



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Ana Carolina dos Santos Gomes

**Mecanismos de indução de enzimas despolimerizantes da
biomassa vegetal em *Myceliophthora thermophila***

São José do Rio Preto

2019

Ana Carolina dos Santos Gomes

**Mecanismos de indução de enzimas despolimerizantes da
biomassa vegetal em *Myceliophthora thermophila***

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. João Cláudio Thoméo

Co orientadora: Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes

São José do Rio Preto

2019

Gomes, Ana Carolina dos Santos.

Mecanismos de indução de enzimas despolimerizantes da biomassa vegetal em *Myceliophthora thermophila* / Ana Carolina dos Santos Gomes. – São José do Rio Preto, 2019

111 f.: il., tabs.

Orientador: João Cláudio Thoméo

Coorientador: Eleni Gomes

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

1. Microbiologia. 2. Xilanases. 3. Celulases. 4. Indução enzimática. 5. Fungos. I. Título.

CDU – 576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Ana Carolina dos Santos Gomes

**Mecanismos de indução de enzimas despolimerizantes da
biomassa vegetal em *Myceliophthora thermophila***

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. João Cláudio Thoméo
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves do Prado
UNESP – Ilha Solteira

Prof. Dr. Hamilton Cabral
USP – Ribeirão Preto

Dr^a. Aleksandrina Patyshakuliyeva
Universidade de Wageningen – Holanda

Prof^a. Dr^a. Fernanda Perpétua Casciatori
UFSCAR – São Carlos

São José do Rio Preto
18 de dezembro de 2018

Ao meu pai, minha mãe e meu irmão

Dedico

Agradecimentos

I would like to express my gratitude to many people who accompanied me during my PhD inside and outside of Sao Paulo State University (UNESP) over the past four years.

First of all, I would like to thank my supervisors João Cláudio Thoméo and Eleni Gomes for the opportunity to work in the Bioreactors lab and Microbiology lab. Thanks for sharing your knowledge, your supporting ideas, advices and friendship.

I am very thankful to the professors of the committee to spend your time reading and contributing to the final version of this thesis.

Ronald de Vries, thank you very much for the opportunity to work in your group at Westedijk Institute, the most organized Institute I have ever visited. The experience that I've got during this time is highly appreciated. I hope we can work together again! Special thanks to Nancy for the daily lab supervision. I have learnt so many molecular biology methods from you and thanks for the nice and fruitful conversations! I will never forget that I felt really welcomed in Utrecht because of your help.

I would like to also express my gratitude to Evy Battaglia for being involved in my project, for supporting ideas and interesting talks.

Special thanks to my friend of lab and life, Alexa. Thanks for being such a nice friend during my time in The Netherlands. I am also happy that we keep contact even from the other side of the ocean.

Thanks to my colleagues in The Netherlands. Victoria and Nora (the best companies for a beer) Tania, Elena, Sara, Joanna, Claire, Ronnie, Roland, Dora, Paul, Adiphol, Ad, April, Mao, Sandra and Jaap. Amazing time sharing experiences with you! I wish you, guys, success and a brilliant future career!

Thanks to my brazilian friends in The Netherlands, Tassia, Luciana e Angélica, for the unforgettable adventures!

Agradecimentos especiais aos meus queridos amigos do laboratório de microbiologia! Isabel, obrigada por ser minha colega de trabalho, amiga e irmã de vida. Nossas aventuras em Rio Preto e na Europa ficarão eternizadas! Diego, obrigada pela amizade e admiro muito você como cientista, é muito motivador ver seu entusiasmo pela ciência e busca por conhecimento! Roni, obrigada pela colaboração na revisão e pelos conselhos científicos. Muitos papers para você!! Erick Galindo e Josi, meus queridos, obrigada por ajudas em experimentos, cafés e pelas conversas mais engraçadas ever!!

Minha querida turma do café, almoço e da fome all the time: Carlos Eduardo, Tiago, Janaina, Eduardo, Pedro, Ana, Maitê, Lorena, Giuliana... vocês foram essenciais para o andamento dessa dura jornada acadêmica.

