



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Pós-Graduação em Biologia Molecular

Caracterização do secretoma de *Aspergillus niger* crescido em bagaço de cana e purificação de xilanasas de interesse biotecnológico

Pedro Alves Martins

Orientador: Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart

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

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

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 niger* crescido em bagaço de cana e purificação de xilanases de interesse biotecnológico

Pedro Alves Martins

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

"Experience is a brutal teacher, but you learn. My God, do you learn."

C. S. Lewis

Agradecimentos

A Deus, que nos dotou de conhecimento e sabedoria para estudar e conhecer as obras das Suas mãos. Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. *Soli Deo Gloria.*

À minha família, que tanto me apoiou. Em especial aos meus pais, Isaías e Célia, pelo suporte e incentivo diários para que este trabalho se concretizasse; e ao meu irmão, Daniel, pela ajuda com a edição das imagens finais apresentadas neste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart, por me incentivar e me receber ainda no PIBIC sem nenhuma experiência, pelos ensinamentos, por manter as portas abertas para me receber e por todo apoio e confiança depositados em mim. Obrigado!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, que sempre manteve as portas do Laboratório de Enzimologia e de sua sala escancaradas para me receber. Você não foi de fato apenas um co-orientador, mas um orientador! Obrigado!

Ao Prof. Dr. Magno Rodrigues Junqueira, pelos ensinamentos e pelo apoio essencial no processamento e na análise das amostras para a espectrometria de massas. Aprendi muito com você!

À MSc. Natália von Gal Milanezi, pelo incentivo e apoio iniciais essenciais para dar continuidade ao projeto iniciado por ela em sua dissertação de mestrado.

À Ana Caroline Ribeiro de Toledo Pinto, amiga e companheira de laboratório de longa data. Você é a prova de que pessoas completamente diferentes podem se dar extremamente bem! Obrigado!

A todos os professores do LBQP e do Laboratório de Enzimologia, pelos ensinamentos, pelas lições, correções e dicas fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Às técnicas Marísia e Margarete do Laboratório de Enzimologia e aos técnicos do LBQP Antônio e Nuno. O apoio e a ajuda de vocês foram determinantes para o meu crescimento no laboratório e para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilberto Barbosa Domont (UFRJ), pela colaboração e o uso do espectrômetro de massa para a análise da composição do secretoma.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e ao Departamento de Biologia Celular, pela estrutura fornecida e oportunidade e confiança para me receber como aluno.

Aos amigos e colegas do LBQP, pelos conselhos acadêmicos, pelos almoços no RU, pelas ajudas na bancada e também pelos momentos de descontração enquanto os géis corriam. Vocês fizeram a rotina do laboratório ser mais divertida!

Aos amigos e colegas do Laboratório de Enzimologia, pelo apoio e amizade de cada um. As longas cromatografias compensaram ao lado de vocês. Meu K_m por vocês é incrivelmente baixo!

À MSc. Diana Paola Gómez Mendoza, agradecimentos mais que especiais por aceitar me ajudar desde o PIBIC, pela disposição e por estar sempre por perto para me socorrer e auxiliar em tudo. Aprendi muito com nossa convivência. Você foi essencial!

Aos meus amigos aleatórios, obrigado por serem aleatórios! Muito de mim é feito do que aprendi com vocês. Obrigado pelo crescimento mútuo e pelas palavras de incentivo. A amizade de vocês foi essencial para manter minha sanidade mental.

A Karla Tepedino e Paula Jaramillo, por me auxiliarem na obtenção das fotos no microscópio estereoscópico e no microscópio ótico, respectivamente.

Pelo apoio financeiro recebido dos órgãos CNPq, por meio de concessão de bolsa de estudos, e FAPDF e INCT do Bioetanol, por meio de projeto de pesquisa.

Resumo

Os fungos filamentosos quando submetidos ao crescimento em meios contendo material lignocelulósico, são capazes de produzir diferentes tipos de enzimas extracelulares responsáveis por catalisar a hidrólise de celulose, hemicelulose e outros polissacarídeos encontrados nas paredes celulares vegetais. Algumas dessas enzimas podem ser aplicadas comercialmente em processos industriais, como nas indústrias alimentícia, têxtil, papelreira e também na produção de bioetanol. O fungo filamentoso mesofílico e de distribuição cosmopolita *Aspergillus niger* é saprófita e apresenta potencial biotecnológico como produtor de enzimas hidrolíticas. O presente trabalho tem como objetivo a purificação de xilanases de *A. niger* bem como a análise do seu secretoma (conjunto de proteínas secretadas) após seis dias de crescimento em meio sintético suplementado com 1% de bagaço de cana como única fonte de carbono. Uma fração xilanolítica (*Xyl*) previamente purificada por cromatografia de exclusão molecular revelou ser composta por polipeptídeos distintos apresentando diferentes *p*/s como demonstrado por eletroforese bidimensional (2-DE). A fim de aperfeiçoar a purificação de *Xyl* e separar possíveis isoformas, *Xyl* foi submetido às cromatografias de troca aniônica (CTA) em pH 8,5 e de troca catiônica (CTC) em pH 5,0. A CTA separou uma fração contendo apenas dois polipeptídeos como demonstrado por 2-DE. Um *spot* foi identificado como sendo uma endo-1,4- β -xilanase e o outro não pôde ser identificado. A xilanase presente na fração purificada exibiu um K_m de 6.46 mg/ml e uma V_{max} de 1.984 UI.mL⁻¹ para xilana solúvel. A fim de ser submetido à análise proteômica, o secretoma foi primeiramente submetido à digestão trípica tanto em solução quanto após separação eletroforética em gel de poliacrilamida. Os peptídeos resultantes foram analisados por LC-MS/MS-Orbitrap em modo *Data Dependent Acquisition*. A abordagem de digestão em gel propiciou a identificação de 55 proteínas comparada à identificação de apenas 14 proteínas utilizando a digestão em solução. A maioria das proteínas identificadas pertence à classe das hidrolases, sendo as xilanases as mais abundantes. Estes resultados correspondem aos ensaios enzimáticos realizados e à composição esperada do secretoma: um arsenal de enzimas capazes de promover a hidrólise do substrato e prover meios para o desenvolvimento e crescimento do fungo.

Abstract

When submitted to growth in media containing lignocellulosic materials, filamentous fungi are able to produce different kinds of extracellular enzymes, which are responsible to catalyze the hydrolysis of cellulose, hemicellulose and other polysaccharides found on plant cell wall. Some of these enzymes can be commercially applied to industrial processes, such as the ones used on food, paper and textile industry as well as on the production of bioethanol. *Aspergillus niger*, a mesophilic and saprophytic filamentous fungus, possesses biotechnological potential as a producer of hydrolytic enzymes. The present work aims at purifying xylanases from *A. niger* and analyzing its secretome (group of secreted proteins) after six days of growth on synthetic medium supplemented with 1% sugarcane bagasse as the only carbon source. A xylanolytic fraction (*Xyl*) previously purified by molecular exclusion chromatography was shown to be composed of different polypeptides bearing different pI/s as demonstrated by two-dimensional electrophoresis (2-DE). In order to improve *Xyl* purification and to separate possible xylanase isoforms, *Xyl* was submitted to both Anion Exchange Chromatography (AEC) at pH 8.5 and Cation Exchange chromatography (CEC) at pH 5.0. The AEC approach could successfully isolate a fraction containing two different polypeptides as demonstrated by 2-DE. One spot was identified as an endo-1,4- β -xylanase and the other couldn't be identified. This xylanase in the purified fraction exhibited a K_m of 6.46 mg/ml and a V_{max} of 1.984 IU.mL⁻¹ for soluble xylan. For proteomic analysis, the secretome was firstly submitted to *In-solution* trypsin digestion or alternatively to SDS-PAGE followed by trypsin digestion of gel slices. Resulting peptides were then analyzed by LC-MS/MS-Orbitrap using *Data Dependent Acquisition* mode. Overall, the *In-gel* digested samples provided identification of 55 proteins comparing to only 14 identified proteins in *In-solution* digested samples. Most proteins identified in *A. niger* secretome belonged to the hydrolase class, being xylanases the most abundant ones. These findings correspond to experimental enzymatic assays and the expected secretome composition: an arsenal of enzymes capable of hydrolyzing the substrate and providing ways for the fungi growth and development.

Índice

Lista de Figuras.....	I
Lista de Tabelas.....	III
Lista de Abreviaturas.....	IV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Biomassa lignocelulósica.....	1
1.2 O bagaço de cana no Brasil.....	9
1.3 <i>Aspergillus niger</i>	11
1.4 Secretoma.....	15
1.5 Aplicações industriais das xilanases.....	18
2. JUSTIFICATIVAS.....	20
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral.....	21
3.2 Metas.....	21
4. METODOLOGIA.....	22
4.1 Manutenção da cultura de <i>Aspergillus niger</i>	22
4.2 Pré-tratamento do Bagaço de cana.....	23
4.3 Cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em Bagaço de cana.....	23
4.4 Caracterização Enzimática.....	24
4.4.1 Determinação de atividade enzimática.....	24
4.4.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	25
4.4.3 Efeito do pH na atividade enzimática.....	25
4.4.4 Efeito da presença de cisteína na atividade enzimática.....	25
4.4.5 Determinação de parâmetros cinéticos: K_m e $V_{máx}$	25
4.5 Purificação de Xilanases.....	26
4.5.1 Ultrafiltração.....	26
4.5.2 Precipitação protéica com sulfato de amônio (salting-out).....	26
4.5.3 Cromatografia de exclusão molecular em sistema ÄKTA.....	26
4.5.4 Cromatografia de dessalinização em sistema ÄKTA.....	27
4.5.5 Cromatografia de troca iônica em sistema ÄKTA.....	27
4.6 Determinação da concentração de proteína.....	28

4.7 Análise em gel.....	28
4.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) ...	28
4.7.2 Eletroforese Bidimensional (2-DE).....	28
4.7.3 Coloração dos géis	29
4.7.4 Zimograma.....	29
4.7.5 Ensaio de N-deglicosilação enzimática.....	30
4.8 Análise de imagem.....	30
4.9 Digestão trípica dos <i>spots</i>	31
4.10 Espectrometria de Massa (MS) e “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF) por MALDI-TOF.....	31
4.11 Espectrometria de massas <i>in tandem</i> (MS/MS) por MALDI-TOF/TOF .	32
4.12 Derivatização dos peptídeos trípticos por SPITC.....	33
4.13 Análise do secretoma de <i>A. niger</i> por LC-MS/MS.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Caracterização enzimática do Extrato Bruto	36
5.2 Purificação de xilanases	40
5.3 Análise do secretoma.....	55
6. CONCLUSÕES	66
7. PERSPECTIVAS	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

Lista de Figuras

Figura 1. Paredes celulares vegetais.....	02
Figura 2. Representação esquemática da hidrólise de celulose.....	04
Figura 3. Representação esquemática da hidrólise de uma heteroxilana	05
Figura 4. Representação esquemática da hidrólise da glicomanana.....	06
Figura 5. Representação esquemática da hidrólise da pectina.....	07
Figura 6. Representação esquemática da degradação da lignina por atuação enzimática e não-enzimática.....	08
Figura 7. <i>Aspergillus niger</i>	14
Figura 8. Número de publicações contendo a palavra <i>Secretome</i>	16
Figura 9. Organograma do projeto.....	22
Figura 10. Efeito da temperatura na atividade de xilanases, CMCases, mananases e pectinases presentes no extrato bruto de <i>A. niger</i>	37
Figura 11. Efeito do pH na atividade de xilanases, CMCases, mananases e pectinases presentes no extrato bruto de <i>A.niger</i>	38
Figura 12. Efeito da cisteína sobre a atividade enzimática de xilanases, CMCases, mananases e pectinases.....	39
Figura 13. Avaliação enzimática das frações resultantes da ultrafiltração.....	40
Figura 14. Perfil cromatográfico referente à calibração da coluna de exclusão molecular Sephadex G-50.....	41
Figura 15. Perfil cromatográfico de UFPM10 em Sephadex G-50.....	41
Figura 16. Análise eletroforética das amostras relativas às etapas de purificação.....	42

Figura 17. Perfil bidimensional da fração <i>Xyl</i>	44
Figura 18. Perfil cromatográfico de <i>Xyl</i> em coluna de dessalinização....	46
Figura 19. Perfil cromatográfico de <i>Xyl</i> em coluna de troca catiônica.....	47
Figura 20. Perfil cromatográfico de <i>Xyl</i> em coluna de troca aniônica.....	48
Figura 21. Análise eletroforética por SDS-PAGE das frações relativas à separação de <i>Xyl</i> na cromatografia de troca aniônica	49
Figura 22. Análise da atividade xilanolítica <i>in gel</i> das frações correspondentes às etapas de purificação.....	50
Figura 23. Perfil bidimensional da fração QFF.....	51
Figura 24. Espectros de massas relativos ao <i>spot</i> 2.....	52
Figura 25. Espectros de massas relativos ao <i>spot</i> 1.....	53
Figura 26. Análise em gel do ensaio de N-deglicosilação por PNGase F	54
Figura 27. Triplicata dos mapas bidimensionais do secretoma de <i>A. niger</i>	55
Figura 28. Contagem dos <i>spots</i> do secretoma de <i>A. niger</i>	56
Figura 29. Perfil cromatográfico referente ao secretoma de <i>A. niger</i> digerido em solução obtido em coluna de fase reversa C18.....	57
Figura 30. Exemplo de espectro de MS obtido no tempo de retenção de 104,83 min.....	58
Figura 31. Separação eletroforética do EB e posterior fracionamento (P1-P6).....	60

Lista de Tabelas

Tabela 1. Matriz energética brasileira.....	11
Tabela 2. Avaliação inicial da atividade de xilanases, CMCase, mananases e pectinases presentes no extrato bruto de <i>A. niger</i>	36
Tabela 3. Relação das proteínas identificadas no secretoma de <i>A. niger</i> quando crescido em bagaço de cana. Abordagem: digestão em solução.....	59
Tabela 4. Relação das proteínas identificadas no secretoma de <i>A. niger</i> quando crescido em bagaço de cana. Abordagem: digestão <i>in gel</i>	61
Tabela 5. Relação das proteínas sem nome ou hipotéticas identificadas no secretoma de <i>A. niger</i> quando crescido em bagaço de cana. Abordagem: digestão <i>in gel</i>	63

Lista de Abreviaturas

2-DE	Eletroforese Bidimensional
ACN	Acetonitrila
BDA	Meio Batata Dextrose Ágar
CMC	Carboximetil Celulose
DDA	<i>Data Dependent Acquisition</i>
DHB	Ácido 2,5-Dihidroxibenzóico
DNS	Ácido 3,5-Dinitro Salicílico
DTT	Ditiotreitol
EB	Extrato Bruto
EC	<i>Enzyme Commission</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
GH	Glicosil Hidrolase
CHCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
IPG	Gradiente de pH Imobilizado
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pI	Ponto Isoelétrico
PM10	Concentrado
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>
QFF	Fração Purificada de Xilanases
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - Poliacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SPITC	4-Sulfofenil-Isotiocianato
TFA	Ácido Trifluoroacético
TOF	<i>Time of Flight</i>
UI	Unidade Internacional
UFPM10	Ultrafiltrado
V_{máx}	Velocidade Máxima
Xyl	Fração Semipurificada de Xilanases

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biomassa lignocelulósica

A vida como a conhecemos se mantém através de um fluxo contínuo de energia entre organismos. Tudo começa com a captação e utilização da energia solar para a produção de biomassa vegetal que, em seguida, pode ser utilizada como fonte energética por outros organismos. Segundo Pérez e colaboradores (2002), cerca de metade de toda essa biomassa vegetal gerada pela fotossíntese é composta por biomassa lignocelulósica, que é direcionada para a formação das paredes celulares vegetais e, conseqüentemente, essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta.

As paredes celulares vegetais são estruturas complexas responsáveis por, entre outras funções, conferir resistência física às células vegetais. Dependendo de sua composição podem ser classificadas em parede celular primária ou parede celular secundária. A parede celular primária está presente em todas as células vegetais; é plástica, ou seja, aumenta de tamanho junto com o protoplasto, mas não retorna ao seu tamanho inicial. A parede celular secundária é comumente presente em fibras e esclereídeos. Quando presente, esta é depositada sobre a porção interior da parede celular primária e frequentemente apresenta-se dividida em três camadas distintas: S_1 , S_2 e S_3 (Figura 1a). As camadas diferem entre si quanto à organização e orientação dos feixes de microfibrilas de celulose, o que confere maior rigidez à estrutura. Tanto a parede celular primária quanto a secundária podem ser lignificadas. Entre as paredes celulares de células adjacentes, encontra-se a lamela média ou substância intercelular, responsável pela adesão célula a célula e transporte de substâncias (Raven *et al*, 2005).

A parede celular vegetal consiste, predominantemente, de três tipos de macromoléculas: a celulose, a hemicelulose e a lignina. Estas três se organizam de modo a formar uma malha de polímeros

entrelaçados por ligações covalentes e interações não covalentes. Principalmente nas paredes primárias, a rede de celulose-hemicelulose é ainda permeada por pectinas, um tipo de polissacarídeo altamente hidrofílico que confere maior hidratação à estrutura (Figura 1b). Atualmente, tem-se utilizado o termo holocelulose para descrever o arranjo entre os polissacarídeos que compõem a parede celular vegetal. Além destes, também são encontrados outros componentes não estruturais como extrativos polares (fenóis e taninos), extrativos apolares (óleos e esteróis) e componentes solúveis como açúcares, amido e proteínas (Martínez *et al*, 2005).

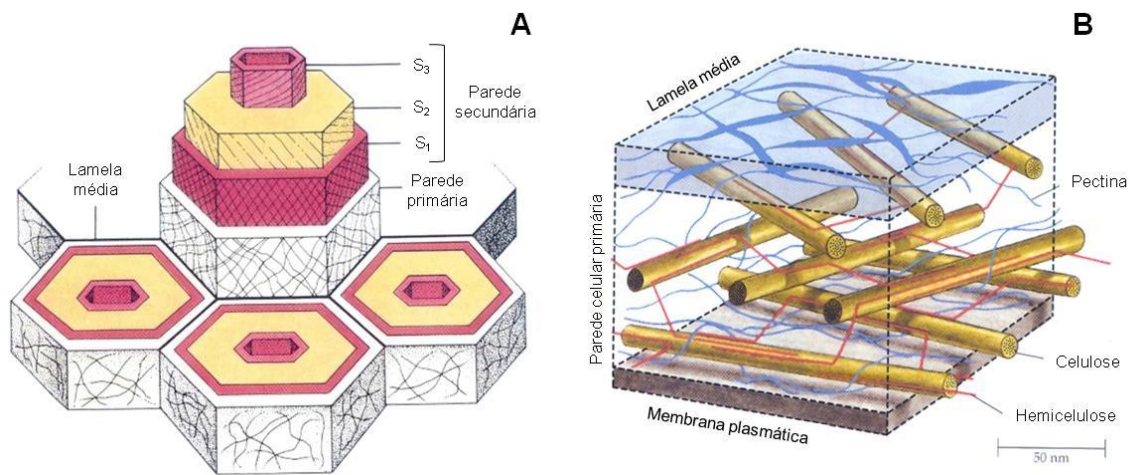


Figura 1. Paredes celulares vegetais. (A) Distribuição das camadas da parede celular secundária. (B) Organização estrutural dos componentes de uma parede celular primária mostrando os feixes de microfibrilas de celulose embebidos em uma matriz composta por hemicelulose e pectina. Modificado de Raven *et al*, 2005.

A celulose é um homopolímero linear e não-ramificado que consiste de unidades de D-glicopiranoose (glicose) conectadas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Apresenta-se com um grau de polimerização de 100 até 20.000 e, segundo Ragauskas e colaboradores (2006), é o biopolímero mais abundante do planeta podendo atingir de 35% a 50% do peso seco das plantas. As moléculas de celulose são encontradas dispostas paralelamente umas às outras e interagem entre si por pontes de hidrogênio e forças de van der Waals

formando uma estrutura rígida, cristalina e de difícil acessibilidade enzimática (Percival Zhang *et al*, 2006). Entretanto, além das regiões cristalinas, observa-se também a presença de regiões para-cristalinas, ou amorfas, que são aquelas mais acessíveis ao ataque enzimático (Bhat & Hazlewood, 2001).

A hidrólise completa da celulose requer a ação de três tipos de atividades enzimáticas distintas: (i) endo-1,4- β -glicanase (E.C. 3.2.1.4; conhecida por endocelulase ou endoglicanase) que atua catalisando a hidrólise aleatória de ligações glicosídicas presentes em porções internas das regiões amorfas da fibra de celulose gerando duas novas extremidades, uma redutora e uma não-redutora; (ii) exo-1,4- β -glicanases, como as 1,4- β -glicano glicanohidrolases (E.C. 3.2.1.74; conhecida por celodextrinase) ou 1,4- β -celobiosidase (E.C. 3.2.1.91; conhecida por celobiohidrolase) que atuam nas extremidades redutoras e não-redutoras das fibras de celulose gerando glicose (celodextrinase) ou celbiose (celobiohidrolase) como produto final; e (iii) β -glicosidase (E.C. 3.2.1.21; conhecida por celobiase) que libera monômeros de D-glicose por meio da catálise da hidrólise de celbiose e das extremidades não-redutoras de celulose (Lynd *et al*, 2002) (Figura 2). Entretanto, a hidrólise completa da celulose é limitada pela recalitrância da biomassa vegetal e conseqüente dificuldade do acesso das enzimas hidrolíticas. Para contornar esse problema, alguns fungos produzem proteínas, chamadas de swoleninas, responsáveis por promover uma desordem molecular de regiões cristalinas da fibra de celulose resultando em afrouxamento e conseqüente exposição e solubilização das moléculas de celulose, um processo denominado amorfogênese (Arantes & Saddler, 2010).

A hemicelulose é composta por um grupo de polissacarídeos complexos que, juntos, representam de 25% a 30% de toda a biomassa lignocelulósica (Ragauskas *et al*, 2006). Quando comparados à celulose, pode-se dizer que são polímeros quimicamente heterogêneos, ramificados e de baixo grau de polimerização – de 70 até 200. Podem ser compostos por mais de 20 monossacarídeos distintos organizados em diversas combinações, sendo os mais comuns a D-xilose, a D-manose, a D-galactose, a D-glicose, a L-arabinose, o ácido 4-O-metilglicurônico, o ácido D-galacturônico e o ácido D-glicurônico (Wei *et al*, 2009; Pérez *et al*, 2002). Tais monossacarídeos podem

se ligar de forma diversificada, sendo o padrão mais comum a presença de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 nas cadeias principais e a presença de ligações glicosídicas do tipo β -1,2, β -1,3 ou β -1,6 nas ramificações. De acordo com o monossacarídeo mais abundante da estrutura de uma hemicelulose, ela pode ser denominada de xilana, glicomanana, arabinana ou galactana.

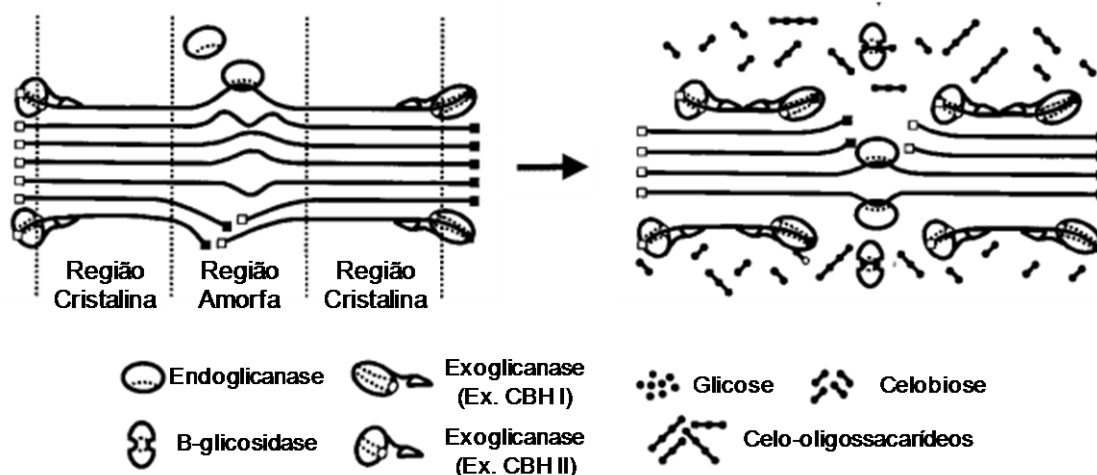


Figura 2. Representação esquemática da hidrólise de celulose. Adaptado de Lynd, 2002.

