



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo da alteração do perfil de proteínas de fungos filamentosos
em diferentes condições de cultivo utilizando ferramentas
proteômicas e ensaios enzimáticos**

NATHÁLIA GONSALES DA ROSA GARZON

**Ribeirão Preto
2017**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Estudo da alteração do perfil de proteínas de fungos filamentosos
em diferentes condições de cultivo utilizando ferramentas
proteômicas e ensaios enzimáticos**

NATHÁLIA GONSALES DA ROSA GARZON

**Ribeirão Preto
2017**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Estudo da alteração do perfil de proteínas de fungos filamentosos
em diferentes condições de cultivo utilizando ferramentas
proteômicas e ensaios enzimáticos**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Orientada: Nathália Gonsales da Rosa
Garzon

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

**Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 26/01/2018. A
versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.**

**Ribeirão Preto
2017**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

GARZON, N. G. R. Estudo da alteração do perfil de proteínas de fungos filamentosos em diferentes condições de cultivo utilizando ferramentas proteômicas e ensaios enzimáticos. 2017. 220f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos naturais e sintéticos.

Orientador: Cabral, Hamilton

1. Biotecnologia. 2. Eletroforese bidimensional. 3. Hidrolases. 4. Resíduos lignocelulósicos. 5. Proteômica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nathália Gonsales da Rosa Garzon

Estudo da alteração do perfil de proteínas de fungos filamentosos em diferentes condições de cultivo utilizando ferramentas proteômicas e ensaios enzimáticos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho
aos meus pais Ângela e Jonas
e ao meu amor...meu Elmir*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida e pela de todos que têm me acompanhado nessa trajetória.

Ao Prof. Dr. Hamilton Cabral pela oportunidade, orientação e compreensão, sempre disponível para me auxiliar nos percalços encontrados.

Ao Departamento de Ciências Farmacêuticas e ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) pela oportunidade concedida.

Aos funcionários que contribuem, das mais diferentes formas, para a realização dos nossos trabalhos e a todas as pessoas que fizeram parte desta trajetória de alguma forma.

A todos os professores e pesquisadores que me auxiliaram, das mais diversas formas, durante o desenvolvimento do trabalho. Em especial, agradeço aos funcionários e alunos do Centro de Química de Proteínas, vinculado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro sob Processo nº 2012/24703-8.

Gostaria de expressar meus mais sinceros agradecimentos a todos meus familiares e amigos pelo apoio, carinho e admiração que a mim dedicaram.

Sei que depois de um tempo viramos números, estatísticas ou índices de performance, por isso, dedico especial agradecimento àqueles que sempre me conhecerão pelo simples Nathalia, Nath ou Ná.

Aos companheiros de laboratório e de vida que, com carinho e amizade, tornaram muito felizes os meus dias no Laboratório de Tecnologia Enzimática. Em especial, agradeço àqueles que extrapolaram nosso vínculo para além dos limites do laboratório e que, por morarem em meu coração, serão levados sempre comigo.

Agradeço aqui aos doutores que não possuem títulos formais, mas que são os doutores da minha vida: MINHA FAMÍLIA. Minha mãe Ângela e meu pai Jonas, que com seus títulos de amor, trabalho e muito sacrifício, me deram integridade e me fazem a cada dia enchê-los de orgulho...quisera eu poder um dia fazer pelos meus filhos, o que eles fizeram por mim...

Meus irmãos, Lucas e Alexandre, que por me fazem perceber que, independente do meu título, não estarei isenta de gozações, me deram humildade. Minha cunhada Francine que me ensinou a ter fé e paciência. Meus sobrinhos Maria Elisa e Joaquim, me mostraram que não precisamos de palavras para compreender o amor, e assim me ensinaram a pureza que deixamos o tempo levar. Minha sogra Marta, meu sogro Elmir, minha cunhada Renata e meu cunhado Matheus, me ensinaram que a vida é um acumulado de encontros inexplicáveis, e que repentinamente já fazemos parte de outra família. Eles me deram o título do quanto é importante saber ser apoio.

Meu amor Elmir/Miro/Fera me mostrou que sempre há um porto seguro para o qual eu posso voltar, que nos momentos de maior dificuldade, a dedicação, o respeito, a admiração e o companheirismo irão prevalecer. Com ele percebi que a felicidade só é verdadeira quando as pessoas que amamos estão felizes...e com tudo isso...ele me deu o título de amor...

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

GARZON, N. G. R. **Estudo da alteração do perfil de proteínas de fungos filamentosos em diferentes condições de cultivo utilizando ferramentas proteômicas e ensaios enzimáticos.** 2017. 220f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Os fungos filamentosos são microrganismos explorados devido ao potencial biotecnológico de seus produtos, nos quais as enzimas têm papel de destaque. Apesar de serem utilizadas em diversos segmentos industriais, as enzimas compõem um mercado que esta em franca expansão e em busca de melhores níveis de produção, de novas atividades enzimáticas, e outros. Os fungos filamentosos possuem mecanismos refinados de resposta a alterações exógenas. Sendo assim, os estudos proteômicos têm se tornado uma excelente ferramenta para explorar proteínas produzidas em resposta às variações ambientais, tais como, pH, fontes de nitrogênio e carbono, temperatura e tipos de bioprocessos. Um grupo especialmente afetado por estas variações é a produção de enzimas biotecnológicas. Neste trabalho, os perfis de proteínas intracelulares e/ou de enzimas secretadas foram identificados nos bioprocessos com *Fusarium oxysporum* URM 7401 e *Myceliophthora thermophila*, submetidos a diferentes condições de cultivo. As proteínas intracelulares de *Fusarium oxysporum* URM 7401, cultivado em bioprocessos submersos com diferentes pH ou fontes de nitrogênio, foram extraídas do micélio e fracionadas por eletroforese bidimensional (2DE). Os spots proteicos foram selecionados e identificados por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF-MS/MS. As proteínas secretadas foram avaliadas quanto às suas atividades enzimáticas utilizando substratos adequados para: peptidase, lipase, amilase, β -glicosidase, CMCase, FPase, invertase, pectinase, xilanase e lacase. As proteínas presentes nos secretomas de *Fusarium oxysporum* URM 7401, cultivado em bioprocessos submersos com caseína e farinha de pena, e de *Myceliophthora thermophila*, cultivado em bioprocessos sólidos com resíduos agroindustriais, foram identificadas por espectrometria de massas LC-ESI-MS/MS e também avaliadas quanto ao potencial de sacarificação de resíduos agroindustriais (farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja). As proteínas selecionadas e identificadas, das diferentes condições de cultivo com *Fusarium oxysporum* URM 7401, em conjunto com os dados de produção enzimática demonstram a influência dos parâmetros dos bioprocessos no metabolismo de compostos, crescimento celular, síntese de nutrientes, estresse oxidativo, entre outros. Além do destaque na produção de enzimas, os extratos dos cultivos com caseína e farinha de pena foram capazes de degradar resíduos agroindustriais. A capacidade lignocelulolítica, conjugada a indução da via das fosfopentoses, sugerem que *Fusarium oxysporum* URM 7401 também tem potencial para a realização de bioprocessos consolidados e, conseqüentemente, para a produção de bioetanol. As proteínas do secretoma de *Myceliophthora thermophila*, quantificadas em ensaios enzimáticos e identificadas por espectrometria de massas LC-ESI-MS/MS, reforçaram o potencial hidrolítico e oxidativo deste microrganismo, com destaque especial para o grande número de enzimas ativas sobre carboidratos (CAZy) e oxirredutases. A ação deste arsenal enzimático também foi confirmada nos ensaios de degradação com resíduos agroindustriais; e indicaram um elevado potencial para sacarificação de resíduos

lignocelulósicos. A compreensão dos mecanismos de produção e/ou secreção de proteínas pode ser auxiliada pela proteômica. Estes mecanismos, complementados pela identificação de enzimas biotecnológicas, podem elucidar as rotas metabólicas desencadeadas pelo microrganismo; e também na elaboração de estratégias que propiciem resultados satisfatórios nos bioprocessos.

Palavras-chave: biotecnologia, eletroforese bidimensional, hidrolases, resíduos lignocelulósicos, proteômica.

ABSTRACT

GARZON, N. G. R. **Study of the modification in protein profile of filamentous fungi on different culture conditions using proteomic tools and enzymatic assays.** 2017. 220f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Filamentous fungi are very exploited due to biotechnological potential of their products, which enzymes play a prominent role. Although they have been using in several industrial segments, the enzymes belong to an expansion market, that looking for a better levels of production, novel enzymatic activities and other. Filamentous fungi have a refined mechanisms for response to exogenous alterations. Thus, the proteomic studies have been become an excellent tool to explore proteins, which are produced in response to environmental changes, such as pH, nitrogen and carbon sources, temperature and kind of bioprocesses. A protein group that can be influenced by these variations is biotechnological enzymes. In this work, the profiles of intracellular proteins and/or of secreted enzymes were identified in the bioprocesses with *Fusarium oxysporum* URM 7401 and *Myceliophthora thermophila*, submitted to different culture conditions. The intracellular proteins from *Fusarium oxysporum* URM 7401, cultured in submerged bioprocess with various pH values or nitrogen sources, were extracted from mycelium and fractionated by bidimensional electrophoresis (2DE). The spots were selected and identified by MALDI-TOF/TOF-MS/MS mass spectrometry. The secreted proteins were evaluated, for their enzyme activities, using suitable substrates for peptidase, lipase, amylase, β -glucosidase, CMCase, FPase, invertase, pectinase, xylanase and laccase. The proteins in secretomes from *Fusarium oxysporum* URM 7401, cultured in submerged bioprocess with casein and feather meal, and from *Myceliophthora thermophila*, cultured in solid state bioprocess with agroindustrial residues, were identified by LC-ESI-MS/MS mass spectrometer and they were also evaluated for saccharification potential of the agroindustrial residues (wheat bran, rice straw and soybean straw). The selected and identified proteins from *Fusarium oxysporum* URM 7401, obtained from different culture conditions, in addition to the enzyme production showed that bioprocess parameters influence the metabolism of compounds, cell growth, synthesis of nutrient, oxidative stress, among other. Besides this prominence in enzymes production, the extracts with casein or feather meal were able to degrade agroindustrial residues. The lignocellulolytic ability, conjugated to induction of the phosphopentoses pathways, suggest that *Fusarium oxysporum* URM 7401 also has potential for performing consolidated bioprocess and, consequently, for bioethanol production. The secretome proteins from *Myceliophthora thermophila*, quantified in enzymatic assays and identified by mass spectrometer LC-ESI-MS/MS, reinforce the hydrolytic and oxidative potential from this microorganism, with special emphasis for a great number of carbohydrate-active enzymes (CAZy) and oxidoreductases. The action of this enzymatic arsenal was also confirmed by agroindustrial residue degradation assays; and indicated a high potential for lignocellulosic residue saccharifications. The understanding about protein production and/or secretion mechanisms can be supported by proteomics. These mechanisms, complemented by the identification of biotechnological enzymes, can elucidate the metabolic pathways triggered by the microorganism; and can help to design better performing bioprocesses.

Keywords: biotechnology, bidimensional electrophoresis, hydrolases, lignocellulosic residues, proteomic.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ilustração de etapas, vias metabólicas e enzimas importantes para a realização de bioprocesso consolidado por *Fusarium* 6
- Figura 2** – Regulação mediada por PaC como resposta ao pH extracelular 11
- Figura 3** – Esquema simplificado da regulação mediada por CreA como resposta às fontes de carbono disponíveis 13
- Figura 4** – Esquema simplificado da regulação mediada por AreA como resposta às fontes de nitrogênio disponíveis 15
- Figura 5** – Composição e interação entre os constituintes da célula vegetal. 19
- Figura 6** – Celulose e algumas enzimas pertencentes às CAZy, envolvidas no seu processo de degradação 20
- Figura 7** – Hemicelulose e algumas enzimas pertencentes às CAZy, envolvidas no seu processo de degradação 21
- Figura 8** – Pectina e algumas enzimas pertencentes às CAZy, envolvidas no seu processo de degradação 22
- Figura 9** – Esquema da estratégia de identificação de proteínas utilizando eletroforese bidimensional 25
- Figura 10** – Esquema da estratégia de identificação de proteínas em uma mistura complexa 26
- Figura 11** – Representação simplificada das etapas envolvidas na identificação de proteínas por espectrometria de massas 27
- Figura 12** – Abordagem metodológica utilizada para a execução de experimentos utilizando o fungo filamentoso mesofílico *F. oxysporum* URM 7401. 30
- Figura 13** – Abordagem metodológica utilizada para a execução de experimentos utilizando o fungo filamentoso termofílico *M. thermophila*. 30
- Figura 14** – *Fusarium oxysporum* URM 7401 31
- Figura 15** – *Myceliophthora thermophila* 32
- Figura 16** – Eletroforese bidimensional de proteínas extraídas do micélio de *F. oxysporum* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h em diferentes pH inicial do meio. (A) pH 5, (B) pH 6, (C) pH 7 e (D) pH 8 59
- Figura 17** – Quadro dos processos biológicos nos quais as proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401, cultivados em diferentes pH, estão envolvidas 63
- Figura 18** – Perfil de produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo *F. oxysporum* em 96 h de bioprocesso submerso em diferentes condições de pH 70
- Figura 19** – Eletroforese bidimensional de proteínas extraídas do micélio de *F. oxysporum* submetido ao bioprocesso submerso por 96h com 1% de diferentes fontes de nitrogênio. (A) sulfato de amônio, (B) ureia 75

- Figura 20** - Eletroforese bidimensional de proteínas extraídas do micélio de *F. oxysporum* submetido ao bioprocessamento submerso por 96h com 1% de diferentes fontes de nitrogênio. **(A)** ácido glutâmico, **(B)** cisteína, **(C)** histidina, **(D)** isoleucina **83**
- Figura 21** - Eletroforese bidimensional de proteínas extraídas do micélio de *F. oxysporum* submetido ao bioprocessamento submerso por 96h com 1% de diferentes fontes de nitrogênio. **(A)** caseína, **(B)** farinha de pena **97**
- Figura 22** - Abordagem metodológica da análise de proteínas utilizando eletroforese bidimensional e espectrometria de massas **108**
- Figura 23** - Ilustração das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio relacionadas à parede celular, citoesqueleto e transporte intracelular **109**
- Figura 24** - Ilustração das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas na regulação e processamento de proteínas **110**
- Figura 25** - Ilustração das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas no metabolismo de aminoácidos e reciclagem de nitrogênio **114**
- Figura 26** - Ilustração das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas nos mecanismos de resistência ao estresse e em processos de desintoxicação **116**
- Figura 27** - Ilustração das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas no metabolismo de carboidratos **120**
- Figura 28** - Ilustração das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas na geração de energia **124**
- Figura 29** - Ilustração das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas no metabolismo de ácidos graxos **125**
- Figura 30** - Perfil de produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo *F. oxysporum* em 96 h de bioprocessamento submerso contendo 1% (m/v) de diferentes fontes de nitrogênio **127**
- Figura 31** - Perfil de produção de enzimas pelo fungo *F. oxysporum* em 96 h de bioprocessamento submerso contendo 1% (m/v) de caseína ou farinha de pena **132**
- Figura 32** - Diagrama de Venn das amostras de secretoma de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com 1% (m/v) de caseína ou farinha de pena **135**
- Figura 33** - Funções moleculares e processos biológicos das proteínas identificadas no secretoma de *F. oxysporum*. **(A e D)** identificadas nos secretomas dos cultivos com caseína e farinha de pena; **(B e E)** identificadas no secretoma do cultivo com caseína **(C e F)** identificadas no secretoma do cultivo com farinha de pena **139**

- Figura 34** - Correlação entre massa molecular (kDa) e ponto isoelétrico teórico das proteínas identificadas no secretoma de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado em bioprocesso submerso com 1% (m/v) de caseína **(A)** ou farinha de pena **(B)** **140**
- Figura 35** - Distribuição qualitativa das proteínas identificadas nos secretomas dos cultivos com caseína e farinha de pena **141**
- Figura 36** - Perfil de hidrólise de resíduos agroindustriais incubados com extratos enzimáticos induzidos por fontes de nitrogênio complexas. Liberação de açúcares redutores por extrato: **(A)** caseína, **(B)** farinha de pena **145**
- Figura 37** - Padrão de absorvância do material secretado por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido, obtido por escaneamento por comprimento de onda na faixa de 195 a 500 nm. **(A)** farelo de trigo; **(B)** palha de arroz e **(C)** palha de soja **149**
- Figura 38** - pH do cultivo após extração do material secretado por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido. **(A)** farelo de trigo; **(B)** palha de arroz e **(C)** palha de soja **150**
- Figura 39** - Liberação de açúcares redutores presente no material secretado por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido. **(A)** farelo de trigo; **(B)** palha de arroz e **(C)** palha de soja **152**
- Figura 40** - Perfil de produção de peptidase por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido com os resíduos agroindustriais: farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja **154**
- Figura 41** - Perfil de produção de lipase por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido com os resíduos agroindustriais: farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja **155**
- Figura 42** - Perfil de produção de CMC_{Case} por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido com os resíduos agroindustriais: farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja **156**
- Figura 43** - Perfil de produção de FPase por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido com os resíduos agroindustriais: farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja **157**
- Figura 44** - Perfil de produção de β -glicosidase por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido com os resíduos agroindustriais: farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja **159**
- Figura 45** - Perfil de produção de xilanase por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido com os resíduos agroindustriais: farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja **160**
- Figura 46** - Perfil de produção de pectinase por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido com os resíduos agroindustriais: farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja **161**
- Figura 47** - Perfil de produção de amilase por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido com os resíduos agroindustriais: farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja **162**

- Figura 48** - Perfil de produção de lacase presente no secretoma de *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido com os resíduos agroindustriais farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja **163**
- Figura 49** - Diagrama de Venn das amostras de secretoma de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com 1% (m/v) de caseína ou farinha de pena **165**
- Figura 50** - Funções moleculares e processos biológicos das proteínas identificadas no secretoma de *M. thermophila* cultivado em bioprocesso sólido com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja. **(A)** funções moleculares; **(B)** processos biológicos **172**
- Figura 51** - Correlação entre massa molecular (kDa) e ponto isoelétrico teórico das proteínas identificadas no secretoma de *M. thermophila* cultivado em bioprocesso sólido com farelo de trigo **(A)**, palha de arroz **(B)** ou palha de soja **(C)** **173**
- Figura 52** - Distribuição qualitativa das proteínas identificadas nos secretomas dos cultivos com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja **175**
- Figura 53** - Distribuição relativa das proteínas da família CAZy identificadas nos secretomas dos cultivos com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja **176**
- Figura 54** - Perfil de liberação de açúcares redutores de resíduos agroindustriais com extratos enzimáticos induzidos em bioprocesso sólido com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja. Resíduos para degradação: **(A)** farelo de trigo, **(B)** palha de arroz e **(C)** palha de soja **183**

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|------------|
| Quadro 1 – Algumas aplicações industriais de enzimas produzidas por fungos | 2 |
| Quadro 2 – Enzimas produzidas por fungos comercialmente disponíveis | 3 |
| Quadro 3 – Informações sobre as proteínas classificadas como CAZy | 7 |
| Quadro 4 - Quadro resumo das atividades enzimáticas detectadas no secretoma de <i>M. thermophila</i> em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido com os resíduos agroindustriais farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja. | 185 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|------------|
| Tabela 1 – Características dos bioprocessos submerso e sólido | 16 |
| Tabela 2 – Composição dos resíduos agroindustriais que serão utilizados no presente trabalho | 23 |
| Tabela 3 - Informações sobre os bancos de dados utilizados na busca de proteínas para cada uma das condições analisadas | 42 |
| Tabela 4 - Lista de proteínas intracelulares extraídas dos micélios de <i>F. oxysporum</i> URM 7401 cultivados em bioprocessos submersos com diferentes condições de pH (5, 6, 7 e 8) identificadas por MALDI- TOF/TOF-MS/MS | 60 |
| Tabela 5 - Lista de proteínas intracelulares extraídas dos micélios de <i>F. oxysporum</i> URM 7401 cultivados em bioprocessos submersos com 1% (m/v) de sulfato de amônio ou ureia identificadas por MALDI- TOF/TOF-MS/MS | 76 |
| Tabela 6 - Lista de proteínas intracelulares extraídas dos micélios de <i>F. oxysporum</i> URM 7401 cultivados em bioprocessos submersos com 1% (m/v) de aminoácidos e identificadas por MALDI- TOF/TOF-MS/MS | 84 |
| Tabela 7 - Lista de proteínas intracelulares extraídas dos micélios de <i>F. oxysporum</i> URM 7401 cultivados em bioprocessos submersos com 1% (m/v) de caseína ou farinha de pena identificadas por MALDI- TOF/TOF-MS/MS | 98 |
| Tabela 8 - Lista de proteínas secretadas por <i>F. oxysporum</i> URM 7401, cultivado em bioprocessos submerso com 1% (m/v) de caseína ou farinha de pena, identificadas por LC-ESI-MS/MS | 136 |
| Tabela 9 - Lista de proteínas secretadas por <i>M. thermophila</i> cultivado em bioprocessos sólido, com os resíduos agroindustriais farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja, identificadas por LC-ESI-MS/MS | 166 |
| Tabela 10 - Taxa de sacarificação de farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja após 24 h de incubação a 35 °C com extrato produzido por <i>M. thermophila</i> em bioprocessos sólido | 184 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | iii |
| LISTA DE FIGURAS | v |
| LISTA DE QUADROS | ix |
| LISTA DE TABELAS | x |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. O paradoxo dos fungos filamentosos na sociedade atual | 1 |
| 1.2. <i>Fusarium oxysporum</i> | 4 |
| 1.3. <i>Myceliophthora thermophila</i> | 7 |
| 1.4. A importância dos parâmetros dos bioprocessos na produção de proteínas | 9 |
| 1.4.1. Parâmetro de bioprocessos: Temperatura | 9 |
| 1.4.2. Parâmetro de bioprocessos: pH | 10 |
| 1.4.3. Parâmetro de bioprocessos: Fonte de carbono | 12 |
| 1.4.4. Parâmetro de bioprocessos: Fonte de nitrogênio | 14 |
| 1.4.5. Tipos de bioprocessos | 15 |
| 1.4.5.1 Bioprocessos sólido: Resíduos agroindustriais | 18 |
| 1.5. Estudos proteômicos de fungos filamentosos | 23 |
| 2. OBJETIVOS | 28 |
| 2.1. Objetivo geral | 28 |
| 2.2. Objetivos específicos | 28 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| 3.1. Abordagem experimental | 30 |
| 3.2. Microrganismos | 31 |
| 3.2.1. <i>F. oxysporum</i> URM 7401 | 31 |
| 3.2.2. <i>Myceliophthora thermophila</i> | 32 |
| 3.3. Bioprocessos | 33 |
| 3.3.1. Bioprocessos submerso – <i>F. oxysporum</i> URM 7401 | 33 |
| 3.3.2. Bioprocessos sólido – <i>M. thermophila</i> | 34 |
| 3.4. <u>Proteoma</u> : obtenção e processamento | 35 |
| 3.4.1. Extração das proteínas intracelulares | 35 |
| 3.4.2. Precipitação das proteínas intracelulares | 36 |
| 3.5. Eletroforese bidimensional | 36 |
| 3.5.1. Primeira dimensão - focalização isoeletrica | 36 |
| 3.5.2. Equilíbrio das tiras focalizadas | 37 |
| 3.5.3. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE) | 38 |
| 3.5.4. Coloração dos géis bidimensionais | 39 |
| 3.5.5. Obtenção e análise de imagens dos géis bidimensionais | 39 |
| 3.5.6. Digestão triptica e espectrometria de massas por MALDI (ionização/dessorção a laser assistida por matriz) | 40 |
| 3.5.7. Análises de bioinformática das proteínas intracelulares | 42 |
| 3.6. <u>Secretoma</u> : Obtenção e processamento | 43 |
| 3.6.1. Obtenção do secretoma de <i>F. oxysporum</i> URM 7401 | 43 |
| 3.6.2. Obtenção do secretoma de <i>M. thermophila</i> | 44 |

| | |
|--|-----|
| 3.7. Ensaio de atividade enzimática | 45 |
| 3.7.1. Atividade de peptidase | 45 |
| 3.7.2. Atividade de lipase | 46 |
| 3.7.3. Atividade de amilase, CMCase, invertase, pectinase e xilanase | 47 |
| 3.7.4. Atividade de FPase | 48 |
| 3.7.5. Atividade de β -glicosidase | 48 |
| 3.7.6. Atividade de lacase | 49 |
| 3.8. Processamento do secretoma de <i>F. oxysporum</i> URM 7401 para espectrometria de massas | 50 |
| 3.9. Processamento do secretoma de <i>M. thermophila</i> para espectrometria de massas | 51 |
| 3.9.1. Preparo de soluções | 52 |
| 3.10. Digestão triptica e espectrometria de massas utilizando LC-MS acoplada ao ESI-Q-TOF | 53 |
| 3.10.1. Análises de bioinformática das proteínas secretadas | 54 |
| 3.10.2. Predição de propriedades das proteínas identificadas utilizando análises <i>in silico</i> | 55 |
| 3.11. Ensaio da degradação de resíduos agroindustriais por extratos de <i>F. oxysporum</i> URM 7401 | 56 |
| 3.12. Ensaio da degradação de resíduos agroindustriais por extratos de <i>M. thermophila</i> | 57 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 58 |
| 4.1. Efeito de pH sobre o perfil de proteínas intracelulares do fungo <i>F. oxysporum</i> | 58 |
| 4.2. Efeito de pH sobre a produção de hidrolases pelo fungo <i>F. oxysporum</i> | 69 |
| 4.3. Efeito de fontes de nitrogênio sobre o perfil de proteínas intracelulares do fungo <i>F. oxysporum</i> | 74 |
| 4.4. Efeito de fontes de nitrogênio sobre a produção de hidrolases pelo fungo <i>F. oxysporum</i> | 126 |
| 4.5. Identificação de proteínas secretadas por <i>F. oxysporum</i> URM 7401 cultivado com 1% (m/v) de caseína ou farinha de pena | 135 |
| 4.6. Degradação de resíduos agroindustriais pela ação do complexo enzimático produzido por <i>F. oxysporum</i> URM 7401 em bioprocessamento submerso | 144 |
| 4.7. Parâmetros de cultivo do bioprocessamento sólido com <i>M. thermophila</i> utilizando resíduos agroindustriais | 148 |
| 4.8. Produção de enzimas por <i>M. thermophila</i> em bioprocessamento sólido | 153 |
| 4.9. Identificação de proteínas secretadas por <i>M. thermophila</i> em bioprocessamento sólido com resíduos agroindustriais | 164 |
| 4.10. Degradação de resíduos agroindustriais pela ação do complexo enzimático produzido por <i>M. thermophila</i> em bioprocessamento sólido | 183 |
| 5. CONCLUSÃO | 188 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 189 |
| APÊNDICE A | 205 |
| APÊNDICE B | 206 |
| APÊNDICE C | 209 |
| APÊNDICE D | 211 |
| APÊNDICE E | 215 |
| APÊNDICE F | 216 |

| | |
|------------|-----|
| APÊNDICE G | 217 |
| APÊNDICE H | 218 |
| APÊNDICE I | 219 |
| APÊNDICE J | 220 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. O paradoxo dos fungos filamentosos na sociedade atual

Os fungos são classificados em sete filos *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Zygomycota*, *Glomerulomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Estes microrganismos estão presentes na natureza desde tempos remotos e estão relacionados a uma série de condições relevantes, tais como: decompositores envolvidos na reciclagem de nutrientes, patógenos de plantas, animais domésticos e humanos, e produtores de moléculas com potencial biotecnológico (CHAMBERGO; VALÊNCIA, 2016).

Atualmente, as moléculas com aplicações biotecnológicas estão classificadas em quatro grupos de cores que são conhecidas como biotecnologia vermelha (saúde, médica, diagnóstico e farmacêutica); biotecnologia verde (agrícola, produção de alimentos e ração, biocombustíveis, biorremediação e outras); biotecnologia branca (biotecnologia industrial) e biotecnologia azul (biotecnologia marinha, aquicultura) (CHAMBERGO; VALÊNCIA, 2016).

Grandes empresas europeias, como AB Enzymes, BASF, Bayer, DuPont, Novozymes, entre outras, têm utilizado fungos filamentosos como sistemas de produção. A versatilidade metabólica, robustez e capacidade de secreção destes microrganismos tem sido explorada em processos estabelecidos para a produção de ácidos orgânicos, proteínas, enzimas, além de antibióticos, estatinas e esteroides (MEYER et al., 2016).

Dentre as moléculas produzidas por fungos filamentosos, as enzimas possuem diferentes propriedades e podem ser exploradas pelas diferentes aplicações industriais. Alguns exemplos destas enzimas e suas aplicações estão apresentados no QUADRO 1.

Quadro 1 – Algumas aplicações industriais de enzimas produzidas por fungos

| Enzima | Função | Aplicação industrial |
|--|---|-----------------------------|
| Peptidase ácida Peptidase neutra Lipase Catalase | Coagulação do leite Maturação de queijos Maturação de queijos, sabor Processamento de queijos | Laticínios* |
| Amilase Xilanase Lipase Glicose oxidase | Textura de pães Condicionamento da massa Condicionamento e estabilidade da massa Fortalecimento da massa | Panificação* |
| Pectinase Glicose oxidase Celulase α -amilase β -amilase β -glucanase Pululanase Naringinase Limoninase | Remoção de pectina Remoção de oxigênio Liquefação de frutas Hidrólise de amido Hidrólise de amido Reduz a turbidez Sacarificação do amido Controle de amargor Controle de amargor | Bebidas* |
| Fitase Xilanase β -glucanase | Hidrólise de ácido fítico para disponibilização de fósforo Aumentar a digestibilidade do amido Auxiliar a digestão | Ração animal* |
| Peptidase Lacase | Remoção de biofilme Delignificação, alvejante | Papel e celulose* |
| Amilase Lipase Peptidase Celulase Cutinase Mananase | Remoção de manchas de carboidratos Remoção de manchas de gordura Remoção de manchas de proteína Clareamento Remoção de triglicerídeos Remoção de mananas | Detergente* |
| Peptidase alcalina Peptidase neutra Lipase Amilase | Remoção de pêlos Remoção de pêlos Remoção de gorduras Separação das fibras | Couro* |
| Superóxido dismutase Peptidase Endoglicosidase Lacase Lipase | Cuidados com a pele, remoção de radicais livres Remoção de células mortas Cuidados com a saúde bucal Tintura para cabelo Cuidados com a pele | Cosméticos* |
| Amilase Amilglicosidase Lipase Peptidase Lacase Cutinase Manganês peroxidase Lignina peroxidase | Biorremediação de resíduos vegetais Hidrólise de amido para biorremediação Degradação de hidrocarbonetos de petróleo Biorremediação de resíduos com queratina Degradação de oleofinas, poliuretano e compostos fenólicos Degradação de plásticos, policaprolactona Degradação de compostos fenólicos Degradação de compostos fenólicos | Tratamento de resíduos* |
| Quitinase Glucanase Lipase Peptidase | Degradação dos diferentes componentes da parede celular de patógenos (quitina e outros polissacarídeos, lipídeos, proteínas) | Controle biológico** |
| L-asparaginase | Tratamento de leucemia linfoblástica aguda e linfossarcoma | Farmacêutica*** |

Fonte: Elaborado pela autora baseado em *SINGH et al., 2016; **LIMA et al., 2017; ***LOPES et al., 2015

A utilização de fungos associada a ferramentas biotecnológicas tem papel central em muitos setores industriais, incluindo o setor de alimentos, de fármacos, de papel e polpa (celulose), de detergentes, têxtil e de biocombustíveis (LOBEDANZ et al., 2016), entretanto, de modo geral, apenas uma pequena fração de fungos filamentosos, com os mais diversos potenciais de produção, tem sido explorada (MEYER et al., 2016).

Em 2015, o mercado global de enzimas industriais obteve cerca de € 3,5 bilhões, enquanto que, numa análise mais abrangente, a estimativa para o mercado da biotecnologia industrial, em 2020 é de € 450 bilhões (MEYER et al., 2016). No QUADRO 2 estão apresentados alguns produtos, compostos por enzimas produzidas por fungos, que já são comercializadas.

Quadro 2 – Enzimas produzidas por fungos comercialmente disponíveis

| Microrganismo de origem | Produto (*) | Enzimas |
|--|---|---|
| <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus sp.</i> | AMG 300L™ Viscozyme® L | Amiloglucosidase Arabinase, celulase, β-glucanase, hemicelulase e xilanase |
| <i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Aspergillus sp.</i> | Novozyme 188 Celluclast® 1.5L Carezyme 1000L® | Celobiase Celulase Celulase |
| <i>Thermomyces lanuginosus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i> | Lecitase™ Ultra Fructozyme L™ Inulase Lipolase 100L | Fosfolipase A1 Inulinase Lipase |
| <i>Candida sp.</i> <i>Candida antarctica</i> <i>Candida sp.</i> | NovoCor AD L Novozyme 435 Novozymes® CALB L | Lipase Lipase Lipase |
| <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus aculeatus</i> | Palatase® 20,000L Pectinex Ultra Clear® Pectinex® Ultra SPL | Lipase Pectinase Pectinase |
| <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i> <i>Aspergillus oryzae</i> | Flavourzyme® Pentopan Mono BG® Fungamyl® 800L | Peptidase Xilanase α-amilase |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Trichoderma harzianum</i> | Lactase Lactozyme® 2600 L Glucanex® | β-Galactosidase β-glucanase, celulase, peptidase e quitinase |

* Enzimas produzidas por Novozymes. As informações foram obtidas em <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=14572954> (NOVOZYMES, 2017).

Fonte: Elaborado pela autora.

Apesar de todo o potencial biotecnológico, os fungos filamentosos também são explorados por uma outra face que apresentam, umavez que alguns destes microrganismos ameaçam a oferta de alimentos, a segurança alimentar e a saúde (MEYER et al., 2016).

Anualmente, as doenças causadas por fungos filamentosos têm reduzido em pelo menos 10% a oferta de alimentos em todo o mundo, principalmente devido ao surgimento de linhagens hipervirulentas e pela disseminação em novas áreas geográficas. Além disso, a detecção de micotoxinas nesses cultivos é preocupante, pois é mais um fator capaz de causar doenças (NORMILE, 2010).

Neste contexto, o mercado de fungicidas atingiu € 10 bilhões, em 2014, e a sua perspectiva de crescimento, deverá acompanhar o ritmo de avanço das doenças. Além disso, o desenvolvimento de resistência por algumas linhagens, como reflexo da utilização de fungicidas, também teve impacto sobre os índices de infecções causadas por fungos, que matam mais de 2 milhões de pessoas por ano (DENNING; BROMLEY, 2015).

1.2. *Fusarium oxysporum*

F. oxysporum é um fungo filamentoso que pode ser encontrado em solos com diferentes características, além disso, é categorizado como mesofílico e classificado como ascomiceto (FANG; BARBETTI, 2014).

O complexo de espécies de *F. oxysporum* compreende diferentes *formae speciales* (f. sp.) as quais coletivamente infectam mais de 100 diferentes espécies de hospedeiros, causando danos e muitas perdas aos cultivos (DEAN et al., 2012).

A *formae speciales* de patógenos é determinada por ensaios com plantas de diferentes espécies, enquanto que a raça destes microrganismos é definida por ensaios de patogenicidade sobre diferentes cultivos de uma mesma espécie. Como exemplos de *formae speciales* temos: *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, que atacam cultivos de banana e tomate, respectivamente. Como exemplos de raças, temos *F. oxysporum* f. sp. *cubense* *race 1* e *F. oxysporum* f. sp. *cubense* *race 4*, que são classificadas por ensaios de patogenicidade em bananeiras da mesma espécie (FRAVEL; OLIVAIN; ALABOUVETTE, 2003).

Entre as espécies de cultivos atingidos por *F. oxysporum* alguns são economicamente importantes (FANG et al., 2015) e por esse motivo uma série de estudos tem sido realizada para se conhecer melhor este microrganismo. O sucesso deste fitopatógeno depende da interação com os hospedeiros e de

alterações metabólicas que lhe permite infectar o tecido da planta (CARACUEL et al., 2003).

Neste contexto, as proteínas secretadas por fitopatógenos são essenciais, com destaque especial para enzimas que causam degradação do tecido vegetal. A ação destas moléculas está relacionada à virulência do fungo e, por esse motivo, podem ser estudadas como alvos para controle de doenças (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; JORRIN-NOVO, 2012).

De modo interessante, o arsenal enzimático de espécies de *Fusarium*, que favorece o estabelecimento deste fitopatógeno, também tem sido positiva e diferencialmente explorado. Recentemente, um levantamento mostrou uma grande diversidade de enzimas já conhecidas por aplicações biotecnológicas: lacases, quitinases, peptidases, lipases, quitina deacetilase, β -glicosidase, β -mananase, nitrilase, endoglucanase, xilanase e celulase (PESSÔA et al., 2017).

Além da produção de enzimas com as mais diversas aplicações, o fungo *F. oxysporum* tem se destacado na realização de bioprocessos consolidados. O conceito deste tipo de bioprocessos foi proposto em 1996 e é baseado no emprego de microrganismos capazes de produzir enzimas, que hidrolisam os carboidratos, presentes na biomassa, em monossacarídeos; e de fermentar os monossacarídeos gerados (hexoses e pentoses), em uma única etapa (ALI et al., 2014).

Em relação à execução individualizada das etapas, o bioprocessos consolidados apresenta como vantagens a redução de custos e o aumento da eficiência na produção de bioetanol; além de permitir a utilização de fontes renováveis e de baixo custo, como a biomassa lignocelulósica (HASUNUMA et al., 2013).

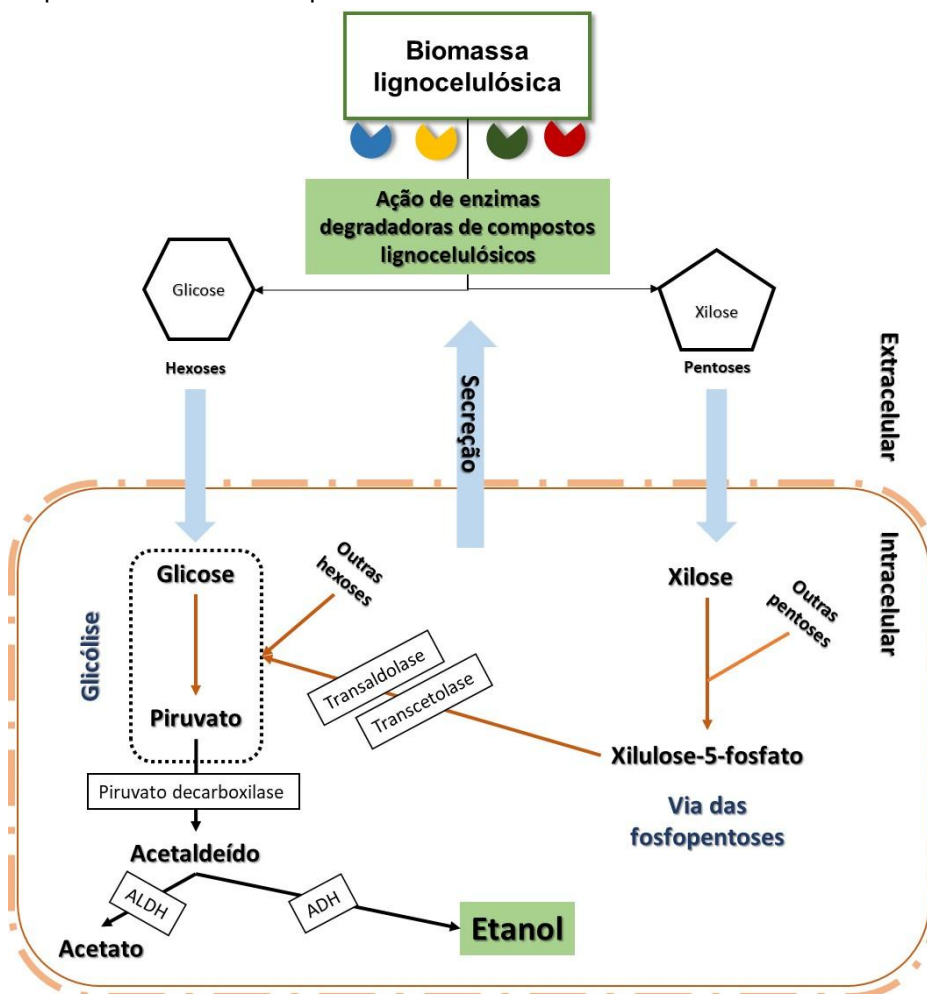
Num primeiro momento, o bioprocessos consolidados foi pensado como uma estratégia para bactérias e leveduras, entretanto, alguns estudos mostraram o potencial de fungos filamentosos. A grande vantagem destes microrganismos, e em especial de *F. oxysporum*, é a produção de altos níveis de enzimas lignocelulolíticas e maior tolerância aos inibidores que são gerados durante o bioprocessos (ALI et al., 2016).

Saccharomyces cerevisiae é o principal produtor de etanol pelas vias tradicionais, entretanto é inapto ao bioprocessos consolidados, pois é ineficiente na

produção de celulases e hemicelulases, além de sua incapacidade de utilizar xilose, devido a ausência de enzima da via das fosfopentoses (PPP) (ANASONTZIS et al., 2014).

A utilização de hexoses e pentoses, geradas pela degradação de compostos lignocelulósicos, é um requisito importante no bioprocessamento consolidado, pois pode melhorar o rendimento na geração de etanol. Na FIGURA 1 é possível observar alguns pontos importantes para a realização de bioprocessamento consolidado que estão presentes em *F. oxysporum*.

Figura 1 – Ilustração de etapas, vias metabólicas e enzimas importantes para a realização de bioprocessamento consolidado por *Fusarium*



Legenda: ADH: álcool desidrogenase; ALDH: aldeído desidrogenase.

Enzimas envolvidas no processo estão nos retângulos com borda. As formas retangulares em verde indicam os produtos cruciais para a ocorrência do bioprocessamento consolidado, ou seja, o microrganismo deve ser capaz de produzir enzimas lignocelulolíticas e realizar a fermentação alcoólica.

Fonte: Elaborado pela autora, baseado em ALI et al., 2016.

A capacidade de utilização da xilose e outras pentoses está relacionada a PPP. Por esse motivo, entre as estratégias para aumentar o rendimento na produção de etanol está o aumento dos níveis de enzimas da PPP (VILELA et al., 2015).

1.3. *Myceliophthora thermophila*

O fungo filamentoso *M. thermophila* (também chamado de *Sporotrichum thermophile*) é termofílico, com crescimento ótimo a 45 °C, distribuído mundialmente, principalmente em solos, e classificado como um ascomiceto. Um levantamento sobre o potencial de *M. thermophila* mostrou uma grande diversidade de enzimas secretadas conhecidas por suas diferentes aplicações biotecnológicas: celulases, hemicelulases, pectinases, fitases, α -galactosidase, queratinase, mananases, lacases, amilases, lipase e outras (SINGH, 2016).

O sequenciamento do genoma de *M. thermophila* identificou cerca de 9500 genes, dos quais um elevado número codificava enzimas relevantes industrialmente, como por exemplo: enzimas ativas sobre carboidratos (denominadas como CAZy), peptidases, oxirredutases, lipases. Além disso, mais de 200 sequências identificadas estavam exclusivamente envolvidas na degradação da parede celular de plantas; e codificavam, principalmente, duas classes de CAZy: glicosil hidrolases (GH) e polisacarídeo liases (PL) (BERKA et al., 2011).

As CAZy estão organizadas em um banco de dados (<http://www.cazy.org/>), constantemente atualizado, que descreve famílias de enzimas com estruturas catalíticas relacionadas e módulos de ligação a carboidratos; envolvidos na degradação, modificação ou criação de ligações glicosídicas (LOMBARD et al., 2014). No QUADRO 3 estão apresentadas algumas informações sobre as CAZy.

Quadro 3 – Informações sobre as proteínas classificadas como CAZy

| Grupo | Sigla | Função | Famílias* |
|---|--------------|--|------------------|
| Glicosil hidrolases | GHs | Hidrólise e/ou rearranjo de ligações glicosídicas | 145 |
| Polissacarídeo liases | PLs | Clivagem não hidrolítica de ligações glicosídicas | 27 |
| Glicosil transferases | GTs | Formação de ligações glicosídicas | 105 |
| Carboidrato esterases | CEs | Hidrólise de ésteres de carboidratos | 16 |
| Atividades auxiliares | AAs | Enzimas com ação redox que atuam em conjunto com outras CAZy | 13 |
| Módulos de ligação a carboidrato | CBMs | Auxilia a ação de outras CAZy pela capacidade de adesão a carboidratos | 81 |

*Os grupos possuem sequências não classificadas. As informações estão disponíveis em: <http://www.cazy.org/> (Acesso 07 de novembro de 2017)

Elaborado pela autora.

As análises gênicas revelaram que *M. thermophila* apresenta cerca de 30 celulasas, 66 hemicelulasas e 35 proteínas com atividades auxiliares, que em conjunto abrangem as principais categorias de CAZy. O repertório de *M. thermophila* se destaca pelas enzimas com atividades auxiliares, especialmente pela família AA9, que possui atividade de monooxigenase lítica de polissacarídeos (LPMO). Em conjunto, as atividades desempenhadas por estas enzimas estão relacionadas à degradação de compostos lignocelulósicos (KARNAOURI et al., 2014).

Além das informações gênicas, dados experimentais também têm validado o potencial de *M. thermophila* na degradação dos principais polissacarídeos encontrados em biomassa. Esta eficiência na liberação de açúcares fermentescíveis, a partir de biomassa, é de extrema importância para o potencial de aplicação em alguns processos, uma vez que, por exemplo, é o principal desafio na produção de biocombustíveis (SINGH, 2016).

Por outro lado, a capacidade de degradar compostos lignocelulósicos reduz o impacto do acúmulo destes compostos sobre a natureza (SINGHANIA et al., 2009).

Alguns fungos filamentosos mesofílicos, pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*, são conhecidos produtores de enzimas, que possuem temperatura ótima entre 40 e 50 °C, capazes de degradar biomassa. No caso do fungo termofílico *M. thermophila*, as enzimas toleram temperaturas elevadas, entre 70 e 80 °C, proporcionando maiores taxas de hidrólises, que tornam estas enzimas atrativas para diferentes processos industriais (SINGH, 2016).

A maior eficiência hidrolítica não se justifica exclusivamente pela termoestabilidade de enzimas secretadas por termófilos; e outros fatores têm sido pontuados. O amplo espectro enzimático, com elevada atividade específica para compostos lignocelulósicos, associada ao grande número de enzimas auxiliares, têm sido apontados como os responsáveis por acelerar a degradação de biomassa (BERKA et al., 2011).

1.4.A importância dos parâmetros dos bioprocessos na produção de proteínas

Os fungos são conhecidos produtores de enzimas com potencial biotecnológico e apresentam como vantagens: os elevados níveis de produção, a certificação de algumas espécies para a indústria, o rápido crescimento e a capacidade de secretar proteínas funcionais, com enovelamento correto e com as modificações pós-traducionais necessárias (KOSALKOVÁ et al., 2012; EL-ENSHASY, 2007).

Além disso, a versatilidade dos fungos filamentosos permite diferentes respostas metabólicas aos substratos disponíveis (GÓMES-MENDOZA et al., 2014).

A modificação das condições e parâmetros de cultivo pode fornecer informações, uma vez que pequenas alterações no meio de cultura modificam a síntese de metabólitos (TAKAHASHI et al., 2013); e estudos acerca da regulação destas alterações têm avançado para fungos com potencial industrial, principalmente nos aspectos de desempenho e produção (AGHCHEH; KUBICEK, 2015).

1.4.1 Parâmetro de bioprocesso: Temperatura

A temperatura afeta o crescimento do microrganismo e a produção de metabólitos. O comportamento da temperatura sobre a taxa de crescimento de um microrganismo é similar ao observado na atividade ótima de uma enzima, aumentando gradativamente até atingir a temperatura ótima com uma incisiva diminuição em temperaturas superiores (ADAV; RAVINDRAN; SZE, 2013; BHUNIA; BASAK; DEY, 2012).

