



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Pós-Graduação em Biologia Molecular

Caracterização do secretoma de *Aspergillus oryzae* crescido em estado sólido de bagaço de cana

ANA CAROLLINE RIBEIRO DE TOLEDO PINTO

Brasília, Abril de 2012



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Pós-Graduação em Biologia Molecular

Caracterização do secretoma de *Aspergillus oryzae* crescido em estado sólido de bagaço de cana

ANA CAROLLINE RIBEIRO DE TOLEDO PINTO

Orientador: Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart

Co-Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Brasília, Abril de 2012

“O amor forte e sincero de minha mãe acompanhava-me, protegendo-me como sempre, dando-me coragem e alegria. Amor de mãe é como um farol a iluminar seus entes queridos e a perfumar suas existências.” (trecho retirado do livro espírita “Violetas na Janela”).

E é a ela quem dedico essa dissertação. Sei que, onde quer que ela esteja, está orgulhosa e feliz por mim.

AGRADECIMENTOS

Depois desse turbilhão de emoções desses dois últimos anos, são muitas as pessoas que me ajudaram a fazer dessa dissertação algo concreto.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, pela oportunidade oferecida de realizar minha pós-graduação em um centro de excelência. Agradeço também ao CNPq, órgão que financiou minha bolsa de estudos durante esses dois anos.

Gostaria de agradecer enormemente ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart, pela paciência e pela disposição que teve para me ensinar muito do que eu sei em proteômica durante esses quatro anos em que ele me orienta. Obrigada por estar sempre disposto a me ajudar, seja me explicando o porquê daquele reagente que eu nunca ouvi falar, seja por escutar todos os meus devaneios, minhas ideias “escabrosas” (como ele mesmo gosta de nomeá-las) e minhas eternas dúvidas sobre o rumo que eu deveria dar a minha carreira. Se eu cheguei até aqui, chefe, a pessoa que mais tem méritos é você.

Agradeço também ao meu co-orientador, Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, por me ensinar com destreza a lidar com a biologia de fungos filamentosos e por me apresentar ao fantástico mundo das enzimas, que me encanta desde o ensino médio.

Agradeço ao professor Dr. Gilberto Barbosa Domont, da UFRJ, pela colaboração e pelo uso do espectrômetro de massas para a análise da amostra de secretoma em estado sólido. Agradeço ao professor Dr. Magno Rodrigues Junqueira, do LBQP, pelos ensinamentos sobre espectrometria de massas e pela ajuda nas análises. Obrigada pela paciência e por tanta disponibilidade em me ensinar!

Agradeço aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, alunos e professores, pela amizade e pelo companheirismo. Obrigada por todos os cafés na copa, todos os eventos em que estávamos juntos, por todas as bagunças e congressos, e, principalmente, obrigada pela companhia em experimentos que atrasaram algumas horas, obrigada pela ajuda para desvendar protocolos

misteriosos e por vigiar aquele gel enquanto eu precisei sair pra resolver algo urgente. Obrigada por vibrarem por toda e cada vitória minha, e por me darem apoio nos momentos em que de fato precisei. Levo daqui amizades para a vida inteira.

Também agradeço, com imenso carinho, aos amigos do Laboratório de Enzimologia. Gostaria de agradecer em especial às técnicas Marísia e Margarete, pela amizade sincera e pelo carinho que sempre tiveram comigo. Agradeço com carinho também aos amigos do grupo do Prof. Edivaldo, por todos os momentos divertidos que passamos juntos, tanto no laboratório como em congressos que participamos.

Agradeço imensamente aos amigos do Laboratório de Biofísica, onde, embora eu não tenha realizado nenhum experimento, passei por momentos incríveis e fiz amizades para a vida inteira. Agradeço aos amigos do Laboratório de Biofísica Estrutural, pela amizade e pela companhia em diversos almoços que fizemos juntos. Agradeço ao Chiquinho, técnico do laboratório, pelo carinho e pelo melhor café do Instituto de Biologia (acredite!). Agradeço especialmente aos amigos do Laboratório de Biologia Teórica e Computacional, pela amizade sincera, pelos conselhos valiosos e pelo exemplo de conduta e competência profissional, que pretendo levar para sempre comigo.

Agradeço aos muitos amigos, todos especiais e cada um do seu jeito, pelo apoio, pelo carinho e pela dedicação durante esses dois anos. Não teria sido do mesmo jeito se não fosse pelo apoio de vocês, seja pela palavra de carinho e força no momento em que eu precisei, seja pela vibração por todas as minhas vitórias nesses dois anos, seja pela cervejinha que tomamos para espantar o cansaço e estresse de mais um dia de trabalho. Agradeço, em especial, aos meus amigos do 2º/2006, meu querido semestre, pelo companheirismo que até hoje é presente.

Com imenso carinho, agradeço ao Studio Ayuny de Dança do Ventre, do qual tenho muito orgulho de ser aluna e bailarina, por todos os momentos inesquecíveis que passei com vocês durante esses dois anos de mestrado. Agradeço à diretora da escola, Prof.^a Roberta Salgueiro, por ser meu grande exemplo de bailarina, por me ensinar muito do que eu sei sobre dança do ventre, pela compreensão infinita e, principalmente, pela amizade sincera. Agradeço a todos os professores que passaram na minha vida através do Ayuny, tenho um carinho enorme por todos

vocês. E agradeço às bailarinas do Grupo Ayuny de Dança, minhas grandes amigas: vocês são as melhores!

Agradeço a minha família, a grande responsável por eu estar aqui celebrando mais uma vitória. Obrigada pelo amor incondicional que vocês me deram, pelos princípios ensinados. Agradeço pela compreensão e pela paciência com meus experimentos em feriados e aos finais de semana, por nem sempre poder estar presente em momentos importantes por conta das obrigações do mestrado e por às vezes passar alguns dias sem dar notícia. Agradeço pela preocupação com meu bem-estar e com minha saúde, que andou dando um bom trabalho durante esses dois anos. Agradeço especialmente ao meu pai e meus irmãos, que amo mais que tudo nessa vida!

Agradeço com carinho ao Lucas Bittencourt Queiroz que, apesar de ter estado presente apenas no finalzinho da dissertação, foi essencial para que o desfecho desta fosse a melhor possível. Obrigada pelo apoio, carinho e, principalmente, por sempre acreditar em mim.

Por fim, gostaria de agradecer a três pessoas: Juliana Ribeiro Rocha, Pedro Alves Martins e Camila Picceli. Vocês são a prova de que os amigos são a família que a gente escolhe. Amo vocês, incondicionalmente.

*“Não te deixes destruir...
Ajuntando novas pedras
e construindo novos poemas.
Recria tua vida, sempre, sempre.
Remove pedras e planta roseiras e faz doces. Recomeça.
Faz de tua vida mesquinha
um poema.
E viverás no coração dos jovens
e na memória das gerações que hão de vir.”*

Cora Coralina

APOIO FINANCEIRO

Esta dissertação foi desenvolvida com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que concedeu a bolsa de estudos, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), do INCT do Bioetanol e da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

RESUMO

A cana de açúcar é a segunda cultura mais abundante no país, e tem como resíduo o bagaço de cana, o qual é constituído por células vegetais que possuem uma parede celular composta por celulose, hemicelulose e pectina, além da lignina. A biomassa lignocelulósica armazena grande quantidade de energia química, que pode ser convertida em diversas outras fontes energéticas. Fungos filamentosos são microrganismos capazes de produzir e secretar enzimas variadas para utilizar a parede celular vegetal como fonte de carbono. Nesta dissertação foi analisado o secretoma de *Aspergillus oryzae* crescido em estado sólido de bagaço de cana como fonte de carbono. Foram testadas duas soluções para a extração do secretoma, a) tampão acetado de sódio 0,25mM, pH 5,0 e b) tampão acNa 0,25mM, pH 5,0, 0,1% *Tween 80*. As amostras foram submetidas às análises enzimáticas, eletroforéticas e por espectrometria de massas (LC-MS/MS). As análises enzimáticas e eletroforéticas mostraram que não houve diferença entre os dois métodos de extração. Além disso, o detergente *Tween 80* aparenta aumentar a extração de proteínas vindas do bagaço de cana, o que não é desejável para a análise por espectrometria de massas. A comparação do secretoma de *A. oryzae* em estado sólido com o secretoma deste em cultura submersa usando meio contendo bagaço mostrou diferenças significativas, sendo o secretoma em estado sólido mais diversificado enquanto o secretoma em cultura submersa apresentou maior abundância de determinadas proteínas. A análise do secretoma produzido em estado sólido por espectrometria de massas permitiu a identificação de 47 proteínas não redundantes, sendo 19 relacionadas à degradação de biomassa lignocelulósica. O polimorfismo enzimático em *A. oryzae* pode ter sido a justificativa para o baixo número de identificações. As proteínas intracelulares identificadas podem ter sido consequência do processo de extração, mas podem também ter sido secretadas por vias não convencionais, da mesma forma que ocorre em protozoários.

ABSTRACT

The sugarcane crop is the second more abundant crop in Brazil, and has as waste sugarcane bagasse, which is constituted by plant cells with a cell wall composed of cellulose, hemicellulose and lignin. The lignocellulosic biomass stores a large amount of chemical energy, which can be converted to another sources of energy. Filamentous fungi are a group of organisms that are able to secrete a variety of proteins to disrupt cell wall structure for further carbon assimilation. In this work, *Aspergillus oryzae* was submitted to solid state-fermentation and it was analyzed two different solutions for extraction of proteins secreted by the fungus as follows: a) 0.25 mM sodium acetate buffer, pH 5; b), 0.25 mM sodium acetate buffer, pH 5, 0.1% *Tween 80*. The samples were analyzed by enzymatic assays, electrophoretical profile and mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis. Enzymatic and electrophoretical analysis showed that there were no differences between extraction with sodium acetate buffer and the extraction buffer with *Tween 80*. Moreover, *Tween 80* seems to increase sugarcane bagasse proteins solubilization in the sample, which is not desirable for MS analysis. The comparison between *A.oryzae*'s secretome in solid-state culture and in submerged culture using sugarcane bagasse as carbon source showed remarkable differences, being the solid-state secretome more complex and the submerged-culture secretome with some more abundant proteins. Mass spectrometry analysis of solid-state secretome allowed the identification of 47 non redundant proteins, and 19 of them were related with biomass degradation. The high degree of enzymatic polymorphisms in *A. oryzae* might be the reason of few identified proteins. Intracellular proteins may be a consequence of extraction process, but they could be secreted in an unconventional secretion pathway, as those ones observed in protozoan parasites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama da organização da parede celular vegetal, mostrando a localização das paredes primária e secundária, além da lamela média.

Figura 2. Diagrama da estrutura tridimensional da parede celular primária, mostrando a localização das microfibrilas de celulose, além da hemicelulose e pectinas.

Figura 3. Estrutura da celulose, com destaque para a unidade de repetição do polímero, a celobiose.

Figura 4. Estrutura de conformação dos principais monossacarídeos constituintes da hemicelulose.

Figura 5. Formação da rede de homogalacturana por pontes iônicas envolvendo íons cálcio.

Figura 6. Esquema global de degradação da parede celular vegetal por celulasas e hemicelulases.

Figura 7. Metodologia de cultivo utilizada,

Figura 8. Atividade de xilanases nas duas estratégias de extração do secretoma de *A. oryzae*: tampão acNa (azul), tampão acNa + *Tween 80* (vermelho).

Figura 9. Atividade de celulases totais nas duas estratégias de extração do secretoma de *A. oryzae*: tampão acNa (azul), tampão acNa + *Tween 80* (vermelho).

Figura 10 Atividade de celobiohidrolases nas duas estratégias de extração do secretoma de *A. oryzae*: tampão acNa (azul), tampão acNa + *Tween 80* (vermelho).

Figura 11. SDS-PAGE comparando o secretoma de *A. oryzae* crescido em estado sólido de bagaço de cana utilizando duas estratégias de extração: tampão acNa 25mM e tampão acNa 25mM acrescido de *Tween 80* 0,1%.

Figura 12. SDS-PAGE do perfil do secretoma de *A. oryzae* crescido em estado sólido de bagaço de cana nos diferentes dias de cultivo.

Figura 13. SDS-PAGE comparando o perfil de secretoma de *A. oryzae* quando crescido em estado sólido de bagaço de cana e cultura submersa com 1% de bagaço de cana.

Figura 14. Perfil bidimensional dos secretomas de *A. oryzae* quando crescido em cultura submersa e cultura em estado sólido, em faixa ampla de pH (3-10).

Figura 15. Perfil bidimensional dos secretomas de *A. oryzae* quando crescido em cultura submersa e cultura em estado sólido, em faixa ácida de pH (4-7).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas identificadas por espectrometria de massas (LC-MS/MS) do secretoma de *A. oryzae* quando cultivado em estado sólido de bagaço de cana.

Tabela 2. Produtos proteicos desconhecidos que foram identificados por espectrometria de massas (LC-MS/MS) a partir do secretoma de *A. oryzae* quando cultivado em estado sólido de bagaço de cana.

ABREVIATURAS

2 DE	Eletoforese Bidimensional
ACN	Acetonitrila
BCA	Ácido Bicinconínico
BDA	Batata Dextrose Ágar
CMC	Carboximetil Celulose
CBD	<i>Carbohydrate Binding Domain</i>
DDA	<i>Data Dependent Acquisition</i>
DNS	Ácido Dinitro Salicílico
DTT	Ditiotreitol
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FP	Papel de Filtro
GH	Glicosil Hidrolase
IAA	Iodoacetamida
IEF	<i>Isoelectric Focusing</i> – Focalização Isoelétrica
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor
SC	<i>Submerged Culture</i> – Cultura Submersa
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SSF	<i>Solid-State Fermentation</i> – Fermentação em Estado Sólido
TCA	Ácido Tricloroacético
TFA	Ácido Trifluoracético
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tween 80	Polisorbato 80
UI	Unidade Internacional

ÍNDICE GERAL

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Biomassa lignocelulósica	1
1.2	Bagaço de cana-de-açúcar	2
1.2.1	<i>Bagaço de cana como matéria-prima lignocelulósica</i>	3
1.2.2	<i>Enzimas na degradação de biomassa lignocelulósica</i>	9
1.3	Fermentação em Estado Sólido (SSF).....	12
1.4	<i>Aspergillus oryzae</i>	14
1.5	Secretoma de fungos filamentosos.....	15
2	JUSTIFICATIVAS	17
3	OBJETIVOS	18
3.1	Objetivo geral.....	18
3.2	Objetivos específicos.....	18
4	HIPÓTESES	19
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
5.1	Microrganismo e condições de cultivo	20
5.2	Processamento do bagaço de cana.....	20
5.3	Produção de proteínas extracelulares	20
5.3.1	<i>Crescimento em meio sólido</i>	20
5.3.2	<i>Crescimento em meio líquido</i>	22
5.4	Caracterizações enzimáticas	23
5.4.1	<i>Quantificação de proteínas totais</i>	23
5.4.2	<i>Determinação de enzimas extracelulares</i>	23
5.4.3	<i>Curva de indução enzimática</i>	24
5.5	Separações eletroforéticas.....	24
5.5.1	<i>Precipitação de proteínas</i>	24
5.5.2	<i>SDS-PAGE</i>	25
5.5.3	<i>Eletroforese bidimensional</i>	25
5.6	Análise das proteínas por Espectrometria de Massas (LC-MS/MS)	26
5.7	Análise estatística.....	29
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30

6.1	Análise da atividade enzimática do secretoma de <i>Aspergillus oryzae</i> crescido em estado sólido de bagaço de cana	30
6.2	Análise do secretoma de <i>Aspergillus oryzae</i> quando crescido em estado sólido de bagaço de cana.	32
6.3	Comparação entre os secretomas de <i>Aspergillus oryzae</i> quando crescidos em cultura submersa e cultura em estado sólido.	35
6.4	Análise do secretoma de <i>Aspergillus oryzae</i> por Espectrometria de Massas (LC-MS/MS): .	41
7	CONCLUSÕES	47
8	PERSPECTIVAS	49
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Biomassa lignocelulósica*

O termo biomassa refere-se a toda matéria vegetal gerada por meio do processo de fotossíntese e derivados (Nogueira e Lora, 2003). Alguns exemplos são os resíduos florestais e agrícolas, os resíduos animais e matéria orgânica contida nos resíduos industriais, domésticos, municipais, etc. Essa biomassa contém energia química que advém da transformação da energia solar (Nogueira e Lora, 2003).

