa a fibra celulósica, sendo capaz de liberar glicose diretamente do polímero. A CBH catalisa a hidrólise nos terminais não-redutores e oligossacarídeos em celobiose, há relatos que essa enzima atua também em terminais redutores. A CBH é responsável pela hidrólise primária da fibra e também tem a importante função de tornar as regiões cristalinas em regiões amorfas, assim aumenta a exposição do polímero às celulasas, e conseqüentemente há aumento da taxa de hidrólise. A celobiohidrolase é dividida em dois grupos: tipo I, que hidrolisa terminais redutores e o tipo II, que hidrolisam terminais não redutores (CAO & TAN, 2002).

As  $\beta$ -glicosidases (1,4-  $\beta$ -D-glicosidase, EC 3.2.1.21), hidrolisam a celobiose e oligossacarídeos solúveis de cadeia curta em glicose. Assim como a celobiohidrolase, essa enzima também é inibida pelo seu produto de hidrólise. As enzimas podem atuar sinergicamente, como ilustrado na Figura 2. Quando a ação sinérgica acontece, há aumento de rendimento do produto final (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

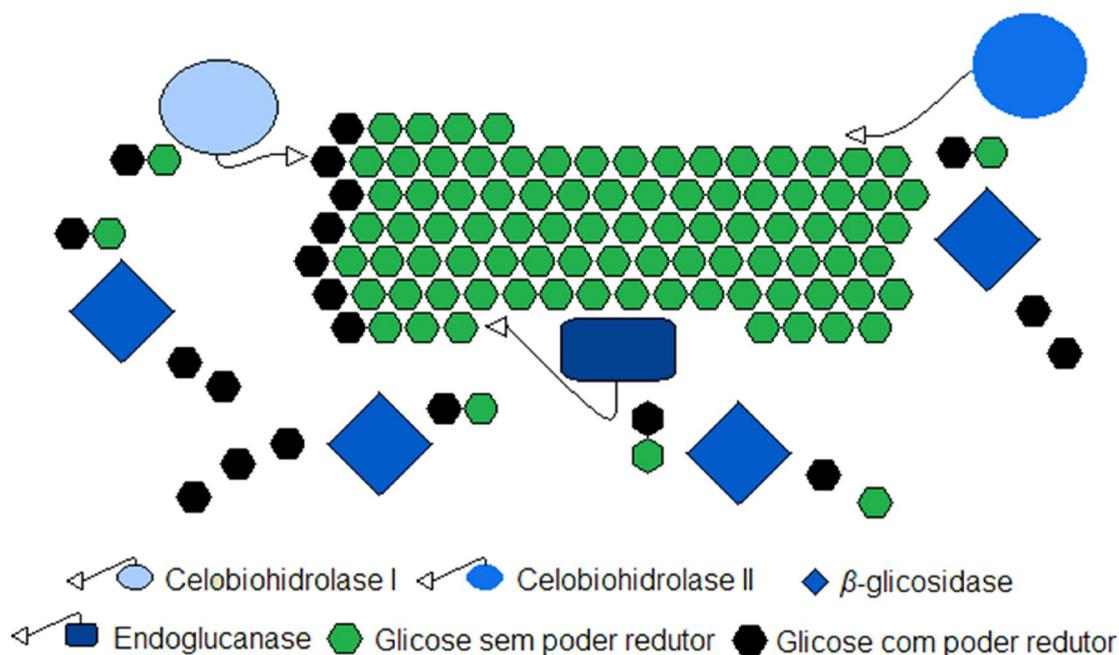


Figura 2 Ação sinérgica das celulasas (modificado de CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

As hemicelulases possuem alta complexidade e atuam quebrando cadeias poliméricas de hemicelulose. As xilanases e as  $\beta$ -glucanases são as hemicelulases mais conhecidas (KOBLOITZ, 2008). A Figura 3 mostra as principais enzimas envolvidas na hidrólise da hemicelulose. As enzimas do complexo celulolítico são inibidas pelo seu produto de hidrólise (ARANTES & SADDLER, 2010).

A hemicelulose atua como um elo químico entre a celulose e a lignina, o xilano é o principal componente dessa fração, e é também o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (HÄKKINEN *et al.*, 2014). As unidades de açúcar são ligadas por ligações do tipo glicosídicas  $\beta$ -1,4. A fração hemicelulósica é muito complexa e sua degradação necessita da ação de várias enzimas. As principais enzimas que degradam a hemicelulose são duas glicosil hidrolases, a endo-1,4- $\beta$ -D-xilanase e a endo-1,4- $\beta$ -D-mananase (COLUSSI, 2016). Todas as enzimas do complexo celulolítico são inibidas pelo seu produto de hidrólise (ARANTES & SADDLER, 2010).

O *T. reesei* possui grande capacidade de produção de celulasas e vem sendo amplamente estudado por vários campos da biotecnologia, no intuito de desenvolver métodos mais eficientes para conversão da biomassa em açúcares fermentáveis (HERPOËL-GIMBERT *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2014).

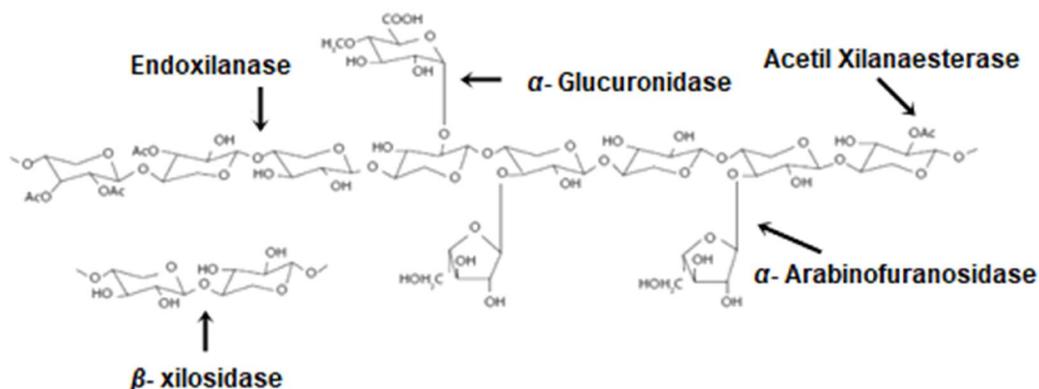


Figura 3 Enzimas envolvidas no processo de hidrólise da hemicelulose (modificado de CGEE, 2010).

### **3.3. *Trichoderma reesei* e seus mecanismos de controle de produção e expressão de celulases**

O gênero *Trichoderma* foi descrito pela primeira vez por Persoon e Gray em 1801. São fungos saprófitos mesofílicos, que quando cultivado, em geral possuem um aspecto verde brilhante (PELCZAR et al., 1980; SILVEIRA, 1995).

O *T. reesei* é um anamorfo do *Hypocrea jecorina*, que cresce aerobicamente no solo e em biomassa vegetal morta. Rapidamente *T. reesei* tornou-se um dos fungos mais estudados, por apresentar uma grande capacidade celulolítica. O primeiro isolado desse fungo foi denominado QM6a, sendo que várias linhagens mutantes foram desenvolvidas a partir dele, a fim de conseguir uma linhagem de *T. reesei* mais eficiente na produção de celulases (RIES et al., 2014).

Entre as enzimas hidrolíticas secretadas por esse fungo têm-se duas celobiohidrolases (CHB I e CHB II) e duas endoglicanases (EG1 e EG2), que somam 90% do coquetel enzimático, já a quantidade de  $\beta$ -glucosidases, secretadas pelo *T. reesei* não chegam a 1% (MARGEOT et al., 2009).

Existem cinco fatores de transcrição importantes no processo de regulação dos genes que codificam celulases e hemicelulases. Entre os reguladores positivos estão o XYR1, ACE2 e o complexo HAP2/3/5, os dois reguladores negativos são o ACE1 e o repressor catabólico do carbono CRE1 (CASTRO et al., 2014).

Estudos demonstram que a deleção de *ace1*, induzidas por sofrose e celulose resultaram no aumento da expressão dos principais genes de celulase e hemicelulase (PORTNOY et al., 2011).

O CRE1 é o principal regulador negativo da transcrição dos genes das celuloses, esse fator é um repressor catabólico, que na presença de glicose, reprime os genes que codificam as celulases, priorizando a liberação de açúcares mais simples, e reprimindo a degradação de polissacarídeos vegetais (RIES et al., 2014).

Com a intenção de incrementar a produção enzimática deste fungo, técnicas como mutação clássica e expressão gênica são amplamente utilizadas nesse fungo (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Os laboratórios Natick foram os pioneiros na geração de mutantes a partir da de *T. reesei* QM6a. Por meio de um acelerador linear foi realizada irradiação dos conídios dessa linhagem, e o mutante mais bem-sucedido dessa mutagênese foi a linhagem QM9414, que apresentou produção de celulases até quatro vezes maior que a linhagem selvagem (MANDELS; REESE, 1957; MONTENECOURT; EVELEIGH, 1977).

A linhagem QM9414 permanecia com a repressão catabólica ativa, e a tentativa de inibir esse sistema de repressão levou pesquisadores na Rutgers University, Nova Jersey, realizarem novos programas de mutagênese. E foi nesse programa que a linhagem hipercelulolítica RUT-C30 foi obtida. Essa linhagem foi gerada em três etapas.

A primeira etapa consistiu em mutagênese por luz ultravioleta (UV) e rastreio em placa de linhagens com ausência de repressão catabólica. Dessa etapa foi isolada a linhagem M7.

A partir de M7 foi realizada uma mutagênese adicional por N-nitroguanidina que gerou a linhagem NG14. Essa linhagem apresentou atividade cinco vezes maior em papel filtro e superou em duas vezes a atividade de  $\beta$ -glucosidase e endoglucanase em relação a QM9414.

Por fim teve-se a última rodada de mutagênese por luz UV, seguida de triagem para alta atividade de celulase e desrepressão catabólica por resistência ao antimetabolito 2-desoxiglucose (2DG). Após essas três rodadas de mutagênese a linhagem RUT-C30 foi isolada (MONTENECOURT; EVELEIGH, 1977; MONTENECOURT; EVELEIGH, 1979; PETERSON; NEVALAINEN, 2012).

Entre todas as linhagens mutantes a RUT-C30 é a mais reportada e usada industrialmente. No entanto, existem inúmeras linhagens descritas que foram geradas na tentativa de aumentar a produção de celulases. As principais linhagens mutantes estão discriminadas na Figura 4, entretanto nenhuma conseguiu se sobressair à linhagem RUT-C30.

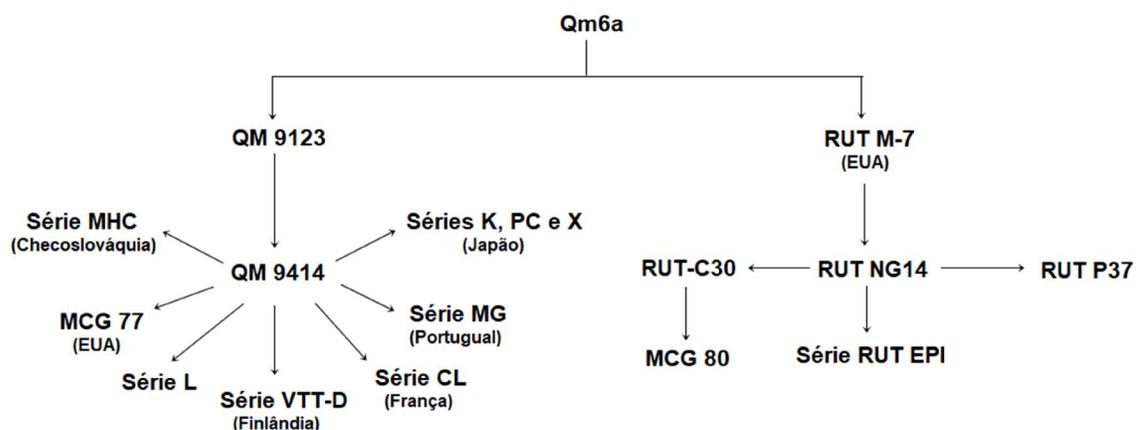


Figura 4 Principais mutantes gerados a partir da linhagem selvagem (modificado de CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

A maioria dos mutantes reportados na literatura foram criados através da superexpressão ou deleção dos genes que estão envolvidos no processo de regulação das celulases e hemicelulases. Uma das técnicas em destaque é a deleção de genes através da inserção de um cassete de deleção que também tenha ação de marcador de seleção (MACH; SCHINDLER; KUBICEK, 1994; SIVAN *et al.*, 1992).

