

# Melhoramento do fungo *Trichoderma erinaceum*: uso de métodos de mutagênese para aumento de produção de enzimas lignocelulolíticas

**Palavras-Chave:** *Trichoderma reesei*, melhoramento genético, bioetanol

**Autores/as:**

**Stella Pinheiro Grandin - IB UNICAMP**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> André Damasio - IB UNICAMP**

## 1. Introdução

A matriz energética mundial do século 20 foi amplamente dominada pela utilização de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás natural) que, ainda no início do século 21, representavam mais de 80% da produção energética global (GOLDEMBERG, 2009). A queima desses compostos resulta na emissão de gases como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>) e óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), sendo o acúmulo desses na atmosfera um dos principais agentes responsáveis pelo aquecimento global (HANSEN et al., 2000; CROWLEY, 2010; COOK et al., 2013).

Torna-se necessário, frente a esses fatos, impulsionar a remodelação da matriz energética mundial, priorizando fontes de energia renovável em detrimento da queima de combustíveis fósseis, tendo como objetivo a redução da emissão de gases de efeito estufa na atmosfera, o que possibilitaria amenizar e até recuar os efeitos do aquecimento global (DE MIRANDA, R. L.; MARTINS, E. M.; LOPES, K., 2019). Nesse cenário, os biocombustíveis apresentam-se como uma opção muito promissora, e sua utilização tem crescido consideravelmente nas últimas décadas, principalmente no Brasil, tido como um dos países pioneiros na geração de energia limpa. Em 2004, fontes renováveis de energia totalizaram 13,61% da oferta energética primária nacional. Em 2018, esse número já era de 45,3%, segundo o Ministério de Minas e Energia (MME, 2019).

Nas últimas décadas houve um incentivo significativo por parte do governo brasileiro para intensificar o uso dos combustíveis renováveis, principalmente do etanol, de modo que em 2018 os derivados da cana-de-açúcar já representavam 17,4% da matriz energética nacional (MME, 2018). O etanol de segunda geração, ou bioetanol, é um combustível obtido por meio do processamento e posterior fermentação dos açúcares presentes em resíduos vegetais, no caso da cana-de-açúcar, o bagaço e a palha. Dentre suas vantagens, tem-se o aumento da produção de etanol sem que seja necessário o aumento da área de cultivo da matéria-prima, além da utilização de insumos já disponíveis para os produtores de álcool e açúcar, que seriam descartados. Dessa forma, o bioetanol é extremamente promissor em termos de economia, rentabilidade e sustentabilidade. Entretanto, o processamento industrial que precede a etapa de fermentação enfrenta alguns obstáculos para se tornar mais eficiente e economicamente vantajoso.

A produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço e da palha da cana-de-açúcar exige etapas de pré-tratamento e hidrólise, por utilizar de uma matéria-prima rica em açúcares insolúveis, o que torna um material extremamente diverso e complexo. Materiais lignocelulolíticos são constituídos por uma matriz de polissacarídeos que, essencialmente, é formada por fibras de celulose envolvidas por hemicelulose e lignina (SANTOS et al., 2012; DIAS et al., 2012). Essa estrutura rígida e complexa torna

esses materiais difíceis de serem hidrolisados, por ocorrer restrição da acessibilidade microbiana e da ação enzimática (PU et al., 2013), o que representa um desafio para a indústria de bioetanol. Esse material deve ser pré-tratado e sofrer hidrólise para que haja conversão dos polissacarídeos em monossacarídeos fermentescíveis (PEREIRA, 2012).