A energia química contida na biomassa pode ser liberada diretamente por combustão. No entanto, ela também pode ser convertida por outros processos que geram fontes de energia mais adequadas às atividades humanas, como o álcool e o carvão vegetal (Nogueira e Lora, 2003). A utilização de biomassa com finalidade energética está entre as fontes renováveis mais promissoras em termos de origem, tecnologia de conversão e produtos energéticos (Brasil, 2007). Esses resíduos possuem uma energia armazenada consideravelmente elevada, podendo representar duas vezes a energia contida no produto colhido (Nogueira e Lora, 2003). Estima-se que sejam produzidas pelo processo de fotossíntese, a partir de 1 % do total da radiação solar que incide sobre a Terra, cerca de 2×10^{10} toneladas de biomassa, equivalentes a 2×10^5 MJ de energia (Smil, 1985).

A diversidade de clima e vegetação, a grande extensão de terras cultiváveis e o desenvolvimento crescente de tecnologia aplicada ao desenvolvimento da agricultura são alguns dos fatores que fazem do Brasil um grande competidor no mercado agrícola mundial. Nosso país atua como líder de exportação de diversas monoculturas, como a soja, por exemplo. Também são destaques a exportação de carnes e suco de laranja, alguns dos produtos que conferiram ao Brasil o terceiro lugar em exportação agrícola mundial (Landim, 2010).

Neste contexto, os resíduos agroindustriais ganham destaque. Estes resíduos são gerados em unidades industriais que processam culturas agrícolas alimentares ou agroenergéticas (Brasil, 2007). Alguns desses resíduos vêm ganhando destaque,

por conta do seu potencial aproveitamento para geração de fluxo de renda, como os resíduos resultantes das indústrias de beneficiamento de arroz, de processamento de madeira e de processamento de cana-de-açúcar (Brasil, 2007).

1.2 Bagaço de cana-de-açúcar

Em termos de montante de produção, a cana-de-açúcar é a segunda cultura mais abundante no país, perdendo somente para a cultura de soja (Brasil, 2007). A sua produção sempre esteve associada à produção e exportação de açúcar, mas também está associada ao aumento da demanda do mercado interno por álcool combustível. Esse aumento de demanda surgiu nos anos 70, quando a energia gerada utilizando biomassa foi cotada como opção economicamente interessante ante o aumento de preço do petróleo (Nogueira e Lora, 2003). Atualmente, esse aumento está associado à popularização de carros bicombustíveis (Brasil, 2007) que utilizam etanol (produto de fermentação do caldo da cana-de-açúcar) como fonte de energia além da gasolina. Entre 1990 e 2005, a produção de cana-de-açúcar cresceu 60% e a área cultivada 38%, representando atualmente 5,8 milhões de hectares (Brasil, 2007).

A produção de açúcar e de álcool combustível tem como um dos resíduos gerado o bagaço de cana, além da chamada palha de cana-de-açúcar. O bagaço de cana é constituído por fibras celulósicas moídas, e constitui, em média, de 12 a 15% do peso seco da cana-de-açúcar. Em termos de produção, foram gerados $5,82 \times 10^7$ toneladas de bagaço de cana pela indústria sucroalcooleira em 2005 (Brasil, 2007).

Tendo em vista a grande produção de bagaço de cana pela indústria sucroalcooleira, a agregação de valor a esse resíduo tem se mostrado uma alternativa interessante para o aumento da receita dessa indústria (Baccarin e Castilho, 2002). O bagaço pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de rações bovinas, celulose e também para a co-geração de energias térmica e elétrica dentro da própria usina. A co-geração de energia a partir da queima do bagaço e palha de cana sempre existiu no setor, sendo uma alternativa atraente

para a geração da energia térmica necessária para o funcionamento da usina (Nogueira e Lora, 2003). No entanto, a co-geração se tornou uma alternativa energética interessante com a necessidade de diversificação da matriz energética brasileira, evidenciada pelo racionamento de energia elétrica imposto em 2001 (Baccarin e Castilho, 2002; Carpio e Lora, 2002).

1.2.1 Bagaço de cana como matéria-prima lignocelulósica

O bagaço de cana possui células vegetais delimitadas por uma parede relativamente delgada, mas mecanicamente forte. Essa parede consiste de uma mistura de diversos polímeros, além de proteínas estruturais, enzimas e complexos fenólicos (Taiz e Zeiger, 2009). A parede celular de plantas, além de exercer as funções de proteção do protoplasto, determinação de forma e regulação de volume celular, também exerce funções como resistência mecânica e obstáculo ao ataque de patógenos (Taiz e Zeiger, 2009)

A parede celular pode variar muito em composição e em aspecto microscópico dependendo do tipo celular, podendo se apresentar como uma parede mais delgada até possuir muitas camadas e maior grau de complexidade, como nas células do câmbio vascular e outras células especializadas. (Taiz e Zeiger, 2009). Apesar dessa diversidade morfológica, a parede celular é classificadas em dois tipos principais, parede primária e parede secundária:

- Parede primária: é formada por células em crescimento, e apresenta estrutura extensível, permitindo o crescimento da planta. Sua estrutura é considerada não-especializada.
- Parede secundária: é formada após cessar o crescimento da planta. A parede secundária tem alto grau de diferenciação, e está presente em tecidos que conferem sustentação mecânica à planta. A parede secundária organiza-se internamente à parede primária, apresentando

três camadas distintas (S1, S2 e S3). As paredes secundárias normalmente ocorrem impregnadas com lignina.

Percebe-se uma camada bem fina de material na junção entre as paredes primária e secundária, a lamela média. A lamela possui uma composição química diferente das paredes, sendo rica em pectina e contendo proteínas únicas, e está relacionada ao transporte de substâncias e adesão das paredes (Taiz e Zeigel, 2009). A estrutura geral da parede celular está esquematizada na figura 1:

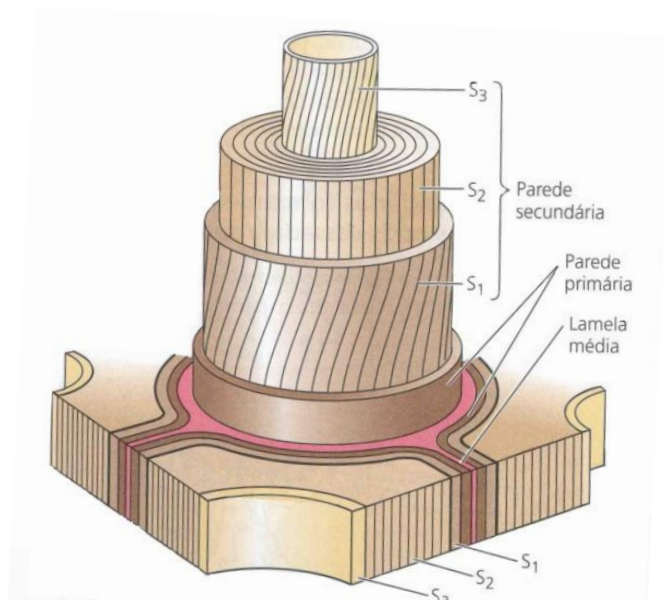


Figura 1. Diagrama de organização da parede celular, mostrando a localização das paredes primária e secundária, além da lamela média. Modificado de Taiz e Zeiger, 2009.

A parede celular primária é composta por microfibrilas de celulose, que estão imersas em uma matriz hidratada de polissacarídeos diversos. Essa matriz é composta principalmente por dois grupos de polissacarídeos, a hemicelulose e a pectina, conforme esquematizado na figura 2:

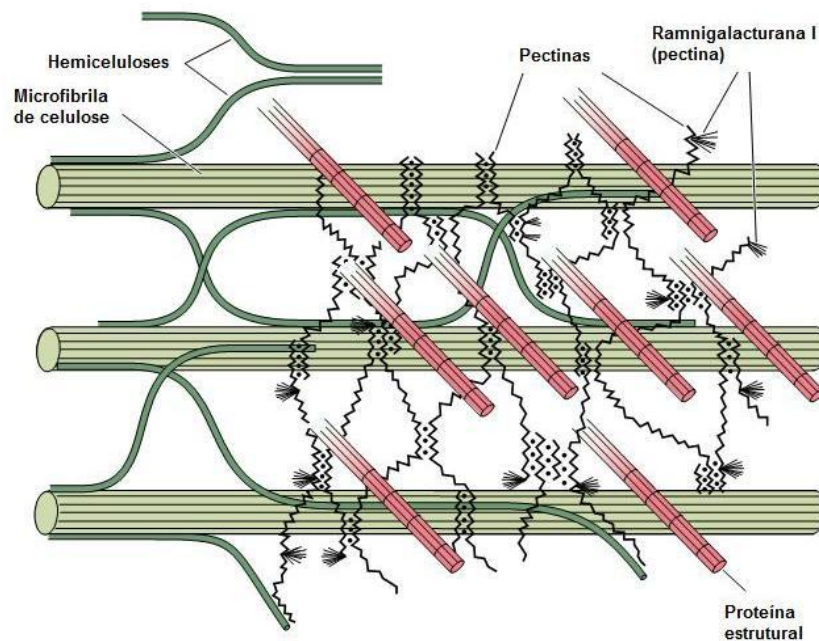


Figura 2. Diagrama da estrutura tridimensional da parede celular primária, mostrando a localização das microfibrilas de celulose, além da hemicelulose e pectinas. Modificado de Taiz e Zeiger, 2002.

A celulose é uma estrutura relativamente rígida, o que confere estabilidade para a parede celular. As moléculas de D-glicose estão unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4), formando microfibrilas que podem ser compostas de 2000 até 25000 resíduos de glicose (Brown *et al.*, 1996). Essas microfibrilas constituem uma estrutura alinhada em forma de fita altamente ordenada (cristalina), que exclui água, formando uma estrutura quimicamente estável e relativamente inacessível ao ataque enzimático (Taiz e Zeiger, 2009). A celulose também é composta por regiões com menor grau de organização (amorfas), que unem os motivos cristalinos por interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio (Viator *et al.*, 2002). Pelo fato de a configuração da ligação glicosídica entre os resíduos de glicose ser alternada, a unidade de repetição da celulose é a celobiose, um dissacarídeo composto por duas moléculas de D-glicose com ligação do tipo β -(1,4). A celulose pode ser encontrada em estruturas cristalinas variantes, dependendo da forma de empacotamento das microfibrilas, que são os alomorfos α , β , II, III e IV (Taiz e Zeiger, 2009; Wei *et al.*, 2009).

A estrutura da celulose, destacando a celobiose está esquematizada na figura 3:

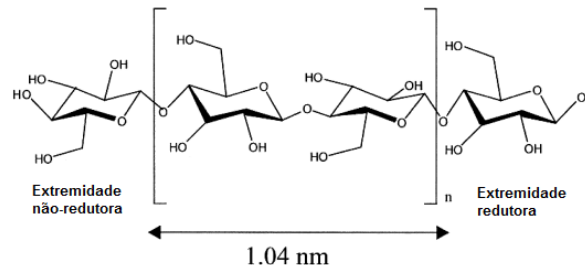


Figura 3. Estrutura da celulose, com destaque para a unidade de repetição do polímero, a celobiose. Modificado de Zhang e Lynd, 2004.

Apesar de possuir formação química relativamente simples, a estrutura molecular exata, a dinâmica e a biogênese da celulose ainda são objeto de discussão (Wei *et al.*, 2009). A estrutura da celulose descrita na literatura é baseada na celulose de plantas modificadas ou baseada em cristais produzidos por algas (Wei *et al.*, 2009). A estrutura nativa da celulose na parede celular permanece desconhecida, mas estudos já demonstram que a celulose contida na parede celular possui uma estrutura dinâmica (Ding & Himmel, 2006). Uma das justificativas para o desconhecimento dessa estrutura é a dificuldade de estudar o polímero *in situ* ou *in vivo* por conta do seu tamanho, entre 3 e 5 nanômetros de diâmetro.

As hemiceluloses são polissacarídeos com certo grau de flexibilidade que se ligam às moléculas de celulose, formando uma rede coesa entre as microfibrilas e também impedindo o contato entre elas, funcionando como uma espécie de revestimento (Taiz e Zeiger, 2009). Constituem um grupo heterogêneo de polissacarídeos, que variam de acordo com o tecido e a espécie em análise. As unidades desses polissacarídeos incluem principalmente aldopentoses, como D-xilose e L-arabinose, e aldo-hexoses, como D-glicose, D-manose e D-galactose (figura 4). Além da heterogeneidade de monossacarídeos, a hemicelulose também contém substituintes, como grupamentos acetila, L-arabinofuranosil, ácido D-glicurônico, ácido D-galacturônico e ácido α -D-4-O-metilgalacturônico nas ramificações (Bon *et al.*, 2008). Os açúcares do polissacarídeo normalmente estão

unidos por ligações do tipo β -(1,4), e ocasionalmente por ligações do tipo β -(1,3) (Pérez *et al.*, 2002). A diversidade de combinações possíveis entre ligações, ramificações e unidades monoméricas contribui para a heterogeneidade da estrutura da hemicelulose, que, de acordo com o monossacarídeo mais abundante na cadeia, pode ter diferentes denominações: xilana, arabinana, galactana ou glicomanana.

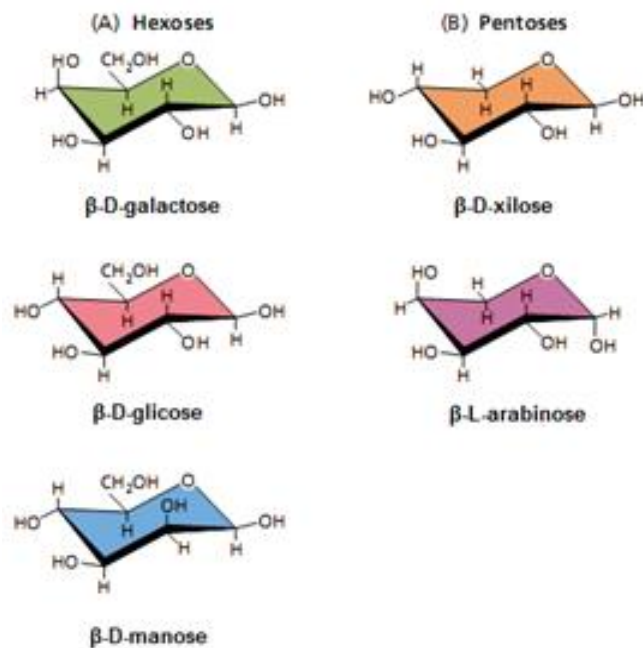


Figura 4. Estrutura de conformação dos principais monossacarídeos constituintes da hemicelulose. (A) Hexoses. (B) Pentoses. Modificado de Taiz e Zeiger, 2002.

As pectinas constituem um gel hidratado que embebe o sistema celulose-hemicelulose, funcionando como um agente hidrofílico que impede o colapso dessa rede. São compostas por um número heterogêneo de polissacarídeos, contendo tanto açúcares neutros como ramnose, arabinose e galactose, quanto açúcares ácidos, como o ácido galacturônico (Taiz e Zeiger, 2009). Esses açúcares formam domínios de polissacarídeos distintos na parede celular, associados por ligações covalentes e intermoleculares. Dentro desses domínios, podem-se destacar três principais:

- Homogalacturonana: também chamada de ácido poligalacturônico, é formada por resíduos de D-ácido glurônico unidos por ligações do tipo

α -(1,4), podendo representar até mais de 60% das pectinas na parede celular das plantas (Caffal e Mohnen, 2009);

- Ramnogalacturonano I (RG I): a cadeia base desse domínio é composta por ramnose e resíduos de ácido galacturônico alternantes. Além disso, pode conter cadeias laterais longas de arabinanos e galactanos;
- Ramnogalacturonano II (RG II): contém uma estrutura básica de ácido poligalacturônico, além de cadeias laterais compostas por pelo menos 10 açúcares distintos. É um domínio mais complexo, altamente ramificado. Outro aspecto exclusivo é a ligação de éster borato existente entre cadeias de RG II (Ishii *et al.*, 1999), importante para a resistência mecânica da parede celular.