As xilanas são o principal tipo de hemicelulose e as mais abundantes nos tecidos das angiospermas em comparação ao das gimnospermas (Pérez *et al*, 2002). São formadas por uma cadeia principal de resíduos de D-xilopirranose (xilose) unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Além da xilose, as xilanas podem ainda conter arabinose, ácido glicurônico ou ácido 4-O-metilglicurônico além de ácido acético, ácido ferúlico e ácidos *p*-cumáricos em suas ramificações. A frequência e a composição das cadeias laterais dependem ainda da fonte da xilana. Acredita-se, por exemplo, que cerca de 60-70% dos resíduos de xilose nas xilanas das angiospermas apresentem acetilação, o que promove a solubilidade parcial desse polissacarídeo (Saha *et al*, 2003; Beg *et al*, 2001)

Devido à heterogeneidade das moléculas de xilana, são necessários diferentes tipos de enzimas para a sua hidrólise completa (Figura 3). São as principais: (i) endo-1,4- β -xilânase (E.C. 3.2.1.8; conhecida por endoxilânase), responsável por catalisar a hidrólise aleatória das regiões internas da xilana

gerando duas novas extremidades e oligossacarídeos menores; (ii) 1,4- β -xilosidase (E.C. 3.2.1.37; conhecida por xilosidase), que atua nas extremidades não redutoras da xilana ou em xilobiose, liberando D-xilose como produto final; (iii) acetil-xilana esterase (E.C. 3.1.1.72), que promove a desacetilação de resíduos xilopiranosídicos da xilana e de outros xilo-oligossacarídeos; (iv) α -L-arabinofuranosidase (E.C. 3.2.1.55; conhecida por arabinosidase), que catalisa a hidrólise de ligações do tipo α -1,3 ou α -1,5 entre resíduos de arabinose da cadeia lateral; (v) α -glicuronidase (E.C. 3.2.1.139), que catalisa a hidrólise de resíduos glicuronosídicos da cadeia lateral; e (vi) feruloil esterases (E.C. 3.1.1.73), que catalisa a hidrólise da ligação que une covalentemente ácidos hidroxicinâmicos da lignina com a xilana. Todas essas enzimas atuam cooperativamente para promover a hidrólise completa da xilana em seus monossacarídeos constituintes (Beg *et al*, 2001).

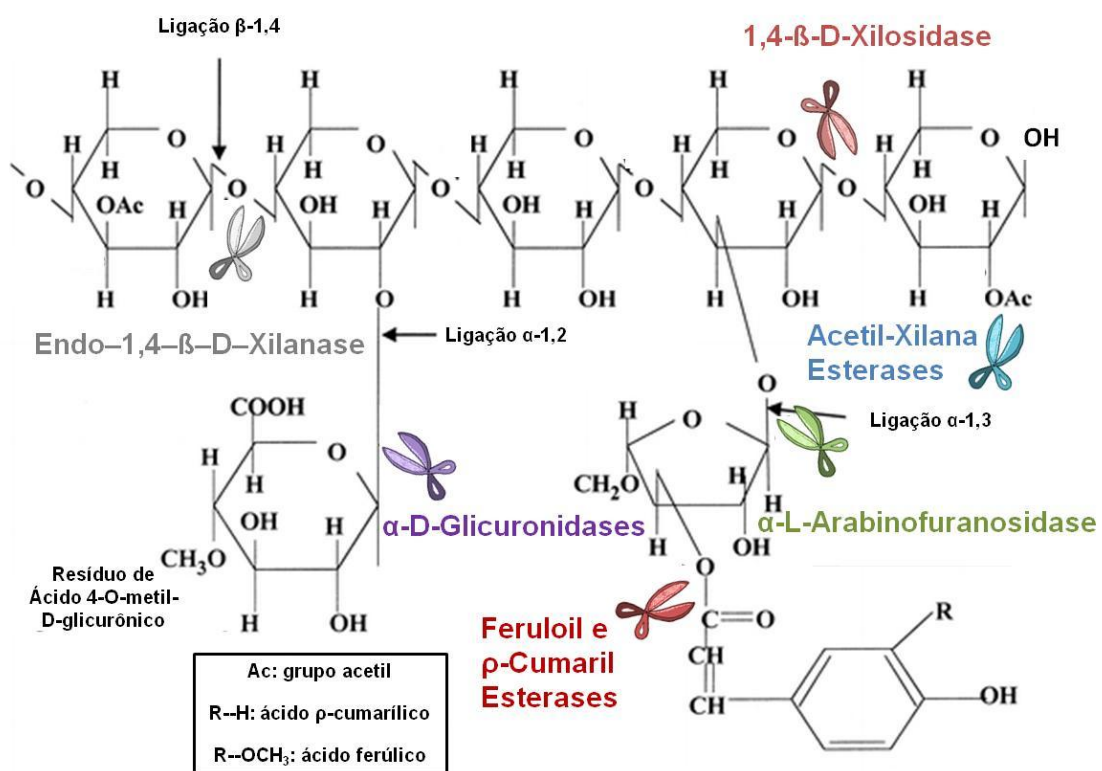


Figura 3. Representação esquemática da hidrólise de uma heteroxilana. Modificado de Beg *et al*, 2001.

As glicomananas representam o constituinte mais abundante da hemicelulose das gimnospermas. Sua cadeia principal é formada por resíduos

de manose e glicose intercalados na proporção 2:1 unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Os resíduos de manose podem apresentar acetilações. Sua estrutura contém ainda unidades de galactose dispostas lateralmente à cadeia do polímero por ligação glicosídica do tipo α -1,6.

Para a hidrólise completa das glicomananas é necessário um conjunto de enzimas, das quais as principais são: (i) endo-1,4- β -mananase (E.C. 3.2.1.78; conhecida simplesmente por mananase), responsável pela catálise da hidrólise aleatória de porções internas das cadeias de manana, glicomanana e galctomanana, formando, assim, duas novas extremidades e polímeros menores; (ii) β -manosidase (E.C. 3.2.1.25; conhecida como manosidase), que atua nas extremidades não redutoras de mananas e manobiose promovendo a liberação de resíduos de D-manose; e (iii) α -galactosidase (E.C. 3.2.1.22), que catalisa a hidrólise das ramificações de galactose presentes nas glucomananas (Figura 4).

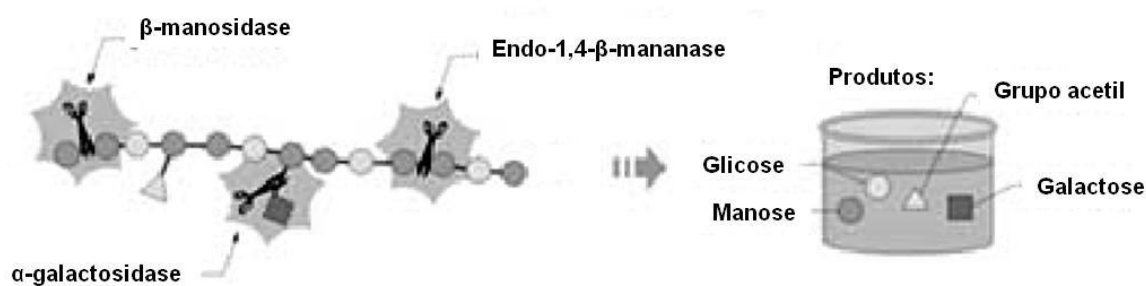


Figura 4. Representação esquemática da hidrólise da glicomanana. Adaptado de Siqueira & Filho, 2010.

A pectina, apesar de representar pequena parte dos polissacarídeos estruturais na maioria dos tecidos vegetais, é um constituinte da biomassa lignocelulósica que, assim como a hemicelulose, promove a ligação cruzada de microfibrilas de celulose, estabilizando a estrutura tridimensional da parede celular vegetal (Wei *et al*, 2009). Sua cadeia principal é composta por unidades de ácido D-galacturônico conectadas por ligações glicosídicas do tipo α -1,4. É comum que vários dos resíduos de ácido D-galacturônico apresentem acetilações ou metilações. Em algumas regiões do polímero observa-se a presença de resíduos de L-Ramnose intercalados aos resíduos de ácido D-

galacturônico. Podem apresentar diversas ramificações, sendo as mais comuns a presença de unidades de L-arabinose e D-galactose.

Participam na hidrólise da pectina uma série de enzimas (Figura 5), das quais as principais são: (i) endo- α -1,4-poligalacturonase (E.C. 3.2.1.15), que catalisa a hidrólise de porções internas do polímero entre resíduos de ácido D-galacturônico, criando duas novas extremidades e oligossacarídeos menores; (ii) ramnogalacturonase (E.C. 3.2.1.-), que atua de forma endo catalisando a hidrólise das ligações entre resíduos de ácido D-galacturônico e L-ramnose; (iii) exo-poligalacturonosidase (E.C. 3.2.1.82), responsável pela catálise da hidrólise de extremidades não redutoras da pectina liberando digalacturonato; e (iv) exo-poligalacturonase (E.C. 3.2.1.67), que catalisa a hidrólise de ligações do tipo α -1,4 liberando unidades de ácido D-galacturônico como produto (Uenojo & Pastore, 2007).

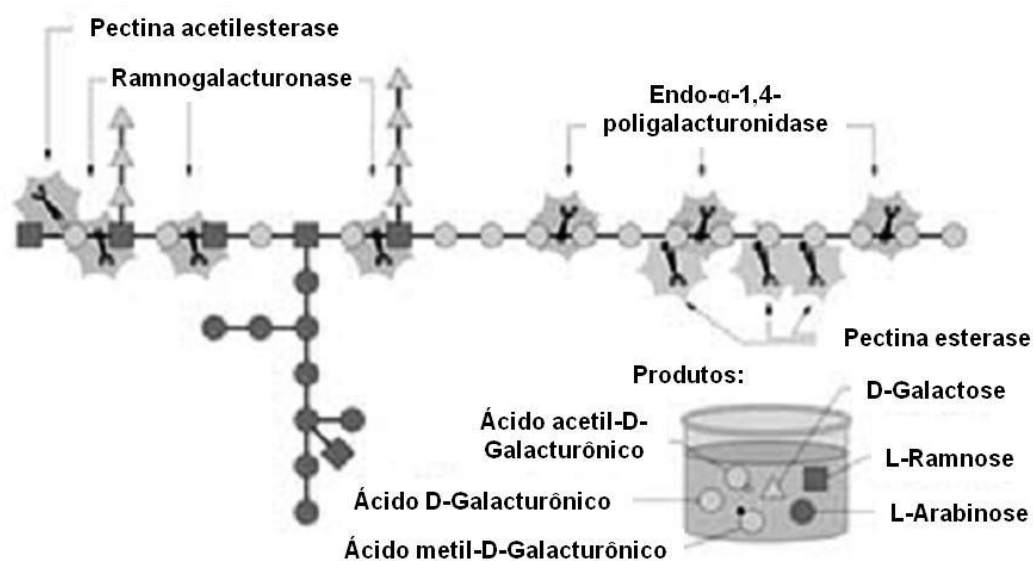


Figura 5. Representação esquemática da hidrólise da pectina. Adaptado de Siqueira & Filho, 2010.

A lignina, diferentemente dos outros biopolímeros descritos, é um complexo fenólico e pode ser descrita como uma rede tridimensional altamente hidrofóbica que se apresenta covalentemente ligada à hemicelulose formando uma matriz amorfa que permeia as microfibrilas de celulose sendo responsável por contribuir para a recalcitrância da biomassa lignocelulósica. Está presente

principalmente na lamela média e nas paredes secundárias, onde confere resistência mecânica e proteção contra a degradação química e biológica da célula vegetal. É uma estrutura constituída por unidades fenilpropanóides que podem ser dimetoxiladas (álcool sinapílico – S), monometoxiladas (álcool coniferílico – G) ou não apresentar metoxilação (álcool p-cumarílico – H). A proporção de cada unidade pode variar conforme o tecido e conforme os diferentes grupos de plantas vasculares. Além disso, tais unidades podem se organizar de diversas formas, o que promove a grande heterogeneidade de ligações observadas na molécula (Figura 6) e um desafio à sua biodegradação (Martínez *et al*, 2005).

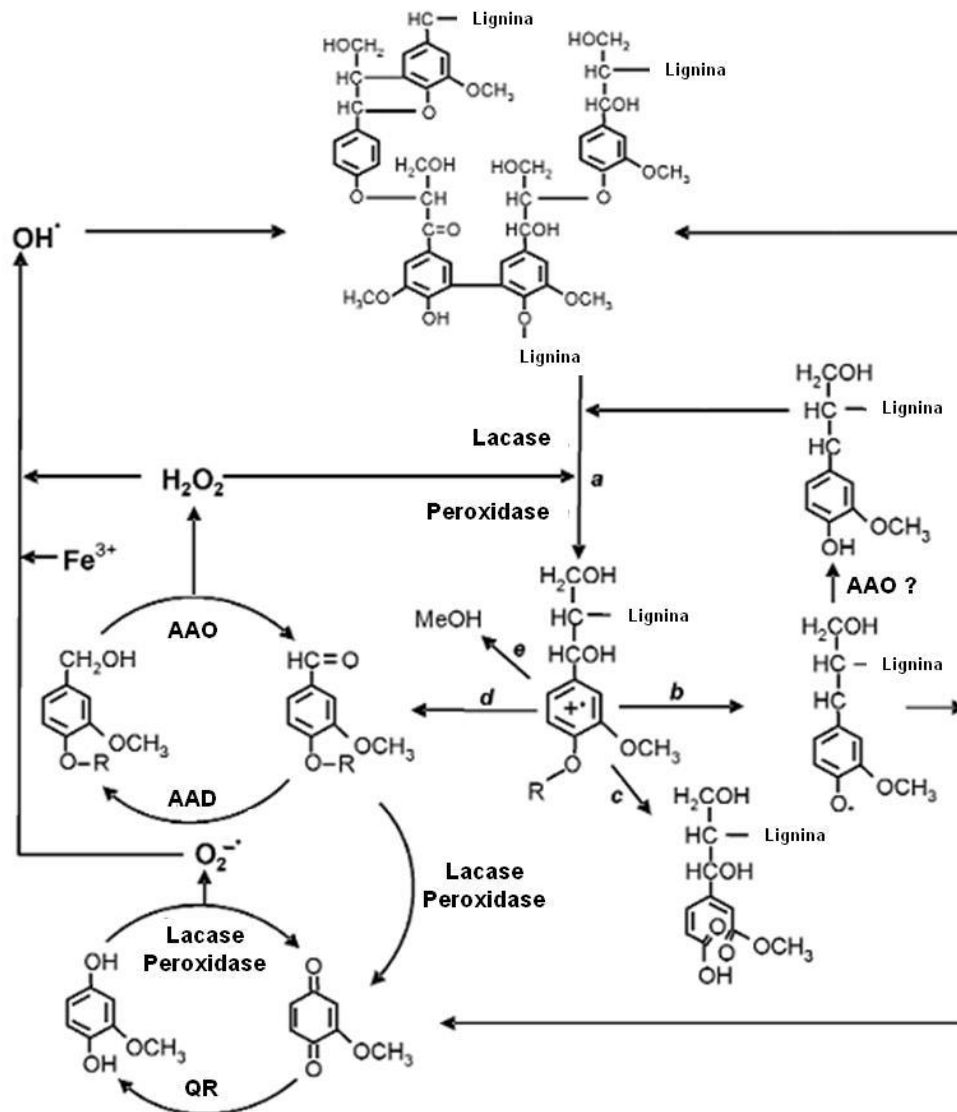


Figura 6. Representação esquemática da degradação da lignina por atuação enzimática e não-enzimática. Adaptado de Martínez *et al*, 2005.

A degradação de lignina é um processo dependente de etapas enzimáticas e não-enzimáticas (Figura 6) e é realizada com maior eficiência por fungos basidiomicetos. A ação de lacases (fenoloxidasas) promove a oxidação de unidades fenólicas da lignina e a ação de peroxidases proporciona a oxidação das unidades não fenólicas, o que desestabiliza a estrutura do polímero (etapa *a* da figura 6) resultando em uma série de eventos não enzimáticos que tentam re-estabilizar a molécula (etapas *b, c, d, e* da figura 6). Em seguida, pela ação de desidrogenases (aril-álcool oxidase – AAO; aril-álcool desidrogenase – AAD; quinona redutase – QR) e de lacases e peroxidases são produzidos radicais livres e peróxido de hidrogênio. Estes, por sua vez, conseguem infiltrar em regiões mais internas da parede celular e atacar porções da lignina que as enzimas não conseguem acessar, sendo assim essenciais no afrouxamento das fibras e conseqüente degradação de outros constituintes da parede celular (Martínez *et al*, 2005).

1.2 O bagaço de cana no Brasil

A cana de açúcar (*Saccharum sp.* Linnaeus) é uma planta de hábito herbáceo, crescimento cespitoso e perene. Seu plantio exige precipitações pluviométricas e temperaturas tais que favoreceram a adaptação da planta às regiões de clima tropical.

No Brasil, o cultivo da cana de açúcar é intrinsecamente relacionado à produção de açúcar e etanol de primeira geração e representa a maior produção brasileira em lavouras temporárias e permanentes. Tal afirmação pode ser comprovada por dados relativos à safra de 2005, ano em que a produção de cana de açúcar atingiu um total de 421,76 milhões de toneladas, o que representou cerca de 85% de toda a produção física nacional das lavouras. É uma cultura fortemente ligada a eventos históricos e em plena expansão tanto em produção como em área. Segundo dados apresentados pelo ministério de minas e energia, entre 1990 e 2005, a produção cresceu 60% e a área 38%, o que reflete o expressivo aumento da produtividade agrícola brasileira desta atividade. De todas as unidades federativas brasileiras, o estado de São Paulo se destaca como maior produtor nacional, sendo

responsável por 62% de toda a produção do país. Estima-se que, para suprir a crescente demanda interna e externa por açúcar e etanol, a produção nacional atinja 1.141.208 milhões de toneladas de cana de açúcar em 2030 (Brasil, 2007).

O bagaço de cana é o principal resíduo do processamento da cana de açúcar e provem da moagem do colmo da cana de açúcar para a extração de seu caldo. Segundo o Plano Nacional de Energia 2030 (Brasil, 2007), da safra de 2005 foram geradas cerca de 120 milhões de toneladas de bagaço de cana, o que representa mais de 28% da massa de toda a cana de açúcar produzida. Atualmente, o bagaço de cana gerado nas usinas sucroalcooleiras é destinado exclusivamente para a queima, onde a energia calorífica gerada é convertida em energia elétrica e utilizada na alimentação dos processos de produção de açúcar e etanol. Tal procedimento é responsável pela autossuficiência energética do setor. De fato, mais que 10% das usinas e destilarias de açúcar e álcool brasileiras vendem a energia excedente de seu consumo ao sistema nacional de abastecimento energético. Além dos processos de co-geração elétrica integrados ao processamento da cana de açúcar nas usinas, existem ainda termelétricas especializadas na utilização de bagaço de cana. Segundo a Agência Nacional de Energia Elétrica – ANEEL (2012), tais usinas totalizam 347 e são responsáveis pela geração de 7.263.788 kW, valor que representa 5,80% da matriz energética brasileira (Tabela 1).

O bagaço de cana é uma fonte de material rica em biomassa lignocelulósica, sendo composto por 40% de celulose, 24% de hemicelulose, 25% de lignina e 11% de outros compostos orgânicos como óleos, proteínas e cinzas (Saha, 2003). É, portanto, matéria-prima potencialmente conversível em produtos de maior valor agregado, como o etanol de segunda geração. Para isso, uma etapa de sacarificação, ou desconstrução da parede celular vegetal, se faz necessária. Tal etapa pode ser realizada com a adição de produtos químicos – em geral um tratamento ácido – acompanhada, ou não, de processamento físico; ou com a adição de enzimas lignocelulolíticas que ataquem as fibras constituintes da parede celular vegetal. Os oligossacarídeos resultantes podem, então, ser utilizados para as mais diversas finalidades,

como a destinação para a fermentação e consequente produção de etanol de segunda geração.

Tabela 1. Matriz energética brasileira (fonte: <www.aneel.gov.br>, Banco de Informações de Geração. Acesso em 14.02.12).

Tipo	Capacidade Instalada			Total			
	N.º de Usinas	(kW)	%	N.º de Usinas	(kW)	%	
Hidro		971	82.345.591	65,75	971	82.345.591	65,75
Gás	Natural	104	11.427.953	9,12	142	13.217.136	10,55
	Processo	38	1.789.183	1,43			
Petróleo	Óleo Diesel	901	3.154.581	2,52	935	7.090.892	5,66
	Óleo Residual	34	3.936.311	3,14			
	Bagaço de Cana	347	7.263.788	5,8			
Biomassa	Licor Negro	14	1.245.198	0,99	430	8.994.437	7,18
	Madeira	43	376.535	0,3			
	Biogás	18	76.308	0,06			
	Casca de Arroz	8	32.608	0,03			
Nuclear		2	2.007.000	1,6	2	2.007.000	1,6
Carvão Mineral	Carvão Mineral	10	1.944.054	1,55	10	1.944.054	1,55
Eólica		73	1.471.192	1,18	73	1.471.192	1,18
Importação	Paraguai		5.650.000	5,46		8.170.000	6,52
	Argentina		2.250.000	2,17			
	Venezuela		200.000	0,19			
	Uruguai		70.000	0,07			
Total		2.573	125.246.147	100	2.573	125.246.147	100

Nesse sentido, o bagaço de cana surge como uma opção economicamente sustentável de aproveitamento de energia e, também, como substrato para crescimento de microrganismos produtores de enzimas lignocelulolíticas utilizadas para a fabricação de produtos comerciais de maior valor agregado.

1.3 *Aspergillus niger*

Os fungos compõem um grupo extenso e diversificado, podendo ser encontrados como organismos unicelulares (leveduriformes) ou pluricelulares (filamentosos), sendo a última, a forma mais abundante. Sua habilidade de degradar biomassa lignocelulósica faz com que este grupo seja capaz de se adaptar facilmente a diferentes fontes de carbono e nitrogênio, permitindo-os ocupar uma série de nichos ecológicos como solos, madeira e outros resíduos de materiais orgânicos. Dentre os fungos saprofiticos destacam-se os filos Ascomycota e Basidiomycota (Bouws *et al*, 2008).

Os ascomicetos compreendem a maioria dos fungos conhecidos e alguns de seus representantes têm sido utilizados industrialmente com sucesso, como na indústria alimentícia, na indústria têxtil, na indústria farmacêutica e na produção de biocombustíveis como o etanol. Muito desse potencial biotecnológico se deve ao emprego de enzimas secretadas pelo fungo, em especial as glicosidases (GHs).

O gênero *Aspergillus*, primeiramente descrito por Micheli em 1729, consiste de fungos filamentosos, anamorfos (reprodução assexuada) e de dispersão cosmopolita, podendo ser encontrados principalmente em material vegetal em decomposição. Atualmente são conhecidas aproximadamente 250 espécies, demonstrando a grande diversidade e variabilidade encontradas no gênero. É definido morfológicamente pelo formato característico de seu conidióforo, onde se encontram os conidiósporos (esporos), e das células da hifa de onde se ramificam os conidióforos. O tamanho, o arranjo e a cor dos conidiósporos são ainda características para a identificação e divisão interna do gênero em subgrupos, como o caso dos *Aspergillus* com esporos negros que são classificados na seção Nigri (Bennett, 2010; Schuster *et al*, 2002).

Dentro do gênero, *Aspergillus niger* é uma espécie que se destaca pelo potencial biotecnológico e aplicabilidade na indústria, onde tem sido utilizado desde 1919 para a produção de ácidos orgânicos, em especial o ácido cítrico, aplicado extensivamente nas indústrias alimentícia e farmacêutica. É uma espécie classificada como segura para o manuseio, a manipulação e o uso na indústria, já que diferentemente de outras espécies classificadas dentro do mesmo gênero, não produz aflatoxinas. Tal fato foi avaliado em seu genoma (Pel *et al*, 2007), onde não foram encontrados genes ortólogos relacionados à biossíntese de aflatoxinas nem outros tipos de micotoxinas. Uma exceção é a presença de um *cluster* envolvido na biossíntese de Ocratoxina A. Entretanto, em análise posterior nenhum desses genes foi expresso em nível detectável, revelando uma realidade apresentada previamente por Schuster e colaboradores (2002), de que apenas aproximadamente 6% das linhagens conhecidas de *A. niger* são capazes de produzir tal toxina.

Desde a década de 60, *A. niger* tem sido reconhecido como importante fonte de secreção de enzimas, as quais têm sido extensivamente estudadas quanto à sua aplicabilidade industrial. De fato, uma β -glicosidase secretada por *A.niger* já é utilizada como aditivo a um coquetel enzimático de celulases de *Trichoderma reesei*, de modo a promover a hidrólise de celobiose em glicose, evitando assim a inibição das outras celulases e um maior rendimento na hidrólise de celulose (Sternberg *et al*, 1977).