Dessa forma, tornam-se necessários: um pré-tratamento capaz de aumentar a superfície de contato e a porosidade do material celulósico (KARAGÖZ et al, 2012), e uma hidrólise capaz de converter os açúcares complexos presentes na biomassa celulósica em monômeros como glicose ou xilose, no qual é preciso utilizar um coquetel enzimático eficiente, que necessariamente deve conter uma mistura das principais enzimas para degradação da biomassa lignocelulolíticas: celulasas, hemicelulasas, LPMOs (lytic polysaccharide monooxygenases) e ligninasas, que atuem de forma conjunta e sinérgica. Podem-se citar como enzimas imprescindíveis para o processo: endoglucanases, celobiohidrolases,  $\alpha$ -glicosidases, monooxygenases, entre outras. Atualmente, coquetéis enzimáticos com essas propriedades são monopólios de empresas estrangeiras, mantendo a produção brasileira de bioetanol dependente de importação, o que aumenta o custo operacional para a indústria e representa um obstáculo para a viabilidade e competitividade econômica desse biocombustível, representando um gargalo da produção de biocombustíveis em escala industrial (Macrelli, 2012; Amorim, 2011).

Assim, **é de interesse nacional que a pesquisa brasileira seja capaz de produzir um coquetel enzimático próprio, industrialmente eficiente e mais viável economicamente**, para que seja possível para o país manter sua tendência das últimas décadas de impulsionar a utilização e expansão de fontes de energia limpas e renováveis. É nesse contexto que o presente projeto visa o melhoramento genético de uma linhagem do fungo *Trichoderma erinaceum*, que apresenta grande produção de alguns grupos de enzimas lignocelulolíticas, em comparação ao fungo *Trichoderma reesei* (modelo de estudo em pesquisas da área).

### 3. Objetivos

Este projeto faz parte da pesquisa de doutorado da aluna Michelle Alexandrino de Assis, cujos objetivos principais consistem no desenvolvimento de cepas modificadas de *T. erinaceum* para promover aumento de secreção e atividade enzimática desse fungo. O presente projeto teve como objetivo principal a obtenção de linhagens modificadas do fungo por meio de ensaios mutagênicos, visando o desenvolvimento de cepas com fenótipo de interesse. Tendo isso em vista, os principais objetivos foram:

1. Realização de ensaios de mutagenese com *Trichoderma erinaceum* a partir do uso de 2 agentes principais, luz ultravioleta e EMS;
2. *Screening* dos mutantes visando a obtenção de cepas com maior capacidade hidrolítica;
3. Avaliação da produção enzimática extracelular de *Trichoderma erinaceum* em fermentação controlada, por quantificação da atividade enzimática e secreção de proteínas totais.

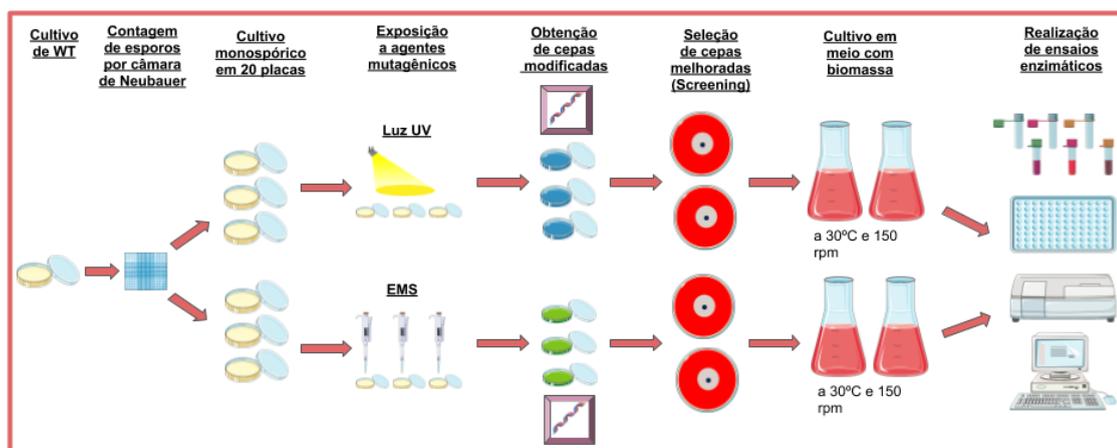


Figura 1: Esquema das principais etapas do projeto.