Vários marcadores de seleção foram desenvolvidos ao longo dos anos, no entanto há poucos que podem ser aplicados para uso em comum. Os três marcadores mais descritos que podem ser utilizados para varias espécies é o hph, pyr4 e amdS (DERNTL *et al.*, 2015).

O gene que confere a resistência à higromicina B foi isolado da *Escherichia coli* e clonado em pBR322 (RAO *et al.*, 1983). Este antibiótico é um aminoglicosídeo que é ativo tanto contra células procarióticas quanto eucarióticas. Desde seu desenvolvimento na década de 50, esse antibiótico vem sendo utilizado em experimentos de transferência de genes, hoje é universalmente aplicado laboratorialmente para seleção e manutenção de células que carregam o gene de resistência, hph. Este gene codifica uma quinase que inativa a higromicina B através de sua fosforilação (RAO *et al.*, 1983; BRODERSEN *et al.*, 2000)

Podemos encontrar na literatura, vários mutantes que tiveram o gene hph inserido em seu gene através de um cassete de deleção. Sivan *et al.* (1992) utilizou essa técnica para produção da linhagem *T. viride* T 105-227 Nic-. Steiger *et al.* (2011) realizou sucessivas deleções de genes na linhagem *T. reesei* QM6a, sempre utilizando o mesmo cassete de deleção com o marcador hph. Fang e Xia (2013) utilizaram o plasmídeo pCAMBIA1300-hph-PsCT para obter a linhagem *Trichoderma reesei* ZU-02 recombinante e Derntl *et al.* (2015) utilizou técnica semelhante para deletar o gene xpp1 na linhagem *T. reesei* QM6a $\Delta$ tmus53.

Cada pesquisa que apresenta a criação de um mutante descreve também uma forma própria para extrair e caracterizar sua nova linhagem. Encontra-se na literatura inúmeros protocolos de extração, mas nenhum é reproduzível para todas as espécies fúngicas, por isso constantemente estudos buscam adaptações e modificações de protocolos a fim de ajustar o processo de extração às necessidades específicas de cada pesquisa (CHIARI *et al.*, 2009).

### 3.4. Isolamento de DNA e caracterização de linhagens

A extração de DNA é o primeiro passo para qualquer análise molecular. A técnica empregada para este fim deve remover substâncias inibitórias como polissacarídeos, proteínas e sais minerais e ao final do processo fornecer um isolado em concentração e pureza suficientes para todas as análises moleculares (PLAZA *et al.*, 2004).

A extração de DNA em fungos filamentosos em geral é um processo dispendioso e a maior parte dos protocolos inclui o crescimento do fungo em um meio líquido, maceração em nitrogênio líquido, interrupção mecânica ou até mesmo sonicação, com isto a adaptação de protocolos de extração conceituados é rotineiramente utilizada, a fim de alcançar resultados mais eficazes e favorecer protocolos mais simples rápidos e reprodutíveis. O protocolo Doyle (1987), é um dos protocolos mais utilizados para extração de DNA. Essa metodologia utiliza pérolas de vidro para lise da parede celular e emprega o uso do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) como componente do tampão de extração. Existem várias adaptações deste protocolo, e em geral a adaptação consiste na alteração da composição do tampão de extração. Este é o caso descrito tanto por Dellaporta *et al.* (1983), que utilizaram como detergente o dodecil sulfato de sódio (SDS), como por Cheung *et al.* (1993), que utilizaram o sarcosyl.

Vazquez-Angulo *et al.* (2012), desenvolveram uma metodologia de sem a necessidade de maceração com nitrogênio líquido e realizavam a precipitação com etanol apenas uma vez, essa adaptação tornou o protocolo dos autores mais simples, rápido e com menos riscos de contaminação cruzada.

Cassago *et al.* (2002) desenvolveu uma metodologia que eliminou as culturas líquidas e a maceração em nitrogênio líquido. Seu protocolo incubou os fungos em discos de celofane e rompeu à parede celular com pérolas de vidro, isto fez com que mais amostras pudessem ser processadas em uma mesma extração.

Vários protocolos buscam a retirada do fenol do processo de extração, pois esta é uma substância cara, altamente tóxica e corrosiva, no entanto Vazquez-Angulo *et al.* (2012) mostram maior eficiência na eliminação de proteínas do DNA, nos métodos que ainda utilizam esse composto.

Depois de isolado o DNA de forma apropriada, faz-se necessário o uso de métodos que possam caracterizar as linhagens. Lieckfeldt *et al.* (1999) caracterizou duas novas linhagens de *T. viride* através de dados moleculares, morfologia, fisiologia e características de crescimento das colônias. Hermosa *et al.*, 2000

caracterizou 15 linhagens amplamente utilizadas para biocontrole. A caracterização das linhagens foi realizada através do crescimento das linhagens em três meios de cultura diferentes, agar de dextrose de batata (BDA), agar de malte (MA) e agar de farinha de milho (CMA). A esporulação em placa foi mais intensa quando inoculado em BDA, e MA, onde as estirpes *T. inhamatum*, *T. harzianum* e *T. longibrachiatum* produziram um pigmento amarelo e as espécies *T. atroviride* e *T. asperellum* não produziram o pigmento.

A taxonomia de espécies de *T. harzianum* foi revisada e pelo menos 14 novas espécies foram incluídas. Para caracterizar essas espécies foram utilizadas as diferenças morfológicas existentes entre elas (CHAVERRI *et al.*, 2015).

Shah *et al.* (2012) classificaram três espécies de *Trichoderma*, nomeadas por *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* e *Trichoderma pseudokoningii*, com base nas características morfológicas e culturais. As linhagens foram cultivadas em seis meios de cultura diferentes a 28 ° C durante quatro dias e após esse período notou-se que a mesma linhagem em cada meio apresentava tempo de esporulação e coloração diferentes, fato que também ocorria quando comparadas linhagens diferentes em mesmo meio. Os autores concluíram com esse estudo que a taxa de crescimento das colônias e a morfologia podem ser utilizadas com eficiência para distinguir espécies.

Jaklitsch *et al.* (2012) isolaram e caracterizaram três novas espécies de *Hypocrea* e seu anamorfo *Trichoderma*. A espécie *Hypocrea caerulescens*, é a mais comum e mais notável devido a formação de um pigmento azul em culturas em ágar dextrose de milho (CMD). A formação do pigmento só ocorre depois de 30 dias de incubação em CMD e por isto apesar da espécie ser comum em regiões da Europa o *H. caerulescens* não recebeu a devida atenção. O *Trichoderma* até então não tinha sido relatado como um fungo de potencial importância para a indústria de pigmentos, pois ao contrário de outros fungos de cores vivas, o *Hypocrea* é desprovido de pigmentos passíveis de extração com KOH. Nas culturas de espécies de *Hypocrea* a cor geralmente vai do amarelo ao laranja e menos comum se apresentarem avermelhadas em BDA, já em CMD os pigmentos não são comuns, mas se apresentam amarelos em *H. atroviridis*, *H. aureoviridis*, *H. petersenii*, *H. psychrophila* e *H. voglmayrii*, marrom no *H. crystalligena* e verde em *H. aeruginea*. Os pigmentos azuis são extremamente raros e os fungos que possuem essa coloração não são passíveis de extração com solventes orgânicos, no entanto o pigmento azul de *H. caerulescens* não foi identificado e poderia ser possível isolar os

pigmentos amarelos que podem ser extraídos do micélio em condições alcalinas e elucidar suas estruturas químicas e depois estudá-los na presença de íons metálicos que podem ser o responsável pela formação da pigmentação azul.

Este trabalho caracterizou o perfil celulolítico e a morfologia dos mutantes *T. reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1, criada a partir da deleção do fator de transcrição ACE1 na linhagem hiperprodutora de celulase RUT-C30. Essa deleção genética dá ênfase no aumento da eficiência da produção de enzimas hidrolíticas para a otimização na produção de bioetanol.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Meios e soluções utilizados

A Tabela 2 lista todas as soluções e meios utilizados neste trabalho.

Tabela 2 Soluções e meios utilizados.

Nome	Reagentes	Quantidade
Meio de cultura adaptada de Ahamed e Vermett (2008)	Celulose	1%
	Extrato de levedura	1%
	Glicose	1%
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,03%
	KHPO <sub>4</sub>	0,2%
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,14%
	CaCl <sub>2</sub>	0,04%
	Solução traços de elementos 50X	4 mL
Água destilada	100 mL	
Meio de cultura adaptada de Ahamed e Vermett (2008)	Lactose	25%
	Extrato de levedura	1%
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,03%
	KHPO <sub>4</sub>	0,2%
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,14%
	CaCl <sub>2</sub>	0,04%
	Solução traços de elementos 50X	4 mL
	Água destilada	100 mL
Meio Mex	Extrato de malte	3 g
	Ágar	2 g
	Glicose	2 g
	Água destilada	100 mL
Meio Mínimo Adaptado (Pontecorvo 1953)	NaNO <sub>3</sub>	0,6%
	KCl	0,05%
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15%
	ZnSO <sub>4</sub>	0,001%
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001%
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25%
	Extrato de levedura	0,25%
Fonte de carbono	1%	
Solução de esporos	NaCl	0,8%
	Twen 80	0,05%
	Água destilada q.s.p.	100 mL
Solução de Extração	EDTA	2 mL
	SDS 1 %	1 mL
	Água Milli-Q	7 mL
Solução traços de elementos 50 X	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25 g
	ZnSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,07 g
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1 g
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,085 g
	Água destilada	1000 mL
Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)	Tris base	24,2 g
	Ácido acético glacial	5,71 mL
	Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)	10 mL
	Água Milli-Q q.s.p.	100 mL

## 4.2. Linhagens

Para este estudo foram utilizadas as linhagens *T. reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1-1, *T. reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 e *T. reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1-3. Essas estirpes foram escolhidas por apresentarem a deleção parcial do gene *ace1* e o gene do fator de transcrição *cre1* truncado. Os fungos *T. reesei* RUT-C30, *T. reesei* QM9414 e *Penicillium crustosum* foram utilizados como controle, dependendo do experimento.

## 4.3. Crescimento das linhagens mutantes em meio suplementado com higromicina B

Para realizar a deleção da sequência que codifica o dedo de zinco do fator de transcrição repressor de celulase ACE1, foi utilizado um cassete de deleção, que contém o marcador de seleção positivo *hph*, conferindo resistência intrínseca a higromicina B à linhagem transformada.

Este teste foi realizado em placas de Petri (60 mm) contendo 15 mL de meio MEX suplementado com 2% de glicose e 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de higromicina B. Cada placa continha uma das quatro linhagens testadas, RUT-C30, *T. reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1-1, *T. reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 e *T. reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1-3. Como controle a linhagem RU-C30, foi inoculada também em meio MEX suplementado com 2% de glicose, sem higromicina B. Para inocular as linhagens, foi utilizada a técnica do ponto central. As placas foram incubadas em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand - Technal*) a 28 °C por nove dias.

## 4.4. Extração do DNA genômico de *T. reesei*

A extração foi conduzida seguindo dois métodos diferentes:

Método adaptado Doyle (1987): As linhagens foram cultivadas em meio MEX, incubado a 30 °C, 150 rpm por 24 h. Os micélios foram centrifugados em tubos de 50 mL por aproximadamente 15 min e, em seguida, 0,5 mL de cada micélio foi transferido para microtubos (DNase/RNase free) de 1,5 mL. Foram pipetados 600  $\mu\text{L}$  da solução de extração e adicionado pérolas de vidro até metade do microtubo tipo eppendorf. Os microtubos foram agitados em Vortex-Genie 2 por 10 min e, em seguida, foram incubados a 66 °C por 20 min em banho seco. A mistura foi centrifugada a 12000 rpm por 10 min e 400  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, no qual foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de RNase 20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  seguido de incubação a 37 °C por 60 min. Decorrido o tempo, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), e a solução foi misturada delicadamente por

inversão, seguido de centrifugação a 12000 rpm por 10 min a 4°C. Em seguida, 400 µL do sobrenadante foi transferido para outro microtubo, em que foi adicionado 63 µL de acetato de potássio 5 M (pH 4,8), após mistura realizada por inversão os microtubos foram incubados em banho de gelo por 35 min. Então foram centrifugados a 12000 rpm por 10 min a 4 °C. Novamente, 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo de 1,5 mL, no qual foi adicionado 1mL de etanol gelado 100%. A mistura dos reagentes foi realizada por inversão, seguido de centrifugação a 1200 rpm por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado três vezes com 500 µL de etanol 70%. O precipitado permaneceu em temperatura ambiente até total volatilização do etanol residual e então ressuspenso em 50 µL de água Milli-Q a 55 °C. O DNA foi armazenado a -20 °C.