A espécie foi descrita originalmente por van Tieghem (1867) através de análises morfológicas caracterizando-a como apresentando esporos esféricos, rugosos, enegrecidos e com diâmetro de 4 a 5 μm (Figura 7). Em 2007 a espécie teve seu genoma seqüenciado por Pel e colaboradores. O estudo revelou um genoma de 33,9 Mb com 14.165 genes codificadores de proteína preditos. A análise das ORFs (*Open Reading Frames*) encontradas detectou 171 glicosidases codificadas no genoma de *A. niger*, das quais 131 (77%) são possivelmente secretadas.

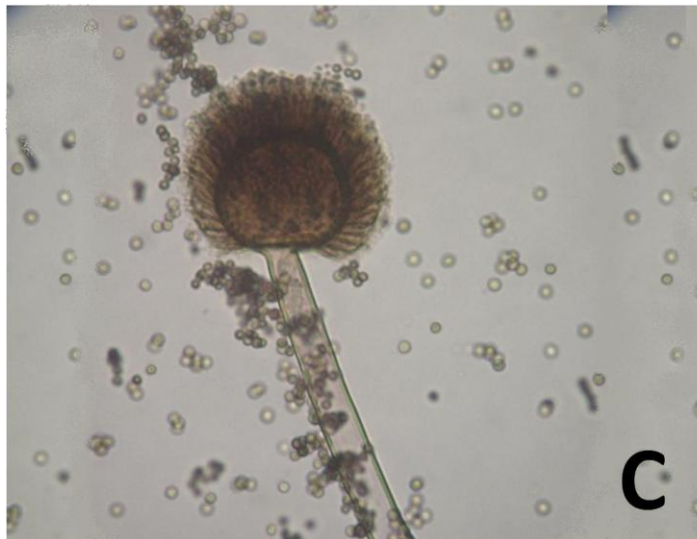
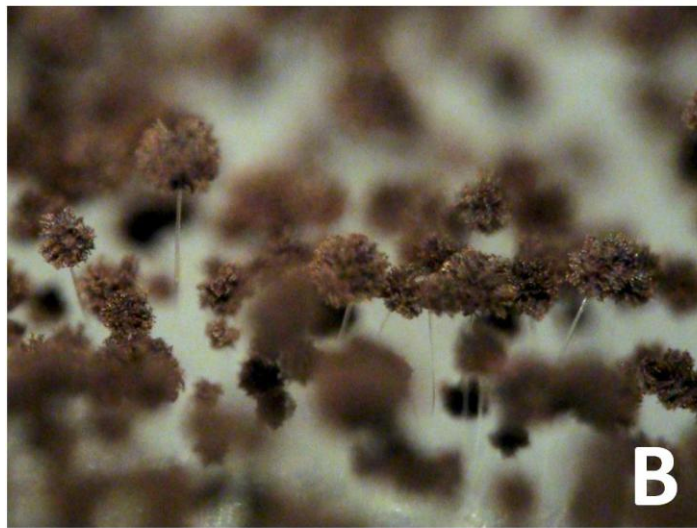


Figura 7. *Aspergillus niger* (A) em vista macroscópica, (B) quando visualizado com um aumento de 70 vezes em um microscópio estereoscópico e (C) quando visualizado com um aumento de 400 vezes em um microscópio ótico.

1.4 Secretoma

O secretoma, uma fração do proteoma, foi definido inicialmente por Tjalsma e colaboradores (2000) como sendo composto pelas proteínas nas suas formas nativas (funcionais) que são exportadas para fora da célula e pelos componentes da maquinaria de secreção. O grupo cunhou o termo quando trabalhava prevendo quais das proteínas de *Bacillus subtilis* eram secretadas para o meio extracelular em um estudo que avaliou a presença ou ausência de peptídeos sinais na sequência primária das pré-proteínas utilizando ferramentas genômicas. No ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisa analisou se a predição do secretoma baseada em técnicas genômicas era correspondente com a realidade (Antelmann *et al*, 2001). Desta forma, utilizando técnicas proteômicas tradicionais (eletroforese bidimensional seguida de espectrometria de massas) confirmou-se grande parte das predições. Entretanto, observou-se que as predições correspondiam a aproximadamente 50% das proteínas do secretoma de *B. subtilis*. Tal fato se dá devido à presença de proteínas sem peptídeo sinal no secretoma, impossibilitando a predição das mesmas pelo método utilizado. O artigo destaca, portanto, a importância da análise computacional de predição, mas também revela a necessidade de avaliações experimentais que complementem o estudo.

Desde então uma série de estudos têm adotado o termo, o qual tem sido aplicado para diversos modelos biológicos em diferentes contextos (Figura 8). Em alguns trabalhos, como este, o termo secretoma tem sido utilizado como forma de descrever apenas o conjunto de proteínas secretadas em um determinado tempo em uma determinada condição, o que seria equivalente ao termo exoproteoma.

No que diz respeito aos fungos e às bactérias, o foco do estudo do secretoma tem sido a identificação das proteínas envolvidas em processos de degradação da biomassa lignocelulósica, processos de patogenicidade e de defesa (Tsang *et al*, 2009). Neste sentido, o secretoma de *A. niger* tem sido extensivamente estudado desde 2009, quando Tsang e colaboradores estudaram a relação existente entre o secretoma de *A. niger* cultivado em seis

condições distintas (glicose 15%, glicerol 15%, sorbitol 5%, goma de alfarroba 2,5%, pectina cítrica 5% e xilana de bétula 5%) e as previsões genômicas a partir da presença de peptídeos sinais na porção N-terminal. No estudo foram preditas a secreção de 691 a 881 proteínas (dependente do método computacional de análise genômica), das quais 222 foram identificadas experimentalmente, sendo 39 de expressão constitutiva (presentes em todas as condições de cultivo) e 74 exclusivamente expressas. Curiosamente, foram detectadas muito mais enzimas de atuação *exo* (exo-glicanase, xilosidase, exo-poligalacturonase, exo-rhamnogalacturonase, manosidase e arabinofuranosidase) do que enzimas respectivas de atuação *endo* (endo-glicanase, xilanase, endo-poligalacturonase, endo-rhamnogalacturonase, mananase e arabinase).

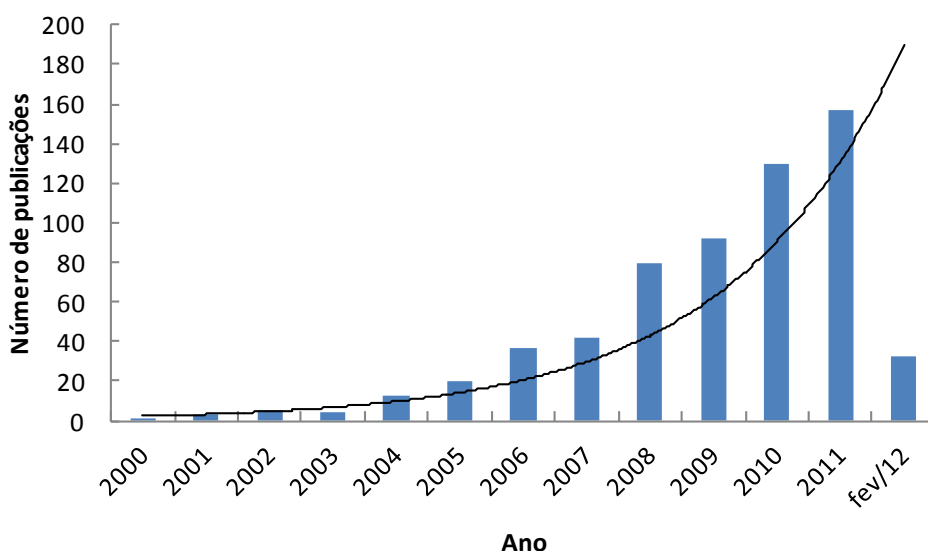


Figura 8. Número de publicações contendo a palavra *Secretome* em qualquer parte da mesma. A linha representa a tendência de crescimento para o ano de 2012. Fonte: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em 10.02.12

Após o trabalho de Tsang e colaboradores (2009), foram realizados outros estudos com o secretoma de *A. niger*, todos também trabalhando com substratos simples comercialmente disponíveis. Adav e colaboradores (2010) avaliaram o efeito do pH sobre o perfil do secretoma de *A. niger* quando cultivado em meio sintético acrescido de glicose como única fonte de carbono,

demonstrando que a produção enzimática pode ser estimulada através do controle do pH de cultivo. Braaksma e colaboradores (2010) estudaram a relação do secretoma predito *in silico* com o secretoma obtido através do crescimento do fungo em meio sintético acrescido de sorbitol ou ácido galacturônico ou em condições sem nenhuma fonte de carbono. Como previsto pela análise transcriptômica, a condição de crescimento com o ácido galacturônico foi a que apresentou maior expressão do sistema pectinolítico. Apesar de a condição de restrição a fonte de carbono ter apresentado uma expressão de proteases significativamente mais elevada, algumas proteases foram identificadas exclusivamente nos crescimentos com sorbitol e ácido galacturônico. Detectou-se ainda uma grande quantidade de proteínas secretadas que não apresentam peptídeo sinal, indicando a existência de uma provável via de secreção não clássica.

Ferreira de Oliveira e colaboradores (2010) analisaram a maquinaria de secreção protéica de *A. niger* através da coleta de microsomas e frações do proteoma das organelas envolvidas no processo de secreção quando o fungo foi crescido em meio sintético não induzido (contendo sorbitol) ou meio sintético induzido (contendo xilose). O estudo mostrou que a secreção é um processo extremamente dinâmico e interativo, sendo que as mudanças na constituição protéica dos microsomas induzida pela mudança de substrato pode ocorrer devido à reorganização do perfil de expressão gênica ou atribuída a processos de controle de secreção a nível protéico, como o recrutamento de proteassomas.

Por fim, Lu e colaboradores (2010) examinaram a indução e a repressão do promotor de glicoamilase (*glaA*) através da análise dos proteomas intracelular e extracelular (secretoma) de *A. niger* em condições de crescimento com xilose ou maltose como única fonte de carbono. Enquanto a mudança de substrato promoveu uma mudança expressiva no secretoma, o proteoma intracelular de *A. niger* se manteve praticamente inalterado. Foram identificadas 21 proteínas do secretoma relativo ao crescimento em meio sintético acrescido de xilose, das quais 60% eram classificadas como membros da classe das hidrolases e o restante estava envolvido em processos de manutenção da parede celular fúngica e proteínas antioxidantes. Da condição

de crescimento em meio sintético acrescido de maltose foram identificadas 48 proteínas, das quais mais da metade era representada pela glicoamilase e o restante era representado por algumas proteases e uma catalase. Algumas enzimas foram constitutivas e foram observadas nas duas condições. Dentre elas se destacam a β -glicosidase, a sulfidril oxidase e uma catalase. O estudo observou ainda uma alteração drástica no secretoma de *A. niger* quando foi feita adição de maltose à condição de crescimento em meio sintético acrescido de xilose, provavelmente devido à indução do promotor de glaA.

De modo geral, todos os estudos destacam além da importância da integração entre a genômica e a proteômica, a dinamicidade com que o secretoma de *A. niger* responde a mudanças na fonte de carbono. Destaca-se ainda, a necessidade de estudos que utilizem fontes de carbono lignocelulósicas, como o bagaço de cana de açúcar, para a compreensão da fisiologia e da capacidade de hidrólise de tais substratos por parte do fungo *A. niger*, permitindo assim uma otimização de processos enzimáticos de interesse biotecnológico.

1.5 Aplicações industriais das xilanases

A história do uso de enzimas na indústria moderna data de 1874, quando o químico dinamarquês Emil Christian Hansen extraiu uma protease de estômagos de bezerros e a utilizou para a preparação de queijos, marcando assim o primeiro preparado enzimático com aplicações industriais. Desde então, as enzimas vem conquistando cada vez mais seu espaço na indústria revelando uma parceria de sucesso.

Segundo Sá-Pereira e colaboradores (2008), o mercado atual de enzimas industriais está dividido em três segmentos: (i) enzimas técnicas, representadas pelos setores têxtil, de bioetanol e de papel e celulose; (ii) enzimas para alimentos e bebidas; e (iii) enzimas para ração animal. No que diz respeito às enzimas lignocelulolíticas, as mesmas estão representadas em todos os segmentos citados, podendo ser encontradas tanto em processos consolidados quanto em processos em afirmação.

Atualmente, as xilanases têm sido destinadas ao uso na indústria alimentícia, nos setores de panificação e na clarificação e redução da viscosidade de sucos de frutas e vinhos. Além disso, as xilanases têm ganhado espaço em outras importantes aplicações industriais, como nas indústrias farmacêutica e química. Nesta última, os produtos de hidrólise da xilana, em sua maioria resíduos de β -xilopiranosil (xilose), podem ser convertidos em solventes e adoçantes de baixa caloria, como o xilitol. Destaca-se nesse sentido a produção de etanol combustível a partir de produtos de hidrólise da hemicelulose com potencial fermentescível (Polizeli *et al*, 2005).

Contudo, a destinação mais promissora para a utilização de xilanases até o momento tem sido na indústria papelreira. Após o processo de polpação *kraft*, a polpa de celulose apresenta uma coloração amarronzada derivada da presença residual de lignina e seus derivados. A seguir, a polpa necessita passar por um processo de branqueamento sem que o teor de celulose seja reduzido, o que comprometeria a qualidade do papel. O uso das xilanases nesta etapa do processo se torna atrativo, pois através da hidrólise da xilana consegue-se remover a lignina residual da polpa, reduzindo assim a utilização de solventes organoclorados convencionais e obtendo um processo ecologicamente mais favorável. É importante destacar que neste processo, os extratos enzimáticos utilizados devem ser livres de celulases, de modo a evitar o comprometimento das fibras de celulose constituintes do papel (Duran *et al*, 2008).

Entretanto, apesar do progresso atingido, alguns desafios ainda se opõem ao uso concreto e robusto das xilanases para propósitos industriais como a redução dos custos para que haja competição entre produtos de origem lignocelulósica e os pré-existentes. Neste sentido, estudos têm focado na bioprospecção de novas xilanases; na produção de baixo custo através da utilização de substratos alternativos, como resíduos agroindustriais; na purificação e caracterização de xilanases com potencial industrial; no melhoramento genético de xilanases já conhecidas através de evolução dirigida; e na busca por misturas enzimáticas mais eficientes.

2. JUSTIFICATIVAS

Em um mundo onde a sustentabilidade vem sendo extensivamente debatida, a criação de processos industriais alternativos e a busca pela modificação e renovação dos processos atuais têm sido avaliadas. Neste contexto, a biotecnologia tem ganhado seu espaço no que diz respeito à aplicação de ferramentas ecologicamente viáveis, como a substituição de tratamentos químicos pela utilização de enzimas.

O fungo *Aspergillus niger* é um organismo que tem sido amplamente utilizado e reconhecido como um bom secretor de enzimas lignocelulolíticas. É um microrganismo de fácil manipulação e não traz riscos à saúde humana. É capaz de crescer em amplas faixas de pH e temperatura e se adapta facilmente à cultura submersa. Seu cultivo em meios contendo substratos lignocelulósicos resulta em um extrato de fácil obtenção e com abundância de atividade enzimática.

O bagaço de cana, por sua vez, é o principal resíduo derivado da cultura de cana de açúcar, a maior produção brasileira em lavouras temporárias e permanentes. É um material rico em biomassa lignocelulósica e com potencial de agregação de valor e de aproveitamento maior do que se tem sido utilizado. Além da utilização deste material para a sacarificação em si, o bagaço de cana também pode ser usado como substrato para o crescimento de microrganismos, tornando-se assim uma forma alternativa e econômica para a produção de enzimas lignocelulolíticas.

Uma fração de atividade xilanolítica (Xyl) previamente purificada em um estudo realizado em nosso laboratório demonstrou não estar completamente pura, o que motivou a continuação do processo de purificação. A obtenção de enzimas puras é essencial para sua caracterização e a consequente avaliação de sua aplicabilidade industrial seja na forma pura ou de misturas enzimáticas.

A abordagem proteômica para caracterização de um secretoma se torna atrativa no sentido que proporciona uma visão abrangente dos processos envolvidos na degradação enzimática da biomassa lignocelulósica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a composição do secretoma de *Aspergillus niger* utilizando abordagens proteômicas e de enzimologia clássica de identificação de proteínas, em especial as hidrolases responsáveis pela degradação de matéria lignocelulósica, quando crescido em bagaço de cana como única fonte de carbono; e obter, através de fracionamento cromatográfico, xilanases puras com potencial aplicação em processos de interesse industrial.

3.2 Metas

- Cultivar o fungo *A. niger* em meio líquido contendo bagaço de cana como única fonte de carbono, de forma a estimular a produção de um material rico em atividade hidrolítica principalmente do tipo xilanolítica;
- Caracterizar o perfil de atividades enzimáticas do secretoma obtido;
- Promover a separação das proteínas componentes do secretoma de *A. niger* através de técnicas eletroforéticas (eletroforese bidimensional) e identificar os *spots* obtidos por meio de análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF);
- Analisar o secretoma de *A. niger* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS);
- Obter frações puras com atividade xilanolítica por técnicas cromatográficas e realizar sua caracterização cinética, bioquímica e físico-química, bem como analisar suas possíveis aplicações industriais.

4. METODOLOGIA

Como forma de cumprir os objetivos estabelecidos, determinou-se um desenho experimental conforme esquematizado na Figura 9. Para tanto, os métodos descritos abaixo foram empregados.

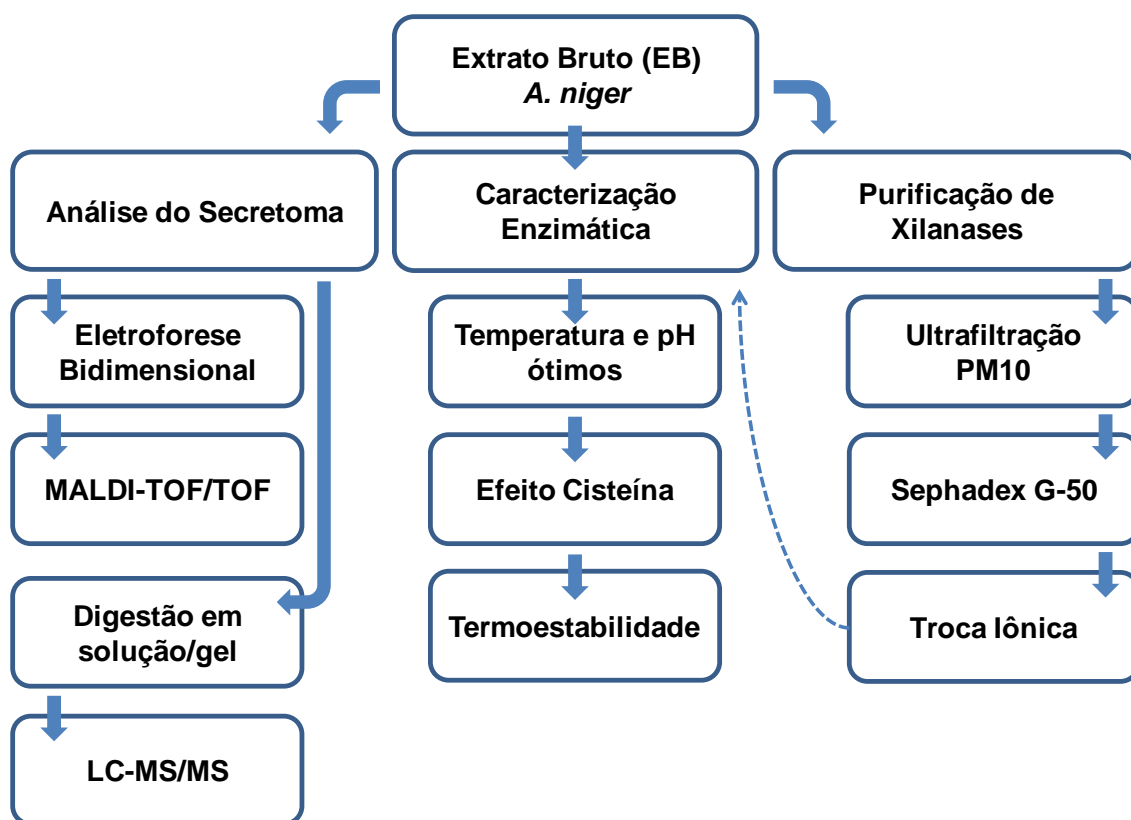


Figura 9. Organograma do projeto.

4.1 Manutenção da cultura de *Aspergillus niger*

Para a realização deste trabalho utilizou-se a linhagem LPM 93 de *Aspergillus niger* van Tieghen mantida no laboratório de enzimologia da Universidade de Brasília. O fungo foi coletado crescendo sobre madeira em decomposição encontrada na Reserva Natural do INPA (Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia) e, a partir daí, isolado, selecionado até a obtenção de uma cultura pura que apresentasse atividade xilanolítica expressiva e, por fim, classificado conforme critérios morfológicos (Medeiros *et al.*, 2003).

O fungo foi mantido em meio de cultura BDA (10% batata, 1% dextrose e 2% Agar) através de repiques constantes. Essas placas foram mantidas à temperatura ambiente em local iluminado até a esporulação. Para armazenamento da cultura, também foi feita estocagem a -80°C em solução anti-congelante (50% glicerol, 0,9% NaCl e 0,2% Tween 80).

4.2 Pré-tratamento do Bagaço de cana

O bagaço de cana (*Saccharum officinarum* Linnaeus, variedade Java) utilizado neste projeto foi coletado na Fazenda Brejo, em Formosa – GO, no ano de 2007.

Antes de sua utilização como fonte de carbono no cultivo do microrganismo, o mesmo foi submetido a um pré-tratamento. Esse cuidado é importante por dois motivos: (i) promover uma potencialização do acesso das hifas às fibras da parede celular vegetal, que, por sua vez, estimula a produção de maior quantidade de enzimas hidrolíticas; (ii) e eliminar açúcares presentes no material, de forma que ao ser utilizado no cultivo, o fungo tenha que degradar o bagaço de cana para se alimentar e não simplesmente se alimentar de açúcares residuais do processo de moagem e produção do suco da cana. O material foi pré-tratado da seguinte forma: lavagem em água corrente, seguido de autoclavagem e uma última lavagem também em água corrente. Após esse processo o bagaço de cana foi seco a uma temperatura de 60°C e em seguida moído até a obtenção de um pó fino que, após adicionado no meio de cultura, foi autoclavado e utilizado para os cultivos.

4.3 Cultivo de *Aspergillus niger* em Bagaço de cana

Após o crescimento e esporulação da cultura de *A. niger* em placas de BDA (pré-inóculo), foi feita uma raspagem com solução salina (0,9% NaCl) até a obtenção de uma suspensão coloidal com 10^8 esporos por mililitro. Essa solução de esporos foi utilizada para inocular um meio sintético (0,7% KH_2PO_4 ; 0,2% K_2HPO_4 ; 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,06% extrato de levedura) acrescido de bagaço de cana (1% m/v) como única fonte de carbono, previamente autoclavado por 20 minutos. A inoculação foi feita adicionando-se 1% da solução de esporos em relação ao volume total de meio. Em seguida, o

meio inoculado foi mantido sob agitação constante de 120 rpm a 28°C por um período de incubação de seis dias, conforme descrito por Milanezi (2010).

Passado o período de incubação, a cultura foi filtrada a vácuo utilizando-se papel de filtro Whatman® N°1 para separar o sobrenadante da cultura (onde se encontra o secretoma do fungo) de esporos e do micélio do fungo. O procedimento foi repetido duas vezes para evitar que algum esporo remanescente germinasse e modificasse o conteúdo da amostra que foi denominada Extrato Bruto (EB). Em seguida o extrato bruto foi separado em frascos âmbar e armazenado a 4°C.

4.4 Caracterização Enzimática

4.4.1 Determinação de atividade enzimática

A análise das atividades hemicelulolíticas (xilanases e mananases), celulolítica (celulases) e pectinolítica (pectinases) presentes no extrato bruto de *A. niger* foi realizada através de ensaio de dosagem de açúcares redutores usando DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) como descrito por Miller (1959).

Para cada ensaio, incubou-se 10 µL de substrato (xilana, carboximetilcelulose e pectina 1%; e manana 0,5%) com 5 µL de solução enzimática (extrato bruto ou fração cromatográfica) a 50°C durante 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 30 µL de DNS (ácido 3,5–dinitrosalicílico 43,84 mM; NaOH 400 mM; Tartarato de Sódio e Potássio 1,06 mM) a cada ensaio e os mesmos foram incubados a 97°C por mais 10 minutos a fim de que a reação fosse interrompida e o produto da mesma pudesse ser observado devido à mudança de cor do DNS. Ao final, adicionaram-se 150 µL de água destilada de modo que a absorbância se adequasse à curva padrão de cada açúcar redutor em questão. Para quantificar a intensidade de cor, foi feita leitura de absorbância no espectrofotômetro (Spectra-Max) a 540 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e no termociclador *MyCycler*TM (Bio-Rad).