As homogalacturonanas formam géis, redes frouxas formadas por polímeros altamente hidratados (Taiz e Zeigel, 2009; Caffal e Mohnen, 2009). Esses géis pécticos possuem os grupos carboxila (COO^-) não-metilados carregados e ligados às cadeias vizinhas via íons cálcio, formando pontes iônicas. Essa rede está esquematizada na figura 5:

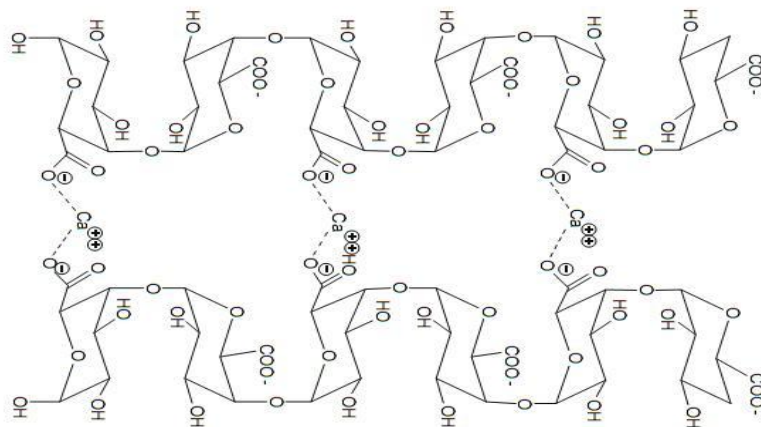


Figura 5. Formação da rede de homogalacturonana a partir de pontes iônicas envolvendo íons cálcio. Essas pontes conferem o caráter de gel às moléculas de pectina. Modificado de Caffal e Mohnen, 2009.

A lignina é uma macromolécula fenólica tridimensional com alto grau de complexidade, constituída por um polímero de grupos fenilpropanóides altamente

ramificado (Taiz e Zeiger, 2009). Suas subunidades básicas são alcoóis de fenilpropanóides com diferentes graus de metoxilação: cumaril, coniferil e sinaplil (Martínez *et al.*, 2005; Taiz e Zeiger, 2009). A lignina é encontrada principalmente em paredes celulares de tecidos de sustentação e vascularização, podendo ocorrer nas paredes primária e secundária (principalmente) e na lamela média, formando, juntamente com a hemicelulose, uma matriz amorfa onde as fibras de celulose ficam inseridas (Martínez *et al.*, 2005). A lignina, além de conferir resistência mecânica à planta, permite a condução de água e sais sob pressão negativa, e protege os polissacarídeos da parede do processo de degradação, agindo como agente de defesa contra patógenos, insetos e outros herbívoros (Hatfield e Vermerris, 2001). A estrutura precisa da lignina ainda não é conhecida, pelo fato de o polímero ser ligado covalentemente à holocelulose, mas sabe-se que as unidades da lignina não aparentam estar ligada de um modo repetido (Taiz e Zeiger, 2009).

1.2.2 Enzimas na degradação de biomassa lignocelulósica

Os componentes principais da parede celular de plantas (celulose, hemicelulose e lignina) formam uma rede cristalina complexa e robusta de difícil processamento. Para fazer frente a esse substrato, os microrganismos que dependem dele para a sobrevivência possuem um arsenal enzimático complexo, composto de diferentes grupos de enzimas.

As celulases compreendem um grupo de enzimas que, coletivamente, têm especificidade para as ligações glicosídicas do tipo β -(1,4) da fibra de celulose. São enzimas que agem em sinergismo (Lynd *et al.*, 2002), tendo em vista que a estrutura do polímero de celulose dificulta o ataque enzimático, conforme descrito anteriormente. A hidrólise completa da celulose requer, pelo menos, três grupos enzimáticos distintos:

- endo β -(1,4)-glicanases (E.C. 3.2.1.4, endocelulase), que catalisam randomicamente a hidrólise de regiões internas da molécula de celulose,

criando extremidades redutoras e não-redutoras com diversos graus de polimerização, que serão hidrolisados pelas enzimas CBH;

- exo-(1,4)- β -glicanases, como as celodextrinases (1,4- β -glicana-glicanohidrolases, E.C. 3.2.1.74) e as celobiohidrolases, ou CBHs (1,4- β -glicana-celobiohidrolases, E.C. 3.2.1.91), que atuam nas extremidades redutoras e não-redutoras gerando glicose e celobiose, respectivamente. As celobiohidrolases ocorrem em duas formas morfológicamente distintas: CBH tipo I, que catalisa a hidrólise de regiões redutoras, e CBH tipo II, que catalisa a hidrólise de regiões não-redutoras;
- β -glicosidases (ou celobiase, E.C. 3.2.1.21), que catalisa a hidrólise da celobiose em moléculas de D-glicose, também atuando nas extremidades não-redutoras da molécula de celulose.

As celulases, em geral, possuem em sua estrutura uma região responsável pela ligação da molécula ao substrato (CBM – *cellulose binding module*). Esse módulo pode funcionar como mecanismo de seletividade entre enzima e substrato, bem como ter a função de concentrar e/ou aproximar a enzima na superfície do substrato. Ademais, a ligação desse módulo à celulose aparenta facilitar o processo de amorfogênese deste polímero, diminuindo o grau de cristalização da celulose e criando uma superfície mais acessível ao ataque enzimático (Arantes e Saddler, 2010).

A variedade de açúcares nas ramificações da hemicelulose impede a formação de regiões cristalinas, como ocorre na celulose. Essa característica heteropolissacarídica exige um arsenal enzimático mais complexo para a degradação da hemicelulose (Bon *et al*, 2008). As hemicelulases também trabalham em sinergia, o que aumenta a susceptibilidade do polímero de hemicelulose, neste caso a xilana, ao ataque enzimático. Os principais grupos de hemicelulases que degradam xilana são:

- endo-(1,4)- β -xilanases (ou endoxilanases, E.C. 3.2.1.8), catalisam randomicamente a hidrólise de regiões internas da xilana, despolimerizando sua estrutura e gerando polissacarídeos menores. Este grupo atua de forma análoga às endo β -(1,4)-glicanases;

- 1,4- β -xilosidase (E.C. 3.2.1.37), que atua em extremidades não-redutoras da xilana ou em moléculas de xilobiose, e tem como produto de hidrólise a D-xilose. Esse grupo atua de forma análoga às β -glicosidases;
- enzimas desramificadoras das cadeias laterais ligadas à cadeia principal, como as α -L-arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55), que atuam em ligações do tipo α -(1,3) ou α -(1,5) em resíduos de arabinose; acetil-xilana esterases (E.C. 3.1.1.72), que catalisam a desacetilação de xilo-oligossacarídeos e de resíduos xilopiranosídicos de xilana; feruloil esterases (E.C. 3.2.1.73), que catalisa a hidrólise entre a xilana e a lignina (ácido hidroxicinâmico); α -glucuronidases (E.C. 3.2.1.139), que catalisam a hidrólise de resíduos glucuronosídicos das cadeias laterais (Beg *et al*, 2001).

Embora seja um substrato com menor recalcitrância ao acesso enzimático, a pectina é constituída por um grupo heterogêneo de polissacarídeos. Sua hidrólise requer um grupo de enzimas com atividades distintas, as pectinases. Os principais grupos são (Uenojo e Pastore, 2007):

- endo- α -(1,4)-poligalacturonases (E.C. 3.2.1.15), responsáveis por catalisar a hidrólise da região interna entre os resíduos de ácido D-homogalacturônico, resultando em polímeros menores;
- exo-poligalacturonase (E.C. 3.2.1.67), que catalisa a hidrólise de ligações α -(1,4) entre resíduos de ácido galacturônico, liberando seus monômeros como produto;
- exo-poligalacturonosidase (E.C. 3.2.1.82), que catalisa a hidrólise de extremidades não-redutoras da pectina, liberando digalacturonato;
- ramnogalacturonase (E.C. 3.2.1.-), que age em ramnogalacturonanas, catalisando a hidrólise entre resíduos de ácido-D- galacturônico e L-ramnose.

Todos esses grupos enzimáticos agem de maneira coordenada, tendo em vista que a parede celular possui estrutura complexa e recalcitrante ao ataque

enzimático. Uma visão geral da ação dos principais grupos enzimáticos está esquematizada na figura 6:

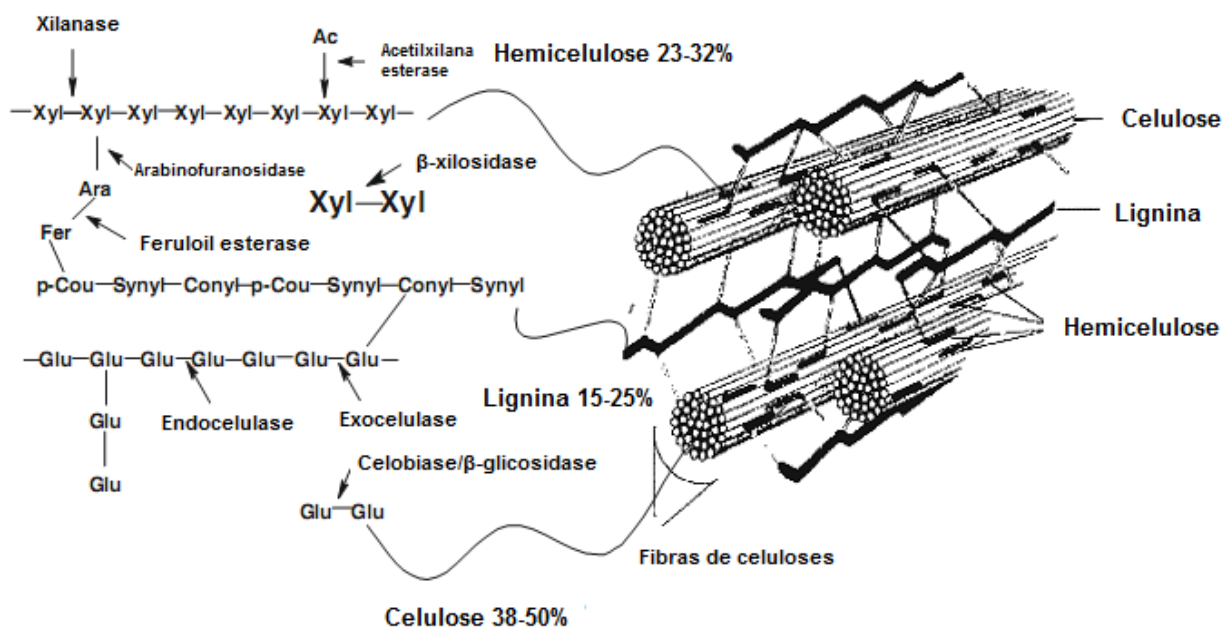


Figura 6. Esquema global de degradação da parede celular vegetal por celulasas e hemicelulasas. Adaptado de Khandeparker e Numan, 2008.

1.3 Fermentação em Estado Sólido (SSF)

O processo de fermentação em estado sólido é comumente encontrado sob os mais diversos contextos, desde o mofo encontrado em frutas apodrecendo ou até em vestimentas deixadas em locais úmidos. Embora as situações descritas acima sejam indesejadas, o processo no qual elas estão envolvidas pode ser de grande utilidade para a indústria, se as etapas do processo forem controladas.

O processo de fermentação em estado sólido é delimitado como uma cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, onde o conteúdo de substrato ou meio umidificante seja tal que permita o crescimento e metabolismo das células, mas não permita o trânsito de metabólitos por esse meio líquido; esses

substratos podem também servir como fonte de carbono. (Del Bianchi *et al*, 2000; Hölker *et al*, 2003).

A grande maioria dos microrganismos isolados da natureza foi encontrada crescendo em substratos sólidos. Grande parte dos ascomicetos e basidiomicetos, por exemplo, foi isolada de ambientes terrestres, com apenas algumas poucas espécies encontradas em ambientes aquáticos (Hölker *et al*, 2003).

A cultura em estado sólido possui vantagens em relação à cultura submersa: manipulação barata, pouca necessidade de água, e a aproximação com as condições naturais em que o microrganismo está adaptado, principalmente. A fermentação em estado sólido permite também que resíduos agroindustriais, substratos abundantes e baratos, sejam utilizados como fonte de carbono para o crescimento de microrganismos. Muitos destes substratos não são aplicáveis para o crescimento em cultura submersa (Hölker *et al*, 2003).

Há, entretanto, certas características como a dificuldade de controlar as condições do cultivo (temperatura e pH, por exemplo), a pouca produção de enzimas e metabólitos, além da necessidade de pré-tratamento do substrato para o ataque microbiano fazem com que a utilização da cultura submersa ainda seja a melhor opção para a utilização de microrganismos em processos industriais (Hölker *et al*, 2003, Ferreira *et al*, 1999).

A produção e secreção de proteínas em diferentes formas de cultivo, mesmo que a natureza do substrato seja a mesma, pode resultar em perfis proteicos bem distintos, quantitativa e qualitativamente. Alguns trabalhos na literatura relatam essas particularidades, como o de Oda e colaboradores (2006), que compararam a quantidade de proteínas secretadas nas duas formas de cultivo, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono; o estudo relata que o crescimento em estado sólido resultou em uma quantidade de quatro a seis vezes mais proteínas secretadas do que o cultivo em cultura submersa, resultando num perfil proteico mais complexo. Outros trabalhos relatam a preferência de certos grupos enzimáticos pelo cultivo em estado sólido: Ishida (2000) destacou que o gene que codifica a enzima glicoamilase B em *Aspergillus oryzae*, *glaB*, é marcadamente expresso em culturas de estado

sólido, e tem baixa expressão em culturas submersas. Outras enzimas são marcadores do modo de cultivo, sendo unicamente expressas no cultivo em estado sólido. É o caso, por exemplo, da protease ácida de *A. oryzae*, *pepA*, exclusivamente expressa em culturas de estado sólido (Kitano *et al.*, 2002);

O processo de fermentação em estado sólido é comumente empregado nos países do Oriente para a obtenção de alimentos. A fermentação em estado sólido é considerada um dos processos biotecnológicos mais antigos do mundo, e os primeiros relatos desse processo datam de 3000-2000 anos atrás, na China. Os exemplos mais conhecidos são os provenientes da culinária japonesa, como o *sake* e o *miso*, todos provenientes da modificação enzimática do meio utilizando o chamado *koji*, uma massa úmida de um cereal cozido (normalmente o arroz) onde há crescimento do fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*. Outras descrições estão relacionadas à produção de queijo (*Penicillium roquefortii*), produção de pães e produção de bebidas alcoólicas a partir da fermentação do farelo de trigo.

1.4 *Aspergillus oryzae*

O filo Ascomycota compreende a maioria dos fungos descritos na literatura, com espécies relacionadas às indústrias alimentícias e farmacêuticas, e ainda organismos patogênicos, e é neste filo que se encontra o ascomiceto *Aspergillus oryzae*. Esta espécie é utilizada há um milênio na produção das tradicionais comidas fermentadas da culinária japonesa (Machida *et al.*, 2005) e é descrita na literatura como sendo capaz de produzir e secretar uma grande variedade de enzimas em diferentes formas de cultivo (Iwashita, 2002; Kitano *et al.*, 2002).

O fungo foi isolado pela primeira vez por H. Ahlburg em 1876, a partir do *koji*. Porém, a sua utilização na culinária oriental vem de muito tempo antes, confundindo-se em registros históricos diversos (Machida *et al.*, 2008). Interessantemente, o microrganismo, apesar de possuir genes relacionados à síntese de aflatoxina, substância carcinogênica produzida pelo gênero *Aspergillus* (em especial pela espécie *Aspergillus flavus*), não foi detectada a expressão destes no microrganismo

(Machida *et al.*, 2005). A seleção de linhagens não-tóxicas para a utilização do microrganismo na culinária oriental pode ser uma das justificativas para tal.

O genoma de *A. oryzae* foi completamente seqüenciado por Machida e colaboradores em 2005. Quando comparado com o genoma de duas outras espécies do gênero *Aspergillus*, *A. nidulans* e *A. fumigatus*, foi constatado que o genoma de *A. oryzae* é de 25 a 30% maior do que das outras duas espécies citadas. Este aumento é notado principalmente em COGs (*cluster of orthologous group*) relacionados ao metabolismo, em especial ao metabolismo secundário.

Aspergillus oryzae é notadamente conhecido na literatura por se desenvolver em culturas em estado sólido, em especial relacionadas à culinária japonesa. Além disso, a espécie é descrita como sendo capaz de produzir e secretar grande número de proteínas, em especial enzimas, fato também apontado pela análise do genoma do microrganismo. Ademais, é descrito que *A. oryzae* secreta um número maior de proteínas quando crescido em estado sólido quando comparado ao crescimento em estado líquido (Machida *et al.*, 2008; Oda *et al.*, 2006).