*Método Bueno & Maller:* O fungo foi cultivado em meio MEX, incubado a 30 °C, 150 rpm por 24 h. Os micélios foram centrifugados em tubos de 50 mL por aproximadamente 15 min e em seguida 0,5 mL de cada micélio foi transferido para microtubo do tipo eppendorf (DNase/RNase free) de 1,5 mL. Pipetou-se 600 µL da solução de extração (EDTA 0,05 M; SDS 1%) e foi realizada a mistura por inversão. Foram adicionadas pérolas de vidro até metade do microtubo e a mistura agitada em Vortex-Genie 2 por 10 min, seguido de incubação a 66 °C por 20 min, sob agitação a 800 rpm. Decorrido o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min em temperatura ambiente e 400 µL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Adicionou-se 50 µL de RNase 20 mg.mL<sup>-1</sup> realizando a mistura por inversão e seguido de incubação a 37 °C por 60 min a 500 rpm. Foram então adicionados 300 µL de fenol e realizado a mistura por inversão, seguido de centrifugação a 13.000 rpm por 10 min em temperatura ambiente. Transferiu-se 400 µL do sobrenadante para um novo microtubo, no qual foram acrescentados 400 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguido de centrifugação a 13.000 rpm por 5 min em temperatura ambiente. Esse passo foi repetido duas vezes. Transferiu-se 400 µL do sobrenadante para outro microtubo, no qual foram adicionados 63 µL de acetato de potássio 5M (pH 4,8), misturado por inversão, seguido de incubação em banho seco a 2 °C, por 35 min e centrifugação a 13.500 rpm por 5 min a 4 °C. Todo o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, em que foi pipetado 1 mL de etanol gelado 100% misturado por inversão, seguido de centrifugação a 13.500 rpm por 5 min a 4 °C . O sobrenadante foi descartado e lavado por duas vezes com 500 µL de etanol 70% gelado seguido de mistura por inversão e centrifugação a 13.500 rpm por 5 min a 4 °C. Em sequência

centrifugou-se o microtubo por 1 segundo, para facilitar a retirada do álcool residual com a pipeta. O microtubo foi deixado a 35 °C até que o precipitado secasse completamente. O precipitado foi ressuspenso em 50 µL de TE/RNase.

As amostras de DNA obtidas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 % acrescido de 3 µg de brometo de etídio (1 mg.mL<sup>-1</sup>). Foram aplicados no gel 3 µL da amostra com 1 µL de azul de bromofenol e o marcador Ladder 1kb da *Ludwig Biotec* na concentração 0,1 µg.µL<sup>-1</sup>. Posteriormente as amostras foram visualizadas em transluminador ultravioleta (DigiDoc – It System). O grau de pureza das bandas visualizadas no gel, foi verificado através da relação das leituras realizadas em espectrofotômetro nas absorvâncias de 260 e 280 nm.

#### 4.5. Confirmação de deleção gênica

Para amplificação dos fragmentos e confirmação da deleção parcial do *ace1* do *T. reesei* RUT-C30 foram utilizados os *primers* ace1SC e ace1ZFSCR, que tem suas seqüências demonstradas na Tabela 3. A reação foi realizada nas seguintes temperaturas: 1 ciclo de 96 °C por 3 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 48 °C por 40 s e 72 °C por 1 min, seguido de 1 ciclo de 10 min a 72 °C. A reação foi montada utilizando 1 µL de DNA genômico (100 ng.µL<sup>-1</sup>), 5 µL de 10X *accuprime Buffer II*, 1 µL de dNTP 10 Mm, 1 µL do *primer* ace1SC (100 pmol), 1 µL do *primer* ace1ZFSCR (100 pmol), 1 µL de Taq *Home Made* e 40 µL de Água Milli-Q.

Tabela 3 *Primers* para amplificação da região codificadora do dedo de zinco do gene *ace1*.

<b>Primer</b>	<b>Seqüência</b>	<b>TM (°C)*</b>	<b>Amplificado esperado (p/b)</b>
1ace1SC	CCTTCATCATCAACGATGAGG	53,2	479
ace1ZFSCR	CGGCTGGCCCACCGAGAAG	63,8	

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

#### 4.6. Características e taxa de crescimento das linhagens

Para observar características da colônia e taxa de crescimento, foi realizado um ensaio com as linhagens mutantes, *T. reesei* RUT-C30Δzface1-1, RUT-C30Δzface1-2 e RUT-C30Δzface1-3, comparando-as com a linhagem RUT-C30. Para este teste foram utilizadas 12 placas de Petri (90 mm) com 30 mL do meio MEX sólido, suplementado com 1% de glicose como fonte de carbono. Os esporos foram inoculados através da aplicação da técnica do ponto central e incubados em estufa

BOD a 28 °C. Foram incubadas três placas de Petri para cada linhagem e os halos de crescimento foram medidos a cada 24 h.

Para medir os halos, foi utilizado um paquímetro em escala de milímetros. Foram medidos dois diâmetros (a e b), para cada colônia. Os diâmetros foram somados e divididos por dois, obtendo-se assim o diâmetro do halo de crescimento da colônia ( $hc$ ) em milímetros ( $hc=a+b/2$ ), como demonstrado na Figura 5.



Figura 5 Diâmetro do halo de crescimento micelial. Linhagens crescidas em meio extrato de malte, suplementado com 1% de glicose, no qual halo de crescimento (mm) =  $a+b/2$ .

#### 4.7. Indução da produção enzimática por lactose

Para estimar a atividade celulolítica dos mutantes, foram utilizados os substratos, papel filtro Whatman nº1, CMC e Avicel, para dosar celulasas; xilano para dosar xilanase; sacarose para dosar invertase e pectina para dosar pectinase, sendo que a liberação de açúcar redutor foi quantificada segundo Miller (1959). Para todas as enzimas testadas, uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de produto (açúcar redutor) por minuto nas condições do ensaio.

A indução enzimática por lactose foi realizada segundo metodologia de Ahamed e Vermett (2008). A primeira dosagem ocorreu logo após a adição de lactose, as seguintes foram realizadas de 6 em 6 h até completar 18 h. Também foram efetuadas dosagens com 24 e 48 h com o mesmo indutor. Para esses ensaios foram inoculados 1 mL de solução de esporos de cada linhagem em 20 mL do meio de cultura Ahamed e Vermett (2008). Os cultivos permaneceram a 30 °C sob agitação de 150 rpm em incubadora *shaker* LUCA-223. Decorrido 24 horas de

crescimento micelial, foram adicionados 5 mL do mesmo meio, porém sem celulose e glicose, suplementado com 25% de lactose para induzir a produção enzimática. No ensaio realizado durante 18 h, a cada 6 h eram retiradas alíquota da cultura obtida. Essa alíquota era então colocada dentro de um microtubo de 1,5 mL que continha lâ de vidro em seu interior e um orifício no fundo. Esse microtubo foi colocado dentro de um microtubo de 2 mL, e esse sistema foi então centrifugado na mini-centrífuga (UniSpin - UNISCIENCE), para obter um extrato límpido, que posteriormente foi usado para realização das dosagens enzimáticas. As dosagens foram realizadas segundo a metodologia descrita por Miller (1959), utilizando os substratos citados anteriormente.

As culturas obtidas após 24 e 48 h de indução, foram filtradas a vácuo, em funil de Büchner e papel de filtro Whatman nº 1. As amostras foram dialisadas, por 24 h em água destilada trocada em intervalos de 6 h. Após a diálise as amostras foram submetidas as dosagens enzimáticas.

#### **4.8. Testes de Hidrólise**

O primeiro método foi o teste com vermelho Congo realizado segundo a metodologia de atividade em placa adaptada de Florencio (2011). O meio de cultura utilizado foi o MEX sólido suplementado com 2% de glicose e 1% de CMC como fontes de carbono. Foram inoculadas três placas de Petri (90 mm) para cada linhagem. Os esporos foram inoculados por meio da técnica de ponto central e incubados em BOD a 28 °C por 96 h. Após esse período, o halo de crescimento foi medido com paquímetro em escala de milímetros e então foram adicionados 10 mL de solução de vermelho Congo (2,5 g.L<sup>-1</sup>) em cada placa. Passados 15 min a solução foi descartada e as culturas lavadas com NaCl 1 mol.L<sup>-1</sup>. A solução salina foi mantida por 15 min e descartada. Com a adição de NaCl 1 mol.L<sup>-1</sup> foi observado a formação de um halo claro, com a borda laranja. Decorridos 15 min após o descarte da solução salina o halo foi medido e o índice enzimático calculado a partir da equação: i.e. (índice enzimático) = diâmetro do halo de hidrólise/ diâmetro do halo da colônia (Figura 6).

O segundo método foi o teste de hidrólise da biomassa, adaptado da metodologia descrita por Ribeiro *et al.* (2014). Utilizou-se 20 mg de bagaço de cana-de-açúcar moída *in natura*, 0,2 mg de proteína do extrato, e acetato de sódio 100 mM pH 5, para um volume de reação final de 1,5 mL. A reação foi incubada a 30 °C por 24 h, seguido de fervura por 10 min e centrifugação a 10.000 g por 10 min.

O sobrenadante foi utilizado para dosagem de açúcar redutor segundo Miller (1959) e posterior leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. O procedimento para a detecção do branco ocorreu da mesma forma que a reação descrita acima, porém na ausência da proteína.

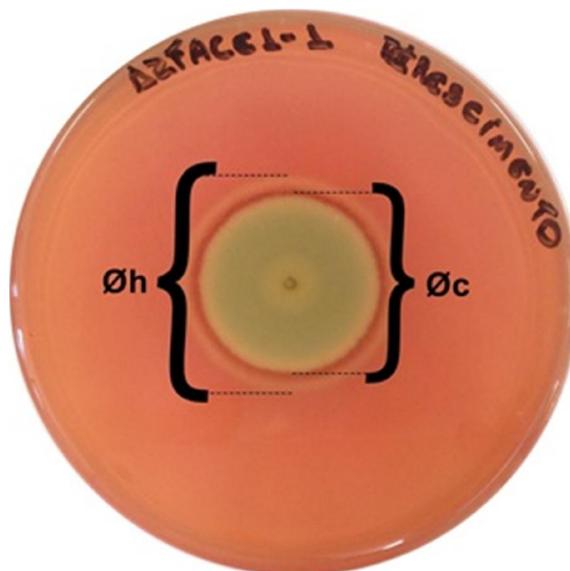


Figura 6 Teste com corante vermelho Congo. Øh- diâmetro do halo de hidrólise, Øc- diâmetro do halo de crescimento da colônia.

#### 4.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa *Microsoft Excel 2010* e *Graphpad Prisma 6*. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelos testes Bonferroni's ou Dunnett's nos quais  $p < 0,05$  há diferença significativa entre as amostras.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Crescimento das linhagens mutantes em meio suplementado com higromicina B

Como observado na Figura 7, após 24 h de incubação em estufa BOD, as placas de Petri, que continham esporos das linhagens RUT-C30 $\Delta$ zface1-1, RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 e RUT-C30 $\Delta$ zface1-3, apresentavam pequeno crescimento das colônias. Enquanto que tanto na placa suplementada com higromicina B, quanto na placa sem a presença do antibiótico, que continham os esporos da linhagem RUT-C30, não foi observado nenhum crescimento micelial.

Com o decorrer de 48 h de incubação, as linhagens mutantes estavam maiores em relação ao dia anterior e houve o início do crescimento da linhagem RUT-C30 semeada na placa controle, sem o antibiótico. O RUT-C30 incubado em placa com higromicina B, ainda não apresentava crescimento de esporos. Após nove dias de incubação, os halos de crescimento tanto da linhagem parental, crescida em meio sem higromicina B, como os mutantes estavam quase com o tamanho total da placa de Petri, enquanto que o RUT-C30 contido na placa com o antibiótico não apresentou nenhum crescimento.

Apenas linhagens que possuem o gene *hph*, poderiam se desenvolver nas placas que continham a higromicina B, portanto o crescimento apenas das linhagens mutantes na placa suplementada com higromicina B, indicou a manutenção das linhagens RUT-C30 $\Delta$ zface1.

Vários trabalhos utilizaram metodologia de obtenção de linhagens modificadas geneticamente semelhante à utilizada nestes mutantes. Pesquisadores como Sivan *et al.* (1992), Mach *et al.* (1994), Steiger *et al.* (2011), Fang e Xia (2013) e Derntl *et al.* (2015), também demonstram o desenvolvimento de novas linhagens de *Trichoderma*. Em todos os trabalhos citados acima, utilizaram um plasmídeo contendo o gene *hph*, para montar um cassete de deleção que trabalhasse também como marcador de seleção. Desta forma quando o cassete de deleção é inserido no gene alvo, conseqüentemente gera uma linhagem resistente à higromicina B.