Aos meus amigos e companheiros de vida, Flávia Leandra, Carol Novaes, Letícia, Caio Amorim, Josi, Ricardo, Mizael, João e Helo Trindade. Mesmo com toda distância que a vida proporciona, carrego vocês comigo!

Ao meu pai Amauri, minha mãe Clarice e meu irmão Gabriel. Obrigada pelo amor e paciência. Eu amo vocês!

Aos docentes e funcionários da UNESP de Rio Preto e Ilha Solteira.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Don't let anyone rob you of your imagination, your creativity, or your curiosity. It's your place in the world; it's your life. Go on and do all you can with it and make it the life you want to live.”

Mae Jemison, the first African woman astronaut in space

RESUMO

O presente trabalho se propôs a buscar um melhor entendimento dos mecanismos de indução envolvidos na degradação da biomassa lignocelulósica por *Myceliophthora thermophila*. O capítulo 2 teve como objetivo descrever as similaridades e diferenças entre as linhagens de *Myceliophthora thermophila* ATCC 46424 e M.7.7 em diferentes substratos lignocelulósicos. O perfil de crescimento e a atividade de enzimas extracelulares demonstraram que ambas as linhagens utilizam mecanismos similares de degradação da biomassa. No entanto, a linhagem ATCC 46424 liberou uma maior quantidade de enzimas nas primeiras horas de crescimento, ao passo que M.7.7 revelou uma dinâmica diferente de secreção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Essa comparação enfatiza a diversidade no sistema regulatório de enzimas lignocelulolíticas em diferentes linhagens da mesma espécie, o que pode estar relacionado com a adaptação do fungo em diferentes biótopos. No capítulo 3 o fungo *Myceliophthora thermophila* M.7.7 foi cultivado em quatro diferentes fontes de carbono facilmente metabolizáveis sem agitação e o efeito de diferentes concentrações das mesmas foi avaliado na síntese de celulases, proteínas totais, consumo de açúcar e crescimento da biomassa ao longo do tempo de cultivo. A lactose foi considerada ser um indutor promissor para a síntese de celulases na concentração de 1,5%. O capítulo 4 teve como objetivo compreender os mecanismos de indução à nível molecular através da deleção do fator de transcrição *xyl1* em *Myceliophthora thermophila* C1. O perfil de crescimento do mutante foi drasticamente reduzido em xilose e xilano, e parcialmente em arabinose. A abordagem de RNA-seq foi utilizada para estudar o efeito da deleção de *xyl1* nos níveis de transcrição dos genes que codificam enzimas ativas de carboidratos (CAZymes). A análise do transcriptoma das linhagens selvagem e mutante em glicose, xilose, arabinose e arabinoxilano, permitiu a identificação de genes celulolíticos e hemicelulolíticos que estão sob controle de *xyl1*. Além disso, genes envolvidos na via catabólica de pentose e na via das pentoses-fosfato tiveram sua expressão drasticamente reduzida na linhagem mutante, sugerindo que estes genes também estão sob controle de *xyl1*. A regulação do sistema xilanolítico de *Myceliophthora thermophila* pode estar envolvida em uma rede complexa de fatores de transcrição.

