

Obtenção de mutantes de *Trichoderma harzianum* CFAM-422 visando à seleção de linhagens produtoras de enzimas para desconstrução de biomassa

Jéssyca S. Alencar^{1,3*}; Mariana S. Tamietti^{2,3}; Jhéssica C. Araújo^{2,3}; Léia C. L. Fávaro³

Introdução

A biomassa lignocelulósica pode ser utilizada para a produção de biocombustíveis e químicos renováveis. No entanto, um dos principais desafios para seu aproveitamento é o aumento da eficiência de hidrólise enzimática. Isto pode ser obtido, por exemplo, por meio da obtenção de microrganismos capazes de produzir enzimas em concentrações elevadas e de serem cultivados em substratos de baixo custo. Diferentes estratégias de melhoramento genético têm sido utilizadas visando aumento da produção de enzimas para conversão de biomassa (FÁVARO; POLETTO, 2013). Neste contexto, este trabalho iniciou um programa de melhoramento por mutação/seleção recorrente de *T. harzianum* CFAM-422, visando à seleção de linhagens melhoradas quanto à produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas.

Métodos

A linhagem de *T. harzianum* CFAM-422 foi isolada do bioma Amazônico e previamente selecionada como produtora de celulasas e hemicelulasas em níveis semelhantes à linhagens industriais (SOUZA et al., 2011). Esta linhagem foi submetida a um primeiro ciclo de mutagênese com ultravioleta. Para tanto, 10^6 conídios/mL foram tratados para obtenção de sobrevivência entre 1 e 5% e as células foram inoculadas em meio completo e em meio mínimo contendo carboximetilcelulose (CMC), Avicel, xilana e pectina. A biblioteca de prováveis mutantes foi parcialmente caracterizada em testes em triplicata, utilizando a avaliação semi-quantitativa do índice enzimático nos substratos CMC, pectina e xilana (4 dias de incubação a 25°C), bem como a avaliação de crescimento em Avicel (2 dias de incubação a 25°C). Linhagens promissoras foram selecionadas, purificadas e então reavaliadas do mesmo modo, porém em experimentos com 10 repetições. Linhagens selecionadas foram submetidas a um segundo ciclo de mutagênese com etilmetanossulfonato (10^6 conídios/mL

1 Centro Universitário de Brasília (UnICEUB), Brasília, Distrito Federal, Brasil, CEP 70790-075

2 Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brasil, CEP 70910-900

3 Embrapa Agroenergia, Brasília, Distrito Federal, Brasil, CEP 70770-901

*jessyca.alencar@colaborador.embrapa.br; leia.favaro@embrapa.br

tratados com EMS 10%, de modo a obter entre 1 e 5% de sobrevivência). A nova biblioteca de mutantes foi avaliada em duas etapas, conforme descrito anteriormente. Alguns mutantes selecionados foram caracterizados quanto à identidade genética por meio de marcadores moleculares RAPD, conforme protocolo descrito por Fávoro et al. (2011).

Resultados e Conclusões

No primeiro ciclo de mutagênese com ultravioleta foi obtida uma biblioteca de 1047 linhagens. Destas, 454 foram avaliadas quanto ao índice enzimático em CMC, xilana e pectina e quanto ao crescimento em Avicel (em triplicata) e 2 linhagens (TA127 e TA99) foram selecionadas. No segundo ciclo de mutagênese com etilmetanossulfonato foram obtidas 205 linhagens provenientes do parental TA127 e 305 linhagens provenientes do parental TA99. Após nova triagem (nos substratos CMC e Avicel, em triplicata) foi possível selecionar 32 linhagens descendentes do parental TA127 e 20 linhagens descendentes do parental TA99. As 32 linhagens descendentes do parental TA127 foram purificadas até a obtenção de culturas monospóricas e reavaliadas. Apenas 8 linhagens foram superiores nos testes realizados com 10 repetições. O parental TA127 apresentou crescimento em Avicel de 4,760 cm ($\pm 0,122$), enquanto que para os mutantes 7A43, 7A47, 7A49, 7D23 o diâmetro médio das colônias neste substrato foi de 6,694 cm ($\pm 0,194$); 7,156 cm ($\pm 0,297$); 7,238 cm ($\pm 0,116$) e 7,238 cm ($\pm 0,116$), respectivamente. No substrato CMC, o índice enzimático do parental TA127 foi 1,414 ($\pm 0,073$) e para os mutantes 7A33, 7A38, 7A54 e 7C30 os índices enzimáticos neste substrato foram 1,529 ($\pm 0,051$); 1,706 ($\pm 0,152$); 1,518 ($\pm 0,053$) e 1,530 ($\pm 0,085$), respectivamente. As 20 linhagens provenientes do parental TA99 também foram purificadas e reavaliadas em experimentos com 10 repetições, porém somente no substrato Avicel. O parental TA99 apresentou crescimento de 4,125 cm ($\pm 0,050$) neste substrato e apenas 4 das 20 linhagens apresentaram maior crescimento: 9A6, 9E20, 9E57 e 9C53 {4,713 cm ($\pm 0,133$); 4,263 cm ($\pm 0,116$); 4,481 cm ($\pm 0,080$); 4,400 cm ($\pm 0,108$), respectivamente}.

Alguns mutantes selecionados descendentes da linhagem TA127 foram avaliados quanto à identidade genética em comparação com os parentais CFAM-422 e TA127, por meio de marcadores RAPD. De 23 oligonucleotídeos avaliados, 17 produziram perfil de amplificação adequado para análise e confirmaram a identidade genética das linhagens (OP-A03, OP-A13, OP-A18, OP-A07, OP-A09, OP-A10, OP-C02, OP-C06, OP-C07, OP-C08, OP-C11, OP-P03, OP-P06, OP-P07, OP-P15, OP-P19 e OP-X01). A estratégia utilizada para obtenção de mutantes tem sido satisfatória e obteve-se até o momento uma biblioteca de 1558 linhagens. Os mutantes selecionados estão sendo avaliados quanto à produção de enzimas em cultivo submerso e espera-se obter linhagens com produção enzimática superior para aplicação na desconstrução de biomassa lignocelulósica.

Apoio Financeiro

Este trabalho é financiado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Agroenergia.

Referências

FAVARO, L. C. L.; MELO, F. L.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; ARAÚJO, W. L. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 8, número do artigo e14828, 2011.

FAVARO, L. C. de L.; POLETTO, C. M. Bioprospecção e melhoramento genético de fungos para produção de enzimas aplicadas em biocombustíveis. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microorganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013. p. 35-79.

SOUZA, M. F.; GONÇALVES, H. R. A.; FERNANDES, O. C. C.; BOM, E. P. S.; SILVA, A. S. Produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fungos filamentosos isolados da Amazônia: seleção de uma linhagem promissora. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS - SINAFERM, 18., 2011, Caxias do Sul. [Anais...]. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul, 2011.