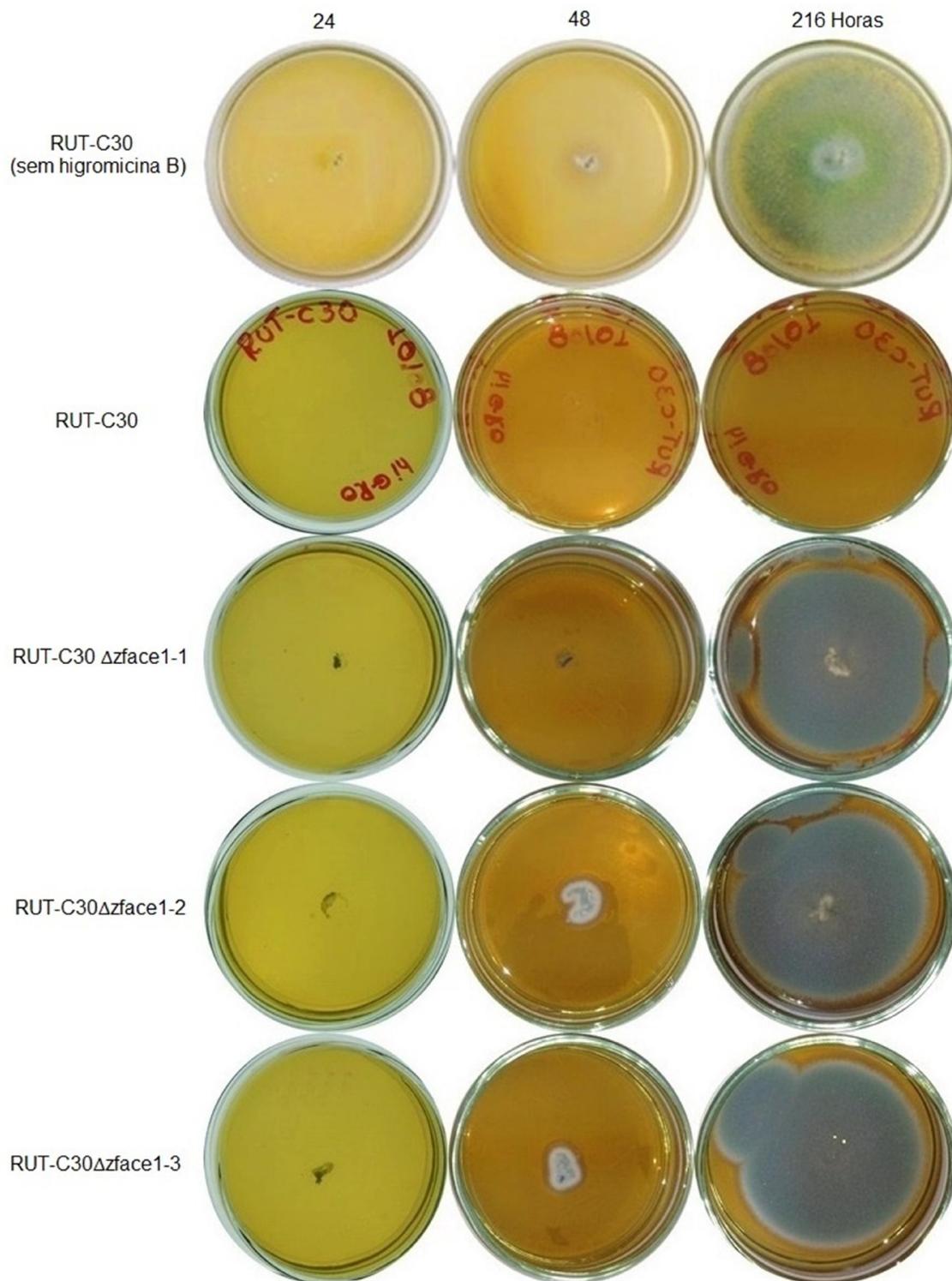


Figura 7 Resistência a higromicina B. Teste de resistência ao antibiótico no decorrer de 216 horas em meio MEX suplementado com 2% de glicose e  $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de higromicina B.

## 5.2. Extração de DNA e confirmação de deleção gênica

Na Figura 8a podem-se visualizar bandas intensas e sem arraste, mostrando que o protocolo rotineiramente utilizado, que mantém tanto a integridade do DNA, e quanto extrai quantidades satisfatórias de DNA do *T. reesei*. Simultaneamente foi realizada a extração do fungo *Penicillium crustosum*, a fim de testar a eficiência desse protocolo para outros gêneros de fungos. Como observado na Figura 8a, o protocolo Adaptado de Doyle (1987) não foi bem-sucedido para esse gênero.

A fim de quantificar a concentração de DNA e averiguar o grau de pureza do mesmo, foi realizada a leitura em espectrofotômetro nas absorvâncias 260 e 280 nm. As concentrações dos DNAs isolados obtiveram valores entre 671,5 e 791,5 ng. $\mu\text{L}^{-1}$ , enquanto que a relação A (260/280) obteve resultados entre 1,17 e 1,45. A relação A (260/280), obtida através do método Doyle (1987), sugere contaminação do DNA por proteínas, portanto estes isolados de DNA foram considerados impróprios para os testes moleculares.

Frente a este resultado buscou-se desenvolver uma metodologia que alcançasse níveis satisfatórios de pureza, e pudesse ser utilizado com eficácia em outros gêneros de fungos. Foram testados vários protocolos (DOYLE, 1987; CASSAGO *et al.*, 2002; PLAZA *et al.*, 2004), dos quais várias etapas foram modificadas e por fim chegou-se a um novo protocolo de extração.

Quando visualizado o gel de agarose com os DNAs isolados seguindo a nova metodologia foi observada bandas mais intensas e espessas, sugerindo maior concentração de DNA (Figura 8b). Com esta metodologia foi possível extrair tanto do DNA do *T. reesei*, quanto do *P. crustosum*, resultado não alcançado com o protocolo anterior. No gel 8a foram aplicados 2  $\mu\text{L}$  dos DNAs isolados. No gel 8b foram aplicados 2  $\mu\text{L}$  de DNA isolado do RUT-C30, RUT-C30 $\Delta$ zface1-1, RUT-C30 $\Delta$ zface1-2, RUT-C30 $\Delta$ zface1-3, no entanto como não houve visualização da banda do *P. crustosum* no gel 8a, no 8b foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de DNA desse fungo. A comparação entre as médias das concentrações de DNA obtidas frente aos diferentes protocolos é demonstrada na Figura 9.

A comparação dos valores de concentração da mesma linhagem frente aos dois protocolos permitiu concluir que a linhagem controle, RUT-C30, no protocolo Bueno & Maller, teve eficiência 1,05 vezes maior do que no protocolo adaptado de Doyle (1987).

Para as linhagens RUT-C30 $\Delta$ face1-1, RUT-C30 $\Delta$ face1-2 e RUT-C30 $\Delta$ face1-3 os valores foram de 1,5; 2,2 e 1,6 vezes maior, respectivamente, para o novo protocolo. Com esse método observamos a concentração de 861 ng/ $\mu$ L para o *P. crustosum* enquanto que a metodologia de Doyle (1987) não apresentou a extração de DNA.

Em relação à eficiência da nova metodologia quanto ao grau de pureza do DNA, obtivemos resultados acima do grau satisfatório, significando que a contaminação por proteína nesse método foi desprezível, enquanto que no protocolo Bueno & Maller, os valores estavam abaixo do grau satisfatório.

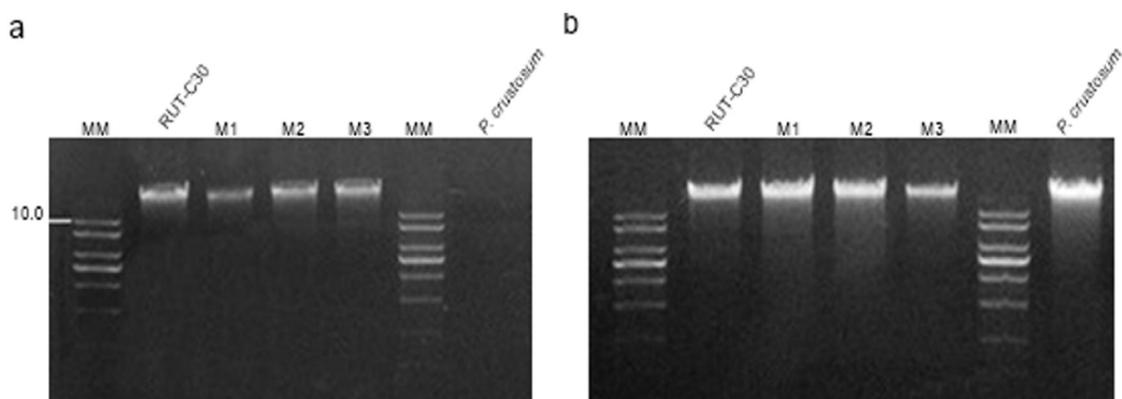


Figura 8 Comparação entre os métodos de extração adaptado de Doyle (1987) (a) e Bueno & Maller (b). Gel de agarose 1% TAE 1X. Símbolos: MM - marcador molecular DNA Ladder 1 kb Ludwig® Biotec, M1 - RUT-C30 $\Delta$ face1-1, M2 - RUT-C30 $\Delta$ face1-2 e M3 - RUT-C30 $\Delta$ face1-3.

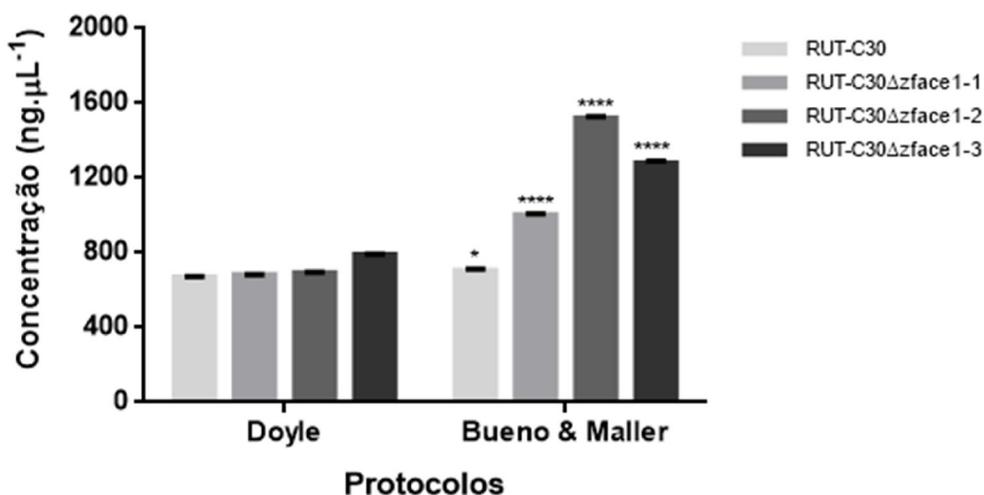


Figura 9 Comparação das concentrações de DNA entre os protocolos adaptado de Doyle (1987) e Bueno & Maller. As diferenças entre os dois protocolos, foram analisadas comparando a mesma linhagem. A análise estatística foi realizada segundo Teste Bonferroni's no qual, (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

A linhagem RUT-C30 no protocolo Bueno & Maller, apresentou o grau de purificação 2 vezes maior quando comparado a metodologia adaptada de Doyle (1987). Para as linhagens RUT-C30 $\Delta$ zface1-1, RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 e RUT-C30 $\Delta$ zface1-3, obtivemos valores de purificação 1,6, 2,2, e 1,4 vezes maiores, respectivamente. O valor da relação A (260/280) foi de 2,0 para o *P. crustosum* (Figura 10).