A atividade enzimática foi expressa em unidade internacional (UI), definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1µmol de produto (açúcar) por minuto por 1mL de solução enzimática (UI.mL⁻¹).

4.4.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi avaliado realizando-se ensaios nas temperaturas de 30°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C, 70°C e 80°C nas mesmas condições descritas anteriormente.

4.4.3 Efeito do pH na atividade enzimática

O efeito do pH na atividade enzimática foi avaliado realizando-se ensaios em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 3,0 – 6,0), tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0 – 7,5) e tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5 – 9,0). Estes ensaios foram feitos nas mesmas condições descritas acima, alterando-se as quantidades de solução enzimática (25 µL) e substrato (50 µL) adicionados de 75 µL de tampão, perfazendo um volume final de ensaio dez vezes maior ao valor descrito anteriormente.

4.4.4 Efeito da presença de cisteína na atividade enzimática

Estudos anteriores demonstraram que xilanases podem apresentar uma atividade hidrolítica maior quando incubadas por certo tempo na presença de L-cisteína (Teixeira *et al*, 2010). Visando observar o efeito da presença ou ausência deste aminoácido na atividade enzimática do extrato bruto, foram feitas incubações em duas temperaturas (28°C e 50°C) na presença e na ausência do aminoácido por 20 minutos. A alteração da atividade enzimática foi avaliada logo em seguida ao período de incubação pelo método descrito anteriormente (Miller, 1959).

4.4.5 Determinação de parâmetros cinéticos: K_m e $V_{máx}$

A amostra de xilanase purificada foi submetida a ensaios enzimáticos conforme descrito acima mantendo fixa a quantidade de enzima utilizada e variando-se a concentração de substrato (Xilana *Oat Spelts* solúvel). Foram testadas concentrações no intervalo de 0,66 mg/mL a 48 mg/mL de substrato. Os valores de K_m e $V_{máx}$ foram estimados através da equação de Michaelis-Menten utilizando-se regressão não-linear no software *Enzfitter* (Leatherbarrow, 1999).

4.5 Purificação de Xilanases

4.5.1 Ultrafiltração

O extrato bruto foi concentrado utilizando-se o método de ultrafiltração. Neste procedimento, o extrato bruto foi submetido a uma pressão de 2,5 kgf/cm², produzida pela injeção de ar comprimido na câmara de ultrafiltração, e forçado através de uma membrana com *cut-off* de 10 kDa (PM10 Millipore Co., MA, EUA). Foram obtidas duas frações: o concentrado (que foi denominado de PM10) e o ultrafiltrado (que foi denominado de UFPM10). Como a membrana é feita a partir de celulose, e a amostra apresenta atividade celulolítica, o processo foi realizado a 4°C. Sabendo-se da capacidade de algumas xilanases de fungos filamentosos em atravessar por essa membrana, o procedimento foi utilizado como uma etapa de purificação. Para dar continuidade ao processo de purificação de xilanases de *A. niger*, utilizou-se a fração UFPM10.

4.5.2 Precipitação protéica com sulfato de amônio (*salting-out*)

A fração UFPM10 foi submetida a uma condição de saturação de 60% (m/v) de sulfato de amônio macerado e adicionado lentamente à solução a uma temperatura de 4°C sob leve agitação. Após 16 horas de incubação, a solução foi centrifugada a 5000 g por 20 minutos. Ao final, obteve-se um *pellet*, composto pela fração protéica precipitada, que foi ressuspenso em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 em um volume 120 vezes menor que o volume inicial de UFPM10.

4.5.3 Cromatografia de exclusão molecular em sistema ÄKTA

Para a purificação em cromatografia de exclusão molecular, 275 mL de resina Sephadex G-50 foram empacotados em uma coluna do tipo XK 26 (51,8 cm de comprimento x 2,6 cm de diâmetro) utilizando o sistema ÄKTApurifier (GE Healthcare) a um fluxo constante de 1 mL/min. A pressão máxima foi calculada através da lei de Darcy e dos parâmetros fornecidos no manual do fabricante da resina. O volume vazio da coluna foi calculado com a utilização de Blue Dextran e, em seguida, a mesma foi calibrada com a utilização de Albumina (66 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa), Citocromo C (12,4 kDa) e Aprotinina (6 kDa).

Para cada corrida utilizou-se 1 mL de amostra precipitada. A eluição foi isocrática em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 25 mM (previamente filtrado em membrana com corte de 0,22 µm e deaerado) a um fluxo constante de 1 mL/min e por dois volumes de coluna. As frações foram coletadas automaticamente por um coletor e apresentaram um volume final de 6 mL cada. Em seguida, cada fração foi analisada para detecção de atividade xilanolítica para a confecção do cromatograma.

4.5.4 Cromatografia de dessalinização em sistema ÄKTA

As frações que apresentaram atividade xilanolítica foram reunidas, denominadas *Xyl* e, em seguida, liofilizadas e armazenadas a -20°C. As amostras foram, então, ressuspensas em água Milli-Q em um volume 8 vezes menor do que o inicial e submetidas à cromatografia de exclusão molecular em coluna *HiTrap™ Desalting* (GE Healthcare) utilizando o sistema ÄKTApurifier para a dessalinização. A eluição foi isocrática em tampão respectivo à próxima cromatografia a um fluxo constante de 5 mL/min.

4.5.5 Cromatografia de troca iônica em sistema ÄKTA

As frações dessalinizadas foram reunidas e recromatografadas em colunas de troca iônica utilizando o sistema ÄKTApurifier. Para tanto, foram aplicados 5 mL de amostra dessalinizada utilizando o sistema Superloop™ (GE Healthcare). As frações foram coletadas automaticamente por um coletor e apresentaram um volume final de 1 mL cada. Em seguida, cada fração foi analisada por ensaio de atividade xilanolítica para a confecção do cromatograma.

Foram testadas duas colunas distintas: troca aniônica *HiTrap™ Q Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare) em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,5 e troca catiônica *HiTrap™ SP Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare) em tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0. Todos os tampões foram filtrados em membrana com corte de 0,22 µm (GE Healthcare) e deaerados previamente. A eluição foi feita com fluxo de 1 mL/min em gradiente de NaCl 0 – 1,0 M, após a injeção total da amostra, da seguinte maneira:

- Ausência de NaCl por 5 volumes de coluna;

- Gradiente de NaCl de 0 – 0,5 M por 10 volumes de coluna;
- Gradiente de NaCl de 0,5 – 1,0 M por 5 volumes de coluna;
- NaCl 1,0 M por 5 volumes de coluna;
- Ausência de NaCl por 5 volumes de coluna.

4.6 Determinação da concentração de proteína

A determinação da concentração protéica de cada solução enzimática (extrato bruto e frações das etapas de purificação) foi obtida utilizando-se o *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) segundo instruções do fabricante.

4.7 Análise em gel

4.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Para a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), as amostras foram liofilizadas e tratadas com o kit *2D Clean-Up* (Amersham Biosciences Co.) conforme instruções do fabricante. Em seguida, adicionou-se tampão de amostra 1X (Tris-HCl 72,5 mM; 2% SDS m/v; 10% Sacarose m/v; DTT 50 mM; 0,01% Azul de bromofenol; pH 6,8) e as amostras foram submetidas a 100°C por 5 minutos e aplicadas em géis com concentração de 12% de poliacrilamida preparados segundo o protocolo tradicional descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada em sistema Hoefer® (San Francisco, CA, EUA) em tampão de corrida (Tris 25 mM; Glicina 0,19 M; SDS 3,45 mM) aplicando-se uma corrente constante de 30 mA por gel. Para cada gel utilizou-se 5 µL de marcador contendo: fosforilase b (97,0 kDa), soroalbumina bovina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa).

4.7.2 Eletroforese Bidimensional (2-DE)

Após liofilização de 1,5 mL de Extrato Bruto (ou 2 mL no caso de frações cromatográficas), as amostras foram precipitadas com o kit *2D Clean-Up* (Amersham Biosciences Co.) conforme instruções do fabricante. Com a amostra limpa e seca, promoveu-se a solubilização da mesma em tampão de amostra 2-DE (Uréia 7 M; Tiouréia 2 M; DTT 85 mM; 2,5% Triton X-100; 0,5% Pharmalyte™; 10% Isopropanol) que, em seguida, foi utilizado para reidratar

strips de 18 cm com gradiente imobilizado (IPG) de pH 3-10 linear (*ReadyStrip IPG strips*, Bio-Rad) por 17 horas. Os *strips* reidratados foram, então, submetidos à focalização isoeétrica (IEF) no aparelho Ettan IPGPhor 3 (Amersham Biosciences Co.) em sistema “*manifold*” usando-se corrente e voltagem máximas de 75 μ A e 10000 V respectivamente. A focalização foi realizada em quatro passos sucessivos: 500 V por 1 hora, um gradiente de 500 V a 1000 V por 1 hora, um outro gradiente de 1000 V a 8000 V por 3 horas e 45 minutos, e, por fim, 8000 V por mais 45 minutos, totalizando 24000 Vh de acordo as instruções do fabricante. Finalizada a IEF, os *strips* foram submetidos à redução das pontes dissulfeto por incubação em 3 mL de DTT 125 mM em tampão de equilíbrio (Tris 1 M pH 8,0, uréia 6 M, glicerol 30% v/v e SDS 1% m/v) durante 30 minutos. Em seguida, foi feito um processo de alquilação incubando-se o *strip* em solução de acrilamida 300 mM em tampão de equilíbrio por mais 30 minutos (Mineki *et al.*, 2002). Esse processo promove a propionamidação dos radicais sulfidrilas das cisteínas reduzidas anteriormente, impedindo a reformação das pontes dissulfeto, o que promove a linearização das proteínas em questão. Por fim, os *strips* foram transferidos para um sistema de eletroforese em gel de poli(acrilamida) desnaturante (SDS-PAGE) com gradiente de 10-15% de poli(acrilamida) (Laemmli, 1970), utilizando-se o aparelho *Bio Rad PROTEAN II xi Cell*. A separação das proteínas na segunda dimensão foi realizada em tampão de corrida (25 mM Tris, 0,19 M Glicina, 3,45 mM SDS) aplicando-se uma corrente constante de 25 mA por gel em temperatura de 19°C. Os géis de Extrato Bruto foram feitos em triplicata.

4.7.3 Coloração dos géis

Os géis do secretoma (EB) foram corados com solução de *Coomassie Brilliant Blue G-250* coloidal segundo protocolo modificado de Anderson e colaboradores (1991). Já os géis relacionados a picos cromatográficos foram corados com nitrato de prata segundo protocolo de Blum e colaboradores (1987).

4.7.4 Zimograma

Para a análise da atividade xilanolítica *in gel*, as amostras foram tratadas conforme protocolo descrito por Sunna e colaboradores (1997). Para tal, foi

feito um gel de poliacrilamida 15% co-polimerizado com suspensão de xilana *Oat Spelts* para concentração final de 0,1% (m/v). Após a corrida, o gel foi lavado em solução de Triton X-100 2,5% por 60 minutos para retirada do SDS. Em seguida, o gel foi incubado em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 por cinco minutos em banho-maria a 90°C e, posteriormente, deixado a 4°C por 16 horas. O gel foi, então, incubado por 20 minutos em solução de *Congo Red* 0,1% sob leve agitação e a seguir descorado com solução de NaCl 1 M até o aparecimento das bandas. Por fim, adicionou-se solução de ácido acético 0,5% (v/v) para finalizar a visualização das bandas.

4.7.5 Ensaio de N-deglicosilação enzimática

A fim de verificar a presença de N-glicosilações na enzima putificada, a mesma foi concentrada e precipitada com utilização do kit comercial *2D Clean-Up* (Amersham Biosciences Co.). Após este processo, adicionou-se às amostras tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5, β -mercaptoetanol 1%, Tergitol NP40 1% e SDS 0,2%. Em seguida, as amostras foram submetidas a 100°C por um período de 10 minutos. Finalizado o tempo, dividiu-se o volume de amostra em duas partes iguais, das quais se adicionou 3 U de PNGase F (N-oligossacarídeo glicopeptidase; EC 3.5.1.52) de *Elizabethkingia meningoseptica* em uma parte e a outra permaneceu sem a presença de PNGase F. Como controle, o mesmo tratamento descrito foi realizado com Ribonuclease B, uma proteína que apresenta N-glicosilações. As amostras foram, então, incubadas a 37°C por 18 horas e, em seguida, separadas em SDS-PAGE e reveladas com nitrato de prata, conforme descrito acima.

4.8 Análise de imagem

Após completa revelação dos *spots*, os géis foram digitalizados em *scanner* e as imagens utilizadas para análise computacional. Com o *software* ImageMaster™ 2D Platinum v. 5.0 (Amersham Biosciences), os *spots* foram delimitados e pôde-se contar o número total de *spots* e estimar a massa molecular e o *pI* de cada um.

4.9 Digestão tríptica dos *spots*

Os *spots* enumerados foram excisados do gel e submetidos a dois ciclos de lavagem com água seguida de solução de acetonitrila 50%. Em seguida, os *spots* provenientes de géis corados com nitrato de prata foram descorados utilizando-se uma solução de ferricianeto de potássio 15 mM e tiosulfato de sódio 50 mM e, por fim, lavados com água até que o gel ficasse transparente novamente. Para os *spots* de géis corados com *Coomassie* a etapa de descoloração com ferricianeto não é necessária. Os *spots* são, então, submetidos a mais três ciclos de lavagem com tampão NH_4HCO_3 10 mM seguida de solução de acetonitrila 100%, sendo que na última lavagem com acetonitrila os *spots* são macerados e, em seguida, secos em concentrador rotatório *SpeedVac* (Savant). Após isso, os *spots* foram reidratados em tampão de digestão (NH_4HCO_3 10 mM; CaCl_2 5 mM) gelado adicionado de tripsina 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Promega, Madison, WI, EUA) e incubados a 40°C por 16 – 18 horas.

4.10 Espectrometria de Massa (MS) e “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF) por MALDI-TOF

Para análise por espectrometria de massas (MS) os peptídeos resultantes da digestão tríptica de cada *spot* foram acidificados com a adição de 1 μL de TFA 0,1% (Ácido trifluoroacético) e aplicados sobre placa AnchorChip™ (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) de acordo com o método modificado de Zhang e colaboradores (2007). Em seguida, aplicou-se 0,5 μL de solução de mistura de matrizes contendo ácido 2,5-dihidroxibenzóico 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (DHB) diluído em acetonitrila 30% e TFA 0,1%; e ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (CHCA) diluído em acetonitrila 50% e TFA 0,1%. Após completa secagem da placa, a mesma foi levada ao espectrômetro de massa Autoflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics). Antes da obtenção dos espectros das amostras, realizou-se uma calibração do aparelho utilizando-se uma mistura de peptídeos de massas conhecidas (Peptide calibration standard, Bruker Daltonics) plaqueada com a mesma mistura de matrizes (DHB e CHCA).

Para cada amostra foram gerados espectros de massas em modo refletor positivo com o auxílio do programa FlexControl v. 2.4 (Bruker

Daltonics). Em seguida, os espectros foram editados e analisados no programa FlexAnalysis v. 2.4 (Bruker Daltonics), preservando-se o espectro original em outro computador de forma que, caso seja necessário, o espectro possa ser recuperado. Para cada espectro foram geradas listas de picos contendo as massas monoisotópicas de cada um dos peptídeos trípticos observados. Essas listas foram usadas para buscar massas semelhantes contra o banco de dados de seqüência de proteínas de fungos online do NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, EUA) utilizando-se o programa BioTools v. 3.0 (Bruker Daltonics) acoplado ao programa Mascot (<<http://www.matrixscience.com/>>) (Perkins *et al.*, 1999). Como parâmetros de busca foram utilizados propionamidação da cisteína (alquilação com acrilamida) como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. Estabeleceu-se como zero ou, no máximo, um os sítios de clivagem perdidos pela tripsina. Não foram impostas restrições de massa. Consideraram-se significativas as identificações que apresentaram *score* acima do limiar calculado pelo Mascot considerando-se valor de $p < 0,05$.

4.11 Espectrometria de massas *in tandem* (MS/MS) por MALDI-TOF/TOF

A fim de confirmar a identificação por PMF ou tentar uma identificação dos *spots* que não apresentaram *score* significativo, picos parentais (relativos ao espectro de PMF) foram selecionados e fragmentados (MS/MS). O procedimento foi realizado no espectrômetro de massas Autoflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics) a partir da mesma amostra plaqueada para o PMF. Para a fragmentação aumentou-se o ganho do detector e a potência do laser. Assim como no PMF, os espectros obtidos foram tratados no programa FlexAnalysis v. 2.4 (Bruker Daltonics) e utilizados para buscar contra o banco de dados de seqüências de proteínas de fungos do NCBI utilizando-se o programa BioTools v. 3.0 (Bruker Daltonics) acoplado ao programa Mascot (<<http://www.matrixscience.com/>>) (Perkins *et al.*, 1999). Utilizaram-se os mesmos parâmetros de busca que no PMF acrescentando-se tolerância de erro de massa de 0,5 Da para fragmentos de peptídeos.

4.12 Derivatização dos peptídeos trípticos por SPITC

Amostras que não puderam ser identificadas através dos espectros de MS (PMF) e MS/MS foram submetidas à marcação com 4-sulfofenil-isotiocianato (SPITC). Tal marcação introduz um grupo ácido sulfônico às extremidades N-terminal dos peptídeos trípticos que provê uma carga positiva móvel, que pode migrar para a cadeia principal do peptídeo e promover clivagens induzidas por carga nas ligações do tipo amida (ligação peptídica). Tal método promove, portanto, um aumento da proporção de íons da série *y* gerados na fragmentação, facilitando o sequenciamento *de novo* dos peptídeos em questão. Para tanto, uma solução de SPITC 10 µg/µL foi preparada em tampão NaHCO₃ 50 mM (pH 8,6) e misturada com os peptídeos resultantes da digestão com tripsina descrita acima em uma proporção de 1:1. A seguir a mistura foi incubada a 55°C por 30 minutos e, por fim, terminada com a adição de 1 µL de TFA 5%. A amostra foi, então, dessalinizada e concentrada em coluna com resina Poros R2 preparada no próprio laboratório em ponteira *gel loader*. A amostra foi eluída com solução de mistura de matrizes (DHB + CHCA), aplicada sobre placa AnchorChip™ (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e levada ao espectrômetro de massas Autoflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics) para obtenção de espectros do tipo MS/MS. O sequenciamento *de novo* foi feito manualmente através da comparação entre as massas dos picos mais intensos do espectro a partir da massa correspondente ao pico parental.

4.13 Análise do secretoma de *A. niger* por LC-MS/MS

Análise em solução – O secretoma de *A. niger* foi concentrado e ressuspendido em tampão de digestão em solução (HEPES 200 mM pH 8,3; Uréia 510 mM ; Tiouréia 120 mM). A amostra foi reduzida por 1 hora a 56°C com a adição de DTT 10 mM e em seguida alquilada por 1h a temperatura ambiente com a adição de iodocetamida 20 mM. Posteriormente, a amostra foi digerida com tripsina modificada (Promega, Madison, WI, EUA) em concentração de 50 ng/µL acrescida de acetonitrila 10% por 15 horas a 40°C.

Análise in gel – O secretoma de *A. niger* foi separado em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% e submetido à coloração com *Coomassie Brilliant Blue G-250* coloidal. O perfil eletroforético observado foi, então, dividido

em 6 frações menores, as quais foram submetidas ao processo de digestão separadamente. As frações foram reduzidas por 1 hora a 56°C com a adição de DTT 10 mM em tampão NH_4HCO_3 10 mM e em seguida alquiladas por 1 hora a temperatura ambiente em iodoacetamida 55 mM em tampão NH_4HCO_3 10 mM. Após esse processo, as frações foram submetidas a três ciclos de lavagens em tampão NH_4HCO_3 10 mM e em acetonitrila 100%. Posteriormente, os *spots* foram reidratados em tampão de digestão (NH_4HCO_3 10 mM; CaCl_2 5 mM; 10% acetonitrila) gelado adicionado de tripsina 0,12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Promega, Madison, WI, EUA) e incubados a 40°C por 16 – 18 horas.

Os peptídeos resultantes das duas abordagens de digestão foram, então, concentrados e dessalinizados *off-line* em uma coluna de fase reversa (C18) usando dois passos de eluição com acetonitrila 80% acrescida de TFA 0,1%. Ao final os peptídeos foram re-dissolvidos em 10 μL de TFA 0,1%, dos quais 4 μL foram aplicados no sistema nanoLC-Ultra system (Eksigent), equipado com uma coluna do tipo *trap* (150 μm x 200 mm) empacotada no laboratório com partículas C18 Reprosil de 3 μm (Dr. Maisch) trabalhando a um fluxo de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$. Em seguida, os peptídeos foram eluídos em uma nanocoluna (15 cm x 50 μm) empacotada com partículas C18 Reprosil de 3 μm (Dr. Maisch). O gradiente para análise direta em solução foi: 5-20% de solvente B em 73 min, 20-50% de solvente B em 71 min, 50-100% de solvente B em 5 min, 100% de solvente B por 10 min e de volta a 5% de solvente B em 10 min. O solvente A foi ACN 5% contendo ácido fórmico 0,1% e o solvente B foi ACN 80% contendo ácido fórmico 0,1 %. A interface entre nanoLC e o espectrômetro de massas híbrido LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) foi feita através do controle automático do equipamento. Os espectros de MS/MS foram adquiridos em modo *Data Dependent Acquisition* (DDA) sobre o controle do *software* Xcalibur 2.0 (Thermo Fisher Scientific). O ciclo de DDA consistiu em um *survey scan* compreendendo a faixa de *m/z* 300-1600 realizada sob resolução de 60.000 FWHM (*Full Width at Half-Maximum*) e com valor alvo de $1\text{E}06$ íons. O *survey scan* foi seguido por fragmentação MS/MS dos dez íons precursores com cargas múltiplas mais abundantes de cada tempo. Os espectros foram adquiridos sob energia de colisão de 35% e valor alvo de íons igual a $1\text{E}04$ no *ion trap* linear (limiar de seleção de íons de 400 contagens). Foram aplicados parâmetro de ativação $q = 0,25$ e tempo de

ativação de 30 ms. Íons precursores anteriormente fragmentados foram excluídos de forma dinâmica por 90 s.

Os dados brutos (arquivos .raw) foram submetidos à busca contra o banco de dados de Ascomycota (174346 seqüências; NCBI). Como parâmetros de busca foram utilizados carbamidometilação da cisteína (proveniente da alquilação com Iodoacetamida) como modificação fixa; oxidação da metionina, acetilação da porção N-terminal do peptídeo e fosforilação de serina, treonina como modificações variáveis; máximo de um sítio de clivagem perdido pela tripsina; equipamento do tipo ESI-MS (Orbitrap); e tolerância de erro de massa dos íons precursores e dos fragmentos como 10 ppm e 0,6 Da, respectivamente. Para o arquivo relativo à digestão em solução usou-se o programa Mascot (<<http://www.matrixscience.com/>>) para realização das buscas. As identificações foram consideradas positivas quando o *score* total foi acima de 60 considerando peptídeos com *scores* individuais acima de 20. Para os arquivos relativos à digestão *in gel* usou-se o programa SEQUEST para realização das buscas. As identificações foram consideradas positivas se o *score* total foi acima de 2.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização enzimática do Extrato Bruto

Estudos de caracterização enzimática avaliativos de parâmetros como temperatura e pH ótimos de atuação enzimática são essenciais quando se pretende estudar a aplicação industrial de um coquetel enzimático ou de uma amostra contendo enzimas purificadas, pois determinam as condições ideais de uso da enzima maximizando a produção e reduzindo custos.

No presente trabalho foram realizados ensaios para diversas atividades enzimáticas presentes no secretoma de *A. niger* crescido em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono. Pode-se notar que de um modo geral a atividade xilanólítica foi a que mostrou valores mais altos enquanto a atividade mananolítica foi a mais baixa dentre as enzimas testadas (Tabela 2). Assim atividades de xilanases, celulases (CMCases), pectinases e mananases, foram analisadas em diferentes condições de temperatura e pH.

Tabela 2. Avaliação inicial da atividade de xilanases, CMCases, mananases e pectinases presentes no extrato bruto de *A. niger*.

	Atividade específica (UI.mg ⁻¹)	Desvio Padrão
Xilanases	0,6330	0,0639
CMCases	0,1324	0,0466
Mananases	0,0301	0,0087
Pectinases	0,1993	0,0475

A figura 10 mostra o efeito da temperatura de ensaio sobre a atividade das xilanases, celulases (CMCases), pectinases e mananases presentes no secretoma de *A. niger*. A temperatura ótima para atuação das xilanases foi determinada como 45°C, sendo que ao chegar a 60°C a atividade enzimática caiu em até 50% em relação à atividade a 45°C. Para pectinases e CMCases a temperatura ideal foi 50°C. A atividade de mananases foi inferior às outras avaliadas, sendo melhor a 60°C. Provavelmente, o que se observa é uma perda de atividade relacionada à desnaturação térmica da enzima.