Os fungos são classificados como psicrófilos, mesófilos e termófilos, de acordo com a temperatura de crescimento. Fungos mesofílicos, como *F. oxysporum* utilizado neste trabalho, tem temperatura ótima de crescimento a 30 °C, enquanto que o termófilo *M. thermophila* tem crescimento adequado a 45 °C.

Em bioprocessos sólidos, a temperatura é um fator crucial, uma vez que a transferência de calor do cultivo, provoca o aquecimento do material e prejudica o

crescimento microbiano e a produção de enzimas (ORDAZ-HERNÁNDEZ et al., 2016).

1.4.2 Parâmetro de bioprocesso: pH

O pH é o principal fator que influencia as vias metabólicas e afeta a eficiência da síntese e produção de enzimas industriais (ADAV et al., 2011).

Além disso, alterações no pH extracelular podem induzir estresse sobre funções celulares, tais como: disponibilidade de micronutrientes, função de proteínas e potencial de membrana. Por esse motivo, as vias de sinalização de controle de pH extracelular são componentes importantes para a maquinaria celular (SELVIG; ALSPAUGH, 2011).

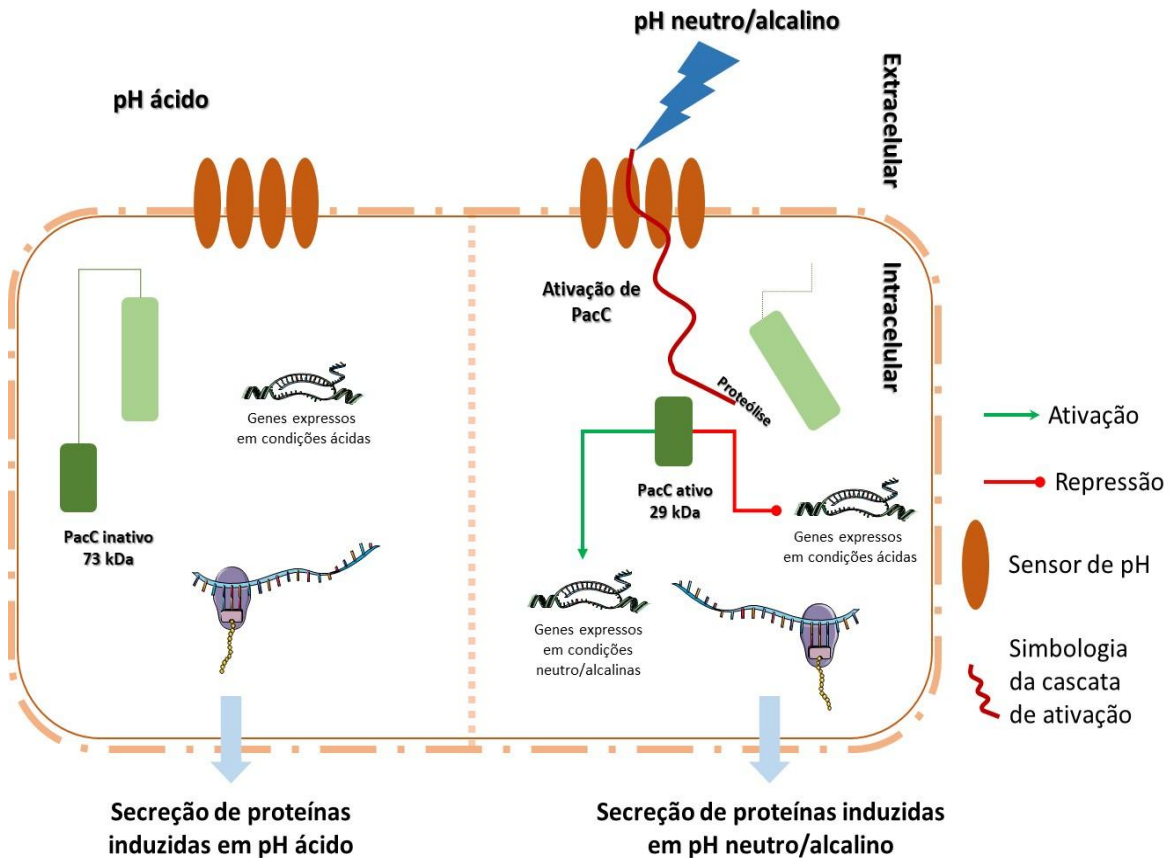
Em fungos, o pH extracelular também atua diretamente na sinalização para crescimento, diferenciação e virulência; e na regulação da expressão gênica, que é mediada por uma cascata de sinalização integrada de sete genes: *pacC* (que codifica o fator de transcrição), além de *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* e *pall* que atuam na transdução de sinais mediada por pH neutro-alkalino (PEÑALVA et al., 2008).

Um sistema de regulação similar, mediado pelo fator de transcrição PacC, também tem sido relacionado ao fungo *F. oxysporum* (CARACUEL et al., 2003).

O mecanismo proposto indica que, em pH alcalino, a proteína PacC intacta e inativa (com massa molecular de 73 kDa) é clivada proteoliticamente e resulta em uma fração menor e funcional (com massa molecular de 29 kDa). A forma ativa de PacC ativa genes que são preferencialmente expressos em pH alcalino e também reprime genes expressos em condições ácidas (PEÑALVA et al., 2008).

Na FIGURA 2 está apresentado um esquema que ilustra a modulação por PacC.

Figura 2 – Regulação mediada por PaC como resposta ao pH extracelular



Em pH ácido, o fator de transcrição PacC está inativo e os genes expressos em condições ácidas estão ativos. Em pH neutro/alcalino, o fator de transcrição PacC é ativado por proteólise, ao fim de uma cascata de eventos. Os genes expressos em condições ácidas são reprimidos, enquanto que os genes expressos em condição alcalina são ativados.

Fonte: Elaborado pela autora, baseado em PEÑALVA et al., 2008. Ácidos nucleicos e ribossomos obtidos em <http://servier.com.br/content/slide-kit?item=7> (SERVIER, 2017).

Entre os genes cuja expressão é controlada por PacC temos, por exemplo, os que codificam enzimas extracelulares, componentes de vias de biossíntese de metabólitos secundários e proteínas envolvidas na biossíntese de parede celular (CARACUEL et al., 2003).

Fosfatases ácidas e alcalinas, ilanase e peptidases são algumas das proteínas moduladas por PacC (PEÑALVA et al., 2008). Além destas, algumas enzimas envolvidas na degradação de compostos lignocelulósicos, tais como, celulasas e hemicelulasas, também são responsivas ao pH extracelular (HÄKKINEN et al., 2015).

1.4.3 Parâmetro de bioprocesso: Fonte de carbono

Para o desenvolvimento de microrganismos, as fontes de carbono orgânicas e/ou inorgânicas buscam mimetizar as condições ambientais que atendam as exigências nutricionais de cada espécie. A utilização de fontes de carbono pelos microrganismos se baseia em dois processos principais: indução ou repressão catabólica de carbono (CCR) (BENOCCI et al., 2017).

Em fungos filamentosos, o principal regulador da CCR é o fator de transcrição CreA/CRE1/CRE-1. O objetivo da CCR é evitar o gasto desnecessário de energia com a produção de enzimas extracelulares e com vias metabólicas, que não serão utilizadas (BENOCCI et al., 2017).

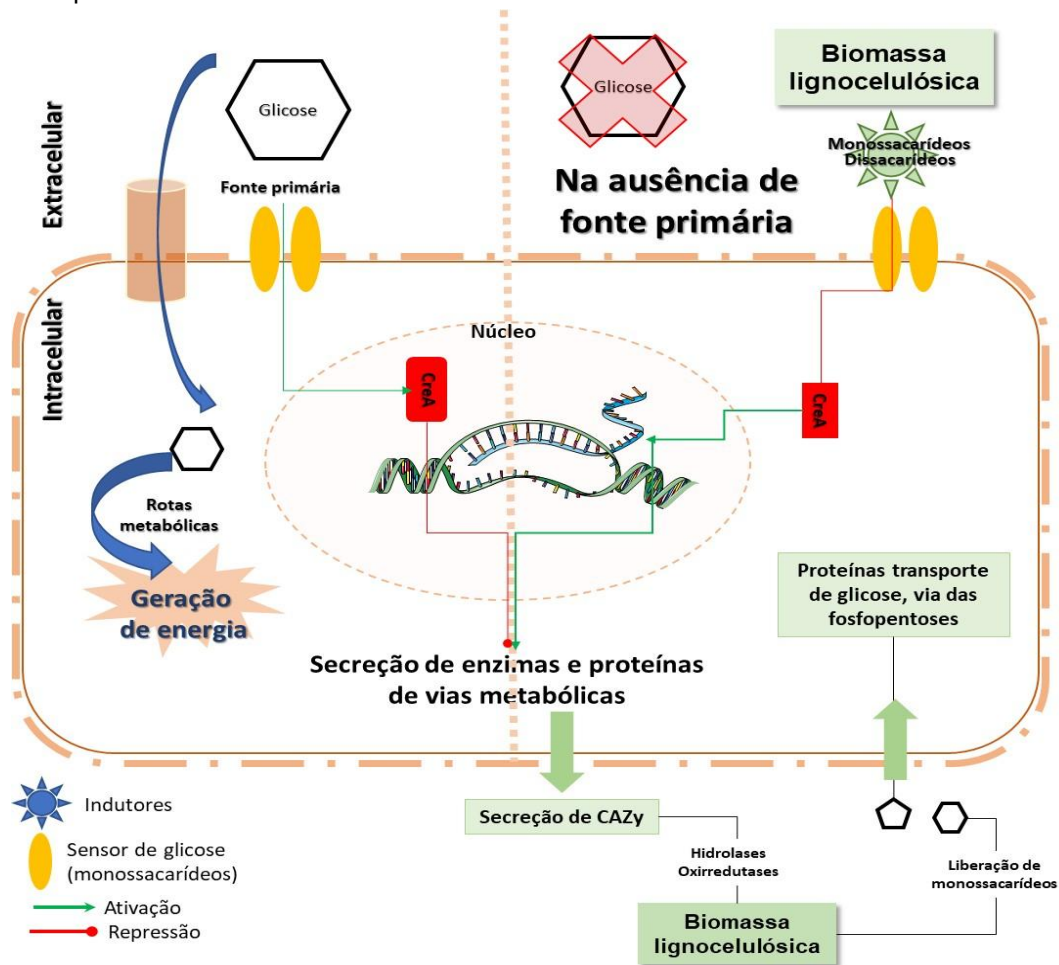
Neste sistema, a concentração de monossacarídeos é detectada por sensores de glicose (proteína quinase cAMP) e, quando em concentração suficiente, o fator de transcrição CreA, localizado no núcleo, causa a repressão de genes alvos (HUBERMAN et al., 2016).

No ausência ou insuficiência de fontes de carbono preferenciais e energeticamente favoráveis, como por exemplo, a glicose, ocorre o processo de indução. Monossacarídeos e dissacarídeos são os principais indutores deste processo, pois são escassos no meio ambiente, e assim que são detectados também sinalizam a ativação de fatores de transcrição (BENOCCI et al., 2017).

A indução pode ser exemplificada na utilização de biomassa vegetal. Inicialmente, os fungos precisam reconhecer seus componentes (polissacarídeos), e após a ativação de fatores de transcrição; induzir tanto a produção de enzimas quanto os constituintes de vias metabólicas, capazes de converter os açúcares em energia e/ou bioprodutos (BENOCCI et al., 2017).

Na FIGURA 3 está apresentado um esquema que ilustra a modulação por CreA.

Figura 3 – Esquema simplificado da regulação mediada por CreA como resposta às fontes de carbono disponíveis



Na presença de glicose, o fator de transcrição CreA inibe a expressão de enzimas lignocelulolíticas e de proteínas de vias metabólicas envolvidas no processamento de monossacarídeos gerados.

Legenda: CAZy (enzimas ativas sobre carboidratos).

Fonte: Elaborado pela autora, baseado em ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005. Ácidos nucleicos obtidos em <http://servier.com.br/content/slide-kit?item=7> (SERVIER, 2017).

O papel de CreA, na regulação da repressão catabólica de carbono, o faz interagir com diferentes fatores de transcrição envolvidos na utilização de polissacarídeos de biomassa lignocelulósica. No processo de indução, os fatores de transcrição atuam principalmente na expressão de genes que codificam CAZy hidrolíticas e oxidativas, assim como, proteínas de rotas metabólicas necessárias para a utilização da fonte de carbono disponível (CULLETON; MCKIE; VRIES, 2013).

A síntese de enzimas lignocelulolíticas leva a um aumento de proteínas no retículo endoplasmático, na via de secreção, o que gera um estresse devido à demanda aumentada. O dobramento e o transporte de proteínas prejudicados desencadeiam respostas, como por exemplo, a ativação da via de proteínas desdobradas (*unfolded protein response*) (UPR). A via UPR induz a expressão de

genes que corrigem a conformação das proteínas defeituosas. Além da UPR, outros mecanismos também são desencadeados com o objetivo de reduzir a transcrição de enzimas lignocelulolíticas (HUBERMAN et al., 2016).

O aumento na concentração de monossacarídeos, gerados pela degradação dos polissacarídeos, também pode dar início a um novo processo de repressão catabólica de carbono (BENOCCI et al., 2017). Os bioprocessos sólidos são utilizados como estratégia para retardar o início do processo de CCR, e prolongar o período de cultivo para aumentar o rendimento de enzimas produzidas (SANTOS et al., 2016). Por esse motivo, estabelecer corretamente as estratégias de cultivo pode aumentar a produção de enzimas de interesse.

A relação entre mecanismos de controle de carbono e nitrogênio também já são conhecidas. Os aminoácidos são reconhecidos como fontes de nitrogênio, entretanto, na ausência de glicose, os fungos filamentosos podem utilizar seus esqueletos de carbono na gliconeogênese (FLECK; SCHOBEL; BROCK, 2011). A interferência entre estes sistemas de regulação também justifica os efeitos negativos sobre a produção de CAZy, em condições limitantes de N (BENOCCI et al., 2017).

1.4.4 Parâmetro de bioprocessos: Fonte de nitrogênio

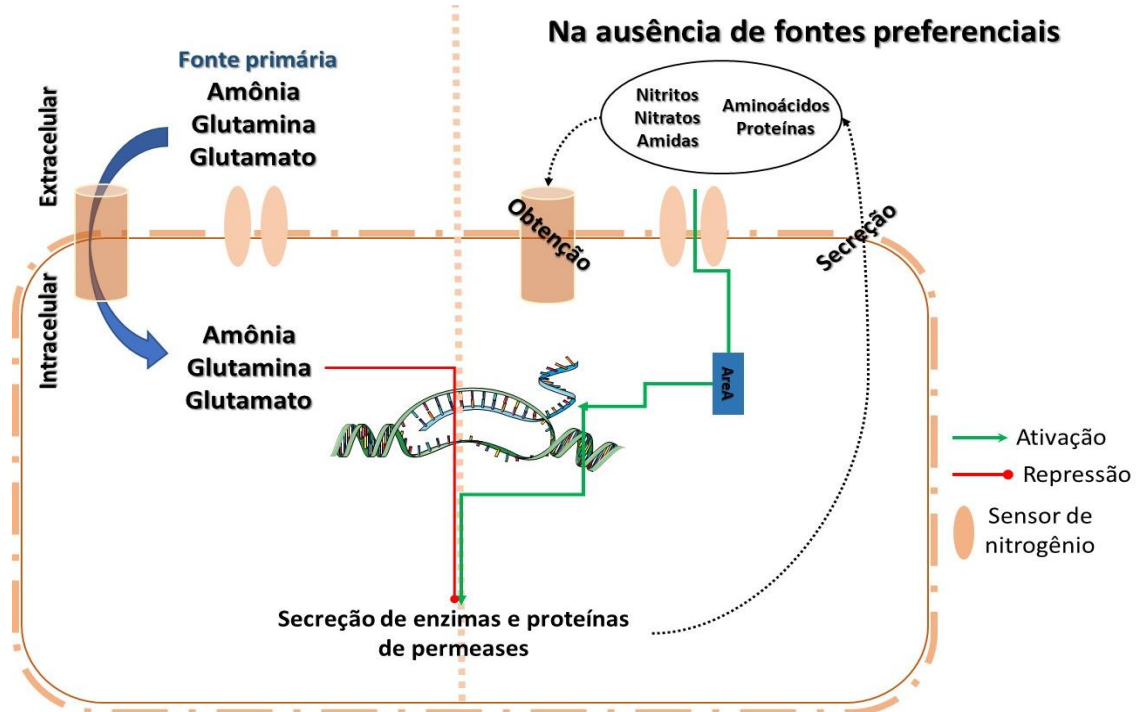
A qualidade e a quantidade de nitrogênio disponível no meio têm um impacto sobre o crescimento e a produção de metabólitos pelos microrganismos (TUDZYNSKI, 2014). De modo geral, os fungos filamentosos têm preferência por amônia, glutamina e glutamato, entretanto na ausência destas fontes, os microrganismos podem utilizar nitrito, nitrato, amidas, aminoácidos e proteínas (TER SCHURE; VAN RIEL; VERRIPS, 2000).

A utilização seletiva, dentro do metabolismo global de nitrogênio, é denominada de repressão catabólica de nitrogênio (NMR). Para ascomicetos, a regulação é mediada por fatores de transcrição da família GATA, tais como, AreA e Nit2, que foram descritos para *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa*, respectivamente (KRAPPMANN; BRAUS, 2005).

O fator de transcrição AreA é o principal regulador sensível a condição de nitrogênio. Em condições limitantes de N, AreA ativa uma série de genes envolvidos na aquisição e no catabolismo do nitrogênio alternativo; tais como, enzimas

específicas e permeases (BUGEJA; HYNES; ANDRIANOPOULOS, 2012). Na FIGURA 4 está apresentado um esquema que ilustra a modulação por AreA.

Figura 4 – Esquema simplificado da regulação mediada por AreA como resposta às fontes de nitrogênio disponíveis



Na ausência de fontes de nitrogênio primárias, o fator de transcrição AreA ativa a expressão de proteínas envolvidas na obtenção e catabolismo das fontes de nitrogênio alternativas.

Fonte: Elaborado pela autora, baseado em ARO et al., 2005. Ácidos nucleicos obtidos em <http://servier.com.br/content/slide-kit?item=7> (SERVIER, 2017).

1.4.5 Tipos de bioprocesso

Os bioprocessos podem ser classificados como sólido e submerso; e a principal diferença entre eles é a quantidade de água livre. No bioprocessos submerso, os constituintes estão diluídos no meio, enquanto que no bioprocessos sólido, o substrato é apenas umedecido. Industrialmente, a produção de koji, molho de soja e queijo são alguns dos principais exemplos da utilização de bioprocessos sólido (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000), entretanto, maior parte das indústrias produtoras de enzimas utiliza o bioprocessos submerso (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003).

A técnica selecionada deve considerar uma série de fatores, uma vez que cada uma tem vantagens e desvantagens; e algumas características importantes de cada tipo de bioprocessos estão apresentadas na TABELA 1.

Tabela 1 – Características dos bioprocessos submerso e sólido

| Condição | Bioprocesso submerso | Bioprocesso sólido |
|---|--|--|
| Complexidade do meio | Meio definido Maior quantidade de compostos Maior reprodutibilidade | Meio indefinido Simples |
| Custo do meio | Elevado | Baixo Pode utilizar substratos renováveis * |
| Atividade de água | Alta Maior risco de contaminação | Baixa Menor risco de contaminação |
| Produtividade volumétrica | Menor Produtos diluídos | Maior Produtos concentrados |
| Flexibilidade sobre a [substratos] | Se elevar a [substratos] pode causar problemas reológicos | Se elevada a [substratos] pode obter maior rendimento de produtos |
| Aeração | Necessita de elevada pressão para garantir a transferência na fase líquida | Baixa pressão |
| Temperatura | Maior controle Melhor transferência de calor | Menor controle Dificuldade para a retirada do calor gerado pelo metabolismo fúngico Problemas com aquecimento dos produtos |

Continua...

| Condição | Bioprocesso submerso | Bioprocesso sólido |
|--|---|---|
| Controle de parâmetros do processo (pH, temperatura, tensão de O₂) | Elevada Sensores disponíveis para verificar as condições do cultivo Possibilidade de intervenção | Baixa Dificultada pela ausência de controladores |
| Purificação dos produtos | Produto diluído Remoção de grandes volumes de água Custo elevado Purificação facilitada pela menor quantidade de contaminantes | Produto concentrado pode simplificar o processo Pode conter contaminantes oriundos do substrato |
| Uso de água | Alto | Baixo |
| Comportamento do microrganismo | Bem caracterizado Permite escalonamento com maior facilidade Microambiente não natural | Cinética de crescimento e fenômenos de transporte são pouco caracterizados Mimetiza as condições de crescimento naturais |

*Podem ser utilizados resíduos agroindustriais.

Fonte: Elaborado pela autora, baseado em MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000.

Os bioprocessos possuem características próprias, que impactam diretamente no tipo de produto, por isso, conhecer o comportamento dos microrganismos nessas condições, respeitando-se as suas peculiaridades, é fundamental para a obtenção dos melhores resultados.

O bioprocesso sólido também se torna economicamente interessante à medida que permite a utilização de resíduos agroindustriais, que são fontes renováveis, de baixo custo e elevada disponibilidade. Além disso, a utilização destes resíduos é ecologicamente desejável, pois o acúmulo destes compostos e a sua disposição inadequada tem gerado problemas ambientais (SINGHANIA et al., 2009).

1.4.5.1 Bioprocesso sólido: Resíduos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais gerados a partir do processamento de alimentos são, principalmente, palhas, grãos, farelos, farinhas e bagaço. No Brasil, as principais fontes de resíduos são cana de açúcar, soja, milho, arroz e trigo (PORTUGAL-PEREIRA et al., 2015).

Além da sua utilização como substratos em bioprocessos sólidos, os resíduos agroindustriais também podem ser utilizados na produção de bioetanol de 2ª geração (PEREIRA et al., 2016).

As vantagens atribuídas a este processo são a redução dos impactos econômicos, políticos e ambientais que estão associados ao uso de combustíveis fósseis. Além disso, também superam as questões acerca do cultivo de alimentos para a produção de etanol, como no caso do bioetanol de 1ª geração (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016).

Atualmente, cerca de 10% da energia em todo o mundo é derivada de biomassa vegetal e, nesse cenário, o Brasil ganha destaque como maior produtor de bioetanol, fato delegado à relevância econômica do seu setor agrícola e à quantidade de recursos disponíveis (WELFLE, 2017).

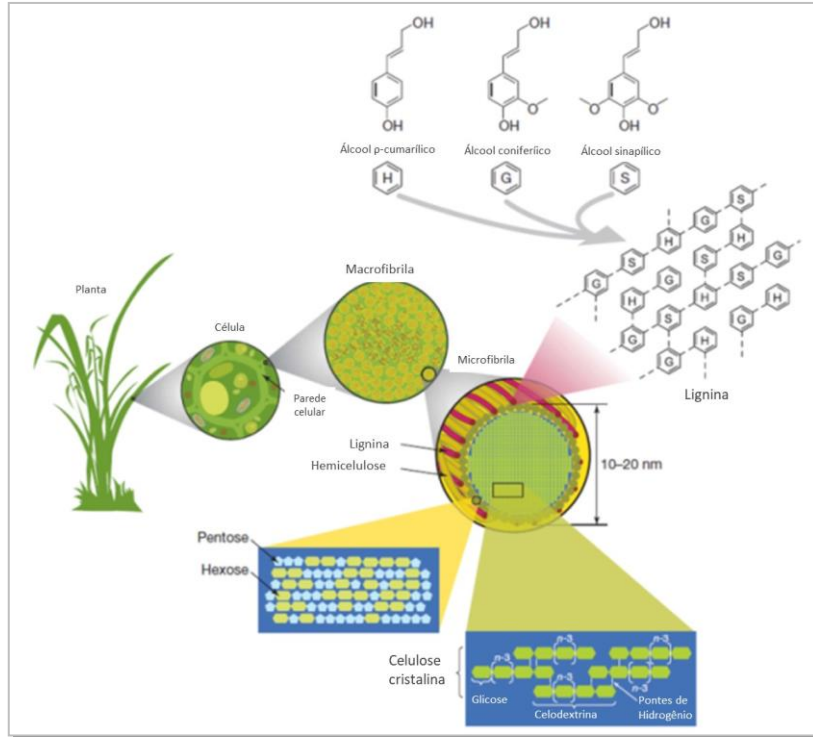
Apesar de todas as vantagens relacionadas à utilização de resíduos agroindustriais, a velocidade e eficiência da conversão de lignocelulose em açúcares é o principal obstáculo para a produção de bioetanol de 2ª geração. A dificuldade deste processo é reflexo da composição destes resíduos (SANTOS et al., 2016).

A biomassa lignocelulósica de plantas é composta majoritariamente por polissacarídeos, mas também por proteínas e lignina. As proporções de seus

constituintes são dependentes da espécie, tecido vegetal, clima e localização geográfica (BENOCCI et al., 2017).

Na FIGURA 5 estão apresentados os principais componentes dos resíduos lignocelulósicos, baseando-se nas estruturas da célula vegetal.

Figura 5 – Composição e interação entre os constituintes da célula vegetal.



Fonte: Extraído e modificado de POTTERS; VAN GOETHEM; SCHUTTE, (2010).

Os polissacarídeos podem ser classificados como de parede celular (celulose, hemicelulose e pectina) e de armazenamento (amido, inulina e gomas), e eles interagem entre si e também com a lignina (BENOCCI et al., 2017).

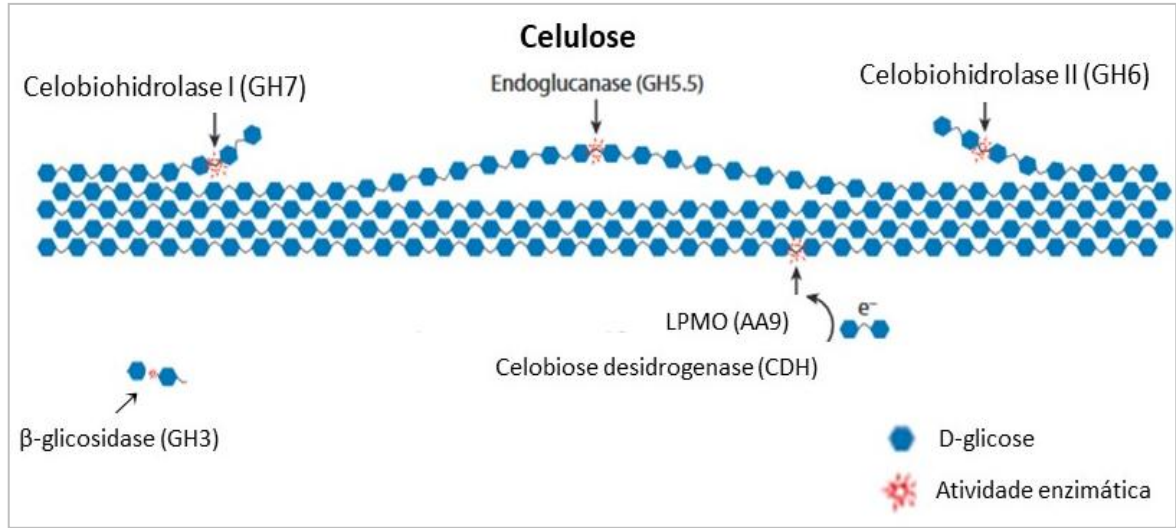
A celulose é o principal componente estrutural da parede celular e é composta por cadeias lineares de resíduos de D-glicose, com ligações do tipo β -1,4, que se organizam em microfibrilas altamente resistentes. Além disso, é o polissacarídeo mais abundante da parede celular correspondendo a cerca de 40-50% da biomassa vegetal (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014).

A degradação de celulose é mediada pela ação sinérgica de celulases, que são subdivididas em endocelulases, exocelulases {celodextrinases e celobiohidrolases do tipo I (CBH I, atuam em extremidades redutoras) e do tipo II (CBH II, atuam em extremidades não redutoras)} e β -glicosidases. Além da ação de hidrolases, a ação de oxirredutases, tais como monooxigenase lítica de

polissacarídeos (LPMO, da família AA9) e celobiose desidrogenase (CDH) também estão envolvidas no aumento da ação celulolítica (KARNAOURI et al., 2014).

A FIGURA 6 apresenta ilustrativamente os componentes da celulose presente na parede celular vegetal e as enzimas envolvidas em sua degradação.

Figura 6 – Celulose e algumas enzimas pertencentes às CAZy, envolvidas no seu processo de degradação



Legenda: GH (glicosil hidrolase), LPMO (monooxigenase lítica de polissacarídeos), AA (Atividade auxiliar).

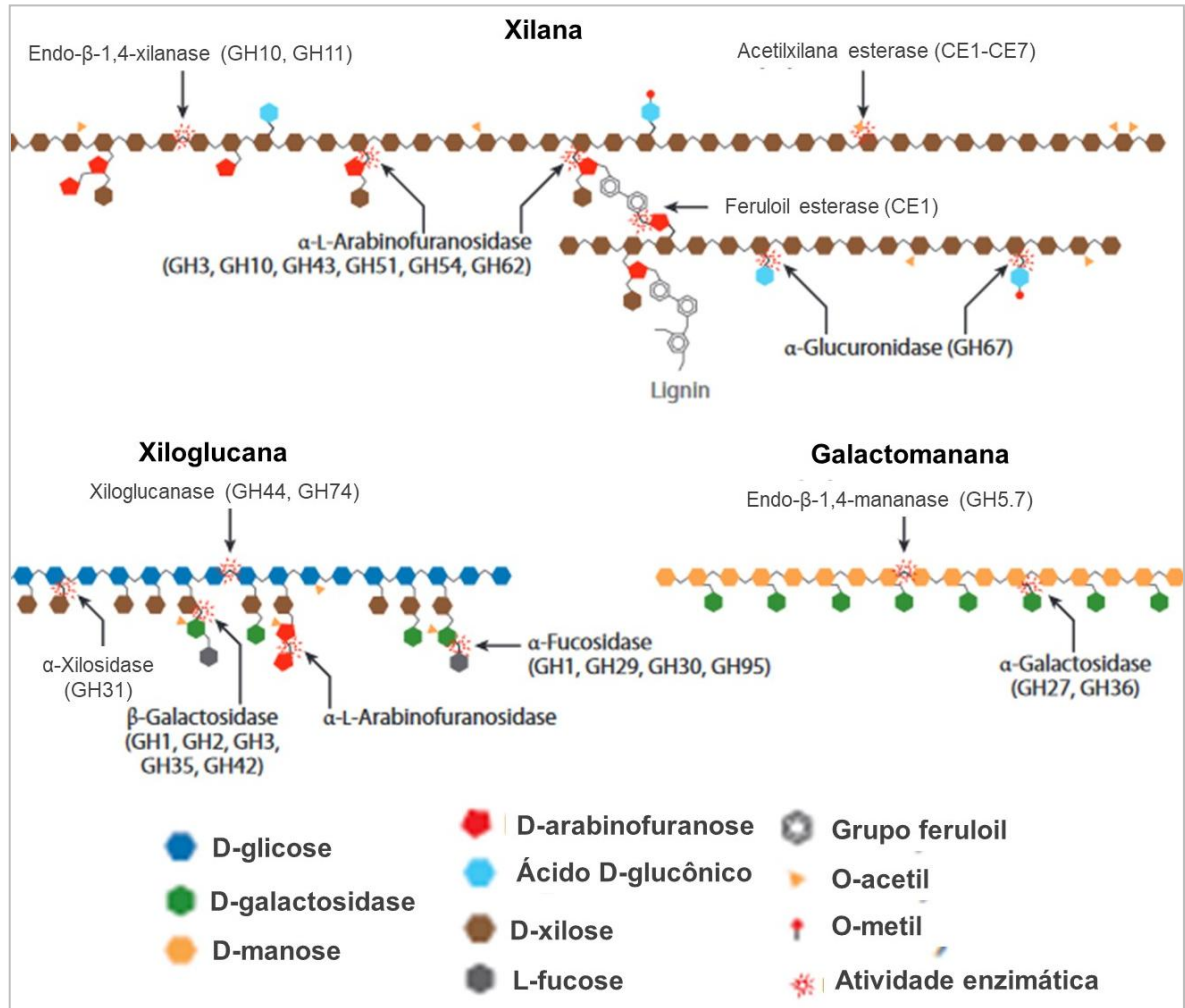
Fonte: Extraído e modificado de GLASS et al., 2013.

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante, que apresenta mais diversificação estrutural. Suas estruturas principais são xilana, xiloglicanas e mananas, que são heteropolímeros compostos por hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose) e pentoses (D-xilose e L-arabinose) (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014).

A complexidade estrutural de hemicelulose também se projeta na diversidade de enzimas envolvidas em sua degradação. Os grandes grupos enzimáticos são xilanases, arabinases, mananases e esterases, com enzimas pertencentes a diferentes famílias de glicosil hidrolases e carboidrato esterases (GLASS et al., 2013).

A FIGURA 7 apresenta ilustrativamente os componentes da hemicelulose presente na parede celular vegetal e a ação enzimática.

Figura 7 – Hemicelulose e algumas enzimas pertencentes às CAZy, envolvidas no seu processo de degradação



Legenda: GH (glicosil hidrolase), CE (carboidrato esterase).

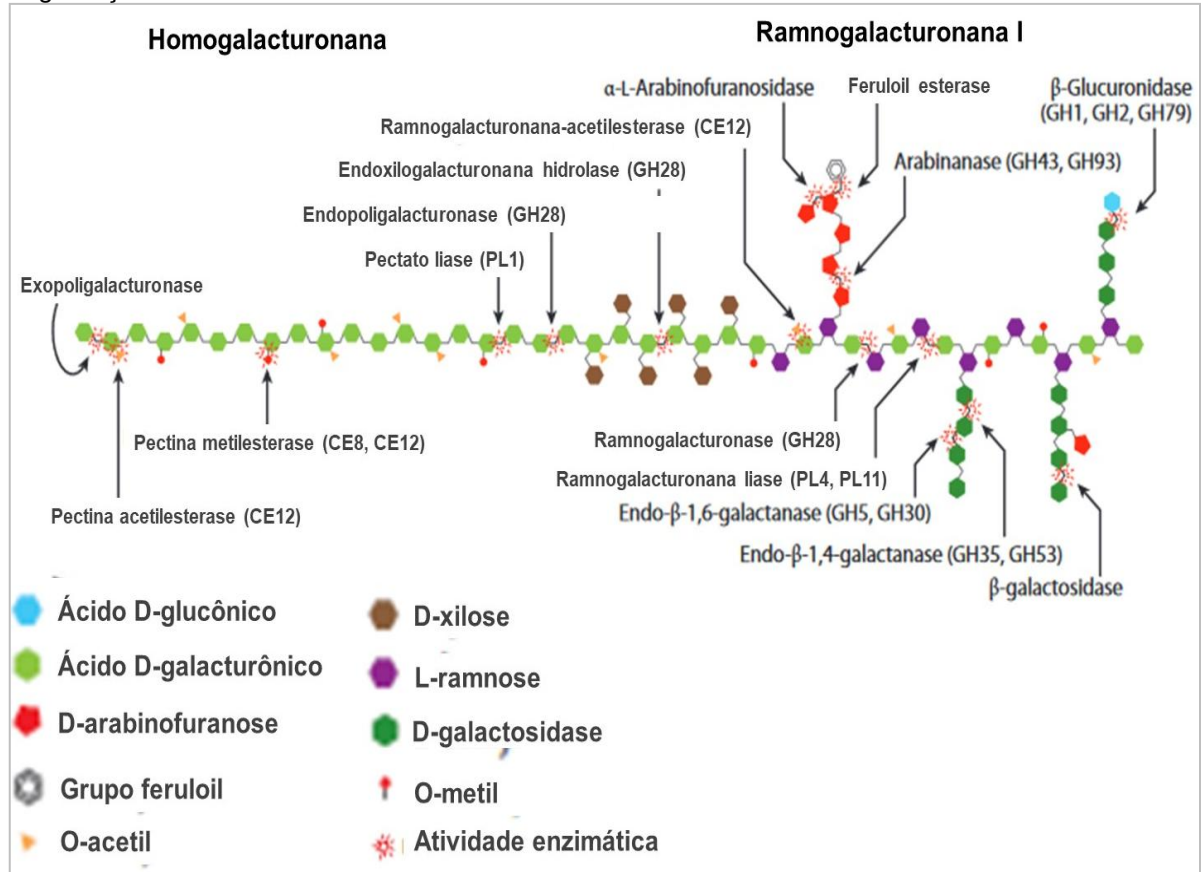
Fonte: Extraído e modificado de GLASS et al., 2013.

A pectina é um polissacarídeo altamente dependente da espécie e do tecido vegetal de origem. As suas principais estruturas polissacarídicas são homogalacturonanas, xilogalacturonanas e ramnogalacturonanas I e II, sendo que o principal monômero da composição é o ácido galacturônico (GLASS et al., 2013).

As pectinases envolvidas na degradação de pectina também são amplamente distribuídas entre as CAZy e pertencem a diferentes famílias de glicosil hidrolases, carboidrato esterase e polissacarídeo liases (KARNAOURI et al., 2014).

A FIGURA 8 apresenta ilustrativamente os componentes da pectina presente na parede celular vegetal e a ação de enzimas envolvidas na sua degradação.

Figura 8 – Pectina e algumas enzimas pertencentes às CAZy, envolvidas no seu processo de degradação



Legenda: GH (glicosil hidrolase), CE (carboidrato esterase), PL (polissacarídeo liase).

Fonte: Extraído e modificado de GLASS et al., 2013.

A lignina também é uma estrutura dependente da espécie e do tecido vegetal e é o principal fator de resistência estrutural da parede celular. A lignina é um heteropolímero complexo e recalcitrante, que possui em sua estrutura álcool *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (BENOCCI et al., 2017).

A delignificação é mediada por mecanismos de oxirredução que são executados, principalmente, por lacase (fenol oxidase) e por heme peroxidases, tais como: lignina peroxidase, manganês peroxidase e peroxidase polivalente (*versatile peroxidase*) (DASHTBAN et al., 2010).

O amido é o principal polissacarídeo de reserva das plantas e suas estruturas são amilose e amilopectina que contém resíduos de glicose com ligações do tipo α -1,4. No caso da amilopectina também ocorrem ramificações com ligações do tipo α -1,6 (BENOCCI et al., 2017).

Na TABELA 2 estão apresentadas as composições de alguns resíduos agroindustriais, originados de diferentes espécies vegetais: farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja.

Tabela 2 – Composição dos resíduos agroindustriais que serão utilizados no presente trabalho

| Composição | Farelo de trigo* | Palha de arroz** | Palha de soja*** |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Celulose | 7 % | 37 % | 40 % |
| Hemicelulose | 29 % | 23 % | 23 % |
| Lignina | 6 % | 14 % | 13 % |
| Proteína | 18 % | ----- | ----- |
| Amido | 19 % | ----- | ----- |

* MERALI et al., 2015; **RAVEENDRAN; GANESH; KHILAR, 1995; ***MARTELLI-TOSI et al., 2016.

Fonte: Elaborado pela autora

Em estudos com fungos filamentosos, a composição dos substratos, e mais especificamente dos resíduos agroindustriais, reflete na alteração de proteínas e demais moléculas envolvidas no controle das diferentes vias de regulação (BENOCCI et al., 2017), além de ser capaz de influenciar o perfil do material secretado pelo microrganismo (SANTOS et al., 2016).

1.5. Estudos proteômicos de fungos filamentosos

A modificação das condições e dos parâmetros de cultivo altera a síntese de metabólitos (TAKAHASHI et al., 2013) e estudos acerca da regulação destas alterações têm avançado, principalmente para fungos com potencial industrial (AGHCHEH; KUBICEK, 2015). Além disso, a maior disponibilidade do genoma, de diversas espécies de fungos, também tem contribuído (DOYLE, 2011).

A mudança no perfil proteico, em resposta a estas alterações, pode ser avaliada utilizando técnicas proteômicas (AEBERSOLD; MANN, 2003). O proteoma é o conjunto de proteínas codificadas pelo genoma (ABBOTT, 1999), e que permite

compreender como as células se adequam às diferentes condições ambientais (GRIFFIN; GOODLETT; AEBERSOLD, 2001).

A plasticidade em resposta às estas condições torna o proteoma muito dinâmico, pois pode ser modulado por uma grande variedade de fatores genéticos, ambientais (sinais externos) e cinéticos (eventos regulatórios transcricionais e traducionais) (WERNER, 2003).

Em outras abordagens, a determinação do mapa proteômico permite a identificação do tipo e da quantidade de proteínas, além de serem úteis na anotação de genes e na identificação de variantes transcricionais e isoformas de proteínas (KNIEMEYER, 2011).

O secretoma é um subgrupo do proteoma que é constituído pelas proteínas secretadas por células, tecidos ou organismos (GREENBAUM et al., 2001). Entretanto, algumas proteínas reconhecidas do ambiente intracelular, também possuem função biológica quando secretadas para o ambiente extracelular, ou seja, nem sempre uma proteína pode ser inflexivelmente categorizada.

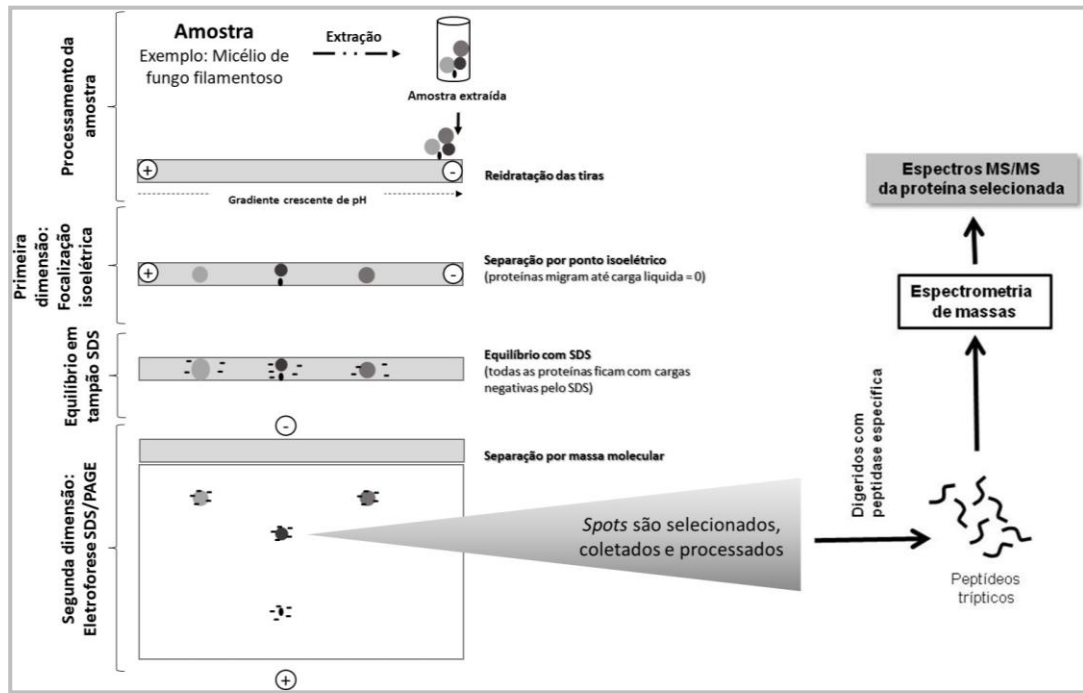
A análise do secretoma também nos mostra as variações bioquímicas do fungo em resposta às diferentes condições ambientais (NAVARRETE; CALLEGARI; EYZAGUIRRE, 2012), uma vez que eles produzem enzimas extracelulares diversas, para utilizar os substratos disponíveis (KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2007).

A relevância e as perspectivas acerca dos estudos proteômicos têm como um obstáculo a ser superado a origem das amostras, que devem ser apropriadamente processadas, uma vez que esta tem um impacto direto sobre a taxa de sucesso nas identificações (KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2008).

As amostras proteicas podem ser fracionadas e analisadas de diversas formas. Uma delas é a baseada na eletroforese bidimensional que, em termos técnicos, se baseia em duas etapas: na primeira etapa, ocorre a separação das proteínas de acordo com os seus pontos isoelétricos, e na segunda, as proteínas são separadas, em um gel de poliacrilamida desnaturante, pelas suas massas moleculares (RABILLOUD; LELONG, 2011).

Os padrão bidimensional da distribuição de proteínas pode ser analisado, e os *spots* proteicos selecionados, coletados e processados, para as análises posteriores que permitirão a identificação proteica, como ilustrado na FIGURA 9.

Figura 9 – Esquema da estratégia de identificação de proteínas utilizando eletroforese bidimensional



Legenda: SDS (dodecil sulfato de sódio), SDS/PAGE (eletroforese desnaturante com SDS em gel de poliacrilamida).

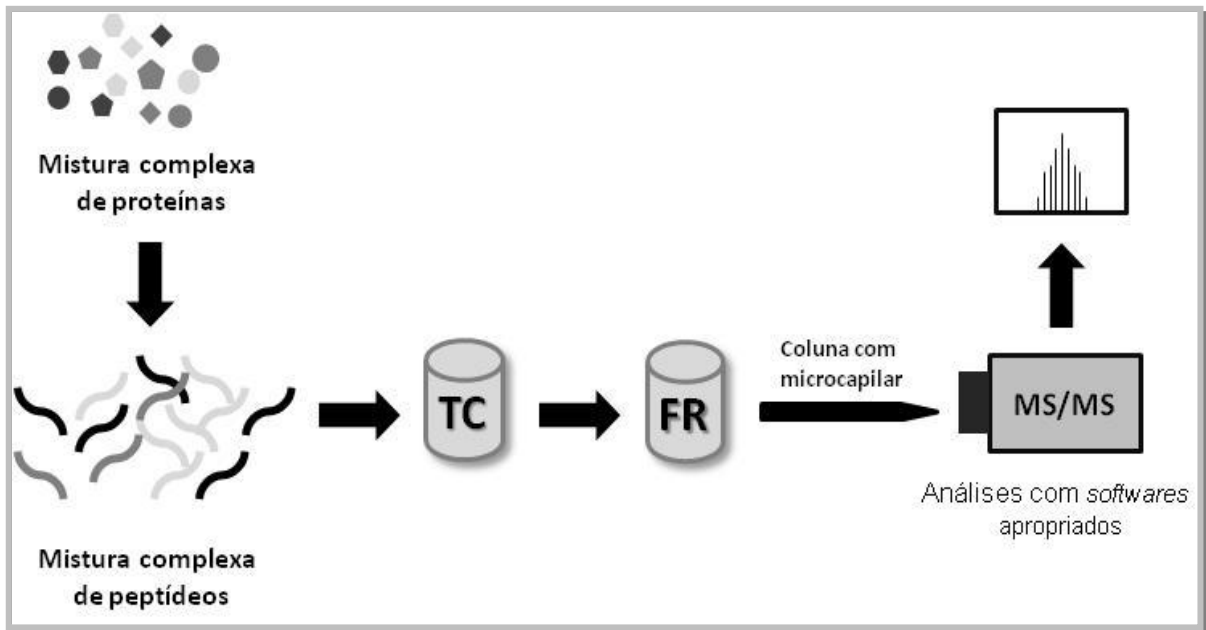
Fonte: Elaborado pela autora.

A eletroforese bidimensional tem como vantagem a possibilidade de identificação de isoformas e modificações pós traducionais, entretanto, nesta técnica, a quantificação é prejudicada quando se trata de proteínas com massas moleculares e pontos isoeletricos extremos ou em baixa abundância (OLIVEIRA; GRAAFF, 2011). Por estas questões, a complexidade da amostra pode não ser totalmente elucidada quando se utiliza a eletroforese bidimensional.

Em outra abordagem, temos a análise de misturas complexas, que utilizam uma estratégia denominada de *Shotgun Proteomics*. Esta estratégia conjuga tecnologias de identificação uni ou multidimensional de proteínas, sistemas de cromatografia líquida e a determinação de espectros de massas *in tandem* (WU; MACCOSS, 2002).