Palavras-chave: Microbiologia, Xilanases, Celulases, indução enzimática, fungos

ABSTRACT

*The present work focused on a better understanding of the induction mechanisms involved in plant cell wall degrading enzymes in *Myceliophthora thermophila*. The Chapter 2 describes similarities and differences between the *Myceliophthora thermophila* ATCC 46424 and M.7.7 strains in different lignocellulosic substrates. The growth profile and the activity of extracellular enzymes demonstrated that both strains use similar mechanisms to degrade biomass. However, ATCC 46424 secreted a greater amount of enzymes in the first few hours of growth, whereas M.7.7 revealed a different dynamics of secretion of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes. This comparison emphasizes the diversity of the (hemi-) cellulolytic regulatory system in different strains of the same species, which might be related to the adaptation of the fungus to their different biotopes. In the Chapter 3, the strain *Myceliophthora thermophila* M.7.7 was cultivated in four different easily metabolized carbon sources and the effect of different concentrations of them was evaluated in the synthesis of cellulases, total proteins, sugar consumption and biomass growth over time cultivation. Lactose was considered to be a promising inducer for the synthesis of cellulases at the concentration of 1.5%. The Chapter 4 aimed to understand the induction mechanisms at the molecular level by deleting the transcription factor *xyr1* in *Myceliophthora thermophila* C1. Growth phenotype analysis of the mutant strain revealed a severely reduced growth on D-xylose and birchwood xylan and partially in arabinose. RNA-seq was used to study the effect of the *xyr1* deletion on transcripts levels of genes encoding Carbohydrate Active enzymes (CAZymes). The transcriptome analysis of the wild type and mutant strains cultivated in glucose, xylose, arabinose and arabinoxylan allowed the identification of cellulolytic and hemicellulolytic genes that are under *xyr1* control. In addition, genes involved in the pentose catabolic pathway and in the pentose phosphate pathway were drastically reduced in the mutant, suggesting that these genes are also under *xyr1* control. The regulation of the xylanolytic system of *Myceliophthora thermophila* might be involved in a complex network of transcription factors.*

*Keywords: transcription factors, xylanases, cellulases, *Myceliophthora thermophila*, enzymatic regulation*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

- Figura 1 - Plant biomass composition. Schematic representation of the main polymers of the plant cell wall. 17
- Figura 2 - Representation of the proteome tree of Fungi kingdom. 20
- Figura 3 - Schematic representation of the plant cell walls polysaccharides and corresponding polysaccharide-degrading enzymes. 23

Capítulo 2

- Figura 1 - Growth profile of the *Myceliophthora thermophila* ATCC46424 (a) and *Myceliophthora thermophila* M.7.7 (b) on 35 different carbon sources. 48
- Figura 2 - SDS-PAGE analysis of the protein profiles secreted by the *Myceliophthora thermophila* ATCC 46424 and *Myceliophthora thermophila* M.7.7 strains grown in liquid medium using wheat bran, sugarcane bagasse and soybean hull as carbon sources. 50
- Figura 3 - Specific enzymatic activities for β -xylosidase and α -arabinofuranosyl of *Myceliophthora thermophila* M.7.7 and *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464 for 72 hours of culture in wheat bran, cane bagasse and soybean hulls. 51
- Figura 4 - Specific enzymatic activities for β -glycosidase and cellobiohydrolase from *Myceliophthora thermophila* M.7.7 and *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464 for 72 hours of cultivation on wheat bran, cane bagasse and soybean hulls. 53
- Figura 5 - Saccharification of sugarcane bagasse and soybean hulls using the enzymatic mixtures of *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464 and M.7.7 of 72 hours of culture. 55

Capítulo 3

- Figura 1 - Sugar assimilation (A), mycelial growth (B), CMCase (C) activity and total proteins (D) at concentrations of 0.5% (■); 1% (●) and 1.5% (▲) of glucose as a source of carbon for 96 hours of cultivation. 63
- Figura 2 - Sugar assimilation (A), mycelial growth (B), CMCase activity (C) and total proteins (D) at concentrations of 0.5% (■); 1% (●) and 1.5% (▲) using lactose as carbon source for 96 hours of cultivation. 65

Figura 3. Sugar assimilation (A), mycelial growth (B), CMCase activity (C) and total proteins (D) at concentrations of 0.5% (■); 1% (●) and 1.5% (▲) using xylose as carbon source for 96 hours of cultivation. 67

Figura 4 - Sugar assimilation (A), mycelial growth (B), CMCase activity (C) and total proteins (D) at concentrations of 0.5% (■); 1% (●) and 1.5% (▲) using cellobiose as carbon source for 96 hours of culture. 69