1.5 Secretoma de fungos filamentosos

A literatura descreve e caracteriza em nível molecular inúmeras enzimas relacionadas com a degradação de matéria orgânica por fungos. No entanto, o não-entendimento do contexto no qual dada enzima está inserida dentro de diversas redes metabólicas impede que o processo de desconstrução da biomassa lignocelulósica chegue a sua eficiência máxima em condições experimentais ou industriais (Bowns *et al.*, 2008).

O melhoramento de técnicas de análise de separação e caracterização de proteínas, tanto individualmente quanto em diversos contextos, tem permitido o estudo quantitativo e qualitativo das proteínas secretadas por fungos para a degradação de biomassa, o chamado estudo de secretoma. O termo foi utilizado pela primeira vez por Tjalsma e colaboradores (2000), e representa a totalidade de

proteínas secretadas por um organismo, e é dividido entre proteínas secretadas no ambiente e proteínas associadas com a parede celular externa, compreendendo também o maquinário celular envolvido no processo de secreção.

Com o melhoramento das metodologias de análise de proteínas, como eletroforese, cromatografia e espectrometria de massas, muitos foram os trabalhos que começaram a surgir descrevendo secretomas de asco- e basidiomicetos, filamentosos conhecidos por sua eficiência em produção e secreção de enzimas que catalisam a hidrólise de biomassa lignocelulósica.

Muitos são os trabalhos que relacionam a fonte de carbono na qual o fungo foi cultivado e o perfil de proteínas secretadas. Em *A. oryzae*, o trabalho de Oda e colaboradores (2006) demonstrou que a forma como a fonte de carbono é apresentada ao microrganismo influencia no perfil do secretoma deste; outro trabalho onde o ascomiceto *A. flavus* foi cultivado em cultura contendo rutina (um flavonóide) demonstrou que a quantidade de proteínas produzidas e secretadas na presença desta fonte de carbono é muito maior do que quando o microrganismo é cultivado em fontes de carbono menos complexas, como o meio BDA (Medina *et al*, 2004).

2 JUSTIFICATIVAS

A sustentabilidade global é o grande objetivo dos principais governos do planeta neste século, e as estratégias para atingir este objetivo com excelência serão discutidos na Conferência das Nações Unidas sobre Desenvolvimento Sustentável, a Rio +20. Dentre os principais problemas a serem resolvidos, está a necessidade de uma nova abordagem para minimizar a utilização de químicos nas indústrias, poluentes de difícil assimilação pelos ecossistemas. Nesse aspecto a substituição destes poluentes por enzimas, não-poluentes, mostra-se uma estratégia promissora.

O fungo filamentoso *A. oryzae* é utilizado há milhares de anos na culinária japonesa, e, apesar de possuir o gene para a produção de aflatoxina, não há relatos de quaisquer problemas com intoxicação envolvendo a espécie. É relatada a capacidade de *A. oryzae* de produzir e secretar proteínas, especialmente enzimas, durante seu processo de desenvolvimento em diferentes formas de cultivo, sendo esse fato corroborado pela análise de genoma do microrganismo. É relatado também que este fungo produz e secreta uma maior quantidade de proteínas quando submetido a culturas em estado sólido, em comparação à cultura submersa. Torna-se interessante, então, a investigação do perfil de proteínas secretadas por *A. oryzae* em culturas sólidas em diferentes fontes de carbono, estabelecendo padrões e particularidades.

Conforme já descrito, o bagaço de cana de açúcar é um resíduo agroindustrial que é produzido em escala crescente no Brasil. A procura por estratégias de utilização deste resíduo de forma a aproveitar seu potencial e diminuir os danos causados por seu acúmulo vem como consequência da necessidade do desenvolvimento sustentável exigido dos países que estão em amplo processo de expansão econômica, caso do Brasil. Nesse contexto, a utilização do bagaço em estado sólido como indutor da produção e secreção de proteínas pode ser uma estratégia interessante tanto para a produção em larga escala de enzimas de interesse industrial, quanto para o aproveitamento do potencial do bagaço de cana para produzir etanol de segunda geração.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

Investigar o potencial do bagaço de cana de açúcar como indutor de produção e secreção de proteínas, em especial enzimas, por *A. oryzae*, quando o microrganismo é submetido à cultura em estado sólido utilizando este resíduo como única fonte de carbono.

3.2 *Objetivos específicos*

- Caracterizar o perfil proteico produzido e secretado por *A. oryzae* quando crescido em estado sólido de bagaço de cana como fonte de carbono, destacando o perfil enzimático induzido por esta fonte de carbono;
- Estabelecer uma metodologia de extração de proteínas secretadas do meio de cultura sólido;
- Comparar os perfis proteicos de *A. oryzae* quando crescido em cultura submersa e cultura em estado sólido, ambos utilizando bagaço de cana como fonte de carbono, visando encontrar semelhanças e particularidades entre os dois tipos de cultivo.

4 HIPÓTESES

- A utilização do detergente não-iônico *Tween 80* (0,1%v/v) aumentaria a solubilidade de enzimas que estivessem em contato direto com o bagaço de cana; outro aspecto seria facilitar a dissociação entre enzimas e o domínio de ligação ao carboidrato (CBD), aumentando a quantidade de enzimas solubilizadas no extrato bruto final.
- A complexidade do bagaço de cana em estado sólido induziria um secretoma mais diverso de *A. oryzae* quando comparado ao secretoma deste crescido em cultura submersa de bagaço de cana.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 *Microrganismo e condições de cultivo*

Foi utilizado para essa dissertação o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*, linhagem Blu34. Este fungo foi isolado da compostagem natural de resíduos de indústria de re-beneficiamento de algodão em Gaspar-SC. O microrganismo foi cultivado em meio BDA (10% batata, 1% dextrose e 2% ágar) e mantido a 28°C até sua esporulação. As placas esporuladas também foram processadas para estocagem, retirando-se pequenos pedaços de meio contendo micélio e esporos, mantendo-os em solução (50% glicerol, 0,9% NaCl, 0,2% *Tween 80*) e estocados a -80°C.

5.2 *Processamento do bagaço de cana*

O bagaço de cana utilizado foi da espécie *Saccharum officinarum* Linnaeus, variedade JAVA, obtida na Fazenda Brejo em Formosa – GO em junho de 2007. O material foi lavado em água abundante por 12h, autoclavado e novamente lavado. Posteriormente, o bagaço foi levado à estufa e mantido a 60°C por dois dias e em seguida moído para padronização da granulometria.

5.3 *Produção de proteínas extracelulares*

5.3.1 *Crescimento em meio sólido*

Os esporos de *Aspergillus oryzae* foram recolhidos utilizando-se solução de NaCl 0,9% até obter uma suspensão conidial de aproximadamente 10^8 esporos por mL de solução. Foi inoculado uma alíquota de 1 mL dessa solução em placa contendo meio BDA. As placas foram incubadas a 28°C durante sete dias. Para iniciar o cultivo em estado sólido, foi acrescentada uma mistura contendo 2g de

bagaço de cana processado e umedecido com 10 mL de meio líquido para cultivo (pH 7,0: 7,0 g de KH_2PO_4 ; 2,0 g de K_2HPO_4 ; 0,5 g de $\text{Mg}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,6 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$); proporções para 1 litro); sendo essa mistura previamente autoclavada antes do procedimento. As culturas foram incubadas a 28°C durante sete dias. Este procedimento visou à transferência do micélio da placa para o bagaço de cana gradativamente, permitindo a adaptação do fungo à mudança de substrato.

Para a expansão do crescimento, o conteúdo da placa, exceto o ágar, foi transferido para um frasco do tipo erlemeyer (250 mL) contendo 8g de bagaço de cana umedecido com 32 mL de meio líquido de cultivo (previamente descrito). Os frascos foram incubados a 28°C por sete dias.

A metodologia de cultivo está simplificada na figura 7:

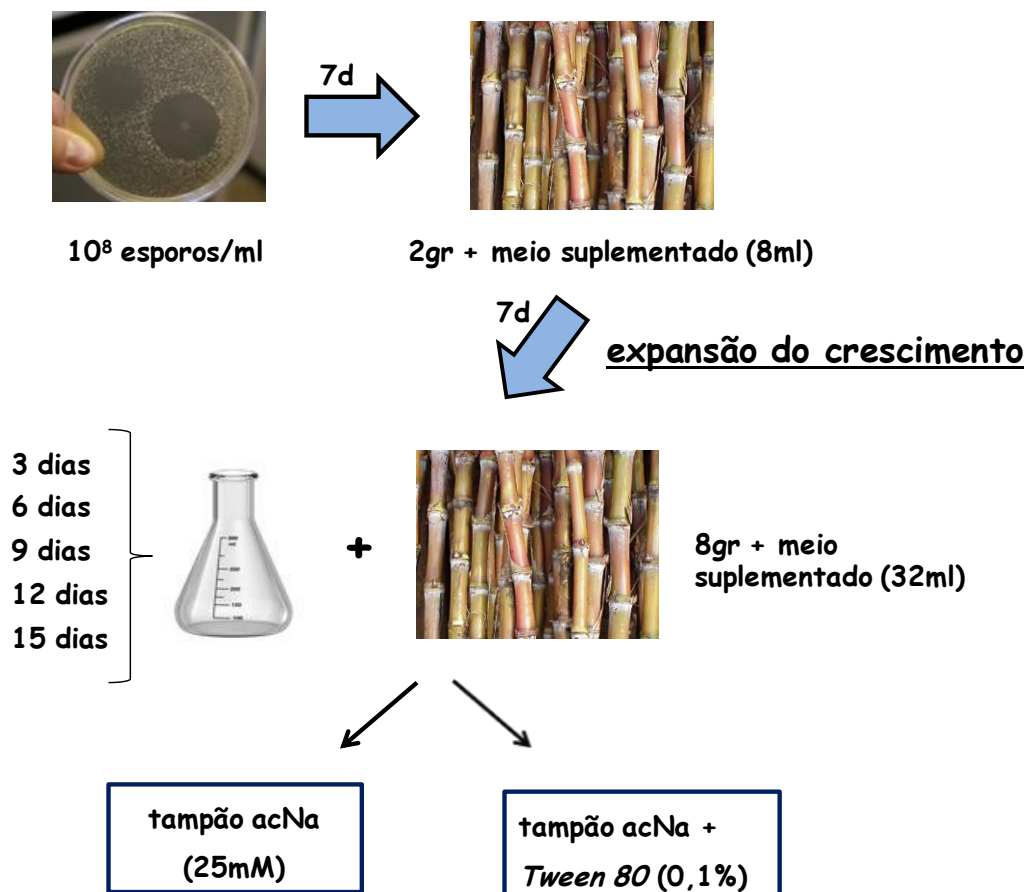


Figura 7. Metodologia de cultivo utilizada, destacando o processo de expansão do crescimento de *A. oryzae* em estado sólido de bagaço de cana.

5.3.1.1 Escolha do método de extração

Após o período de crescimento, a extração das proteínas secretadas pelo fungo no bagaço de cana foi feita testando-se duas soluções, como segue abaixo:

- Tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,0 (volume final: 100 ml)
- Tampão acetato de sódio 25 mM + *Tween 80* (0,1%), pH 5,0 (volume final: 100 ml).

Em todas as extrações, os frascos foram mantidos à 28°C por quatro horas, em agitação constante de 130 rpm, com acréscimo de 1 mM de PMSF, e dois tabletes de coquetel inibidor de protease (Complete Mini™; Roche). Posteriormente, a mistura foi filtrada a vácuo utilizando Whatman® N°1 e centrifugada para a retirada de esporos remanescentes (12000 rpm, 10 minutos) por duas vezes e armazenado com acréscimo de azida sódica 0,02%. O extrato bruto resultante foi analisado quanto à atividade enzimática e perfil protéico.

Para a análise do perfil protéico do bagaço de cana, a extração foi feita conforme descrito acima, somente com o bagaço de cana pré-tratado.

5.3.2 Crescimento em meio líquido

O crescimento em placa de Petri e a retirada da solução de esporos de *A. oryzae* para crescimento em meio líquido foram realizadas conforme descrito no subitem 5.2.1. A solução de esporos (10^8 esporos/ml) foi inoculada em meio suplementado com sais (descrito no item 2.3.1) e mantido em agitação constante (180 rpm) durante 5 dias a 28°C. O extrato bruto resultante foi filtrado e centrifugado conforme descrito no subitem 5.3.1.1, e armazenados posteriormente com acréscimo de azida sódica 0,02%. O extrato bruto foi cedido pela aluna de doutorado Gláucia Emi Okida Midori, do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

5.4 Caracterizações enzimáticas

5.4.1 Quantificação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais contidas no extrato bruto foi determinada utilizando-se o *kit* Micro BCA™ Protein Assay Kit, da Thermo Scientific. Foi utilizada a albumina bovina sérica como padrão e os procedimentos de dosagem foram feitos de acordo com instruções do fabricante. As dosagens foram feitas em triplicata.

5.4.2 Determinação de enzimas extracelulares

As diferentes atividades enzimáticas do extrato bruto foram quantificadas utilizando-se o método descrito por Miller (1959). Nele, o açúcar redutor gerado pela catálise enzimática associa-se ao ácido dinitrosalicílico (DNS) e essa reação gera uma mudança de coloração que é detectável pelo espectrofotômetro, permitindo a quantificação de açúcar liberado durante o ensaio.

Em cada ensaio foram utilizados 10µL de substrato a ser analisado (xilana 1%, CMC1%, pectina 1%) e 5µL de solução enzimática. Os ensaios foram incubados a 50 °C por 30 minutos. A seguir, os ensaios foram incubados com 30µl de DNS a 97°C por 10 minutos. Ao final, 150µL de água destilada foram acrescentados ao ensaio para parar a reação entre os açúcares redutores e o DNS. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540nm. As atividades foram expressas como 1µmol de açúcar redutor formado por minuto (Unidade Internacional - UI) por 1 mL de enzima (UI.mL⁻¹). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Para a análise de celulases totais foi utilizado o papel de filtro Whatman® nº1 (tiras de 6 cm de comprimento x 1 cm de largura) incubado diretamente com 150 µL de enzima. O período de incubação foi de uma hora e a reação com DNS foi feita conforme descrito anteriormente, alterando as proporções para 300µL de DNS e 1500µL de água destilada.

Para a análise de celobiohidrolases foram utilizados 100µL do reagente Avicel® (Sigma – Aldrich) e 100µL do extrato bruto. O ensaio foi incubado durante duas horas a 50°C e sob agitação constante de 60rpm. A reação com DNS foi procedida conforme descrito anteriormente, utilizando 300µL de DNS e 1500 µL de água destilada.

5.4.3 Curva de indução enzimática

A curva de indução enzimática foi determinada por meio da análise do extrato bruto de cultivos em dias específicos. Os procedimentos para crescimento foram feitos conforme descrito no item 5.4.1 e a curva foi feita para ambas as extrações. Foram realizados crescimentos independentes em 3, 6, 9, 12 e 15 dias. Os experimentos foram feitos em triplicata.

5.5 Separações eletroforéticas

5.5.1 Precipitação de proteínas

O volume de 1mL de amostra foi precipitado utilizando primeiramente 8µL de desoxicolato de sódio 2% (w/v), que foram misturados à amostra e a mistura incubada em gelo por 15 minutos. Em seguida, foram acrescentados 60µL de TCA 100%, também misturados à amostra e incubados no gelo por 10 minutos. Após esse procedimento, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000g. O sobrenadante foi, então, retirado e foram acrescentados 90µL de acetona (estocada a -20°C). A amostra foi novamente submetida à centrifugação nas condições descritas acima, e novamente o sobrenadante foi retirado e a acetona acrescentada. Esse procedimento foi repetido três vezes, visando à retirada do excesso de TCA da amostra. Enfim, o sobrenadante foi retirado pela última vez e a amostra foi ressuspensa no tampão de amostra correspondente ao procedimento.

As amostras submetidas à eletroforese bidimensional foram precipitadas utilizando o *kit* SDS-PAGE Clean-Up, da GE Healthcare. O procedimento de precipitação foi feito de acordo com instruções dadas pelo fabricante.

5.5.2 SDS-PAGE

Os extratos brutos dos cultivos referentes à curva de indução foram submetidos à análise por SDS-PAGE para observar a reprodutibilidade das triplicatas e o perfil protéico de secreção nos diferentes dias e condições de crescimento.