Em termos técnicos, as amostras complexas são submetidas à digestão com peptidases específicas (por exemplo, tripsina) e o produto é uma mistura complexa de peptídeos. Este material é submetido às cromatografias de troca catiônica e fase reversa, permitindo o fracionamento por carga e hidrofobicidade, respectivamente. Os peptídeos eluídos são ionizados, isolados e seletivamente fragmentados *in tandem* para a determinação dos espectros MS/MS (WU; MACCOSS, 2002), conforme ilustrado na FIGURA 10.

Figura 10 – Esquema da estratégia de identificação de proteínas em uma mistura complexa



Legenda: TC (cromatografia em coluna de Troca Catiônica), FR (cromatografia em coluna de Fase Reversa). A coluna com microcapilar é utilizada para a injeção da amostra fracionada no espectrômetro de massas.

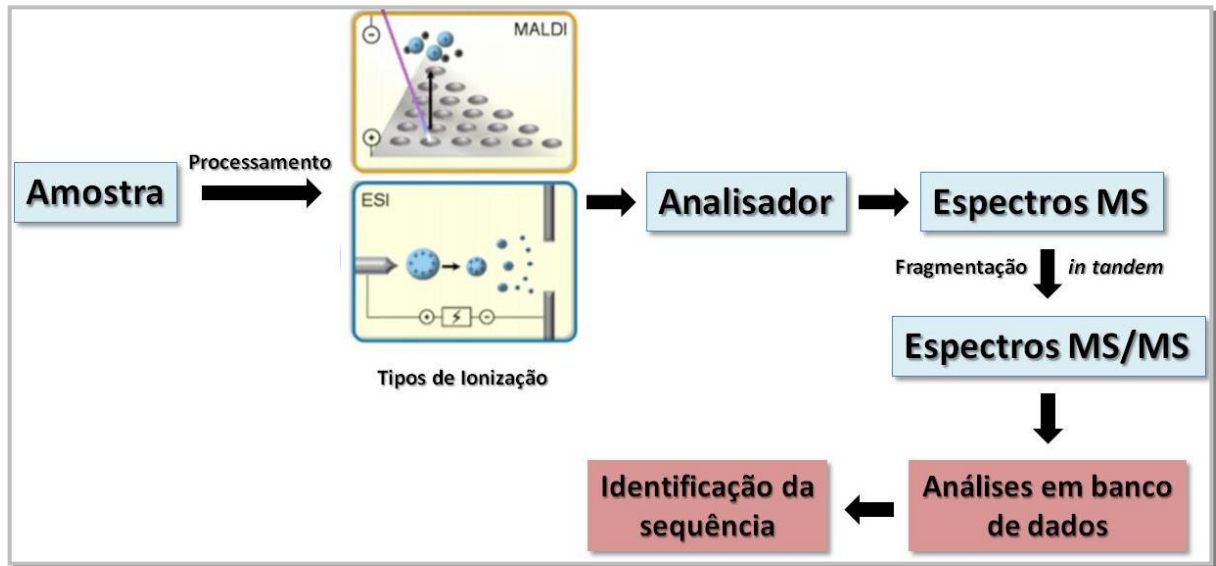
Fonte: Elaborado pela autora, baseado em WU; MACCOSS, 2002.

Na etapa final dos estudos proteômicos, as proteínas são identificadas por espectrometria de massas. As duas técnicas mais importantes para a ionização de biomoléculas, para análises por espectrometria de massa, são baseadas na desorção/ionização por laser associada a matriz (MALDI) e na ionização por eletrospray (ESI) (NADLER et al., 2017).

Na ionização por MALDI, a amostra é incorporada a uma matriz ácida, que absorve energia do *laser* e que, ao aquecer, é vaporizada/ionizada juntamente com a amostra. No ESI, a amostra flui por um capilar e é submetida a um campo elétrico; como resultado, são formadas gotículas cada vez menores, que culminam na formação de íons carregados. Além disso, o ESI pode ser conjugado com sistemas de cromatografia líquida (LC) (NADLER et al., 2017).

A FIGURA 11 ilustra o processo de identificação das proteínas das amostras, que serão analisadas por espectrometria de massas.

Figura 11 – Representação simplificada das etapas envolvidas na identificação de proteínas por espectrometria de massas



Os retângulos em vermelho representam as etapas realizadas com os dados obtidos por espectrometria de massas.

Fonte: Elaborado pela autora. Tipos de ionização modificado de NADLER et al., 2017.

Os estudos proteômicos têm se tornado uma excelente ferramenta para explorar, descobrir e identificar as proteínas produzidas em resposta ao estresse ambiental, fonte de carbono, temperatura e pH, uma vez que estes parâmetros estão diretamente relacionados a produção de enzimas (AEBERSOLD; MANN, 2003). Para exemplificar, a abordagem proteômica, utilizando diferentes técnicas, já foi utilizada para a determinação da influência do pH (ADAV et al., 2011; LU et al., 2010), das fontes de carbono (OLIVEIRA et al., 2011; LU et al., 2010; BRAAKSMA et al., 2010) e dos tipos de bioprocessamento (sólido e submerso) (ODA et al., 2006; TE BIESEBEKE et al., 2006).

Embora amplamente utilizada nos estudos com o objetivo de verificar o impacto sobre a produção de enzimas, a proteômica não se restringe a isto; e também tem sido utilizada para avaliar a fisiologia de fungos sob o efeito da pressão osmótica, aeração, da exposição a antifúngicos, na produção de penicilina, em estudos *in vivo* (simulando a condição natural), entre outros (OLIVEIRA; GRAAFF, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil de proteínas e a produção de enzimas com potencial biotecnológico dos fungos filamentosos *F. oxysporum* URM 7401 e *M. thermophila* expostos a diferentes condições de cultivo.

2.2. Objetivos específicos

- Submeter o fungo filamentoso mesofílico *F. oxysporum* URM 7401 a diferentes condições de cultivo, em bioprocesso submerso: variação do efeito de pH (5, 6, 7 e 8) e 1% (m/v) de fontes de nitrogênio (sulfato de amônio, ureia, aminoácidos – ácido glutâmico, cisteína, histidina e isoleucina; caseína e farinha de pena);
- Extrair as proteínas do micélio de *F. oxysporum* URM 7401 e avaliar o perfil proteômico das proteínas intracelulares (proteoma intracelular), das condições selecionadas do cultivo submerso, por eletroforese bidimensional;
- Analisar os géis bidimensionais, selecionar os *spots* de interesse e realizar digestão trípica para obtenção dos espectros de massas dos peptídeos, obtidos por MALDI-TOF/TOF-MS/MS;
- Analisar as sequências de peptídeos gerados em bancos de dados de proteínas;
- Realizar a análise funcional preditiva dos processos biológicos modulados pelas proteínas identificadas;
- Avaliar a produção de enzimas de interesse biotecnológico, produzidas por *F. oxysporum* URM 7401, nas diferentes condições de bioprocessos submersos;
- Identificar as proteínas presentes no secretoma de *F. oxysporum* URM 7401, produzidas em bioprocesso submerso com 1% (m/v) de caseína ou farinha de pena, utilizando espectrômetro de massas acoplado a sistema de cromatografia líquida, obtidos por LC-ESI-MS/MS;

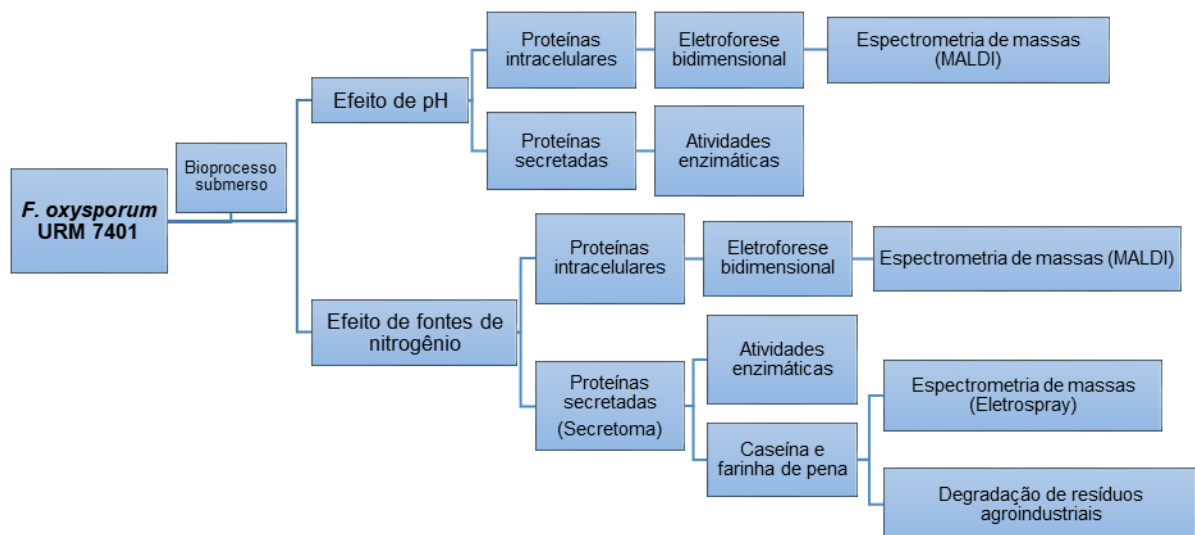
- Avaliar a degradação de resíduos agroindustriais (farelo de trigo, farelo de soja e farelo de arroz) utilizando os extratos proteicos obtidos a partir do cultivo de *F. oxysporum* URM 7401 com 1% (m/v) caseína ou farinha de pena, baseando-se na liberação de açúcares redutores;
- Submeter o fungo filamentoso termofílico *M. thermophila* ao bioprocesso sólido, utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substratos: farelo de trigo (FT), palha de arroz (PA) e palha de soja (PS);
- Avaliar a produção de enzimas de interesse biotecnológico, produzidas por *M. thermophila*, nas diferentes condições de bioprocessos sólidos ;
- Identificar as proteínas presentes no secretoma de *M. thermophila*, produzidas em bioprocesso sólido com resíduos agroindustriais, utilizando espectrômetro de massas acoplado a sistema de cromatografia líquida, obtidos por LC-ESI-MS/MS;
- Avaliar a degradação de resíduos agroindustriais (farelo de trigo, farelo de soja e farelo de arroz) utilizando os extratos proteicos obtidos a partir do cultivo de *M. thermophila* com FT, PA e PS, baseando-se na liberação de açúcares redutores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Abordagem experimental

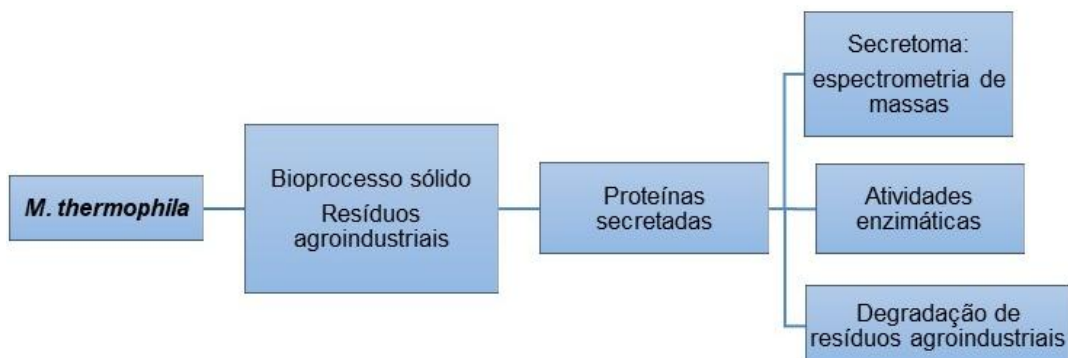
As principais etapas utilizadas neste trabalho com *Fusarium oxysporum* URM 7401 e com *Myceliophthora thermophila* estão apresentadas a seguir nas FIGURAS 12 e 13, respectivamente.

Figura 12 - Abordagem metodológica utilizada para a execução de experimentos utilizando o fungo filamentosso mesofílico *F. oxysporum* URM 7401.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 13 - Abordagem metodológica utilizada para a execução de experimentos utilizando o fungo filamentosso termofílico *M. thermophila*.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.2. Microrganismos

3.2.1. *Fusarium oxysporum* URM 7401

O fungo *F. oxysporum* foi isolado de amostras de solo (Miguelópolis, São Paulo, Brasil) e identificado pelo grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Cristina Maria de Souza Motta, curadora da Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco.

O microrganismo está depositado na Coleção de Culturas da Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (URM), sob número de acesso URM 7401. O fungo também pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Tecnologia Enzimática da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

A manutenção dos isolados fúngicos foi realizada com repiques periódicos, a cada 30 dias, e a preservação das culturas foi realizada com uso de óleo mineral e água estéril recobrando o micélio no meio de cultivo (CASTELLANI, 1939).

Na FIGURA 14 está apresentada uma fotografia retirada de *F. oxysporum* URM 7401, em meio ágar batata, após 72 h a 30 °C.

Figura 14 - *Fusarium oxysporum* URM 7401



Fonte: Extraído de SIQUEIRA (2017).

3.2.2. *Myceliophthora thermophila*

O fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* foi isolado de silagem e identificado como pertencente ao gênero *Myceliophthora* pelo grupo da Prof^a. Dr^a. Cristina Maria de Souza Motta, curadora da Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco.

A confirmação da espécie foi realizada utilizando ferramentas de biologia molecular pelo grupo do Prof. Dr. André Rodrigues, coordenador do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) de Rio Claro.

O fungo também pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Tecnologia Enzimática da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

A manutenção dos isolados fúngicos foi realizada com repiques periódicos, a cada 30 dias, e a preservação das culturas foi realizada com uso de óleo mineral e água estéril recobrimdo o micélio no meio de cultivo (CASTELLANI et al., 1939). Na FIGURA 15 está apresentada uma fotografia retirada de *M. thermophila*, em meio ágar batata, após 72 h a 45 °C.

Figura 15 – *Myceliophthora thermophila*



Fonte: Elaborado pela autora.

3.3. Bioprocessos

O fungo mesofílico *F. oxysporum* URM 7401 foi cultivado apenas em bioprocesso submerso, enquanto que o fungo termofílico *M. thermophila* foi cultivado apenas em bioprocesso sólido.

3.3.1. Bioprocesso submerso – *F. oxysporum* URM 7401

Para a realização do bioprocesso submerso, o fungo *F. oxysporum* URM 7401 foi semeado em placas contendo meio de cultura ágar batata e incubado a 30 °C por 72 h.

Para a coleta de *F. oxysporum* URM 7401, a parte superior de ponteiras descartáveis de pipeta foi utilizada para a demarcação de discos homogêneos de 0,5 cm² no micélio, que havia crescido na superfície do meio ágar batata. Com o auxílio de uma pinça previamente esterilizada, os discos foram coletados.

O bioprocesso submerso foi realizado em frascos tipo erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio padrão: 0,7% (m/v) de K₂HPO₄; 0,2% (m/v) de KH₂PO₄; 0,01% (m/v) de MgSO₄.7H₂O; 0,01% (m/v) de CaCl₂.2H₂O; 0,05% (m/v) de citrato.2 H₂O; 0,01% (m/v) de peptona, baseado em Tran e Nagano (2002).

O pH do meio foi ajustado de acordo com a necessidade do estudo para os pH 5, 6, 7 ou 8; e após a esterilização em 121°C por 15 min, foram adicionados 14 discos para cada 50 mL de meio de cultura.

Os frascos foram acomodados em incubadora com agitação orbital de 120 rpm, a 30 °C por 96 h. Cada condição de cultivo foi composta por 9 frascos. O tempo de cultivo de 96 h foi determinado em estudos prévios e considerou a melhor produção de enzimas (dados não mostrados).

Para a realização do cultivo submerso com diferentes fontes de nitrogênio, as condições utilizadas foram similares ao descrito anteriormente e as características específicas estão apresentadas a seguir.

O meio padrão, descrito anteriormente, foi suplementado com 1% (m/v) de diferentes fontes de nitrogênio (sulfato de amônio, ureia, ácido glutâmico, cisteína, histidina e isoleucina, caseína e farinha de pena). O pH do meio foi ajustado para 7;

e após a esterilização em 121°C por 15 min, foram adicionados 14 discos para cada 50 mL de meio de cultura.

Os frascos foram acomodados em incubadora com agitação orbital de 120 rpm, a 30 °C por 96 h. Cada condição de cultivo foi composta por 15 frascos.

3.3.2. Bioprocesso sólido – *M. thermophila*

Para a realização do bioprocesso sólido, o fungo *M. thermophila* foi semeado em placas contendo meio ágar batata e incubado a 45 °C por 72 h.

Para a coleta de *M. thermophila*, a parte superior de ponteiros descartáveis de pipeta foi utilizada para a demarcação de discos homogêneos de 0,5 cm² no micélio, que havia crescido na superfície do meio ágar batata. Com o auxílio de uma pinça previamente esterilizada, os discos foram coletados.

Para o bioprocesso sólido foram utilizados sacos de polipropileno de 11x20 cm. Em cada saco foram adicionados 5 g de resíduos agroindustriais (palha de arroz, palha de soja ou farelo de trigo), gentilmente cedidos pela Prof^a. Dr^a. Heloíza Ferreira Alves-Prado (IBILCE/UNESP).

Para evitar o colapamento das superfícies também foi introduzido um cabo flexível encapado de 20 cm, que foi espiralado com 3 voltas. A parte aberta da embalagem foi fechada com um cano de PVC de 5 cm e tampado com aparato de gaze e algodão.

Os resíduos agroindustriais foram umedecidos com 10 mL de solução salina (0,1% (m/v) de NH₄NO₃, 0,1% (m/v) de (NH₄)₂SO₄ e 0,1% (m/v) de MgSO₄.7H₂O), e esterilizados a 121 °C por 40 min.

Depois desta etapa, foram adicionados 5 discos do micélio coletado para cada 5 g de resíduos agroindustriais. Como controle, o bioprocesso foi realizado nas mesmas condições, mas sem a adição do microrganismo.

O material foi acondicionado em câmara incubadora para BOD (Marconi) a 45 °C por até 72 h, sendo que a cada 24 h foram coletadas amostras com e sem inóculo. O cultivo foi realizado em triplicatas biológicas, sendo que cada replicata foi composta por 3 amostras.

3.4. Proteoma: obtenção e processamento

Aqui neste estudo, como forma de diferenciação, denominamos de proteoma o conjunto de proteínas intracelulares presentes no micélio. A análise do proteoma só foi realizada para o fungo *F. oxysporum* URM 7401, sendo assim, as metodologias descritas nas seções de 3.4.1 a 3.5.7 estão relacionadas apenas a este microrganismo.

3.4.1. Extração das proteínas intracelulares

Em 96 h de cultivo, os frascos foram coletados e o conteúdo filtrado em papel filtro qualitativos nº 1. O filtrado foi processado conforme indicado no item 3.6.1 e o micélio foi transferido para um tubo cônico de 50 mL.

O volume de massa micelial foi coberto com dois volumes de solução 0,9 % (m/v) de NaCl e o material foi centrifugado a $8000 \times g$ (4 °C, 5 min). O sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem com NaCl foi repetido.

A seguir, o volume de massa micelial foi coberto com dois volumes de água ultrapura e o material foi centrifugado a $8000 \times g$ (4 °C, 5 min). O sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem com água ultrapura foi repetido.

Por fim, ao volume de massa micelial foi adicionada a solução de inibidores de peptidases (cOmplete Ultra; Roche) e pérolas de vidro. O material foi submetido à lise por agitação em vortex em 2 ciclos (30 s agitação, 1 min descanso em banho de gelo).

O tubo contendo o material parcialmente lisado foi levado ao sonicador (Q125 sonicador, QSonica), mantido em recipiente com gelo, e submetido à lise utilizando os seguintes parâmetros: 75% de potência (93,75 W), com 10 ciclos de 1 min intercalado com intervalos de 30 s.

O produto da lise micelial foi centrifugado a $8000 \times g$ por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em membranas de 0,22 µm e transferido para um novo tubo de 50 mL.

3.4.2. Precipitação das proteínas intracelulares

Ao volume de sobrenadante contendo as proteínas intracelulares foi adicionado o mesmo volume de solução gelada de ácido tricloroacético 30% (m/v) em acetona PA.

O material foi mantido a -20 °C por 2 h e, após este período, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 20 mL de acetona PA gelada, seguido de centrifugação a 10.000 x g por 30 min a 4 °C.

O sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem com acetona PA gelada foi repetido. O material precipitado foi mantido a 25 °C até a completa volatilização da acetona residual e, posteriormente, solubilizado em tampão tioureia (7 M ureia, 2 M tioureia, 2% (m/v) CHAPS).

O material, proveniente dos estudos sobre o efeito de pH, foi submetido a uma etapa adicional utilizando o 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare Life Sciences) de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976) e o material armazenado em ultrafreezer -80 °C até o momento da focalização isoeletrica.

3.5. Eletroforese bidimensional

3.5.1. Primeira dimensão - focalização isoeletrica

Para a realização da primeira dimensão, todas as amostras foram suplementadas com 0,002% (m/v) de azul de bromofenol, 0,5% (v/v) de solução de anfólitos (IPG *buffer*) e 2,8 mg/mL de DTT (Ditiotreitol).

Para o estudo do efeito do pH, foram utilizados 13 µg das proteínas extraídas de amostras obtidas dos cultivos em pH 5, 6, 7 e 8. Para o estudo do efeito de sulfato de amônio, ureia, ácido glutâmico (Glu), cisteína (Cys), histidina (His) ou isoleucina (Ile), foram utilizados 50 µg das proteínas extraídas, enquanto que para a determinação do efeito de caseína e farinha de pena, foram utilizados 200 µg das proteínas extraídas.

As amostras foram então reidratadas passivamente, por 16 h a 20 °C, em tiras com gradiente linear de pH de 3 a 10 *Immobiline Dry Strip* (GE Healthcare Life Sciences) de 7 cm (efeito de pH) ou de 13 cm (efeito de fontes de nitrogênio).

Para esta etapa, as tiras foram acomodadas em bandejas apropriadas e inseridas no aparato IPG Box (GE Healthcare Life Sciences).

As amostras foram submetidas à focalização isoelétrica em placa de cerâmica utilizando o sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare Life Sciences) e os parâmetros da focalização foram controlados utilizando o Ettan IPGphor 3 Control Software, seguindo as instruções do fabricante.

Após a focalização foram acumulados 5750 Vh (tiras de 7 cm) ou 15500 Vh (tiras de 13 cm). As tiras foram retiradas do sistema de focalização e submetidas ao equilíbrio imediatamente (conforme descrito na seção 3.5.2) ou armazenadas a -80 °C até o momento da utilização.

3.5.2. Equilíbrio das tiras focalizadas

Para a execução da segunda dimensão, inicialmente as tiras foram equilibradas em tampão de equilíbrio SDS (6 M de ureia; 75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 29,3% (v/v) de glicerol; 2% (m/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS); 0,002% (m/v) de azul de bromofenol) suplementado com DTT (10 mg/mL).

As tiras foram imersas nessa solução e mantidas sob agitação por 15 min a 20 °C. Após este período a solução contendo DTT foi removida e às tiras foi adicionado o mesmo tampão, dessa vez suplementado com iodoacetamida (25 mg/mL).

As tiras foram imersas nessa solução e mantidas sob agitação por 15 min a 20 °C. Após este período a solução foi removida e as amostras focalizadas estavam preparadas para a segunda etapa: a eletroforese desnaturante.

3.5.3. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE)

As tiras equilibradas de 7 cm, das diferentes condições de pH, foram acomodadas horizontalmente sobre a superfície do gel desnaturante 12,5% de poliacrilamida, com 10 cm de largura, e com o auxílio de papel filtro foi aplicado o marcador de massa molecular Amersham ECL *Full-Range Rainbow* (GE Healthcare Life Sciences).

As placas foram seladas com solução de agarose 0,5% (m/v) preparada em tampão Tris-glicina (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0,1% (m/v) SDS, 0,002% (m/v) azul de bromofenol) e o aparato foi introduzido na cuba eletroforética Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad).

As cubas de eletroforese foram preenchidas com tampão Tris-glicina e a segunda dimensão foi realizada seguindo as condições de eletroforese recomendadas pelo fabricante: 15 mA/gel durante os 15 min iniciais e 30 mA/gel até o final da corrida.

Para as diferentes fontes de nitrogênio, as tiras equilibradas de 13 cm foram acomodadas horizontalmente sobre a superfície do gel desnaturante 12,5% de poliacrilamida, com 16 cm de largura, e com o auxílio de papel filtro foi aplicado o marcador de massa molecular Amersham ECL *Full-Range Rainbow* (GE Healthcare Life Sciences).

As placas foram seladas com solução de agarose 0,5% (m/v) preparada em tampão Tris-glicina e o aparato foi introduzido na cuba eletroforética SE-600 Ruby acoplada ao banho termostático com circulação MultiTemp IV (GE Healthcare Life Sciences).

As cubas de eletroforese foram preenchidas com tampão Tris-glicina e a segunda dimensão foram realizadas com as seguintes condições de eletroforese: temperatura controlada de 10 °C, 15 mA/gel durante os 15 min iniciais e 30-60 mA/gel até o final da corrida.

3.5.4. Coloração dos géis bidimensionais

No estudo das diferentes condições de pH, após o término da eletroforese, os géis foram retirados das placas, colocados em recipiente contendo solução fixadora (10% (v/v) ácido acético, 40% (v/v) etanol) e fixados por 16 h a 20 °C.

Após este período, a solução fixadora foi removida e a coloração foi realizada com PhastGel Blue R-350 (GE Healthcare Life Sciences), de acordo com as instruções do fabricante. Os géis foram corados por 16 h a 20 °C, e após este período, a solução foi descartada e o excesso de corante foi removido utilizando a mesma solução fixadora, previamente descrita. Os géis adequadamente descorados foram mantidos em solução contendo 5% (v/v) de ácido acético até a obtenção das imagens.

No estudo das diferentes fontes de nitrogênio, após o término da eletroforese, os géis foram retirados das placas, colocados em recipiente contendo solução fixadora e fixados por 16 h a 20 °C.

Após este período, a solução fixadora foi removida e a coloração foi realizada utilizando a solução *Colloidal Coomassie Blue G-250* (8% (m/v) de sulfato de amônio; 0,8% (v/v) de ácido fosfórico; 0,08% (m/v) Coomassie Blue G-250; 20% (v/v) de metanol).

Os géis foram corados por 16 h a 20 °C, e após este período, a solução foi descartada e o excesso de corante foi removido utilizando a água ultrapura. Os géis adequadamente descorados foram mantidos em solução contendo 5% (v/v) de ácido acético até a obtenção das imagens.

3.5.5. Obtenção e análise de imagens dos géis bidimensionais

Para a obtenção das imagens, os géis bidimensionais foram lavados com água ultrapura e digitalizados com o auxílio do densitômetro DS-6000 (Loccus Biotecnologia) utilizando o modo transparente e a resolução de imagem de 300 dpi.

As imagens capturadas foram arquivadas no formato TIF (Tagged Image File) e analisadas no programa Image Master 2D Platinum v7.0 (GE Healthcare Life Sciences) para a detecção dos *spots*, para a determinação de massa molecular,

ponto isoelétrico e para a comparação dos níveis de abundância de proteínas em condições de bioprocessos diferentes.

Para a coleta dos *spots* de interesse das diferentes condições de pH foram estabelecidos os seguintes critérios: *spots* exclusivos de uma determinada condição ou qualitativamente diferentes e *spots* diferencialmente expressos em termos quantitativos (considerando os seguintes parâmetros *fold* – nível de abundância > 2; ANOVA com $\alpha < 0,05$). O nível de abundância é a razão entre a condição mais abundante pela condição menos abundante.

Os géis obtidos de amostras cultivadas em pH 7 foram utilizados como referência. Os *spots*, selecionados de cada condição, foram manualmente coletados com agulhas hipodérmicas estéreis, armazenados em tubos e congelados a -80 °C, até o momento da análise por espectrometria de massas.

No estudo das diferentes fontes de nitrogênio, a obtenção de imagens e os critérios de seleção foram os mesmos descritos anteriormente. Para os géis obtidos de amostras cultivadas em aminoácidos, o ácido glutâmico foi utilizado como referência.

Para os géis obtidos de amostras cultivadas em sulfato de amônio, ureia, caseína e farinha de pena, foram selecionados os *spots* que apresentaram maior nível de intensidade.

Os *spots*, selecionados de cada condição, foram manualmente coletados com agulhas hipodérmicas estéreis, armazenados em tubos e congelados a -80 °C, até o momento da análise por espectrometria de massas.

3.5.6. Digestão trípica e espectrometria de massas por MALDI (ionização/dessorção a laser assistida por matriz)

Os *spots* coletados foram descorados por sucessivas trocas de 100 μ L de solução (50 % (v/v) acetonitrila (ACN); 100 mM de NH_4HCO) até a completa remoção do corante. Posteriormente, o gel foi desidratado com 100 μ L ACN 100%, por 10 min. A solução foi descartada e o excesso de solvente removido em concentrador a vácuo rotacional 2-18 CDplus (Martin Christ) 1200 rpm, 35 °C por 30 min.

Aos *spots* desidratados foram adicionados 5 a 10 μL de uma solução 0,02 mg/mL de tripsina de pâncreas de porco dimetilada (grau proteômico, Sigma), para o intumescimento do gel; e a seguir, foram adicionados 100 μL de solução 100 mM de NH_4HCO_3 .

As amostras foram incubadas a 37 °C por 22 h e a reação foi interrompida com 5 μL de ácido fórmico. A solução, contendo os peptídeos trípticos, foi coletada após 4 h e submetida à concentração e dessalinização.

A dessalinização foi realizada em resina de fase reversa POROS[®] R2 (Applied Biosystems[®]), previamente empacotada em ponteiras com fibra de vidro AP4009000 (Merck Millipore). Inicialmente, a resina foi ativada em metanol e equilibrada em solução 0,2% (v/v) de ácido fórmico.

A solução contendo os peptídeos trípticos foi então aplicada na resina e os contaminantes foram removidos pela lavagem com solução 0,2% (v/v) de ácido fórmico. Por fim, os peptídeos que interagiram com a resina foram eluídos em solução de eluição (60 % (v/v) de ACN; 5 % (v/v) de ácido fórmico).

A solução com os peptídeos eluídos foi seca em concentrador a vácuo rotacional 2-18 CDplus (Martin Christ) 1200 rpm, 35 °C por 90 min. Os peptídeos foram então ressuspensos em 6 μL de uma solução de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinamínico (5 mg/mL em 50 % (v/v) de ACN; 0,1 % (v/v) de ácido trifluoracético); dos quais 2 μL foram aplicados, em duplicata, em placas de inox com 384 *spots*, compatíveis com o equipamento.

Os espectros MALDI MS/MS foram adquiridos utilizando MALDI-TOF/TOF (Axima Performance, Kratos-Shimadzu). Os íons detectados tiveram suas massas determinadas utilizando como calibrante externo uma mistura de peptídeos (insulina bovina, citocromo C, aldolase de coelho e albumina sérica bovina), que compõem o padrão de calibração (Protein MALDI-MS Calibration Kit; MSCAL-1-1KT, Sigma).

Os dados de espectrometria de massas foram obtidos no equipamento sob supervisão do Prof. Dr. José César Rosa (FMRP), localizado no Centro de Química de Proteínas, no Hemocentro de Ribeirão Preto.

3.5.7. Análises de bioinformática das proteínas intracelulares

Os espectros MS/MS obtidos de cada proteína, em arquivos compatíveis com o *Mascot Generic Format*, foram analisados utilizando a ferramenta MS/MS íons search do *software on line* Mascot Server version 2.2 (Matrix Science, Boston, Massachusetts, EUA) disponível em: http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS.

Para identificação das proteínas, foram utilizados os bancos de dados de proteínas do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia NCBI (NCBI não redundante) e SwissProt.

Os parâmetros de busca foram - restrição taxonômica: fungos, clivagem por tripsina e permissão para até uma clivagem perdida; modificação fixa da cisteína – carbamidometilação; modificação variável da metionina – oxidação; tolerância do peptídeo: 1,2 Da; tolerância do fragmento iônico MS/MS: 0,8 Da e massas médias.

Os resultados foram considerados significantes para um acerto aleatório individual com $p < 0,05$, que representa identidade ou homologia de acordo com o escore estabelecido pelo MASCOT (Matrix Science, Boston, Massachusetts, EUA).

Na TABELA 3 é possível observar o nome dos bancos de dados e o número de seqüências depositadas para cada uma das condições analisadas.

Tabela 3 - Informações sobre os bancos de dados utilizados na busca de proteínas para cada uma das condições analisadas

| Condição | Banco de dados | Nº de seqüências |
|---|-----------------------|-------------------------|
| Efeito de pH | NCBI nr 20160321 | 83784708 |
| | SwissProt 2016_03 | 550740 |
| Efeito de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio e ureia | NCBI nr 20161127 | 106762850 |
| | SwissProt 2016_10 | 552884 |
| Efeito de fonte de nitrogênio: aminoácidos (Glu, Cys, His e Ile) | NCBI prot 20170106 | 111388506 |
| | SwissProt 2016_11 | 553231 |
| Efeito de fonte de nitrogênio: caseína e farinha de pena | NCBI prot 20170131 | 113288504 |
| | SwissProt 2017_01 | 553474 |

Fonte: Elaborado pela autora.

A diferença entre a nomenclatura dos bancos de dados utilizados na busca é justificada pelo fato que no segundo semestre do ano de 2016 o NCBI descartou os identificadores de sequência do tipo número de GI o que, conseqüentemente, inutilizou o banco de dados NCBIInr. Agora existem novos identificadores e desde então vigora o banco de dados NCBIprot (http://www.matrixscience.com/whats_new.html).

3.6. Secretoma: Obtenção e processamento

Aqui neste estudo, como forma de diferenciação, denominamos de secretoma o conjunto de proteínas secretadas, independentemente do tipo de bioprocessamento de origem. O secretoma foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas de todas as condições e para a identificação de proteínas, por espectrometria de massas, de *F. oxysporum* URM 7401 (caseína e farinha de pena) e *M. thermophila* (bioprocessamento sólido com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja).

3.6.1. Obtenção do secretoma de *F. oxysporum* URM 7401

O extrato de *F. oxysporum* URM 7401, obtido em 96 h de bioprocessamento submerso, foi coletado e filtrado em papel filtro qualitativo nº 1. Para a remoção de impurezas, o filtrado foi centrifugado a 10000 × g, a 4 °C por 30 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e denominado de extrato proteico.

O extrato proteico foi utilizado para verificar o pH final do bioprocessamento e as atividades enzimáticas, que serão objeto de estudo. No caso dos extratos proteicos dos cultivos com 1% (m/v) de caseína e farinha de pena também foi realizada a identificação de proteínas por espectrometria de massas e o ensaio de degradação de resíduos agroindustriais (seção 3.11).

O pH final do extrato foi aferido com auxílio de um pHmetro de bancada (Digimed DM-22). As atividades enzimáticas foram avaliadas utilizando substratos adequados, de acordo com a seção 3.7. Para a identificação de proteínas, por espectrometria de massas, o extrato proteico foi processado de acordo com a seção 3.8.

3.6.2. Obtenção do secretoma de *M. thermophila*

Para análise de produção de enzimas e parâmetros de cultivo, os sacos dos cultivos (controle e experimental) foram coletados a cada 24 h, por um período total de 72 h.

Ao substrato sólido foram adicionados 50 mL de água ultrapura a 4 °C e o material foi mantido sob agitação por 1 h a 20 °C. Após este período, o material foi filtrado em gaze e centrifugado a 10000 x *g* por 10 min a 4 °C.

O sobrenadante transferido para um novo tubo e denominado de extrato proteico. O extrato proteico foi utilizado para verificar: pH do extrato, perfil de absorbância, presença de açúcares redutores, atividade enzimática e identificação de proteínas, por espectrometria de massas e o ensaio de degradação de resíduos agroindustriais (seção 3.12)

O pH final do extrato foi aferido com auxílio de um pHmetro de bancada (Digimed DM-22).

Para avaliar o perfil de absorção das moléculas, presentes no extrato sólido, 50 µL de extrato foram homogeneizados com 950 µL de água ultrapura e submetidos a varredura em espectrofotômetro (Genesys 10S, Thermo).

Os parâmetros ajustados foram: comprimento de onda de 195 a 500 nm, intervalos de leitura de 1 nm, método de leitura rápido. A linha de base do equipamento foi obtida utilizando 1 mL de água ultrapura e as amostras analisadas foram lidas contra essa linha de base. Todas as leituras foram realizadas a 25 °C em cubeta de quartzo de 1 mL.

A liberação de açúcares redutores, durante o bioprocessamento, foi avaliada utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

As atividades enzimáticas foram avaliadas utilizando substratos adequados, de acordo com a seção 3.7.

Para a identificação de proteínas, por espectrometria de massas, o extrato proteico foi processado de acordo com a seção 3.9.

3.7. Ensaio de atividade enzimática

Os ensaios de atividades enzimáticas foram realizados com os extratos obtidos dos cultivos com *F. oxysporum* URM 7401 e *M. thermophila*. De modo geral, foram determinadas as atividades de peptidase, lipase, pectinase e xilanase.

Nos extratos selecionados para os ensaios de degradação de resíduos agroindustriais, também foram verificadas as atividades de amilase, CMCase, FPase, β -glicosidase e lacase.

As temperaturas de incubação foram adequadas às origens dos extratos proteicos: 40 °C para *F. oxysporum* URM 7401 e 45 °C para *M. thermophila*. Todas as reações enzimáticas foram realizadas em triplicatas e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism version 5.00.

3.7.1. Atividade de peptidase

Para avaliar a atividade proteolítica, inicialmente foi realizado o preparo do substrato. O tampão fosfato monobásico de sódio 50 mM, pH 6,5 foi mantido em agitador magnético com aquecimento, até atingir a temperatura de 85 °C. Após essa etapa, a massa equivalente a 1% (m/v) de caseína bovina (Sigma, C8654) foi adicionada lentamente, sob agitação, até a formação de uma solução homogênea.

O ensaio de peptidase foi realizado de acordo com Sarath *et al.* (1996), com modificações. Para a reação, 100 μ L do extrato proteico foram incubados com 500 μ L de solução 1% (m/v) de caseína (pH 6,5). O tempo de reação foi determinado de acordo com cada amostra. A reação foi interrompida pela adição de 300 μ L de solução 10% (m/v) de ácido tricloroacético e os tubos foram centrifugados a 10000 x g, a 20 °C por 15 min.

A leitura do sobrenadante da reação foi realizada em 280 nm, em espectrofotômetro (Genesys 10S, Thermo), contra seus respectivos brancos. Para o cálculo de atividade o coeficiente de extinção molar da tirosina foi de 1029 M⁻¹.cm⁻¹.

O cálculo de atividade está apresentado a seguir:

$$\text{Atividade} = \frac{\Delta \text{ Abs} \times 10^6 \times V_{\text{Total}}}{t_{(\text{min})} \times 1029 \times V_{\text{enz}}}$$

$$\Delta \text{ Abs} = (\text{Abs}_{\text{reação}} - \text{Abs}_{\text{branco}})$$

A Unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μM tirosina/min sob as condições de ensaio (MEYERS; AHEARN, 1977).

3.7.2. Atividade de lipase

Para o ensaio de atividade de lipase, inicialmente foi realizado o preparo da solução contendo o substrato e, para isso, foram preparadas duas soluções. A primeira solução foi preparada pela homogeneização de 8 mM de palmitato de *p*-nitrofenila (Sigma, N2752) em 2 mL de isopropanol.

A segunda solução foi composta por 18 mL de solução tampão 50 mM de Bicina pH 8,5, 10 mg de goma arábica e 50 μL de Triton X-100 (Sigma, 93418).

Por fim, a primeira solução foi mantida sob agitação branda em vortex e a segunda solução foi adicionada lentamente ao tubo, para garantir a homogeneização do substrato (0,8 mM palmitato de *p*-nitrofenila; 10% (v/v) de isopropanol; 0,05% (m/v) de goma arábica; 0,25 % (m/v) de Triton X-100; em tampão 50 mM Bicina pH 8,5).

O ensaio lipolítico foi realizado de acordo com Pereira e colaboradores (2014), com modificações. Para a reação, 50 μL de extrato foram incubados com 450 μL da solução de substrato (pH 8,5).

O tempo de reação foi determinado de acordo com a hidrólise do substrato, entretanto para evitar a auto-hidrólise, o tempo máximo de reação foi de 30 min. O substrato utilizado é cromogênico, sendo assim, a alteração da coloração da mistura reacional é um indicativo da hidrólise.

A reação foi interrompida pela imersão das amostras em banho a 96 °C por 1 minuto, seguida de imersão em banho de gelo. Por fim, foi adicionado ao volume reacional 500 µL de solução saturada de tetraborato de sódio. A liberação de *p*-nitrofenol foi determinada pela leitura da reação em 410 nm, em leitor de placas (SpectraMax, Molecular Devices), contra seus respectivos brancos.

A equação da reta, obtida pela correlação entre os valores de *x* (concentração em µmol/mL) e *y* (Abs_{410 nm}), foi utilizada para determinar a concentração de *p*-nitrofenol liberado, e a atividade calculada como descrito a seguir.

$$\text{Atividade} = \frac{\text{Concentração de } p\text{-nitrofenol}}{t_{(\text{min})}}$$

A Unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µM de *p*-nitrofenol/min sob as condições de ensaio (PEREIRA et al., 2014).

3.7.3. Atividade de amilase, CMCase, invertase, pectinase e xilanase

Para avaliar a atividade de amilase, endoglucanase (CMCase), invertase (sacarase), pectinase e xilanase, inicialmente foi realizado o preparo individual de cada substrato. Foram utilizados como substratos: amido solúvel (Synth), carboximetilcelulose (CMC – Synth), sacarose (PA, Synth), pectina cítrica (Vetec) ou xilana de madeira de faia (Sigma, X0502).

O tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5) foi mantido em agitador magnético com aquecimento até atingir a temperatura de 85 °C. Após essa etapa, a massa equivalente a 0,5% (m/v) de cada substrato foi adicionada lentamente, sob agitação, até a formação de uma solução homogênea. A solubilização de 0,5 % (m/v) de sacarose utilizou o mesmo tampão, sem aquecimento.

Para a reação, 25 µL do extrato proteico foram incubados com 25 µL do respectivo substrato. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de solução de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e, na sequência, as amostras foram incubadas em banho a 96 °C por 5 min.

Por fim, foi adicionado ao volume reacional, 400 μL de água e a leitura da reação foi realizada em 540 nm, em leitor de placas (SpectraMax, Molecular Devices), contra seus respectivos brancos. A liberação de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959). A equação da reta, obtida pela correlação entre os valores de x (concentração em $\mu\text{g/mL}$) e y ($\text{Abs}_{540 \text{ nm}}$), foi utilizada para determinar a concentração de açúcar redutor liberado, e a atividade calculada como descrito a seguir.

$$\text{Atividade} = \frac{\text{Concentração de açúcar redutor}}{t_{(\text{min})}}$$

A Unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μg de açúcar redutor por minuto sob as condições de ensaio.

3.7.4. Atividade de FPase

Para determinação da atividade de FPase: 25 μL de extrato e 25 μL de tampão 100 mM de acetato de sódio pH 5 foram incubados por 60 min com 0,25 cm^2 de papel filtro (0,5 cm x 0,5 cm). A reação foi interrompida pela transferência de 50 μL da reação para um tubo contendo 50 μL de DNS e, posteriormente, mantida em banho a 96 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min.

Após o resfriamento da amostra, foram adicionados 400 μL de água ultrapura. O material foi centrifugado a 9300 x g , por 10 min a 20 $^{\circ}\text{C}$. A leitura do sobrenadante foi realizada contra o seu respectivo branco a 540 nm. O cálculo da atividade foi o mesmo realizado na seção 3.7.3.

3.7.5. Atividade de β -glicosidase

Para avaliar a atividade de β -glicosidase, o substrato p -nitrofenil β -D-glicopiranosídeo (pNPG) (Sigma) foi solubilizado em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5), em uma concentração final de 0,22 mM.

O ensaio de β -glicosidase foi realizado de acordo com Coston e Loomis (1969), com modificações. Para a reação, 50 μ L de extrato foram incubados com 50 μ L da solução de substrato pNPG.

O tempo de reação foi determinado de acordo com a hidrólise do substrato, entretanto para evitar a auto-hidrólise, o tempo máximo de reação foi de 30 min. O substrato utilizado é cromogênico, sendo assim, a alteração da coloração da mistura reacional é um indicativo da hidrólise.

A reação foi interrompida pela adição de 500 μ L de solução 0,5 M de carbonato de sódio. A liberação de *p*-nitrofenol foi determinada pela leitura da reação em 410 nm, em leitor de placas (SpectraMax, Molecular Devices), contra seus respectivos brancos.

A Unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ M de *p*-nitrofenol/min sob as condições de ensaio (OLAJUYIGBE, NLEKEREM, OGUNYEWO, 2016).

Para o cálculo de atividade, o coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol nas condições do ensaio foi de 18000 $M^{-1}.cm^{-1}$. O cálculo de atividade está apresentado a seguir:

$$\text{Atividade} = \frac{\Delta \text{ Abs} \times 10^6 \times V_{\text{Total}}}{t_{(\text{min})} \times 18000 \times V_{\text{enz}}}$$

$$\Delta \text{ Abs} = (\text{Abs}_{\text{reação}} - \text{Abs}_{\text{branco}})$$

3.7.6. Atividade de lacase

O ensaio de lacase foi baseado em Ning e colaboradores (2016), com modificações. Para determinação da atividade de lacase: 50 μ L de extrato foram incubados com 100 μ L de solução de 1 mM de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) por 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 150 μ L de ácido tricloroacético 10%. A leitura do sobrenadante foi determinada pela leitura da reação em 405 nm, em leitor de placas (SpectraMax, Molecular Devices), contra seus respectivos brancos.

O cálculo de atividade está apresentado a seguir:

$$\text{Atividade} = \frac{\Delta \text{ Abs}}{V_{\text{enzima}} \times t_{(\text{min})}}$$

$$\Delta \text{ Abs} = (\text{Abs}_{\text{reação}} - \text{Abs}_{\text{branco}})$$

A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 1 unidade sob as condições de ensaio (NING et al., 2016).

3.8. Processamento do secretoma de *F. oxysporum* URM 7401 para espectrometria de massas

Os extratos proteicos, obtidos dos cultivos com 1% (m/v) caseína e farinha de pena, foram submetidos à liofilização, em liofilizador Alpha 2-4 LDplus (Martin Christ), cujo vácuo equivalente correspondia a - 40 °C.

O material foi reunido, solubilizado em água e centrifugado a 10000 x g, a 4 °C por 30 min. O sobrenadante foi filtrado, em membranas de 0,22 µm, e processado em triplicata.

Dois mililitros de sobrenadante foram transferidos para um tubo cônico de 5 mL e ao material foram adicionados 2 mL de solução metanol:clorofórmio (1:1). A precipitação foi mantida sem agitação, a 8 °C por 16 h.

Após este período, as fases aquosa e orgânica solúveis foram descartadas. Para uma melhor definição da interface, o material restante foi centrifugado a 10000 x g, a 8 °C por 10 min. Os volumes residuais das fases aquosa e orgânica foram coletados para descarte; e a película contendo o material proteico foi transferida para um microtubo de 2 mL.

A película foi submetida ao protocolo de precipitação o *kit* 2-D Clean-Up (GE Healthcare Life Sciences), de acordo com as instruções do fabricante.

3.9. Processamento do secretoma de *M. thermophila* para espectrometria de massas

As soluções (sublinhadas no texto) foram preparadas, de acordo com o volume necessário para cada etapa, e estão apresentadas na seção 3.9.1, após a descrição da metodologia.

O material proveniente de 72 h de bioprocessamento sólido foi processado para obtenção de proteínas secretadas. Ao extrato proteico (correspondente a uma replicata com 3 sacos) foi adicionado 1 g polivinilpolipirrolidona (PVPP, Sigma), 100 mL de tampão de extração e 0,1 mL de β -mercaptoetanol.

O material foi homogeneizado com o auxílio de um bastão de vidro e mantido sob agitação de 160 rpm, por 30 min a 15 °C. Após este processo, o material foi filtrado em gaze; o filtrado foi centrifugado a 10000 x g, por 30 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi filtrado em membrana de 0,22 μ m e transferido para um novo tubo.