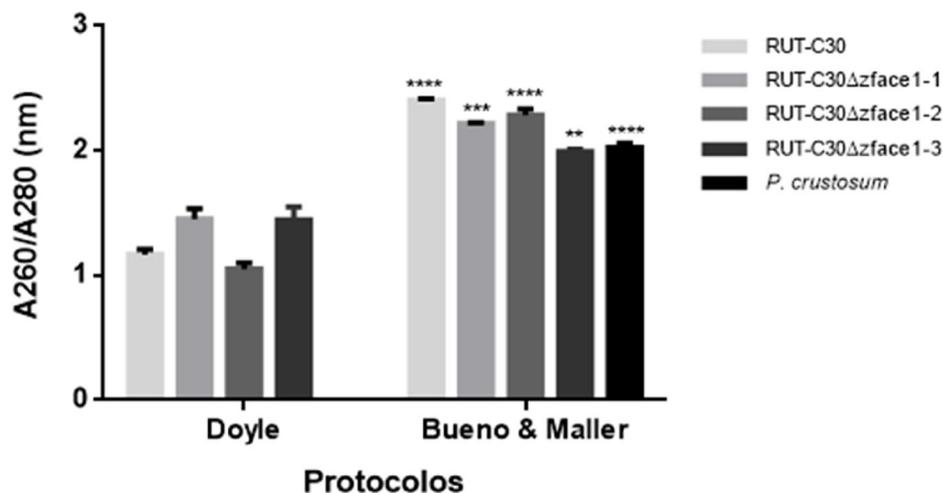


Figura 10 Comparação do grau de pureza dos DNAs entre os protocolos adaptado de Doyle (1987) e Bueno & Maller. As diferenças entre as duas metodologias, foram analisadas comparando a mesma linhagem. A análise estatística foi realizada segundo Teste Bonferroni's, no qual, (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

Chiari *et al.* (2009), compararam a eficiência dos métodos de extração de Bonato *et al.* (2002) e Faleiro *et al.* (2003) e a melhor relação A (260/280) alcançada pelos protocolos foi de 1,5. Vazquez-Angulo *et al.* (2012), ao desenvolverem seu protocolo conseguiram valores de pureza entre 1,7 e 1,9. Portanto o protocolo desenvolvido neste trabalho apresentou melhores resultados que métodos amplamente utilizados.

Os DNAs extraídos a partir da nova metodologia foram utilizados para várias reações em cadeia da polimerase (PCR). A deleção da sequência que codifica o dedo de zinco do fator de transcrição repressor de celulase ACE1, foi confirmada através da PCR, utilizando a Taq *home made* e os *primers* ace1SC e ace1ZFSCR. Para o controle positivo foi selecionada a linhagem de *T. reesei* QM9414.

O *primer* ace1SC se anela na região terminadora do gene *ace1* e o *primer* ace1ZFSCR se anela na região do dedo de zinco. Como os mutantes tem essa região deletada, a confirmação da deleção se deu pela amplificação de um

fragmento com 479 pb para o controle positivo e para o RUT-C30 e ausência de amplificação para as linhagens mutantes, como demonstrado na Figura 11.

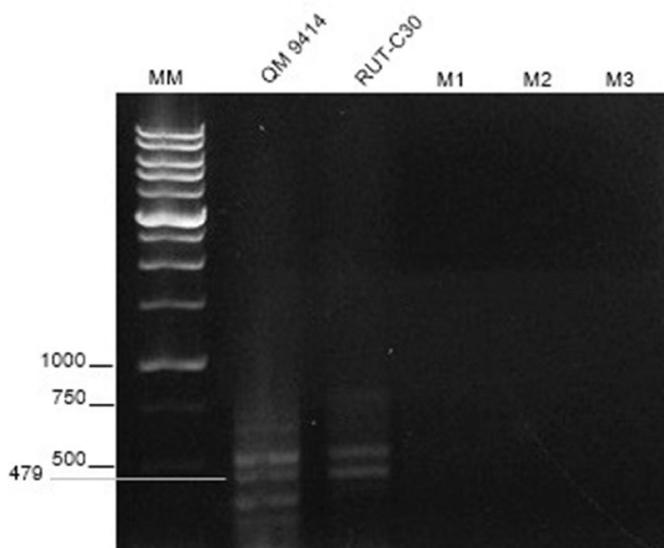


Figura 11 Confirmação da deleção da região codificadora do dedo de zinco do fator de transcrição ACE1. Gel de agarose 1,5% TAE 1X. 1- Marcador DNA *Ladder* 1kb RTU (*Reading-to-use*), M1- RUT-C30 $\Delta$ zface1-1, M2- RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 e M3- RUT-C30 $\Delta$ zface1-3.

### 5.3. Características e taxa de crescimento das linhagens mutantes

Ao verificar o crescimento das placas de Petri após 24 h de incubação, foi possível visualizar pequeno crescimento na parte central dos cultivos das placas que continham as linhagens mutantes. A linhagem parental RUT-C30, não apresentou nenhum crescimento. As placas foram devolvidas a incubadora BOD e decorridas 24 h foram retiradas para nova avaliação.

Com 48 h de incubação os mutantes já apresentavam pequenas colônias cor verde-azulado com borda branca que delimitava o tamanho da colônia, enquanto que na linhagem RUT-C30 foi possível visualizar apenas um ponto central, demonstrando o início do crescimento micelial.

Passados 72 h de incubação, as linhagens mutantes mantinham a mesma forma e coloração, apresentavam-se apenas maiores que no dia anterior. Neste ponto a colônia do RUT-C30 apresentava-se pequena e levemente esbranquiçada.

A partir de 120 h, a linhagem parental tomou forma e desenvolveu uma característica de halo central esbranquiçado e ramificações translúcidas que irradiavam todo o halo central. Essa linhagem ainda apresentava tamanho menor que os mutantes que continuavam seu desenvolvimento. No decorrer das próximas

24 h de incubação a linhagem RUT-C30 teve rápido crescimento micelial e superou em tamanho às linhagens mutantes (Figura 12).

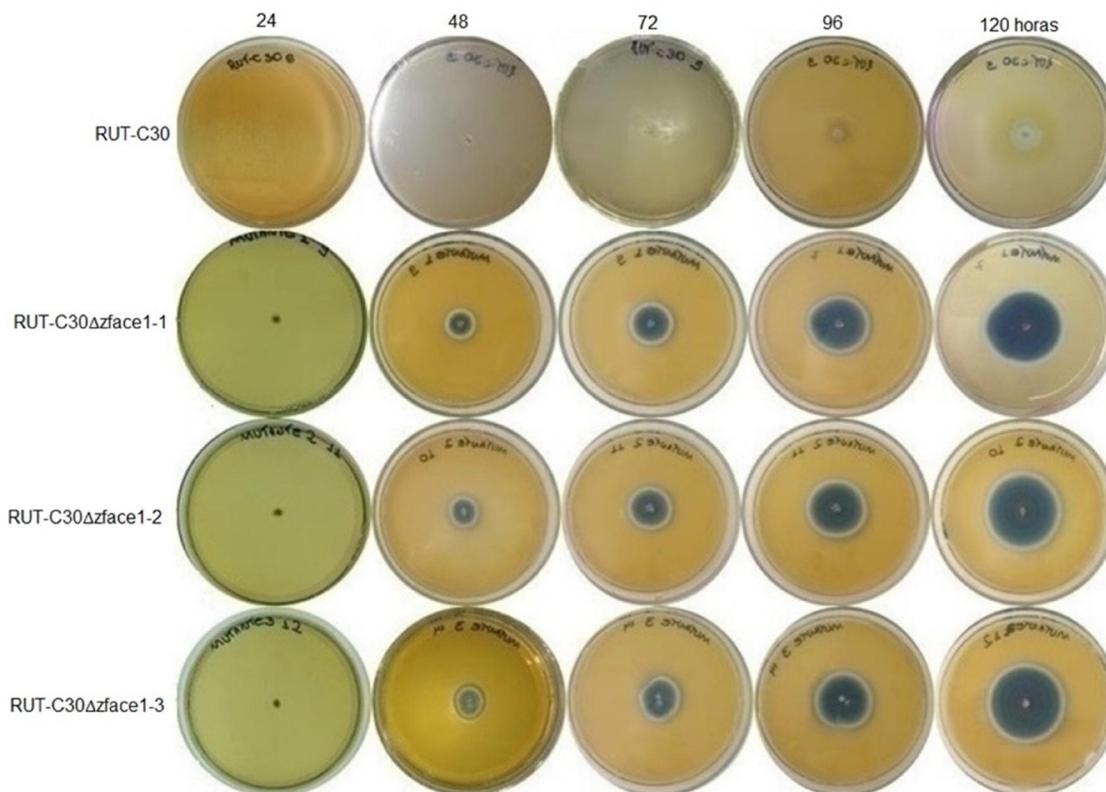


Figura 12 Morfologia e crescimento das colônias RUT-C30 e RUT-C30 $\Delta$ zface1. Incubação por 120 horas em meio MEX suplementado com 1% de glicose como fonte única de carbono.

As linhagens mutantes possuem características próprias, com formação de 2 anéis concêntricos, um pequeno ponto branco no centro, circulado por conídios verde-azulados, com algumas partes amareladas e um anel branco que delimita a colônia. As colônias possuem aspecto mais denso e aveludado. A linhagem RUT-C30 também forma dois anéis concêntricos, no entanto as características de crescimento e aspecto são bem diferentes quando comparados com as características dos mutantes. O anel central é esbranquiçado com micélio transparente ao redor, possui aspecto granuloso com o centro mais denso. Os conídios verdes só começam a aparecer por volta do sexto dia de incubação e a colônia se torna completamente verde-escura com aproximadamente 8 dias de incubação. Esse rápido crescimento com posterior cor branco-verde das colônias também foi descrito por Willians et. al. (1983).

Com o auxílio do paquímetro, as colônias foram medidas diariamente e assim foi possível quantificar a taxa de crescimento das linhagens mutantes e compará-las com a linhagem RUT-C30 (Tabela 4).

Tabela 4 Medidas das médias (mm) do crescimento das colônias mutantes e parental.

Linhagens	Tempo (horas)						
	24	48	72	96	120	144	168
<b>RUT-C30</b>	0,0± 0,0	5,0±1,5	9,5±0,8	15,0±1,3	41,7±1,2	65,2±2,3	83,7±2,3
<b>RUT-C30</b>	4,8±0,5	12,0±0,4	28,5±0,9	36,0±1,3	45,7±1,8	50,0±2,8	68,5±2,8
<b>Δzface1-1</b>							
<b>RUT-C30</b>	5,2±0,3	12,2±0,2	28,5±1,1	35,5±1,5	42,7±2,0	48,0±1,4	61,2±1,4
<b>Δzface1-2</b>							
<b>RUT-C30</b>	5,2±1,2	10,7±1,5	27,5±0,7	32,5±1,5	43,0±1,8	52,0±7,6	64,0±7,6
<b>Δzface1-3</b>							

Como a intenção era comparar o crescimento das linhagens mutantes em relação à RUT-C30 e considerando que a variação dos valores obtidos das médias entre os mutantes foi pequena, realizou-se a média entre os valores do diâmetro das colônias dos três mutantes, sendo esta média comparada com a linhagem parental.

Com 24 h de incubação a média de crescimento das linhagens mutantes foi 5,06 vezes maior do que a linhagem parental, visto que a mesma não apresentou crescimento. Após 48 h os mutantes apresentaram tamanho micelial de 2,34 vezes maior do que a linhagem parental. No tempo de 72 e 96 h as linhagens mutantes apresentaram crescimento 2,98 e 2,31 vezes maior do que no RUT-C30. Após 96 h, a linhagem parental teve crescimento acelerado, atingindo o mesmo tamanho que as linhagens mutantes e com 120 h não houve diferença significativa entre as linhagens. Após esse período, a linhagem RUT-C30 continuou apresentando um rápido crescimento e superou em 1,3 vezes o tamanho das linhagens mutantes, tanto em 144 como em 168 h (Figura 13).

Esses dados são semelhantes ao resultado obtido por Lieckfeldt *et al.* (1999), que ao estudarem amostras da linhagem *T. viride*, notaram que as amostras apresentava conídios diferentes, e a partir dessa percepção foi realizada a caracterização das linhagens. A observação da cultura mostrou que as espécies tinham taxas de crescimento muito diferentes, uma vez que a linhagem *T. viride* tipo I em 40 h atingiu menos de 10 mm de raio, enquanto que as colônias de *T. viride* tipo II atingiram quase 30 mm. Não houve diferença na coloração dos conídios, que

se manifestaram na cor verde-escura, no entanto houve diferença no tempo em que os conídios se formaram, dentro de 48 h a linhagem tipo I já se apresentavam verde-escuras enquanto que o tipo II neste tempo havia apenas alguns conídios verde pálido.