As amostras foram liofilizadas em diferentes volumes e, posteriormente, o extrato liofilizado foi submetido à precipitação de proteínas (item 2.5.1), visando à retirada de compostos que pudessem interferir no processo de eletroforese. O produto final da precipitação foi ressuspenso em tampão de amostra (SDS 25% (p/v), glicerol 10% (v/v), EDTA 0,1 M, Tris HCl pH 6,8, 17,5% (m/v), azul de bromofenol) e fervido por cinco minutos. Todo o conteúdo foi aplicado nos poços. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida de 12% e 0,75mm de espessura à temperatura ambiente e voltagem constante de 25mA no sistema Hoefer[®]. Os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com protocolo estabelecido por Blum *et al.* (1987).

5.5.3 Eletroforese bidimensional

As amostras submetidas à eletroforese bidimensional foram primeiramente precipitadas para retirada de impurezas que pudessem interferir no processo de eletroforese, conforme descrito no subitem 5.5.1. Em seguida, a amostra precipitada foi solubilizada em tampão de amostra 2-DE (Uréia 7mol/L; Tiouréia 2mol/L; DTT 85mmol/L; Triton X-100 2,5% (v/v); Pharmalyte™ 0,5% (v/v); Isopropanol 10% (v/v)). A solução resultante foi utilizada para reidratar *strips* de 18 cm com gradiente imobilizado (IPG) de pH 3-10/ pH 4-7 lineares (ReadyStrip IPG strips, Bio-Rad) por

17 horas. Os *strips* reidratados foram submetidos à focalização isoeétrica (IEF) em aparelho IPGPhor (GE Healthcare) em sistema *manifold*. A focalização foi feita em quatro passos sucessivos, dependendo da faixa de pH que a focalização foi realizada:

- pH 3-10: *step-and-hold* de 500V/1h; gradiente de 500V-1000V/1h; gradiente de 1000V-8000V/3h45; *step-and-hold* de 8000V/ 45min.
- pH 4-10: *step-and-hold* de 500V/1h; gradiente de 500V-1000V/1h; gradiente de 1000V-10000V/3h; *step-and-hold* de 10000/1h45min.

Finalizada a IEF, os *strips* foram submetidos à redução das pontes dissulfeto por incubação em 3mL de DTT 125mmol/L solubilizado em tampão de equilíbrio (Tris 1mol/L pH 8,0, uréia 6mol/L, glicerol 30% v/v e SDS 1% w/v) durante 30 min. Depois de reduzidas, os *strips* foram submetidos à alquilação, evitando a reformulação das pontes dissulfeto já desfeitas, linearizando as proteínas focalizadas (Mineki *et al.*, 2002). A alquilação foi feita em 3ml de acrilamida 300mmol/mL solubilizada em tampão de equilíbrio, já descrito acima, por 30 minutos. Findado o processo de alquilação, os *strips* foram acoplados a um sistema de eletroforese desnaturante do tipo SDS-PAGE para a separação de proteínas por massa molecular. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida de 12% e 0,75mm de espessura à temperatura ambiente e voltagem constante de 25mA em aparelho Bio Rad PROTEAN II xi Cell. Os géis resultantes foram corados com nitrato de prata, conforme protocolo estabelecido por Blum *et al.* (1987).

5.6 Análise das proteínas por Espectrometria de Massas (LC-MS/MS)

As amostras para análise foram previamente submetidas à eletroforese do tipo SDS-PAGE conforme descrito no subitem 5.5.2, e o gel resultante foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-50 coloidal conforme protocolo modificado de Candiano e colaboradores (2004). Posteriormente, o gel foi cortado em seis pedaços, e as proteínas contidas em cada pedaço foram submetidas à redução das pontes dissulfeto em solução tampão (NH_4CO_3 10mM) contendo 10mM de DTT por 1h a

56°C. O procedimento seguiu com lavagem das amostras utilizando o tampão descrito acima. Estas, posteriormente, foram submetidas à alquilação das cisteínas em tampão (NH_4CO_3 10 mM) contendo 55mM de IAA por 1h em temperatura ambiente. O procedimento seguiu com a lavagem utilizando o tampão acima por sete minutos, seguida por lavagem com ACN 100% por sete minutos, sendo esses dois procedimentos repetidos três vezes. Posteriormente, foi acrescentado à amostra o tampão de digestão, que contém 10 mM de NH_4CO_3 , 5mM de CaCl_2 , 10% de ACN e a enzima tripsina (proporção de 1,25 μg por 100 μL de solução). Esse sistema foi mantido em gelo por 45 minutos, para que a solução fosse absorvida pelo gel, porém sem o início da reação de digestão triptica. Após o período estipulado, foi acrescentado tampão de digestão sem a tripsina, de modo que as amostras estivessem submersas nessa solução. A reação de digestão foi realizada posteriormente a 40°C *overnight*. Em seguida, foi acrescentada uma solução contendo TFA 1% para interromper a reação de digestão pela tripsina. As amostras foram agitadas vigorosamente para que os peptídeos fossem retirados do gel e entrassem em solução. Por fim, as amostras foram centrifugadas por alguns segundos para baixar os componentes do gel e separá-los da solução de peptídeos resultantes da digestão triptica.

Os peptídeos que resultaram da digestão triptica foram concentrados e dessalinizados *off-line* em microcoluna Ultra-Micro Spincolumn™ (Harvard Apparatus) e eluídos utilizando ACN 80% e TFA 0,1%. As amostras foram liofilizadas e posteriormente os peptídeos foram re-dissolvidos em 10 μL de TFA 0,1%. Desse volume, 4 μL foram aplicados no sistema nano LC-Ultra system (Eksigent), equipado com uma coluna do tipo *trap* (150 μm x 200mm, partículas C18 Reprosil de 3 μm – Dr. Maich, empacotada no laboratório), trabalhando a um fluxo de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$. Em seguida, os peptídeos foram eluídos em uma nano-coluna (15cm x 50 μm , partículas C18 Reprosil de 3 μm – Dr. Maich, empacotada no laboratório) no seguinte gradiente:

- 5-20% de solvente B – 20 min;
- 20-50% de solvente B – 16 min;
- 50-100% de solvente B – 5 min;
- 100% de solvente B – 10 min;

- 5% de solvente B – 10 min.

*solvente B: ACN 80%, ácido fórmico 0,1%.

O sistema nanoLC foi associado *online* a um espectrômetro de massa híbrido LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). Os espectros de MS/MS foram obtidos em modo DDA (Data Dependent Acquisition), sob o controle do software Xcalibur 2.0 (Thermo Fisher Scientific). O modo DDA consistiu em um *survey scan* entre as faixas de 300-16000 m/z, sob resolução de 60000 FWHM (Full Width at Half-Maximum) e com valor alvo de 1E06 íons. Este processo foi seguido por fragmentação MS/MS dos dez íons precursores com cargas múltiplas mais abundantes no tempo analisado. Estes espectros foram adquiridos em *µscan* sob energia de colisão de 35% e valor alvo de íons igual a 1E04 no *ion trap* linear (limiar de seleção de íons: 400 contagens). O parâmetro de ativação foi $q=0,25$ e o tempo de ativação foi de 30ms. Os íons precursores já fragmentados foram excluídos de forma dinâmica por 90s.

Análise dos dados: os arquivos .raw gerados foram convertidos em formato .mgf (formato genérico do MASCOT) e foram submetidos a busca contra o banco de dados Ascomycota (174346 sequências, NCBI) e contra um banco de dados *Decoy*, que consiste em um banco de dados de peptídeos fictício, mas com propriedades semelhantes às sequências de peptídeos geradas por MS/MS (Elias & Gygi, 2010); esse procedimento visa à diminuição de identificações falso-positivas, artefato da técnica de LC-MS/MS. Como parâmetros de busca foram usados carbamidometilação da cisteína (alquilação com iodoacetamida) como modificação fixa; oxidação da metionina, acetilação da porção N-terminal do peptídeo e fosforilação da serina e tronina como modificações variáveis; máximo de um sítio de clivagem perdido pela tripsina; equipamento do tipo ESI-TRAP; tolerância de erro de massa dos íons precursores e dos fragmentos de 10ppm e 0,6 Da, respectivamente. As identificações foram consideradas positivas se o *score* total for acima de 60, considerando peptídeos com *score* individual acima de 20.

As identificações que resultaram em produtos proteicos desconhecidos (*unnamed protein product*) foram submetidas ao alinhamento de sequências utilizando o programa BLAST. O banco de dados utilizado foi o NR (*non-redundant*

protein sequences), e o algoritmo de alinhamento foi o blastp (*protein-protein* BLAST) com os parâmetros padrão: tamanho da semente entre três e dez resíduos, score mínimo de 10, matriz de distância BLOSUM62, valores para existência de *gap* na sequência igual a -11 e para a extensão igual -1.

5.7 Análise estatística

A quantificação das diferenças entre os dois tipos de cultivo foi testada estatisticamente utilizando o programa PAST (Paleontological Statistics), disponível em <http://folk.uio.no/ohammer/past/>. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, posteriormente à análise de variância (ANOVA) e por fim foram submetidos à comparação de Tuckey's Pairwise, com significância $P < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 *Análise da atividade enzimática do secretoma de *Aspergillus oryzae* crescido em estado sólido de bagaço de cana*

O fungo filamentoso *A. oryzae* foi cultivado em bagaço de cana em estado sólido, e esta foi sua única fonte de carbono. Foi analisado um período de 15 dias de cultivo, e foram testadas duas estratégias de extração das proteínas secretadas pelo microrganismo: extração com tampão acetato de sódio 25mM e extração com o mesmo tampão acrescido do detergente não-iônico *Tween 80* em concentração 0,1% (v/v). A hipótese levantada foi que o acréscimo do detergente poderia facilitar a solubilização de enzimas que estivessem em contato direto com o bagaço de cana. Além disso, o detergente poderia facilitar a dissociação entre enzimas e o domínio de ligação ao carboidrato (CBD), aumentando a quantidade de enzimas solubilizadas no extrato bruto. Algumas análises foram feitas a partir do extrato bruto obtido. A caracterização de alguns dos principais grupos enzimáticos segue nos gráficos a seguir (fig. 7 à fig. 9):

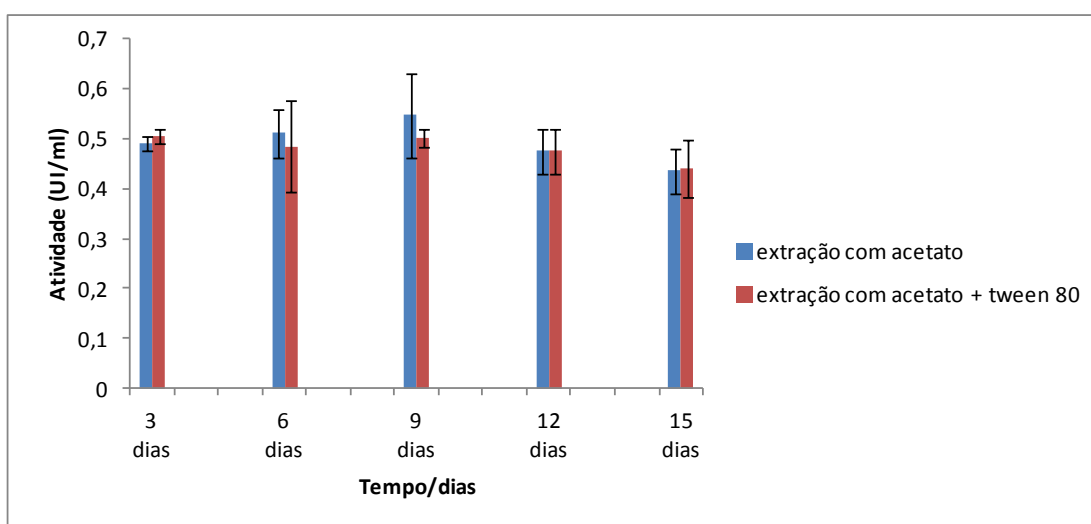


Figura 8. Atividade de xilanases nas duas estratégias de extração do secretoma de *A. oryzae*: tampão acNa (azul), tampão acNa + *Tween 80* (vermelho). A unidade internacional (UI) foi definida como 1 μ mol de açúcar redutor liberado no meio por minuto.

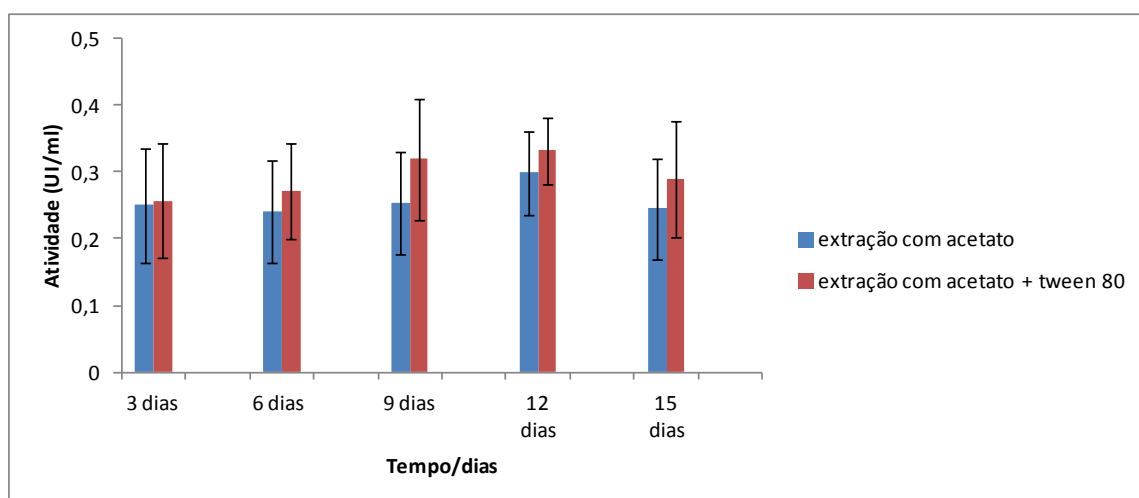


Figura 9. Atividade de celulases totais nas duas estratégias de extração do secretoma de *A. oryzae*: tampão acNa (azul), tampão acNa + *Tween* 80 (vermelho). A unidade internacional (UI) foi definida como 1 μ mol de açúcar redutor liberado no meio por minuto.

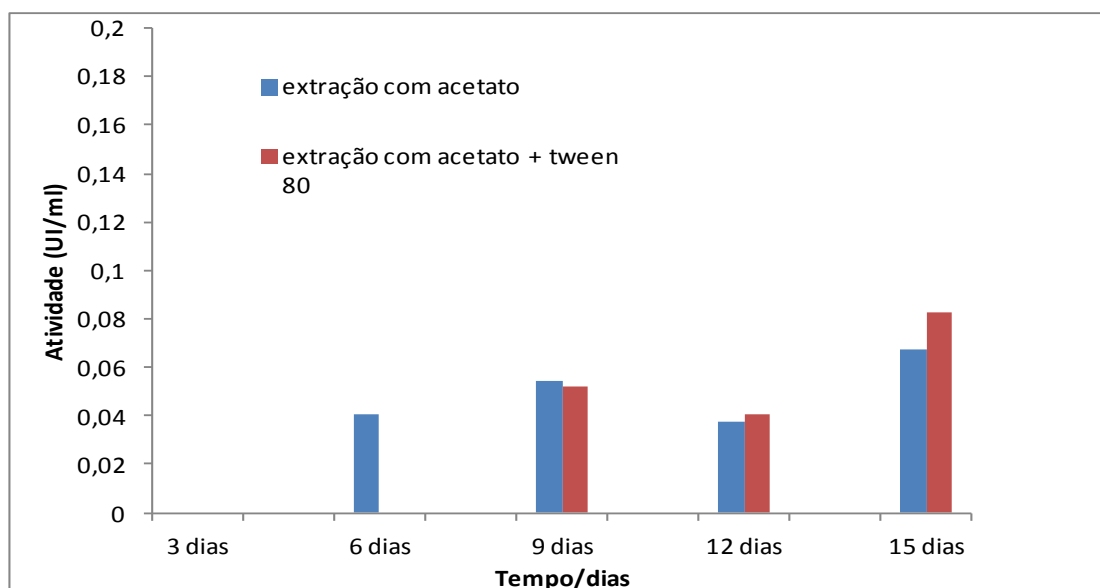


Figura 10. Atividade de celobiohidrolases nas duas estratégias de extração do secretoma de *A. oryzae*: tampão acNa (azul), tampão acNa + *Tween* 80 (vermelho). A unidade internacional (UI) foi definida como 1 μ mol de açúcar redutor liberado no meio por minuto. O desvio padrão foi desconsiderado por ter dado negativo.