O sobrenadante foi submetido à precipitação com 100 mL de tampão de precipitação, por 16 h a -20 °C. Após esta etapa, o material foi centrifugado a 10000 x g, por 30 min a 4 °C, e o sobrenadante foi descartado.

Para a lavagem, ao precipitado foram adicionados 30 mL de tampão de lavagem I e o material foi mantido por 1 h a -20 °C. O material foi centrifugado a 10000 x g, por 30 min a 4 °C, e o sobrenadante descartado. Esta etapa foi repetida mais duas vezes.

Após a lavagem inicial, ao precipitado foram adicionados 30 mL de tampão de lavagem II. O material foi mantido a -20 °C por 48 h e, posteriormente, foi submetido à centrifugação a 13000 x g, por 30 min a 4 °C, e o sobrenadante descartado.

Para a volatilização da acetona, os tubos foram mantidos abertos em local limpo, a 20 °C por 1 h. Após a remoção da acetona, o precipitado foi solubilizado em tampão de solubilização, por 48 h a 20 °C.

Para remoção de material não solubilizado, os frascos foram centrifugados a 10000 x g, por 15 min a 20 °C, e o sobrenadante transferido para um microtubo novo.

O material foi novamente centrifugado a 16000 x *g* por 60 min a 20 °C e o sobrenadante obtido nesta etapa foi submetido ao protocolo de precipitação utilizando o *kit* 2-D Clean-Up (GE Healthcare Life Sciences), de acordo com as instruções do fabricante.

3.9.1. Preparo de soluções

❖ Tampão de extração

Para o preparo do tampão de extração cada uma das soluções foi preparada separadamente, seguindo as orientações de concentração e pH.

O volume correspondente de cada solução foi adicionado à solução final. Para cada 100 mL de tampão de extração foram adicionados: 50 mL de Tris-HCl (1M, pH 7,5); 10 mL de solução de cloreto de potássio (1 M); 10 mL de solução de EDTA (0,5 M, pH 8,0); 24 g de sacarose e 34,8 mg de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), que foi solubilizado em 2 mL de isopropanol antes de ser adicionado. O volume foi completado com água ultrapura.

❖ Tampão de precipitação (0,1 M de acetato de amônio / 100% metanol)

O tampão de precipitação foi preparado pela solubilização de acetato de amônio (77,8 g/mol) em metanol, na concentração de 0,0078 g/mL. Após a solubilização, a solução foi mantida em freezer -20 °C, pelo menos 2 h antes de sua utilização.

❖ Tampão de lavagem I (0,1 M de acetato de amônio / 100% metanol)

O tampão de lavagem I possui a mesma composição do tampão de precipitação, e foi preparado da mesma forma. Após a solubilização do acetato de amônio, a solução foi mantida em freezer -20 °C, pelo menos 2 h antes de sua utilização.

❖ Tampão de lavagem II (100 % Acetona)

O tampão de lavagem II é composto por acetona PA que foi mantida em freezer -20 °C por pelo menos 2 h antes de sua utilização.

❖ Tampão de solubilização

Para cada 100 mL de tampão de solubilização foram adicionados 42 g de ureia; 15,2 g de tiourea; 1 mL de solução de DTT (1 M) e 0,1 g de Triton X-100. O volume da solução foi completado com água ultrapura.

Para o preparo do tampão de solubilização, as massas de ureia e tiourea foram fracionadas e solubilizadas em água. A massa de Triton X-100 foi ajustada em um microtubo por gotejamento.

A solução de DTT foi preparada em água e adicionada ao tampão de solubilização, imediatamente antes de sua utilização.

3.10. Digestão trípica e espectrometria de massas utilizando LC-MS acoplada ao ESI-Q-TOF

Os precipitados, obtidos dos secretomas de *F. oxysporum* URM 7401 e *M. thermophila*, foram solubilizados em 50 µL de solução de ureia 8 M, dos quais 5 µL foram utilizados para a quantificação.

Ao volume de cada amostra, equivalente a 50 µg de proteínas, foram adicionados 10 µL de solução de DTT (45 mM) e a mistura foi incubada a 37 °C por 1 h.

Após a etapa de redução, foram adicionados 10 µL de solução de iodoacetamida (100 mM) e a mistura foi incubada a 20 °C, por 1 h em ambiente protegido da luz.

Ao material foram adicionados 160 µL de tampão bicarbonato de amônio (0,1 M) e o 2 µg de tripsina de porco dimetilada, grau proteômico (Sigma) que foram incubados por 24 h a 37 °C.

A reação foi finalizada com 10 µL de ácido fórmico e os peptídeos gerados foram concentrados e dessalinizados de acordo com o descrito em resina de fase reversa POROS[®] R2 (Applied Biosystems[®]), de acordo com o descrito anteriormente na seção 3.5.6.

Os peptídeos secos foram então solubilizados em uma solução 0,1% (v/v) de ácido fórmico e 5% (v/v) de acetonitrila. As amostras foram submetidas à separação por UPLC (Waters, Beverly, MA) com uma coluna capilar de fase reversa C₁₈, acoplado diretamente à fonte de ionização, e o fracionamento foi realizado utilizando um gradiente crescente de acetonitrila.

Os peptídeos foram analisados *online* em uma fonte “eletrospray”, acoplado a um espectrômetro de massas Q-TOF (ESI-Q-TOF-MS, Ultima, Waters). Os espectros foram coletados no modo *data-dependent acquisition*, e processados pelo *software* Mass Lynx 4.0.

Os peptídeos fragmentados, por colisão induzida (CID-MS/MS), foram coletados automaticamente, sendo selecionados pelos íons mais intensos, durante um determinado tempo da cromatografia, utilizando para isto programas apropriados.

Os dados de espectrometria de massas foram obtidos no equipamento sob supervisão do Prof. Dr. José César Rosa (FMRP), localizado no Centro de Química de Proteínas, no Hemocentro de Ribeirão Preto.

3.10.1. Análises de bioinformática das proteínas secretadas

Os espectros MS/MS foram processados e os seguintes parâmetros foram considerados: sem restrição taxonômica (contra um banco de dados específico, descritos a seguir), clivagem por tripsina e permissão para até uma clivagem perdida; modificação fixa da cisteína – carbamidometilação; modificação variável da metionina – oxidação; tolerância do peptídeo: 1,2 Da; tolerância do fragmento iônico MS/MS: 0,8 Da e massas médias.

Para as amostras de *F. oxysporum* URM 7401, os dados foram analisados contra o banco de dados referência UP000030663 de *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 54005.

Este banco de dados contém 22754 proteínas (acesso em 24 de setembro de 2017) e o arquivo FASTA foi obtido em <http://www.uniprot.org/proteomes/UP000030663>.

Para as amostras de *M. thermophila*, os dados foram analisados contra o banco de dados referência UP000007322 de *Myceliophthora thermophila* (strain ATCC 42464 / BCRC 31852 / DSM 1799) / (*Sporotrichum thermophile*) (Strain: ATCC 42464 / BCRC 31852 / DSM 1799).

Este banco de dados contém 9079 proteínas (acesso em 24 de setembro de 2017) e o arquivo FASTA foi obtido em <http://www.uniprot.org/proteomes/UP000007322>.

Os resultados foram considerados significantes para um acerto aleatório individual com $p < 0,05$, que representa identidade ou homologia, de acordo com o escore estabelecido pelo MASCOT (Matrix Science, Boston, Massachusetts, EUA).

As proteínas identificadas foram submetidas a análise pelo algoritmo Scaffold 4.8.4 (Proteome Software Inc., Portland, OR), para validar a identificação dos peptídeos, com FDR - *false discovery rate* (menor que 1%). A probabilidade de identificação dos peptídeos foi ajustada para um mínimo de 95%, enquanto que a probabilidade de identificação das proteínas foi de 99%.

3.10.2. Predição de propriedades das proteínas identificadas utilizando análises *in silico*

As sequências FASTA das proteínas identificadas no secretoma de *F. oxysporum* URM 7401 e *M. thermophila* também foram analisadas quanto a presença de peptídeos sinais, ponto isoelétrico teórico e de efetores para fitopatogenicidade.

Para a previsão de peptídeos sinais, as amostras foram analisadas no servidor Signal P4 (PETERSEN et al., 2011).

O ponto isoelétrico teórico (pI) das sequências secretadas de *F. oxysporum* URM 7401 e *M. thermophila* foi determinado utilizando a ferramenta disponível em https://web.expasy.org/compute_pi/.

As informações do pI teórico foram correlacionados com a massa molecular obtidas da sequência identificada.

No caso específico de *F. oxysporum* URM 7401, que pertence a um grupo de microrganismos classificados como fitopatógenos, também foi realizada a análise com a ferramenta EffectorP, disponível em <http://effectorp.csiro.au/>, que prediz a presença de possíveis efetores fúngicos envolvidos na interação com os hospedeiros.

A predição pela ferramenta EffectorP é baseada no tamanho da sequência, massa molécula, carga líquida da proteína e seu conteúdo de cisteína, serina e triptofano (SPERSCHNEIDER et al., 2015).

3.11. Ensaio da degradação de resíduos agroindustriais por extratos de *F. oxysporum* URM 7401

Para avaliar a capacidade de degradação de biomassa foram utilizados secretomas de *F. oxysporum* URM 7401 obtidos em 96 h de bioprocessamento submerso com caseína e farinha de pena (seção 3.6.1).

O estudo da degradação de resíduos agroindustriais foi realizado pela incubação de 20 µL de extrato/mg de substrato. Os resíduos agroindustriais utilizados foram: farelo de trigo (FT), farelo de soja (FS) e farelo de arroz (FA), que foram gentilmente cedidos pela Prof^a. Dr^a. Heloíza Ferreira Alves-Prado (IBILCE/UNESP).

Os extratos de caseína e farinha de pena foram incubados por 0, 24, 96 e 168 h a 35 °C. O controle deste ensaio foi realizado utilizando extrato inativado por fervura e água nas mesmas condições anteriores.

O produto gerado pela incubação de extrato e resíduo foi avaliado para a determinação de liberação de açúcares redutores utilizando o método do DNS (MILLER, 1959).

3.12. Ensaio da degradação de resíduos agroindustriais por extratos de *M. thermophila*

Para avaliar a capacidade de degradação de biomassa foram utilizados 500 µL dos secretomas de *M. thermophila* obtidos em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido (seção 3.6.2). Os secretomas foram incubados a 35 °C com 10 mg de resíduos agro-industriais (farelo de arroz, farelo de soja e farelo de trigo).

Como controle, os resíduos agro-industriais foram incubados com o mesmo volume dos respectivos extratos enzimáticos previamente inativados por fervura. O produto gerado pela incubação por 24 h de extrato e resíduo foi avaliado para a determinação de liberação de açúcares redutores utilizando o método do DNS (MILLER, 1959).

O cálculo da porcentagem de sacarificação foi baseado em Ramanjaneyulu e Reddy (2016) e está descrito a seguir.

$$\text{Sacarificação (\%)} = \frac{0,9 \times (\text{Açúcar redutor liberado})}{(\text{Carboidrato da biomassa})} \times 100$$

As unidades utilizadas para açúcar redutor liberado e carboidrato da biomassa foram padronizadas (µg ou mg). A quantidade de carboidratos em cada resíduo agroindustrial levou em consideração o teor de celulose, hemicelulose e amido, conforme apresentados na TABELA 2. Para cada 1 mg de farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja foram considerados que 0,55; 0,60 e 0,63 mg correspondem a carboidratos, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito de pH sobre o perfil de proteínas intracelulares do fungo *F. oxysporum* URM 7401

O pH é um parâmetro químico que influencia de modo muito expressivo na produção de metabólitos e, conseqüentemente, no perfil proteico que é alterado na tentativa de adaptação ao pH ambiental extracelular.

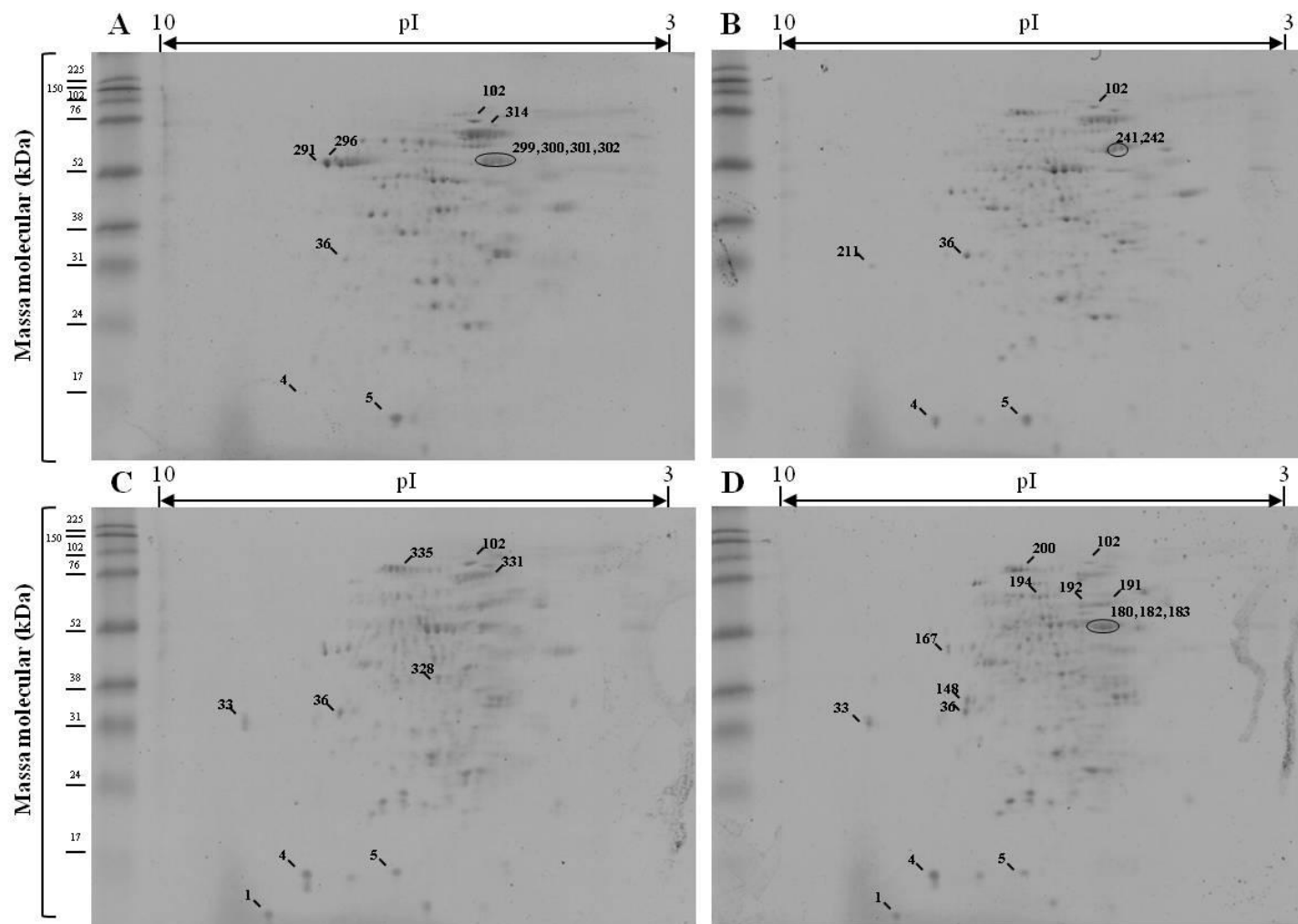
Neste contexto, elucidar o perfil de proteínas intracelulares e de enzimas secretadas de *F. oxysporum* URM 7401 pode auxiliar no esclarecimento sobre o comportamento deste microrganismo em diferentes condições de pH extracelular.

Para avaliar a influência do pH extracelular do meio de cultivo as proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 foram extraídas dos micélios coletados em 96 h dos bioprocessos submersos nos pH 5, 6, 7 e 8.

O perfil de proteínas presentes no proteoma foi determinado utilizando eletroforese bidimensional e é possível observar que a maior parte das proteínas está distribuída na faixa de 31 a 102 kDa e na faixa de pH neutro a ácido (FIGURA 16).

Nos perfis de proteínas intracelulares de pH 5, 6, 7 e 8 foram detectados 146, 195, 186 e 187 *spots*, respectivamente. Após a seleção dos *spots* foram identificadas 28 proteínas cujas características estão apresentadas na TABELA 4.

Figura 16 - Eletroforese bidimensional de proteínas extraídas do micélio de *F. oxysporum* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h em diferentes pH inicial do meio. **(A)** pH 5, **(B)** pH 6, **(C)** pH 7 e **(D)** pH 8



O marcador de massa molecular utilizado foi o Amersham ECL Full-Range Rainbow com o seguinte padrão de bandas 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24, 17 e 12 kDa. Os géis de 7 cm foram carregados com 13 µg de proteínas totais e corados com Coomassie R-350.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4 - Lista de proteínas intracelulares extraídas dos micélios de *F. oxysporum* URM 7401 cultivados em bioprocessos submersos com diferentes condições de pH (5, 6, 7 e 8) identificadas por MALDI- TOF/TOF-MS/MS

| Cód. | Proteína [espécie] | Acesso | Escore | Cobertura (%) | MM (kDa) | | pI | |
|--|---|--------------|--------|---------------|----------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| Exclusivo ou mais abundante em pH 5 | | | | | | | | |
| 5 | Cu-Zn superóxido dismutase [<i>F. verticillioides</i> 7600] | gi 584129430 | 228 | 21 | 22 | 16 | 5,74 | 6,70 |
| 291 | Fosfatase ácida [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubeense</i> race 4] | gi 475672358 | 119 | 5 | 48 | 57 | 6,61 | 7,70 |
| 296 | Fosfatase ácida [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubeense</i> race 4] | gi 475672358 | 174 | 9 | 48 | 59 | 6,61 | 7,60 |
| 299 | Aminopectidase [<i>F. verticillioides</i> 7600] | gi 584136777 | 76 | 2 | 52 | 59 | 5,47 | 5,50 |
| 300 | Aminopectidase [<i>F. verticillioides</i> 7600] | gi 584136777 | 93 | 2 | 52 | 60 | 5,47 | 5,20 |
| 301 | Aminopectidase [<i>F. verticillioides</i> 7600] | gi 584136777 | 84 | 2 | 52 | 60 | 5,47 | 5,30 |
| 302 | Aminopectidase [<i>F. verticillioides</i> 7600] | gi 584136777 | 87 | 2 | 52 | 60 | 5,47 | 5,40 |
| 314 | Serina carboxipeptidase [<i>F. fujikuroi</i>] | gi 145586987 | 114 | 2 | 65 | 72 | 6,11 | 5,50 |
| Exclusivo ou mais abundante em pH 6 | | | | | | | | |
| 211 | Malato desidrogenase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubeense</i> race 4] | gi 475673703 | 99 | 6,00 | 35 | 31 | 9,03 | 8,70 |
| 241 | Aminopectidase [<i>F. verticillioides</i> 7600] | gi 584136777 | 103 | 5,00 | 52 | 60 | 5,47 | 5,30 |
| 242 | Aminopectidase [<i>F. verticillioides</i> 7600] | gi 584136777 | 77 | 2,00 | 52 | 60 | 5,47 | 5,40 |

| Cód. | Proteína [espécie] | Acesso | Escore | Cobertura (%) | MM (kDa) | | pI | |
|--|---|--------------|--------|---------------|----------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| Exclusivo ou mais abundante em pH 7 | | | | | | | | |
| 102 | Alanina/arginina aminopeptidase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> race 1] | gi 477520481 | 75 | 1 | 110 | 85 | 5,69 | 5,70 |
| 328 | Actina OS [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>] | ACT_SCHPO* | 138 | 12 | 42 | 38 | 5,31 | 6,10 |
| 331 | N-acetil-β-D-glicosaminidase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> race 4] | gi 475668910 | 216 | 11 | 66 | 75 | 5,31 | 5,50 |
| 335 | Peroxidase/catalase [<i>F. verticillioides</i>] | gi 216408357 | 62 | 3 | 89 | 80 | 6,58 | 6,60 |
| Exclusivo ou mais abundante em pH 8 | | | | | | | | |
| 1 | Nucleosídeo difosfato quinase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> race 4] | gi 475670818 | 139 | 11 | 26 | 13 | 8,46 | 8,40 |
| 4 | Peptidilprolil cis-trans isomerase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> race 4] | gi 475663475 | 68 | 6 | 25 | 16 | 9,42 | 7,90 |
| 33 | Malato desidrogenase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> race 4] | gi 475673703 | 277 | 18 | 35 | 31 | 9,03 | 8,70 |
| 36 | Proteína hipotética FOYG_07497 [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | gi 587667505 | 286 | 20 | 36 | 33 | 6,08 | 7,40 |
| 148 | Malato desidrogenase, NAD-dependente [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | gi 587669372 | 92 | 6 | 35 | 35 | 6,47 | 7,30 |

| Cód. | Proteína [espécie] | Acesso | Escore | Cobertura (%) | MM (kDa) | | pI | |
|------|---|--------------|--------|---------------|----------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| 167 | Provável citrato sintase mitocondrial [<i>F. fujikuroi</i> IMI 58289] | gi 517310432 | 231 | 10 | 52 | 46 | 8,18 | 7,60 |
| 180 | Enolase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ubense race 4</i>] | gi 475668982 | 232 | 19 | 47 | 52 | 5,06 | 5,50 |
| 182 | Enolase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ubense race 4</i>] | gi 475668982 | 361 | 27 | 47 | 52 | 5,06 | 5,40 |
| 183 | Enolase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ubense race 4</i>] | gi 475668982 | 267 | 19 | 47 | 53 | 5,06 | 5,30 |
| 191 | Aminopectidase [<i>F. verticillioides 7600</i>] | gi 584136777 | 59 | 2 | 52 | 61 | 5,47 | 5,40 |
| 192 | UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ubense race 4</i>] | gi 475663781 | 64 | 3 | 55 | 61 | 5,34 | 5,80 |
| 194 | Fosfoenolpiruvato carboxiquinase [ATP] [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ubense race 1</i>] | gi 477512939 | 59 | 4 | 79 | 65 | 7,94 | 6,30 |
| 200 | Aconitato hidratase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum 25433</i>] | gi 591491590 | 95 | 3 | 86 | 80 | 6,20 | 6,60 |

Cód: código do spot; Acesso: código de acesso nos bancos de dados (* Banco de dados SwissProt; demais códigos referentes ao banco de dados NCBItr); MM: massa molecular; pI: ponto isoelétrico.

Fonte: Elaborado pela autora.

As proteínas identificadas na TABELA 4 foram agrupadas de acordo com os processos biológicos nos quais estão envolvidas e de modo qualitativo foram pontuadas dentro do quadro ilustrativo (FIGURA 17).

Figura 17 - Quadro dos processos biológicos nos quais as proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401, cultivados em diferentes pH, estão envolvidas.

| Processo biológico | pH 5 | pH 6 | pH 7 | pH 8 |
|---|------|------|------|------|
| Citoesqueleto e Parede celular | | | | |
| Citoesqueleto | | | ■ | |
| Parede celular | | | ■ | ■ |
| Mecanismos modulados pelo estresse | | | | |
| Enzimas com propriedades fisiológicas | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Estresse oxidativo | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Metabolismo de proteínas | | | | |
| Regulação por fosfatase | ■ | | | |
| Peptidases | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Metabolismo de carboidratos | | | | |
| Glicólise | | | | ■ |
| Gliconeogenese | | | | ■ |
| Ciclo do TCA | | ■ | ■ | ■ |

Fonte: Elaborado pela autora.

A seguir estão apresentadas as discussões acerca da participação de proteínas intracelulares em processos biológicos. As proteínas apresentadas foram identificadas no cultivo de *F. oxysporum* com diferentes condições de pH 5, 6, 7 e 8.

❖ **Proteínas relacionadas à parede celular e ao citoesqueleto**

A identificação de proteínas relacionadas à parede celular e ao citoesqueleto pode ser um indicativo da integridade da estrutura do fungo e de seu crescimento. O

spot 331 (pH 7) foi identificado como uma N-acetil- β -D-glicosaminidase, também nomeada como β -hexosaminidase, a qual participa dos processos catabólicos de polissacarídeos e quitina (SUN et al., 2014).

Além disso, o *spot* 192 (pH 8) foi identificado como UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase que catalisa a formação de UDP-N-acetilglicosamina, uma molécula envolvida na biossíntese de parede celular de fungos (LEE et al., 2008).

O aumento na expressão de diferentes proteínas envolvidas na síntese ou remodelamento da parede celular tem sido relacionado com a virulência (LI et al., 2015; SUN et al., 2014) e formação de conídeos (DENG et al., 2015) de *F. oxysporum*.

Outra proteína de citoesqueleto, identificada em pH 7, foi a actina (Spot 328). Em conjunto, neste trabalho identificamos que ocorreu um maior acúmulo de biomassa em pH 7 e 8, baseando-se na concentração de proteínas intracelulares totais. O crescimento de *F. oxysporum* URM 7401 foi condizente com as proteínas identificadas relacionadas à manutenção de parede celular e citoesqueleto.

❖ **Proteínas envolvidas na regulação proteica, processos celulares e no metabolismo proteico**

As fosfatases desfosforilam substratos proteicos e dessa forma controlam processos bioquímicos e celulares. No pH 5, os *spots* 291 e 296 foram exclusivos e sequenciados como uma fosfatase ácida.

Rossi et al. (2013) também relataram que a secreção de fosfatases ácidas ou alcalinas (entre outras proteínas e enzimas) devem se ajustar fisiologicamente às mudanças de pH do ambiente e que respondem ao pH sob a regulação do sistema Pal/PacC via transdução de sinal.

Da mesma forma, alguns autores relataram que a expressão de fosfatase ácida em condições ácidas está sujeita ao controle do sistema PacC e que é mediada pelo gene *pacA* (PEÑALVA et al., 2008).

A menor abundância de alanina/arginina aminopeptidase (*spot* 102) foi detectada em pH 8 e aumentada em pH 5 e 7. Os *spots* 299, 300, 301, 302 (pH 5); 241, 242 (pH 6); e 191 (pH 8) também foram identificados como aminopeptidases. Análises do gel bidimensional sugerem que os *spots* 299, 300,

301 e 302; ou 241 e 242 são proteoformas. Os *spots* que apresentaram a mesma identificação foram denominados como proteoformas porque apresentaram massa molecular e ponto isoelétricos semelhantes.

Proteoformas são formas moleculares diferentes nas quais o produto proteico de um único gene pode ser encontrado, incluindo as alterações devido às variações genéticas, os transcritos de RNA com *splicing* alternativo e modificações pós-traducionais (SMITH; KELLEHER, 2013).

Aminopectidases catalisam a remoção de aminoácidos das porções aminoterminais e estão envolvidas no metabolismo de aminoácidos e proteínas (ZHAO et al., 2012). Alguns tipos de aminopectidases estão envolvidas em sistemas de autofagia de mitocôndrias, denominado mitofagia.

Esta condição ocorre quando o estresse provocado pelo cultivo provoca danos nas mitocôndrias, que são eliminadas com o objetivo de se manter a qualidade mitocondrial (SUZUKI, 2013).

O *spot* 314 detectado em pH 5 foi identificado como uma serina carboxipeptidase que catalisa a hidrólise de ligações peptídicas. A análise global da abundância de aminopectidases e serina carboxipeptidases indica que a abundância destas enzimas foi maior em pH 5 e diminuída em pH 8.

A presença de peptidases, mesmo que em diferentes abundâncias, sugere que estas enzimas participam de processos metabólicos essenciais para *F. oxysporum* URM 7401. Além disso, a presença de fosfatases ácidas sugere que o sistema de regulação PacC está envolvido no controle de pH por *F. oxysporum* URM 7401.

❖ **Proteínas envolvidas em mecanismos de resistência ao estresse**

As enzimas nucleosídeo difosfato quinase (NDK) e peptidilprolil cis–trans isomerase (PPI) desempenham funções fisiológicas, mas podem estar envolvidas na resposta a diferentes condições de estresses (HOUTERMAN et al., 2007). Neste estudo, as enzimas NDK e PPI foram mais abundantes nas condições neutra e alcalina.

O *spot* 1 detectado em pH 7 e 8 representa uma NDK que está envolvida no metabolismo de nucleotídeos e também no controle da concentração celular

de ATP (Trifosfato de adenosina). O aumento na abundância de NDK já foi previamente relacionado a condições de estresse em diferentes organismos (ZHANG et al., 2013).

A abundância de peptidilprolil cis-trans isomerases (*spot 4*) foi 7 vezes maior em pH 8 do que em pH 5. Esta proteína acelera o dobramento de proteínas e a isomerização de ligações peptídicas e está relacionada a vários processos biológicos, tais como, a organização da cromatina, fusão celular ou no dobramento de proteínas (ASHBURNER et al., 2000; THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015).

Estudos com o fungo filamentosso *Botrytis cinerea* indicaram que PPI é um fator de virulência, uma vez que pode estar envolvida na invasão do tecido hospedeiro, na patogenicidade ou no desenvolvimento do microrganismo (LI et al., 2012).

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) é intrínseca ao metabolismo aeróbico e é fundamental para a sinalização celular (KROLL; PÄHTZ; KNIEMEYER, 2014). A capacidade de responder ao estresse oxidativo tem sido considerada um fator de virulência para espécies de *Fusarium* (SUN et al., 2014; LI et al., 2015).

A abundância da proteína hipotética FOYG_07497 (relacionada à desidrogenases de cadeia curta/redutases), codificada pelo *spot 36*, foi de 3,7 vezes menor em pH 5.

A abundância de superóxido dismutase (SOD) (*Spot 5*) foi 3,2 vezes maior em pH 5 do que em pH 8. O íon superóxido, uma das espécies reativas de oxigênio (ERO) mais prejudiciais, é produzida de forma endógena como consequência do metabolismo aeróbico e pode causar danos em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (SARKAR; SARAISKUMAR, 2011).

A enzima SOD catalisa a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2) a partir do ânion superóxido (O_2^-) a (AYAR-KAYALI; OZER; TARHANA, 2002). A produção de enzimas SOD está diretamente condicionada ao aumento de ERO intracelular e, por isso esta enzima é utilizada como biomarcador de estresse oxidativo (SARKAR; SARAISKUMAR, 2011).

A redução de SOD já foi descrita como responsável pela redução da virulência de *B. cinerea*, uma vez que a produção desta enzima é um mecanismo

de resistência de fitopatógenos contra as reações de defesa dos hospedeiros que produzem grandes quantidades de ERO (LÓPEZ-CRUZ et al., 2017).

Por outro lado, Cu-Zn SOD de *B. cinerea* também é apontada como um fator de virulência devido à habilidade de geração de ERO nas etapas iniciais da infecção (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2015).

Neste trabalho, a produção de SOD foi maior no pH 5. No entanto, em estudos sobre o efeito de pH (5, 6, 7, 8 e 9) no cultivo de *Bacillus subtilis*, o maior nível de SOD foi detectado em pH alcalino (SARKAR; SARAISKUMAR, 2011).

A enzima peroxidase/catalase foi identificada pelo *spot* 335. A frequência das proteoformas de peroxidase/catalase indicam que a abundância desta enzima foi maior em pH 7, mas não foi identificada em pH 5.

Em fungos fitopatogênicos esta enzima pode ser secretada como forma de proteção ao aumento do nível de H_2O_2 em células hospedeiras. A peroxidase/catalase é fundamental para o crescimento de hifas, a manutenção da integridade da parede celular fúngica e a resposta ao estresse oxidativo, por esse motivo tem sido postulado como um fator de virulência de *F. oxysporum* (SUN et al., 2014).

No estudo com *B. subtilis* a produção de catalase foi aumentada nas condições mais extremas de acidez (pH 5) e alcalinidade (pH 9). Os autores propuseram pelo perfil de produção de peroxidase/catalase e SOD que o dano oxidativo foi causado pelo estresse em pH alcalino que levou a geração de superóxido intracelular devido ao desequilíbrio entre o crescimento celular e as atividades metabólicas (SARKAR; SARAISKUMAR, 2011).

A presença de enzimas associadas com o metabolismo de nucleotídeos e dobramento de proteínas indica uma regulação metabólica associada às condições de cultivo. Além disso, a produção de SOD e peroxidase/catalase em todas as condições de pH indica que o cultivo submerso atua como estressor, uma vez que não mimetiza as condições naturais de crescimento deste microrganismo.

❖ Enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos

O metabolismo de carboidratos desempenha um papel vital como fonte primária de carbono e energia e, por esse motivo, as enzimas relacionadas a estes processos podem favorecer a sobrevivência de linhagens mais virulentas (SUN et al., 2014; LI et al., 2015).

Os *spots* 180, 182 e 183 foram exclusivos do pH 8 e correspondem a proteoformas de uma Enolase que catalisa de modo reversível a conversão de fosfoenolpiruvato em 2-fosfoglicerato (MACÍAS-SÁNCHEZ et al., 2015). Li et al. (2015) propuseram que a Enolase pode favorecer o crescimento celular e conferir vantagem para a patogenicidade.

A Enolase também foi relatada como mais abundante em linhagens mais virulentas de *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (LI et al., 2015) e *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (SUN et al., 2014); entretanto, Macías-Sánchez et al. (2015) não encontraram evidências sobre o papel da Enolase na patogenicidade.

O *spot* 194, exclusivo do pH 8, é uma Fosfoenolpiruvato carboxiquinase que participa de vários processos biológicos, tais como: a ligação de ATP, a atividade de quinase, atividade de Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (ATP) e gliconeogênese.

O *spot* 33 foi identificado como malato desidrogenase (MDH) e a abundância em pH 8 foi 4,3 vezes maior do que a pH 7. Além disso, esta enzima também foi identificada nos *spots* 211 e 148 exclusivos dos pH 6 e 8, respectivamente.

A enzima malato desidrogenase atua em diferentes processos biológicos: metabolismo de carboidratos, o envelhecimento celular, metabolismo do malato e ciclo dos ácidos tricarbóxicos (ASHBURNER et al., 2000; THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015). A presença de múltiplos *spots* sugere que estas proteínas podem ter modificações pós traducionais (TANG et al., 2016).

A malato desidrogenase catalisa a conversão reversível de oxalacetato em malato e oxalacetato é um precursor do ácido oxálico, que tem sido descrito como um fator de patogenicidade em *B. cinerea*. As funções fisiológicas de ácido oxálico na patogênese são numerosas e entre elas se destaca a capacidade de sinalização de pH (AMSELEM et al., 2011).

Neste estudo, a maior produção de malato desidrogenase foi detectada em condições neutras e alcalinas o que corrobora com o observado nas linhagens CECT2100 e CECT2996 isoladas a partir de material que possuía pH de origem maior que 6. Estas linhagens acidificavam o meio de cultura, com o aumento de ácido oxálico, para a secreção de peptidase aspártica (TEN HAVE et al., 2010), enzimas envolvidas na degradação de parede celular e toxinas (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2014).

Amselem et al. (2011) justificam que a secreção de ácido oxálico por *B. cinerea* cria ambiente ácido adequado para a expressão e a secreção de fatores de virulência (enzimas) e para a biossíntese e secreção de fitotoxinas. Sendo assim, a malato desidrogenase desempenha um papel chave na cascata de acontecimentos que conduzem morte celular na planta.

Os *spots* 167 e 200 (exclusivos do pH 8) codificam uma citrato sintase mitocondrial e uma aconitato hidratase mitocondrial, respectivamente e participam do ciclo de ácido tricarboxílico (TCA).

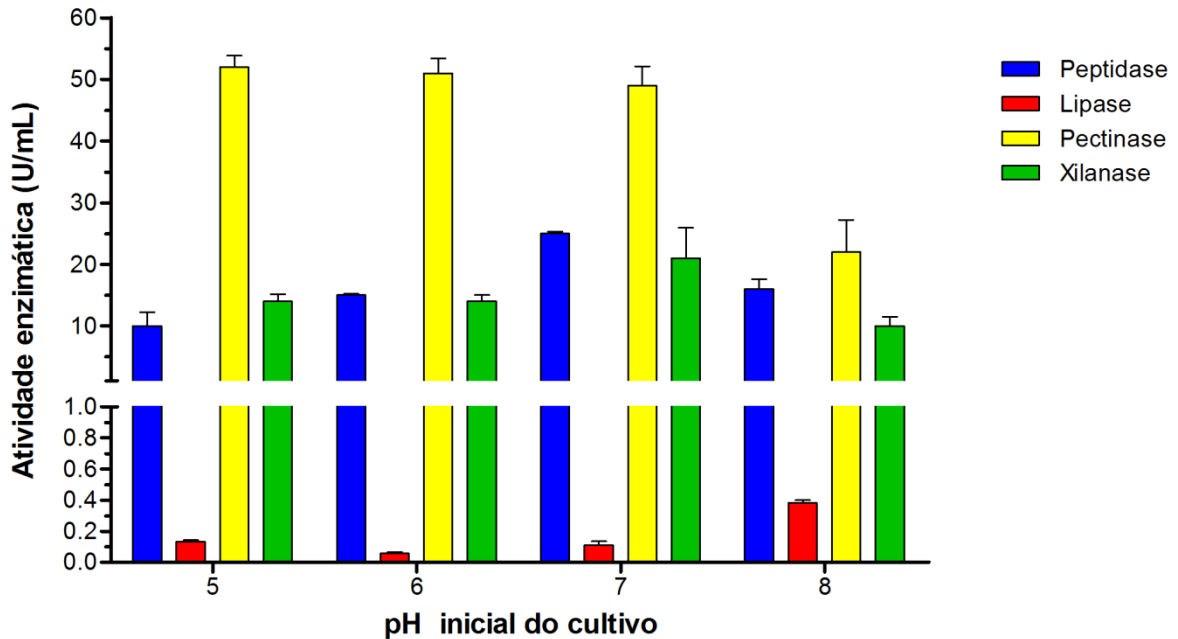
As evidências indicam que os altos níveis de metabolismo e biomassa acumulada em pH 8 pode ser corroborado pela maior abundância e/ou exclusividade de enzimas que participam do metabolismo de carboidratos (glicólise e gliconeogênico) e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

4.2. Efeito de pH sobre a produção de hidrolases pelo fungo *F. oxysporum* URM 7401

A maquinaria global para a produção enzimática é modulada pelo pH extracelular, e em fungos fitopatógenos envolve a regulação da secreção de enzimas para o estabelecimento e proliferação do microrganismo. Neste contexto, os estudos *in vitro* podem mimetizar as condições ambientais com o objetivo de se observar a resposta do microrganismo.

Para avaliar o efeito do pH sobre a resposta de *F. oxysporum* URM 7401 em bioprocesso submerso, os pH iniciais dos meios de cultivo foram ajustados para 5, 6, 7 e 8 e os extratos obtidos foram submetidos à avaliação da produção de hidrolases (FIGURA 18), além da determinação de biomassa acumulada e variação de pH durante o cultivo.

Figura 18 - Perfil de produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo *F. oxysporum* em 96 h de bioprocesso submerso em diferentes condições de pH.



Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média \pm desvio padrão.
Fonte: Elaborado pela autora.

As biomassas acumuladas em cada cultivo foram estimadas pela quantificação de proteínas totais intracelulares. As maiores biomassas foram obtidas nas amostras do pH 7 (0,14 mg/mL) e 8 (0,28 mg/mL). As biomassas obtidas em pH 5 e 6 foram cerca de 7 e 3 vezes menores que a biomassa obtida em pH 8, respectivamente.

Em 96 h de bioprocesso submerso o pH final dos meios foi determinado: $5,48 \pm 0,11$, $6,18 \pm 0,11$, $7,15 \pm 0,05$ e $7,99 \pm 0,11$ para as amostras com pH inicial 5, 6, 7 e 8, respectivamente. Os cultivos com pH iniciais ajustados para 5, 6 e 7 apresentaram uma tendência à alcalinização. Estudo com diferentes fitopatógenos, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus nidulans* e *Fusarium oxysporum*, mostraram que a privação de glicose pode gerar a produção de moléculas que alcalinizam o meio (BI et al., 2016) e estes dados podem ser reflexo da não adição de glicose ou sacarose ao meio de cultivo padrão.

O fungo *F. oxysporum* é capaz de alcalinizar ou acidificar o meio extracelular (ALKAN; ESPESO; PRUSKY, 2013) e por isso, é possível que, se necessário, este microrganismo adeque o meio extracelular para a secreção de

peptidases que são capazes de atuar em diferentes condições de pH, como por exemplo, aspartil peptidases e peptidases alcalinas.

Com o objetivo de modificar o pH extracelular, *F. oxysporum* é capaz de secretar pequenas moléculas, como ácidos orgânicos ou amônia. A habilidade dos fitopatógenos de detectar o pH extracelular e responder as variações ambientais são essenciais, uma vez que proporcionam a otimização do uso das enzimas disponíveis (BI et al., 2016).

O estudo sobre efeito de pH em *F. oxysporum* f.sp. *cumini* cultivado em meio Czapek-dox ágar mostrou que o pH 8 proporcionou o maior crescimento (RATHORE et al., 2015). Por outro lado, Tyagi e Paudel (2014) mostraram que o crescimento e a esporulação de *F. oxysporum* aumentaram em pH 6,5.

Neste estudo foram avaliadas a secreção de peptidases, lipases, xilanases e pectinases, pois estas enzimas estão envolvidas na virulência de microrganismos e podem ser alvos para o controle de fitopatógenos (GONZALEZ-FERNANDEZ et al., 2012).

A maior produção de peptidase, nas condições do estudo, foi obtida em pH 7 ($p < 0,05$) e foi de 2,5, 1,7 e 1,6 vezes maior do que um pH de 5, 6 e 8, respectivamente. A produção peptidase foi favorecida na faixa de pH neutro-alcalina, isso porque o fungo *F. oxysporum* pode secretar outros tipos de peptidases que não peptidases ácidas, as quais podem atuar em condições de pH ácido, neutro e alcalino (YIKE, 2011; JASHNI et al., 2015).

A produção de peptidases é responsiva ao fator de transcrição PacC, que é modulado pelo pH extracelular, (CARACUEL et al., 2003) e a presença de peptidase, pode ser considerada um fator de virulência, pois pode favorecer o crescimento do microrganismo ao promover a hidrólise de proteínas da parede celular ou de defesa do hospedeiro (GONZALEZ-FERNANDEZ et al., 2012).

Jashni et al. (2015) relataram que a secreção de peptidases aumenta a virulência de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, entretanto mutações no gene de serina peptidase não exerceram efeito sobre a patogenicidade (DI PIETRO et al., 2001).

Estudos com *B. cinerea* demonstraram a influência do pH ambiental e mostraram que a indução de peptidases foi aumentada em pH 4 enquanto que a produção de enzimas que degradam parede celular (CWDEs) foram acumuladas em

pH 6 (BI et al., 2012). Estes diferentes perfis podem ser resultantes da extrapolação *in vitro* do pH dos tecidos do hospedeiro (MANTEAU et al., 2003).

As peptidases atuam em diferentes momentos da infecção e, no secretoma de *B. cinerea*, a secreção de peptidases é convergente com a necessidade ambiental (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2015). Além disso, é importante enfatizar que o conteúdo proteico e a sua modulação são específicos para cada fungo (ORTEGA et al., 2013).

A produção de lipase foi maior em pH 8 ($p < 0,05$) e foi cerca de 3, 7 e 4 vezes maior do que um pH de 5, 6 e 7, respectivamente.

Análises *in silico* de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* com base em peptídeos sinais e em sequências pentapeptídicas conservadas previu um grande número de lipases. A interrupção de genes que codificavam lipase geraram mutantes com virulência reduzida e resultados contrastantes, ou seja, a atividade lipolítica não estava diretamente relacionada à redução da virulência (BRAVO-RUIZ; RUIZ-ROLDÁN; RONCERO, 2013).

Neste trabalho, *F. oxysporum* URM 7401 apresentou baixos níveis de produção de lipases em 96 h de bioprocessamento submersos. Estudo com isolados de *F. graminearum* mostraram que, quando presente, a melhor produção foi detectada após 288 h de bioprocessamento e que alguns isolados não apresentaram atividade lipolítica (ORTEGA et al., 2013).

As lipases podem afetar a patogenicidade de fungos devido a sua capacidade de hidrolisar ceras presentes nas cutículas das plantas e, dessa forma, providenciar fontes de carbono durante a fase de adesão e penetração no hospedeiro (BRAVO-RUIZ; RUIZ-ROLDÁN; RONCERO, 2013).

As produções de xilanase e pectinase foram similares nos pH 5, 6 e 7 e reduzidas em condições alcalinas ($p < 0,05$). Além disso, a produção de xilanase é uma evidência de que o sistema PacC está envolvida no controle de pH de *F. oxysporum* URM 7401, porque o controle da produção de xilanase por PacC em *Aspergillus nidulans* já é conhecida. Os genes *xlnA* e *xlnB* codificam endoxilanases e têm a sua expressão ativa em pH ácido e alcalino, respectivamente (PEÑALVA et al., 2008).

Pectinases e xilanases são enzimas que pertencem as enzimas degradadoras de parede celular (CWDE) e a produção destas enzimas é vital para fitopatógenos,

que não possuem estruturas especializadas, pois permitem a penetração nas células das plantas hospedeiras. Além disso, a ação das CWDE sobre os polímeros da parede celular, permite que os microrganismos os utilizem como fonte nutricional para crescimento e reprodução (KUBICEK; STARR; GLASS, 2014).

Nas etapas iniciais da infecção, as CWDE podem melhorar o acesso a outros componentes da parede celular e também facilitar a ação de outras enzimas (ORTEGA et al., 2013).

Apesar da importância destas enzimas, fungos que apresentavam mutações em xilanases e pectinases mantiveram a sua virulência (DI PIETRO et al., 2003), provavelmente isto ocorre devido ao complexo arsenal enzimático que possui diferentes classes e quantidades de CWDEs (KUBICEK; STARR; GLASS, 2014).

Neste estudo, a produção de enzimas hidrolíticas por *F. oxysporum* foi modulada de modo diferencial para peptidases, lipases, xilanases e pectinases.

Adav e colaboradores (2011) ao investigarem o efeito de pH na produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo *Trichoderma reesei* QM6a e seus mutantes sugeriram que a produção foi afetada pelo pH alcalino, uma vez que o pH mais baixo favoreceu a maior expressão proteica, hidrólise da celulose e atividades enzimáticas. Além disso, foram obtidas enzimas hidrolíticas específicas para pH e linhagem.

A capacidade de modular a produção de hidrolases corrobora com o observado neste estudo, além disso, os tipos de hidrolases secretadas (peptidase e xilanase) e a presença de fosfatases ácidas (no proteoma intracelular) sugerem que o sistema de regulação PacC está envolvido no controle de pH por *F. oxysporum* URM 7401.

4.3. Efeito de fontes de nitrogênio sobre o perfil de proteínas intracelulares do fungo *F. oxysporum*

O nitrogênio é muito importante para o metabolismo fúngico pois desempenha papéis funcionais e estruturais que influenciam no crescimento e desenvolvimento de várias espécies. Dessa forma, fungos têm desenvolvido estratégias que lhes permitam obter esse nutriente de diferentes fontes. Nesse contexto, decifrar o perfil de enzimas secretadas e o conteúdo de proteínas intracelulares pode auxiliar a

elucidar o comportamento de *F. oxysporum* URM 7401 na presença de diferentes fontes de nitrogênio.