Capítulo 4

Figura 1 - Growth phenotype of the *M. thermophila* wild type, *xyr1* and complemented strains on agar plates. 84

Figura 2 - Extracellular L-arabinose and D-xylose concentration during 48 h of growth of the wild-type and *Mtxyr1* strain in liquid cultures. 85

Figura 3 - Endo- and exo-acting enzyme activities after 24 h of growth of the wild-type and *xlr1* strain on lignocellulose related substrates. 87

Figura 4 - Venn diagram showing the JGI numbers, CAZy classifications and (determined or predicted) enzyme activities encoded by differentially expressed genes (DEGs) expected to be involved in plant cell wall degradation. 90

Figura 5 - The numbers of down-regulated genes per CAZy family in the *Mtxyr1* strain on wheat arabinoxylan compared to the wild type strain. 93

Figura 6 - Hierarchical clustering of significantly differentially expressed putative sugar transporter genes in the *Mtxyr1* strain. 96

Figura 7 - Hierarchical clustering of significantly differentially expressed genes in the *Mtxyr1* strain with a putative function in primary metabolism. 99

Anexos

Figura 1 - Deletion of the *Mtxyr1* gene in the *Myceliophthora thermophila* C1 strain. 109

Figure 2 - Growth phenotype of the *M. thermophila* wild-type and *Mtxyr1* strain on agar plates. 110

Figura 3 - Up-regulated Cazy genes in the *Mtxyr1* strain during 2 and 8 h of growth on wheat arabinoxylan compared to the wild-type strain. 111

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Examples of some lignocellulolytic enzymes from *Myceliophthora thermophila*

Anexos

Tabela 1 – Expression of PCP genes induced in the wild-type under inducing 112 conditions (L-arabinose, L-arabinose and D-xylose or arabinoxylan) compared to D-glucose.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TF	Transcription factor
CCR	Carbon Catabolic Repression
RNAi	RNA interference
AMYs	α -amylases
GLAs	Glucoamylases
AGDs	α -glucosidases
BXL	β – xylosidase
ABF	α - arabinofuranosidase
BGL	β - glucosidase
CBH	Cellobiohydrolase
pNP	p-nitrophenol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
UGP	Pyrophosphorylase
UDPG	Uridine glucose diphosphate
F	Forward
R	Reverse
GLC	Glucose
XYL	Xylose
ARA	Arabinose
CEL	Cellobiose
AVI	Avicel
WAX	Wheat arabinoxylan
BX	Beechwood xylan
PCP	Pentose catabolic pathway
PPP	Pentose phosphate pathway

Sumário

Introdução geral	14
Chapter 1	16
1. Plant biomass composition	17
2. Fungi	19
3. Plant biomass-degrading enzymes	21
3.1. Cellulose degrading enzymes	21
3.2. Hemicellulose degrading enzymes	21
3.3. Pectin degrading enzymes	22
4. Induction mechanisms of plant cell wall degrading enzymes	23
5. Potential of <i>Myceliophthora thermophila</i> for plant biomass degradation	25
6. Transcriptional factors of plant biomass degradation in <i>Myceliophthora thermophila</i> 30	
6.1. The Carbon catabolic repressor Cre1	30
6.2. The amyolytic regulator AmyR	31
6.3. The hemicelulolytic repressor MHR1	32
Chapter 2	41
1. Introduction.....	42
2. Materials and methods	43
3. Results and discussion.....	45
Chapter 3	59
1. Introduction.....	60
2. Material and methods	61
3. Results and discussion.....	62
4. Conclusions.....	69
5. References	70
Chapter 4	72
1. Introduction.....	73
2. Materials and Methods	76
3. Results	83
4. Discussion	100
5. References	104
6. Additional Files	109
Chapter 5	114