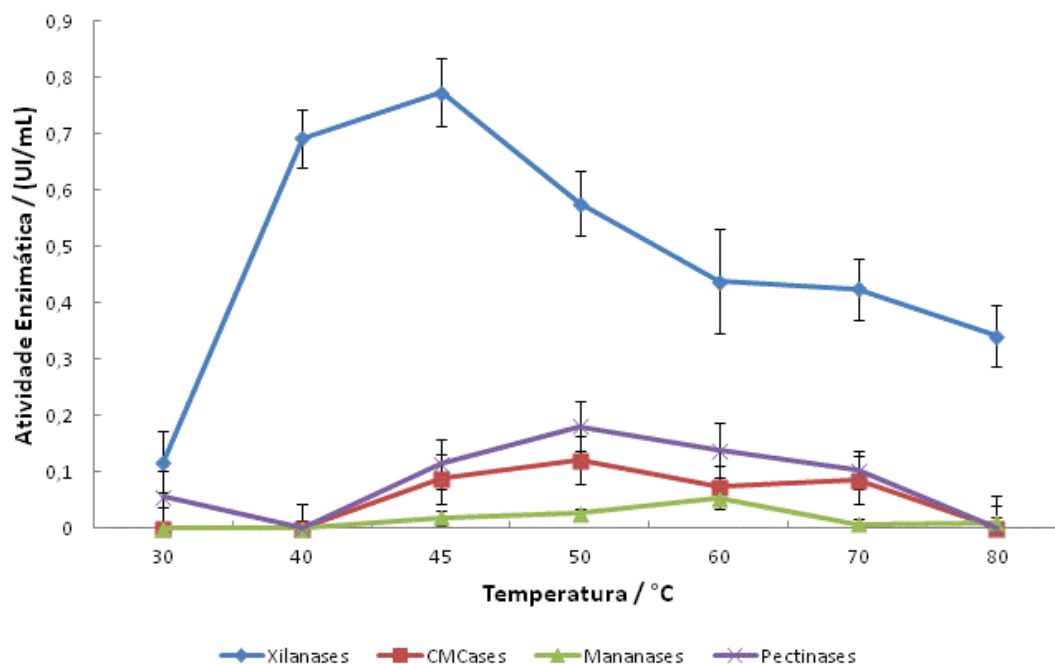


Figura 10. Efeito da temperatura na atividade de xilanases, CMCases, mananases e pectinases presentes no extrato bruto de *A. niger*.

Os ensaios de determinação do efeito do pH na atividade enzimática confirmaram a atividade xilanolítica como sendo a mais expressiva do secretoma de *A. niger* quando crescido nas condições descritas anteriormente (Figura 11). As xilanases em questão apresentaram ampla atuação em pHs da faixa ácida e se mantiveram estáveis até uma faixa de pH neutro. As CMCases, tal como as xilanases, obtiveram atuação preferencial em pHs ácidos apresentando um decréscimo de sua atividade conforme o aumento da alcalinidade do meio. As pectinases e mananases, por sua vez, foram mais resistentes a diferente pHs, mantendo uma atividade relativamente constante. Em pH alcalino as mananases não apresentaram atividade alguma. É possível que a perda de atividade em pHs alcalinos esteja relacionada a mudanças na distribuição de cargas da superfície da enzima, o que provavelmente afetou sua conformação tridimensional e conseqüentemente sua atividade enzimática. Uma hipótese seria pensar na alteração da distribuição de cargas e conseqüente rearranjo das moléculas de solvente presentes no sítio ativo das

enzimas em questão, o que poderia promover uma desestruturação do mecanismo de catálise comum às glicosidases.

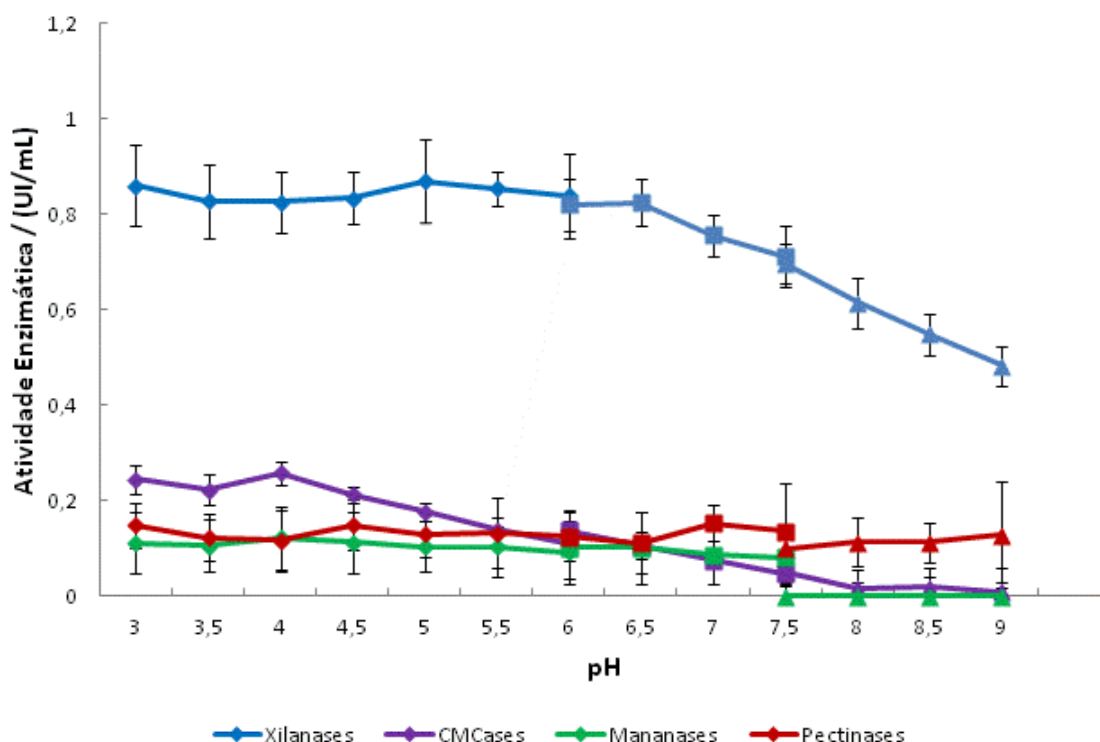


Figura 11. Efeito do pH na atividade de xilanases, CMCases, mananases e pectinases presentes no extrato bruto de *A.niger*. Para esse experimento foram utilizados três tampões diferentes: Tampão Acetato de sódio 50 mM (3,0 – 6,0), Tampão Fosfato de sódio 50 mM (6,0- 7,5) e Tampão Tris-HCl 50 mM (7,5 – 9,0).

Estudos anteriores demonstraram que xilanases podem apresentar maior termoestabilidade e maior atividade hidrolítica quando incubadas por certo tempo na presença de L-cisteína (Teixeira *et al*, 2010). Visando observar o efeito da presença ou ausência deste aminoácido na atividade enzimática do extrato bruto, foram feitas incubações em duas temperaturas (28°C e 50°C) na presença e na ausência do aminoácido por 20 minutos previamente ao ensaio enzimático (Figura 12).

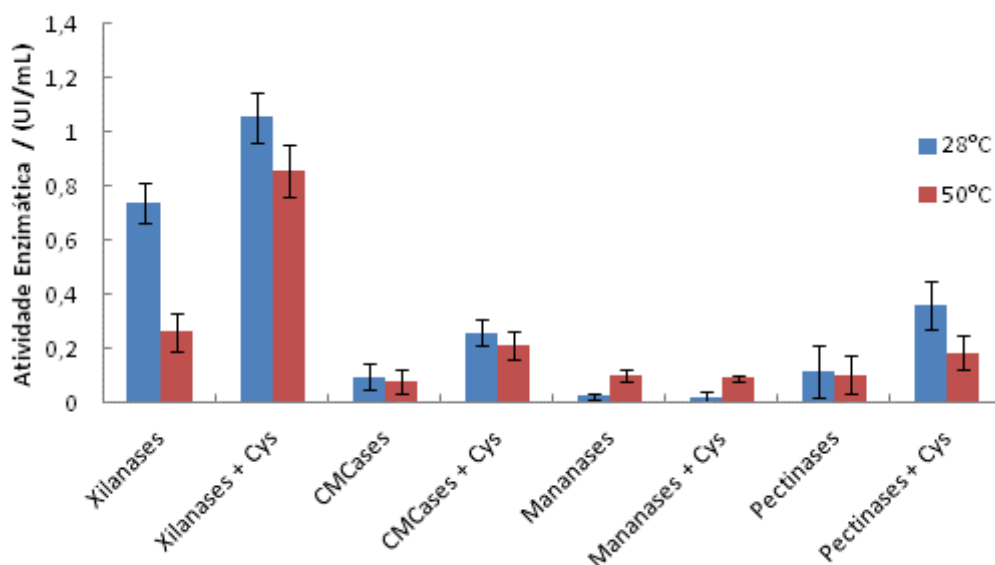


Figura 12. Efeito da cisteína na atividade enzimática de xilanases, CMCases, mananases e pectinases presentes no extrato bruto de *A. niger*. A concentração de cisteína na solução enzimática foi de 20 mM e o controle foi feito incubando-se o extrato bruto na ausência de cisteína.

Observou-se que em todas as condições avaliadas as xilanases, CMCases, e pectinases apresentaram um aumento de atividade quando incubadas com cisteína. As mananases, entretanto, aparentaram não serem afetadas pela presença de cisteína. Segundo Teixeira e colaboradores (2010), a presença de cisteína promove a conservação de um ambiente redutor, evitando que resíduos de cisteína presentes no sítio ativo da enzima formem pontes dissulfeto em uma tentativa de estabilização da enzima em um ambiente de temperatura elevada. Assim, a estrutura terciária é conservada e, conseqüentemente, a atividade enzimática do extrato. A partir desses resultados prévios, espera-se realizar experimentos de termoestabilidade visando verificar se a presença de cisteína pode prolongar a meia-vida das enzimas em questão.

Em um estudo anterior em nosso grupo de pesquisa (Milanezi, 2010), a atividade de uma fração purificada de xilanases (*Xyl*) foi avaliada quanto ao efeito da adição de cisteína 10 mM. Ao contrário do encontrado neste trabalho, a fração *Xyl* foi fortemente inibida pela presença de cisteína, indicando que o

aumento de atividade xilanolítica observado pode estar relacionado a xilanases diferentes das que compõem *Xyl* e que estão presentes no extrato bruto analisado.

5.2 Purificação de xilanases

O extrato bruto foi concentrado 10 vezes através de ultrafiltração utilizando uma membrana com *cut-off* de 10 kDa. As frações resultantes, o concentrado (PM10) e o ultrafiltrado (UFPM10), foram analisadas quanto à presença de atividades hemicelulolíticas (xilanases e mananases), celulolítica (CMCase) e pectinolítica (Figura 13). É interessante notar que a única atividade não detectada no ultrafiltrado foi a de mananase, indicando que estas enzimas não atravessaram a membrana de ultrafiltração. Por outro lado detectou-se a presença de uma expressiva atividade xilanolítica na fração UFPM10, o que motivou a tentativa de purificação de tais enzimas.

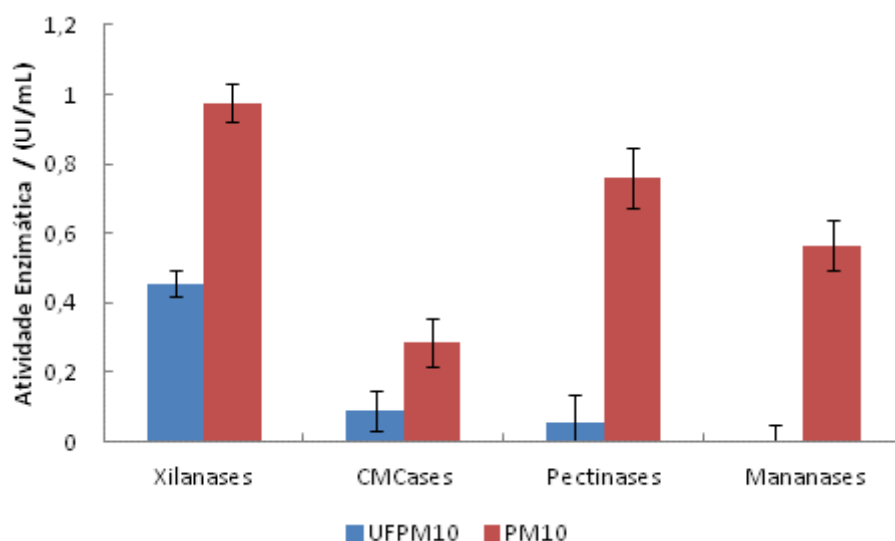


Figura 13. Atividade enzimática das frações resultantes da ultrafiltração.

Uma vez concentrada por precipitação com sulfato de amônio, a fração UFPM10 foi aplicada em coluna de exclusão molecular do tipo Sephadex G-50, previamente calibrada (Figura 14), utilizando o sistema ÄKTApurifier. O perfil cromatográfico obtido para UFPM10 foi reproduzível e pode ser observado abaixo, na figura 15.

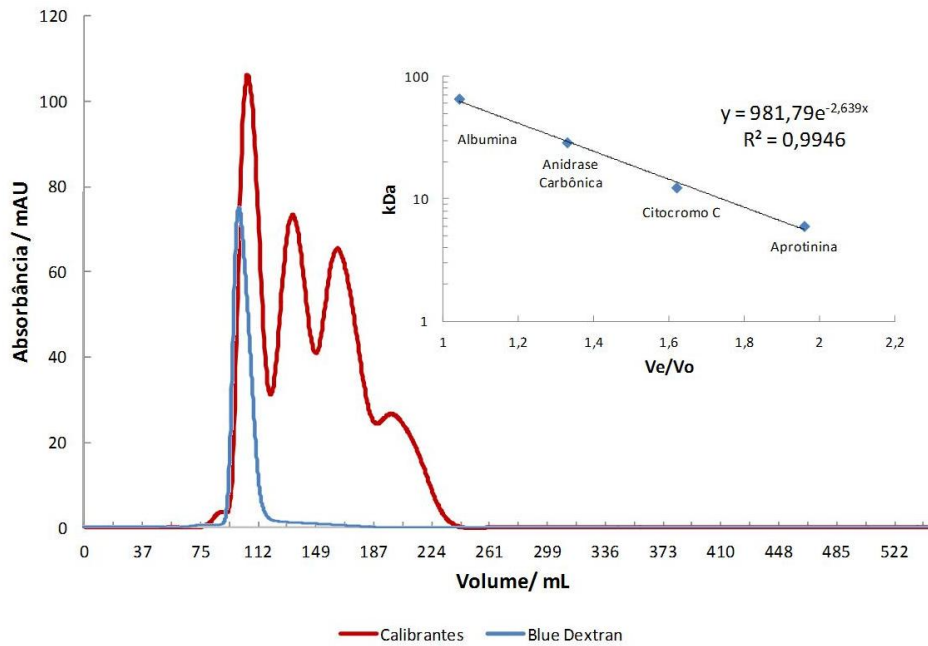


Figura 14. Perfil cromatográfico referente à calibração da coluna de exclusão molecular Sephadex G-50 (51,8 cm de comprimento x 2,6 cm de diâmetro) e a curva de calibração obtida. A eluição foi isocrática em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 25 mM a um fluxo constante de 1 mL/min e por dois volumes de coluna.

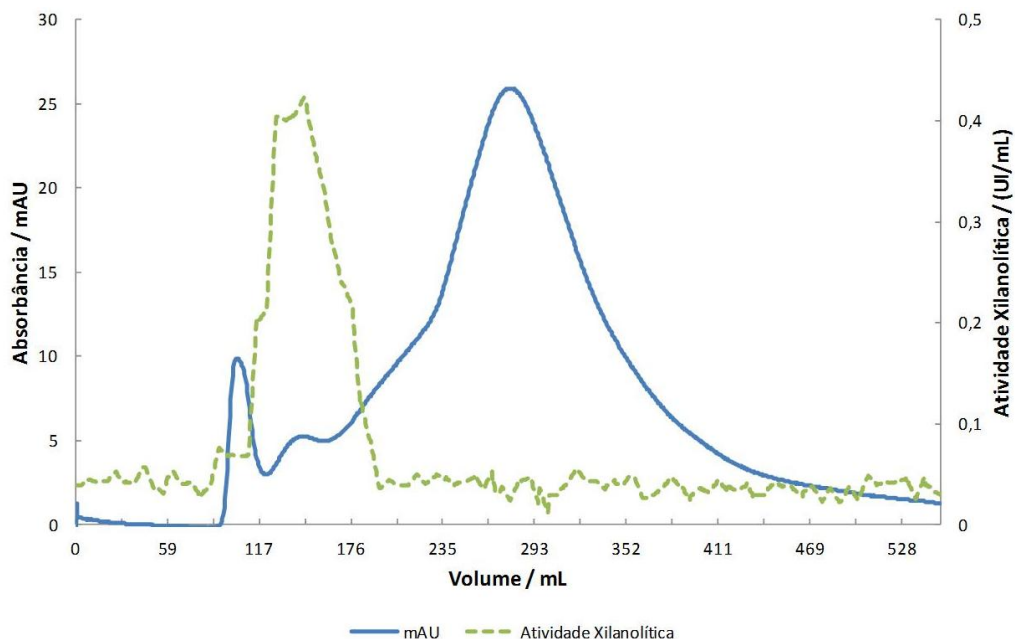


Figura 15. Perfil cromatográfico de UFPM10 em Sephadex G-50 (51,8 cm de comprimento x 2,6 cm de diâmetro). A eluição foi isocrática em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 25 mM a um fluxo constante de 1 mL/min e por dois volumes de coluna. A linha contínua representa a leitura de absorbância feita a 280 nm e a linha pontilhada representa a atividade xilanolítica.

Considerando-se o volume de eluição do pico que apresentou atividade xilanolítica e a curva de calibração obtida com o uso de marcadores moleculares de massas conhecidas, estimou-se que a atividade xilanolítica estava relacionada a uma enzima de 20,14 kDa.

As frações correspondentes ao pico de atividade xilanolítica representado no cromatograma da figura 15 foram unidas e a fração resultante foi denominada *Xyl*. As amostras relativas às etapas de purificação foram, então, submetidas à análise eletroforética por SDS-PAGE para verificação de seu grau de pureza (Figura 16).

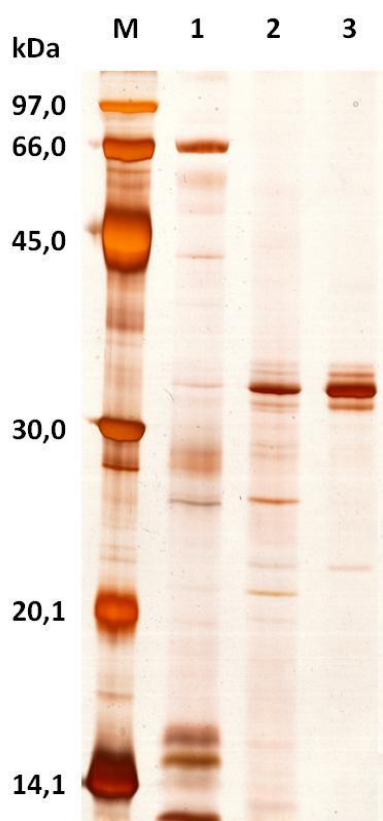


Figura 16. Análise eletroforética das amostras relativas às etapas de purificação. M: Marcador molecular; Linha 1: Ultrafiltrado; Linha 2: Ultrafiltrado precipitado por sulfato de amônio; Linha 3: Fração purificada em Sephadex G-50 (*Xyl*).

A análise em SDS-PAGE revelou um ultrafiltrado com abundância em bandas superiores a 10 kDa, valor máximo esperado para as proteínas

componentes do ultrafiltrado (Figura 16, linha 1). Tal fenômeno já havia sido relatado previamente (Filho *et al*, 1993) e reflete a característica de certas proteínas de alterar sua conformação possibilitando a travessia por poros menores que seu “volume molecular”. No caso das glicosidases esta seria uma propriedade extremamente vantajosa, no sentido que possibilitaria a infiltração e conseqüente maior acesso das enzimas às fibras internas da madeira, permitindo assim uma hidrólise mais intensificada da biomassa lignocelulósica.

Em relação ao pico de atividade xilanolítica encontrado, a análise por SDS-PAGE mostrou a presença de mais de uma banda na composição do pico (Figura 16, linha 3). A banda principal revelou uma massa de aproximadamente 35 kDa, contradizendo assim os cálculos de acordo com a calibração da coluna (Figura 14) que previam uma enzima com massa em torno de 20 kDa. A hipótese para explicar tal comportamento da enzima seria a mesma apresentada acima: enzimas com a capacidade de se infiltrar por poros com “volume molecular” menor do que o seu próprio. Entretanto, deve-se levar em consideração que proteínas podem apresentar comportamento anômalo para determinação de massa molecular tanto por cromatografia de exclusão molecular quanto por SDS-PAGE. A exclusão molecular só é linear para proteínas de formato globular, esférico. Há também a possibilidade de uma interação inespecífica das enzimas em questão com a resina da coluna, o que atrasaria o processo de eluição. Já no SDS-PAGE uma glicosilação pode fazer com que a proteína pareça ter uma massa maior do que a real.

Devido à heterogeneidade dos componentes de *Xyl*, decidiu-se por investigar melhor a composição da fração *Xyl* através de análise eletroforética bidimensional (Figura 17).

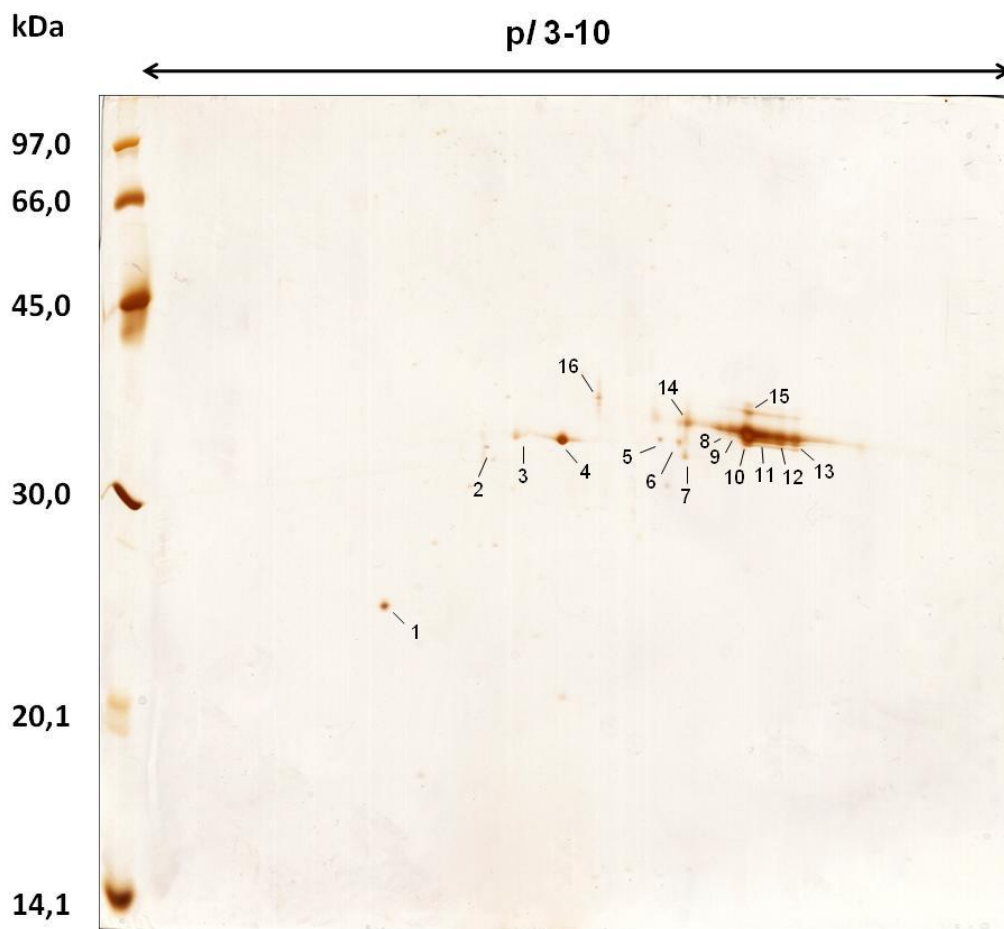


Figura 17. Perfil bidimensional da fração *Xyl*. Os números representam o nome dado a cada *spot* encontrado.