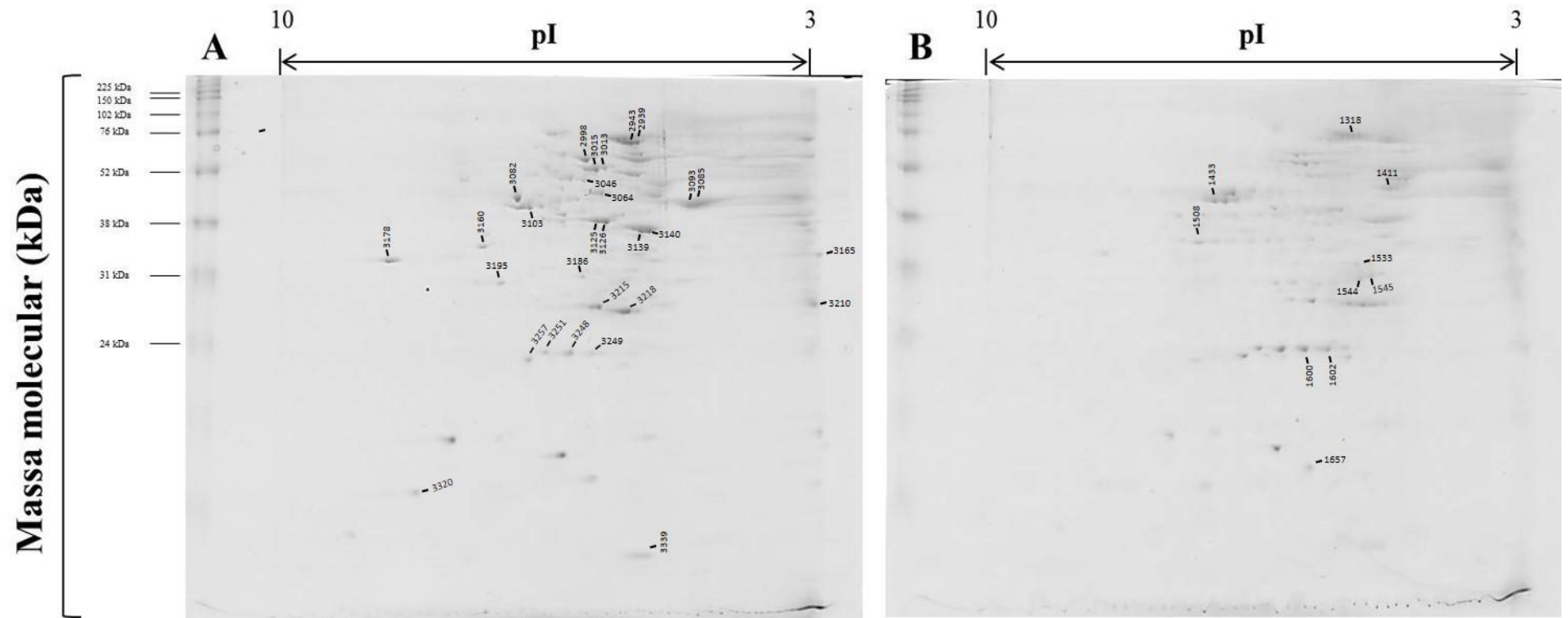
Para avaliar a influência das fontes de nitrogênio: sulfato de amônio, ureia, aminoácidos (ácido glutâmico, cisteína, histidina e isoleucina), caseína e farinha de pena; as proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 foram extraídas dos micélios coletados em 96 h dos bioprocessos submersos.

Os perfis de proteínas intracelulares, presentes no proteoma de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com sulfato de amônio e ureia, foram determinados utilizando eletroforese bidimensional. Na FIGURA 19 é possível observar que a massa molecular da maior parte das proteínas está distribuída na faixa de 31 a 102 kDa; e o ponto isoelétrico na faixa de pH neutro a ácido.

Nos perfis de proteínas intracelulares dos cultivos com sulfato de amônio e ureia foram detectados 278 e 204 *spots*, respectivamente. Os géis bidimensionais foram avaliados individualmente, sem efeitos comparativos, e para cada condição foram selecionados 40 *spots* proeminentes (maior intensidade).

Após a seleção dos *spots* foram identificadas 29 e 10 proteínas para as condições contendo sulfato de amônio e ureia, respectivamente. As proteínas identificadas e as suas características estão apresentadas na TABELA 5.

Figura 19 - Eletroforese bidimensional de proteínas intracelulares extraídas do micélio de *F. oxysporum* submetido ao bioprocesso submerso por 96h com 1% de diferentes fontes de nitrogênio. **(A)** sulfato de amônio, **(B)** ureia



O marcador de massa molecular utilizado foi o Amersham ECL Full-Range Rainbow com o seguinte padrão de bandas 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24, 17 e 12 kDa. Os géis foram carregados com 50 µg de proteínas totais e corados com Coomassie G-250.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5 - Lista de proteínas intracelulares extraídas dos micélios de *F. oxysporum* URM 7401 cultivados em bioprocessos submersos com 1% (m/v) de sulfato de amônio ou ureia identificadas por MALDI- TOF/TOF-MS/MS.

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura (%) | Massa (kDa) | | pI | |
|--------------------------|--|---------------|--------|---------------|-------------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| Sulfato de amônio | | | | | | | | |
| 2939 | Carboxipeptidase cpdS [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> race 1] | gi 477519586* | 204 | 8 | 65 | 73 | 5,75 | 5,6 |
| 2943 | Carboxipeptidase cpdS [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> race 1] | gi 477519586* | 71 | 2 | 65 | 73 | 5,75 | 5,68 |
| 2998 | Glicose-6-fosfato isomerase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> race 4] | gi 475670646* | 72 | 3 | 61 | 62 | 5,64 | 6,24 |
| 3013 | Aldeído desidrogenase [<i>F. avenaceum</i>] | gi 751346087* | 133 | 8 | 54 | 57 | 5,4 | 6 |
| 3015 | Aldeído desidrogenase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> race 4] | gi 475663676* | 131 | 6 | 54 | 56 | 5,57 | 6,12 |
| 3046 | 6-fosfogliconato desidrogenase, descarboxilante 2 [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> race 4] | gi 475664413* | 123 | 4 | 56 | 51 | 5,75 | 6,25 |

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura (%) | Massa (kDa) | | | |
|------|---|---------------|--------|---------------|-------------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| 3064 | Proteína hipotética <i>FOXB_13773</i> [<i>F. oxysporum</i> Fo5176] | gi 342873590* | 377 | 14 | 50 | 47 | 5,57 | 6,03 |
| 3082 | Beta-lactamase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> 26406] | gi 590026218* | 119 | 5 | 45 | 45 | 6,33 | 7,06 |
| 3085 | Protease vacuolar A [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | gi 587664064* | 206 | 7 | 43 | 45 | 4,66 | 4,82 |
| 3093 | Protease vacuolar A [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | gi 587664064* | 188 | 8 | 43 | 44 | 4,66 | 4,97 |
| 3103 | Proteína de choque térmico SSC1 [<i>F. graminearum</i> PH-1] | gi 758204858* | 60 | 1 | 73 | 43 | 5,61 | 6,92 |
| 3125 | Frutose-bifosfato aldolase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> race 4] | gi 475673861* | 137 | 10 | 40 | 40 | 5,44 | 6,09 |
| 3126 | Frutose-bifosfato aldolase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> race 4] | gi 475673861* | 234 | 16 | 40 | 39 | 5,44 | 5,97 |
| 3139 | Transaldolase OS= <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (strain 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) | TAL1_FUSO4** | 129 | 7 | 36 | 38 | 5,11 | 5,54 |

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura (%) | Massa (kDa) | | pI | |
|------|---|---------------|--------|---------------|-------------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| 3140 | Transaldolase OS= <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (strain 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) | TAL1_FUSO4** | 107 | 7 | 36 | 38 | 5,11 | 5,43 |
| 3160 | Proteína hipotética FOYG_07497 [<i>F.</i> <i>oxysporum</i> FOSC 3-a] | gi 587667505* | 205 | 12 | 36 | 35 | 6,08 | 7,48 |
| 3165 | Malato desidrogenase, mitocondrial [<i>F.</i> <i>oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 4] | gi 475673703* | 143 | 11 | 35 | 35 | 9,03 | 3,34 |
| 3178 | Malato desidrogenase, mitocondrial [<i>F.</i> <i>oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 4] | gi 475673703* | 340 | 15 | 35 | 33 | 9,03 | 8,64 |
| 3186 | Proteína hipotética FOXB_12676 [<i>F.</i> <i>oxysporum</i> Fo5176] | gi 342874872* | 154 | 15 | 33 | 31 | 5,85 | 6,25 |
| 3195 | S-formilglutaciona hidrolase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 4] | gi 475666337* | 118 | 16 | 31 | 30 | 6,41 | 7,25 |
| 3210 | Transaldolase OS= <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (strain 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) | TAL1_FUSO4** | 59 | 3 | 29 | 36 | 3,40 | 5,11 |

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura (%) | Massa (kDa) | | pI | |
|------|---|---------------|--------|---------------|-------------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| 3215 | Proteína hipotética <i>FOXB_10488</i> [<i>F. oxysporum</i> <i>Fo5176</i>] | gi 342877609* | 212 | 24 | 28 | 29 | 6,04 | 5,58 |
| 3218 | Triosefosfato isomerase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> <i>race 4</i>] | gi 475666313* | 58 | 5 | 28 | 27 | 5,68 | 5,3 |
| 3248 | Proteína hipotética <i>FOZG_04537</i> [<i>F. oxysporum</i> <i>Fo47</i>] | gi 587696823* | 70 | 7 | 24 | 22 | 6,38 | 6,58 |
| 3249 | Superóxido dismutase [Mn], mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> <i>race 4</i>] | gi 475668421* | 61 | 13 | 24 | 23 | 6,12 | 6,22 |
| 3251 | Superóxido dismutase [Mn], mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> <i>race 4</i>] | gi 475668421* | 96 | 13 | 24 | 23 | 6,69 | 6,22 |
| 3257 | Componente do proteassoma PRE3[<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15] | gi 389622405* | 88 | 15 | 23 | 25 | 6,89 | 5,66 |
| 3320 | Nucleosídeo difosfato quinase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> <i>race 4</i>] | gi 475670818* | 119 | 11 | 13 | 26 | 8,25 | 8,49 |
| 3339 | Peptidilprolil isomerase [<i>F. oxysporum</i> <i>FOSC</i> 3-a] | gi 587674187* | 71 | 18 | 10 | 16 | 5,4 | 9,3 |

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Score | Cobertura (%) | Massa (kDa) | | pI | |
|--------------|---|---------------|-------|---------------|-------------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| Ureia | | | | | | | | |
| 1318 | Carboxipeptidase cpdS [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 1] | ENH71756.1* | 62 | 2 | 65 | 73 | 5,75 | 5,45 |
| 1411 | Tripeptidil aminopeptidase [<i>F. langsethiae</i>] | KPA38682.1* | 78 | 4 | 58 | 45 | 5,23 | 4,99 |
| 1433 | Formiato desidrogenase [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | gi 587679845* | 124 | 7 | 40 | 42 | 6,17 | 7,16 |
| 1508 | Proteína hipotética FOYG_07497 [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | gi 587667505* | 242 | 12 | 26 | 34 | 6,08 | 7,34 |
| 1533 | Ribose 5-fosfato isomerase A [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | gi 587669214* | 103 | 8 | 42 | 31 | 9,08 | 5,42 |
| 1544 | Oxalato descarboxilase [<i>F. verticillioides</i> 7600] | EWG54024.1* | 179 | 8 | 52 | 30 | 5,66 | 5,23 |
| 1545 | Oxalato descarboxilase [<i>F. verticillioides</i> 7600] | EWG54024.1* | 110 | 5 | 52 | 30 | 5,66 | 5,36 |
| 1600 | Fe-Mn superóxido dismutase [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | EWZ00525.1* | 143 | 11 | 28 | 22 | 5,81 | 6,05 |
| 1602 | Fe-Mn superóxido dismutase [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | EWZ00525.1* | 98 | 10 | 23 | 22 | 5,81 | 5,77 |

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura (%) | Massa (kDa) pI | | | |
|------|---|-------------|--------|---------------|---------------------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| 1657 | Proteína hipotética <i>FVEG_12940</i> [<i>F. verticillioides</i> 7600] | EWG54832.1* | 88 | 7 | 17 | 13 | 5,58 | 5,99 |

Cód. Código do *spot*, Teor.: teórico; Obs.: Observado. Na coluna de Acesso as bases de dados utilizadas estão indicadas a seguir: * NCBI (NCBI não redundante); ** SwissProt.

Fonte: Elaborado pela autora.

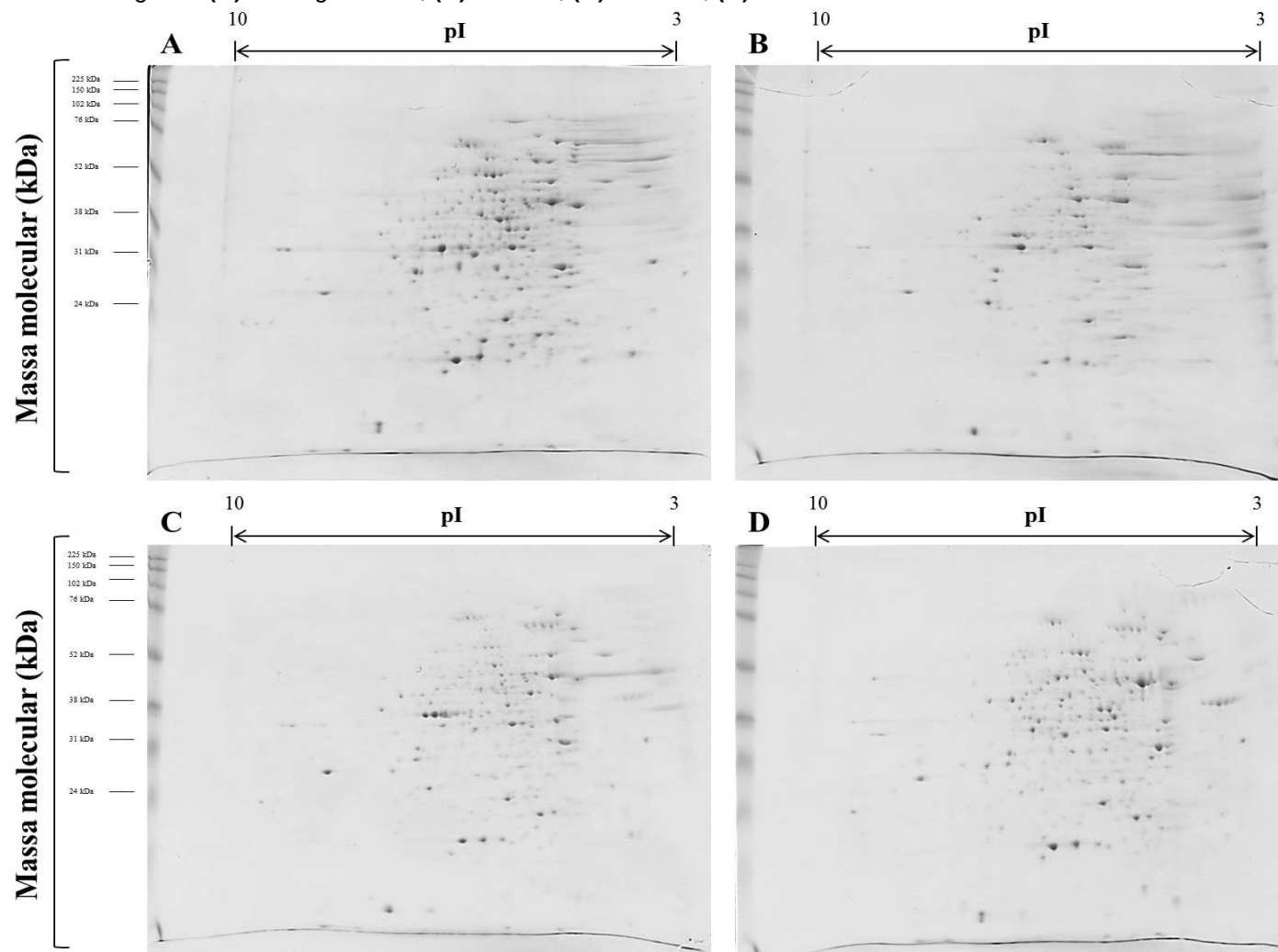
Os perfis de proteínas intracelulares, presentes no proteoma de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com 1% (m/v) de aminoácidos, foram determinados utilizando eletroforese bidimensional. Na FIGURA 20 é possível observar que a massa molecular da maior parte das proteínas está distribuída na faixa de 31 a 102 kDa; e o ponto isoelétrico na faixa de pH neutro a ácido.

Nas análises dos géis bidimensionais foram detectados 496, 400, 425 e 508 *spots*, relativos aos cultivos com ácido glutâmico, cisteína, histidina e isoleucina respectivamente.

Nos cultivos com os aminoácidos, após análise comparativa, foram selecionados *spots* com diferenças no nível de abundância, tanto quali quanto quantitativamente. As proteínas foram distribuídas, de acordo com a abundância ou exclusividade. Para os cultivos com ácido glutâmico, cisteína, histidina e isoleucina estão apresentadas 25, 20, 16 e 23 proteínas, respectivamente. As proteínas identificadas e as suas características estão apresentadas na TABELA 6.

Os *spots* foram demarcados com o auxílio do *software* Image Master 2D Platinum e estão apresentados no APÊNDICE A.

Figura 20 - Eletroforese bidimensional de proteínas intracelulares extraídas do micélio de *F. oxysporum* submetido ao bioprocesso submerso por 96h com 1% de diferentes fontes de nitrogênio. **(A)** ácido glutâmico, **(B)** cisteína, **(C)** histidina, **(D)** isoleucina



O marcador de massa molecular utilizado foi o Amersham ECL Full-Range Rainbow com o seguinte padrão de bandas 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24, 17 e 12 kDa. Os géis foram carregados com 50 µg de proteínas totais e corados com Coomassie G-250.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 6 - Lista de proteínas intracelulares extraídas dos micélios de *F. oxysporum* URM 7401 cultivados em bioprocessos submersos com 1% (m/v) de aminoácidos e identificadas por MALDI- TOF/TOF-MS/MS.

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa | | pI | | NA |
|------------------------|--|-----------------|--------|-----------|-------|------|------|------|-------|
| | | | | | Teor | Obs. | Teor | Obs. | |
| Ácido glutâmico | | | | | | | | | |
| 24 | Peroxidase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018255412.1* | 62 | 4 | 25 | 20 | 5,86 | 6,22 | 2,83 |
| 64 | Espermidina sintase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense tropical race 4 54006</i>] | EXM01944.1* | 60 | 3 | 39 | 27 | 6,24 | 5,68 | 1,95 |
| 76 | Pirofosfatase inorgânica [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense race 1</i>] | ENH61050.1* | 81 | 3 | 46 | 31 | 6,57 | 4,84 | 7,51 |
| 79 | Malato desidrogenase, NAD-dependente [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | EWY91713.1* | 142 | 8 | 35 | 31 | 6,47 | 6,98 | 1,23 |
| 83 | Malato desidrogenase, NAD-dependente [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | EWY91713.1* | 517 | 24 | 35 | 30 | 6,47 | 7,22 | 37,34 |
| 85 | Tiamina tiazol sintase OS= <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (strain 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) | THI4_FUSO4** | 564 | 23 | 35 | 30 | 5,90 | 6,05 | 1,19 |

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa | | pI | | NA |
|------|--|--------------|--------|-----------|-------|------|------|------|-------|
| | | | | | Teor | Obs. | Teor | Obs. | |
| 90 | Tiamina tiazol sintase OS= <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (strain 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) | THI4_FUSO4** | 473 | 23 | 35 | 30 | 5,90 | 6,63 | 1,30 |
| 101 | Aspartato aminotransferase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 1] | ENH72826.1* | 69 | 3 | 47 | 32 | 9,10 | 9,36 | 1,05 |
| 114 | Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | EWZ01894.1* | 61 | 3 | 35 | 33 | 6,09 | 6,60 | 2,05 |
| 140 | Actina, gama OS= <i>Acremonium chrysogenum</i> GN=ACT PE=3 SV=1 | ACTG_ACRCH** | 178 | 6 | 42 | 37 | 5,45 | 5,59 | 32,04 |
| 156 | Proteína hipotética BN1723_009022 [<i>Verticillium longisporum</i>] | CRK09269.1* | 75 | 2 | 91 | 40 | 6,08 | 6,03 | 3,49 |
| 162 | 6-fosfogliconato desidrogenase, descarboxilante 2 [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 4] | EMT62208.1* | 283 | 8 | 56 | 40 | 5,75 | 6,30 | 3,05 |
| 180 | Subunidade beta da ATP sintase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 4] | EMT62383.1* | 479 | 15 | 55 | 43 | 5,27 | 4,85 | 6,02 |

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa | | pI | | NA |
|------|--|-----------------|--------|-----------|-------|------|------|------|------|
| | | | | | Teor | Obs. | Teor | Obs. | |
| 181 | Inibidor de dissociação Rab-GDP [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> race 4] | EMT60657.1* | 351 | 12 | 52 | 44 | 5,44 | 5,62 | 3,06 |
| 221 | Provável heat-shock protein hsp60 [<i>F. fujikuroi</i> IMI 58289] | CCT67279.1* | 770 | 14 | 78 | 51 | 5,46 | 5,26 | 4,04 |
| 226 | Piruvato quinase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ubense tropical</i> race 4 54006] | EXM07608.1* | 134 | 3 | 59 | 53 | 5,90 | 6,40 | 1,13 |
| 227 | Fosfoenolpiruvato carboxiquinase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018237557.1* | 452 | 24 | 37 | 53 | 5,37 | 6,24 | 1,16 |
| 229 | Fosfoenolpiruvato carboxiquinase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018237557.1* | 320 | 16 | 37 | 55 | 5,37 | 5,92 | 2,49 |
| 238 | Proteína de choque térmico SSB [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> race 1] | ENH61385.1* | 77 | 1 | 107 | 60 | 6,55 | 5,28 | 2,99 |
| 273 | Fator de alongação 1-beta [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018232308.1* | 119 | 7 | 25 | 31 | 4,36 | 3,67 | 1,35 |
| 276 | Álcool desidrogenase 1 [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018251224.1* | 556 | 23 | 38 | 31 | 6,99 | 7,60 | 1,68 |

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa | | pI | | NA |
|-----------------|--|-----------------|--------|-----------|-------|------|------|------|------|
| | | | | | Teor | Obs. | Teor | Obs. | |
| 285 | eIF4A RNA helicase ATP-dependente [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018235179.1* | 393 | 17 | 45 | 39 | 4,98 | 4,99 | 2,41 |
| 315 | Proteína de choque térmico <i>Hsp88</i> [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 1] | ENH63096.1* | 64 | 1 | 81 | 70 | 5,09 | 5,17 | 2,78 |
| 330 | Peroxidase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018255412.1* | 294 | 21 | 25 | 20 | 5,86 | 5,80 | 2,89 |
| 1156 | Proteína de choque térmico 83 [[<i>Rhizoctonia solani</i>] | CUA70109.1* | 74 | 2 | 61 | 69 | 5,02 | 4,87 | |
| Cisteína | | | | | | | | | |
| 7 | Mn superóxido dismutase, parcial [<i>Scedosporium aurantiacum</i>] | ALL26902.1* | 63 | 19 | 10 | 17 | 5,48 | 6,8 | 1,44 |
| 11 | Proteína hipotética <i>FOXB_09718</i> [<i>F. oxysporum</i> <i>Fo5176</i>] | EGU79756.1* | 360 | 27 | 22 | 18 | 5,54 | 5,80 | 9,69 |
| 13 | Fe-Mn superóxido dismutase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> <i>tropical</i> race 4 54006] | EXM02193.1* | 66 | 5 | 28 | 20 | 5,81 | 5,96 | 1,84 |
| 27 | Triosefosfato isomerase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018235652.1* | 136 | 10 | 27 | 22 | 5,29 | 5,40 | 8,31 |

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa | | pI | | NA |
|------|--|-----------------|--------|-----------|-------|------|------|------|-------|
| | | | | | Teor | Obs. | Teor | Obs. | |
| 111 | Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | EWZ01894.1* | 164 | 8 | 35 | 33 | 6,09 | 6,89 | 34,79 |
| 116 | Frutose-bifosfato aldolase, classe II [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018247837.1* | 355 | 16 | 40 | 34 | 5,44 | 5,81 | 2,06 |
| 149 | Citrato sintase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018249423.1* | 272 | 7 | 52 | 40 | 8,18 | 7,45 | 13,96 |
| 186 | Aldeído desidrogenase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | EMT61471.1* | 329 | 9 | 54 | 44 | 5,57 | 5,97 | 1,65 |
| 190 | Subunidade 2 da ATP-citrato sintase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018243499.1* | 77 | 2 | 53 | 46 | 5,41 | 5,65 | 58,68 |
| 191 | Dipeptidase citosólica não específica [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> 25433] | EXM32319.1* | 77 | 2 | 60 | 46 | 6,02 | 5,46 | 2,24 |
| 201 | Glicose-6-fosfato isomerase [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | EWZ02675.1* | 86 | 3 | 61 | 47 | 5,64 | 6,09 | 17,65 |
| 246 | Aconitato hidratase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> 25433] | EXM21218.1* | 327 | 7 | 86 | 66 | 6,20 | 6,47 | 2,03 |

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa | | pI | | NA |
|------|---|-----------------|--------|-----------|-------|------|------|------|------|
| | | | | | Teor | Obs. | Teor | Obs. | |
| 335 | Transaldolase OS= <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (strain 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) | TAL1_FUSO4** | 132 | 6 | 36 | 31 | 5,11 | 5,29 | 2,42 |
| 856 | Proteína beta-lactamase hidrolase-like [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 1] | ENH64870.1* | 278 | 16 | 32 | 25 | 6,43 | 7,35 | |
| 888 | Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> tropical race 4 54006] | EXM06573.1* | 76 | 4 | 35 | 34 | 6,09 | 3,34 | |
| 892 | Proteína de choque térmico [<i>Trichosporon asahii</i> var. <i>asahii</i> CBS 8904] | EKD00689.1* | 63 | 1 | 82 | 36 | 5,18 | 6,75 | |
| 939 | Proteína de choque térmico 60, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018243894.1* | 141 | 4 | 62 | 50 | 5,55 | 5,29 | |
| 961 | Carboxipeptidase cpdS [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 4] | EMT67950.1* | 65 | 3 | 65 | 63 | 5,94 | 5,62 | |
| 963 | Carboxipeptidase cpdS [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 4] | EMT67950.1* | 119 | 6 | 65 | 63 | 5,94 | 5,49 | |

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa | | pI | | NA |
|------------------|--|-----------------|--------|-----------|-------|------|------|------|------|
| | | | | | Teor | Obs. | Teor | Obs. | |
| 964 | Carboxipeptidase cpdS [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> race 4] | EMT67950.1* | 149 | 6 | 65 | 63 | 5,94 | 5,38 | |
| 990 | Enolase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018231581.1* | 193 | 11 | 47 | 43 | 5,06 | 5,28 | |
| Histidina | | | | | | | | | |
| 28 | Triosefosfato isomerase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> race 4] | EMT64104.1* | 72 | 5 | 27 | 23 | 5,30 | 5,19 | 2,29 |
| 45 | S-formilglutaciona hidrolase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> race 4] | EMT64128.1* | 85 | 4 | 31 | 25 | 6,41 | 7,05 | 1,43 |
| 55 | Proteína de choque térmico 30 kDa [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> race 1] | ENH60719.1* | 61 | 4 | 24 | 28 | 5,95 | 6,15 | 1,44 |
| 57 | Malato desidrogenase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> race 4] | EMT70814.1* | 406 | 18 | 35 | 28 | 9,03 | 8,46 | 1,25 |
| 68 | Proteína hipotética FOTG_08222 [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> 25433] | EXM24732.1* | 287 | 13 | 36 | 29 | 6,38 | 7,25 | 3,72 |

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa | | pI | | NA |
|------|---|-----------------|--------|-----------|-------|------|------|------|------|
| | | | | | Teor | Obs. | Teor | Obs. | |
| 91 | Transaldolase OS= <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (strain 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) | TAL1_FUSO4** | 324 | 13 | 36 | 31 | 5,11 | 5,04 | 4,20 |
| 100 | Aspartato aminotransferase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 1] | ENH72826.1* | 238 | 8 | 47 | 32 | 9,10 | 9,22 | 6,21 |
| 126 | Formiato desidrogenase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018243669.1* | 184 | 8 | 40 | 36 | 6,17 | 6,97 | 4,64 |
| 127 | Beta-lactamase [<i>F. oxysporum</i> Fo47] | EWZ38933.1* | 61 | 2 | 45 | 36 | 6,17 | 6,87 | 1,60 |
| 133 | subunidade 2 do núcleo ubiquinol citocromo c redutase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> 25433] | EXM30343.1* | 123 | 4 | 54 | 36 | 9,58 | 7,82 | 2,56 |
| 134 | Formiato desidrogenase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018243669.1* | 124 | 7 | 40 | 36 | 6,17 | 6,79 | 5,82 |
| 175 | diidrolipoamida acetiltransferase componente do complexo da piruvato desidrogenase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> 26406] | EXK30186.1* | 67 | 2 | 49 | 44 | 6,24 | 5,60 | 5,55 |

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa | | pI | | NA |
|-------------------|--|-----------------|--------|-----------|-------|------|------|------|-------|
| | | | | | Teor | Obs. | Teor | Obs. | |
| 280 | Formiato desidrogenase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018243669.1* | 188 | 7 | 40 | 36 | 6,17 | 7,10 | 36,63 |
| 289 | Subunidade beta da peptidase de processamento mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ubense race 4</i>] | EMT61583.1* | 59 | 4 | 45 | 41 | 5,14 | 5,82 | 1,58 |
| 699 | Homoserina O-acetiltransferase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>psi HDV247</i>] | EXA30797.1* | 199 | 6 | 39 | 35 | 5,20 | 5,16 | |
| 729 | Formamidase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>psi HDV247</i>] | EXA30796.1* | 97 | 3 | 45 | 41 | 5,30 | 5,54 | |
| Isoleucina | | | | | | | | | |
| 0 | Peptidil-prolil cis-trans isomerase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ubense race 4</i>] | EMT61270.1* | 136 | 9 | 25 | 12 | 9,42 | 7,80 | 1,29 |
| 12 | Fe-Mn superóxido dismutase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ubense tropical race 4 54006</i>] | EXM02193.1* | 497 | 24 | 28 | 18 | 5,81 | 6,63 | 1,69 |

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa | | pI | | NA |
|------|--|-----------------|--------|-----------|-------|------|------|------|-------|
| | | | | | Teor | Obs. | Teor | Obs. | |
| 14 | Fe-Mn superóxido dismutase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense tropical race 4 54006</i>] | EXM02193.1* | 219 | 19 | 28 | 20 | 5,81 | 6,25 | 1,51 |
| 38 | Proteína hipotética FPOA_06751 [<i>F. poae</i>] | OBS20380.1* | 259 | 14 | 29 | 23 | 5,42 | 5,90 | 13,85 |
| 49 | Fe-Mn superóxido dismutase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense tropical race 4 54006</i>] | EXM02193.1* | 193 | 11 | 28 | 26 | 5,81 | 6,56 | 1,90 |
| 89 | Transaldolase OS= <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> lycopersici (strain 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936)</i> | TAL1_FUSO4** | 139 | 6 | 36 | 32 | 5,11 | 5,38 | 2,71 |
| 92 | Fator de alongação 1-beta [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> lycopersici 4287</i>] | XP_018232308.1* | 62 | 7 | 25 | 33 | 4,36 | 3,40 | 3,28 |
| 98 | Álcool desidrogenase (NADP ⁺) [<i>F. oxysporum</i> Fo47] | EWZ35585.1* | 120 | 8 | 37 | 32 | 5,91 | 6,39 | 2,00 |
| 105 | Adenosina quinase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> raphani 54005</i>] | EXL00574.1* | 84 | 3 | 47 | 34 | 6,51 | 5,52 | 3,05 |
| 123 | Lipase/esterase [<i>F. fujikuroi</i>] | KLO99832.1* | 139 | 6 | 40 | 36 | 5,11 | 4,62 | 2,19 |
| 125 | Proteína de choque térmico 70 kDa [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense race 1</i>] | ENH61283.1* | 258 | 6 | 71 | 35 | 5,00 | 5,66 | 50,14 |

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa | | pI | | NA |
|------|--|-----------------|--------|-----------|-------|------|------|------|------|
| | | | | | Teor | Obs. | Teor | Obs. | |
| 137 | Adenosilhomocisteinase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018246403.1* | 536 | 18 | 50 | 37 | 5,57 | 5,88 | 3,02 |
| 152 | 2-metilcitrate sintase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018233968.1* | 139 | 5 | 52 | 41 | 7,75 | 6,99 | 2,51 |
| 185 | Enolase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018231581.1* | 187 | 11 | 47 | 46 | 5,06 | 4,77 | 1,93 |
| 188 | Proteína hipotética FOXB_04764 [<i>F. oxysporum</i> Fo5176] | EGU84753.1* | 661 | 19 | 49 | 44 | 5,17 | 5,23 | 2,82 |
| 194 | 2-metilcitrate desidratase [<i>F. oxysporum</i> FO5C 3-a] | EWY89168.1* | 312 | 11 | 62 | 47 | 7,94 | 6,27 | 1,96 |
| 390 | Proteína hipotética SBOR_8074 [<i>Sclerotinia borealis</i> F-4128] | ESZ91540.1* | 63 | 3 | 43 | 27 | 4,39 | 5,91 | |
| 399 | Proteinase subtilisina-like Spm1 [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> race 4] | EMT61067.1* | 60 | 1 | 57 | 30 | 5,87 | 7,42 | |

| Cód. | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa | | pI | | NA |
|------|--|-----------------|--------|-----------|-------|------|------|------|----|
| | | | | | Teor | Obs. | Teor | Obs. | |
| 408 | 3-hidroxiso-butilato desidrogenase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018245188.1* | 214 | 11 | 36 | 32 | 8,74 | 6,08 | |
| 442 | Acil-CoA desidrogenase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018245168.1* | 206 | 8 | 49 | 38 | 8,24 | 5,48 | |
| 448 | Protease vacuolar A [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | EWY86405.1* | 170 | 5 | 43 | 39 | 4,66 | 3,77 | |
| 490 | Fosfoenolpiruvato carboxiquinase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018237557.1* | 96 | 4 | 37 | 55 | 5,37 | 5,82 | |
| 502 | Proteína de choque térmico 70 kDa [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> race 1] | ENH61283.1* | 196 | 3 | 71 | 61 | 5,00 | 4,67 | |

Cód. Código do *spot*, Teor.: teórico; Obs.: Observado. NA: nível de abundância. O nível de abundância é a razão entre a condição mais abundante pela condição menos abundante. Na coluna de Acesso as bases de dados utilizadas estão indicadas a seguir: * NCBIprot; ** SwissProt.

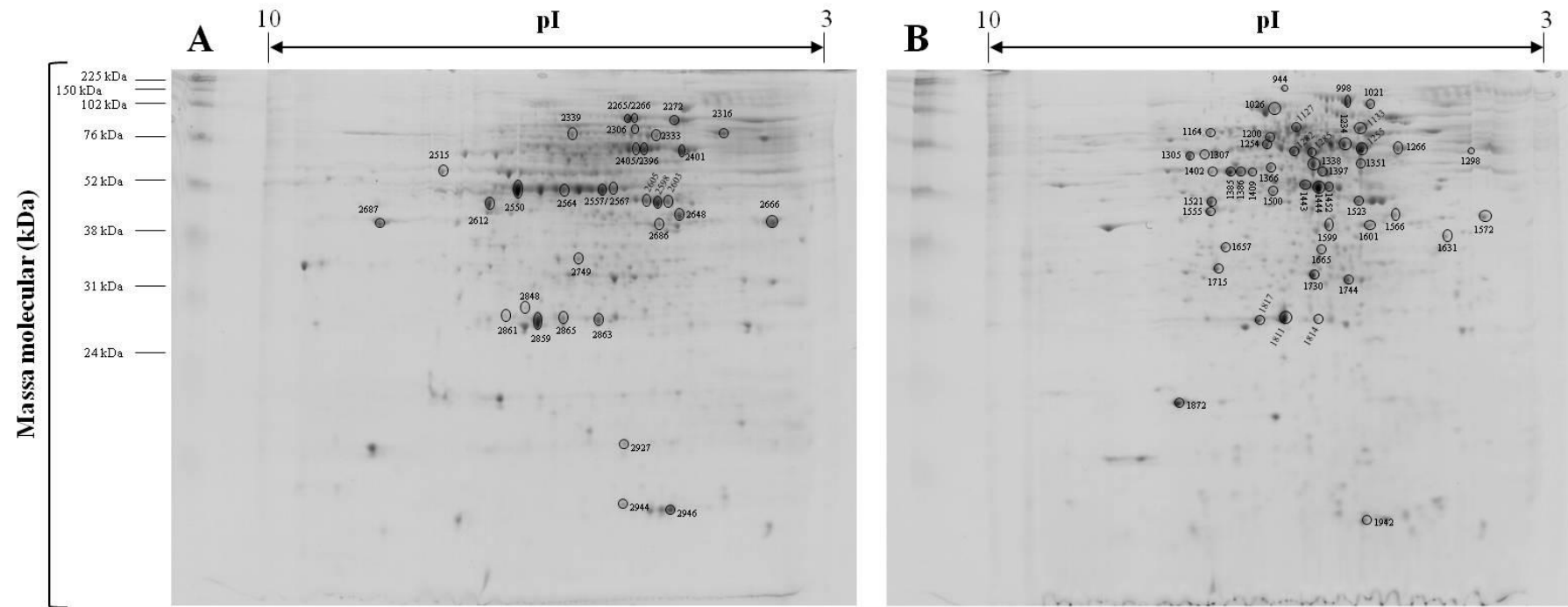
Fonte: Elaborado pela autora.

Os perfis de proteínas intracelulares, presentes no proteoma de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com 1% (m/v) de caseína ou farinha de pena, foram determinados utilizando eletroforese bidimensional. Na FIGURA 21 é possível observar que a massa molecular da maior parte das proteínas está distribuída na faixa de 31 a 102 kDa; e o ponto isoelétrico na faixa de pH neutro a ácido.

Nos perfis de proteínas intracelulares dos cultivos com caseína e farinha de pena foram detectados 670 e 751 *spots*, respectivamente. Os géis bidimensionais foram avaliados individualmente, sem efeitos comparativos, e para cada condição foram selecionados *spots* proeminentes (maior intensidade).

Após a seleção dos *spots* foram identificadas 32 e 47 proteínas para as condições contendo caseína e farinha de pena, respectivamente. As proteínas identificadas e as suas características estão apresentadas na TABELA 7.

Figura 21 - Eletroforese bidimensional de proteínas intracelulares extraídas do micélio de *F. oxysporum* submetido ao bioprocessamento submerso por 96h com 1% de diferentes fontes de nitrogênio. **(A)** caseína, **(B)** farinha de pena



O marcador de massa molecular utilizado foi o Amersham ECL Full-Range Rainbow com o seguinte padrão de bandas 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24, 17 e 12 kDa. Os géis foram carregados com 200 µg (A e B) de proteínas totais e corados com Coomassie G-250.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 7 - Lista de proteínas intracelulares extraídas dos micélios de *F. oxysporum* URM 7401 cultivados em bioprocessos submersos com 1% (m/v) de caseína ou farinha de pena identificadas por MALDI- TOF/TOF-MS/MS

| Spot | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa (kDa) | | pI | |
|----------------|--|-----------------|--------|-----------|-------------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| Caseína | | | | | | | | |
| 2265 | Proteína hsp70-like [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018245414.1* | 151 | 3 | 73 | 69 | 5,68 | 5,55 |
| 2266 | Proteína hsp70-like [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018245414.1* | 147 | 3 | 73 | 68 | 5,68 | 5,48 |
| 2272 | Proteína regulada por glicose de 78 kDa-like [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 1] | ENH73980.1* | 152 | 3 | 71 | 68 | 4,94 | 4,97 |
| 2306 | UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i> HDV247] | EXA52227.1* | 70 | 3 | 55 | 63 | 5,47 | 5,48 |
| 2316 | Proteína dissulfeto-isomerase [<i>F. oxysporum</i> Fo47] | EWZ50114.1* | 120 | 4 | 56 | 60 | 4,79 | 4,37 |
| 2333 | Aminopectidase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018246148.1* | 77 | 2 | 52 | 58 | 5,47 | 5,2 |
| 2339 | Glicose-6-fosfato isomerase [<i>F. oxysporum</i> FO5C 3-a] | EWZ02675.1* | 61 | 3 | 61 | 58 | 5,64 | 6,25 |

| Spot | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa (kDa) | | pI | |
|------|--|-----------------|--------|-----------|-------------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| 2396 | Enolase [<i>Obba rivulosa</i>] | OCH88769.1* | 64 | 4 | 47 | 50 | 5,18 | 5,35 |
| 2401 | Subunidade beta da ATP sintase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 4] | EMT62383.1* | 613 | 22 | 55 | 50 | 5,27 | 4,89 |
| 2405 | Enolase [<i>Obba rivulosa</i>] | OCH88769.1* | 63 | 4 | 47 | 50 | 5,18 | 5,45 |
| 2515 | subunidade 2 do núcleo ubiquinol citocromo c redutase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> 25433] | EXM30343.1* | 69 | 2 | 54 | 42 | 9,58 | 7,84 |
| 2550 | Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense tropical</i> race 4] | EXM06573.1* | 68 | 3 | 35 | 38 | 6,09 | 6,90 |
| 2557 | Frutose-bifosfato aldolase, classe II [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018247837.1* | 262 | 13 | 40 | 38 | 5,44 | 5,86 |
| 2564 | MULTIESPÉCIES: Aldeído desidrogenase [<i>Enterobacteriaceae</i>] | WP_008456666.1* | 62 | 4 | 36 | 38 | 6,54 | 6,33 |
| 2567 | Frutose-bifosfato aldolase, classe II [<i>F. oxysporum</i> FO SC 3-a] | EWY91283.1* | 90 | 3 | 40 | 38 | 5,64 | 5,72 |

| Spot | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa (kDa) | | pI | |
|------|---|-----------------|--------|-----------|-------------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| 2598 | Transaldolase OS= <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (strain 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) | TAL1_FUSO4** | 132 | 7 | 36 | 36 | 5,11 | 5,17 |
| 2603 | Transaldolase OS= <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (strain 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) | TAL1_FUSO4** | 69 | 3 | 36 | 36 | 5,11 | 5,04 |
| 2605 | Transaldolase OS= <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (strain 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) | TAL1_FUSO4** | 239 | 9 | 36 | 36 | 5,11 | 5,32 |
| 2612 | Malato desidrogenase, NAD-dependente [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | EWY91713.1* | 313 | 11 | 35 | 35 | 6,47 | 7,26 |
| 2648 | 60S da proteína ácida ribossomal P0 [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018235208.1* | 125 | 7 | 33 | 34 | 4,83 | 4,90 |
| 2666 | Fator de alongação 1-beta [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018232308.1* | 216 | 17 | 25 | 33 | 4,36 | 3,74 |
| 2686 | Proteína hipotética FOIG_05852 [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense tropical race 4</i> 54006] | EXM02876.1* | 63 | 4 | 32 | 33 | 5,03 | 5,14 |

| Spot | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa (kDa) | | pI | |
|------|---|-----------------|--------|-----------|-------------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| 2687 | Malato desidrogenase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> race 4] | EMT70814.1* | 423 | 19 | 35 | 32 | 9,03 | 8,61 |
| 2749 | Proteína hipotética <i>FOTG_04674</i> [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> 25433] | EXM29450.1* | 67 | 3 | 28 | 29 | 5,80 | 6,13 |
| 2848 | Proteína hipotética <i>FOIG_06213</i> [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ubense tropical</i> race 4 54006] | EXM03397.1* | 174 | 9 | 28 | 24 | 6,71 | 6,77 |
| 2859 | Fe-Mn superóxido dismutase [<i>F. avenaceum</i>] | KIL90429.1* | 107 | 4 | 28 | 22 | 6,04 | 6,60 |
| 2861 | Proteína hipotética <i>FOZG_04537</i> [<i>F. oxysporum</i> <i>Fo47</i>] | EWZ43428.1* | 83 | 7 | 22 | 23 | 6,58 | 7,03 |
| 2863 | Alérgeno Alt a 7 [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> race 4] | EMT64431.1* | 214 | 16 | 22 | 22 | 5,54 | 5,9 |
| 2865 | Proteína hipotética <i>FOZG_04537</i> [<i>F. oxysporum</i> <i>Fo47</i>] | EWZ43428.1* | 81 | 6 | 22 | 22 | 6,58 | 6,31 |
| 2927 | cofilina [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018243893.1* | 150 | 21 | 17 | 13 | 5,21 | 5,52 |

| Spot | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa (kDa) | | pI | |
|------------------------|--|-----------------|--------|-----------|-------------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| 2944 | piridoxamina 5-fosfato oxidase [<i>F. langsethiae</i>] | KPA40568.1* | 77 | 3 | 32 | 10 | 5,83 | 5,53 |
| 2946 | Peptidilprolil isomerase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i> HDV247] | EXA48089.1* | 186 | 21 | 15 | 10 | 9,57 | 4,94 |
| Farinha de Pena | | | | | | | | |
| 944 | Proteína hipotética FOZG_04537 [<i>F. oxysporum</i> Fo47] | EWZ43428.1* | 191 | 13 | 22 | 121 | 6,58 | 6,36 |
| 998 | (AAP1)-alanina/arginina aminopeptidase [<i>F. proliferatum</i>] | CVL02718.1* | 165 | 3 | 110 | 83 | 5,70 | 5,58 |
| 1021 | Proteína hipotética GLOTRDRAFT_53242 [<i>Gloeophyllum trabeum</i> ATCC 11539] | XP_007860389.1* | 62 | 2 | 47 | 80 | 8,81 | 5,31 |
| 1026 | Proteína hipotética K432DRAFT_127530 [<i>Lepidopterella palustris</i> CBS 459.81] | OCK77166.1* | 64 | 1 | 91 | 75 | 6,16 | 6,48 |
| 1127 | Fosfoenolpiruvato carboxiquinase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018237557.1* | 281 | 13 | 37 | 61 | 5,37 | 6,2 |

| Spot | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa (kDa) | | pI | |
|------|---|-----------------|--------|-----------|-------------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| 1133 | Proteína de choque térmico 60, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018243894.1* | 487 | 15 | 62 | 61 | 5,55 | 5,42 |
| 1164 | Cisteína proteinase [<i>Sistotremastrum niveocreameum</i> HHB9708] | KZS95724.1* | 67 | 1 | 66 | 68 | 6,09 | 7,28 |
| 1200 | 2-metilcitrato desidratase [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | EWY89168.1* | 139 | 6 | 62 | 56 | 7,94 | 6,54 |
| 1234 | Dipeptidase citosólica não específica [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | EWY91149.1* | 178 | 4 | 60 | 52 | 5,93 | 5,61 |
| 1254 | homogentisato 1,2-dioxigenase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> 25433] | EXM35428.1* | 147 | 7 | 52 | 52 | 5,84 | 6,57 |
| 1255 | Enolase [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | EWY94797.1* | 352 | 22 | 35 | 50 | 4,87 | 5,40 |
| 1266 | Subunidade beta da ATP sintase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 4] | EMT62382.1* | 336 | 12 | 42 | 50 | 4,74 | 4,94 |
| 1282 | Fumarilacetoacetase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 1] | ENH71266.1* | 372 | 15 | 47 | 49 | 6,02 | 6,25 |

| Spot | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa (kDa) | | pI | |
|------|---|-----------------|--------|-----------|-------------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| 1285 | Oxalato descarboxilase <i>oxdC</i> [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 1] | ENH63700.1* | 134 | 4 | 52 | 49 | 5,59 | 6,02 |
| 1298 | Similar a citrato sintase [<i>Botrytis cinerea</i> T4] | CCD34704.1* | 104 | 3 | 52 | 49 | 8,84 | 4,05 |
| 1305 | Citrato sintase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018249423.1* | 399 | 10 | 52 | 48 | 8,18 | 7,53 |
| 1307 | Proteína hipotética <i>BABINDRAFT_160361</i> [<i>Babjeviella inositovora</i> NRRL Y-12698] | XP_018986251.1* | 74 | 0 | 127 | 49 | 6,10 | 7,34 |
| 1338 | Adenosilhomocisteinase [<i>Ophiocordyceps sinensis</i> CO18] | EQL00197.1* | 141 | 5 | 48 | 45 | 5,98 | 5,99 |
| 1351 | Ubiquitina tiolesterase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense tropical</i> race 4 54006] | EXM00652.1* | 166 | 5 | 50 | 46 | 5,67 | 5,41 |
| 1385 | Formiato desidrogenase [<i>F. verticillioides</i> 7600] | XP_018749369.1* | 293 | 13 | 40 | 43 | 6,17 | 7,03 |
| 1386 | Formiato desidrogenase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018243669.1* | 143 | 7 | 40 | 43 | 6,17 | 6,91 |

| Spot | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa (kDa) | | pI | |
|------|---|-----------------|--------|-----------|-------------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| 1397 | Isovaleril-CoA desidrogenase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> 26406] | EXK30868.1* | 71 | 3 | 46 | 43 | 7,02 | 5,90 |
| 1402 | Putative aminometiltransferase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 4] | EMT62248.1* | 73 | 4 | 47 | 43 | 8,87 | 7,26 |
| 1409 | Proteína hipotética K432DRAFT_127530 [<i>Lepidopterella palustris</i> CBS 459.81] | OCK77166.1* | 62 | 1 | 91 | 43 | 6,16 | 6,76 |
| 1443 | Fator de alongação 2 [<i>F. oxysporum</i> Fo47] | EWZ42328.1* | 71 | 1 | 92 | 40 | 6,45 | 6,11 |
| 1444 | Frutose-bifosfato aldolase, classe II [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | EWY91283.1* | 351 | 17 | 40 | 39 | 5,64 | 5,93 |
| 1452 | Frutose-bifosfato aldolase, classe II [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018247837.1* | 272 | 12 | 40 | 39 | 5,44 | 5,81 |
| 1500 | Transaldolase OS= <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (strain 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) | TAL1_FUSO4** | 225 | 10 | 36 | 37 | 5,11 | 6,57 |
| 1521 | Malato desidrogenase, NAD-dependente [<i>F. oxysporum</i> FOSC 3-a] | EWY91713.1* | 370 | 15 | 35 | 36 | 6,47 | 7,27 |

| Spot | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa (kDa) | | pI | |
|------|---|-----------------|--------|-----------|-------------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| 1523 | Arginase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 54005] | EXK93353.1* | 139 | 9 | 42 | 36 | 5,49 | 5,40 |
| 1555 | Proteína hipotética FOTG_08222 [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> 25433] | EXM24732.1* | 264 | 13 | 36 | 35 | 6,38 | 7,29 |
| 1566 | Proteína hipotética K432DRAFT_127530 [<i>Lepidopterella palustris</i> CBS 459.81] | OCK77166.1* | 62 | 1 | 91 | 35 | 6,16 | 4,98 |
| 1572 | Fator de alongação 1-beta [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287] | XP_018232308.1* | 116 | 7 | 25 | 34 | 4,36 | 3,88 |
| 1599 | HBL134Cp [<i>Eremothecium sinECAUDUM</i>] | XP_017985764.1* | 155 | 8 | 34 | 33 | 5,17 | 5,32 |
| 1601 | Pirofosfatase inorgânica [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> race 1] | ENH61050.1* | 234 | 11 | 46 | 32 | 6,57 | 4,35 |
| 1631 | Proteína de choque térmico 70 kDa [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> race 4] | EMT61617.1* | 61 | 3 | 71 | 30 | 5,00 | 7,1 |
| 1657 | S-formilglutamina hidrolase [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> race 4] | EMT64128.1* | 239 | 14 | 31 | 30 | 6,41 | 4,41 |
| 1665 | Sorbose redutase SOU1 [<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> race 4] | EMT66610.1* | 214 | 14 | 30 | 30 | 5,6 | 5,91 |

| Spot | Proteína [Espécie] | Acesso | Escore | Cobertura | Massa (kDa) | | pI | |
|------|--|-----------------|--------|-----------|-------------|------|-------|------|
| | | | | | Teór. | Obs. | Teór. | Obs. |
| 1715 | Lipase [<i>F. oxysporum</i>] | ABR12479.1* | 216 | 11 | 37 | 28 | 6,38 | 7,2 |
| 1730 | Proteína hipotética <i>FPOA_06751</i> [<i>F. poae</i>] | OBS20380.1* | 264 | 14 | 29 | 27 | 5,42 | 6,00 |
| 1744 | Triosefosfato isomerase [<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. cubense race 4</i>] | EMT64104.1* | 149 | 9 | 27 | 27 | 5,30 | 5,57 |
| 1811 | Proteína hipotética <i>FOZG_04537</i> [<i>F. oxysporum Fo47</i>] | EWZ43428.1* | 119 | 7 | 22 | 22 | 6,58 | 6,36 |
| 1814 | Proteína hipotética <i>FOXB_09718</i> [<i>F. oxysporum Fo5176</i>] | EGU79756.1* | 324 | 23 | 22 | 22 | 5,54 | 5,96 |
| 1817 | Fe-Mn superóxido dismutase [<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. cubense tropical race 4 54006</i>] | EXM02193.1* | 180 | 11 | 28 | 22 | 5,81 | 6,67 |
| 1872 | Peptidil-prolil cis-trans isomerase, mitocondrial [<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. cubense race 4</i>] | EMT61270.1* | 83 | 6 | 25 | 15 | 9,42 | 7,78 |
| 1942 | Profilina [<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. lycopersici 4287</i>] | XP_018244810.1* | 81 | 9 | 14 | 10 | 5,52 | 5,36 |

Cód. Código do spot, Teor.: teórico; Obs.: Observado. Na coluna de Acesso as bases de dados utilizadas estão indicadas a seguir: * NCBIprot; ** SwissProt.