Conforme demonstrado em gráfico, o extrato bruto obtido com o tampão acetato acrescido de *Tween* 80 (0,1%) não apresentou maior quantidade de enzimas solubilizadas quando comparado ao extrato bruto que foi obtido apenas com o tampão. Quando submetidas às análises estatísticas (Hammer *et al*, 2001), as

diferentes extrações não mostraram diferenças significativas. Estas diferenças entre valores de UI, por serem pequenas, podem ser atribuídas às particularidades de cultivo, da mesma forma em que acontece em triplicatas técnicas.

A justificativa para o acréscimo do detergente ao tampão de extração era de aumentar a quantidade de enzimas no extrato bruto que antes estavam associadas ao substrato pelo CBM, tendo em vista que a interação entre CBM e substrato é extremamente estável. No entanto, a análise do genoma de *A. oryzae* por Mashida e colaboradores (2005) demonstrou que o microrganismo possui apenas cinco genes de glicosil-hidrolases com domínio de ligação à celulose ou domínio de ligação ao amido. Esse fato pode ser uma justificativa para o método de extração de proteínas secretadas contendo *Tween 80* (0,1%) não ter mostrado um aumento na concentração de enzimas relacionadas à degradação do bagaço de cana, fato demonstrado pela semelhança nos perfis de atividade enzimática.

Outros grupos enzimáticos também foram testados, como endoglicanases e pectinases. No entanto, por estarem presentes em concentrações baixas em ambos os cultivos, seus valores brutos não são numericamente relevantes (dados não mostrados). De fato, uma das limitações do cultivo em estado sólido é a secreção de enzimas em baixas concentrações (Ferreira *et al.* 1999). A presença desses grupos enzimáticos foi detectada por identificação de proteínas por espectrometria de massas, tópico 5.4 dessa dissertação.

6.2 Análise do secretoma de *Aspergillus oryzae* quando crescido em estado sólido de bagaço de cana.

A análise dos principais grupos enzimáticos potencialmente secretados por *A. oryzae* mostrou que, embora tenham sido usadas duas estratégias de obtenção de proteínas, não houve extração diferenciada de enzimas quando foi acrescentado o detergente *Tween 80* ao tampão de extração. No entanto, faz-se necessário verificar se houve extração diferencial de outros grupos de proteína utilizando esse método.

Para tal, o perfil proteico de ambas as extrações foi comparado em gel de poliacrilamida do tipo SDS-PAGE. O bagaço de cana utilizado como fonte de carbono, sem o microrganismo, foi submetido ao mesmo procedimento realizado para extração de proteínas secretadas por *A. oryzae*, visando verificar se algum dos métodos favorecia a solubilização de proteínas do bagaço de cana. A comparação dessas amostras está demonstrada na figura abaixo:

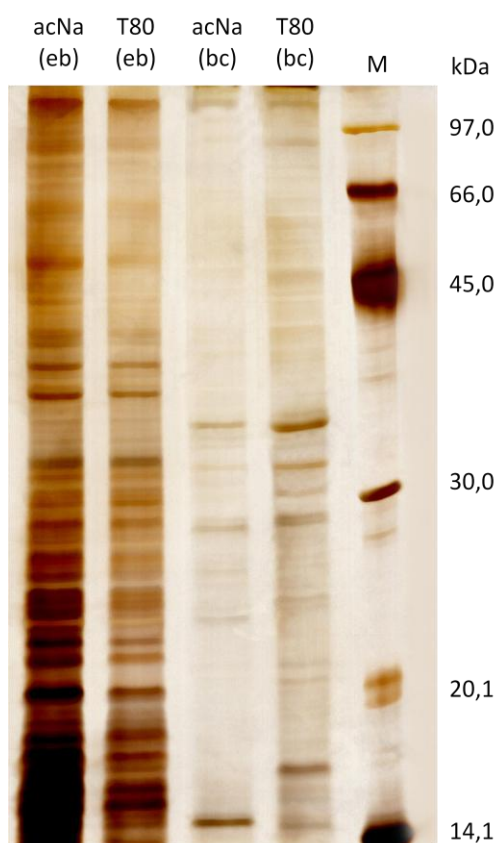


Figura 11. SDS-PAGE comparando o secretoma de *A. oryzae* crescido em estado sólido de bagaço de cana utilizando duas estratégias de extração: tampão acNa 25mM [acNa (eb)] e tampão acNa 25mM acrescido de *Tween* 80 0,1% [T80 (eb)]. O bagaço de cana também foi submetido sozinho ao processo de extração sem o microrganismo: extração com tampão acNa 25mM [acNa (bc)], extração com tampão acNa 25 mM com *Tween* 80 0,1% [T80 (bc)]; (M) marcador de massa molecular. As amostras de secretoma correspondem ao 15º dia de crescimento; todas as amostras foram obtidas por precipitação de 2mL de extrato com TCA, desoxicolato de sódio e acetona, dos quais foram aplicados 50µL.

Conforme observado na figura 10, não houve aumento ou extração diferencial das proteínas secretadas por *A. oryzae* com o acréscimo de *Tween* 80 no tampão de

extração. Entretanto, conforme observado nas amostras de bagaço, o acréscimo do detergente ao tampão aumentou a solubilidade de proteínas advindas do bagaço. Este fato é extremamente desvantajoso, tendo em vista que as proteínas de bagaço agiriam como contaminantes da amostra de extrato bruto quando este fosse submetido à análise por espectrometria de massas.

Tendo por base os dados descritos anteriormente, foram utilizadas para as análises seguintes as amostras de extrato bruto de *A. oryzae* que foram obtidas por meio da extração que continha somente o tampão acetato de sódio. Inicialmente, foi avaliado se havia diferenças no secretoma durante os diferentes dias de crescimento. A análise foi feita através de gel de poliacrilamida do tipo SDS-PAGE e o resultado encontra-se abaixo:

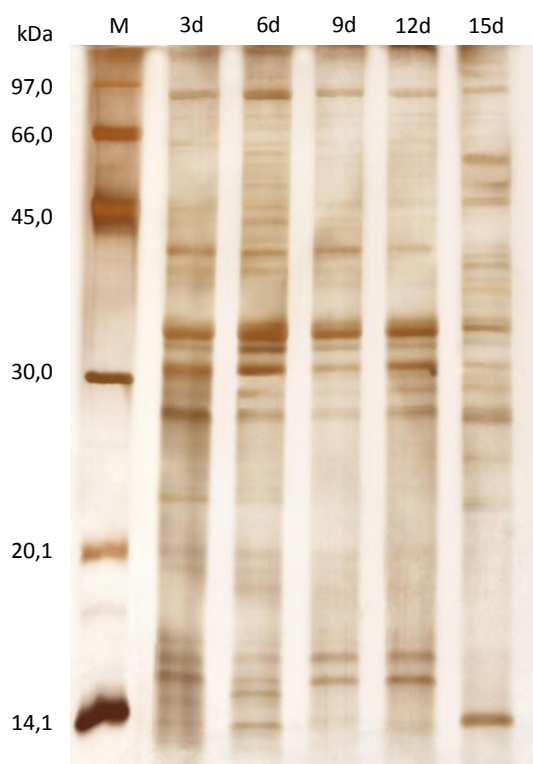


Figura 12. SDS-PAGE do secretoma de *A. oryzae* crescido em estado sólido de bagaço de cana em diferentes dias de crescimento: (M) marcador molecular, (3d) 3 dias, (6d) 6 dias, (9d) 9 dias, (12d) 12 dias, (15d) 15 dias. Extração feita com tampão acetato de sódio 25mM. As amostras foram obtidas por precipitação de 2mL de extrato com TCA, desoxicolato de sódio e acetona, dos quais foram aplicados 50 μ L.

O perfil de proteínas referente ao sexto dia de cultivo mostrou um perfil qualitativo discretamente mais rico. O perfil de proteínas secretadas pelo microrganismo não mostrou, entretanto, diferenças significativas entre os diferentes dias de cultivo, sendo as diferenças de abundância de determinadas bandas atribuídas à limitação da técnica de precipitação de proteínas com TCA, que é pouco reprodutível em baixas concentrações de proteína.

Com base nessas evidências, a amostra de seis dias foi escolhida para as análises de comparação entre o crescimento em cultura submersa e cultura em estado sólido.

6.3 Comparação entre os secretomas de *Aspergillus oryzae* quando crescidos em cultura submersa e cultura em estado sólido.

A produção e secreção de proteínas por fungos estão intimamente relacionadas à forma de cultivo no qual o microrganismo foi submetido. A fonte de carbono utilizada para a indução da expressão de proteínas, bem como a forma que essa fonte de carbono é apresentada para o microrganismo podem ter como consequência perfis proteicos bem distintos, tanto em relação à quantidade de determinadas proteínas secretadas quanto aos diferentes graus de diversidade do perfil proteico. Normalmente estes perfis estão diretamente relacionados à recalcitrância da fonte de carbono em que ele se desenvolveu.

Em *A. oryzae*, foram descritas diferenças de secreção de proteínas, em especial enzimas para a degradação da fonte de carbono, relacionadas ao tipo de cultura em que o microrganismo foi submetido (Hashimoto *et al.*, 1999; Maeda *et al.*, 2004; Oda *et al.*, 2006). Essas diferenças normalmente incluem: concentrações diferentes de proteínas secretadas dependendo do modo de cultivo, diferentes grupos de enzimas secretados dependendo da fonte de carbono e até isoformas da mesma enzima diferencialmente secretadas dependendo do modo de cultivo. Esses são indícios de que o ambiente no qual o fungo está se desenvolvendo tem grande influência nos tipos de proteínas que ele secreta no meio.

Com base no que é relatado na literatura, foram analisados os perfis proteicos de amostras do extrato bruto de *A. oryzae* crescido em cultura submersa contendo 1% de bagaço de cana como única fonte de carbono, e de extrato bruto de *A. oryzae* crescido em estado sólido de bagaço de cana. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 12.

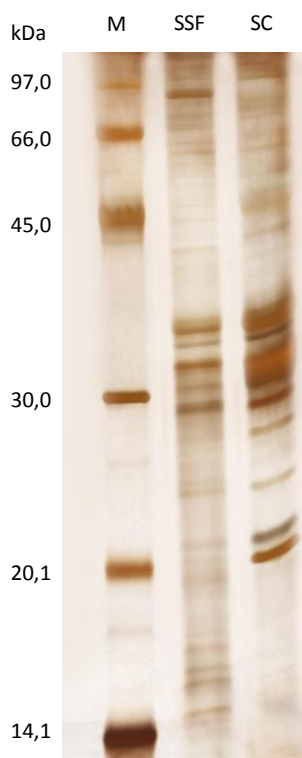


Figura 13. SDS-PAGE comparando o perfil de secretoma de *A. oryzae* quando crescido em estado sólido de bagaço de cana (SSF) e cultura submersa com 1% de bagaço de cana (SC); marcador de massa molecular (M). As amostras de secretoma correspondem ao 6º e 5º dias de crescimento, respectivamente, e foram obtidas por precipitação de 2mL de extrato com TCA, desoxicolato de sódio e acetona, dos quais foram aplicados 50µL

O perfil proteico unidimensional mostrou diferenças marcantes entre os dois secretomas. O perfil do secretoma de *A. oryzae* crescido em estado sólido apresenta maior quantidade de bandas distintas, enquanto o secretoma de *A. oryzae* crescido em cultura submersa apresenta abundância de determinadas bandas proteicas, embora aparente ser um secretoma menos complexo.

O substrato em estado sólido representa um desafio maior para o microrganismo em termos de degradação da fonte de carbono para sobrevivência, o

que pode justificar o arsenal mais complexo secretado, evidenciado em gel, em comparação ao crescimento em meio líquido. De fato, são vários os estudos que demonstram a maior concentração de proteínas secretadas no meio sólido em detrimento do meio líquido, revisados por Iwashita (2002).

Um fato interessante presentes em alguns estudos (Hashimoto *et al.*, 1999; Iwashita *et al.*, 1998; Oda *et al.*, 2006) é a localização das enzimas produzidas por fungos para a degradação de biomassa. Os estudos demonstraram que algumas destas enzimas estão localizadas associadas à parede celular dos fungos, e não são secretadas no ambiente; esse fato pode justificar a menor quantidade de proteínas distintas secretadas na cultura submersa. No estudo realizado por Oda (2006), é demonstrado que as enzimas que estão associadas à parede celular do fungo quando este cresce em cultura submersa foram encontradas no secretoma do microrganismo quando o fungo cresce em cultura de estado sólido, como algumas α -amilases e β -glicosidases. A hipótese levantada pelo estudo está na composição e importância da parede celular: em cultura submersa, a parede celular tem um papel importante contra a baixa pressão osmótica do meio, necessitando de uma estrutura mais estática que dificulta a secreção de proteínas. O crescimento em estado sólido, por sua vez, permite que o fungo tenha uma parede celular mais dinâmica, o que facilita a secreção de proteínas para o meio.

Outro aspecto relevante é o fato de que existem proteínas que são secretadas exclusivamente quando o fungo é crescido em estado sólido. Em *A. oryzae* a protease ácida codificada pelo gene *pepA* é encontrada exclusivamente quando o fungo é crescido em estado sólido, conforme demonstrado no estudo realizado por Kitano e colaboradores (2002).

Tendo como base os resultados preliminares apresentados anteriormente e o que foi discutido acima, as amostras foram submetidas à eletroforese bidimensional em faixas ampla (3-10) e ácida (4-7) de pH, para análise do perfil do secretoma, conforme demonstrado nas figuras 13 e 14:

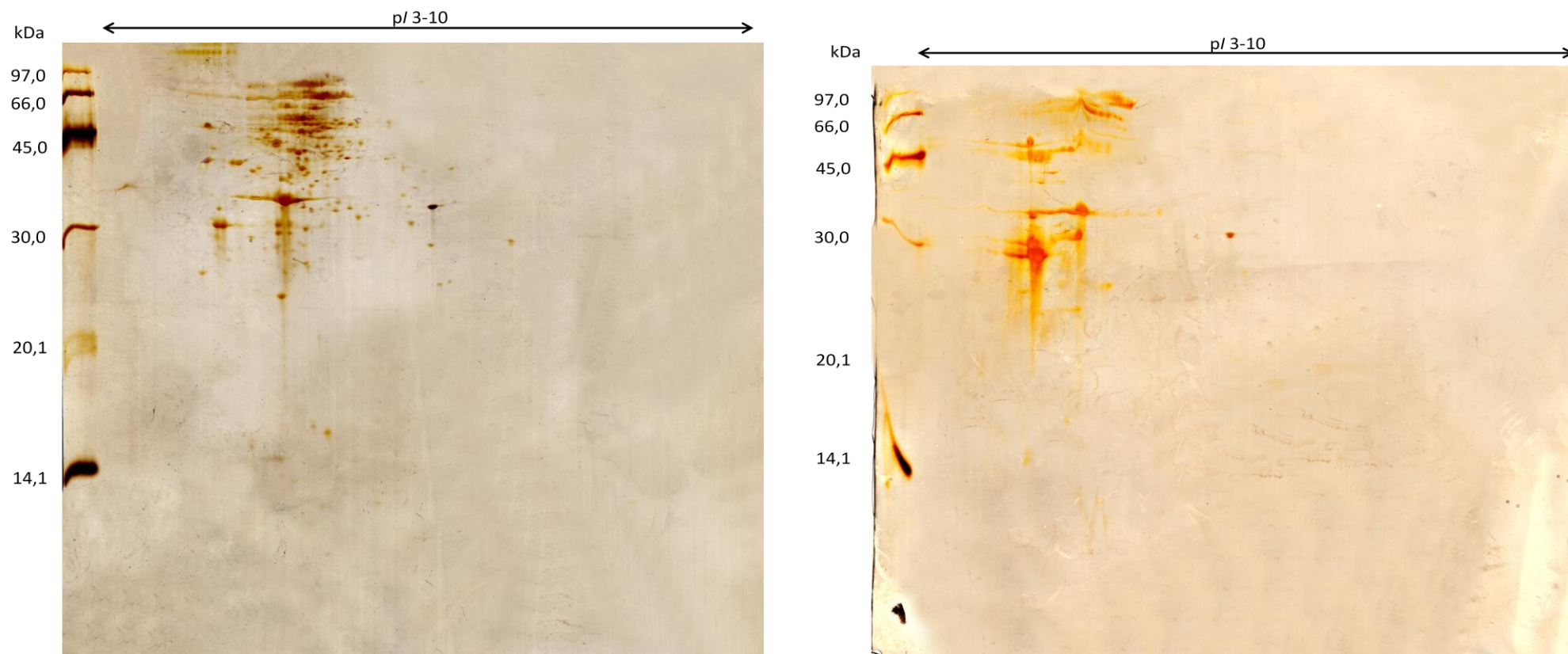


Figura 14. Perfil bidimensional dos secretomas de *A. oryzae* quando crescido em cultura em estado sólido (esquerda) e cultura submersa (direita), mostrando a maior complexidade de proteínas secretadas quando o microrganismo é submetido à primeira condição. As amostras foram submetidas à focalização isoeétrica em faixa ampla de pH (3-10), seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Nota-se que a grande maioria das proteínas no gel está localizada na região de pH ácido. As amostras foram obtidas por meio de precipitação de 4mL de extrato bruto com TCA, deoxicolato de sódio e acetona.