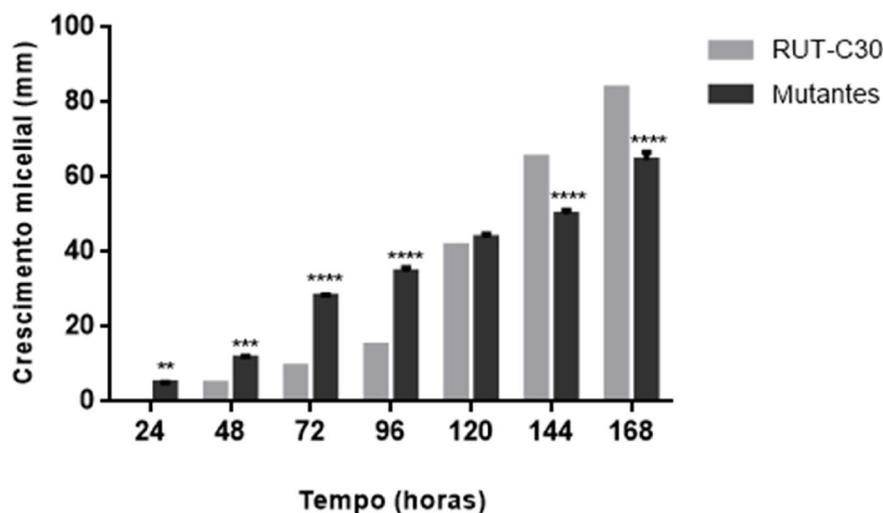


Figura 13 Comparação entre as médias de crescimento micelial dos mutantes em relação ao RUT-C30, durante 168 horas de incubação. A análise estatística foi realizada segundo teste Bonferroni's, no qual (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

Hermosa *et al.* (2000) encontraram diferentes graus de esporulação tanto em relação as diferentes espécies como também quando comparado a mesma espécie em diferentes meios. Shah *et al.* (2012), caracterizaram várias espécies de *T. reesei* e constataram que todas as linhagens diferiram entre si tanto na taxa de crescimento micelial como na aparência das colônias. Quando comparado a mesma espécie em diferentes meios de cultura, concluiu-se que o meio em que a espécie era inoculada, influenciava muito nas características morfológicas.

Corabi-Adell (2005) descreveu uma classificação, na qual propôs um esquema em chave que caracteriza as espécies conhecidas de *T. reesei*, a qual é uma das formas de identificação mais utilizadas para o *Trichoderma*. Nestes métodos são descritas uma grande variedade morfológica deste fungo, como exemplo, o *Trichoderma* anamorfo de *Hypocrea semiorbis* que possui conidióforo verde claro-azulado a acinzentado e o *T. strigosum* com pústulas conidiógenas verde-azulado.

Jaklitsch *et al.* (2012) caracterizaram a espécie *Hypocrea caerulescens*, que produz pigmento azul em culturas em ágar de dextrose de milho (CMD). Chaverri *et*

al. (2015) observaram o estado sexual de cinco espécies de *Trichoderma*, eles descreveram alguns aspectos da variedade deste fungo. O *T. guizhouense* quando formado possui o estroma muito escuro, se aproximando da cor preta, já o *T. lixii* e *T. simmonsii* são marrom escuro tornando-se preto, enquanto que o *T. lentiforme* e *T. atrobrunneum* são verdes, tornando-se pretos. Com a caracterização realizada neste trabalho, foi possível observar algumas dessa variedade de características entre as espécies de *T. reesei*. A morfologia e crescimento das linhagens mutantes apresentaram grande diferença em relação à RUT-C30, valendo ressaltar que entre essas linhagens existe diferença genética em apenas um gene.

#### 5.4. Indução de produção enzimática por lactose

No ensaio de indução enzimática por lactose durante 18 h, quando comparado os valores de atividade enzimática obtidos na leitura sem adição de lactose ao meio, com a leitura após a adição do indutor, pode-se observar que a lactose foi um excelente indutor enzimático para o *T. reesei*.

Os dados obtidos demonstram que a lactose aumentou a atividade das avicelases em 1,5 vezes para o RUT-C30 e RUT-C30 $\Delta$ zface1-1 e 1,7 vezes para RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 e RUT-C30 $\Delta$ zface1-3 (Figura 14a). As CMCase apresentaram atividade elevada em 1,8 vezes para RUT-C30 e RUT-C30 $\Delta$ zface1-1. Já para os mutantes RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 e RUT-C30 $\Delta$ zface1-3 a atividade foi 1,6 vezes maior (Figura 14b). Na atividade das FPases os valores obtidos foram 1,7 vezes maiores em RUT-C30 e RUT-C30 $\Delta$ zface1-1 e 1,8 vezes maior para RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 e RUT-C30 $\Delta$ zface1-3 (Figura 14c).

No tempo de 6 h foi possível observar o maior rendimento de produção enzimática para todos os substratos avaliados. Neste intervalo o RUT-C30 $\Delta$ zface1-2, foi o maior produtor tanto de avicelase quanto de CMCase, com atividade aumentada em 1,1 e 1,2 vezes respectivamente, em relação ao RUT-C30.

A partir de 12 h de indução, houve queda da atividade enzimática para todos os substratos. O mutante RUT-C30 $\Delta$ zface1-1 apresentou diferença significativa na atividade de FPase com atividade enzimática 1,1 vezes maior em relação ao RUT-C30. Já o mutante RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 apresentou atividade 1,2 vezes maior tanto para avicelase, quanto para CMCase e aumento de 1,1 vezes para FPase quando comparado a linhagem parental. Enquanto que o mutante RUT-C30 $\Delta$ zface1-3 apresentou diferença significativa na atividade de FPase com aumento de 1,1 vezes em relação a linhagem parental.

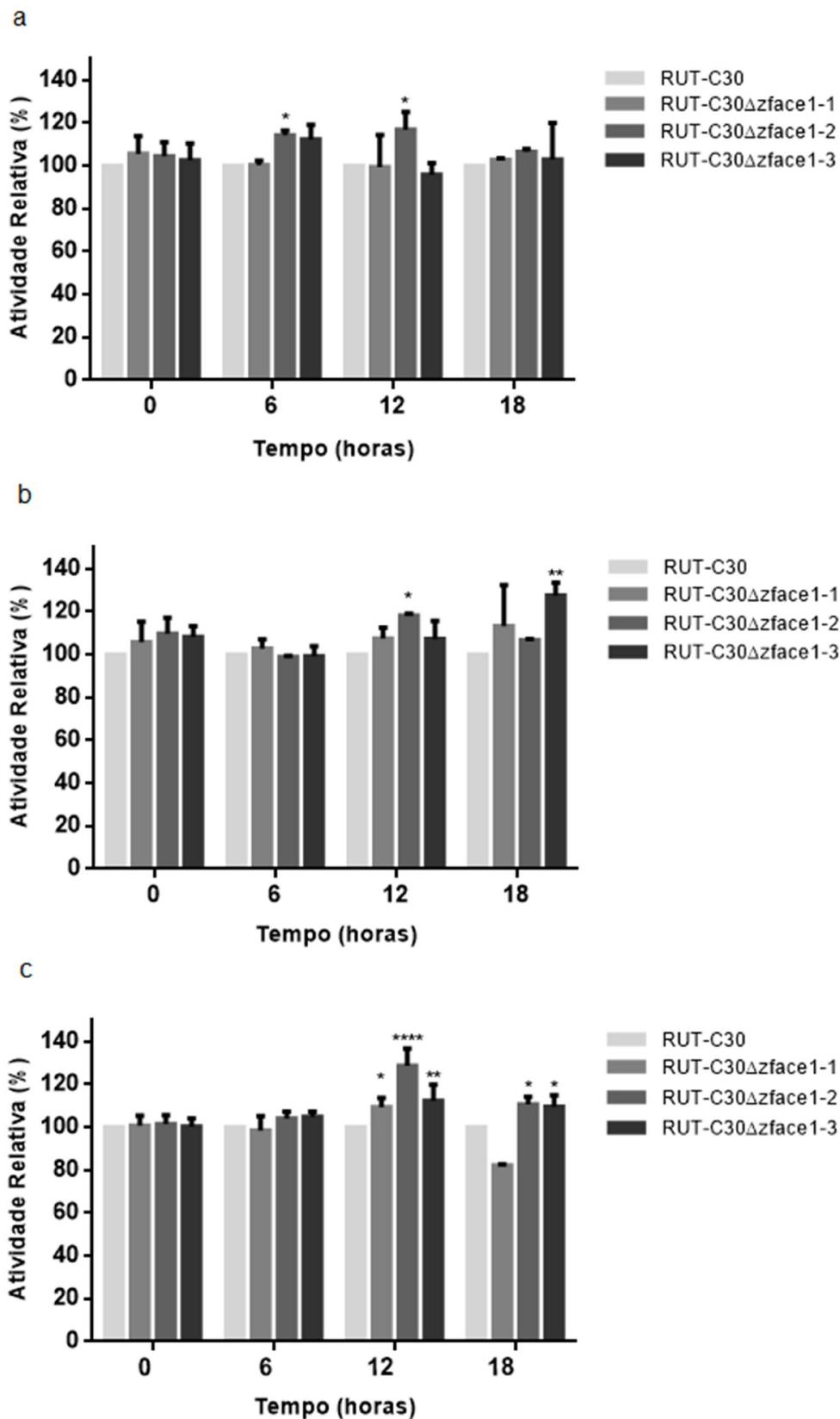


Figura 14 Relação entre tempo de incubação e produção enzimática. (a)- Avicelase, (b)- CMCase e (c)-FPase. Para a análise estatística a linhagem controle RUT-C30 foi considerada 100% e realizada, segundo teste de Dunnett's, no qual (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

Em 18 h de incubação, houve diferença significativa na atividade do RUT-C30 $\Delta$ zface1-3 tanto para CMCase, quanto para FPase, com otimização de 1,3 e 1,1 vezes quando comparado ao RUT-C30. O mutante RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 apresentou atividade de FPase 1,1 vezes maior em comparação a linhagem parental.

Com base nos resultados anteriores, a indução enzimática por lactose foi testada também em 24 e 48 h. Neste teste as amostras foram dialisadas por 24 horas.

A fim de averiguar maiores diferenças quanto à produção enzimática dos mutantes em relação à linhagem parental, foi avaliada também a atividade da pectinase, invertase e xilanase nos tempos citados acima.

A indução enzimática durante 24 h por lactose, representou o melhor tempo para a otimização na produção de celulases e pectinases pelas linhagens mutantes.

A produção de avicelases teve um excelente desempenho no mutante RUT-C30 $\Delta$ zface1-1, que apresentou atividade 3,2 vezes maior em relação à linhagem controle. O RUT-C30 $\Delta$ zface1-3 também mostrou valor promissor apresentando atividade aumentada em 2 vezes quando comparado ao RUT-C30. A produção de FPases, também se destacou com aumento de atividade para todos os mutantes. O mutante RUT-C30 $\Delta$ zface1-1 apresentou 2,1 vezes mais atividade quando comparado ao RUT-C30. Os mutantes RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 e RUT-C30 $\Delta$ zface1-3 exibiram atividade aumentada em 1,6 e 1,8 vezes respectivamente, em relação à linhagem parental. A atividade de CMCase também obteve resultados superiores para todos os mutantes. Os mutantes RUT-C30 $\Delta$ zface1-1, RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 e RUT-C30 $\Delta$ zface1-3 apresentaram atividades 1,7, 2,0 e 2,1 vezes maior em relação ao RUT-C30.

Além da otimização da atividade de todas as celulases, neste tempo de indução foi possível observar a potencialização na atividade de pectinases. O mutante RUT-C30 $\Delta$ zface1-1 apresentou atividade 1,9 vezes maior quando comparado ao RUT-C30. Os mutantes RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 e RUT-C30 $\Delta$ zface1-3 obtiveram aumento de 2,4 e 1,3 vezes a atividade em relação ao RUT-C30 (Figura 15a).

Após 48 h de incubação com lactose (Figura 15b), foi observado queda nos valores de atividade enzimática para todos os substratos e linhagens analisadas em relação ao tempo de 24 h. Com 48 h de indução, foi observado diferença significativa apenas na atividade de FPase para os mutantes RUT-C30 $\Delta$ zface1-1 e

RUT-C30 $\Delta$ face1-2 com aumento de 1,2 vezes na produção enzimática em relação ao RUT-C30.