Fonte: Elaborado pela autora.

Participação de proteínas intracelulares identificadas no cultivo de *F. oxysporum* com diferentes fontes de nitrogênio em processos biológicos

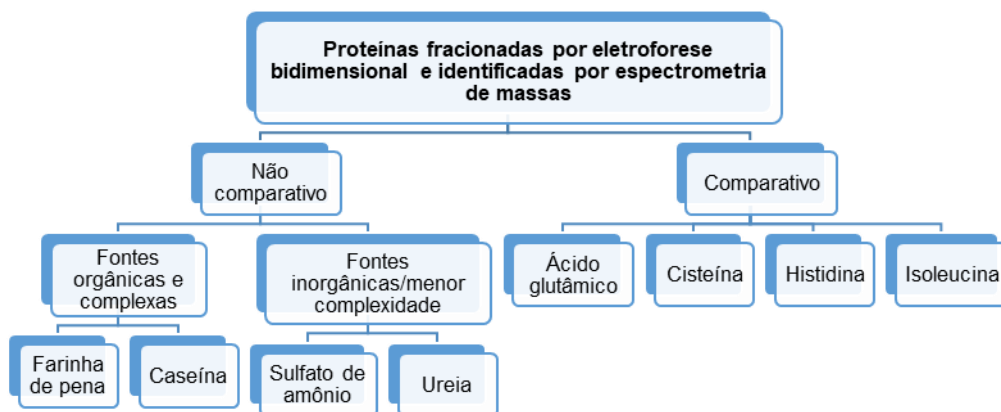
O metabolismo de nitrogênio está correlacionado ao metabolismo energético da célula porque depende de ATP, NAD ou NADPH (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) como cofatores, dessa forma, fontes de nitrogênio orgânicas podem ser utilizadas para a obtenção de nitrogênio e carbono (FREESE et al., 2011).

A abordagem metodológica utilizada para apresentar as proteínas identificadas nos cultivos (caseína, farinha de pena, ácido glutâmico, cisteína, histidina, isoleucina, sulfato de amônio e ureia) está demonstrada na FIGURA 22.

Vale ressaltar que apenas no cultivo com aminoácidos o nível de abundância é retratado de modo comparativo, e os valores estão indicados na TABELA 6.

Nos demais cultivos o intuito foi pontuar, de modo qualitativo, as proteínas proeminentes no mapa proteômico de cada condição.

Figura 22 - Abordagem metodológica da análise de proteínas utilizando eletroforese bidimensional e espectrometria de massas



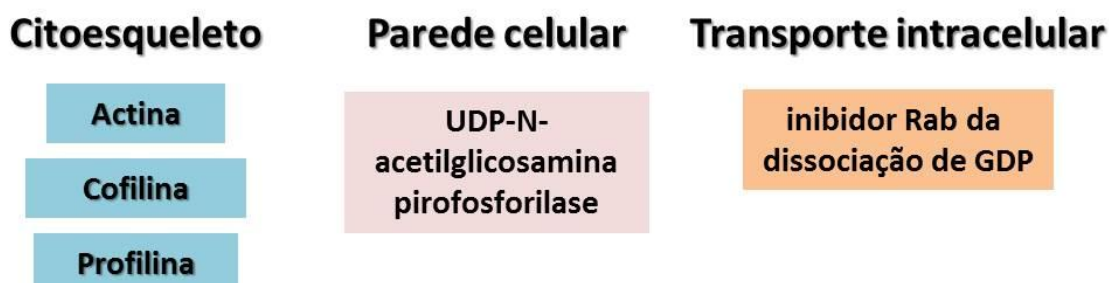
Fonte: Elaborado pela autora.

A seguir estão apresentadas as discussões acerca da participação de proteínas intracelulares em processos biológicos. As proteínas apresentadas foram identificadas no cultivo de *F. oxysporum* com diferentes fontes de nitrogênio.

❖ Proteínas relacionadas à parede celular, citoesqueleto e transporte intracelular

As proteínas relacionadas à regulação e ao processamento de proteínas que foram apresentadas nas TABELAS 5, 6 e 7 foram agrupadas, de acordo com suas funções, e estão representadas na FIGURA 23 e no APÊNDICE E. As discussões acerca das funções destas proteínas estão apresentadas em seguida.

Figura 23 - Ilustração das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio relacionadas à parede celular, citoesqueleto e transporte intracelular



As formas geométricas com a mesma cor representam proteínas identificadas, por espectrometria de massas, que atuam no mesmo processo biológico.

Fonte: Elaborado pela autora.

O arranjo do citoesqueleto de fungos filamentosos depende de diferentes componentes que são fundamentais para o estabelecimento de diferentes funções biológicas (TAKESHITA et al., 2014).

A actina (*spot* 140) e inibidor Rab da dissociação de GDP (*spot* 181) foram mais abundantes em ácido glutâmico e ausente em cisteína. A actina está envolvida no crescimento e morfogênese de células fúngicas, além disso, pode desempenhar diferentes funções na dinâmica de transporte intracelular (BEREPIKI; LICHIOUS; READ, 2011) e inibidor Rab da dissociação de GDP também está envolvido no transporte de proteínas intracelulares mediado por vesículas (THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015).

Nos cultivos com caseína e farinha de pena foram identificadas cofilina (*spot* 2927) e profilina (*spot* 1942), respectivamente. Estas proteínas interagem com actina e atuam na dinâmica da estrutura do citoesqueleto (THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015). Além disso, no cultivo com caseína também foi identificada

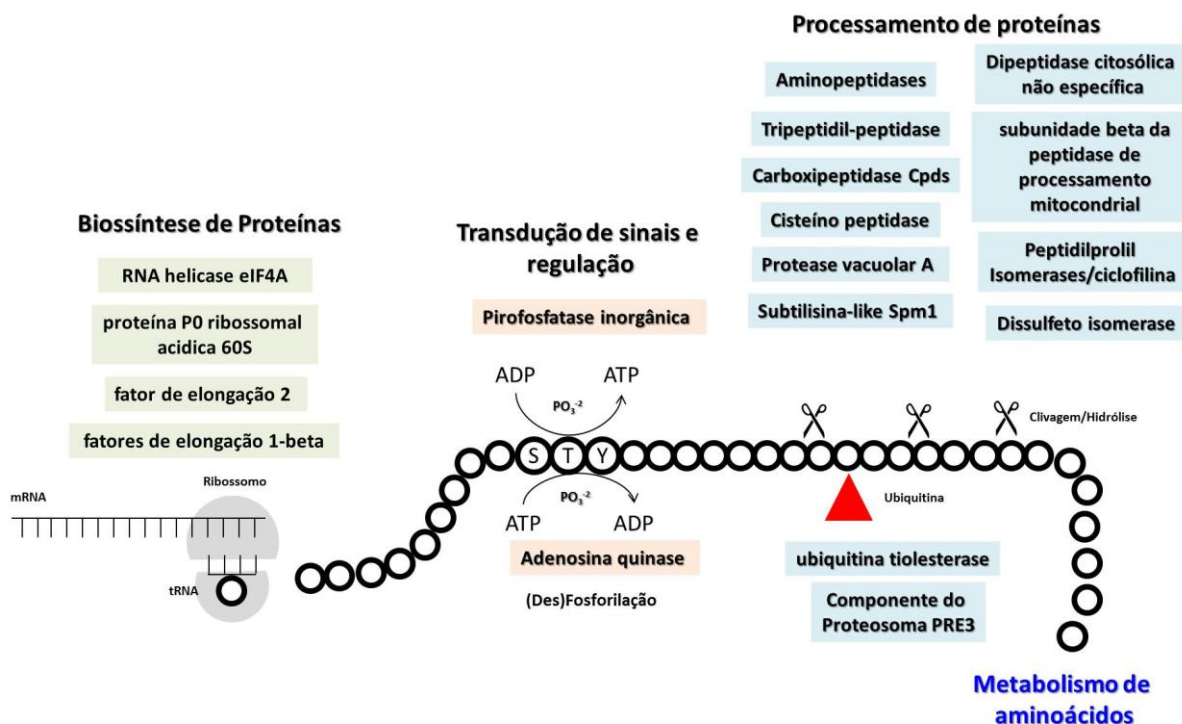
a enzima UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase (*spot* 2306) envolvida na biossíntese de parede celular de fungos.

Em relação às fontes de nitrogênio a abundância observada dos *spots* 140 e 181 sugerem que no cultivo com ácido glutâmico exista um maior transporte intracelular, uma vez que estas proteínas podem refletir o envolvimento dessas propriedades metabólicas em cada condição de cultivo. Já os *spots* 2927, 1942 e 2306 indicam que nos cultivos com fontes de nitrogênio mais complexas também ocorreu uma modificação na dinâmica do citoesqueleto, possivelmente, devido ao crescimento celular.

❖ Proteínas envolvidas na regulação e processamento de proteínas

As proteínas relacionadas à regulação e ao processamento de proteínas que foram apresentadas nas TABELAS 5, 6 e 7 foram agrupadas, de acordo com suas funções, e estão representadas na FIGURA 24 e no APÊNDICE F. As discussões acerca das funções destas proteínas estão apresentadas em seguida.

Figura 24 - Ilustração das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas na regulação e processamento de proteínas



As formas geométricas com a mesma cor representam proteínas identificadas, por espectrometria de massas, que atuam no mesmo processo biológico.

Fonte: Elaborado pela autora.

A capacidade de proporcionar a fosforilação/desfosforilação reversíveis de proteínas confere as proteínas quinases e fosfatases papéis chave no mecanismo de transdução de sinais em eucariotos (SHARMIN et al., 2014).

A adenosina quinase (*spot 105*) envolvida na transdução de sinais e regulação de genes alvo, foi identificada em todos os cultivos com aminoácidos. Li et al. (2014) utilizaram a eletroforese bidimensional para mostrar que a adenosina quinase é uma proteína fundamental para a aclimação de *Magnaporthe oryzae* ao frio.

A pirofosfatase inorgânica (*spot 76*) foi 3 vezes menos abundante no cultivo com cisteína, em relação aos demais. Esta enzima também foi encontrada no cultivo com farinha de pena (*spot 1601*). Estudos com *Saccharomyces cerevisiae* indicaram a importância de pirofosfatases nas respostas ao estresse ambiental (SHARMIN et al., 2014).

Neste estudo, a identificação de quinases e fosfatases sugere uma tentativa de *F. oxysporum* URM 7401 se adequar ao ambiente disponível com as diferentes fontes de nitrogênio.

No proteoma de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com diferentes fontes de nitrogênio foram identificadas proteínas associadas a diferentes etapas do processamento de proteínas.

A proteína eIF4A RNA helicase ATP-dependente (*spot 285*) foi identificada nos cultivos com ácido glutâmico e histidina; e está envolvida na ligação do mRNA ao ribossomo (THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015). Já a proteína 60S da proteína ribossomal ácida P0 detectada no *spot 2648* (caseína) está envolvida na biossíntese, montagem e arranjo das partes constituintes dos ribossomos e inclui o transporte para os sítios de síntese proteica (THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015).

Nós também identificamos proteínas envolvidas na biossíntese de proteínas. A abundância conjunta do fator de alongação 1-beta (*spot 273 e 92*) foi similar entre os cultivos com os aminoácidos. Outros fatores de alongação também foram detectados nos cultivos com caseína (*spot 2666*) e farinha de pena (*spot 1443 e 1572*).

A proteína do *spot* 0 possui função de peptidil-prolil isomerase e foi 1,3 vezes mais abundante no cultivo com isoleucina. Enzimas com a mesma função também foram identificadas nos cultivos com sulfato de amônio, caseína e farinha de pena nos *spots* 3339, 2946 e 1872, respectivamente. Já a enzima dissulfeto isomerase (*spot* 2316) foi identificada no cultivo com caseína.

As enzimas peptidil-prolil isomerase e dissulfeto isomerase atuam no dobramento de proteínas e catalisam isomerização em ligações peptídicas de resíduos de prolina ou em proteínas contendo pontes de dissulfeto, respectivamente.

Em estudo sobre o efeito do excesso de nitrogênio no perfil proteômico de líquens, utilizando fontes reduzidas e oxidadas (NO_3^- e NH_4^+), o aumento destas duas enzimas foi identificado nos dois tratamentos (MUNZI et al., 2017).

No cultivo com farinha de pena foi identificada a ubiquitina tiolesterase (*spot* 1351) que participa da deubiquitinação e processo catabólico dependente de ubiquitina (THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015). Já o componente do proteossoma PRE3 (*spot* 3257) foi identificado no cultivo com sulfato de amônio.

O proteossoma atua no controle de qualidade celular e permite o crescimento e adaptação às condições ambientais, pois participa do processo de degradação de proteínas poliubiquitinadas para a remoção de proteínas com dobramento incorreto. Sun et al. (2013) sugeriram que em plantas a composição do proteossoma pode ser modificada por patógenos, uma vez que estes alteram o microambiente, por exemplo, aumentando espécies reativas de oxigênio (ERO).

A presença de proteínas relacionadas aos ribossomos e a abundância dos fatores de alongação indica a ocorrência de biossíntese de proteínas. Os resultados obtidos também convergem para a constatação de que o excesso de nitrogênio aumenta a produção de enzimas com ação de chaperona ou que atuem no dobramento de proteínas.

Além disso, é possível que o cultivo com sulfato de amônio tenha conduzido ao aumento de proteínas com dobramento incorreto, aumentando a degradação dessas proteínas via proteossomo.

Diferentes enzimas com atividade proteolítica também foram identificadas no proteoma de *F. oxysporum* URM 7401. A produção de grandes quantidades de peptidases já foi relatada em fungos filamentosos; e podem estar relacionadas a obtenção de nutrientes (VAN DEN HOMBERGH et al., 1997).

A subunidade beta da peptidase de processamento mitocondrial (*spot* 289) foi mais abundante no cultivo com histidina e ausente em isoleucina. A dipeptidase citosólica não específica (*spot* 191) foi cerca de 2 vezes mais abundante no cultivo com cisteína e também foi identificada no cultivo com farinha de pena (*spot* 1234).

As proteínas subtilisina-like Spm1 (*spot* 399) e a protease vacuolar A (*spot* 448) foram exclusivas do cultivo com isoleucina. No cultivo com sulfato de amônio foram identificadas proteoformas da protease vacuolar A (*spots* 3085 e 3093).

Os *spots* 961 963 e 964 são proteoformas de carboxipeptidase cpdS que foram identificadas apenas no cultivo com cisteína. Esta enzima também foi identificada nos cultivo com sulfato de amônio (*spots* 2939 e 2943) e ureia (*spot* 1318). Nos cultivos com farinha de pena e ureia foram identificadas as enzimas cisteíno peptidase (*spot* 1164) e tripeptidil aminopeptidase (*spot* 1411), respectivamente. As aminopeptidases foram identificadas nos *spots* 2333 e 998 correspondentes aos cultivos com caseína e farinha de pena, respectivamente.

O gênero *Fusarium* tem sido muito estudado para a produção de moléculas que podem ser exploradas por seu potencial biotecnológico, tais como: enzimas, na produção de biocombustíveis, pigmentos, entre outros (PESSÔA et al., 2017).

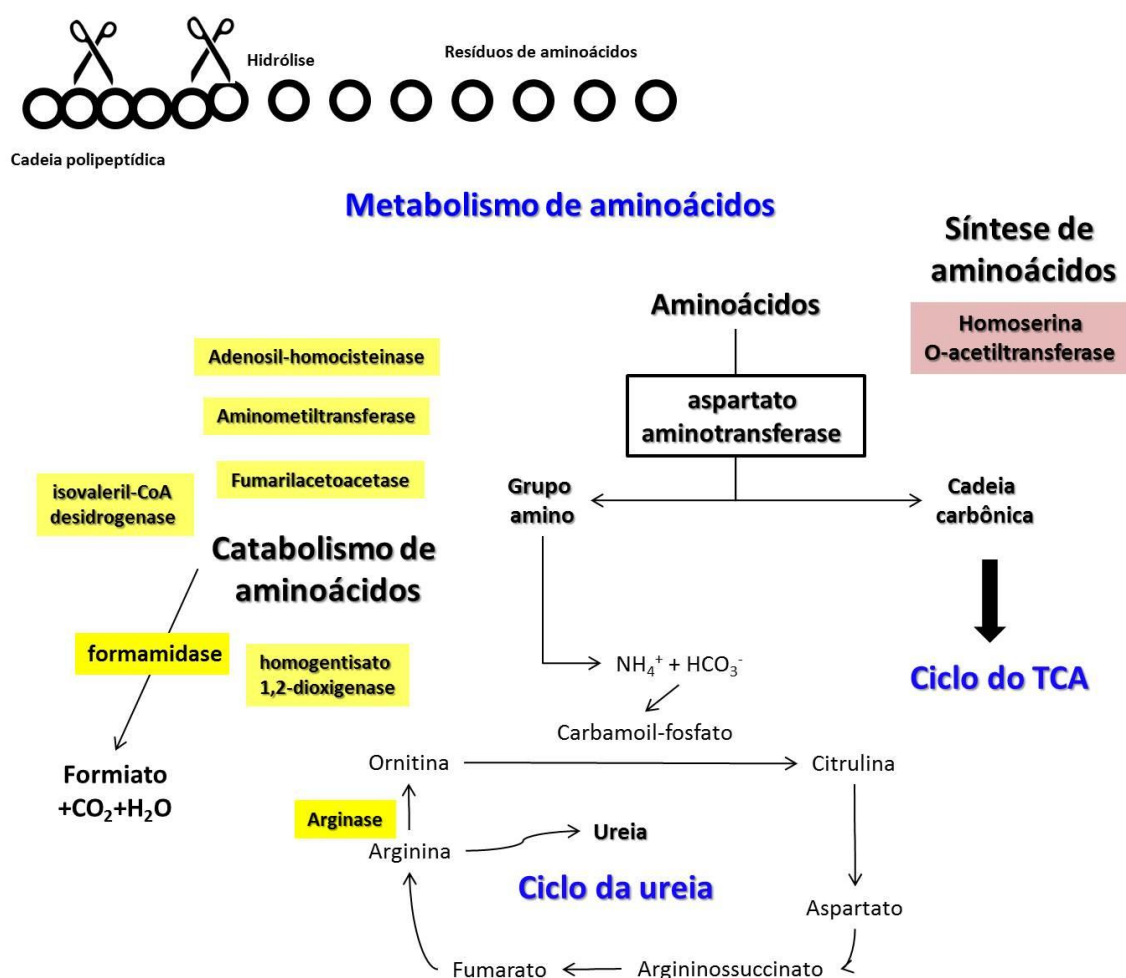
Dentre as enzimas, foram identificadas no proteoma intracelular de *F. oxysporum* URM 7401 diferentes peptidases. As peptidases identificadas possuem diferentes propriedades e, mesmo que em abundâncias diferentes, estiveram presentes no proteoma de todas as condições de cultivo com as fontes de nitrogênio estudadas.

Também foram identificadas lipases nos proteomas provenientes dos cultivos com farinha de pena (*spot* 1715) e com os aminoácidos (*spot* 123). Peptidases e lipases também foram secretadas no extrato e identificadas a partir de ensaios de atividade enzimática, mas é possível que as peptidases e lipases identificadas intracelularmente ainda não tivessem sido secretadas e, por isso, não foram quantificadas.

❖ Enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e reciclagem de nitrogênio

As proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e reciclagem de nitrogênio que foram apresentadas nas TABELAS 5, 6 e 7 foram agrupadas, de acordo com suas funções, e estão representadas na FIGURA 25 e no APÊNDICE G. As discussões acerca das funções destas proteínas estão apresentadas em seguida.

Figura 25 - Ilustração das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas no metabolismo de aminoácidos e reciclagem de nitrogênio



As formas geométricas com a mesma cor representam proteínas identificadas, por espectrometria de massas, que atuam no mesmo processo biológico. Fonte: Elaborado pela autora.

Neste trabalho também foram identificadas proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e reciclagem do nitrogênio. No cultivo com histidina foi

identificada a enzima formamidase (*spot* 729). Estudos proteômicos com *F. solani* cultivado em substrato à base de madeira relataram a secreção de enzimas para a digestão proteica e obtenção de nutrientes e a formamidase é apontada como uma enzima relevante para a reciclagem e remoção do nitrogênio excedente (SCULLY et al., 2012).

A enzima adenosilhomocisteinase que está envolvida no metabolismo da metionina (WINTERBERG et al., 2014) foi identificada no cultivo com farinha de pena (*spot* 1338) e, entre os cultivos com aminoácidos, de modo mais abundante nos cultivos com isoleucina (*spot* 137).

A homoserina O-acetiltransferase (*spot* 699) foi exclusiva do cultivo com histidina e participa da via biossintética da metionina. Os *spots* 100 e 101 são proteoformas de aspartato aminotransferase, mitocondrial e foram mais abundantes nos cultivos com histidina e ácido glutâmico, respectivamente. Esta enzima participa do metabolismo celular de aminoácidos (THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015).

Além disso, no cultivo com farinha de pena foram identificadas proteínas que participam do processo metabólico da arginina, de aminoácidos aromáticos, metabolismo da L-tirosina e catabolismo da L-fenilalanina; e da glicina: arginase (*spot* 1523), fumarilacetoacetase (*spot* 1282), homogentisato 1,2-dioxigenase (*spot* 1254) e aminometiltransferase (*spot* 1402), respectivamente.

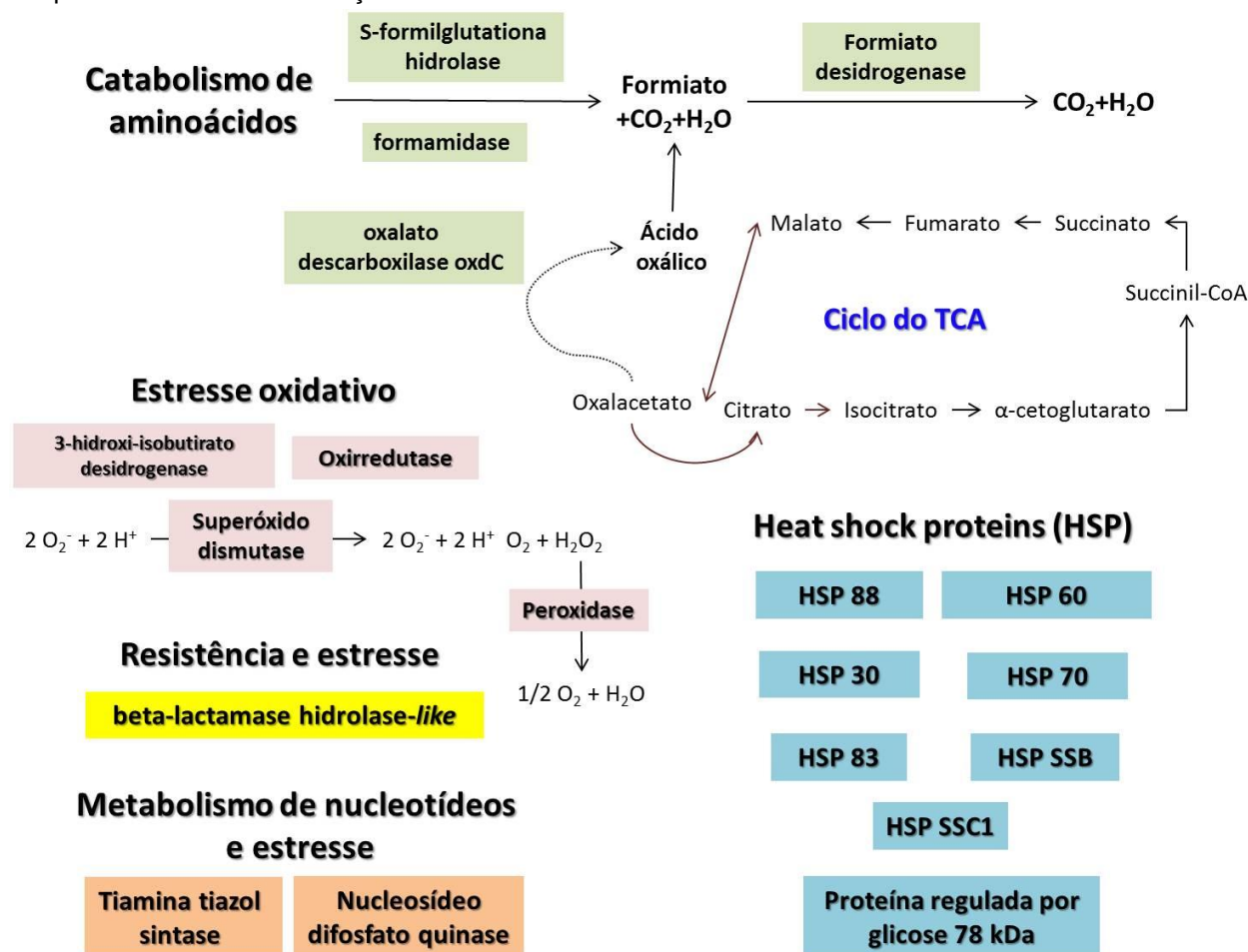
O panorama geral de identificação das peptidases, anteriormente relatadas, e da formamidase no proteoma de *F. oxysporum* URM 7401, em conjunto com as atividades enzimáticas detectadas, sugerem que o microrganismo produziu estas enzimas para a obtenção de nutrientes das fontes de nitrogênio disponíveis. Como reflexo do processamento das proteínas também foram identificadas enzimas envolvidas com o metabolismo de aminoácidos.

❖ **Proteínas envolvidas na resistência ao estresse e em processos de desintoxicação**

As proteínas relacionadas aos mecanismos de resistência ao estresse e em processos de desintoxicação que foram apresentadas nas TABELAS 5, 6 e 7 foram agrupadas, de acordo com suas funções, e estão representadas na FIGURA 26 e

APÊNDICE H. As discussões acerca das funções destas proteínas estão apresentadas em seguida.

Figura 26 - Ilustração das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas nos mecanismos de resistência ao estresse e em processos de desintoxicação



As formas geométricas com a mesma cor representam proteínas identificadas, por espectrometria de massas, que atuam no mesmo processo biológico. Fonte: Elaborado pela autora.

O crescimento e o desenvolvimento de microrganismos estão atrelados a uma série de fatores que lhes garantem a homeostasia. A alteração destas condições leva a um desequilíbrio metabólico e é considerada uma condição estressante. Como exemplos de situações que alteram o equilíbrio metabólico temos o aporte nutricional, o tratamento com medicamentos ou os níveis de compostos oxidativos. Neste contexto, o estresse oxidativo tem papel de destaque e é uma desordem ocasionada pelo desequilíbrio entre a geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) como resultado da respiração aeróbia. O ânion superóxido O_2^{-2} é

uma das moléculas ERO mais nocivas que é metabolizado pela ação de SOD gerando como produto outra molécula com propriedade de ERO - o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HAMANN, BRUST, OSIEWACZ; 2008).

O peróxido de hidrogênio por sua vez é catalisado pela peroxidase e leva a produção de água e oxigênio. A ação destas enzimas é fundamental para os microrganismos, uma vez que o acúmulo de peróxido de hidrogênio foi considerado um indutor de apoptose para fungos e leveduras (HAMANN, BRUST, OSIEWACZ; 2008).

Nas análises proteômicas foi possível detectar proteínas envolvidas no mecanismo de resposta e eliminação das ERO. Superóxido dismutase (SOD) e Peroxidase são enzimas clássicas com função antioxidante.

A enzima superóxido dismutase foi identificada em vários *spots*: os *spots* 7 e 13 foram mais abundante no cultivo com cisteína, enquanto que os *spots* 13, 14 e 49 foram mais abundantes no cultivo com isoleucina.

A SOD também foi identificada nos cultivos com sulfato de amônio (*spots* 3249 e 3251), ureia (*spots* 1600 e 1602), caseína (*spot* 2859) e farinha de pena (*spot* 1817). Já a peroxidase foi identificada nos *spots* 24 e 330 que foram mais abundantes nos cultivos com ácido glutâmico.

Por outro lado, já foi relatado que a produção de enzimas oxidativas (manganês-peroxidase, lignina peroxidase e lacase) por *F. solani* F552 pode ser otimizada em condições brandas de estresse oxidativo induzido por H_2O_2 e estas enzimas estão envolvidas na degradação de biomassa lignocelulósica (OBRUCA et al., 2012).

A identificação de SOD e Peroxidase sugere que ocorreu a produção de moléculas de H_2O_2 e que isso pode ter estimulado a produção de enzimas oxidativas por *F. oxysporum* URM 7401.

A produção de proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins* - HSP) é um fenômeno resultante da alteração da expressão gênica e da tradução de proteínas em resposta ao estresse. As HSP atuam como chaperonas e estão envolvidas com a proteção e manutenção do correto dobramento das proteínas (SALEKDEH; KOMATSU, 2007).

Em outros eucariotos, a disponibilidade de nitrogênio também foi relatada como um fator capaz de influenciar a produção de HSP (WANG et al., 2014).

Nos cultivos com aminoácidos foram identificadas diferentes proteínas de choque térmico (Cys: *spots* 892 e 939; Glu: *spots* 221, 238, 315 e 1156; His: *spot* 55; Ile: *spots* 125 e 502) e, de maneira geral, todos os cultivos apresentaram as proteínas de choque térmico.

Nos cultivos com, sulfato de amônio, caseína e farinha de pena também foram identificadas proteínas com ação de proteínas de choque térmico (HSP): *spot* 3103 (sulfato de amônio); *spots* 2272, 2265 e 2266 (caseína) e *spots* 1631 e 1133 (farinha de pena). No cultivo com isoleucina também foi identificada a enzima 3-hidroxi-isobutirato desidrogenase, mitocondrial (*spot* 408) que atua como oxirredutase (THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015).

Os processos metabólicos endógenos dos fungos também podem levar ao acúmulo de outros produtos tóxicos. Nos cultivos com farinha de pena (*spot* 1285) e ureia (*spot* 1544 e 1545) foi identificada a enzima oxalato decarboxilase *oxdC*.

O *spot* 45 representou uma S-formilglutamina hidrolase mais abundante no cultivo com histidina e esta enzima também foi identificada nos cultivos com sulfato de amônio (*spot* 3195) e farinha de pena (*spot* 1657).

As enzimas oxalato decarboxilase *oxdC* e S-formilglutamina hidrolase estão envolvidas na decomposição de ácido oxálico e formaldeído, respectivamente e geram como produto o formiato.

A formiato desidrogenase está envolvida na desintoxicação por formiato e foi identificada nos cultivos com aminoácidos (*spots* 280, 134 e 126), nos quais as proteoformas que foram mais abundantes no cultivo com histidina, com farinha de pena (*spots* 1385 e 1386) e com ureia (*spot* 1433).

O ácido oxálico em fungos filamentosos é produzido como um reflexo do ciclo dos ácidos carboxílicos que pode ser modulado por fontes de nitrogênio (MÄKELÄ et al., 2009).

A beta-lactamase hidrolase-*like* está relacionada à hidrólise de compostos do tipo carbapenemos e foi mais abundante no cultivo com histidina (*spot* 127), além de ser identificada de modo exclusivo no cultivo com cisteína (*spot* 856) e com sulfato de amônio (*spot* 3082).

A presença de enxofre nas estruturas de cisteína e sulfato de amônio pode ter induzido a produção desta enzima pela similaridade com os compostos sobre os quais ela atua.

Os *spots* 85 e 90 são proteoformas de tiamina tiazol sintase que foram mais abundantes no cultivo com ácido glutâmico. Essa enzima está envolvida na resposta a várias condições de estresse e em mecanismos de controle de dano ao DNA (THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015).

No cultivo com sulfato de amônio (*spot* 3320) foi identificada a enzima nucleosídeo difosfato quinase (NDK) que atua no metabolismo de nucleotídeos, mas que tem sido induzida em situações diversas de estresse metabólico (ZHANG et al., 2013).

A produção de enzimas antioxidantes pode indicar um mecanismo de defesa de *F. oxysporum* URM 7401 contra o aumento de ERO, e indiretamente a ocorrência de apoptose. Também é possível que a abundância de HSP tenha sido modulada pela disponibilidade das diferentes fontes de nitrogênio e pelos reflexos do aumento de estresse oxidativo.

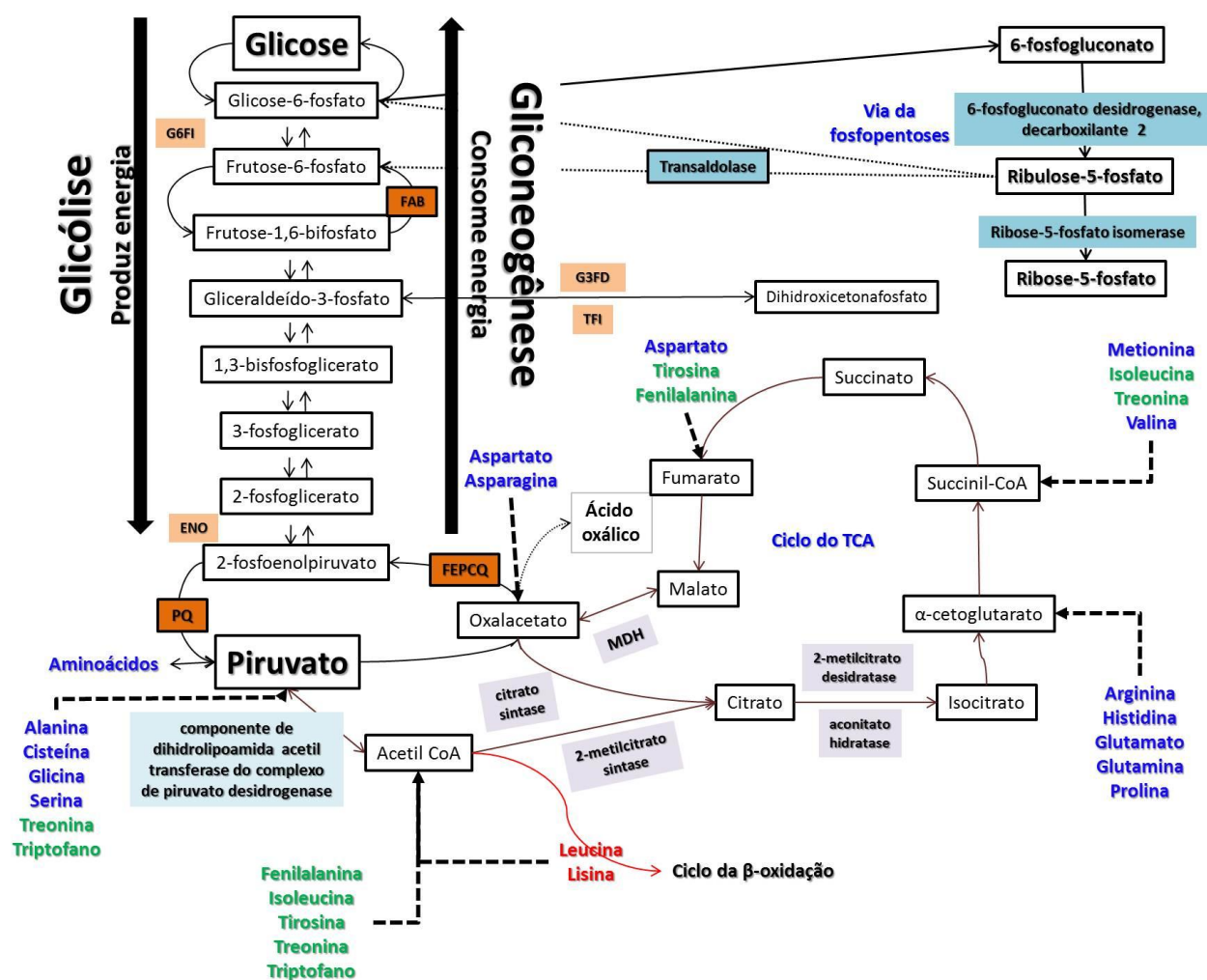
Além disso, a presença de enzimas antioxidantes e de proteínas HSP pode estar correlacionada à abundância de tiamina tiazol sintase, pois apresentam um papel claro no controle ao dano provocado pelas ERO.

A produção de oxalato decarboxilase *oxdC*, S-formilglutamina hidrolase e formiato desidrogenase nos cultivos com as diferentes fontes de nitrogênio indicam que estas, provavelmente, modularam o ciclo de ácidos tricarbóxicos e, conseqüentemente, a produção de ácido oxálico.

❖ Enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos

As proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos que foram apresentadas nas TABELAS 5, 6 e 7 foram agrupadas, de acordo com suas funções, e estão representadas na FIGURA 27 e APÊNDICE I. As discussões acerca das funções destas proteínas estão apresentadas em seguida.

Figura 27 - Ilustração das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas no metabolismo de carboidratos.



As formas geométricas com a mesma cor representam proteínas identificadas, por espectrometria de massas, que atuam no mesmo processo biológico. Os retângulos sem preenchimento representam moléculas importantes do ciclo metabólico abordado. As setas que ligam aminoácidos aos diversos precursores mostram a via de entrada destes aminoácidos. Os aminoácidos em azul são ditos glicogênicos ou gliconeogênicos; os aminoácidos em vermelho são ditos cetogênicos; e os aminoácidos em verde são ditos glicocetogênicos.

Legenda: G6FI: glicose-6-fosfato isomerase; TFI: Triosefosfato isomerase, G3FD: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; ENO: Enolase; FEPCQ: Fosfoenolpiruvato carboxiquinase; FBA: frutose-1,6-bisfosfato aldolase; PQ: piruvato quinase.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio foram identificadas proteínas envolvidas com o metabolismo de carboidratos, de modo mais específico com glicólise, gliconeogênese, ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e via das fosfopentoses. A gliconeogênese resulta na formação de glicose a partir de precursores que não são carboidratos, tais como piruvato, aminoácidos e glicerol. Já a glicólise é uma série de reações químicas que resultam na quebra do carboidrato em piruvato com produção de ATP e redução de NAD(P) em NAD(P)H (THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015).

Para participar da gliconeogênese, esses aminoácidos são deaminados na mitocôndria e podem entrar no ciclo dos ácidos tricarbóxicos, por exemplo - a partir da via α -cetoglutarato (ácido glutâmico e histidina), Succinil-Coa (isoleucina) ou piruvato (cisteína) para serem convertidos em oxalacetato.

A sorbose redutase SOU1 foi identificada no cultivo com farinha de pena (*spot* 1665) e esta enzima pode estar envolvida na catálise de D-sorbitol fosforilado para frutose-6-fosfato ou glicose-6-fosfato que são precursores da glicólise (GREENBERG et al., 2005).

A enzima glicose-6-fosfato isomerase (G6FI) (*spot* 201) foi identificada em todos os cultivos com aminoácidos e também nos cultivos com sulfato de amônio (*spot* 2998) e caseína (*spot* 2339). Os *spots* 111/888 e 114 representam proteoformas de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3FD), que foram mais abundantes em cisteína e ácido glutâmico, respectivamente. Além disso, esta enzima foi detectada no cultivo com caseína (*spot* 2550).

Os *spots* 27 e 28 são proteoformas de triosefosfato isomerase (TFI) e foram mais abundantes nos cultivos com cisteína e histidina, respectivamente. A TFI também foi identificada nos cultivos com sulfato de amônio (*spot* 3218) e farinha de pena (*spot* 1744). Os *spots* 185 e 990 são proteoformas de enolase (ENO) que apresentaram maiores abundâncias nos cultivos com isoleucina e cisteína, respectivamente. Esta enzima também foi identificada nos cultivos com farinha de pena (*spot* 1255) e caseína (*spot* 2396, 2405).

A enzima piruvato quinase (PQ) (*spot* 226) foi identificada no proteoma dos cultivos com aminoácidos. A frutose-1,6-bisfosfato aldolase (FBA) foi identificada nos cultivos com sulfato de amônio (*spot* 3125 e 3126), caseína (*spots* 2557 e 2567), farinha de pena (*spots* 1444 e 1452); e no cultivo com aminoácidos, o *spot* 116 indicou que a FBA foi mais abundante no cultivo com cisteína.

Os *spots* 227/229 e 490 identificadas como a enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (FEPCQ) foram mais abundantes nos cultivos com ácido glutâmico e isoleucina, respectivamente. Esta enzima também foi identificada no cultivo com farinha de pena (*spot* 1127).

As enzimas G6FI, TFI, G3FD e a ENO são enzimas reversíveis e estão envolvidas tanto na glicólise quanto na gliconeogênese. A FEPCQ e FBA catalisam reações de modo irreversível e são específicas da gliconeogênese. Por sua vez, a

PQ é uma enzima específica da glicólise (THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015).

Além das enzimas envolvidas nos processos de glicólise e gliconeogênese, as fontes de nitrogênio modularam enzimas que atuam em outras rotas metabólicas. A oxidação do piruvato, que é o produto final da glicólise, e a presença de aminoácidos geram moléculas de acetil-CoA que modula diferentes rotas metabólicas, tais como, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e a biossíntese de ácidos graxos (SPALDING; PRIGGE, 2010).

O *spot* 175 foi cerca de 2 vezes mais abundante no cultivo com histidina e foi identificado como diidrolipoamida desidrogenase que é uma enzima que constitui o complexo da piruvato desidrogenase, que catalisa a decarboxilação do piruvato em acetil-CoA. A molécula de acetil-CoA pode ser utilizada em diferentes vias metabólicas, entre as quais está o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e biossíntese de ácidos graxos (SPALDING; PRIGGE, 2010).

A enzima malato desidrogenase (MDH) mitocondrial foi identificada nos cultivos com sulfato de amônio (*spots* 3165 e 3178), caseína (*spot* 2687) e no *spot* 57, que foi mais abundante no cultivo com histidina.

A malato desidrogenase NAD-dependente foi identificada pelos *spots* 79 e 83, que são proteoformas, e foram mais abundantes no cultivos com ácido glutâmico. Esta enzima também foi identificada nos cultivos com caseína (*spot* 2612) e farinha de pena (*spot* 1521).

Malato desidrogenase mitocondrial e malato desidrogenase NAD-dependente são oxirredutases que atuam na conversão malato em oxalacetato na mitocôndria ou no citossol (THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015).

As enzimas aconitato hidratase, mitocondrial (*spot* 246), 2-metilcitrato sintase, mitocondrial (*spot* 152) e citrato sintase, mitocondrial (*spot* 149) foram mais abundantes nos cultivos com cisteína, isoleucina cisteína, respectivamente.

A enzima citrato sintase também foi identificada no cultivo com farinha de pena (*spots* 1298 e 1305). A enzima 2-metilcitrato desidratase foi identificada no cultivo com farinha de pena (*spot* 1200) e no *spot* 194 que foi mais abundante no cultivo com isoleucina.

Transaldolase, 6-fosfogliconato desidrogenase, decarboxilante 2 e ribose-5-fosfato isomerase atuam na via das fosfopentoses (THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015) e foram moduladas pela suplementação com fontes de nitrogênio de diferentes complexidades.