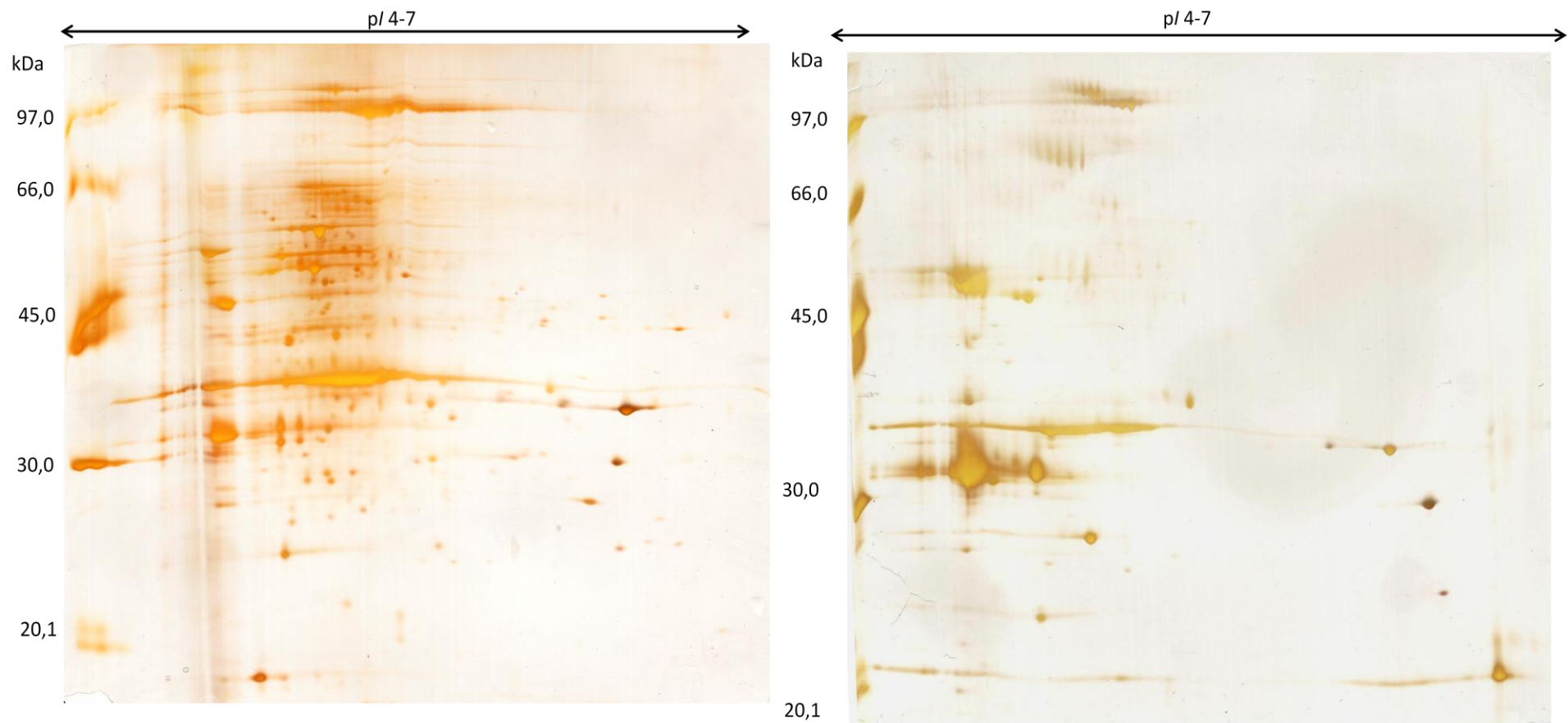


Figura 15. Perfil bidimensional dos secretomas de *A. oryzae* quando crescido em cultura em estado sólido (esquerda) e cultura submersa (direita), ambos submetidos à focalização isoelétrica em faixa ácida de pH (4-7), seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. A restrição da faixa de pH foi baseada na análise dos secretomas visualizados na figura 13, e teve como objetivo aumentar a definição do perfil de proteínas secretadas pelo microrganismo nas diferentes condições. As amostras foram obtidas por precipitação de 2mL do extrato bruto utilizando o *kit* Clean Up™, da GE.

Os perfis proteômicos das duas formas de cultura se mostram bem distintos, com diferentes graus de complexidade. O perfil proteico do crescimento em cultura submersa é mais simples, porém com maior abundância de determinadas proteínas. O perfil proteico do crescimento em estado sólido se apresenta mais complexo, sugerindo que este tipo de cultura aciona um maquinário proteico maior qualitativamente, que pode ser justificado pelas condições mais bruscas que consistem o crescimento em estado sólido, com água e nutrientes básicos bem escassos.

O trabalho realizado por Oda e colaboradores (2006) foi o primeiro a comparar os proteomas de cultura submersa e de cultura em estado sólido em *A. oryzae*, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono. Nestas condições, o microrganismo crescido em estado sólido secretou de quatro a seis vezes mais proteínas por micrograma de micélio do que quando crescido em cultura submersa. Qualitativamente, esse fato se refletiu em um proteoma com maior diversidade de proteínas secretadas quando analisado por eletroforese bidimensional.

Machida e colaboradores (2005), ao analisarem o genoma de *A. oryzae* e compará-lo com os genomas de *A. fumigatus* e *A. nidulans*, perceberam que o genoma daquele é 34% e 29% maior do que destes, respectivamente. Nesta análise, o grupo destaca o grande número de proteínas expressas por *A. oryzae* que são secretadas que não possuem ortólogos nas duas outras espécies. Muitas são as hipóteses levantadas pelo grupo para explicar essa diferença entre tamanhos de genomas, desde a perda de genes pelas duas espécies, partindo do pressuposto de que os três *Aspergillus* descendem do mesmo ancestral, até a possibilidade de rearranjo cromossômico em *A. oryzae* graças a sua utilização em larga escala em culturas de estado sólido durante seu período de domesticação, de forma semelhante ao que acontece com linhagens de leveduras quando submetidas a situações de falta de nutrientes. A amostra do cultivo em estado sólido, graças ao seu maior grau de complexidade, foi submetida à identificação de proteínas por espectrometria de massas do tipo LC-MS/MS.

6.4 Análise do secretoma de *Aspergillus oryzae* por Espectrometria de Massas (LC-MS/MS):

Por intermédio da espectrometria de massas (LC-MS/MS) foi possível identificar 47 proteínas distintas do secretoma de *A. oryzae* quando crescido em estado sólido de bagaço de cana (tabelas 1 e 2). Das proteínas em questão, 19 são pertencentes à família das glicosil hidrolases (E.C. 3.2.-), relacionadas com a degradação de biomassa lignocelulósica. Essa variedade também pode justificar a complexidade do perfil proteômico (figuras 13 e 14), no qual o crescimento em estado sólido apresenta perfil proteico mais rico. Tendo em vista que o crescimento em estado sólido possui água e nutrientes restritos, a secreção de grande variedade de grupos enzimáticos pode garantir a sobrevivência do microrganismo (Oda *et al.*, 2006).

Entre as proteínas identificadas está a protease ácida codificada pelo gene *pepA* e que é expressa e secretada exclusivamente em cultura em estado sólido (Kitano *et al.*, 2002), já anteriormente citada. Os trabalhos que citam esta expressão em particular normalmente envolvem culturas em estado sólido que utilizam arroz ou farelo de trigo (Oda *et al.* 2006) como fonte de carbono. A identificação desta enzima em cultura de bagaço de cana é mais um indicativo de que o modo como o substrato é apresentado ao microrganismo (estado sólido) de fato é determinante para a expressão e secreção desta enzima.

A lista de proteínas identificadas apresentada é dita não redundante, ou seja, entradas diferentes no banco de dados que representassem a mesma proteína não foram consideradas como identificações distintas e foram representadas na coluna “número de proteínas”. Entretanto, a identificação de uma mesma proteína várias vezes pode ser um indicativo da existência de isoformas desta que podem, inclusive, não estarem presentes no banco de dados: quando os espectros de MS/MS são submetidos ao banco de dados, os peptídeos em comum entre as isoformas conseguem alinhamento com os espectros teóricos do banco de dados, mas os que possuem quaisquer resíduos diferentes da proteína que consta no banco encontram

espectros teóricos equivalentes; dessa forma, a proteína é “identificada” várias vezes.

Mesmo levando em consideração as possíveis isoformas que não foram discernidas no processo de identificação, ainda é pequeno o número de proteínas identificadas quando o este número é comparado ao número de *spots* do proteoma de *A. oryzae* ilustrado anteriormente. Este fato pode ser justificado pela existência de polimorfismos dentro da mesma espécie. A linhagem utilizada nesta dissertação foi isolada em compostagem natural de resíduos de indústria de rebeneficiamento de algodão, que pode possuir proteínas com composição de aminoácidos distintas daquelas encontradas no banco de dados de *A. oryzae*, que foi construído a partir da clonagem de genes específicos de uma única linhagem, a RIB40.

Conforme já destacado previamente, quase metade das proteínas identificadas (19/47) é pertencente à família das glicosil hidrolases. Vale ressaltar que foram identificados grupos enzimáticos distintos, demonstrando que a cultura em estado sólido de bagaço de cana é capaz de induzir a produção e secreção de um arsenal enzimático bem diverso por *A. oryzae*, fato que pode ter grande valia em processos biotecnológicos. Dentre esses grupos, aparecem enzimas relacionadas à degradação de pectina que não foram detectadas por meio de ensaios enzimáticos, mas que foram identificadas por LC-MS/MS. Conforme discutido anteriormente, uma das limitações do cultivo em estado sólido é a baixa concentração de produção e secreção de enzimas (Ferreira *et al.*, 1999).

O grupo enzimático mais abundante nas identificações é o relacionado à degradação de celulose. Dentre as enzimas identificadas, observa-se pelo menos quatro beta-glicosidases codificadas por genes distintos, demonstrando a importância desta enzima para a degradação do bagaço de cana. A quantidade de diferentes beta-glicosidases secretadas também pode estar relacionada ao tipo de cultivo: em *A. kawachii*, 80% das beta-glicosidases estão associadas à parede celular quando o microrganismo é cultivado em cultura submersa, enquanto 80% dessas enzimas são secretadas quando o microrganismo é cultivado em estado sólido. Foi demonstrado que essas enzimas são secretadas com o auxílio de um

polissacarídeo extracelular, que aparentemente estabiliza a enzima e a libera da parede celular do fungo (Iwashita *et al.*, 2001). É possível que esse mecanismo aconteça de forma semelhante em *A. oryzae*, o que poderia justificar a diversidade de beta-glicosidases identificadas.

A extração das proteínas secretadas por *A. oryzae* em meio sólido foi feita com a adição de tampão, seguida por agitação. Esse processo pode ocasionar eventual lise celular, liberando no meio as proteínas de origem intracelular em pequenas quantidades. Quando o secretoma é submetido à análise por espectrometria de massas, as proteínas de maior abundância nas células lisadas podem ser identificadas, o que justifica as proteínas intracelulares listadas nas tabelas 1 e 2. Em protozoários, entretanto, são descritas na literatura vias de secreção ditas não convencionais, onde proteínas sabidamente conhecidas por terem funções intracelulares são encontradas secretadas. No secretoma de *Leishmania braziliensis* foram descritas algumas proteínas intracelulares, provavelmente secretadas via exossomos, que aparentam ou são já descritas como de crucial importância para o processo de infecção do protozoário: enzimas relacionadas ao metabolismo de glicose, como enolase e malato desidrogenase, fatores de alongação, e chaperonas moleculares (Cuervo *et al.*, 2009). Essas proteínas foram identificadas no secretoma de *A. oryzae*. Apesar de não haver relato na literatura sobre a existência deste tipo não convencional de secreção em fungos filamentosos, a existência de vias não clássicas de secreção pode ser outra explicação para a existência dessas proteínas no secretoma de *A. oryzae*.

Tabela 1. Proteínas identificadas por Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) a partir do secretoma de *A. oryzae* quando cultivado em estado sólido de bagaço de cana (amostra do sexto dia de cultivo). Os espectros de MS/MS foram obtidos em modo DDA (*Data Dependent Acquisition*) e posteriormente submetidos à busca contra o banco de dados Ascomycota (NCBI) por meio do programa MASCOT. Todos os hits foram obtidos com menos de 1% de FDR (*False Discovery Rate*).

acesso NCBI	proteína/organismo	Score ⁽¹⁾	Cobertura (%)	nº de proteínas	nº de peptídeos	nº de ⁽²⁾ pept. únicos	nº de ⁽³⁾ PSMs	MW (kDa)	pI	E.C.	G.H.
3915310	Endo-1,4-beta-xilanase [<i>Aspergillus aculeatus</i>]	63,04	37,31	6	11	5	41	35,31	8,29	3.2.1.8	11
133779823	precursor de poligalacturonase A [<i>Aspergillus oryzae</i>]	22,31	14,93	6	3	3	10	34,85	4,65	3.2.1.15	28
220699884	provável precursor de glicoamilase [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357]	23,35	16,63	3	7	3	18	52,50	5,00	3.2.1.3	15
285611	protease ácida [<i>Aspergillus oryzae</i>]	16,46	11,39	3	4	2	10	42,27	5,07	3.4.23.18	–
217825	glicoamilase [<i>Aspergillus oryzae</i>]	11,71	19,44	3	9	2	15	65,45	5,17	3.2.1.3	15
121801892	beta-D-glicosídeo glicohidrolase M [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	7,34	18,36	2	11	2	12	82,31	5,02	3.2.1.21	3
18958133	beta-galactosidase [<i>Aspergillus candidus</i>]	5,81	11,24	11	14	1	15	109,82	5,52	3.2.1.23	42
3242655	avicelase III [<i>Aspergillus aculeatus</i>]	3,77	8,76	4	5	1	5	89,76	5,20	3.2.1.4	74
119396958	exo-beta-1,3-glucanase Exg0 [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	4,44	8,96	6	7	1	8	99,07	5,26	3.2.1.58	5
292495285	exo-1,4-beta-xilosidase xInD [<i>Aspergillus japonicus</i>]	6,38	8,33	2	5	1	7	86,20	4,79	3.2.1.37	3
220699003	provável alfa-amilase [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357]	8,38	11,02	17	4	1	7	54,77	4,81	3.2.1.1	13
220700187	provável galactose oxidase [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357]	4,04	6,33	3	3	1	4	74,28	5,01	1.1.3.9	–
317035636	beta-glucosidase E [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	3,19	17,38	5	10	1	10	115,33	5,34	3.2.1.21	3
114195852	proteína hipotética ATEG_02590 [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	4,1	6,18	1	2	1	4	37,16	6,20	–	–
317151393	glutaminase GtaA [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	12,15	9,28	3	6	2	3	76,12	5,02	3.5.1.2	–
317149199	lipase extracelular GDSL-like/acilhidrolase [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	13,39	12,68	3	3	2	3	44,78	5,12	3.1.1.3	–
317032184	6-fosfogluconato desidrogenase [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	2,19	12,63	4	5	1	4	54,12	6,33	1.1.1.44	–
114192101	precursor de proteína regulada por glicose [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	2,56	12,2	2	8	1	2	73,37	5,06	–	–
114190657	actina [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	2,87	22,78	5	7	1	5	40,11	6,24	–	–
121734391	histona H2B [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	2,89	40	5	7	1	5	14,95	10,13	–	–
114191217	fator de alongação 3 [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	4,05	12,46	4	12	1	4	111,70	6,60	–	–
114194661	proteína carreadora de ADP, ATP [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	2,66	23,17	4	5	1	4	34,17	9,83	–	–
114194476	enolase [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	4,54	16,67	5	6	1	5	47,32	5,48	4.2.1.11	–
119397689	provável fator de alongação da tradução EF-1, subunidade α [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	6,1	18	22	8	1	22	49,99	9,00	–	–

119398187	domínio da proteína DUF410 [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	3	31,41	6	8	1	6	38,13	6,13	–	–
119402498	provável ATP sintase F1, subunidade β [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	7,9	21,54	3	9	1	3	55,65	5,59	3.6.3.14	–
119404312	chaperona molecular Mod-E/Hsp90 [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	4,23	15,79	5	11	1	5	80,14	4,98	–	–
145237640	transaldolase [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	2,43	22,53	5	6	1	5	35,41	5,80	2.2.1.2	–
145254885	proteína ribossomal S3 da subunidade 40S [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	2,83	27,44	3	6	1	3	29,17	9,10	–	–
220690051	serina carboxipeptidase (CpdS), putativa [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357]	13,21	9,04	3	4	1	3	54,84	5,36	3.4.16.-	–
220690837	isocitrato liase AcuD [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357]	3,02	13,75	5	9	1	5	60,00	7,01	4.1.3.1	–
220697975	proteína de secreção vacuolar (Pep7), putativa [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357]	11,61	12,24	2	5	1	2	69,42	4,70	–	–
317148785	malato desidrogenase [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	5,37	9,68	4	3	1	4	32,49	7,33	1.1.1.37	–

(1) *Score* baseado em parâmetros do SEQUEST.