## 4. Principais Resultados

O projeto teve como base 3 cepas do fungo filamentoso *Trichoderma erinaceum*: a cepa WT, obtida por bioprospecção durante o mestrado da doutoranda Michelle de Assis, assim como 2 cepas mutantes criadas por uma pesquisadora do LEBIMO (Laboratório de Enzimologia e Biologia Molecular de Microorganismos) - Miriam Dantzger - em 2018. Essas 2 linhagens foram marcadas como mutantes positivos, por apresentarem indicativo de incremento na produção de enzimas lignocelulolíticas, e congeladas em freezer -80°, até o ano passado, quando voltaram a ser estudadas. A tabela a seguir mostra as cepas utilizadas durante a IC realizada pela aluna.

**Tabela 1:** Apresentação das 3 cepas utilizadas no projeto, bem como o surgimento de cada uma:

Cepa	Método de Obtenção
F3 <i>T. erinaceum</i> selvagem (WT)	Bioprospecção em palha de cana-de-açúcar
1RE5 mutante	Coleta e cultivo do 5º esporo obtido após exposição do WT a 1 rodada de EMS.
3RE9 mutante	Coleta e cultivo do 9º esporo obtido após exposição do WT a 3 rodadas de EMS.

Visando avaliar a produção de enzimas com potencial lignocelulolítico, isto é, aquelas que são necessárias para o processo de degradação de biomassa e, com isso, para a preparação de um coquetel enzimático eficiente na indústria, foram planejados experimentos de crescimento das diferentes cepas em diferentes substratos. O objetivo era induzir a produção das principais enzimas citadas (celulases, xilanases,  $\beta$ -glicosidases e  $\beta$ -xilanases) por meio da inoculação dos fungos em meios ricos em diferentes substratos: biomassa pré-tratada, Avicel® e lactose. Desse modo, seria possível identificar se os mutantes de fato apresentam incremento na secreção enzimática de interesse, como o screening inicial realizado em 2018 havia indicado.

### 4.1 Experimento em Palha de cana-de-açúcar Pré-Tratada:

Foram realizados experimentos de crescimento da 3 cepa fúngica em 3 meios diferentes - palha de cana-de-açúcar pré-tratada, micro celulose cristalina e lactose - sendo que o protocolo de preparo para cada um foi o mesmo, alterando-se apenas o substrato utilizado. Em primeiro lugar, foi feito um pré-inóculo de cada cepa para crescimento dos micélios, seguida de um inóculo, em quadruplicata, em meio *Mandels-Andreotti* enriquecido com o substrato escolhido. A padronização da quantidade de fungo adicionada para cada inóculo foi feita por número de esporos, sendo estes filtrados e transferidos para o inóculo. Essas réplicas foram incubadas em *shaker* por até 72h a 30°C assim como o fungo WT, sendo que a cada 24h foram coletados pontos do sobrenadante.

O propósito dos primeiros experimentos realizados era confirmar se havia incremento na produção enzimática em relação ao WT. Para isso, foram planejados 4 ensaios que permitiram avaliar a secreção de enzimas dos mutantes:

1. Dosagem de proteínas totais secretadas por Ensaio de Bradford;
2. Ensaio enzimático de CMCase, para quantificação de celulases;
3. Ensaio enzimático de  $\beta$ -glicosidase;
4. Ensaio enzimático de Xilanase;
5. Ensaio enzimático de  $\beta$ -xilanase.