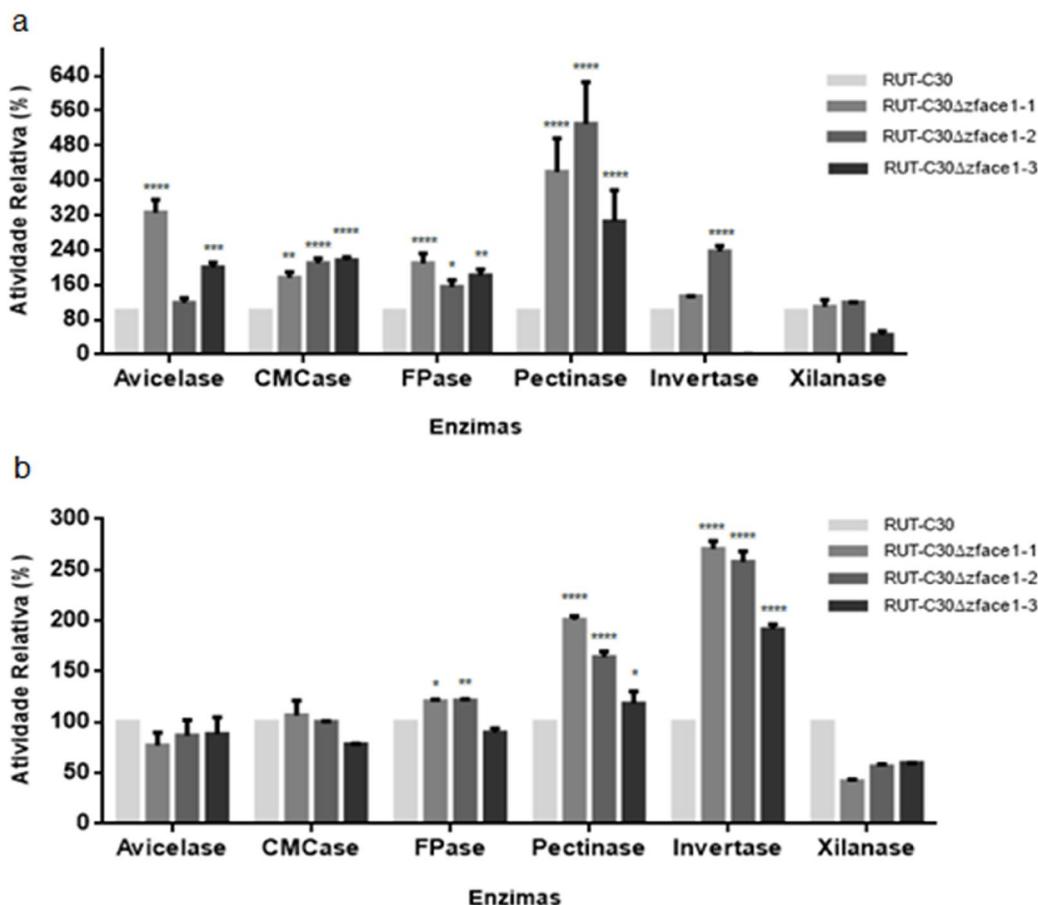


Figura 15 Comparação da produção enzimática em 24 (a) e 48 horas (b) de indução por lactose. Para a análise estatística a linhagem controle RUT-C30 foi considerada 100% e realizada, segundo teste de Dunnett's, no qual (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

Os valores de celulases produzidos pelos mutantes são importantes para a otimização da capacidade celulolítica de *T. reesei*, e consequentemente um aumento de produção do bioetanol. Liming e Xueliang (2004) em pesquisa realizada com o mutante *T. reesei* ZU-02, em resíduo de milho obtiveram valores de atividade de celulase de  $5,25 \text{ U.mL}^{-1}$ , após sete dias de incubação, valor abaixo do obtido para o mutante RUT-C30 $\Delta$ face1-1, com 24 h em meio com celulose e lactose. Ivanova *et al.* (2013) relataram que a lactose é a única fonte de carbono solúvel que induz as celulases em *T. reesei* em nível industrial. Herpoël-Gimbert *et al.* (2008) também descreveram a lactose como fonte de carbono para melhorar o rendimento de celulases nas linhagens RUT-C30 e CL847.

A produção de FPases pelo mutante RUT-C30 $\Delta$ face1-1 também foi maior do que o valor obtido por Bendig e Weuster-Botz (2013), que apresentou atividade de

4,88 U.mL<sup>-1</sup> após incubação de 96 h em meio com celulose e 3,3 g.L<sup>-1</sup> de adição de sulfato de amônio por dia para a linhagem RUT-C30. O trabalho de Häkkinen *et al.* (2014) superexpressou sete genes relacionados à produção de celulases, conseguindo mutantes que tiveram a atividade de celulase e/ ou xilanase aumentada em média 1,5 vezes, em comparação a linhagem parental. Este trabalho reprimiu um gene e obteve mutantes que chegaram a apresentar atividade triplicada em relação à linhagem parental.

## 5.5. Testes de Hidrólise

### 5.5.1. Hidrólise em placa

O índice de hidrólise é uma informação diretamente relacionada às regiões que ocorrem à degradação da celulose em cultivos em placa de Petri. Como ilustrado na Figura 16, o corante vermelho Congo não consegue se fixar aos pequenos fragmentos resultantes da clivagem do CMC, assim quando a placa é lavada essa região se torna mais clara quando comparado à região que o vermelho Congo permanece fixado (WOODWARD & WISEMAN, 1982).

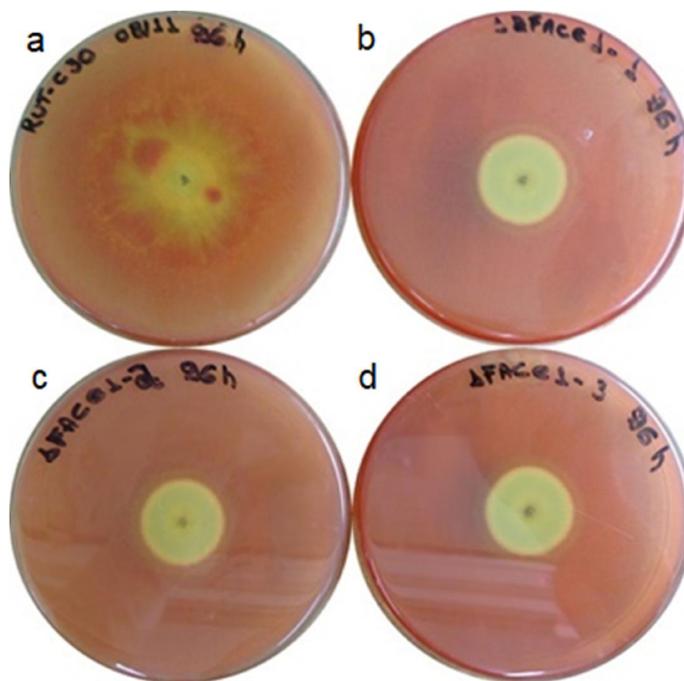


Figura 16 Halos de hidrólise com corante vermelho Congo. (a)- RUT-C30, (b)- RUT-C30 $\Delta$ zface1-1, (c)- RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 e (d)- RUT-C30 $\Delta$ zface1-3.

Todas as linhagens mutantes demonstraram maior índice de hidrólise de celulases na metodologia de hidrólise em placa, em relação ao RUT-C30, em 96 h de incubação à 28 °C. O Rut-C30 $\Delta$ zface1-1 foi o mutante que mais se destacou nesse teste, apresentando halo de hidrólise 1,42 vezes maior quando comparado ao parental. O mutante RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 e RUT-C30 $\Delta$ zface1-3, apresentaram o índice enzimático aumentado em 1,21 e 1,16 vezes em relação à linhagem RUT-C30 (Figura 17).

Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) utilizaram o teste de vermelho Congo para avaliar a capacidade hidrolítica de oitenta linhagens de fungos isolados do solo. Lopes *et al.* (2009) também tomaram dessa técnica de cálculos de índices enzimáticos e obtiveram índices de aproximadamente 1,04 e 1,08 para as linhagens T666 e T300 respectivamente. Esses resultados foram inferiores aos obtidos pelos mutantes RUT-C30 $\Delta$ zface1. Florencio (2011) avaliou através da metodologia com o corante vermelho Congo, o potencial hidrolítico de 78 linhagens de fungos do gênero *Trichoderma*, pertencentes às micotecas da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, CE), Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP) e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF) e concluiu que o RUT-C30 foi à linhagem com maior poder de hidrólise de celulases. Considerando as linhagens descritas nos trabalhos citados a cima, o mutante RUT-C30 $\Delta$ zface1 ganha destaque, pois apresentou ser a linhagem com maior poder de hidrólise.

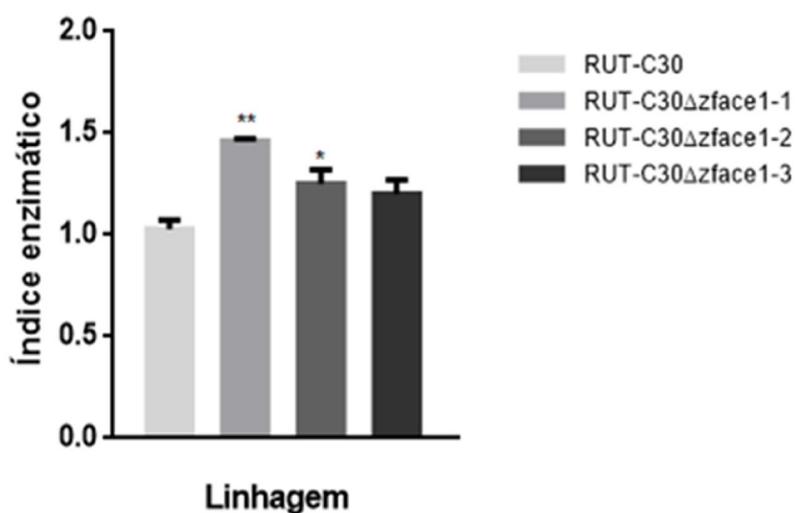


Figura 17 Comparação entre os índices enzimáticos em 96 horas de incubação. Estatística realizada, segundo teste de Dunnett's, no qual (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

### 5.5.2. Hidrólise de biomassa

Tendo em vista os resultados obtidos no teste anterior, foi realizado o ensaio de hidrólise da biomassa. Este último ensaio descrito, foi um dado crucial para confirmar o desenvolvimento de uma linhagem que poderá ser utilizada na otimização da produção do etanol a partir do resíduo lignocelulósico.

Neste ensaio foi possível observar diferença significativa entre todos os mutantes em relação à linhagem parental (Figura 18). O RUT-C30 $\Delta$ zface1-3 foi o que obteve o melhor resultado, apresentando valor 1,4 vezes maior em relação à linhagem hiperprodutora. Os mutantes RUT-C30 $\Delta$ zface1-1 e RUT-C30 $\Delta$ zface1-2 apresentaram hidrólise aumentada em 1,3 vezes quando comparado com a linhagem RUT-C30.

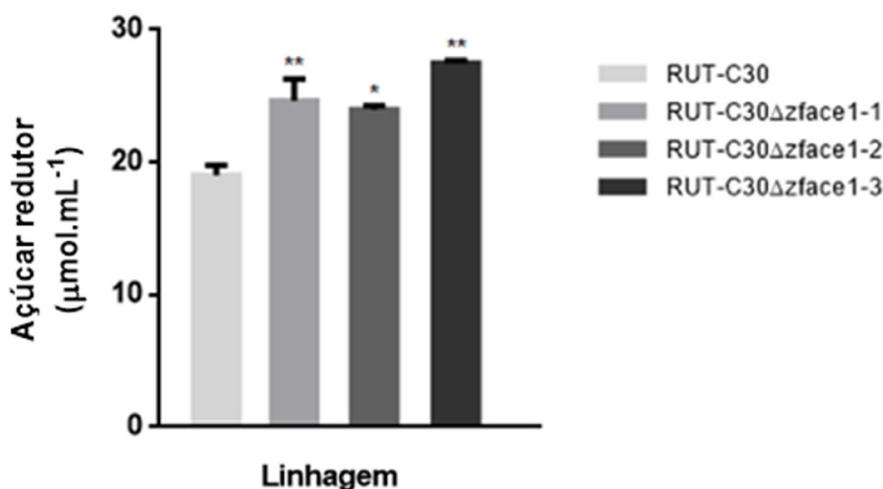


Figura 18 Hidrólise de biomassa das linhagens mutantes em comparação a RUT-C30. Análise estatística realizada, segundo teste de Dunnett's, no qual (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

Raghuwanshi *et al.* (2014) desenvolveram a linhagem mutante *T. asperellum* SR1-7, que quando realizada a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar, obteve liberação de açúcar redutor 1,6 vezes maior que a linhagem selvagem de *T. reesei*. O gênero *Trichoderma* é amplamente conhecido por sua produção de um coquetel enzimático altamente específico (FLORENCIO, 2011), e é por causa dessa especificidade, que o RUT-C30 é a linhagem mais utilizada em processos industriais que envolvam a hidrólise de biomassa (PETERSON; NEVALAINEN, 2012).