O perfil bidimensional obtido permitiu visualizar a presença de diversos *spots* que não eram observados no SDS-PAGE, revelando uma complexidade da amostra antes não aparente. Em um estudo anterior realizado em nosso grupo de pesquisa (Milanezi, 2010) encontrou-se um perfil bidimensional muito similar ao aqui apresentado. Entretanto, o perfil mostrado acima apresenta com maior definição a diversidade dos componentes de *Xyl*. Na figura 17 vemos que a banda isolada (~25 kDa) do SDS-PAGE é composta por exclusivamente um *spot* enquanto as outras bandas (da faixa de 30 kDa) são distribuídas em diversos *spots*. Tal visualização foi possível devido às diferenças no ponto isoelétrico dos componentes da banda. A formação dos *spots* 8 a 13 é característica da presença de isoformas na amostra. Isoformas estas, que

provavelmente apresentem uma sequência primária idêntica, ou muito similar, com pequenas modificações pós-traducionais que as diferencie.

A análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF) por *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) revelou que os *spots* de 10-13 e o *spot* 15 representam isoformas da mesma proteína, confirmando a hipótese apresentada (dados não mostrados). A proteína identificada em todos os *spots* mencionados foi a Endo-1,4- β -xilânase (E.C. 3.2.1.8; nº de acesso do NCBI gi 3915310). As análises por fragmentação dos peptídeos obtidos (MS/MS) confirmaram a identidade da enzima, mas não foram capazes de distinguir diferenças na sequência das isoformas. O *spot* 15 representa a enzima com, possivelmente, alguma modificação pós-traducional que agregue massa à proteína, mas não altere sua distribuição de cargas, fazendo com que no perfil bidimensional apresentado o *spot* 15 apareça logo em cima (mesmo *pI*) do *spot* 10, que é a isoforma mais expressa nas condições de crescimento em que o fungo foi submetido. Uma possível modificação pós-traducional seria a presença de uma glicosilação na enzima, o que é provável em vista de estudos anteriores (Walsh *et al*, 2005) que já demonstraram a presença de grande quantidade de proteínas glicosiladas quando estas são destinadas para o meio extracelular.

Nos casos acima, a xilânase identificada através do banco de dados foi correspondente a uma xilânase de *A. aculeatus* e não de *A. niger*, apesar do último já possuir o genoma sequenciado. Por se tratar do uso de uma linhagem isolada na natureza, a presença de possíveis polimorfismos poderia ser utilizada para explicar a diferença entre a linhagem utilizada neste estudo e as linhagens comerciais que foram utilizadas para o sequenciamento do genoma, dificultando assim a identificação espécie específica.

Os *spots* não citados não obtiveram nenhuma identificação significativa, tanto por PMF quanto por MS/MS. Possíveis explicações seriam a má anotação das proteínas de *A. niger* no banco de dados, a quantidade de polimorfismos apresentada pela linhagem de *A. niger* utilizada no estudo, ou a baixa qualidade dos espectros devido a problemas intrínsecos da amostra em questão.

Em uma tentativa de separar os componentes de *Xyl*, procedeu-se com cromatografias de troca iônica. Devido ao fato de que a amostra é capaz de atravessar membranas com *cut-off* de 10 kDa, ela não pode ser dialisada para a retirada do sal e troca do tampão da cromatografia anterior. Deste modo, *Xyl* foi submetido a uma dessalinização cromatográfica contra o tampão da próxima cromatografia (Figura 18).

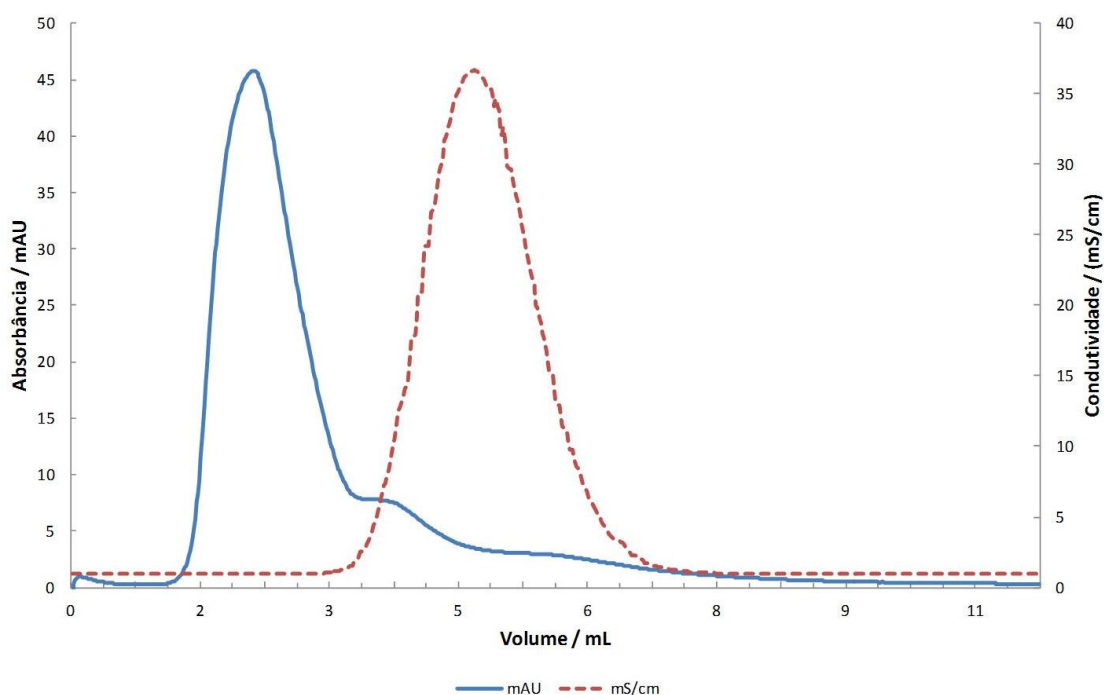


Figura 18. Perfil cromatográfico de *Xyl* em coluna de dessalinização (*HiTrap™ Desalting*). A eluição foi isocrática em tampão respectivo à próxima cromatografia a um fluxo constante de 5 mL/min. A linha contínua azul representa a leitura de absorbância feita a 280 nm e a linha pontilhada vermelha representa a condutividade do tampão.

Foram testadas duas colunas distintas com a amostra dessalinizada: troca catiônica (*HiTrap™ SP Sepharose Fast Flow*) em pH 5,0 e troca aniônica (*HiTrap™ Q Sepharose Fast Flow*) em pH 8,5. A cromatografia de troca catiônica não foi eficiente em separar os componentes de *Xyl*, pois nenhum deles foi capaz de interagir com a resina nas condições testadas. Deste modo todos os componentes foram eluídos juntos antes do início do gradiente (Figura 19).

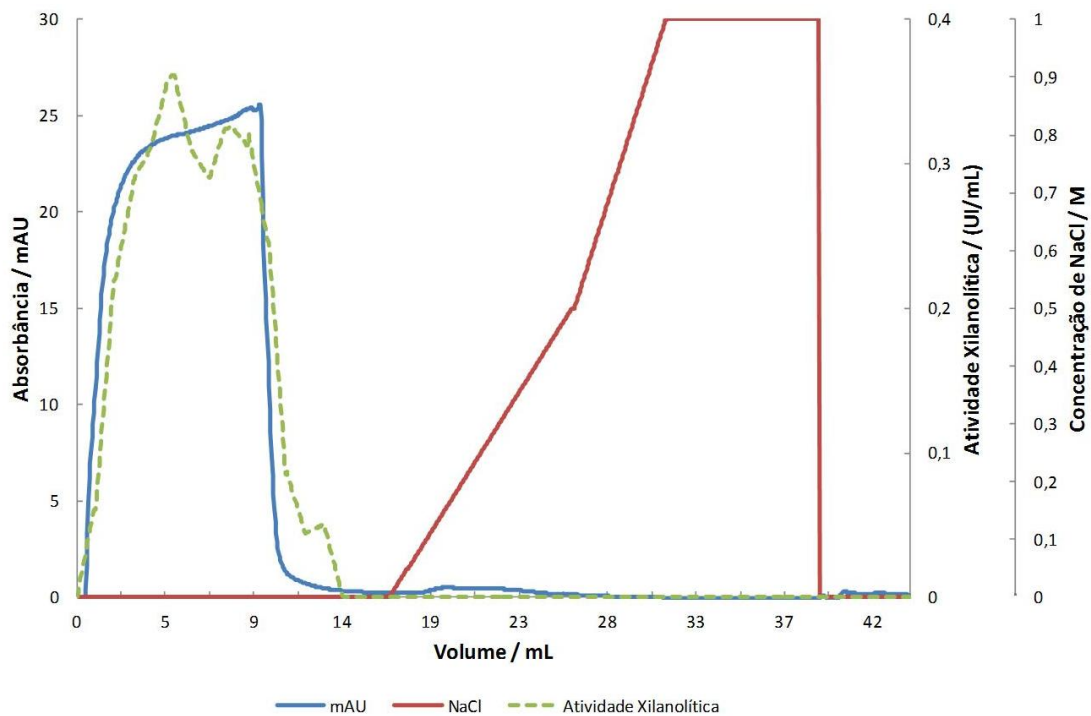


Figura 19. Perfil cromatográfico da fração *Xyl* em coluna de troca catiônica (*HiTrap™ SP Sepharose Fast Flow*). A eluição foi realizada em tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 com gradiente de 0 a 1 M de NaCl a um fluxo constante de 1 mL/min. A linha contínua azul representa a leitura de absorbância feita a 280 nm, a linha contínua vermelha representa o gradiente de NaCl e a linha pontilhada verde representa a atividade xilanólítica.

A cromatografia de troca aniônica, entretanto, foi mais eficiente na separação dos componentes de *Xyl* nas condições testadas. Detectou-se o isolamento de picos de atividade xilanólítica em pontos distintos do gradiente de separação utilizado (Figura 20).

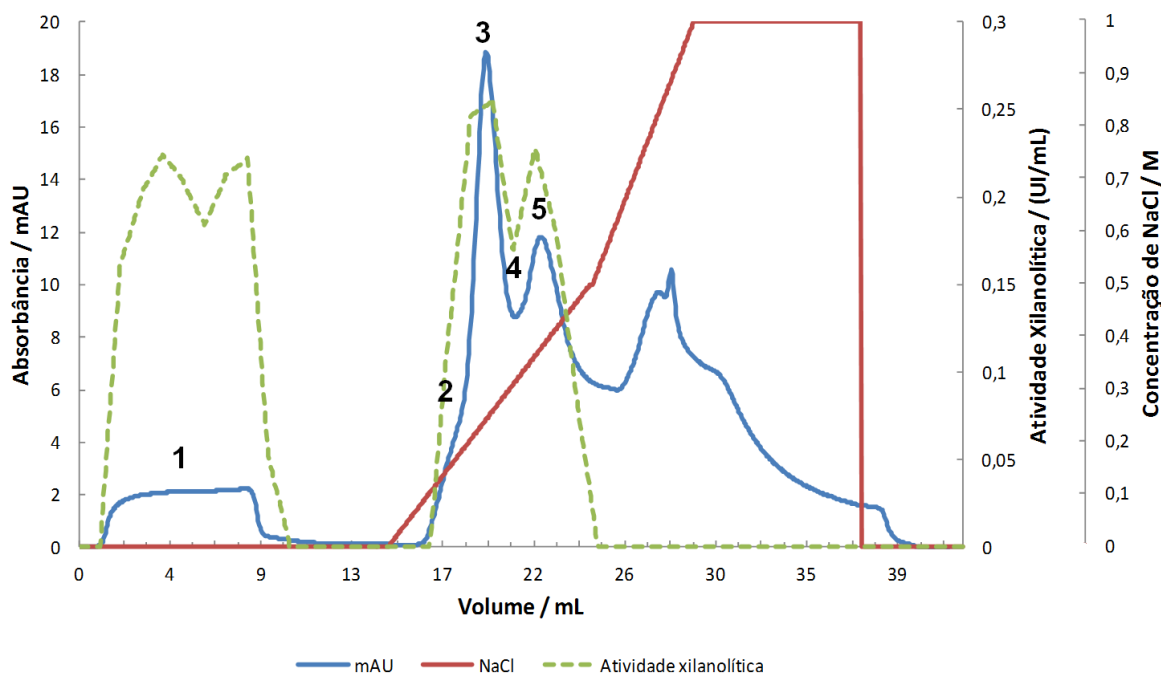


Figura 20. Perfil cromatográfico de *Xyl* em coluna de troca aniônica (*HiTrap™ Q Sepharose Fast Flow*). A eluição foi realizada em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,5 com gradiente de 0 a 1 M de NaCl a um fluxo constante de 1 mL/min. A linha contínua azul representa a leitura de absorbância feita a 280 nm, a linha contínua vermelha representa o gradiente de NaCl e a linha pontilhada verde representa a atividade xilanolítica.

A seguir, as frações obtidas com a separação cromatográfica na troca aniônica foram analisadas em SDS-PAGE para que suas composições fossem verificadas (Figura 21).

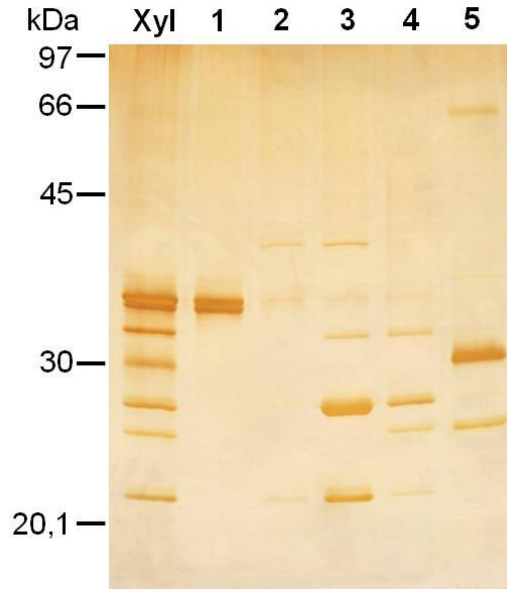


Figura 21. Análise eletroforética por SDS-PAGE das frações relativas à separação de *Xyl* na cromatografia de troca aniônica. Linha 1: Fração eluída antes do gradiente (QFF); Linhas 2 a 5: Frações eluídas ao longo do gradiente.

Observou-se que a fração que não foi retida pela coluna era a que possuía maior abundância da banda da xilanase em questão (Figura 21, linha 1). Tal fração foi denominada QFF, a qual foi utilizada para as análises posteriores. As frações 3 e 5 que também apresentaram atividade xilanolítica não apresentaram quantidade significativa ou nenhuma, respectivamente, da xilanase de 35 kDa em questão. É provável, portanto, que outras bandas componentes de *Xyl* além da banda de 35 kDa devam apresentar atividade xilanolítica. Em decorrência de tal hipótese e para visualização de atividade enzimática *in gel* das xilanases em cada uma das etapas de purificação, realizou-se um zimograma (Figura 22).

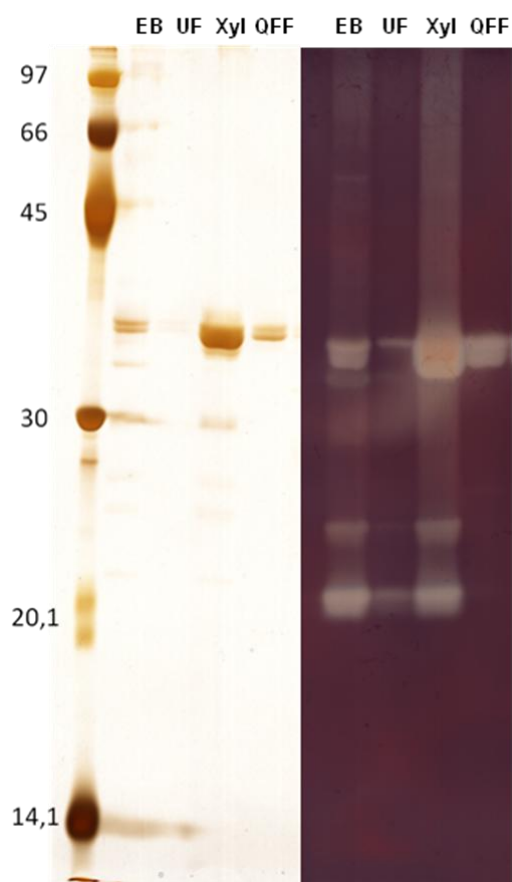


Figura 22. Análise da atividade xilanolítica *in gel* das frações correspondentes às etapas de purificação. EB: Extrato Bruto; UF: Ultrafiltrado; Xyl: Fração relativa à cromatografia de exclusão molecular; QFF: Fração relativa à cromatografia de troca aniônica.

O zimograma revelou um secretoma composto por xilanases de massas moleculares distintas. Dessas todas, diversas estavam representadas no ultrafiltrado e também em Xyl, demonstrando novamente a hipótese relacionada à capacidade de tais enzimas em atravessar por poros de “volume molecular” menor do que os seus. Na fração Xyl podemos observar que duas outras xilanases de massa menor do que 30 kDa estão presentes, comprovando assim a atividade enzimática obtida nas frações 3 e 5 da cromatografia de troca aniônica (Figuras 20 e 21). Já na fração QFF, detectou-se a presença exclusiva da xilanase de 35 kDa, revelando uma fração de atividade pura.

Assim como feito para *Xyl*, decidiu-se por investigar melhor a composição da fração QFF através de análise eletroforética bidimensional (Figura 23).

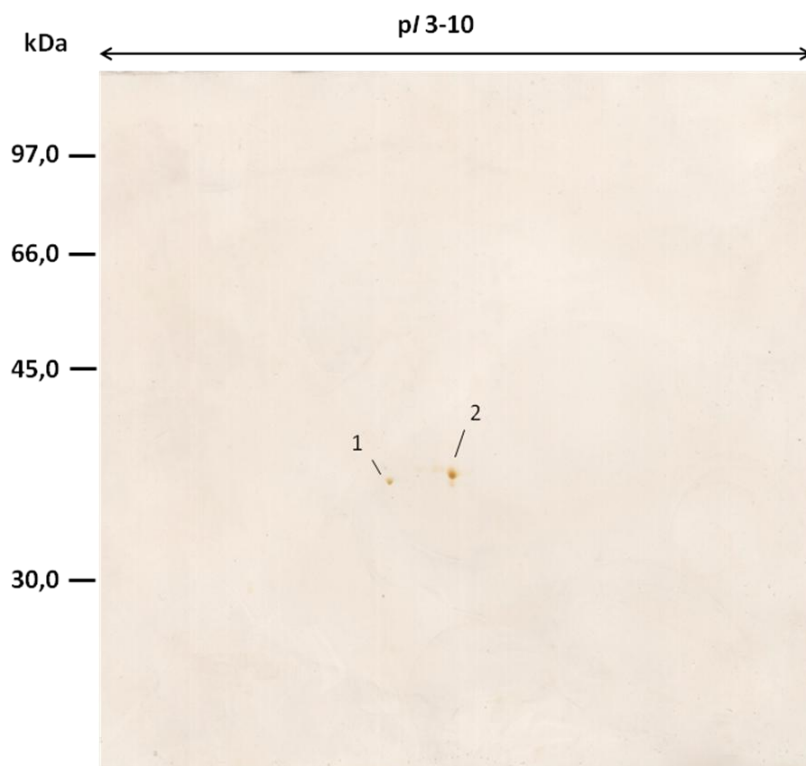


Figura 23. Perfil bidimensional da fração QFF. Os números representam o nome dado a cada *spot* encontrado.

O perfil bidimensional obtido permitiu visualizar a presença de apenas dois *spots*, revelando uma diminuição significativa da complexidade da amostra e um aumento da pureza da mesma em relação à etapa anterior de purificação. A análise por espectrometria de massas tanto por MS quanto por MS/MS mais uma vez confirmaram a identidade da enzima do *spot* 2 como sendo a Endo-1,4- β -xilanase (E.C. 3.2.1.8; nº de acesso do NCBI gi 317028138) (Figura 24). Desta vez, entretanto, a identificação obtida foi espécie específica. A análise dos espectros de MS/MS revelou que o peptídeo de massa 1844,8880 Da, utilizado na validação da identificação da xilanase de *A. niger*, é encontrado na xilanase de *A. aculeatus* com uma modificação de isoleucina para valina no segundo resíduo de aminoácido. Essa modificação promove uma redução de massa do peptídeo da xilanase de *A. aculeatus* em relação ao de *A. niger*, totalizando uma massa de 1830,8723 Da. Como o pico da série *y* relativo ao

peptídeo com a isoleucina é encontrado no espectro de MS/MS obtido, a identificação da xilanase como pertencente ao organismo *A. niger* é validada.

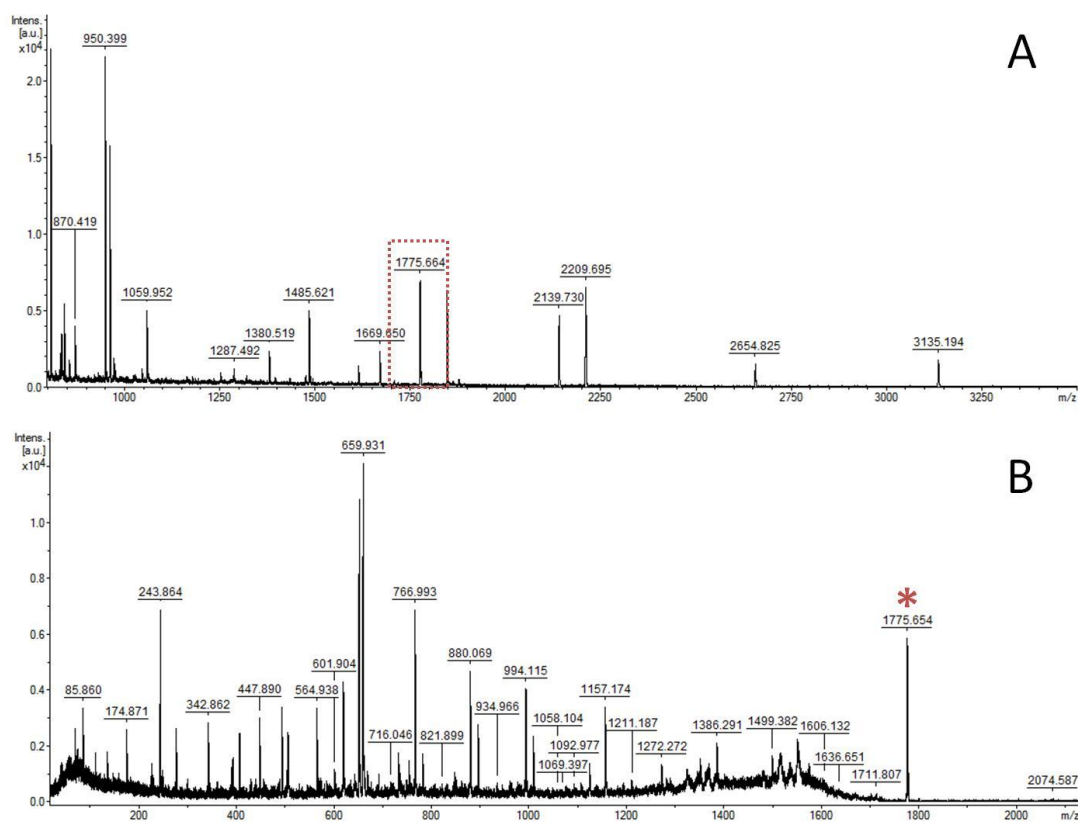


Figura 24. Espectros de massas relativos à identificação do *spot 2* como uma Endo-1,4- β -xilanase. (A) Espectro de PMF, (B) espectro de MS/MS. A área destacada e o asterisco representam o pico parental 1775,660, um dos utilizados para a fragmentação.

Em relação ao *spot 1*, tanto a análise por espectrometria de massas por MS quanto por MS/MS não foram capazes de gerar uma identificação significativa (Figura 25). Partiu-se, então, para a tentativa de sequenciamento *de novo* dos peptídeos mais intensos observados no espectro de PMF respectivo através da marcação dos mesmos com SPITC (Figura 25c). Entretanto, o único pico qual foi possível obter um bom espectro de fragmentação com SPITC foi o 1308,720. Através da análise do espectro obtido e do sequenciamento manual chegou-se à sequência YYFTN(I/L)(I/L)FAR. A sequência do peptídeo foi, então, utilizada para busca no programa BLAST (<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>>) a fim de encontrar uma possível proteína de origem. Entretanto, nenhuma entrada que apresentasse tal sequência foi

encontrada, impossibilitando novamente a identificação da proteína relativa ao *spot* 1.