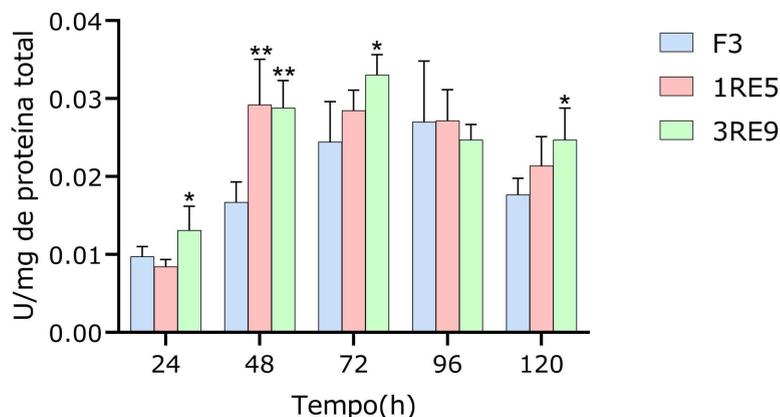
Todos os ensaios enzimáticos dos experimentos foram feitos com amostras em quadruplicata (n=4). Posteriormente, foi realizada uma média dos dados obtidos para cada amostra, assim como o desvio padrão entre as amostras, e estes dados foram utilizados para a construção de gráficos. Foram aplicados testes estatísticos do tipo t nos grupos de dados médios referentes a cada cepa fúngica. Aqueles que

apresentaram *p-value* significativo estão marcados nos gráficos com um asterisco (\*). O número de asteriscos se refere ao valor de *p*: 1 asterisco (\*) significa que  $p < 0,05$ ; 2 asteriscos significa que  $p < 0,01$  e 3 asteriscos significa que  $p < 0,001$ .

Abaixo, são mostrados os resultados mais significativos obtidos no experimento, bem como sua discussão e as conclusões que puderam ser tiradas ao fim do projeto.

#### 4.1.2. Ensaio de CMCase:

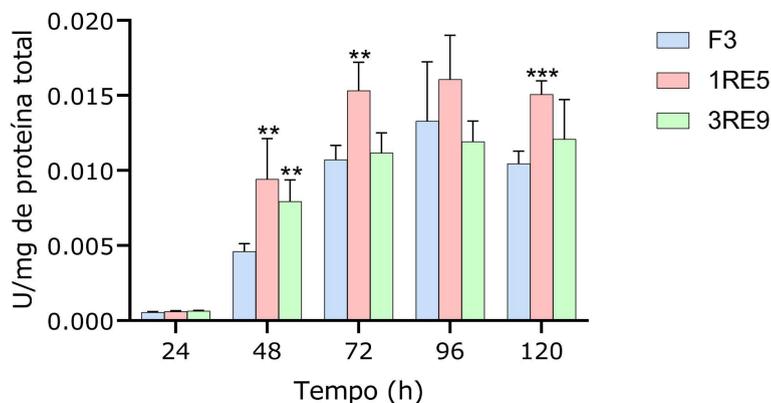
##### Ensaio Enzimático de CMCase



**Figura 2:** Gráfico apresentando os valores de U (Unidade internacional de atividade enzimática) de celulase por mg total de proteína médios de cada cepa, nos 5 dias de experimento (4h, 48h, 72h, 96h, 120h).

#### 4.1.3. Ensaio de $\beta$ -glicosidase:

##### Ensaio Enzimático de $\beta$ -glicosidase

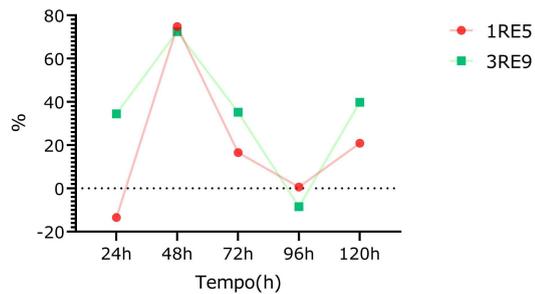


**Figura 3:** Gráfico apresentando os valores de U (Unidade internacional de atividade enzimática) de  $\beta$ -glicosidase por mg total de proteína médios de cada cepa, nos 5 dias de experimento (4h, 48h, 72h, 96h, 120h).

