

# Manipulação genética de genes endógenos de *Trichoderma reesei* para otimização do coquetel enzimático OpEn na degradação de biomassa lignocelulósica

**Responsável:** César Rafael Fanchini Terrasan

**Unidade:** Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR)

## 1. Introdução

A conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis representa uma etapa central para a viabilização de biorrefinarias e produção sustentável de biocombustíveis e bioprodutos. No entanto, apesar dos avanços em tecnologias de pré-tratamento e no desenvolvimento de formulações enzimáticas mais eficientes, o custo associado aos coquetéis enzimáticos ainda constitui o principal gargalo econômico do processo, especialmente no contexto brasileiro, onde há forte dependência de insumos importados (Lynd et al., 2017; Balan, 2014).

Nesse cenário, o desenvolvimento de soluções nacionais competitivas como o coquetel enzimático OpEn é estratégico. A linhagem fúngica de *Trichoderma reesei* produtora desse coquetel vem sendo continuamente engenheirada no Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR), principalmente via expressão de enzimas heterólogas (Fonseca et al., 2020; Santos et al., 2025). Embora essa abordagem tenha demonstrado ganhos relevantes, a modificação de genes endógenos do hospedeiro surge como uma estratégia complementar promissora, permitindo ajustes mais finos no metabolismo celular e no perfil do secretoma produzido pelo fungo.

## 2. Estado da Arte

*Trichoderma reesei* é amplamente reconhecido como plataforma industrial para produção de enzimas lignocelulolíticas, devido à elevada capacidade de secreção proteica, facilidade de manipulação genética e status de biossegurança (Nível 1). Dessa maneira, é considerado um organismo modelo para estudos de secreção e regulação gênica, com genoma extensivamente caracterizado, permitindo a identificação de genes envolvidos na degradação de polissacarídeos e seus elementos regulatórios (Martinez et al., 2008).

O coquetel enzimático OpEn vem sendo desenvolvido no LNBR (Fonseca et al., 2020; Santos et al., 2025), com recentes otimizações voltadas ao balanceamento entre enzimas hidrolíticas (endo/exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases) e enzimas de atividades auxiliares, essencial para maximizar a eficiência da sacarificação (Rodrigues et al., 2026; submetido).

Paralelamente, a modulação de genes endógenos também tem se mostrado uma estratégia eficaz para otimização de linhagens de *T. reesei*. Neste sentido, a deleção de repressores transcricionais, como Rce1 e Rce2, demonstrou aumentar a expressão de genes celulolíticos ao aliviar a repressão sobre ativadores como Xyr1 e Ace3 (Cao et al., 2017; Chen et al., 2021). De forma complementar, reguladores que integram metabolismo e expressão gênica, como TrTRC-1, também se mostram promissores (Dai et al., 2025).

A regulação da produção enzimática envolve ainda múltiplas camadas, incluindo sinalização celular e controle pós-transcricional. A superexpressão de CRZ1 aumenta

a produção de proteínas (Li et al., 2024), enquanto RNAs longos não codificantes demonstraram participar da ativação de genes celulolíticos (Till et al., 2018).

Além disso, fatores morfofisiológicos também demonstraram influenciar o desempenho industrial, como observado em mutantes com viscosidade reduzida que apresentam melhor comportamento em fermentação (Bodie et al., 2021).

### 3. Objetivos

Diante desse cenário, hipotetiza-se que modificações genéticas em diferentes níveis regulatórios na linhagem produtora do coquetel OpEn possam melhorar a eficiência de desconstrução da biomassa lignocelulósica. Assim, este projeto visa avaliar o impacto da deleção ou superexpressão de genes endógenos previamente validados como relevantes na secreção de proteínas e/ou na produção de enzimas lignocelulolíticas. Duas modificações com maior potencial serão selecionadas e introduzidas na linhagem de *T. reesei* produtora do coquetel OpEn, com o objetivo de aprimorar seu desempenho na desconstrução de biomassa pré-tratada.

### 4. Material e Métodos

**Microrganismos e cultivo:** a linhagem de *T. reesei* produtora do coquetel OpEn será utilizada como base para as modificações genéticas. A cepa parental e os mutantes derivados serão mantidas em meio PDA a 28 °C e armazenadas a 4 °C ou em glicerol a -80 °C. Cultivos para produção enzimática serão realizados em meio líquido contendo melaço, conforme descrito previamente (Fonseca et al., 2020).

**Engenharia genética e transformação:** Genes endógenos selecionados serão modificados utilizando-se a ferramenta CRISPR/Cas9 para deleção ou superexpressão. Cassetes de recombinação homóloga serão construídos contendo regiões flanqueadoras dos *loci* dos respectivos genes-alvo. As transformações serão realizadas via protoplastos, utilizando PEG/CaCl<sub>2</sub> para introdução do DNA. Transformantes serão selecionados em meio seletivo e validados por PCR.