Os *spots* 89, 91 e 335 são proteoformas de transaldolase que foram mais abundantes nos cultivos com isoleucina, histidina e cisteína, respectivamente. Esta enzima também foi identificada no cultivo com sulfato de amônio (*spots* 3139, 3140 e 3210), caseína (*spots* 2598, 2603 e 2605) e farinha de pena (*spot* 1500).

Já a enzima 6-fosfogliconato desidrogenase, decarboxilante 2 atua na resposta ao estresse oxidativo e catalisa a reação que resulta na redução de NAD em NADPH. Esta enzima foi mais abundante no cultivo com ácido glutâmico (*spot* 162) e também foi identificada no cultivo com sulfato de amônio (*spot* 3046). A enzima ribose-5-fosfato isomerase foi identificada no cultivo com ureia (*spot* 1533).

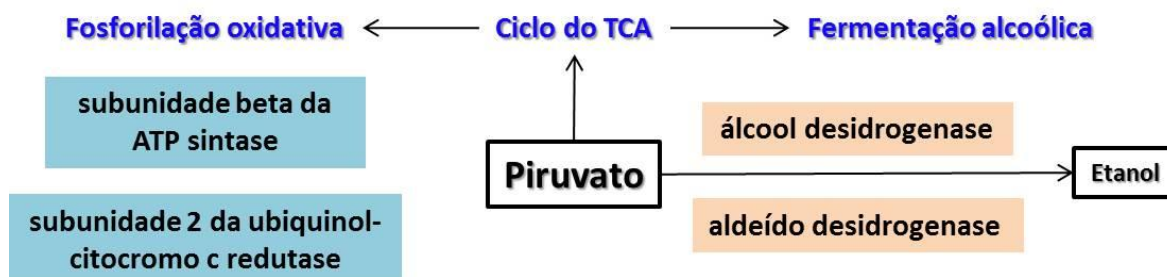
A superexpressão de enzimas da via das fosfopentoses tem sido explorada com o objetivo de otimizar o processo de produção de etanol com *S. cerevisiae* utilizando xilose como fonte de carbono (VILELA et al., 2015) e *F. oxysporum* utilizando glicose como fonte de carbono (ANASONTZIS et al., 2016).

A ribose-5-fosfato isomerase é capaz de converter xilose em xilulose e é uma enzima chave na utilização deste monossacarídeo como fonte fermentescível para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (VILELA et al., 2015). Embora muito conhecido e aplicado em processos fermentativos da glicose, a levedura *S. cerevisiae* não é capaz de utilizar xilose e essa deficiência tem despertado o interesse acerca de *F. oxysporum* dada a sua habilidade de produzir enzimas que degradam biomassa lignocelulósica e utilizar glicose e xilose como substratos fermentescíveis (ANASONTZIS et al., 2014).

❖ Enzimas envolvidas na geração de energia

As proteínas relacionadas à geração de energia que foram apresentadas nas TABELAS 5, 6 e 7 foram agrupadas, de acordo com suas funções, e estão representadas na FIGURA 28 e APÊNDICE J. As discussões acerca das funções destas proteínas estão apresentadas em seguida.

Figura 28 - Ilustração das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas na geração de energia



As formas geométricas com a mesma cor representam proteínas identificadas, por espectrometria de massas, que atuam no mesmo processo biológico.
Fonte: Elaborado pela autora.

Enzimas vinculadas à geração de energia também foram identificadas no proteoma de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com diferentes fontes de nitrogênio.

A subunidade beta da ATP sintase (*spot* 180) foi cerca de 4 vezes mais abundante no cultivo com ácido glutâmico e, identificada nos *spots* 2401 (caseína) e 1266 (Farinha de pena). A subunidade 2 da ubiquinol-citocromo c redutase foi mais abundante no cultivo com histidina (*spot* 133) e também foi identificada no cultivo com caseína (*spot* 2515). Estas enzimas atuam na síntese de ATP e transporte de H⁺; da cadeia respiratória na fosforilação oxidativa, respectivamente (THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015)

A enzima aldeído desidrogenase (ALDH) possui atividade de oxirredutase, atua sobre aldeídos e está envolvida na geração de energia (THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015). A ALDH foi mais abundante no cultivo com cisteína (*spot* 186) e também foi identificada nos cultivos com sulfato de amônio (*spot* 3013 e 3015) e caseína (*spot* 2564).

A identificação de álcool desidrogenase (*spots* 98, 276) indicou que esta enzima foi 2 e 1,6 vezes mais abundante nos cultivos com isoleucina e ácido glutâmico, respectivamente.

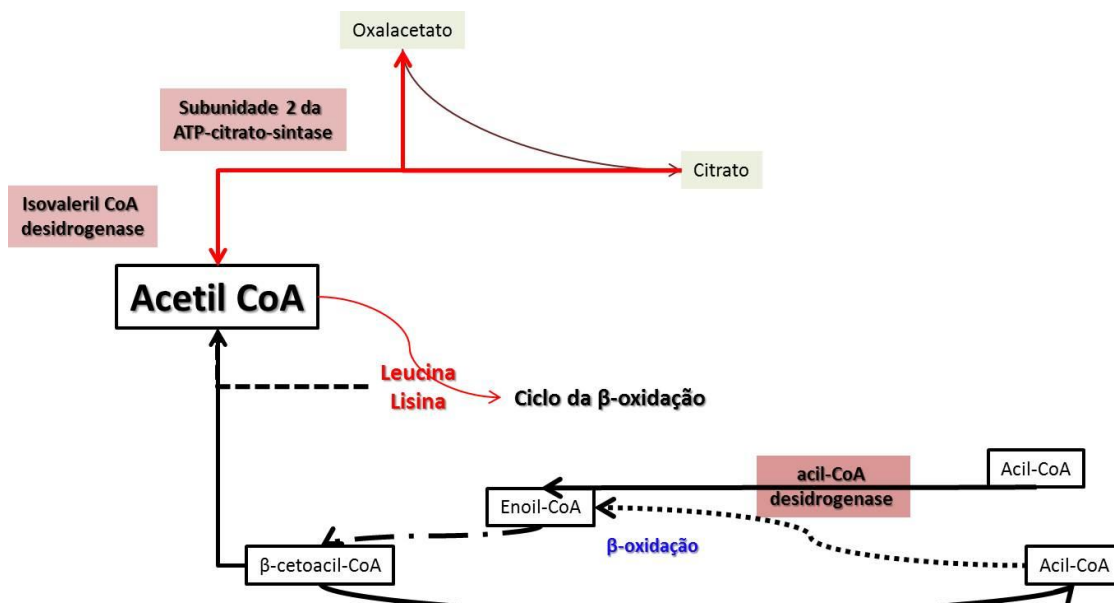
Estudos com *S. cerevisiae* indicaram que a presença de acetaldeído ou etanol provocam um aumento da produção de aldeído desidrogenase para utilizá-los como fontes de carbono e energia, além disso, os autores relataram que este mecanismo de resistência ao estresse de *S. cerevisiae* é inespecífico (ARANDA; DEL OLMO, 2003).

A detecção de álcool desidrogenase reforça que, além da capacidade de utilizar xilose como fonte de carbono e açúcar fermentescível, o fungo *F. oxysporum* URM 7401 também pode ser capaz de realizar fermentação alcoólica, e o etanol gerado pode estar associado ao aumento de aldeído desidrogenase.

❖ Enzimas envolvidas no metabolismo dos ácidos graxos

As proteínas relacionadas ao metabolismo dos ácidos graxos carboidratos que foram apresentadas nas TABELAS 5, 6 e 7 foram agrupadas, de acordo com suas funções, e estão representadas na FIGURA 29. As discussões acerca das funções destas proteínas estão apresentadas em seguida.

Figura 29 - Ilustração das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas no metabolismo de ácidos graxos



As formas geométricas com a mesma cor representam proteínas identificadas, por espectrometria de massas, que atuam no mesmo processo biológico.
Fonte: Elaborado pela autora.

Uma parte das moléculas de acetil-CoA gerada durante os processos intracelulares pode ser direcionada para o metabolismo de ácidos graxos, e por esse motivo, é possível identificar enzimas relacionadas a esta via metabólica (SPALDING; PRIGGE, 2010).

No cultivo com farinha de pena foi identificada a isovaleril-CoA desidrogenase (*spot* 1397) que está relacionada ao metabolismo de ácidos graxos.

No cultivo com isoleucina, foi identificada, de modo exclusivo a enzima acil-CoA desidrogenase (*spot* 442), que está envolvida na oxidação de ácidos graxos. Já no *spot* 190, mais abundante em cisteína, foi identificada a enzima subunidade 2 da ATP-citrato sintase, que é responsável pela síntese de acetil-CoA citosólico (THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015)

O acetil-CoA é fundamental para a biossíntese de ácidos graxos e outros compostos e; as vias metabólicas que produzem acetil-CoA podem ser modificadas de acordo com as fontes de carbono disponíveis (HYNES; MURRAY, 2010).

A isoleucina é um aminoácido classificado como glicogênico (pode gerar glicose como precursor na gliconeogênese) e cetogênico que pode ser convertido em acetil-CoA (SPALDING; PRIGGE, 2010), sendo assim, é possível que a isoleucina module a biossíntese de ácidos graxos e a via da β -oxidação, o que justificaria a abundância dessas enzimas.

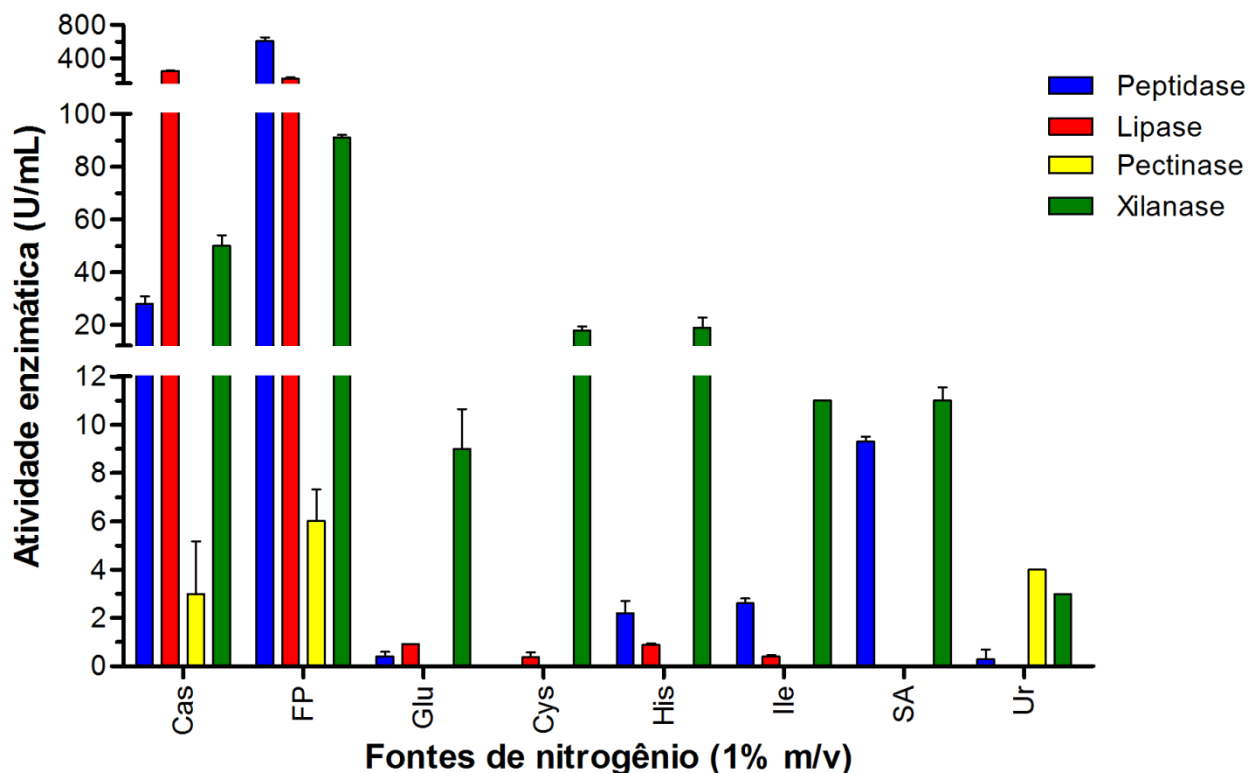
A identificação de enzimas específicas da glicólise também contempla a geração de moléculas de piruvato que podem ser oxidadas a acetil-CoA que é um precursor da biossíntese de ácidos graxos e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Esta hipótese é corroborada pela detecção de diversas enzimas envolvidas nestes processos.

4.4.Efeito de fontes de nitrogênio sobre a produção de hidrolases pelo fungo *F. oxysporum*

Fungos filamentosos podem utilizar um amplo espectro de fontes de carbono e nitrogênio com diferentes complexidades e para avaliar o efeito destas fontes sobre a produção de hidrolases pelo fungo *F. oxysporum* em bioprocessamento submerso, os meios de cultivo foram suplementados com 1% de sulfato de amônio (SA), ureia (Ur), ácido glutâmico (Glu), cisteína (Cys), histidina (His), isoleucina (Ile), caseína (Ca) e farinha de pena (FP).

Na FIGURA 30 é possível observar a produção de enzimas nos cultivos suplementados com as diferentes fontes de nitrogênio.

Figura 30 - Perfil de produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo *F. oxysporum* em 96 h de bioprocessamento submerso contendo 1% (m/v) de diferentes fontes de nitrogênio.



Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média \pm desvio padrão.

Legenda: Caseína (Cas), farinha de pena (FP), ácido glutâmico (Glu), cisteína (Cys), histidina (His), isoleucina (Ile), sulfato de amônio (SA), ureia (Ur).

Fonte: Elaborado pela autora.

Um parâmetro avaliado foi a variação de pH do meio de cultivo, enquanto que em 96 h de bioprocessamento submerso não houve alteração no pH inicial (pH 7) nos cultivos com caseína, farinha de pena, histidina, isoleucina e ureia, os pH dos cultivos com ácido glutâmico, cisteína e sulfato de amônio foram 8, 6 e 6, respectivamente.

Entre as fontes de nitrogênio estudadas temos fontes orgânicas e inorgânicas, com diferentes graus de complexidade, que foram avaliadas comparativamente quanto às atividades de peptidase, lipase, pectinase e xilanase.

Em nosso estudo, o cultivo com farinha de pena foi responsável pela maior atividade de peptidase, pectinase e xilanase, enquanto que a maior atividade lipolítica foi detectada no cultivo com caseína.

A maior atividade proteolítica foi obtida no cultivo com FP (606 U/mL) que foi cerca de 20, 270, 230 e 65 vezes maior que nos cultivos com caseína, histidina, isoleucina e sulfato de amônio, respectivamente. Não foram detectadas atividades proteolíticas nos cultivos com cisteína e ureia.

F. oxysporum URM 7401 produziu elevados níveis de peptidase quando comparado ao estudo com *Stenocarpella maydis* em bioprocesso submerso para o qual foi relatada a produção de cerca de 0,25 U/mL de peptidases (HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2014).

Silva e colaboradores (2013) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de caseína sobre a produção de peptidase em bioprocesso submerso utilizando o fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius. Os cultivos com 0,25 e 0,50 % (m/v) de caseína obtiveram as maiores atividades enzimáticas de cerca de 40 U/mL, entretanto no cultivo com 1% (m/v) de caseína a atividade máxima foi cerca de 25 U/mL; similar aos níveis obtidos no cultivo submerso com *F. oxysporum* URM 7401.

Sethi e colaboradores (2017) avaliaram a produção de peptidase por *Penicillium purpurogenum* BKS9 em cultivo submerso estático e os melhores indutores foram leite de soja e leite em pó na concentração de 1% (m/v) que atingirem cerca de 120 U/mL de atividade proteolítica.

Silva, Bertolini e Ernandes (2001) também avaliaram o efeito da complexidade de diferentes fontes de nitrogênio sobre a produção de hidrolases por *F. oxysporum*. Os autores relataram que em pH inicial 5 e 7, o cultivo com 1% (m/v) de fontes de nitrogênio complexas (gelatina e peptona) foram obtidas as maiores atividade proteolítica e biomassa acumulada em relação ao cultivo com 1% (m/v) de sulfato de amônio.

Os autores justificaram este resultado pela ausência de fonte de nitrogênio orgânico e pela forte acidificação do meio. Além disso, os autores observaram que a maior secreção de hidrolases aconteceu nos meios com fontes de nitrogênio mais complexas.

A produção de peptidases por espécies de *F. oxysporum* também foi explorada por Ali e Vidhale (2013) que relataram a produção de cerca de 70,5 U/g de peptidase utilizando *F. oxysporum* em bioprocesso sólido com resíduos agroindustriais.

A maior produção de lipases foi detectada no cultivo com caseína que foi cerca de 2, 260, 670, 280 e 590 maiores que nos cultivos com farinha de pena, ácido glutâmico, cisteína, histidina e isoleucina, respectivamente, entretanto os cultivos com sulfato de amônio e ureia não apresentaram atividade lipolítica.

O uso de fontes orgânicas como suplementação em bioprocessos submersos também proporcionou uma maior produção de lipase por *Fusarium verticillioides* (FACCHINI et al., 2015); *Fusarium sp.* (OLIVEIRA; LIMA, 2014) e *Trichoderma harzianum* (CORADI et al., 2013) quando comparado com fontes inorgânicas.

Por outro lado, Oliveira e Lima (2014) relataram que o sulfato de amônio favoreceu o acúmulo de biomassa por *Fusarium sp.* enquanto que o extrato de levedura aumentou a secreção de lipase. Niaz e colaboradores (2014) cultivaram *A. nidulans* (MBL-S-6) em bioprocessos submersos e a melhor produção de lipase foi obtida com 1% (m/v) de farelo de arroz que é um resíduo agroindustrial complexo.

Pectinases e xilanases são conhecidas como enzimas degradadoras de parede celular, pois atuam na degradação de polímeros da parede celular e que, por esse motivo, podem favorecer o ataque aos outros componentes da biomassa (ORTEGA et al., 2013).

A maior produção de pectinase foi detectada no cultivo com farinha de pena que foi cerca de 2 vezes maior que nos cultivos com caseína e ureia, respectivamente. Nos cultivos com ácido glutâmico, cisteína, histidina, isoleucina e sulfato de amônio a atividade de pectinase foi ausente.

Reddy e Saritha (2015) descreveram várias linhagens de *Fusarium sp.* com potencial pectinolítico, mas em bioprocessos submersos a suplementação com 1% (m/v) de aminoácidos ou ureia não tiveram efeito sobre a produção de pectinase por *Fusarium sp.* (PSTF1).

Ahmed e colaboradores (2016) utilizaram resíduos cítricos para induzir a produção de pectinases (117 $\mu\text{M}/\text{mL}/\text{min}$) por *Aspergillus niger*. Por outro lado, no cultivo com *F. oxysporum* URM 7401 a farinha de pena, mesmo não sendo um indutor óbvio, atingiu 6 U/mL de atividade de pectinase.

A maior produção de xilanase foi detectada no cultivo com farinha de pena que foi cerca de 2, 10, 5, 5, 9, 8 e 27 maiores que nos cultivos com caseína, ácido glutâmico, cisteína, histidina, isoleucina, sulfato de amônio e ureia, respectivamente.

O uso de extrato de levedura como fonte de nitrogênio orgânica também incrementou a produção de carboidrases por *Aspergillus terreus* M11 (GAO et al., 2008) e xilanase por *Aspergillus sp.* (THOMAS; PARAMESWARAN; PANDEY, 2016).

Hernández-Domínguez e colaboradores (2014) mostraram que a produção de xilanase por *Stenocarpella maydis* em bioprocesso submerso foi cerca de 18 U/mL. Já Reis e colaboradores (2015) utilizaram ureia e sais para a otimização da produção de xilanase por *Penicillium echinulatum* S1M29 que obteve 36 U/mL.

Sharma e colaboradores (2016), em estudos de otimização com a linhagem *Fusarium sp.* XPF-5, obtiveram 0,55 U/mL de atividade de xilanase. Levando-se em conta a importância da produção de xilanase por *F. graminearum* foi verificado que o fator de transcrição Xyr1 é essencial para a produção enzimática, mas não tem efeito sobre a patogenicidade do microrganismo.

Ramanjaneyulu e Reddy (2016) descreveram que em estudos de otimização com o isolado de *Fusarium sp.* BVKTR2, combinando variações na concentração de sorbitol e extrato de levedura, além de pH, temperatura e agitação, foram obtidas 4560 U/mL de atividade xilanólítica.

Os autores também sugeriram o potencial para a sacarificação de biomassa desta linhagem está diretamente relacionado aos níveis de atividade de xilanase. Adicionalmente, outro estudo mostrou a relevância de xilanases e pectinases de *F. verticillioides* para a sacarificação de palha de trigo (RAVALASON et al., 2012).

Rosa-Garzon e colaboradores (2017) sugeriram que a produção de xilanase por *F. oxysporum* URM 7401 pode ser controlado por um mecanismo similar ao sistema PacC (PEÑALVA et al., 2008) e também relataram a produção de peptidases, lipases, pectinases e xilanase, em diferentes condições de pH.

As biomassas obtidas neste estudo foram deduzidas pela quantificação de proteínas intracelulares totais; e as fontes de nitrogênio farinha de pena e caseína (orgânicas e complexas) apresentaram biomassas que foram cerca de 8, 9, 10, 11, 13 e 13 vezes maiores que as biomassas obtidas nos cultivos com ácido glutâmico, isoleucina, cisteína, histidina, sulfato de amônio e urea, respectivamente (dados não mostrados).

F. graminearum com gene *areA* mutante também falhou ao crescer meio suplementado com estes mesmos aminoácidos e os autores sugeriram que a função do fator de transcrição *AreA* era necessária. Por outro lado, o crescimento de *F. graminearum* em ureia indicou independência da regulação por *AreA* e NMR (GIESE; SONDERGAARD; SØRENSEN, 2013).

Para *Penicillium marneffe* com mutação no gene *areA*, o crescimento a 25 °C, em meio contendo a GABA, L-prolina, L-glutamato, L-alanina e L-arginina não foi dependente da função de *AreA*. Por outro lado, a ausência de *AreA* afetou o crescimento do microrganismo no cultivo a 37 °C. Os resultados obtidos com *P. marneffe* indicam que a obtenção de fontes alternativas de nitrogênio pode estar atrelada a temperatura de cultivo (BUGEJA; HYNES; ANDRIANOPOULOS, 2012).

A menor biomassa acumulada na presença dos aminoácidos, sulfato de amônio e ureia é um indicativo de que, para a obtenção de fontes alternativas de nitrogênio, o fungo *F. oxysporum* URM 7401 necessita de um sistema de regulação similar ao *AreA*.

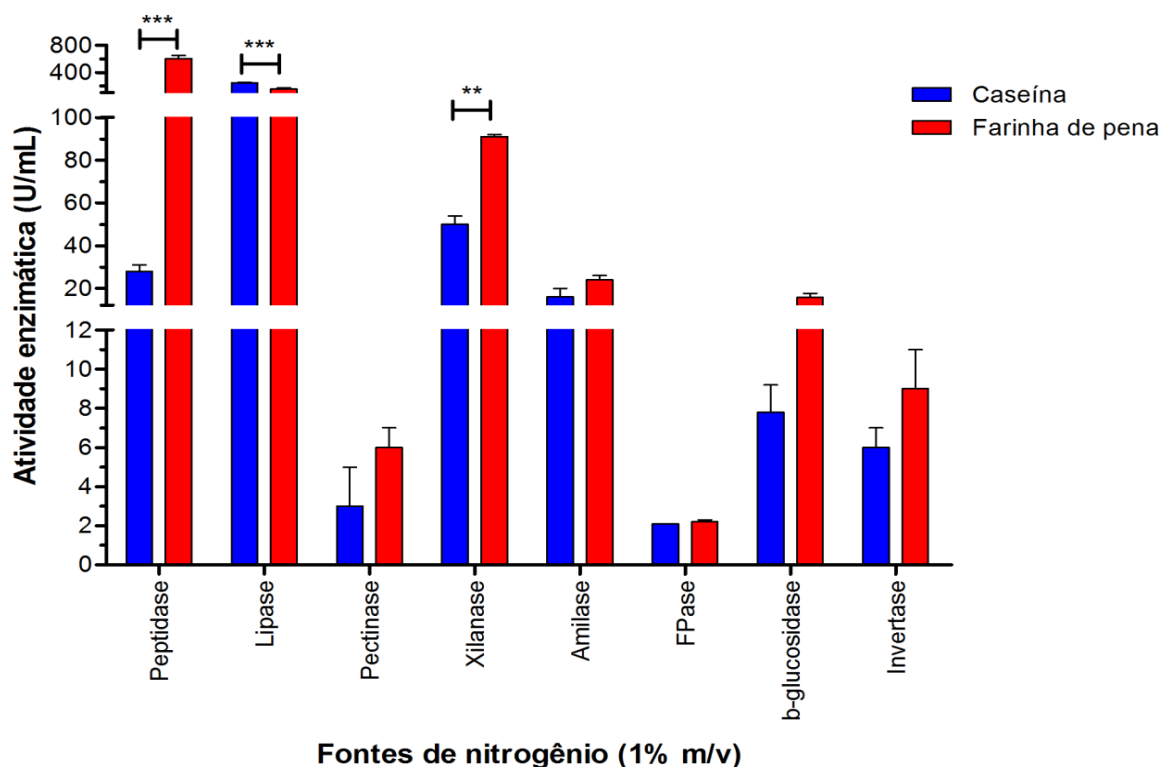
A elevada produção de peptidases nos cultivos com fontes proteicas (farinha de pena e caseína) a 30 °C também reforça a ocorrência da ativação de genes, que codificam enzimas, mediada por fatores de transcrição.

A análise dos estudos com *F. graminearum* (GIESE; SONDERGAARD; SØRENSEN, 2013) e *P. marneffe* (BUGEJA; HYNES; ANDRIANOPOULOS, 2012) também evidencia que regulação por *AreA* pode ser específica para os diferentes tipos de fungos.

Em conjunto, estas informações reforçam que são necessários estudos específicos para a definição do modo de regulação no fungo *F. oxysporum* URM 7401.

Para avaliar a produção de outras enzimas que atuem em diferentes etapas do processamento de biomassa lignocelulósica foram utilizadas apenas as fontes de nitrogênio complexas (caseína e farinha de pena). Para estes extratos também foram verificadas as atividades de amilase, avicelase, β -glicosidase, CMCase, FPase, invertase e lacase (FIGURA 31).

Figura 31 - Perfil de produção de enzimas pelo fungo *F. oxysporum* em 96 h de bioprocesso submerso contendo 1% (m/v) de caseína ou farinha de pena.



Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média \pm desvio padrão. Análise estatística: Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Fonte: Elaborado pela autora.

A análise da FIGURA 31 nos mostra que *F. oxysporum* URM 7401 é capaz de produzir enzimas que favoreçam a degradação inicial da biomassa, mas também hidrolases envolvidas na catálise de produtos menos complexos, como amido e celobiose, por exemplo.

Comparando as produções de enzimas induzidas por caseína ou farinha de pena devemos destacar que apenas peptidase, lipase e xilanase foram moduladas diferencialmente ($p < 0,05$).

As atividades de Avicelase, CMCCase e lacase foram verificadas, mas nas condições do estudo não foram detectadas e por esse motivo não estão destacadas no gráfico (FIGURA 31).

Uma vez que estas atividades já foram anteriormente discutidas, para efeito de comparação apenas entre as fontes de nitrogênio orgânicas e complexas, é possível observarmos que:

- A produção de peptidase induzida por farinha de pena foi cerca de 21 vezes maior que com caseína;
- A produção de lipase foi 1,6 vezes maior no cultivo com caseína quando comparada com o cultivo com farinha de pena;
- A farinha de pena induziu uma produção de xilanase cerca de 80% maior que a caseína;
- A produção de pectinase foi 2 vezes maior no cultivo com farinha de pena quando comparada ao cultivo com caseína.

A produção de amilase no cultivo com farinha de pena foi de 24 U/mL e 50% superior a produção com caseína. Em estudo com *Penicillium purpurogenum* BKS9 a indução de amilase foi mais eficiente com a utilização de farelo de trigo. A produção atingiu 120 U/mL e foi 2 vezes maior do que com leite em pó (SETHI et al., 2017).

Outro estudo com *F. oxysporum* mostrou que a produção de amilase pode ser modulada pelo grau de complexidade de diferentes fontes de nitrogênio e pelo pH inicial do cultivo. Os autores relataram que as maiores atividades de amilase em culturas com pH inicial 5 e 7 foram obtidas utilizando peptona e sulfato de amônio, respectivamente. Além disso, a maior atividade amilolítica estava diretamente relacionada com a biomassa acumulada (SILVA; BERTOLINI; ERNANDES, 2001).

Considerando uma abordagem mais ampla sobre o efeito da complexidade das fontes de nitrogênio, já foi relatado que as produções de xilanase, β -glicosidase, endo e exocelulases por *Lentinula edodes* foram melhoradas pelo uso farinha de soja cozida como fonte de nitrogênio quando comparadas com nitratos de amônio e de potássio (PEDRI et al., 2015).

A produção de FPase por *F. oxysporum* URM 7401 em 96 h de bioprocessamento foi similar entre os cultivos e atingiu cerca de 2 U/mL. Em outro estudo, a produção por FPase pela linhagem mutante *F. oxysporum* NTG-19 atingiu valores de 9 U/mL em cultivo submerso com 4% (m/v) de farelo de trigo (KUHAD; MANCHANDA; SINGH, 1999)

A detecção de FPase indica a atividade de exoglicanase sobre a celulose cristalina presente no papel filtro e atua removendo a celobiose das extremidades da fibra de celulose. O cultivo conjunto de *A. niger* e *T. reesie* otimizou a produção de FPase quando comparado aos cultivos isolados destes microrganismos. A produção

máxima de FPase foi obtida após 120 h de cultivo e atingiu níveis de 3 U/mL (FANG; ZHAO; SONG, 2010).

Outra enzima detectada nos cultivos com *F. oxysporum* URM 7401 foi a β -glicosidase. A produção com farinha de pena foi 2 vezes maior do que a caseína e atingiram cerca de 0,7 e 1,4 U/mL, respectivamente. Resultados similares também foram obtidos por Fang, Zhao e Song (2010) que relataram a produção de β -glicosidase por *A. niger* e *T. reesei* e estes microrganismos obtiveram atividade de 1,4 e 0,3 U/mL após 168 e 144 h, respectivamente.

A degradação de celulose é mediada por celulasas - principalmente endocelulasas, exocelulasas e β -glicosidasas. A ausência ou insuficiência de β -glucosidase leva ao acúmulo de celobiose não degradada e, conseqüentemente, inibe o complexo enzimático de celulasas. Olajuyigbe, Nlekerem e Ogunyewo (2016) já mostraram a produção de uma β -glicosidase termoestável produzida por *F. oxysporum* cultivado com diferentes fontes de celulose (OLAJUYIGBE; NLEKEREM; OGUNYEW, 2016).

F. oxysporum URM 7401 também produziu cerca de 9 e 6 U/mL de invertase com cultivos com farinha de pena e caseína, respectivamente. A produção de invertase já foi descrita para *F. graminearum* em bioprocessamento sólido com farelo de trigo (GONÇALVES; JORGE; GUIMARÃES, 2016).

Rustigel, Jorge e Guimarães (2015) avaliaram o efeito de 1% (m/v) de fontes complexas (bagaço de cana-de-açúcar, espiga de milho triturada, palha de arroz, aveia, farelo de trigo e farinha de mandioca), em bioprocessamento submerso, sobre a produção de invertase por *Aspergillus phoenicis*. Os autores indicaram que o bagaço de cana-de-açúcar e o farelo de trigo aumentaram a produção de invertase cerca de 3 e 5,5 vezes, respectivamente.

Por outro lado, a suplementação com ureia, peptona, extrato de levedura e farelo de algodão não apresentou efeito sobre a produção de invertase por *Fusarium* sp. (SHAHEEN; BHATTI; ASHRAF, 2008).

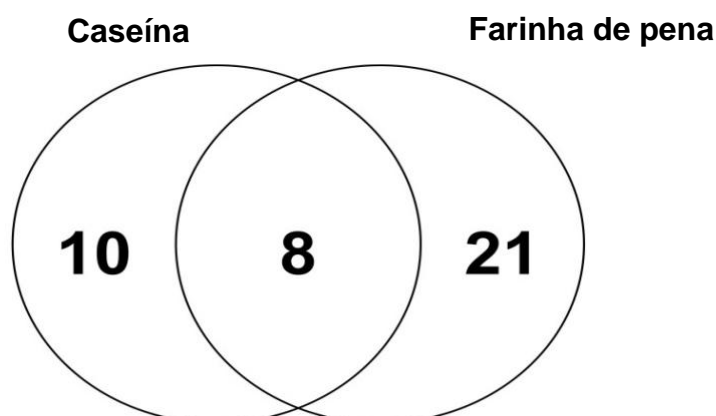
A resposta de microrganismos a composição do meio de cultura é muito útil para explorar os melhores parâmetros para a produção de enzimas (SIALA et al., 2012). De maneira geral, para *F. oxysporum* URM 7401 as maiores biomassas acumuladas e produções de enzimas foram obtidas nos cultivos com caseína e farinha de pena. Estes suplementos se comportam como fontes de nitrogênio e de

carbono o que favorece o desenvolvimento do microrganismo após a obtenção dos nutrientes do meio.

4.5. Identificação de proteínas secretadas por *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com 1% (m/v) de caseína ou farinha de pena

As proteínas secretadas por *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com fontes complexas de nitrogênio foram avaliadas utilizando ensaios enzimáticos e também foram identificadas por espectrometria de massas. No total foram identificadas 41 proteínas considerando as duas condições de cultivo e o padrão de distribuição qualitativo destas proteínas está apresentado na FIGURA 32.

Figura 32 - Diagrama de Venn das amostras de secretoma de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com 1% (m/v) de caseína ou farinha de pena.



A distribuição das amostras foi determinada utilizando o *software* Scaffold versão 4.8.4.

Fonte: Elaborado pela autora.

Pelo diagrama de Venn é possível observar que as condições compartilham de 8 proteínas comuns, além de 10 e 21 proteínas que foram identificadas exclusivamente nos cultivos com caseína e farinha de pena, respectivamente.

As proteínas identificadas nos secretomas do cultivo com caseína e farinha de pena e as suas características estão apresentadas na TABELA 8, e os dados adicionais sobre as proteínas identificadas estão apresentadas no APÊNDICE B.

Tabela 8 - Lista de proteínas secretadas por *F. oxysporum* URM 7401, cultivado em bioprocesso submerso com 1% (m/v) de caseína ou farinha de pena, identificadas por LC-ESI-MS/MS

| Acesso | Proteína (*) | Massa (kDa) | pI teór. | Peptídeo sinal |
|----------------|--|--------------------|-----------------|-----------------------|
| Caseína | | | | |
| X0CJ84 | Cadeia pesada da dineína citoplasmática | 493 | 5,61 | Não |
| X0CET8 | Fator de alongação 1-beta | 25 | 4,36 | Não |
| X0BZ89 | Frutose-bifosfato aldolase, classe II | 40 | 5,64 | Não |
| X0CRV2 | Nucleosídeo difosfato quinase (EC 2.7.4.6) | 26 | 8,8 | Não |
| X0CZT7 | Peptidil-prolil cis-trans isomerase | 24 | 9,42 | Não |
| X0BT45 | Proteína de ribonuclease da família T2 | 29 | 5,47 | Sim |
| X0CFY1 | Proteína ribossomal S27a ubiquitina-40S | 18 | 9,82 | Não |
| X0BZT7 | Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) | 28 | 5,81 | Sim |
| X0CB40 | Proteína não caracterizada | 290 | 5,47 | Não |
| X0CI54 | Proteína não caracterizada | 15 | 8,9 | Sim |
| X0CNB5 | Proteína não caracterizada | 286 | 5,83 | Não |
| X0CZR2 | Proteína não caracterizada | 37 | 6,38 | Sim |
| X0BTD9 | Proteína não caracterizada | 24 | 6,77 | Sim |
| X0CEL7 | Proteína não caracterizada | 13 | 5,25 | Não |
| X0CES0 | Proteína não caracterizada | 22 | 8,61 | Sim |
| X0CXS3 | Proteína não caracterizada | 31 | 5,46 | Não |
| X0DSH3 | Proteína não caracterizada | 26 | 7,66 | Sim |
| X0DZU6 | Proteína não caracterizada | 27 | 9,64 | Não |

| Acesso | Proteína (*) | Massa (kDa) | pI teór. | Peptídeo sinal |
|------------------------|--|------------------------|---------------------|---------------------------|
| Farinha de pena | | | | |
| X0CQI2 | Aminopeptidase (EC 3.4.11.-) | 99 | 5,26 | Não |
| X0CJ84 | Cadeia pesada da dineína citoplasmática | 493 | 5,61 | Não |
| X0BZX8 | Carboxipeptidase A4 | 45 | 6,33 | Sim |
| X0CUD2 | Diidrolipoil desidrogenase (EC 1.8.1.4) | 54 | 6,69 | Não |
| X0CKE4 | Fator de alongação da transcrição SPT6 | 162 | 4,83 | Não |
| X0CSR7 | Glicoamilase (EC 3.2.1.3) (<i>1,4-alpha-D-glucan glucohidrolase</i>) | 72 | 5,1 | Não |
| X0CZH1 | Glicose-6-fosfato isomerase (EC 5.3.1.9) | 43 | 5,86 | Não |
| X0CT61 | Glutaciona redutase | 55 | 7,2 | Não |
| X0CLS5 | N4-(β -N-acetilglucosaminil)-L- asparaginase | 36 | 8,5 | Sim |
| X0CRV2 | Nucleosídeo difosfato quinase (EC 2.7.4.6) | 26 | 8,8 | Não |
| X0CM44 | Peptídeo hidrolase (EC 3.4.-.-) | 52 | 5,38 | Sim |
| X0CFY1 | Proteína ribossomal S27a ubiquitina- 40S | 18 | 9,82 | Não |
| X0B8T7 | Subtilisina | 42 | 6,08 | Sim |
| X0CQK4 | Subtilisina | 43 | 6,09 | Sim |
| X0BZT7 | Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) | 28 | 5,81 | Sim |
| X0BRZ0 | Tripsina | 25 | 8,6 | Sim |

| Acesso | Proteína (*) | Massa (kDa) | pI teór. | Peptídeo sinal |
|---------------|----------------------------|------------------------|---------------------|---------------------------|
| X0CB40 | Proteína não caracterizada | 290 | 5,47 | Não |
| X0CI54 | Proteína não caracterizada | 15 | 8,9 | Sim |
| X0CNB5 | Proteína não caracterizada | 286 | 5,83 | Não |
| X0CZR2 | Proteína não caracterizada | 37 | 6,38 | Sim |
| X0BM87 | Proteína não caracterizada | 18 | 5,84 | Sim |
| X0BMV8 | Proteína não caracterizada | 61 | 6,13 | Sim |
| X0BT91 | Proteína não caracterizada | 28 | 6,66 | Não |
| X0BTP5 | Proteína não caracterizada | 86 | 5,41 | Não |
| X0BVZ4 | Proteína não caracterizada | 10 | 7,68 | Não |
| X0C4X7 | Proteína não caracterizada | 20 | 5,47 | Sim |
| X0C517 | Proteína não caracterizada | 34 | 5,47 | Não |
| X0CC99 | Proteína não caracterizada | 63 | 6,15 | Não |
| X0CYT3 | Proteína não caracterizada | 94 | 8,6 | Sim |

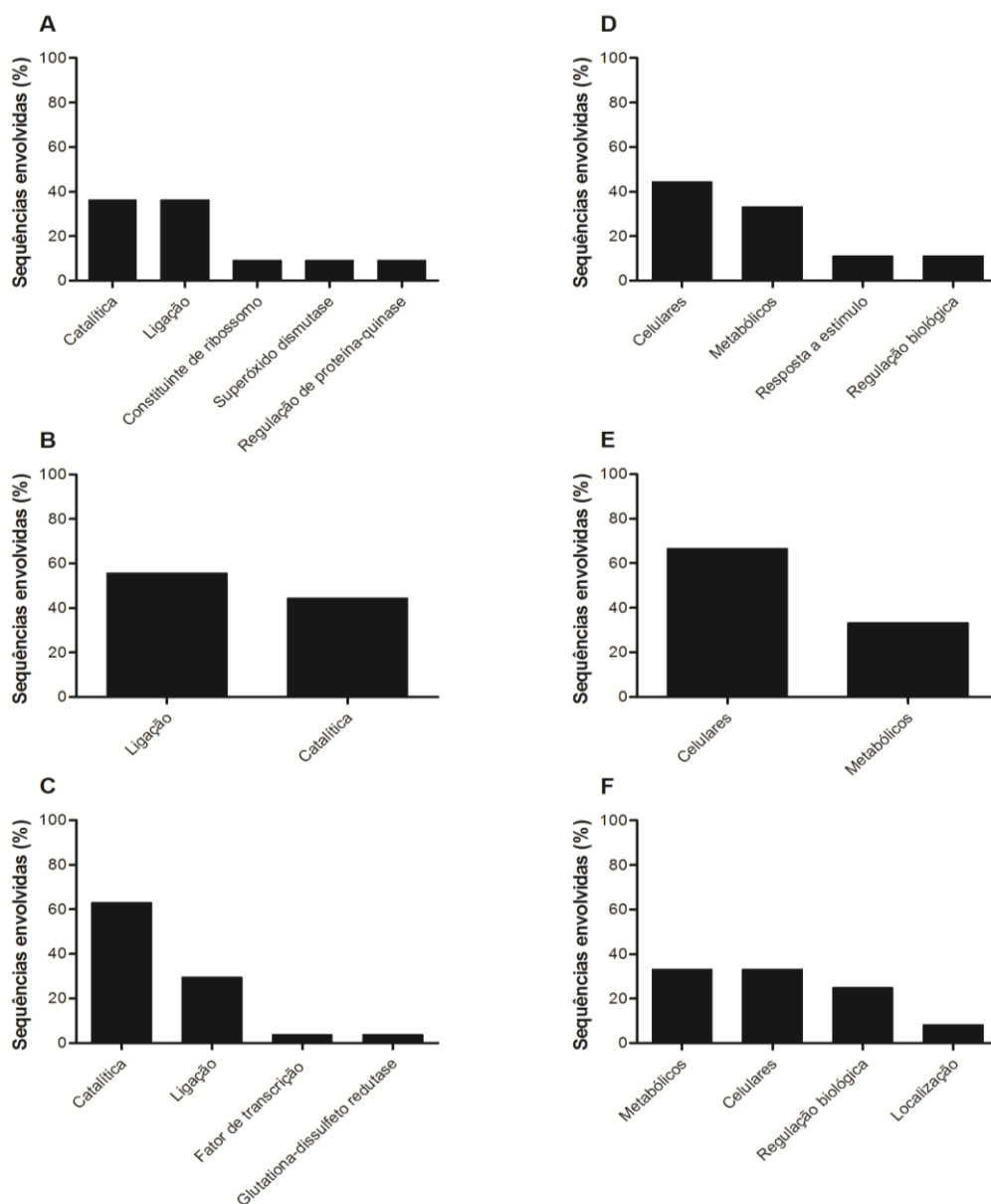
*Todas as sequências obtidas estão relacionadas às proteínas do banco de dados proteômicos UP000030663 da espécie *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 54005.

O ponto isoelétrico teórico (pI) foi determinado utilizando a ferramenta disponível em https://web.expasy.org/compute_pi/.

Fonte: Elaborado pela autora.

Para obtenção de informações sobre as funções moleculares e processos biológicos dos grupos de proteínas identificadas, a anotação de *Gene Ontology* foram feitas pelo *website* <http://www.uniprot.org/uploadlists/>. As informações geradas foram organizadas em gráficos função molecular (FIGURA 33 A-C) e processos biológicos (FIGURA 33 D-F).

Figura 33 - Funções moleculares e processos biológicos das proteínas identificadas no secretoma de *F. oxysporum*. **(A e D)** identificadas nos secretomas dos cultivos com caseína e farinha de pena; **(B e E)** identificadas no secretoma do cultivo com caseína **(C e F)** identificadas no secretoma do cultivo com farinha de pena



Fonte: Elaborado pela autora.

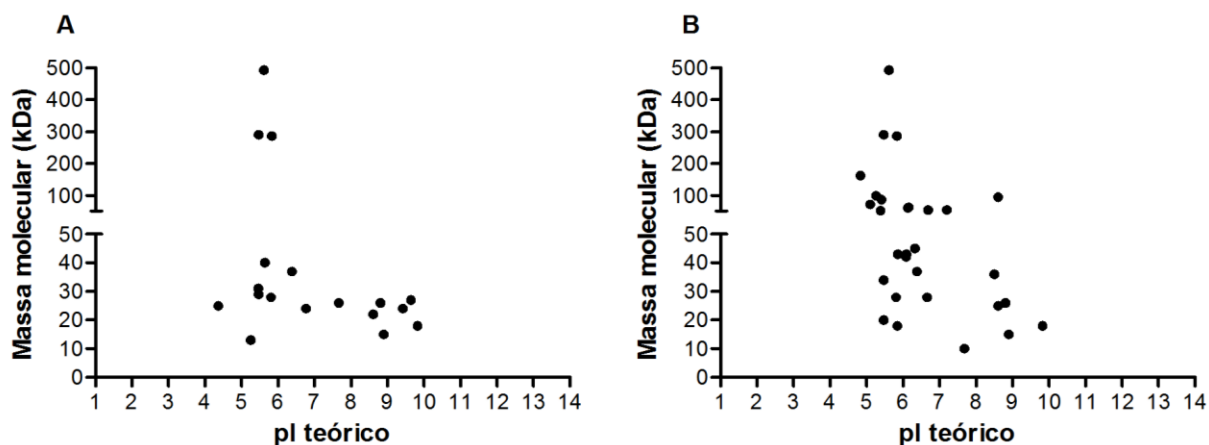
A maior porcentagem das proteínas identificadas, nos secretomas dos cultivos com caseína e farinha de pena, apresentou como principais funções moleculares: as atividades catalítica e de ligação. Além disso, a maior porcentagem das proteínas identificadas nos secretomas dos cultivos com caseína e farinha de pena está envolvida em processos biológicos celulares e metabólicos.

De modo mais específico, as atividades catalíticas foram determinadas para as proteínas comuns aos dois cultivos (50% hidrolases, 25% transferase e 25% superóxido dismutase); exclusivas do secretoma com caseína (25% oxidoreductase, 25% nuclease, 25% PPI, 25% FBA) e exclusivas do cultivo com farinha de pena (71% hidrolases, 18 % oxidoreductases, 6% glicose-6-fosfato isomerase, 6% transferase).

Análises utilizando o *software* Signal P 4.1 indicou que a proporção de proteínas secretadas entre os grupos foram 37,5% para as proteínas comuns, 40% para as proteínas identificadas no cultivo com caseína e 47,6% para as proteínas identificadas no cultivo com farinha de pena. Os resultados obtidos indicam que a maior parte das proteínas presentes no secretoma não possuía peptídeo sinal.

O ponto isoelétrico teórico (pI) de cada proteína identificada foi determinado utilizando a ferramenta disponível em https://web.expasy.org/compute_pi/. Os pontos isoelétricos teóricos foram correlacionados com as massas moleculares das proteínas identificadas no secretoma (FIGURA 34).

Figura 34 - Correlação entre massa molecular (kDa) e ponto isoelétrico teórico das proteínas identificadas no secretoma de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado em bioprocessamento submerso com 1% (m/v) de caseína (A) ou farinha de pena (B)



O ponto isoelétrico teórico (pI) foi determinado utilizando a ferramenta disponível em https://web.expasy.org/compute_pi/.

Fonte: Elaborado pela autora.