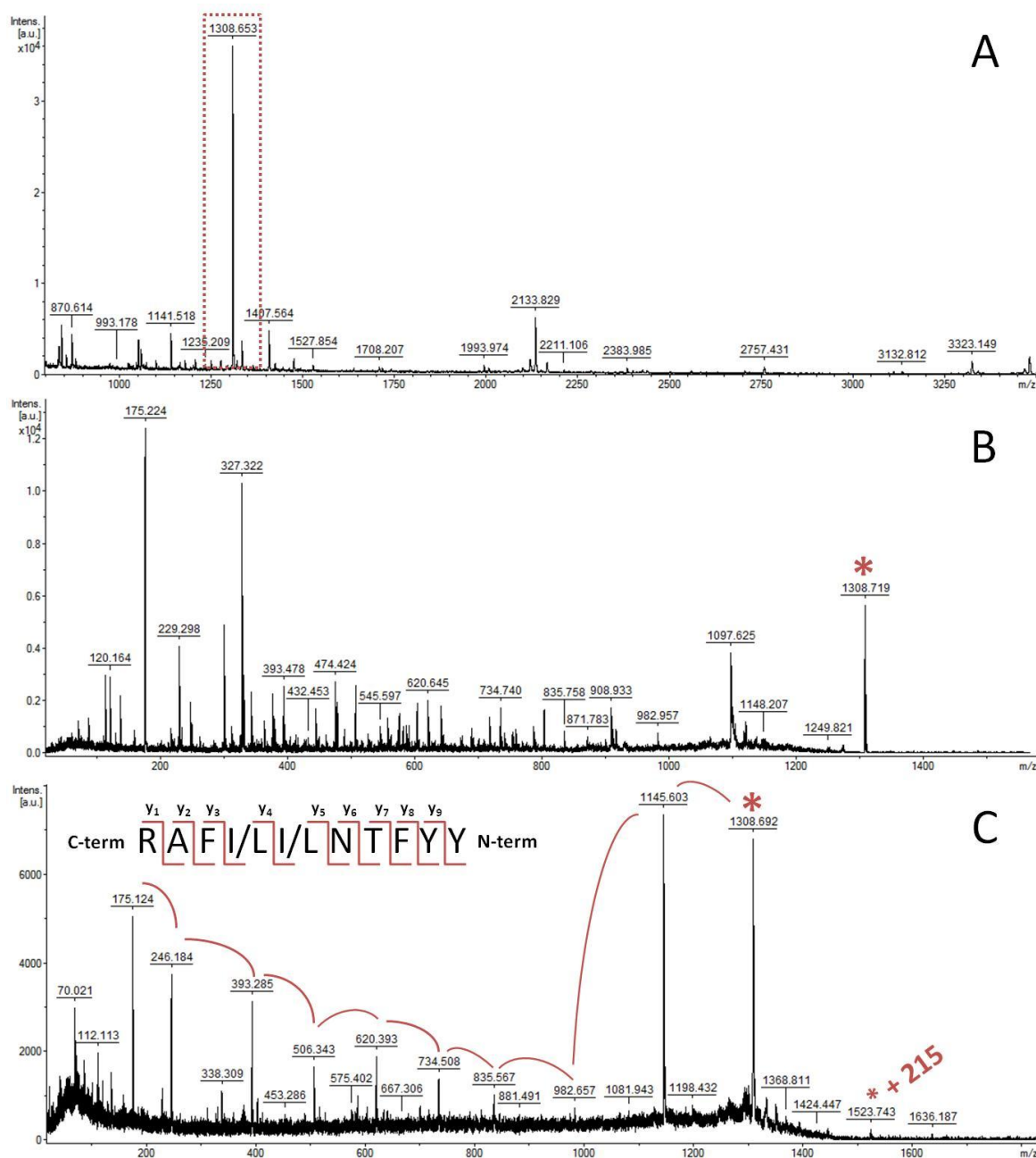


Figura 25. Espectros de massas relativos ao *spot* 1. (A) Espectro de PMF, (B) espectro de MS/MS. A área destacada e o asterisco representam o pico parental de 1308,720 Da, um dos utilizados para a fragmentação. Em (C) espectro de MS/MS relativo ao tratamento da amostra com SPITC. O asterisco mais 215 representa o pico fragmentado adicionado do grupo ácido sulfônico derivado do reagente SPITC. Em destaque a sequência obtida para o pico em questão.

A fração purificada QFF não apresentou atividade celulolítica, pectinolítica ou mananolítica, indicando a presença exclusiva de atividade xilanolítica. Essa característica se torna atrativa para a aplicação industrial da enzima em casos como o da indústria papelreira, onde o uso de xilanases necessita ser livre de atividade celulolítica, evitando assim a degradação das fibras de celulose e uma conseqüente redução da qualidade do papel. A fração QFF teve, ainda, especificidade por xilana solúvel, exibindo um K_m e uma $V_{máx}$ de 6,46 mg/mL e 1,984 UI.mL⁻¹, respectivamente. Estudos anteriores em nosso laboratório (Milanezi *et al*, 2011) avaliaram o K_m de *Xyl* e obtiveram um valor de 47,08 mg/mL, valor que é sete vezes superior ao encontrado para a fração QFF por este estudo.

A fim de verificar a presença de possíveis N-glicosilações na fração QFF, como previsto para *Xyl* em decorrência de seu perfil bidimensional, foi feito um ensaio de N-deglicosilação (Figura 26).

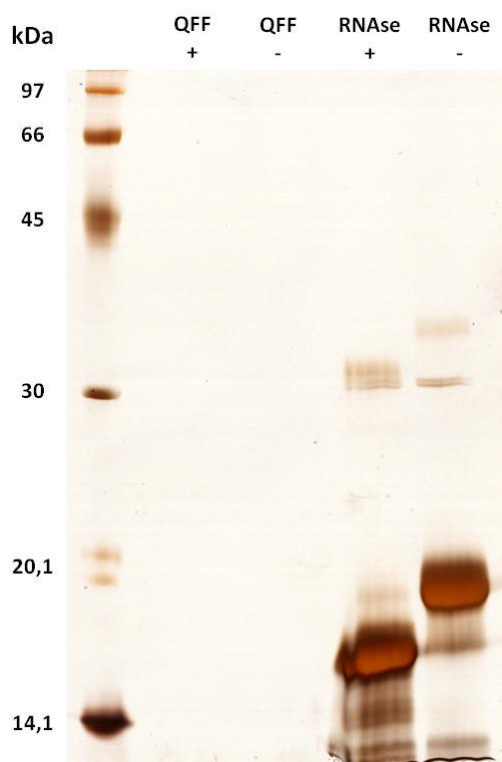


Figura 26. Análise em gel do ensaio de N-deglicosilação por PNGase F. As linhas com um “+” representam aquelas em que houve adição de PNGase F.

A análise por SDS-PAGE do ensaio de N-deglicosilação revelou um desaparecimento das bandas referentes à fração QFF. Entretanto, o controle com a ribonuclease B demonstra que o ensaio foi realizado com sucesso, excluindo a hipótese de o problema estar na separação eletroforética. Entende-se, portanto, que a fração QFF, por algum motivo, foi degradada durante o tratamento utilizado no ensaio, que consiste da adição de agentes desnaturantes e uma série de fervuras. Esperamos em um futuro próximo padronizar e testar novas condições de ensaio, como trabalhar com as estruturas nativas, para avaliar, então, a presença ou ausência de N-glicosilações nos componentes da fração QFF.

5.3 Análise do secretoma

A fim de obter uma visão ampla do secretoma de *A. niger* quando crescido em bagaço de cana, a amostra correspondente ao extrato bruto foi separada através de eletroforese bidimensional em *strips* de faixa ampla (pH de 3-10). Na figura 27 podemos visualizar a triplicata de géis obtidos.

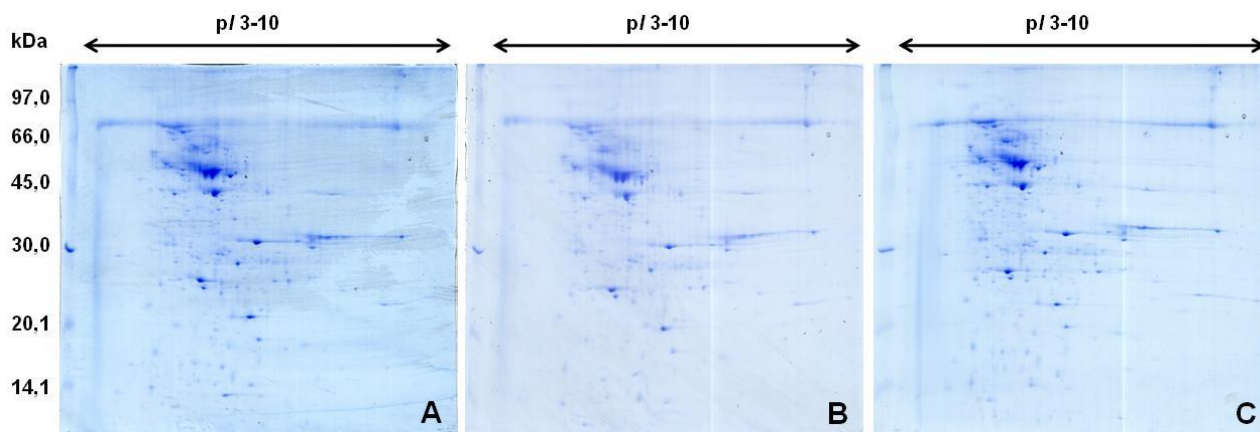


Figura 27. Triplicata dos mapas bidimensionais do secretoma de *A. niger* quando crescido em bagaço de cana como única fonte de carbono.

O perfil bidimensional revelou um secretoma diversificado. Foram contabilizados 448 *spots*, dos quais a maioria se concentra na porção ácida de focalização (Figura 28).

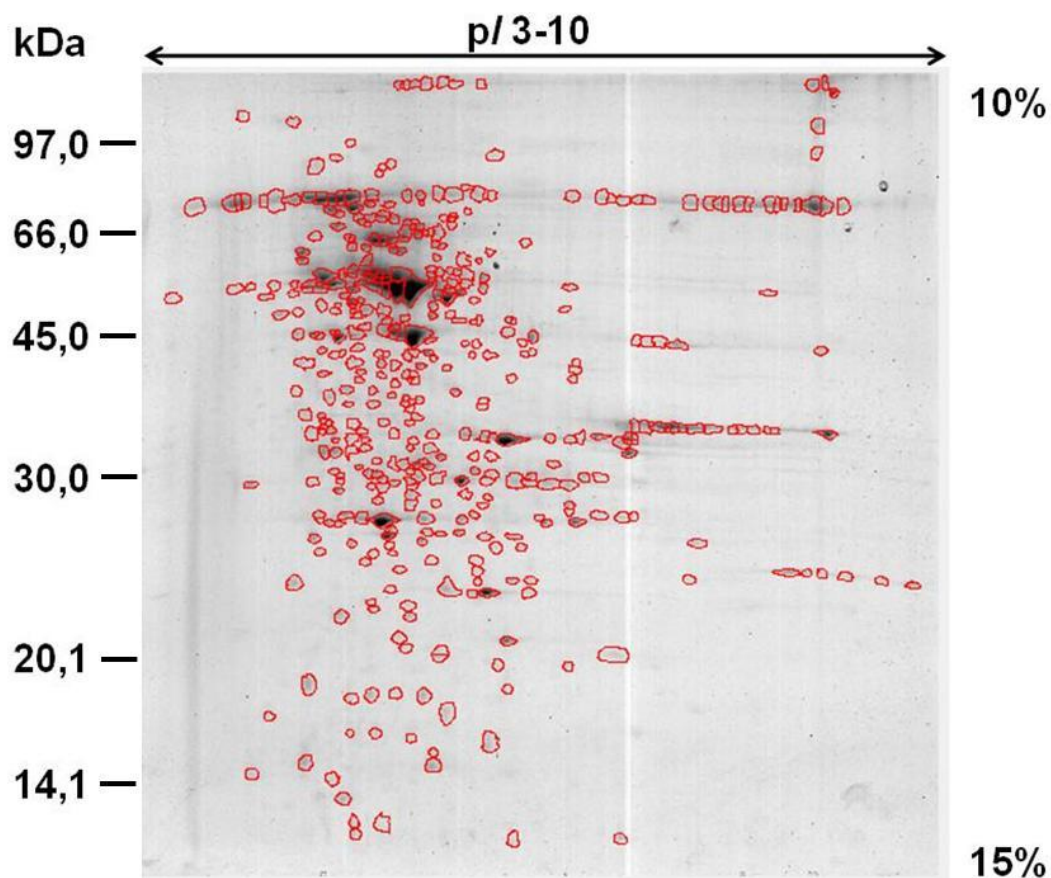


Figura 28. Contagem dos *spots* do secretoma de *A. niger*. A análise da imagem revelou 448 *spots*.

A fim de identificar as proteínas componentes do secretoma de *Aspergillus niger* crescido em bagaço de cana, o extrato bruto foi submetido à digestão em solução seguido de análise por espectrometria de massas. A análise do secretoma por LC-MS/MS, assim como a mostrada em gel, revelou uma amostra bastante diversa, como observado no cromatograma abaixo (Figura 29).

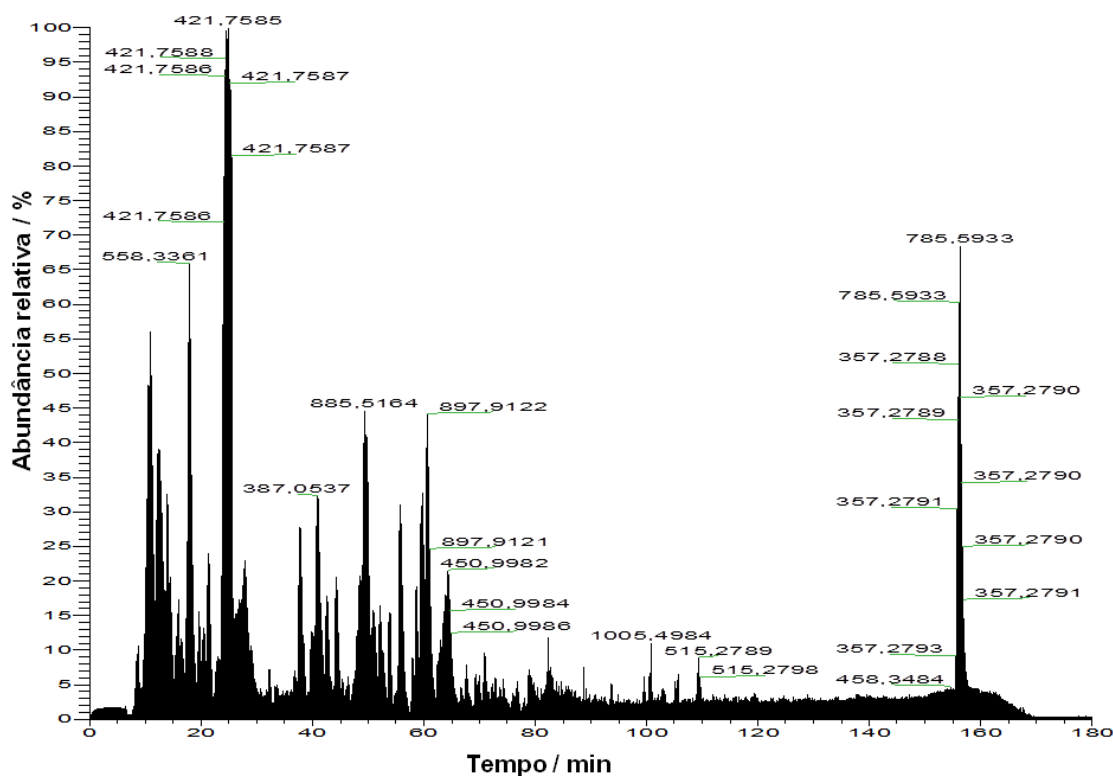


Figura 29. Perfil cromatográfico referente ao secretoma de *A. niger* digerido em solução obtido em coluna de fase reversa C18. As frações eluídas foram automaticamente injetadas e analisadas no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL.

Ao longo do processo de eluição dos peptídeos realizaram-se uma série de *survey scans*, gerando espectros de MS (Figura 30). O *survey scan* foi seguido por fragmentação MS/MS dos dez íons precursores com cargas múltiplas mais abundantes de cada tempo em modo *Data Dependent Acquisition* (DDA), possibilitando a obtenção de sequências que foram utilizadas para a busca contra o banco de dados do NCBI.

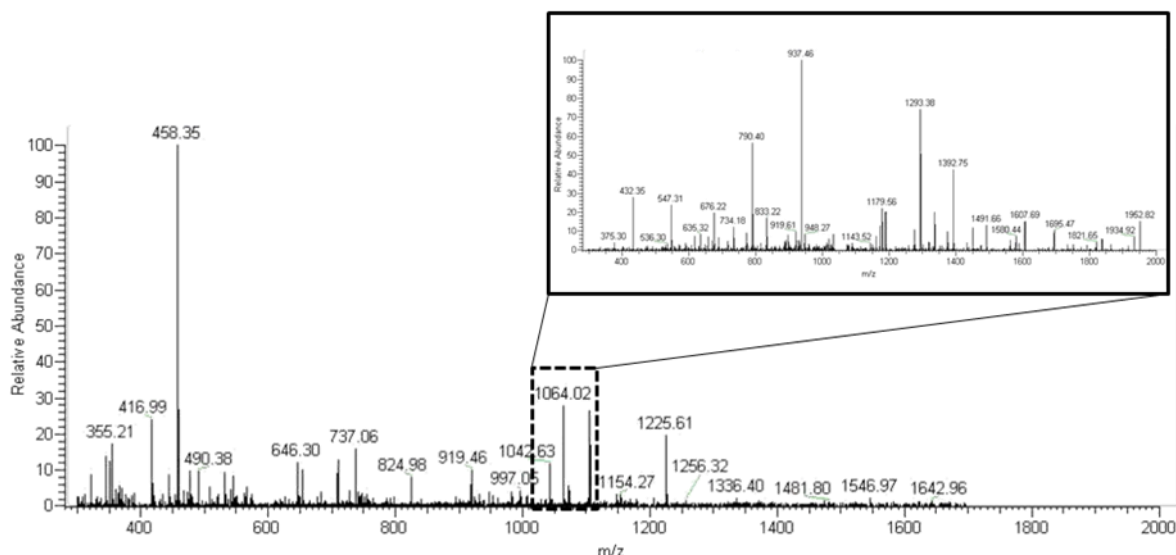


Figura 30. Exemplo de espectro de MS obtido no tempo de retenção de 104,83 min. O aumento da figura representa o espectro de fragmentação (MS/MS) do íon destacado, o qual levou à obtenção da sequência VYAWDVVNEIFNEDGSLR, relativa a uma porção da Endo-1,4- β -xilanase identificada.

Ao total foram feitas 40.181 consultas de sequência ao banco de dados, das quais se obteve uma lista de proteínas componentes da amostra. Aquelas que apresentaram valor estatístico significativo foram consideradas como identificações positivas e são mostradas na tabela 3.

Tabela 3. Relação das proteínas identificadas no secretoma de *A. niger* quando crescido em bagaço de cana. Abordagem: digestão em solução.

Nº	Acesso NCBI	Proteína [organismo]	BLAST ⁽¹⁾	Score ⁽²⁾	Matches	Sequências	MW (kDa)	pI	EC.	Cazy ⁽³⁾
1	3915310	Endo-1,4-β-xilanase [<i>Aspergillus aculeatus</i>]	-	784	30 (22)	12 (10)	35,42	8,29	3.2.1.8	GH 10
2	1352079	β-glicosidase [<i>Aspergillus aculeatus</i>]	-	237	3 (3)	3 (3)	93,39	5,03	3.2.1.21	GH 03
3	121835	Endo-1,4-β-glicanase I [<i>Aspergillus aculeatus</i>]	-	227	5 (5)	2 (2)	25,66	5,82	3.2.1.4	GH 12
4	21842130	Endoglicanase [<i>Aspergillus kawachii</i>]	-	214	5 (4)	2 (1)	25,87	6,9	3.2.1.4	GH 12
5	3913798	1,4-β-glicana Celobiohidrolase B [<i>Aspergillus aculeatus</i>]	-	147	4 (2)	3 (2)	58,37	4,69	3.2.1.91	GH 07
6	3608406	GEL 1 Proteína [<i>Aspergillus fumigatus</i>]	1,3-β-glicosiltransferase	90	3 (2)	3 (2)	48,46	4,94	2.4.1.-	GH 72
7	30315965	Nucleosídeo difosfato quinase [<i>Aspergillus nidulans</i>]	-	87	2 (2)	1 (1)	16,96	7,83	2.7.4.6	-
8	3913152	α-L-arabinofuranosidase [<i>Aspergillus tubingensis</i>]	-	79	2 (2)	1 (1)	36,14	4,74	3.2.1.55	GH 62
9	121702827	D-xilose redutase [<i>Aspergillus clavatus</i>]	-	73	1 (1)	1 (1)	37,55	5,94	1.1.1.21	-
10	70990878	Carreador ADP/ATP mitocondrial [<i>Aspergillus fumigatus</i>]	-	70	3 (1)	3 (1)	33,36	9,97	-	-
11	3242655	Avicelase III [<i>Aspergillus aculeatus</i>]	Endo-1,4-β-glicanase	68	2 (1)	2 (1)	90,11	4,93	3.2.1.4	GH 74
12	67523719	ATP sintase cadeia beta [<i>Aspergillus nidulans</i>]	-	67	1 (1)	1 (1)	54,82	5,17	3.6.3.14	-
13	115385653	α-L-arabinofuranosidase [<i>Aspergillus terreus</i>]	-	66	1 (1)	1 (1)	35,18	4,27	3.2.1.55	GH 54
14	67902378	Proteína hipotética [<i>Aspergillus nidulans</i>]	Proteína L4 ribossomo 60S	64	1 (1)	1 (1)	40,30	10,78	-	-

(1) Busca por similaridade no BLAST; (2) Score baseado em parâmetros do MASCOT; (3) Classificação por família. Busca feita em <www.cazy.org>.

A presença expressiva de enzimas hidrolíticas foi marcante nas proteínas identificadas. Entretanto, o número de identificações foi bastante reduzido comparado ao que se esperava da amostra devido à visualização do perfil do secretoma tanto por meio de eletroforese bidimensional quanto por meio do cromatograma obtido. Partiu-se, então, para uma segunda estratégia para a caracterização do secretoma de *A. niger* quando crescido em bagaço de cana, visando aumentar o número de identificações obtidas. Procedeu-se com um fracionamento prévio da amostra por meio de separação eletroforética, a qual foi dividida em seis frações denominadas de P1 a P6 (Figura 31).

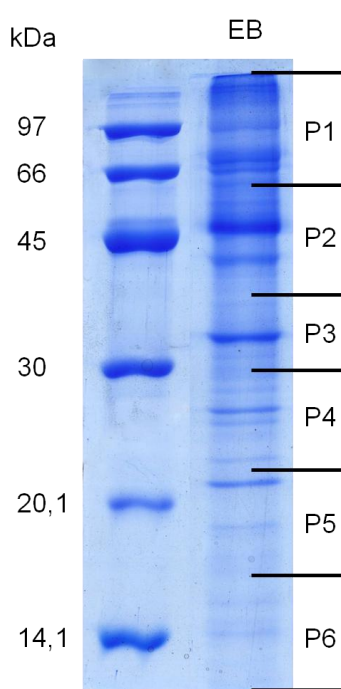


Figura 31. Separação eletroforética do EB e posterior fracionamento (P1-P6).

O fracionamento prévio da amostra serve como uma forma de reduzir a complexidade da amostra aplicada no espectrômetro de massa, possibilitando assim um maior aproveitamento da capacidade do espectrômetro e consequente obtenção de maior informação por corrida, gerando maior quantidade de identificações. As proteínas identificadas por essa abordagem são apresentadas abaixo nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Relação das proteínas identificadas no secretoma de *A. niger* quando crescido em bagaço de cana. Abordagem: digestão *in gel*.