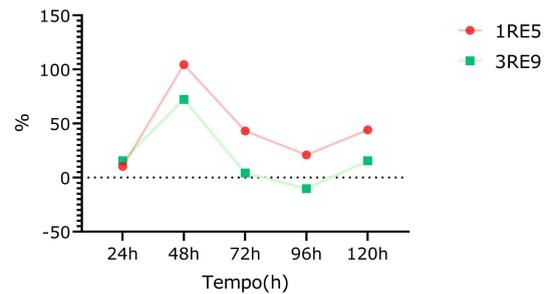
#### 4.1.4. Discussão dos Resultados

Conforme os dados apresentados, o incremento na secreção de enzimas lignocelulolíticas nas cepas mutantes foi verificado em diversos momentos. No primeiro gráfico, referente à secreção de celulases, pode-se observar uma produção tão aumentada nos mutantes, que no período de 48h resultou num *p-value* menor que 0,01 para ambos em comparação com a cepa original, indicando descoberta estatística de grande relevância. O mesmo aconteceu no ensaio enzimático de  $\beta$ -glicosidase, em que os mutantes se sobressaíram grandemente em relação ao WT, principalmente em 48h, sendo que o mutante 1RE5 manteve esse aumento em relação ao WT até o final do experimento. Para melhor ilustrar a relevância desses resultados, foram elaborados dois gráficos que mostram a diferença percentual da secreção enzimática dos fungos mutageneizados em relação ao WT:

**Relative Activity (%) in comparison to WT:  
CMCase**



**Relative Activity (%) in comparison to WT:  
 $\beta$ -glucosidase**



**Figuras 4 e 5:** Gráficos apresentando a atividade relativa percentual entre as cepas mutantes (1RE5 e 3RE9) e o WT (F3).

Acima, é possível facilmente observar que as 2 cepas produzem muito mais enzima do que o fungo original, chegando num auge de quase 80% mais CMCase e cerca de 100% mais  $\beta$ -glicosidase em 48h. Quanto à secreção de xilanases e  $\beta$ -xilanases, observa-se uma produção razoavelmente aumentada dessas enzimas em diferentes pontos para cada mutante, com destaque para a cepa 3RE9 em 48h, 72h, 96h e 120h no caso das xilanases; e 72h e 96h no caso das  $\beta$ -xilanases.

## 5. Conclusões

As cepas mutantes 1RE5 e 3RE9 apresentaram resultado melhorado em relação ao controle em diversos pontos. A atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidases e celulasas dessas cepas é muito superior à da cepa controle, tanto em palha pré-tratada quanto em micro celulose cristalina. Dessa forma, ambas as cepas cumprem com o objetivo do projeto, sendo ótimas candidatas para maiores estudos e caracterização, assim como para futuras rodadas de mutagênese visando ainda maiores melhoramentos de suas capacidades enzimáticas. O projeto contará com nova submissão ao PIBIC, com o intuito de seguir caracterizando as cepas com fenótipo melhorado.

Além dos resultados apresentados neste documento, a aluna obteve dados acerca da produção proteica total e atividade enzimática de 4 grupos de enzima (Celulasas, Xilanases,  $\beta$ -glicosidases e  $\beta$ -xilanases) em cada um dos 3 substratos utilizados. Foram também realizados: o sequenciamento genético da cepa mutantes, que provou se tratarem de fungos da espécie *Trichoderma erinaceum*; o microcultivo de cada fungo para observação dos fenótipos, por meio do que pôde-se constatar que não houve grande mudança fenotípica entre os fungos geneticamente modificados e o fungo original, de forma que as mutações não alteraram a grossura/tamanho das hifas nem o número/tamanho dos esporos - alterações que poderiam levar a obstáculos para crescimento em laboratório; e, por último, experimentos de fenotipagem que mediram o crescimento de cada cepa em diferentes meios a cada 12h, com base num meio controle contendo glicose e outros contendo compostos estressores, como Congo Red, tunicamicina e Calcofluor. A totalidade dos resultados será apresentada tanto no relatório final quanto no XXIX Congresso Virtual de Iniciação Científica da UNICAMP.