Introdução geral

A demanda por alimentos, combustível e recursos energéticos continua a aumentar em todo o mundo. O rápido consumo dos combustíveis fósseis levou ao aumento da geração de gases poluentes lançados na atmosfera, que causaram mudanças no clima global. A solução para essa problemática depende de como serão empreendidos o desenvolvimento e a implementação de tecnologias baseadas em fontes alternativas de energia. A biomassa lignocelulósica tem sido apontada como a mais apropriada matéria prima para a produção de biocombustíveis, uma vez que, consiste de aproximadamente 75% de polissacarídeos (GOLDEMBERG, 2007). Atualmente, existem muitos gargalos presentes no processo de produção de etanol de segunda geração que precisam ser superados para que este combustível se torne competitivo. Dentre eles, destacam-se pré-tratamentos e hidrólises enzimáticas mais eficazes e produção de enzimas lignocelulolíticas a baixo custo.

Os fungos são altamente eficientes no processo de degradação da biomassa vegetal, uma vez que evoluíram e desenvolveram uma complexa e eficiente maquinaria de enzimas hidrolíticas e oxidativas capazes de quebrar os polissacarídeos da parede vegetal (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011). O fungo filamentosso *Myceliophthora thermophila* teve o seu genoma sequenciado e anotado e é caracterizado por ser um excelente produtor de celulasas e hemicelulasas (BERKA et al., 2011). Na natureza este fungo atua na despolimerização de uma grande variedade de polissacarídeos, dentre os quais a celulose e a hemicelulose. A produção dessas enzimas em fungos é rigorosamente regulada e controlada por uma série de fatores de transcrição que ativam subconjuntos de genes em resposta a indutores específicos, geralmente componentes monoméricos da biomassa vegetal ou seus produtos metabólicos. Apesar do conhecimento adquirido sobre o seu amplo complexo enzimático, ainda não é satisfatoriamente compreendido como este fungo utiliza seu sistema celulolítico e hemicelulolítico para desconstruir a parede celular vegetal.

Chapter 5

Final remarks and conclusions

Enzymes from filamentous fungi have a central role in the degradation of different plant polysaccharides. It requires not only the secretion of vast number of enzymes, but also a complex regulatory system. The regulators need to act together in a coordinated manner to express the right enzymes over time, depending on the substrate and fungal species. Understanding the mechanisms involved in the production of enzymes by fungi when they are cultivated in the presence of simple and complex carbon sources is fundamental for the development of mutant strains in order to make the commercialization of enzymatic cocktails viable. However, our understanding of plant biomass degradation strategies by fungi is only in its infancy.

Myceliophthora thermophila is a thermophilic ascomycete fungus and naturally occurs in soil and self-heated soil masses of composted organic matter. *M. thermophila* is known to produce a complete set of cellulolytic enzymes that act synergistically when grown on cellulose.

The main objective of the present work was to understand the mechanism of induction of enzymes involved in the degradation of plant biomass in *Myceliophthora thermophila*. The Chapter 2 describes the similarities and differences between *Myceliophthora thermophila* ATCC 46424 and M.7.7 strains when cultured on different lignocellulosic substrates. These data demonstrate that different strains of *Myceliophthora thermophila* employ significantly different approaches to degrade plant biomass and could result in improved enzyme mixtures for industrial applications, saccharification of plant biomass for biofuel production. In Chapter 3, *Myceliophthora thermophila* strain M.7.7 was grown in four different easily metabolizable carbon sources and the influence of different concentrations was evaluated in the synthesis of cellulases, total proteins, sugar consumption and biomass growth over the growing time.

Chapter 4 aimed to understand the mechanisms of induction at the molecular level by deleting the transcription factor Xyr1 in *Myceliophthora thermophila* C1. The role of Xyr1 on the regulation of cellulolytic and xylanolytic genes are well studied in mesophilic fungi. However, the xylanolytic system and its regulation in *Myceliophthora thermophila* has not been fully described to date. This study provided new insights in the regulation and interactions of genes and proteins involved in plant polysaccharide degradation and provided new hypotheses that will help guide the optimization of pathways for increased enzyme production in filamentous fungi. All these data suggest the presence of a complex network between inducers and regulatory systems involved in plant biomass utilization in *Myceliophthora thermophila*