N°	Acesso NCBI	Proteína [organismo]	Score ⁽¹⁾	Cobertura (%)	n° de proteínas	n° de peptídeos	n° de pept. únicos ⁽²⁾	n° de PSMs ⁽³⁾	MW (kDa)	pI	E.C.	Cazy ⁽⁴⁾
1	3915130	Endo-1,4-β-xilanase [<i>Aspergillus aculeatus</i>]	684,61	63,91	20	16	12	315	35,3	8,29	3.2.1.8	GH 10
2	145232427	Histona H4 [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	16,47	49,51	4	7	4	15	11,4	11,36	-	-
3	21842130	Endo-1,4-β-glicanase [<i>Aspergillus kawachii</i>]	22,1	5,06	1	2	2	13	25,7	6,9	3.2.1.4	GH 12
4	114194661	Carreador ADP,ATP [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	8,32	24,44	2	6	2	9	34,2	9,83	-	-
5	145254885	Proteína S3 ribossomo 40S [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	4,65	25,94	3	7	2	9	29,2	9,1	-	-
6	295982396	Frutossiltransferase cadeia B [<i>Aspergillus Japonicus</i>]	10,05	11,36	5	4	2	6	68,9	4,61	2.4.1.243	GH 32
7	121835	Endo-1,4-β-glicanase [<i>Aspergillus aculeatus</i>]	14,56	9,28	1	1	1	5	25,5	5,82	3.2.1.4	GH 12
8	3912991	α-glicuronidase A [<i>Aspergillus tubingensis</i>]	2,48	9,63	3	6	1	6	93,8	5,63	3.2.1.139	GH 67
9	46395587	Exo-1,3-β-glicanase 1 [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	10,16	11,85	2	3	1	10	44,3	4,73	3.2.1.58	GH 05
10	3913798	Celobiohidrolase B [<i>Aspergillus aculeatus</i>]	10,33	3,52	1	2	1	4	57,1	4,69	3.2.1.91	GH 07
11	110279005	Histona H2B [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	6,04	30,50	5	6	1	11	15,0	10,13	-	-
12	114192312	Precursor Endo-1,4-β-xilanase B [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	11,51	6,82	1	1	1	18	23,8	4,55	3.2.1.8	GH 11
13	114189168	Proteína S4-A ribossomo 40S [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	2,26	20,08	1	4	1	4	26,8	9,96	-	-
14	114190657	Actina [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	5,09	19,44	8	6	1	8	40,1	6,24	-	-
15	114192799	Proteína L11 ribossomo 60S [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	12,43	17,61	6	3	1	8	20,1	9,99	-	-
16	114192590	Proteína S22 ribossomo 40S [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	3,04	19,23	4	2	1	2	14,7	9,74	-	-
17	114190171	ATP sintase cadeia beta [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	7,15	20,20	4	7	1	10	53,6	5,66	3.6.3.14	-
18	114192224	Triosefosfato isomerase [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	5,15	6,02	2	1	1	2	27,1	5,54	5.3.1.1	-
19	114193156	Glicose-6-fosfato isomerase [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	5,50	11,75	3	4	1	5	61,1	6,38	5.3.1.9	-
20	114197497	Espermidina sintase [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	2,35	13,40	7	4	1	5	33,2	5,54	2.5.1.16	-

(tabela 4 contin.)

21	114193514	ATP sintase cadeia alfa [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	7,02	18,88	4	10	1	15	59,8	9,07	3.6.3.14	-
22	119396551	Proteína ribossomal S13p/S18e [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	10,45	26,45	1	4	1	6	17,9	10,45	-	-
23	119397458	Proteína ribossomal S23 (S12) [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	2,49	25,52	2	4	1	4	15,9	10,45	-	-
24	119397489	Proteína L9 ribossomo 60S [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	2,24	5,21	1	1	1	1	21,8	9,67	-	-
25	119397905	Hidrolase alfa/beta [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	2,89	18,83	1	8	1	19	62,3	6,71	-	-
26	119400229	Proteína domínio LIM [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	12,37	7,04	1	4	1	16	87,7	9,06	-	-
27	119402051	Proteína L23 ribossomo 60S [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	4,36	25,32	4	3	1	5	17,0	10,35	-	-
28	119403950	Fator de alongação da tradução EF-2 [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	4,63	16,20	4	12	1	26	91,6	6,90	-	-
29	119404154	Transportador antiporte Na ⁺ /H ⁺ Nha1 [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	6,28	11,58	1	8	1	15	119,1	5,90	-	-
30	119400742	Enolase/alérgeno Asp F 22 [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	2,48	11,87	5	4	1	4	47,3	5,33	4.2.1.11	-
31	119402285	Cu,Zn superóxido dismutase SOD1 [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	2,36	43,03	8	5	1	5	17,1	6,52	1.15.1.1	-
32	145249068	Tripeptidil-peptidase sed2 [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	2,59	3,60	1	2	1	2	65,7	5,68	3.4.14.9	-
33	145259295	Pectina esterase A [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	3,61	4,59	1	1	1	1	34,6	4,39	3.1.1.11	CE 08
34	145239337	Adenosilhomocisteinase [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	3,99	11,36	3	4	1	6	49,0	6,29	3.3.1.1	-
35	292495285	Exo-1,4-β-xilosidase xInD [<i>Aspergillus japonicus</i>]	4,47	8,21	2	4	1	4	86,2	4,79	3.2.1.37	GH 03
36	317025252	endo-1,3-beta-glicanase Eng1 [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	4,42	3,46	2	2	1	3	78,4	6,09	3.2.1.6	GH 81
37	307776299	Ramnogalacturonana liase [<i>Aspergillus Aculeatus</i>]	3,03	5,91	8	3	1	4	54,1	5,76	4.2.2.-	PL 11

(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; (4) Classificação por família. Busca feita em <www.cazy.org>.

Tabela 5. Relação das proteínas sem nome ou hipotéticas identificadas no secretoma de *A. niger* quando crescido em bagaço de cana. Abordagem: digestão *in gel*.

Nº	Acesso NCBI	Proteína [organismo]	BLAST ⁽¹⁾	Score ⁽²⁾	Cobertura (%)	nº de proteínas	nº de peptídeos	nº de (3) pept. únicos	nº de (4) PSMs	MW (kDa)	pI	E.C.	Cazy ⁽⁵⁾
1	56294810	Produto protéico sem nome [<i>Aspergillus aculeatus</i>]	Endo-1,4-β-xilanase	19,26	11,82	1	4	3	10	42,9	5,06	3.2.1.8	GH 10
2	56294812	Produto protéico sem nome [<i>Aspergillus aculeatus</i>]	Endo-1,4-β-xilanase	141,01	14,29	2	2	2	82	24,5	6,29	3.2.1.8	GH 11
3	83765359	Produto protéico sem nome [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	Malato desidrogenase	2,41	12,65	2	3	1	4	35,7	8,76	1.1.1.37	-
4	83771192	Produto protéico sem nome [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	Proteína Cdc25	2,19	6,12	3	5	1	7	140,7	5,30	-	-
5	83771445	Produto protéico sem nome [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	Nucleosídeo difosfato quinase	22,17	16,99	3	2	1	8	17,0	7,99	2.7.4.6	-
6	83771975	Produto protéico sem nome [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	1,3-β-glicanosiltransferase	10,09	19,82	3	6	1	12	48,2	5,21	2.4.1.-	GH 72
7	114190379	Proteína hipotética conservada [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	Endo-arabinase	3,39	15,03	1	3	1	3	35,1	5,19	3.2.1.99	GH 43
8	114192630	Proteína hipotética conservada [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	Proteína hipotética	11,02	5,65	1	3	1	14	102,6	8,02	-	-
9	114192841	Proteína hipotética ATEG_05472 [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	Homocisteína metiltransferase	3,00	11,07	3	7	1	13	86,7	6,76	2.1.1.14	-
10	114195647	Proteína hipotética conservada [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	Proteína hipotética	2,44	15,55	1	2	1	4	26,4	7,01	-	-
11	114194415	Proteína predita [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	Proteína predita	2,21	9,99	1	10	1	16	154,8	7,39	-	-
12	114194946	Proteína hipotética conservada [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	Proteína hipotética	2,22	8,60	1	6	1	7	122,4	6,29	-	-
13	114193395	Proteína hipotética conservada [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	DNA ligase	3,95	12,24	1	7	1	12	84,3	5,86	6.5.1.1	-
14	114195237	Proteína hipotética conservada [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	Protéina domínio CRAL/TRIO	30,69	9,23	1	2	1	62	43,5	6,14	-	-
15	114195852	Proteína hipotética ATEG_02590 [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	Prot. secretada rica em cisteína	5,81	8,15	1	2	1	6	37,2	6,20	-	-
16	145236829	Proteína hipotética ANL_1_602054 [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	Proteína hipotética	4,20	5,95	1	2	1	3	51,8	5,92	-	-
17	220693424	Proteína hipotética conservada [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357]	Proteína hipotética	6,34	7,67	3	4	1	6	69,9	7,11	-	-
18	317140791	Proteína hipotética AOR_1_2572174 [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	Proteína hipotética	5,99	12,54	3	4	1	9	37,4	9,55	-	-

(1) Busca por similaridade no BLAST; (2) Score baseado em parâmetros do SEQUEST; (3) Peptídeos únicos: peptídeos distintos que foram identificados daquela proteína; (4) 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; (5) Classificação por família. Busca feita em <www.cazy.org>.

De fato, a segunda estratégia (digestão *in gel*) foi mais bem sucedida quanto ao número de identificações obtidas em uma razão de até quatro vezes mais proteínas identificadas do que pela abordagem por digestão em solução.

Em ambas as estratégias a presença marcante de enzimas hidrolíticas no grupo de proteínas identificadas demonstra a característica esperada para a composição do secretoma de *A. niger*: um arsenal de proteínas secretadas capaz de degradar o substrato em que o fungo se encontra e possibilitar, assim, o desenvolvimento e crescimento do mesmo. Das enzimas identificadas, grande parte corresponde a enzimas de atuação em xilana (endo-1,4- β -xilânase, exo-1,4- β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase e α -glicuronidase), celulose (endo-1,4- β -glicanase, β -glicosidase e 1,4- β -glicana celobiohidrolase) e pectina (pectina esterase e ramnogalacturana liase), corroborando os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos (figuras 10 e 11).

De todas as enzimas atuantes em carboidratos, destacam-se as endo-1,4- β -xilânases. Ao todo foram identificadas quatro entradas distintas do NCBI correspondentes à enzima em questão, revelando uma diversidade de diferentes xilânases presentes no secretoma. Do mesmo modo, existe ainda a quantidade de proteínas vinculadas a uma mesma identificação (não redundância da tabela), sugerindo a presença de isoformas que não foram distinguíveis pela análise realizada, validando resultados apresentados na seção de purificação nas figuras 17 e 22 deste trabalho.

Detectou-se ainda a presença de uma proteína com domínio hidrolase alfa/beta. Trata-se de um domínio com organização estrutural característica formada por um arranjo entre folhas beta e alfa hélices apresentando uma tríade catalítica. Este domínio tem sido reportado para uma série de classes de enzimas, dentre as quais se encontram as esterases. Em um estudo de caracterização estrutural de uma feruloil esterase de *Aspergillus niger* McAuley e colaboradores (2004) detectaram o padrão do domínio hidrolase alfa/beta como parte da estrutura da enzima. Tal constatação indica, então, a possível presença de uma feruloil esterase no secretoma estudado neste trabalho.

Identificou-se também uma tripeptidil-peptidase, uma protease de atuação *exo* que catalisa a liberação de um tripeptídeo da extremidade de uma

proteína. O estudo realizado por Reichard e colaboradores (2006) relata que tais peptidases apresentam certa homologia com sedolisinas, endoproteases produzidas e secretadas por fungos. A presença de proteases no secretoma de *Aspergillus niger* já foi detectada em outros estudos já descritos na introdução deste trabalho (seção 1.4) e era esperada na composição do mesmo quando o fungo é crescido em bagaço de cana.

Além do secretoma em si, observou-se também a presença de proteínas intracelulares, demonstrando provavelmente a ocorrência de processos de lise celular durante o cultivo. Contudo, a identificação de tais componentes intracelulares pode ser útil para elucidar os processos que estão ocorrendo no ambiente extracelular e como isso afeta o metabolismo da célula. Por exemplo, a identificação de uma D-xilose redutase, que catalisa a reação de formação do xilitol a partir da xilose, indica o processo de catabolismo da xilose produzida extracelularmente através da ação das xilanases sobre o bagaço de cana.

Algo interessante a ser notado é o fato de que poucas identificações foram relacionadas à espécie *Aspergillus niger*, e sim a algum outro fungo do mesmo gênero ou até da mesma seção (Nigri), como é o caso do *Aspergillus aculeatus*, do qual muitas identificações corresponderam. Tal ocorrência poderia ser explicada devido a uma conservação das enzimas de tais organismos, dificultando o processo de identificação em nível de espécie. Entretanto, este resultado levanta algumas questões metodológicas, pois foram geradas muitas sequências e poucas identificações. Tal fato poderia ser explicado pela possível má anotação no banco de dados em que foi feita a busca. Para tanto, outras estratégias de busca podem ser utilizadas, como o MS BLAST, que tem sido utilizado para identificação de proteínas de organismos sem genoma sequenciado, através de uma busca por homologia.

Esperamos que a identificação das proteínas expressas pelo fungo na condição em questão possa adicionar conhecimento à biologia e à capacidade de hidrolisar os substratos e, assim, contribuir para uma otimização dos processos de hidrólise enzimática de materiais de origem lignocelulósica.

6. CONCLUSÕES

- O fungo *Aspergillus niger* foi capaz de secretar enzimas e se desenvolver no meio contendo bagaço de cana como única fonte de carbono. A atividade enzimática mais expressiva do extrato bruto obtido foi a xilanolítica;
- A temperatura ótima e o pH ótimo de ensaio para xilanases presentes no extrato bruto foi de 45°C e 5,0, respectivamente. CMCases e pectinases foram mais ativas a 50°C em uma faixa de pH ácida;
- A cisteína foi capaz de aumentar a atividade de xilanases, CMCases e pectinases presentes no extrato bruto quando incubadas por 20 minutos antes do ensaio enzimático;
- A cromatografia de troca catiônica em pH 5,0 não foi capaz de separar os componentes de *Xyl*, pois nenhum deles interagiu com a resina da coluna em questão;
- A cromatografia de troca aniônica em pH 8,5 produziu uma fração mais pura de xilanases quando comparada à *Xyl*;
- QFF não apresentou outra atividade enzimática que não a xilanolítica, tendo especificidade por xilanas solúveis;
- QFF exibiu um K_m e uma $V_{m\acute{a}x}$ de 6,46 mg/mL e 1,984 UI.mL⁻¹, respectivamente;
- Dos dois *spots* presentes em QFF, um foi identificado como sendo uma endo-1,4-β-xilanase e outro não foi possível de se identificar;
- O secretoma de *A. niger* quando crescido em bagaço de cana apresentou 448 *spots* quando visualizado através de eletroforese bidimensional;

- A abordagem de fracionamento do secretoma previamente à etapa de digestão aumentou o número de identificações em até quatro vezes quando comparada à estratégia de digestão em solução;
- Um número expressivo de glicosil hidrolases foi identificado no secretoma de *A. niger* crescido em bagaço de cana, sendo as xilanases as enzimas mais abundantes;

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar a termoestabilidade de enzimas presentes no extrato bruto de *Aspergillus niger* na presença e ausência de cisteína;
- Identificar os demais *spots* presentes na fração *Xyl*;
- Identificar o *spot* 1 presente na fração purificada QFF;
- Caracterizar a fração purificada QFF quanto à temperatura ótima, pH ótimo, inibição/ativação na presença de íons e termoestabilidade;
- Realizar microscopia de força atômica da fração purificada QFF;
- Realizar ensaios de N-deglicosilação não desnaturantes da fração purificada QFF;
- Estudar comparativamente a fração purificada QFF com outras frações de xilanases purificadas de outros fungos do gênero *Aspergillus*;
- Purificar outras xilanases presentes em *Xyl*;
- Reprocessar os dados brutos (arquivos .raw) obtidos em um mesmo programa, para que possa ser realizada melhor comparação de resultados entre as abordagens de digestão em solução e digestão *in gel*;
- Realizar busca por MS BLAST dos dados brutos (arquivos .raw) obtidos, visando contornar o problema da grande quantidade de polimorfismos existentes e identificar mais proteínas através da similaridade com proteínas de outros organismos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAV, S. S.; LI, A. A.; MANAVALAN, A.; PUNT, P. & SZE, S. K. Quantitative iTRAQ secretome analysis of *Aspergillus niger* reveals novel hydrolytic enzymes. **Journal of Proteome Research**. v. 9, p. 3932-3940. 2010

ANDERSON, N.L.; ESQUER-BLASCO, R.; HOFMANN, J.P. & ANDERSON, N.G. A two-dimensional gel database of rat liver proteins useful in gene regulation and drug effects studies. **Electrophoresis**. v. 12, n. 11, p. 907-930. 1991.

ANTELMANN, H.; TJALSMA, H.; VOIGT, B.; OHLMEIER, S.; BRON, S.; van DIJL, J. M. & HECKER, M. A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. **Genome Research**. v. 11, p. 1484-1502. 2001

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

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

BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M. & GOMI, K. (editors); **Aspergillus Molecular Biology and Genomics**. Linton, UK: Caister Academic Press, 2010. p. 1-16.

BHAT, M.K. & HAZLEWOOD, G.P. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: BEDFORD, M.R. & PARTRIDGE, G.G. (editors); **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. Wallingford, UK: CAB International Publishing, 2001. p. 11-60.

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.

BOUWS, H.; WATTENBERG, A. & ZORN, H. Fungal secretomes – nature’s toolbox for white biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 80, p. 381-388. 2008.

BRAAKSMA, M.; MARTENS-UZUNOVA, E. S.; PUNT, P. J. & SCHAAP, P. J. An inventory of the *Aspergillus niger* secretome by combining *in silico* predictions with shotgun proteomics data. **BMC Genomics**. v. 11, n. 584. 2010

BRASIL. Geração termelétrica a partir da biomassa. **Plano nacional de energia 2030**, v. 8. Ministério de Minas e Energia; colaboração Empresa de Pesquisa Energética, 2007.

DURAN, N.; MARQUES, S.; SALLES, B. C.; MEDEIROS, R. G. & FILHO, E. X. F. Enzimas na indústria de polpa e papel. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. & CORVO, M. A. (editors) **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro, Brasil: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT [Portugal], 2008. p. 205-240.

FERREIRA DE OLIVEIRA, J. M. P.; van PASSEL, M. W. J.; SCHAAP, P. J. & de GRAAF, L. H. Shotgun proteomics of *Aspergillus niger* microsomes upon D-xilose induction. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 76, n. 13, p. 4421-4429. 2010

FILHO, E. X. F.; PULS, J. & COUGHLAN, M. P. Biochemical characteristics of two endo-1,4- β -xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 11, p. 171-180. 1993

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, n. 5259, p. 680-685. 1970.

LEATHERBARROW, R. J. Enzifitter manual: a non-linear regression curve fitting program for Windows. **Biosoft**, London, p. 1-104. 1999.

LU, X.; SUN, J.; NIMTZ, M.; WISSING, J.; ZENG, A. P. & RINAS, U. The intra- and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined

medium with xylose or maltose as carbon substrate. **Microbial Cell Factories**. v. 9, n. 23. 2010

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

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

McAULEY, K. E.; SVENDSEN, A.; PATKAR, S. A. & WILSON, K. S. Structure of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**. v. 60, p. 878-887. 2004

MEDEIROS, R.G.; HANADA, R. & FILHO, E.X.F. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 52, p. 97-100. 2003

MILANEZI, N. von G. **Purificação e caracterização de uma endo-1,4- β -xilanase produzida por *Aspergillus niger* com características de interesse industrial**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2010

MILANEZI, N. von G.; MENDOZA, D. P. G.; SIQUEIRA, F. G.; SILVA, L. P.; RICART, C. A. O. & FILHO, E. X. F. Isolation and characterization of a xylan-degrading enzyme from *Aspergillus niger* van Tieghem LPM 93 with potential for industrial applications. **Bioenergy Research**. v. 3, n. 2, 2011

MILLER, G. 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, n. 12, p. 1672-1681. 2002

PEL, H. J.; de WINDE, J. H.; ARCHER, D. B.; DYER, P. S.; HOFMANN, G.; SCHAAP, P. J.; TURNER, G.; de VRIES, R. P.; ALBANG, R.; ALBERMANN, K.; ANDERSEN, M. R.; BENDTSEN, J. D.; BENEN, J. A. E.; van den BERG, M.; BREESTRAAT, S.; CADDICK, M. X.; CONTRERAS, R.; CORNELL, M.; COUTINHO, P. M.; DANCHIN, E. G. J.; DEBETS, A. J. M.; DEKKER, P.; van DIJCK, P. W. M.; van DIJCK, A.; DIJKHUIZEN, L.; DRIESSEN, A. J. M.; d'ENFERT, C.; GEYSENS, S.; GOOSEN, C.; GROOT, G. S. P.; de GROOT, P. W. J.; GUILLEMETTE, T.; HENRISSAT, B.; HERWEIJER, M.; van den HOMBERGH, J. P. T. W.; van den HONDEL, C. A. M. J. J.; van der HEIJDEN, R. T. J. M.; van der KAAIJ, R. M.; KLIS, F. M.; KOOLS, H. J.; KUBICEK, C. P.; van KUYK, P. A.; LAUBER, J.; LU, X.; van der MAAREL, M. J. E. C.; MEULENBERG, R.; MENKE, H.; MORTIMER, M. A.; NIELSEN, J.; OLIVER, S. G.; OLSTHOORN, M.; PAL, K.; van PEIJ, N. N. M. E.; RAM, A. F. J.; RINAS, U.; ROUBOS, J. A.; SAGT, C. M. J.; SCHMOLL, M.; SUN, J.; USSERY, D.; VARGA, J.; VERVECKEN, W.; van de VONDERVOORT, P. J. J.; WEDLER, H.; WÖSTEN, H. A. B.; ZENG, A.; van Ooyen, A. J. J.; VISSER, J. & STAM, H. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**. v. 25, n. 2, p. 221-231. 2007

PERCIVAL ZHANG, Y.H.; HIMMEL, M.E. & MIELENZ, J.R. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**. v. 24, p. 452-481. 2006

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; de la RUBIA, T. & MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**. v. 5, p. 53-63. 2002

PERKINS, D.N.; PAPPIN, D.J.C.; CREASY, D.M. & COTTRELL, J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**. v. 20, p. 3551-3567. 1999

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TEREZI, H. F.; JORGE, J. A. & AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 67, p. 577-591. 2005.

RAGAUSKAS, A.J.; WILLIAMS, C.K.; DAVISON, B.H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C.A.; FREDERICK Jr., W.J.; HALLETT, J.P.; LEAK, D.J.; LIOTTA, C.L.; MIELENZ, J.R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R. & TSCHAPLINSKI, T. The path forward for biofuels and biomaterials. **Science**. v. 311, p. 484-489. 2006

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. The plant cell and the cell cycle. In: _____. **Biology of Plants**. New York, USA: W. H. Freeman and Company Publishers, 2005. p. 35-101.

REICHARD, U.; LÉCHENNE, B.; ASIF, A. R.; STREIT, F.; GROUZMANN, E.; JOUSSON, O. & MONOD, M. Sedolisins, a new class of secreted proteases from *Aspergillus fumigatus* with endoprotease or tripeptidyl-peptidase activity at acidic pHs. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, n. 3, p. 1739-1748. 2006

SÁ-PEREIRA, P.; DUARTE, J. C.; FERRARA, M. A.; de LACERDA, P. S. B. & ALVES, F. C. Biocatálise: estratégias de inovação e criação de mercados. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. & CORVO, M. A. (editors) **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro, Brasil: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT [Portugal], 2008. p. 433-462.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 30, p. 279-291. 2003

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C. & van DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 59, p. 426-435. 2002

SIQUEIRA, F. G. & FILHO, E. X. F. Plant cell wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**. v. 7, p. 54-60. 2010

STERNBERG, D.; VIJAYAKUMAR, P. & REESE, E. T. Beta-glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 23, n. 2, p. 139-147. 1977

SUNNA, A.; PULS, J. & ANTRANIKIAN, G. Characterization of the xylanolytic enzyme system of the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermotoga maritime*, *T. neapolitana*, and *T. thermarum*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 118A, n. 3, p. 453-461. 1997

TEIXEIRA, R. S. S.; SIQUEIRA, F. G.; SOUZA, M. V.; FILHO, E. X. F. & BOM, E. P. S. Purification and characterization studies of a thermostable β -xylanase from *Aspergillus awamori*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 37, n. 10, p. 1041-1051. 2010

van TIEGHEM, P. E. L. A l'histoire physiologique des mucédinées. **Annales des Sciences Naturelles: Botanique**. v. 8, p. 240. 1867

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

TSANG, A.; BUTLER, G.; POWLOWSKI, J.; PANISKO, E. A. & BAKER, S. E. Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome. **Fungal Genetics and Biology**. v. 46, p. 153-160. 2009

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

WALSH, C. T.; GARNEAU-TSODIKOVA, S. & GATTO Jr., G. J. Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. **Angewandte Chemie**. v. 44, p. 7342-7372. 2005

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

ZHANG, X.; SHI, L.; SHU, S.; WANG, Y.; ZHAO, K.; XU, N.; LIU, S. & ROEPSTORFF, P. An improved method of sample preparation on AnchorChip™ targets for MALDI-MS and MS/MS and its application in the liver proteome project. **Proteomics**. v. 7, p. 2340-2349. 2007