A linhagem RUT-C30 é relatada como hiperprodutora de celulases, e produz de 15 a 20 vezes mais FPases do que a linhagem selvagem (PETERSON; NEVALAINEN, 2012). Os mutantes elaborados neste trabalho apresentam tanto hidrólise em placa, quanto hidrólise de biomassa, maiores do que a linhagem considerada hiperprodutora enzimática. Considerando que o custo do processo de hidrólise química, encarece o processo de conversão de resíduos lignocelulolíticos em glicose, em até 40% do valor total da produção do bioetanol, os mutantes RUT-C30 $\Delta$ zface1, revelam-se de grande importância, para que o uso da biomassa como fonte de energia, chegue a escala industrial (BENDIG; WEUSTER-BOTZ, 2013).

## 6. CONCLUSÃO

A celulose e a hemicelulose representam os maiores reservatórios de fonte de energia renovável na terra e poderiam ser amplamente utilizadas para produção de biocombustíveis e embora existam processos químicos para a hidrólise desses compostos, o custo e o baixo rendimento desses processos são um grande problema para a utilização da biomassa em escala industrial. Os fungos filamentosos possuem características de crescimento micelial que favorecem a degradação de substratos sólidos, portanto produzem um coquetel enzimático altamente específico.

Atualmente a linhagem mais utilizada industrialmente é a RUT-C30 e devido a isso é alvo de pesquisas para a criação de mutantes que tenham o coquetel enzimático produzido com maior eficiência. Com essa finalidade foram desenvolvidas as linhagens mutantes RUT-C30 $\Delta$ zface1, criadas a partir da deleção da sequência codificadora do dedo de zinco do gene repressor de celulase *ace1* na linhagem RUT-C30. Os mutantes deste trabalho apresentaram eficiência da hidrólise de biomassa da cana-de-açúcar aumentada quando comparada com a linhagem parental.

O aumento da produção enzimática pelos mutantes mostra que as linhagens que hoje são conhecidas como hiperprodutoras de celulase, podem ter sua produção enzimática otimizada através da engenharia genética. Assim, as linhagens *T. reesei* RUT-C30 $\Delta$ zface1 são promissoras para serem aplicadas em biorrefinarias na tentativa de alavancar o aproveitamento do resíduo da cana-de-açúcar como fonte renovável de energia, contribuindo assim para o estabelecimento do bioetanol como uma alternativa viável no restrito mercado de combustíveis brasileiros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C. D. J.; DE SOUZA, P. M. Impactos do crescimento da produção de cana-de-açúcar na agricultura dos oito maiores estados produtores. **Revista Ceres**, v. 61, n. 4, 2014.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, n. 1, p. 4, 2010.

BENDIG, C.; WEUSTER-BOTZ, D. Reaction engineering analysis of cellulase production with *Trichoderma reesei* RUT-C30 with intermittent substrate supply. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 36, n. 7, p. 893-900, 2013.

BRODERSEN, D. E.; CLEMONS JR, W. M.; CARTER, A. P.; MORGAN-WARREN, R. J.; WIMBERLY, B. T.; RAMAKRISHNAN, V. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. **Cell**, v. 103, n. 7, p. 1143-1154, 2000.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 14, p. 1291-1296, 2002.

CASSAGO, A.; PANEPUCCI, R.; BAIÃO, A.; HENRIQUE-SILVA, F. Cellophane based mini-prep method for DNA extraction from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **BMC Microbiol**, v. 2, p. 14, Jun 18 2002.

CASTRO, A. M. D.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (CGEE). Química verde no Brasil: 2010-2030 - Ed. rev. e atual. Brasília, DF, 2010.

CHAVERRI, P.; BRANCO-ROCHA, F.; JAKLITSCH, W.; GAZIS, R.; DEGENKOLB, T.; SAMUELS, G. J. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. **Mycologia**, v. 107, n. 3, p. 558-590, 2015.

CHEUNG, W.; HUBERT, N.; LANDRY, B. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **Genome Research**, v. 3, n. 1, p. 69-70, 1993.

CHIARI, L.; DO VALLE, J.; RESENDE, R. Comparação de três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis*. **Embrapa Gado de Corte-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2009.

COLUSSI, F. **Caracterização bioquímica, biofísica e estrutural da Celobiohidrolase I de *Trichoderma harzianum* envolvida na hidrólise da biomassa lignocelulósica**. 2016. Universidade de São Paulo

CORABI-ADELL, C. **Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (HYPOCREALES-FUNGI) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica**. 2004. 220 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2004.

DE AGUIAR, C. M.; DE LUCENA, S. L. Produção de celulases por *Aspergillus niger* e cinética da desativação celulásica. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 4, 2011.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant molecular biology reporter**, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

DERNTL, C.; KIESENHOFER, D. P.; MACH, R. L.; MACH-AIGNER, A. R. Novel strategies for genomic manipulation of *Trichoderma reesei* with the purpose of strain engineering. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 18, p. 6314-6323, 2015.

DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. **Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases**. *Ind. Crop.*, v. 20, p. 11-21, 2004.

DOS SANTOS CASTRO, L.; 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 carbon source in *Trichoderma reesei*. **Gene expression patterns**, v. 14, n. 2, p. 88-95, 2014.

DOYLE, J. J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull Bot Soc Am**, v. 19, p. 11-15, 1987.

FANG, H.; XIA, L. High activity cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* ZU-02 with the enhanced cellobiohydrolase production. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 693-697, 2013/09/01/ 2013.

FLORENCIO, C. **Microrganismos Produtores de Celulases: Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp.** 2011. 86 p. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550-567, 2015.

HÄKKINEN, M.; VALKONEN, M. J.; WESTERHOLM-PARVINEN, A.; ARO, N.; ARVAS, M.; VITIKAINEN, M.; PENTTILÄ, M.; SALOHEIMO, M.; PAKULA, T. M. 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, n. 1, p. 14, 2014.

HERMOSA, M.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA, E. T.; DIAZ-MINGUEZ, J.; CASTRO, C.; MONTE, E.; GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1890-1898, 2000.

HERPOËL-GIMBERT, I.; MARGEOT, A.; DOLLA, A.; JAN, G.; MOLLÉ, D.; LIGNON, S.; MATHIS, H.; SIGOILLOT, J.-C.; MONOT, F.; ASTHER, M. Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. **Biotechnology for biofuels**, v. 1, n. 1, p. 18, 2008.

IVANOVA, C.; BÅÅTH, J. A.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P. Systems analysis of lactose metabolism in *Trichoderma reesei* identifies a lactose permease that is essential for cellulase induction. **PLoS one**, v. 8, n. 5, p. e62631, 2013.

JAKLITSCH, W. M.; STADLER, M.; VOGLMAYR, H. Blue pigment in *Hypocrea caerulescens* sp. nov. and two additional new species in sect. *Trichoderma*. **Mycologia**, v. 104, n. 4, p. 925-941, 2012.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos avançados**, v. 24, n. 68, p. 223-253, 2010.

KOOTSTRA, A. M. J.; BEEFTINK, H. H.; SCOTT, E. L.; SANDERS, J. P. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 31, 2009.

KUBICEK, C. P. Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. **Journal of biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 133-142, 2013.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 1-24, 1997.

LEMOS, J. Estudo da produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana. **Teses de Doutorado. Escola de Química. Universidade Federal de Rio de Janeiro. Brasil**, 2001.

LIECKFELDT, E.; SAMUELS, G. J.; NIRENBERG, H. I.; PETRINI, O. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2418-2428, 1999.

LIMING, X.; XUELIANG, S. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresource technology**, v. 91, n. 3, p. 259-262, 2004.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E.; SILVA, J. E. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: the 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and bioenergy**, v. 32, n. 7, p. 582-595, 2008.

MACH, R. L.; SCHINDLER, M.; KUBICEK, C. P. Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. **Current genetics**, v. 25, n. 6, p. 567-570, 1994.

MANDELS, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. **J Bacteriol**, v. 73, n. 2, p. 269-78, 1957.

MARGEOT LOPES, V.; JUNIOR, G.; BRAGA, R.; JESUS, M. D.; MARTINS, C.; PINTO, G. Atividade da Xilanase em Cepas de *Colletrotichum* e *Trichoderma*. SINAFERM, Natal. **RN**, 2009.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current opinion in biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 372-380, 2009.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Secretaria de Produção e Agroenergia**. Departamento da cana-de-açúcar e Agroenergia. Produção brasileira de etanol. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 14 maio 2016.

MONTENECOURT, B. S.; EVELEIGH, D. E. (a). Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. **Appl Environ Microbiol**, v. 34, n. 6, p. 777-82, 1977.

MONTENECOURT, B. S.; EVELEIGH, D. E. Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. In: (Ed.): ACS Publications, 1979.

MORAIS, S. A. L. D.; NASCIMENTO, E. A. D.; MELO, D. C. D. Chemical analysis of *Pinus oocarpa* wood part I: quantification of macromolecular components and volatile extractives. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. Rio de Janeiro: MAKRON Books, V 1, 1980.

PEREIRA JR, N.; COUTO, M.; SANTA ANNA, L. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**, v. 2, p. 2-45, 2008.

PETERSON, R.; NEVALAINEN, H. *Trichoderma reesei* RUT-C30—thirty years of strain improvement. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 58-68, 2012.

PLAZA, G.; UPCHURCH, R.; BRIGMON, R.; WHITMAN, W.; ULFIG, K. Rapid DNA Extraction for Screening Soil Filamentous Fungi Using PCR Amplification. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 13, n. 3, 2004.

POPP, J.; LAKNER, Z.; HARANGI-RAKOS, M.; FARI, M. The effect of bioenergy expansion: food, energy, and environment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 559-578, 2014.

PORTNOY, T.; MARGEOT, A.; SEIDL-SEIBOTH, V.; LE CROM, S.; CHAABANE, F. B.; LINKE, R.; SEIBOTH, B.; 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.

RAGHUWANSHI, S.; DESWAL, D.; KARP, M.; KUHAD, R. C. Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. **Fuel**, v. 124, p. 183-189, 2014.

RAO, R.; ALLEN, N.; HOBBS, J.; ALBORN, W.; KIRST, H.; PASCHAL, J. Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 24, n. 5, p. 689-695, 1983.

RIBEIRO, L. F.; DE LUCAS, R. C.; VITCOSQUE, G. L.; RIBEIRO, L. F.; WARD, R. J.; RUBIO, M. V.; DAMÁSIO, A. R.; SQUINA, F. M.; GREGORY, R. C.; WALTON, P. H. A novel thermostable xylanase GH10 from *Malbranchea pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 115, 2014.

RIES, L.; BELSHAW, N.; ILMÉN, M.; PENTTILÄ, M.; ALAPURANEN, M.; ARCHER, D. The role of CRE1 in nucleosome positioning within the *cbh1* promoter and coding regions of *Trichoderma reesei*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 2, p. 749-762, 2014.

ROCHA, N. R. D. A. F. Produção de celulase por fermentação submersa empregando resíduos agroindustriais para a produção de etanol. 2011.

RUEGGER, M. J.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, p. 205-211, 2004.

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.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. D.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

SHAH, S.; NASREEN, S.; SHEIKH, P. Cultural and Morphological Characterization of *Trichoderma* spp. Associated with Green Mold Disease of *Pleurotus* spp. in Kashmir. **Research Journal of Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 139, 2012.

SILVEIRA, V.D. **Micologia**. 5a. Ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda, 1995.

SIVAN, A.; STASZ, T.; HEMMAT, M.; HAYES, C.; HARMAN, G. Transformation of *Trichoderma* spp. with plasmids conferring hygromycin B resistance. **Mycologia**, p. 687-694, 1992.

STEIGER, M. G.; VITIKAINEN, M.; USKONEN, P.; BRUNNER, K.; ADAM, G.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M.; SALOHEIMO, M.; MACH, R. L.; MACH-AIGNER, A. 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.

SUN, Y.; CHENG, J. J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource technology**, v. 96, n. 14, p. 1599-1606, 2005.

SZENGYEL, Z.; ZACCHI, G.; VARGA, A.; RÉCZEY, K. Cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C 30 using steam-pretreated spruce. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 84, n. 1-9, p. 679-691, 2000.

TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review *BioResources*. 2007.

THONGEKKAEW, J.; IKEDA, H.; MASAKI, K.; IEFUJI, H. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, v. 60, n. 2, p. 140-146, 2008.

VÁSQUEZ, M. P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA, M. B.; PEREIRA, N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. In: (Ed.). **Applied Biochemistry and Biotechnology**: Springer, 2007. p.141-153.

VAZQUEZ-ANGULO, J. C.; MENDEZ-TRUJILLO, V.; GONZALEZ-MENDOZA, D.; MORALES-TREJO, A.; GRIMALDO-JUAREZ, O.; CERVANTES-DIAZ, L. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from *Trichoderma* spp (Hypocreaceae). **Genet Mol Res**, v. 11, n. 2, p. 1379-84, May 15 2012.