**Ensaio bioquímico:** Sobrenadantes dos cultivos líquidos serão coletados para determinação de: a) proteína total (Método de Lowry); b) atividades enzimáticas: FPase, CMCase,  $\beta$ -glicosidase, xilanase e  $\beta$ -xilidase, conforme descrito previamente (Fonseca et al., 2020).

**Hidrólise de biomassa e análise de produtos:** Sobrenadantes dos cultivos líquidos serão aplicados em ensaios de sacarificação conduzidos com biomassa lignocelulósica pré-tratada, baseando-se em Fonseca et al., 2020. Amostras serão coletadas ao longo do tempo e a concentração de monossacarídeos (glicose e xilose) será determinada por HPLC.

**Análise do proteoma extracelular:** Os secretomas serão obtidos a partir dos sobrenadantes dos cultivos líquidos, seguido de digestão com tripsina e análise por LC-MS/MS, conforme descrito previamente (Rodrigues et al., 2026 submetido). As proteínas serão identificadas por busca em banco de dados de *T. reesei*, com quantificação relativa por abordagem *label-free*.

## 5. Cronograma

Atividade	Mês											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Desenho das estratégias de modificação genética	■	■										
Montagem vetores CRISPR/Cas9 e cassetes de recombinação homóloga		■	■	■								
Transformações e seleção de mutantes				■	■	■	■					
Validação molecular e cultivos de produção enzimática						■	■	■				
Ensaio de dosagem de proteína e atividades enzimáticas e análise proteômica por MS									■	■	■	
Ensaio de sacarificação, análise de dados, redação de relatório/artigo.										■	■	■

## 6. Referências

- BALAN, V. Current challenges in commercially producing biofuels from lignocellulosic biomass. *ISRN Biotechnology*, v. 2014, p. 1–31, 2014. DOI: 10.1155/2014/463074.
- BODIE, E.; VIRAG, A.; PRATT, R. J.; LEIVA, N.; WARD, M.; DODGE, T. Reduced viscosity mutants of *Trichoderma reesei* with improved industrial fermentation characteristics. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 48, n. 1–2, 2021. DOI: 10.1093/jimb/kuab014.
- CAO, Y.; ZHENG, F.; WANG, L.; ZHAO, G.; CHEN, G.; ZHANG, W.; LIU, W. Rce1, a novel transcriptional repressor, regulates cellulase gene expression by antagonizing the transactivator Xyr1 in *Trichoderma reesei*. *Molecular Microbiology*, v. 105, n. 1, p. 65–83, 2017. DOI: 10.1111/mmi.13685.
- CHEN, Y.; WANG, W.; LIU, P.; LIN, A.; FAN, X.; WU, C.; LI, N.; WEI, L.; WEI, D. The novel repressor Rce2 competes with Ace3 to regulate cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Molecular Microbiology*, v. 116, n. 5, p. 1298–1314, 2021. DOI: 10.1111/mmi.14825.
- DAI, X.; LIU, G.; ZHANG, Q.; ZHU, C.; GAO, H.; WU, Y.; CHENG, C.; LIN, H.; XUE, C. Novel transcription factor TrTRC-1 controls amino acid biosynthesis to regulate cellulase and xylanase production in *Trichoderma reesei*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 73, n. 51, p. 32749–32761, 2025.
- FONSECA, LM; PARREIRAS, LS; MURAKAMI, MT. Rational engineering of the *Trichoderma reesei* RUT-C30 strain into an industrially relevant platform for cellulase production. *Biotechnology for Biofuels*. 22;13:93, 2020. DOI: 10.1186/s13068-020-01732-w.
- LI, P.; YAN, S.; XU, Y.; YU, X. W. Constitutive overexpression of CRZ1 in *Trichoderma reesei* reveals its ability to enhance recombinant lipase production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 72, n. 51, p. 28335–28348, 2024. DOI: 10.1021/acs.jafc.4c08701.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.
- MARTINEZ, D.; BERKA, R. M.; HENRISSAT, B.; SALOHEIMO, M.; ARVAS, M.; BAKER, S. E.; et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*, v. 26, p. 553–560, 2008. DOI: 10.1038/nbt1403.
- RODRIGUES, P; TERRASAN, CRFT, BULKA NR. et al. TrLPMO9A drives oxidative cellulose depolymerization in *Trichoderma reesei* and is enhanced by heterologous cellobiose dehydrogenase expression. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* (submetido para publicação).
- SANTOS, CA; MORAIS, MAB; MANDELLI, F. et al. A metagenomic ‘dark matter’ enzyme catalyses oxidative cellulose conversion. *Nature*, 639, p.1076–1083, 2025.
- TILL, P.; PUCHER, M. E.; MACH, R. L.; et al. A long noncoding RNA promotes cellulase expression in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, v. 11, p. 78, 2018. DOI: 10.1186/s13068-018-1081-4.