(2) Peptídeos únicos: peptídeos distintos que foram identificados daquela proteína.

(3) PSM: do inglês *Peptide Spectrum Match*, que consiste na comparação entre o espectro de fragmentação experimental e os espectros teóricos gerados a partir das proteínas do banco de dados.

Tabela 2. Produtos proteicos desconhecidos que foram identificados por Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) a partir do secretoma de *A. oryzae* quando cultivado em estado sólido de bagaço de cana (amostra do sexto dia de cultivo). As sequências encontradas foram submetidas ao alinhamento de sequências pelo BLAST para busca de possíveis funções. Os espectros de MS/MS foram obtidos em modo DDA (*Data Dependent Acquisition*) e posteriormente submetidos à busca contra o banco de dados Ascomycota (NCBI) por meio do programa MASCOT. Todos os hits foram obtidos com menos de 1% de FDR (*False Discovery Rate*).

acesso NCBI	proteína/organismo	Score ⁽¹⁾	Cobertura (%)	nº de proteínas	nº de peptídeos	nº de ⁽²⁾ pept. únicos	nº de ⁽³⁾ PSMs	MW (kDa)	pI	alinhamento no BLAST	E.C.	G.H.
83766737	produto proteico sem nome [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	32,85	24,09	2	7	3	26	49,4	4,90	1,4-beta-D-glucana celobiohidrolase B	3.2.1.91	5
83765143	produto proteico sem nome [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	9,02	7,88	3	2	1	6	38,4	4,32	endopoligalacturonase D	3.2.1.15	28
83771876	produto proteico sem nome [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	2,55	9,5	2	7	1	9	85	5,10	beta-glicosidase	3.2.1.21	3
83772559	produto proteico sem nome [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	4,22	8,88	3	6	1	11	117,2	4,89	trealase ácida	3.2.1.28	37
83771975	produto proteico sem nome [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	2,75	17,62	3	7	1	13	48,2	5,21	1,3-beta-glucanosiltransferase <i>gel1</i>	2.4.1.-	72
134076323	produto proteico sem nome [<i>Aspergillus niger</i>]	2,53	9,5	2	5	1	6	84,4	5,55	beta-glicosidase G	3.2.1.21	3
56294812	produto proteico sem nome [<i>Aspergillus aculeatus</i>]	6,58	19,91	1	2	1	3	24,5	6,29	endo-1,4-beta-xilanase A	3.2.1.8	11
28467439	produto proteico sem nome [<i>Aspergillus oryzae</i>]	10,57	18	2	11	1	12	93,4	5,02	beta-glicosidade	3.2.1.21	3
83774647	produto proteico sem nome [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	2,65	14,5	2	4	1	5	65	5,24	tripeptidil-peptidase <i>sed 2</i>	3.4.14.19	—
83774082	produto proteico sem nome [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	2,24	9,58	1	4	1	4	48,9	6,21	adenosilhomocisteinase	3.3.1.1	—
83767874	produto proteico sem nome [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	2,6	15,76	2	3	1	5	24,1	11,31	proteína ribossomal L15 da subunidade 60S	—	—
83770155	produto proteico sem nome [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	1,76	2,84	2	2	1	3	62,1	8,34	transportador de oligopeptídeos	—	—
83774749	produto proteico sem nome [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	5,39	10,85	6	6	1	8	63,6	5,35	amidase	3.5.1.4	—
134075213	produto proteico sem nome [<i>Aspergillus niger</i>]	4,14	12,2	1	5	1	17	47,2	6,70	produto proteico sem nome	—	—

⁽¹⁾ Score baseado em parâmetros do SEQUEST.

⁽²⁾ Peptídeos únicos: peptídeos distintos que foram identificados daquela proteína.

⁽³⁾ PSM: do inglês *Peptide Spectrum Match*, que consiste na comparação entre o espectro de fragmentação experimental e os espectros teóricos gerados a partir das proteínas do banco de dados.

7 CONCLUSÕES

A partir desse trabalho, conclui-se que:

- O fungo *Aspergillus oryzae* produz e secreta enzimas hidrolíticas quando crescido em bagaço de cana em estado sólido como fonte única de carbono; embora em baixas concentrações, corroborando o que já é descrito na literatura para essa modalidade de cultivo
- A utilização do detergente não iônico *Tween 80* na concentração de 0,1% no tampão de extração não resultou em maior extração de enzimas hidrolíticas quando comparado com a extração padrão, onde é utilizado apenas o tampão acetato de sódio (25mM, pH 5,0);
- O perfil proteico unidimensional das duas extrações mostrou que não houve extração diferencial de proteínas quando o detergente *Tween 80* foi acrescentado ao tampão de extração. Entretanto, o detergente facilitou a solubilização de proteínas do bagaço de cana, o que seria desvantajoso quando o extrato bruto fosse submetido à análise por espectrometria de massas;
- Quando comparado ao secretoma de *A. oryzae* crescido em cultura submersa, o secretoma do crescimento em estado sólido mostrou-se mais diverso, sobretudo quando foram comparados os perfis bidimensionais de ambos os cultivos, enquanto o secretoma em cultura submersa apresentou maior abundância de determinados grupos enzimáticos; ambos os cultivos apresentam a maior parte das proteínas presentes em faixa ácida de pH;
- A análise do secretoma de *A. oryzae* crescido em estado sólido de bagaço de cana por espectrometria de massas identificou 47 proteínas distintas, sendo 18 pertencentes à família das glicosil-hidrolases (E.C. 3.2-), mais um indício da diversidade do secretoma do microrganismo

quando é submetido a essa modalidade de crescimento. Esse cultivo também induziu a expressão de *pepA*, enzima exclusiva dessa modalidade de cultivo;

- O número de polimorfismos entre a espécie *Aspergillus oryzae* pode ser uma justificativa para o baixo número de proteínas identificadas por LC-MS/MS, já que os perfis proteicos mostraram a existência de um número maior de proteínas existentes no secretoma;
- O cultivo em estado sólido de bagaço de cana foi capaz de induzir um arsenal enzimático bem variado para a degradação desta biomassa lignocelulósica, o que tem grande valia para fins tecnológicos: o grupo enzimático mais presente nas identificações foi o relacionado à degradação de celulose;
- Foi possível identificar grupos enzimáticos que não foram detectados por ensaios de açúcar redutor, como no caso de enzimas relacionadas à degradação de pectina;
- A metodologia empregada para a extração do secretoma de *A. oryzae* pode ter ocasionado lise celular e liberado proteínas intracelulares para o secretado, o que justifica a identificação destas proteínas por LC-MS/MS. Entretanto, da mesma forma que em protozoários, algumas destas proteínas podem estar relacionadas a vias de secreção não convencionais, e com funções extracelulares ainda desconhecidas.

8 PERSPECTIVAS

Foi demonstrado que os perfis de secretoma de *A. oryzae* são distintos quando o microrganismo é submetido a diferentes formas de cultivo, mesmo que a fonte de carbono seja a mesma. Entretanto, apesar de constatar essa diferença por meio de mapas proteômicos, pouco se sabe sobre proteínas diferencialmente induzidas nas culturas submersa e em estado sólido. Essa evidência abre inúmeras possibilidades de estudo sobre a indução destes diferentes grupos proteicos em *A. oryzae*, tendo em vista que não existem trabalhos sobre o secretoma deste microrganismo relacionados a esta fonte de carbono.

Além dessa expressão diferencial, parecem ser muitas os polimorfismos em *A. oryzae*, tendo em vista que este microrganismo parece adaptado a diversos nichos. Neste caso, seria interessante a utilização de metodologias que possam evidenciar essas diferenças e aumentar o número de identificações de proteínas secretadas por este microrganismo, como a busca por modificações pós-traducionais por métodos proteômicos, e também pela utilização de *softwares* que sejam aptos a identificar proteínas mesmo com polimorfismos, como o MS-BLAST.

Por fim, a identificação de proteínas intracelulares no secretoma de *A. oryzae* pode ser uma evidência de secreção destas por vias não convencionais, da mesma forma que acontece em protozoários. Essa hipótese abre uma infinidade de possibilidades de estudo, tendo em vista que não existe nada parecido descrito para fungos filamentosos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANTES, V. & SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**. v. 3, n. 4. 2010
- BACCARIN, J. G. e CASTILHO, R. C. A geração de energia como opção de diversificação produtiva da agroindústria canavieira. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 4., 2002, Campinas. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC0000000022002000100004&lng=en&nrm=abn>. Acesso em 30 de outubro de 2011.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L. & HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial application: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 56, p. 326-338. 2001
- BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**. v. 8, n. 2, p. 93-99. 1987.
- BON, E. P. S., GIRIO F. PEREIRA JR, N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. A. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. p. 241- 271.
- BOUWS, H., WATTENBERG, A., ZORN, H. Fungal secretomes: nature's toolbox for White biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v 80 (3), p. 381-388. 2008.

BRASIL, Ministério de Minas e Energia. Geração termelétrica a partir da biomassa. **Plano Nacional de Energia 2030**; colaboração Empresa de Pesquisa Energética. v.8. Brasília, 2007.250p.

BROWN, R. M., Jr., SAXENA, I. M., KUDLICKA, K. Cellulose biosynthesis in higher plants. **Trends in Plant Science**. v. 1(5), p. 149-155. 1996.

CAFFAL, K. H., MOHNEN, D. The structure, function and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**. v. 344. p. 1879-1900. 2009.

CANDIANO, G., BRUSCHI, M., MUSANTE, L., et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333. 2004.

CARPIO, R. C. e LORA, E. S. Estudo abrangente da cogeração no setor sucro-alcooleiro. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 4, 2002, Campinas.

Anais eletrônicos... Disponível em:

<http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC0000000022002000100068&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 30 de outubro de 2011.

CUERVO, P., de JESUS, J. B., SABOIA-VAHIA, L., MENDONÇA-LIMA, L., DOMONT, G., CUPOLILO, E. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Journal of Proteomics**. v 73, p 79-92. 2009.

DEL BIANCHI, V. L., CAPALBO, D. M. F., MORAES, I. O. Fermentação em Estado Sólido. In: Schmidell, W.. (Org.). **Engenharia Bioquímica**. v. 3, p. 247-276. 2000

DING, S. Y., HIMMEL, M. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54 (3), p. 597-606. 2006.

ELIAS, J. E., GYGI, S. P. Target-Decoy search strategy for mass spectrometry-based proteomics. **Methods in Molecular Biology**, v. 604, p. 55-71. 2010.

FERREIRA, G., BOER, C. G., PERALTA, R. M. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamarii* in solid state fermentation. **FEMS Microbiology Letters**. v 173, p. 335-339. 1999.

HAMMER, O, HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. Past: Paleontological Statistics software Package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**. v 4(1)p. 1-9. 2001

HASHIMOTO, T., MORISHITA, M., IWASHITA, K., SHIMOI, H. *et al.* Production and some properties of salt-tolerant β -xylosidases from a *shoyo* koji mold, *Aspergillus oryzae* in solid and liquid cultures. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 88 (5), p. 479-483. 1999.

HATFIELD, R., VERMERRIS, W. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. **Plant Physiology**. v. 126. p. 1351-1357. 2001.

HÖLKER, U., HÖFER, M., LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 64. p. 175-186. 2004.

ISHIDA, H., HATA, Y., KAWATO, A., ABE, Y., SUGINAMI, K., IMAYASU, S. Identification of functional elements that regulate the glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state cultura of *Aspergillus oryzae*. *Current Genetics*. v. 37, p. 373-379. 2000.

ISHII, T., MATSUNAGA, T., PELLERIN, P., O'NEILL, M. A., DARVILL, A., ALBERSHEIM, P. The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a colvalent cross-linked dimer. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 274 (19). p. 13098-13104. 1999.

IWASHITA, K., TODOROKI, K., KIMURA, H., SHIMOI, H., ITO, KIYOSHI, K. Purification and characterization of extracelular and cell wall bound β -glucosidases from *Aspergillus kawachii*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. v 62 (10), p. 1938-1946. 1998.

IWASHITA, K., SHIMOI, H., ITO, K. Extracellular soluble polysaccharide (EPS) from *Aspergillus kawachii* improves the stability of extracellular beta-glucosidase (Ex-1 and Ex-2) and is improved in their localization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v 91, p 134-140. 2001.

IWASHITA, K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v 94(6), 530-535. 2002.

KHANDERPARKER, R. & NUMAN, M.T. Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 35, p. 635-644. 2008.

KITANO, H., KATAOKA, K., FURUKAWA, K., HARA, S. Specific expression and temperature-dependent expression of the acid-protease-encoding gene (*pepA*) in *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (rice-koji). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.93, p. 565-567. 2002.

LANDIM, R. Brasil já é o terceiro maior exportador agrícola do mundo. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 6 de março de 2010. Economia.

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

MACHIDA, M., ASAI, K., SANO, M., TANAKA, T., KUMAGAI, T., TERAJ, G., *et al.* Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v.438, p. 1157-1161. 2005.

MACHIDA, M., YAMADA, O., GOMI, K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. **DNA Research**. v.15, p.173-183. 2008.

MAEDA, H., SANO, M., MARUYAMA, Y., TANNO, T., AKAO, T., TOTSUKA, Y., *et al.* Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v 65, p. 74-83. 2004.

MARTÍNEZ, A.T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F.J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M.J.; GUTIÉRREZ, A. & del RÍO, J.C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**. v. 8, p. 195-204. 2005

MEDINA, M. L., KIERNAN, U. A., FRANCISCO, W. A. Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 41, p. 327–335. 2004

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428.1959

MINEKI, R.; TAKA, H.; FUJIMURA, T.; KIKKAWA, M.; SHINDO, N. & MURAYAMA, K. In situ alkylation with acrylamide for identification of cysteinyl residues in proteins during one- and two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Proteomics**. v. 2 (12), p. 1672-1681. 2002

NOGUEIRA, L. A. H. ; LORA, E.S. . **Dendroenergia: Fundamentos e Aplicações**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 199 p.

ODA, K., KAKIZONO, D., YAMADA, O., IEFUJI, H., AKITA, O., IWASHITA, K.
Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72 (5), p.3448-3457. 2006

PÉREZ, J., MUÑOZ-DORADO, J., DE LA RUBIA, T., MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5 (2), p. 53-63. 2002.

TAIZ, L., ZEIGER, E. Paredes celulares: Estrutura, Biogênese e Expansão. In: _____. **Fisiologia Vegetal**; tradução Eliane Romanato Santarém *et al.* 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 407-434.

TAIZ, L., ZEIGER, E. Cell wall: Structure, Biogenesis and Expansion. In: _____. **Plant Physiology**; Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2002. p. 313- 338.

TJALSMA, H., BOLHUIS, A., JONGBLOED, J. D., BRON, S., DIJL, J. M. van. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.64 (3), p.515-547. 2000

UENOJO, M. & PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 388-394. 2007

VIËTOR, R. J., NEWMAN, R. H., HA, M. A., APPERLEY, D. C., JARVIS, M. C. Conformation features of crystal-surface cellulose from higher plants. **The Plant Journal**. v. 30 (6), p. 721-731. 2002.

WEI, H., XU, Q., TAYLOR, L. E., BAKER, J. O., TUCKER, M. P., DING, S. Y. Natural paradigms of plant cell wall degradation. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 20, p. 330-338. 2009

ZHANG, Y. H., LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 88 (7), p. 797-824. 2004