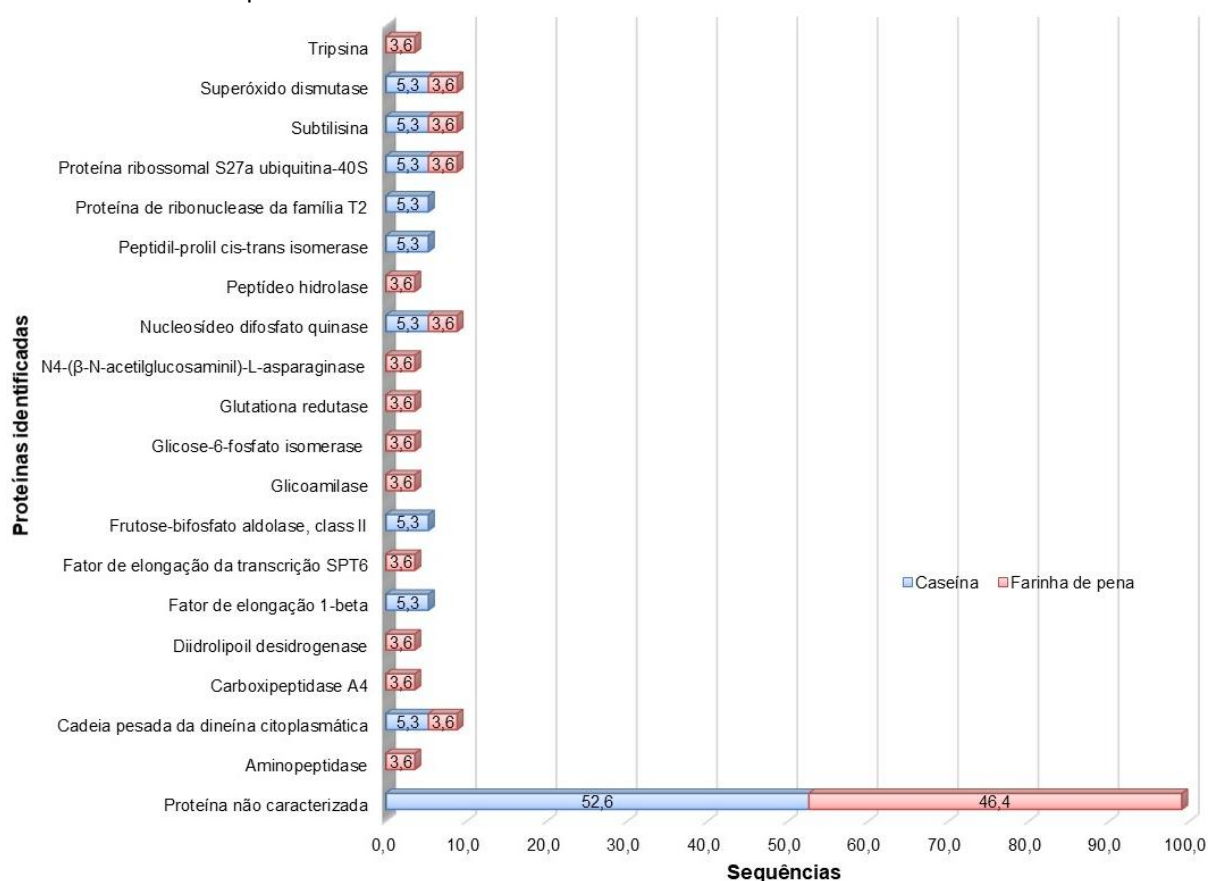
A maior parte das proteínas identificadas no secretoma de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com caseína (FIGURA 34 A) possui pI teóricos distribuídos entre 4 e 10, além disso as massas estão distribuídas entre 10 e 500 kDa, com a maior porcentagem entre 10 e 50 kDa.

Por outro lado, a maior parte das proteínas identificadas no secretoma de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com farinha de pena (FIGURA 34 B) possui pI teóricos distribuídos entre 5 e 10, além disso as massas estão distribuídas entre 10 e 500 kDa, com a maior porcentagem entre 10 e 200 kDa.

A correlação entre pI e massas moleculares das amostras identificadas foram similares entre as proteínas secretadas no cultivo com caseína e farinha de pena, embora os cultivos com caseína e farinha de pena tenham apresentado maiores abrangências em termos de pontos isoelétricos e massas moleculares, respectivamente.

Na FIGURA 35 estão apresentadas a porcentagem de seqüências proteicas identificadas no secretoma dos cultivos com caseína e farinha de pena.

Figura 35 - Distribuição qualitativa das proteínas identificadas nos secretomas dos cultivos com caseína e farinha de pena



Fonte: Elaborado pela autora.

Entre as proteínas identificadas nos secretomas de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com caseína e farinha de pena foram detectadas 10 e 13 proteínas não caracterizadas, respectivamente, que correspondem a cerca de 53 e 46% do total de sequências.

Entre as proteínas comuns aos cultivos com caseína e farinha de pena foram identificadas a cadeia pesada da dineína citoplasmática, proteína ribossomal S27a ubiquitina-40S, nucleosídeo difosfato quinase e superóxido dismutase (SOD).

A cadeia pesada da dineína citoplasmática é de uma proteína motora que está associada aos microtúbulos do citoplasma (INOUE et al., 1998).

As proteínas ribossomal S27a ubiquitina-40S e nucleosídeo difosfato quinase estão envolvidas na biogênese de ribossomos e no metabolismo energético das células, respectivamente (TEICHERT et al., 2006).

A enzima SOD protege contra espécies reativas de oxigênio e está envolvida na desintoxicação por estas moléculas quando são produzidas pelo hospedeiro (WEBER et al., 2012). No cultivo com farinha de pena foi identificada a enzima glutatona redutase que também permite ao microrganismo tolerar o estresse oxidativo (SATO et al., 2011).

Weber e colaboradores (2012) sugeriram que enzimas com estas propriedades estão relacionadas com recuperação celular, defesa e virulência. No cultivo com caseína foi identificada a proteína peptidil-prolil cis-trans isomerase que também está relacionada à resistência e à adaptação ao estresse biótico ou abiótico (KAUR et al., 2015).

No cultivo com caseína também foram identificadas as proteínas de ribonuclease da família T2, fator de alongação 1-beta e frutose-bifosfato aldolase, classe II que atuam como ribonuclease, na biossíntese de proteínas e na via glicolítica, respectivamente.

Thompson e Parker (2009) sugeriram que a RNase Rny1p, pertencente a família de ribonucleases T2, está envolvida na morte celular de *Saccharomyces cerevisiae* mediada em condições de estresse oxidativo.

No cultivo com farinha de pena foram identificadas a proteína fator de alongação da transcrição SPT6, que está envolvida na biossíntese de proteínas; e a proteína diidrolipoamida desidrogenase, componente do complexo de piruvato

desidrogenase e que está envolvida na conversão de piruvato a acetil-CoA (GAO; CHEN; SHI, 2016).

Um dado interessante do secretoma de *F. oxysporum* cultivado com farinha de pena foi que cerca de 1/3 das proteínas identificadas possuem atividade proteolítica: N4-(β -N-acetilglucosaminil)-L-asparaginase, subtilisina, tripsina, carboxipeptidase A4, peptídeo hidrolase e aminopeptidase.

Além disso, no cultivo com farinha de pena também foi identificada uma glicoamilase que está envolvida na hidrólise de polissacarídeos e que possivelmente foi induzida pela composição da farinha de pena.

Assim como no cultivo com caseína, no cultivo com farinha de pena também foi identificada uma proteína envolvida no processo glicolítico, a glicose-6-fosfato isomerase.

A suplementação com caseína e farinha de pena, que são fontes orgânicas e complexas, é condizente com esta observação, uma vez que Weber e colaboradores (2012) sugeriram que a composição do meio, rico em peptídeos e carboidratos, era uma explicação para a presença de enzimas envolvidas na glicólise no secretoma de *Paracoccidioides*.

Entre as proteínas identificadas, algumas estão envolvidas com regulação biológica e resposta a estímulo o que corrobora a hipótese de efeito indutor mediado pelas fontes complexas de nitrogênio.

A elevada participação de hidrolases entre as proteínas identificadas no secretoma de *F. oxysporum* URM 7401, em conjunto com os dados de atividade enzimática, indica que a necessidade obtenção de nutrientes pelo microrganismo induziu a produção de enzimas que favorecessem a hidrólise de caseína e farinha de pena. Além disso, a porcentagem de peptidases identificadas no secretoma com farinha de pena é condizente com a atividade proteolítica detectada.

Assim como nas proteínas intracelulares identificadas, no secretoma também foram detectadas proteínas referentes a mecanismos de resistência ao estresse oxidativo o que indica que a condição de cultivo propicia a formação de ERO.

Neste contexto, também é possível sugerir a ocorrência de morte celular e extravasamento do conteúdo intracelular, o que também justificaria a presença, no secretoma, de proteínas sem peptídeo sinal.

No caso específico de *F. oxysporum* URM 7401, os dados do secretoma também foram analisados com a ferramenta EffectorP que é utilizada para prever possíveis efetores de um fitopatógeno e os dados foram apresentados no APÊNDICE C.

Entre as proteínas com maior probabilidade de atuarem como efetores temos a peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase) e outras proteínas não caracterizadas. Vale ressaltar que a proteína não caracterizada X0CI54, que possui a maior probabilidade, pertence ao *cluster* de uma fitotoxina, ou seja, um efector já conhecido para *Fusarium*.

A presença de efetores da fitopatogenicidade também está relacionada ao potencial de degradação dos fungos, uma vez que a lise da parede celular é a etapa inicial do processo de invasão ao hospedeiro (CARACUEL et al., 2003).

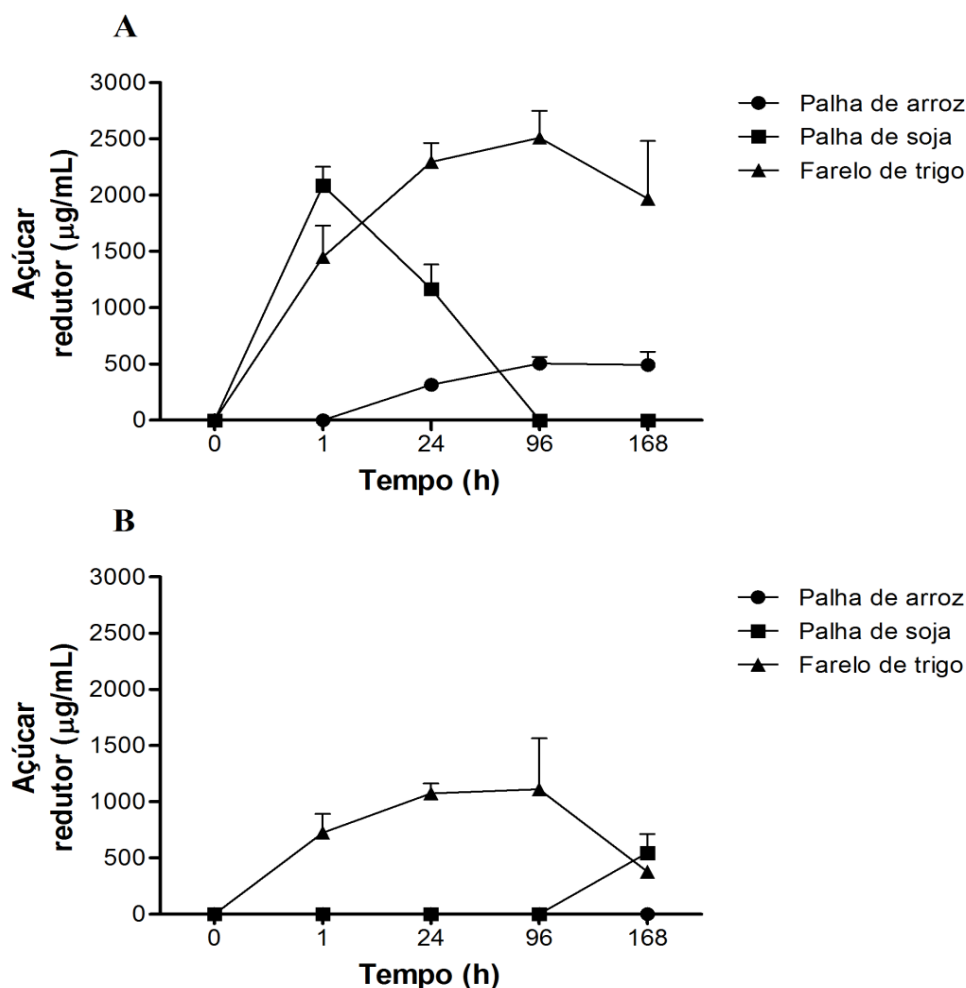
4.6. Degradação de resíduos agroindustriais pela ação do complexo enzimático produzido por *F. oxysporum* URM 7401 em bioprocessamento submerso

A presença de sistemas enzimáticos eficientes para a degradação de lignocelulose já foi descrita para algumas espécies do gênero *Fusarium* (SÁNCHEZ, 2009).

A linhagem *Fusarium oxysporum* URM 7401 produz hidrolases (ROSA-GARZON et al., 2017) que também podem atuar sobre o processo de degradação de biomassa. Além disso, a produção de bioetanol por linhagens de *F. oxysporum* por bioprocessamento consolidado também já foi descrita (ALI et al., 2014).

Para verificar o potencial para degradar biomassa lignocelulósica, os extratos enzimáticos produzidos por *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com fontes de nitrogênio complexas foram incubados com resíduos agroindustriais para a determinação da liberação de açúcares redutores pelo extrato produzido com caseína (FIGURA 36 A) ou com farinha de pena (FIGURA 36 B).

Figura 36 - Perfil de hidrólise de resíduos agroindustriais incubados com extratos enzimáticos induzidos por fontes de nitrogênio complexas. Liberação de açúcares redutores por extrato: **(A)** caseína, **(B)** farinha de pena.



O valor da absorbância das amostras controle (enzima inativada) foi descontado para a determinação da quantidade de açúcares redutores. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média \pm desvio padrão.

Fonte: Elaborado pela autora.

O extrato produzido com caseína obteve um acumulado máximo de liberação de açúcares redutores de 500, 2100 e 2500 $\mu\text{g/mL}$ para palha de arroz, palha de soja e farelo de trigo, respectivamente. Embora o acumulado de açúcares redutores tenha sido maior com farelo de trigo, é possível observar que no tempo de 1 h de incubação, a palha de soja apresentou taxa de liberação 1,4 vezes maior que o farelo de trigo (FIGURA 36 A).

O extrato produzido com farinha de pena obteve um acumulado máximo de liberação de açúcares redutores de 540 e 1100 $\mu\text{g/mL}$ para palha de soja e farelo de trigo, respectivamente. Além disso, nos tempos de incubação avaliados, a palha de arroz foi resistente à ação enzimática do extrato (FIGURA 36 B).

De modo geral, os dois extratos apresentaram melhor desempenho na degradação do farelo de trigo, entretanto o extrato produzido com caseína liberou uma quantidade de açúcares redutores pelo menos 2 vezes maior em relação ao extrato produzido com farinha de pena.

Além disso, baseado no perfil de liberação de açúcares redutores, o farelo de trigo apresentou elevada taxa de hidrólise em um período curto de incubação (1 h) com os dois extratos utilizados. Já a palha de soja apresentou a maior taxa de hidrólise com 1 h de incubação com o extrato produzido com caseína (FIGURA 36 A) enquanto que com o extrato produzido com farinha de pena a maior taxa de hidrólise só foi obtida após 168 h de incubação (FIGURA 36 B).

Os resíduos agroindustriais utilizados neste ensaio de degradação apresentam variações nas proporções dos seus componentes; e a composição lignocelulósica tem sido apontada como um fator limitante na conversão de lignocelulose em açúcares (SANTOS et al., 2016).

O farelo de trigo apresenta em sua composição cerca de 19% de amido, 18% de proteínas, 6% de lignina, 7% de celulose, 29% de hemiceluloses (como por exemplo arabinoxilana e β -(1,3)/ β -(1,4)-glucana) (MERALI et al., 2015). A composição da palha de arroz é de 37% de celulose, 23% de hemiceluloses e 14% de lignina (RAVEENDRAN; GANESH; KHILAR, 1995); enquanto que a composição da palha de soja é cerca de 40% de celulose, 23% de hemiceluloses e 13% de lignina (MARTELLI-TOSI et al., 2016).

A análise comparativa da composição destes resíduos agroindustriais sugere que o elevado percentual de amido, na composição do farelo de trigo, seja uma justificativa para a maior liberação de açúcares redutores, devido a sua hidrólise facilitada. A detecção de amilase nos extratos produzidos com caseína e farinha de (FIGURA 31) corrobora com este fato. Por outro lado, as porcentagens de celulose e lignina, presentes nas palhas de arroz e soja, sugerem que estes materiais são mais resistentes à degradação.

A análise comparativa da liberação de açúcares redutores indica que o extrato produzido com caseína apresentou melhor desempenho na degradação dos resíduos agroindustriais: palha de arroz, palha de soja e farelo de trigo.

A menor eficiência observada no extrato produzido com farinha de pena pode ser justificado pela composição de seu coquetel enzimático. O extrato produzido

com farinha de pena mostrou altos níveis de atividade proteolítica (cerca de 600 U/mL) e pode ter levado à hidrólise das demais enzimas, durante o processo de degradação da biomassa.

Além da atividade proteolítica, a elevada porcentagem de peptidases identificadas; por espectrometria de massas, no secretoma de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com farinha de pena (TABELA 8), corrobora esta hipótese. Estes resultados mostram a importância de se avaliar a secreção de peptidases em extratos, que podem ser obtidos pelos diferentes tipos de bioprocessos com fungos filamentosos.

A estabilização do nível de açúcares redutores acumulado, após 24 h de incubação, pode ser um reflexo da degradação enzimática mediada pelas peptidases do extrato. Outro fator que pode justificar este dado é o acúmulo de produtos de degradação da biomassa lignocelulósica, que possuam efeito inibidor sobre as enzimas presentes nos extratos.

Algumas hidrolases são inibidas por seus produtos, como por exemplo, glicose e celobiose, além disso, outros produtos da degradação de celulose, hemicelulose e lignina também podem inibir a ação enzimática (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013).

Além da ação de enzimas hidrolíticas, a presença de enzimas oxidativas é fundamental para a degradação da lignina presente na parede celular de plantas. No secretoma não foram identificadas enzimas diretamente relacionadas ao processo de delignificação, entretanto a presença de SOD é um bom indicador, pois esta enzima está envolvida na produção de peróxido e alguns estudos já relataram a delignificação mediada por peroxidases na presença de H₂O₂ (CANILHA et al., 2012).

F. oxysporum URM 7401 produz hidrolases com potencial de degradação de biomassa, no cultivo com fontes complexas de nitrogênio. Além disso, o proteoma intracelular, obtido nestas condições, sugere que o microrganismo apresentou um crescimento celular associado a uma série de rotas metabólicas.

Entre estas rotas, a via das fosfopentoses (PPP) ganha um destaque especial, pois tem sido utilizada para otimizar a produção de bioetanol (VILELA et al., 2015; ANASONTZIS et al., 2016). A PPP possui enzimas fundamentais para o

uso de monossacarídeos, como açúcar fermentescível, na produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (ANASONTZIS et al., 2016).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o organismo modelo para a fermentação de glicose, entretanto a ineficiência enzimática, da sua via das fosfopentoses, impossibilita a utilização de xilose em processos fermentativos. Este problema colocou o fungo filamentoso *F. oxysporum* em evidência, pela capacidade de produzir enzimas que degradam biomassa e de utilizar glicose e xilose como substratos fermentescíveis (ANASONTZIS et al., 2014).

No estudo com outra espécie de *Fusarium*, a presença de xilanases e pectinases melhorou a sacarificação da palha de trigo (RAVALASON et al., 2012). Em outro estudo também já foi relatado que *F. oxysporum* é capaz de fermentar pentoses (xilose) e hexoses (glicose). Outra vantagem apontada foi a maior tolerância aos subprodutos (açúcares e álcool); o que permite a ocorrência da fermentação por mais tempo sem inibição (SINGH; KUMAR, 1991).

A presença de enzimas da via das fosfopentoses, a secreção de um coquetel enzimático complexo e a capacidade de degradação de resíduos agroindustriais lignocelulósicos são aspectos relevantes para justificar o potencial de *F. oxysporum* URM 7401 na produção de bioetanol, de modo ecológico e sustentável, uma vez que a hidrólise enzimática e a sacarificação da celulose são etapas essenciais deste processo.

4.7. Parâmetros de cultivo do bioprocessamento sólido com *M. thermophila* utilizando resíduos agroindustriais

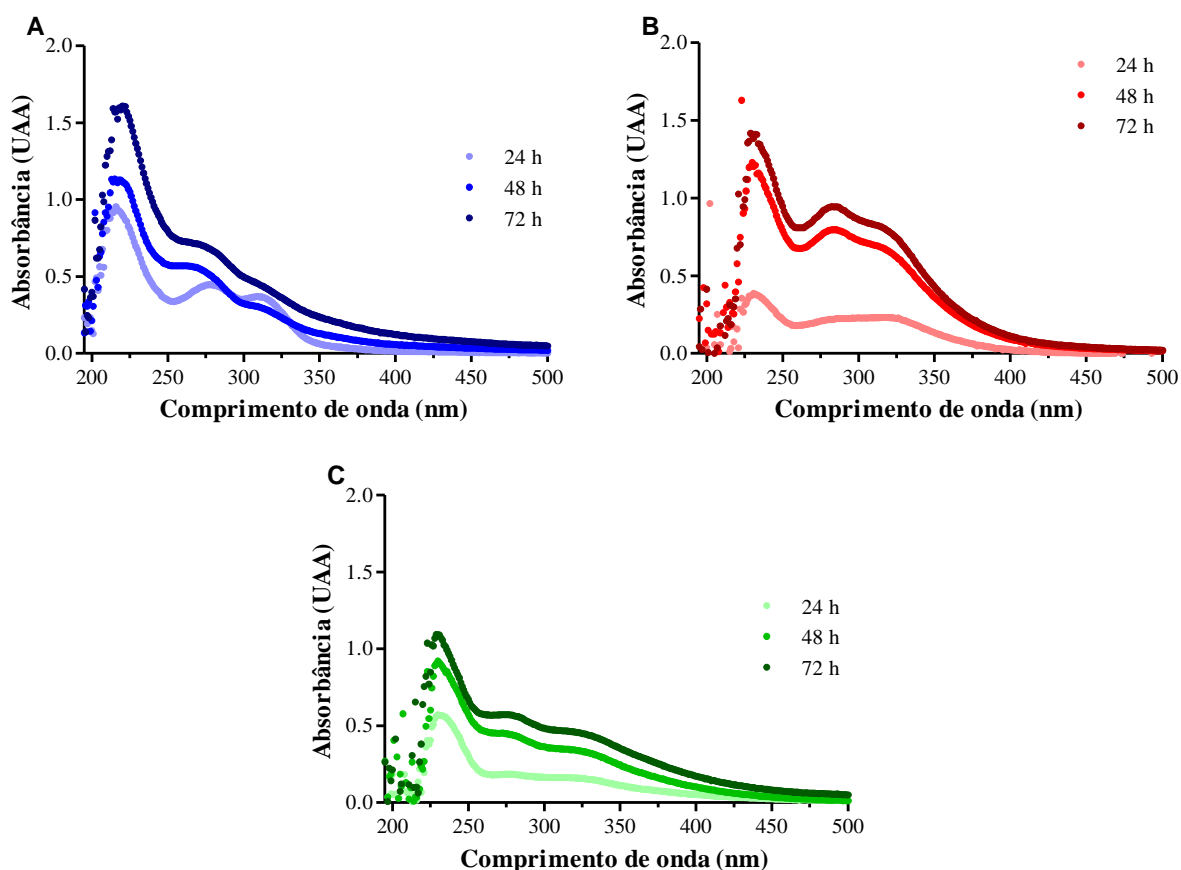
M. thermophila é um fungo termofílico capaz de produzir enzimas envolvidas na hidrólise de biomassa lignocelulósica e outras moléculas com potencial biotecnológico (SINGH, 2016).

Para avaliar o efeito do resíduo agroindustrial sobre a resposta de *M. thermophila* em bioprocessamento sólido, os extratos obtidos foram utilizados para determinar o padrão de absorvância, variação de pH durante o cultivo, a liberação de açúcares redutores e a produção de enzimas.

O espectro de absorção do material extraído dos cultivos com resíduos agroindustriais foi um dos parâmetros do bioprocessamento sólido avaliado. Para eliminar

as alterações nas absorvâncias, mediadas pelo tempo e temperatura dos cultivos, o espectro de absorção, obtido na varredura de 195 a 500 nm, foi corrigido da seguinte forma: *Padrão de absorvância (Abs) = Abs com inóculo – Abs sem inóculo* (FIGURA 37).

Figura 37 - Padrão de absorvância do material secretado por *M. thermophila* após 24, 48 e 72 h de bioprocessamento sólido, obtido por escaneamento por comprimento de onda na faixa de 195 a 500 nm. **(A)** farelo de trigo; **(B)** palha de arroz e **(C)** palha de soja



O material foi extraído utilizando água ultrapura. As amostras 24 h, 48 h e 72 h correspondem ao material extraído do resíduo agroindustrial cultivado com *M. thermophila*, nos respectivos tempos. Para a determinação do perfil de absorvância, foi descontada a absorvância do material extraído do resíduo agroindustrial cultivado sem o fungo, nos respectivos tempos.

Fonte: Elaborado pela autora.

O perfil de absorvância das amostras obtidas do bioprocessamento sólido com *M. thermophila* em farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja é um indicativo da interação de *M. thermophila* com os resíduos agroindustriais.

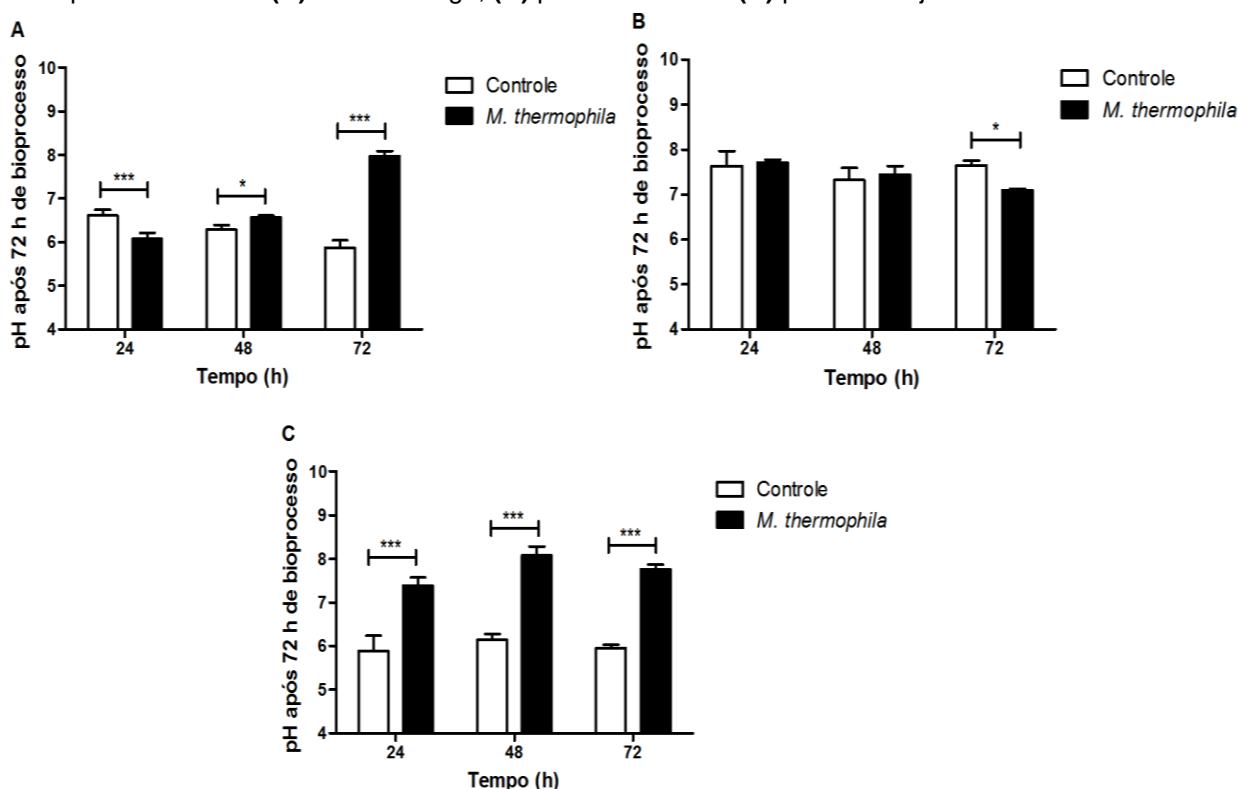
A variação da absorvância pode ser resultado tanto da secreção de moléculas (por exemplo, enzimas e outras proteínas) pelo microrganismo, quanto da modificação de compostos presentes na biomassa lignocelulósica.

A variação no perfil de absorvância também está atrelada ao tempo de cultivo, pois todos os cultivos apresentaram um incremento na absorção (195 a 500 nm) e quanto maior o tempo de cultivo maior a absorção.

A análise individual dos cultivos sugere que a maior absorção foi detectada entre 200 e 250 nm, entretanto os padrões de absorção entre 250 e 400 nm foram específicos de cada substrato utilizado. Esta observação pode ser reflexo do material secretado por *M. thermophila*, assim como dos produtos liberados, pela ação sobre os resíduos agroindustriais; e pela própria composição destes resíduos.

Outro parâmetro do bioprocessamento sólido avaliado foi a variação de pH durante os cultivos com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja (FIGURA 38).

Figura 38 - pH do cultivo após extração do material secretado por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocessamento sólido. (A) farelo de trigo; (B) palha de arroz e (C) palha de soja



O material foi extraído utilizando água ultrapura. O controle corresponde ao resíduo agroindustrial cultivado sem o fungo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média \pm desvio padrão.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os microrganismos são capazes de regular o pH ambiental de modo ativo, para isso secretam moléculas com características ácidas ou alcalinas. De modo geral, a acidificação é promovida pela secreção de ácidos orgânicos, pela remoção de íons de sulfato de amônio e também pela excreção de H^+ . Já a alcalinização é

um processo mediado por amônia, um subproduto do metabolismo de proteínas e aminoácidos (VYLKOVA et al., 2017).

No bioprocesso sólido com farelo de trigo (FIGURA 38 A), o pH do controle foi reduzindo gradativamente com o tempo de cultivo: pH 6,61; 6,28 e 5,87 em 24, 48 e 72 h, respectivamente, o que indica que esta variação não é referente à ação do microrganismo.

A presença de *M. thermophila* levou ao aumento do pH do cultivo e a maior variação de pH, em relação aos cultivos controle, foi obtida em 72 h de bioprocesso e correspondeu a 2 unidades de pH. A presença de proteínas no farelo de trigo (TABELA 2) pode justificar a alcalinização observada no bioprocesso.

Os cultivos controles (sem inóculos) em palha de arroz (FIGURA 38 B) e em palha de soja (FIGURA 38 C) não apresentaram alteração de pH durante o cultivo, e o pH médio foi de $7,54 \pm 0,19$ e $5,99 \pm 0,13$, respectivamente.

Por outro lado, no bioprocesso sólido com palha de arroz (FIGURA 38 B), a ação de *M. thermophila* proporcionou a acidificação do meio, após 72 h de cultivo. Já no bioprocesso sólido com palha de soja (FIGURA 38 C) ocorreu um aumento do pH durante o período de cultivo (24, 48 e 72 h).

A acidificação ou alcalinização dos meios de cultivos, nos bioprocessos com palha de arroz ou soja, respectivamente, podem ser reflexo dos mecanismos anteriormente descritos (VYLKOVA et al., 2017), entretanto já foi relatado que a elevada disponibilidade de glicose também pode promover a acidificação (BI et al., 2016).

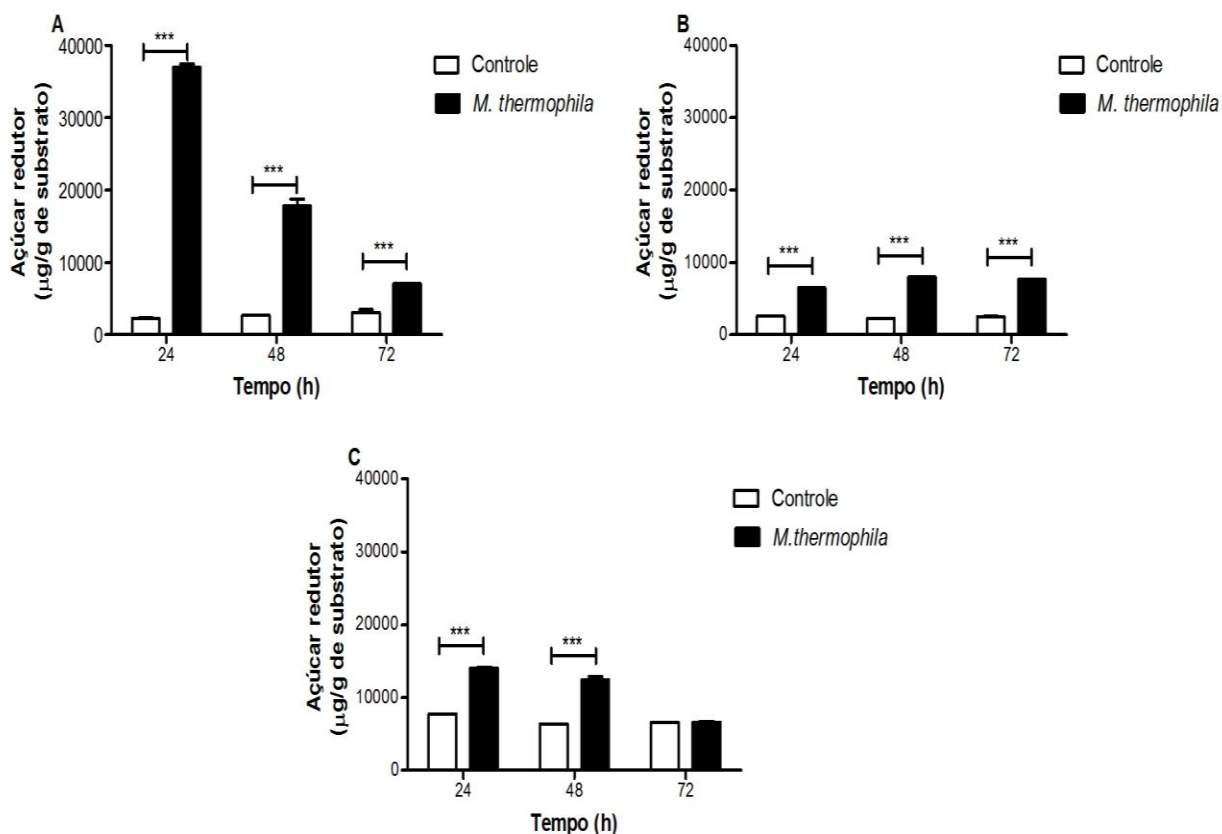
A liberação de açúcares redutores, no bioprocesso com palha de arroz (FIGURA 39 B), pode favorecer a acidificação do cultivo, entretanto é possível que outros fatores não identificados estão associados, já que níveis similares de açúcares no cultivo com farelo de trigo (72 h) não apresentou o mesmo comportamento. A alcalinização do bioprocesso com palha de soja, além dos mecanismos já relatados, pode ser uma associação do material secretado por *M. thermophila* e do próprio resíduo agroindustrial.

O pH extracelular é um importante parâmetro sobre a produção de enzimas. Um estudo recente com *Trichoderma reesei* mostrou que a expressão de genes envolvidos na produção de enzimas de degradação de celulose e hemicelulose é diretamente afetada pelo pH (HÄKKINEN et al., 2015). Adicionalmente, outros

autores mostraram que o controle do pH também está relacionado ao sucesso da sacarificação, possivelmente por favorecer a ação de enzimas importantes para o processo (LA TORRE et al., 2017).

Outro parâmetro do cultivo em bioprocesso sólido avaliado foi a liberação de açúcares redutores durante o cultivo (FIGURA 39).

Figura 39 - Liberação de açúcares redutores presente no material secretado por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido. **(A)** farelo de trigo; **(B)** palha de arroz e **(C)** palha de soja.



O material foi extraído utilizando água ultrapura. O controle corresponde ao resíduo agroindustrial cultivado sem o fungo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média \pm desvio padrão.

Fonte: Elaborado pela autora.

O bioprocesso sólido ocorre na ausência de água livre e o microrganismo é mantido em contato com o resíduo agroindustrial. Por esse motivo, a detecção de açúcares redutores é um indicativo da ocorrência de sacarificação dos resíduos agroindustriais (RAMANJANEYULU; REDDY, 2016), pela ação do microrganismo *M. thermophila*.

A análise da liberação de açúcares redutores do cultivo controle (sem inóculo) busca eliminar o efeito do tempo e temperatura de cultivo. Na análise da da FIGURA 39 A, a maior liberação de açúcares redutores, observada no cultivo com farelo de

trigo, atingiu cerca de 37000 µg/g de substrato, em 24 h de bioprocesso; e posteriormente foi gradativamente reduzida.

No caso da palha de arroz (FIGURA 39 B) a maior liberação de açúcares redutores ocorreu em 48 h e atingiu cerca de 8000 µg/g de substrato. O padrão de liberação de açúcares redutores da palha de soja (FIGURA 39 C) foi similar ao do farelo de trigo, entretanto os valores absolutos foram menores e a maior liberação atingiu cerca de 14000 µg/g de substrato, em 24 h de bioprocesso.

A redução dos níveis de açúcares redutores durante o cultivo pode ser relacionada ao consumo de glicose, por exemplo, pelo microrganismo. A concentração de açúcares redutores também pode ser uma medida indireta da ocorrência de exaustão do substrato; ou da presença de inibidores gerados pela degradação de celulose, hemicelulose e lignina (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013).

Os parâmetros dos bioprocessos sólidos, anteriormente apresentados, são indicativos da ação de *M. thermophila* e do processo de degradação enzimática de resíduos agroindustriais. A utilização destes compostos lignocelulósicos é desafiadora devido à recalcitrância da composição principal dos polissacarídeos de parede celular: celulose, hemicelulose e pectina, além da presença de lignina associada a estas estruturas (GLASS et al., 2013) e de outros componentes.

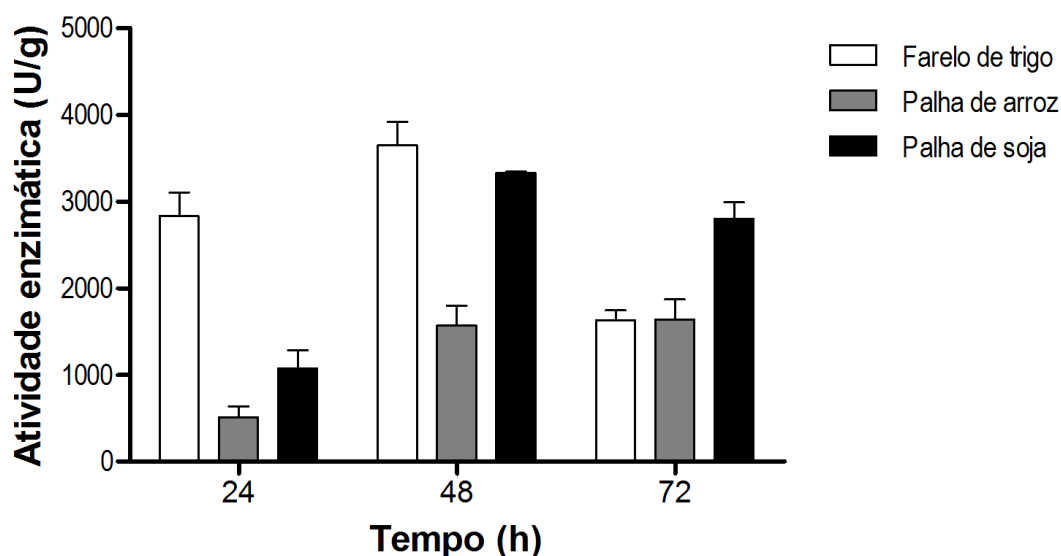
4.8. Produção de enzimas por *M. thermophila* em bioprocesso sólido

Na ausência de glicose, a presença de componentes de biomassa lignocelulósica promove a alteração o perfil metabólico do microrganismo pela ação de fatores de transcrição. O fator conhecido como CreA controla a transcrição de genes envolvidos na degradação de biomassa, como por exemplo, as enzimas lignocelulolíticas, além de genes envolvidos na utilização dos produtos gerados (BENOCCI et al., 2017).

Adicionalmente, análises gênicas já demonstraram que *M. thermophila* possui um grande número de genes que codificam enzima com potencial industrial: enzimas ativas sobre carboidratos (CAZy), peptidases, oxidorreduções e lipases, entre outras (KARNAOURI et al., 2014).

Além disso, a capacidade de secretar uma variedade de enzimas permite ao microrganismo *M. thermophila* crescer sobre substratos com composições variadas (SINGH, 2016). As atividades enzimáticas de peptidase e lipase, que foram induzidas durante o bioprocessamento sólido com resíduos agroindustriais, estão apresentadas nas FIGURAS 40 e 41.

Figura 40 - Perfil de produção de peptidase por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocessamento sólido com os resíduos agroindustriais: farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja



Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média \pm desvio padrão. Análise estatística: Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pela autora.

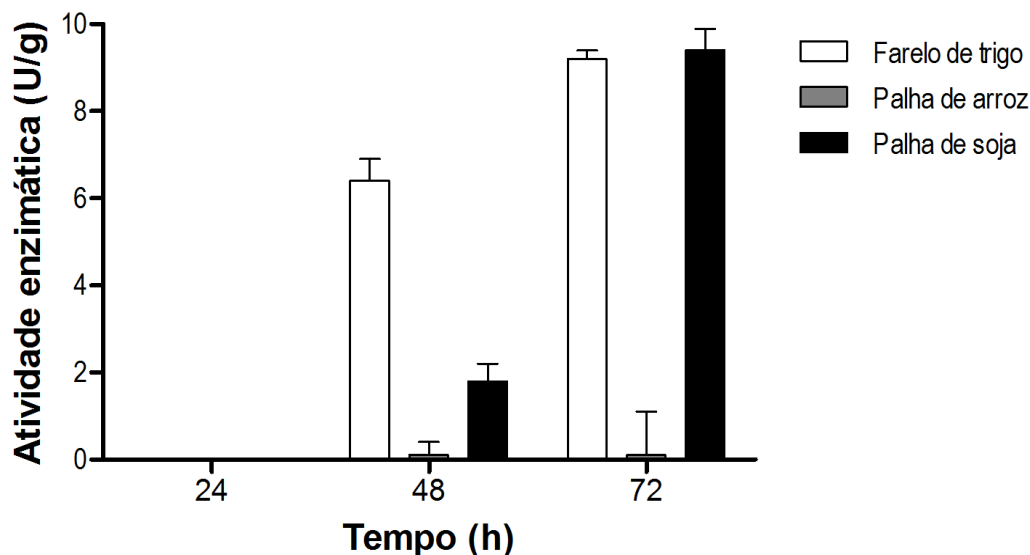
As análises estatísticas mostraram que as maiores produções de peptidases foram obtidas nos cultivos com farelo de trigo (cerca de 3600 U/g) e palha de soja (cerca de 3300 U/g), em 48 h de bioprocessamento. No cultivo com palha de arroz, a máxima atividade, obtida em 48 h de bioprocessamento, foi cerca de 1500 U/g.

Fungos filamentosos são conhecidos pela capacidade de produzir peptidases e secretá-las para a obtenção de nutrientes (VAN DEN HOMBERGH et al., 1997), entretanto em fungos fitopatogênicos estas peptidases podem atuar sobre a membrana plasmática da célula e aumentar a sua permeabilidade celular, durante o processo patológico (CHANDRASEKARAN et al., 2016).

Zanphorlin e colaboradores (2010) identificaram a produção de peptidase alcalina em bioprocessamento sólido com farelo de trigo e caseína e obtiveram cerca de 1,8 U/mL após 80 h de cultivo a 45 °C. Em outro estudo foi caracterizada uma

peptidase neutra (NETO et al., 2015) produzida em bioprocesso submerso que possui potencial colagenolítico (HAMIN NETO et al., 2017).

Figura 41 - Perfil de produção de lipase por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido com os resíduos agroindustriais: farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja



Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média \pm desvio padrão. Análise estatística: Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pela autora.

As maiores produções de lipase foram obtidas nos cultivos com farelo de trigo e palha de soja, em 72 h de cultivo, e atingiram cerca de 9 e 9,5 U/g, respectivamente (FIGURA 41).

As condições utilizadas neste estudo foram favoráveis à secreção de lipases, uma vez que após estudos de otimização em bioprocesso sólido com bagaço de cana de açúcar, sacarose, nitrato de amônio e óleo de oliva, a produção de lipase por *Myceliophthora* sp. atingiu cerca de 20 U/mL, em 168 h de cultivo (BONINE, 2014). Diversos autores têm utilizado resíduos agroindustriais para a produção de lipases por fungos filamentosos, em bioprocessos sólido e submerso, entretanto as produções são extremamente variáveis e dependentes das características do resíduo utilizado, assim como do tipo de processo (SALIHU et al., 2012).

Peptidases e lipases podem ser exploradas em estudos futuros em uma nova vertente de pesquisas sobre o potencial de *M. thermophila*, uma vez que estas

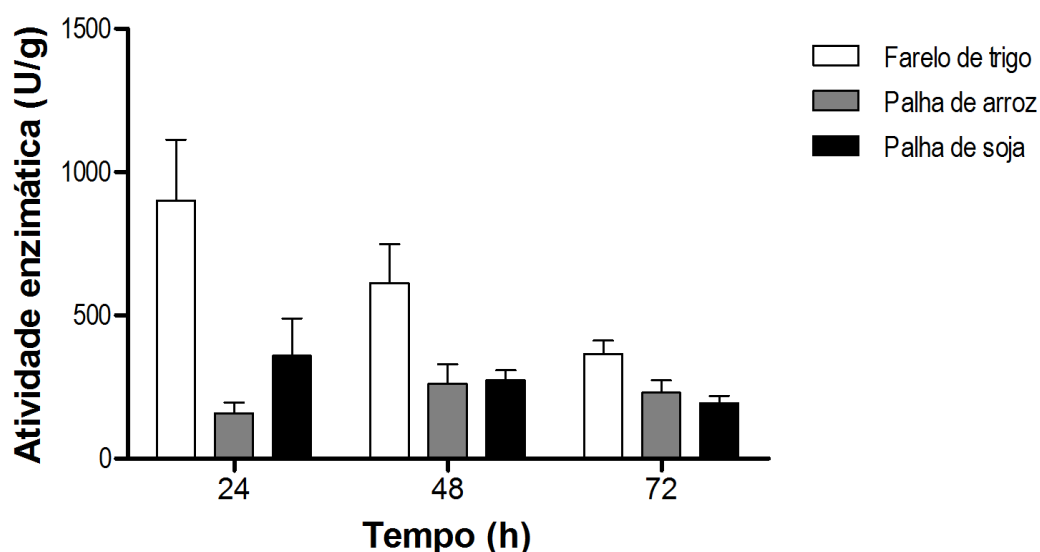
enzimas possuem uma série de aplicações biotecnológicas nos mais diversos setores industriais (SALIHU et al., 2012).

Embora sejam relevantes, as produções de lipases e de peptidases pelo gênero *Myceliophthora* não são tão exploradas. Uma possível justificativa é o destaque deste microrganismo pelas de centenas de sequências de enzimas que degradam parede celular de plantas, principalmente, glicosil hidrolase (GH) e polissacarídeo liase (PL) (KARNAOURI et al., 2014).

As glicosil hidrolases, também conhecidas como glicosidades, hidrolisam ligações glicosídicas, sendo assim, suas atividades enzimáticas estão relacionadas à degradação de constituintes da parede celular vegetal: celulose (atividades de CMCCase, FPase e β -glicosidase); hemicelulose (atividade de xilanase) e pectina (pectinase). Além disso, a atividade de amilase reflete a ação sobre o amido que é um polissacarídeo de reserva.

Neste contexto, a seguir estão apresentadas as atividades enzimáticas de CMCCase (FIGURA 42), FPase (FIGURA 43), β -glicosidase (FIGURA 44), xilanase (FIGURA 45), pectinase (FIGURA 46) e amilase (FIGURA 47), que foram induzidas durante o bioprocessamento sólido com resíduos agroindustriais.

Figura 42 - Perfil de produção de CMCCase por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocessamento sólido com os resíduos agroindustriais: farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja



Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média \pm desvio padrão. Análise estatística: Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pela autora.

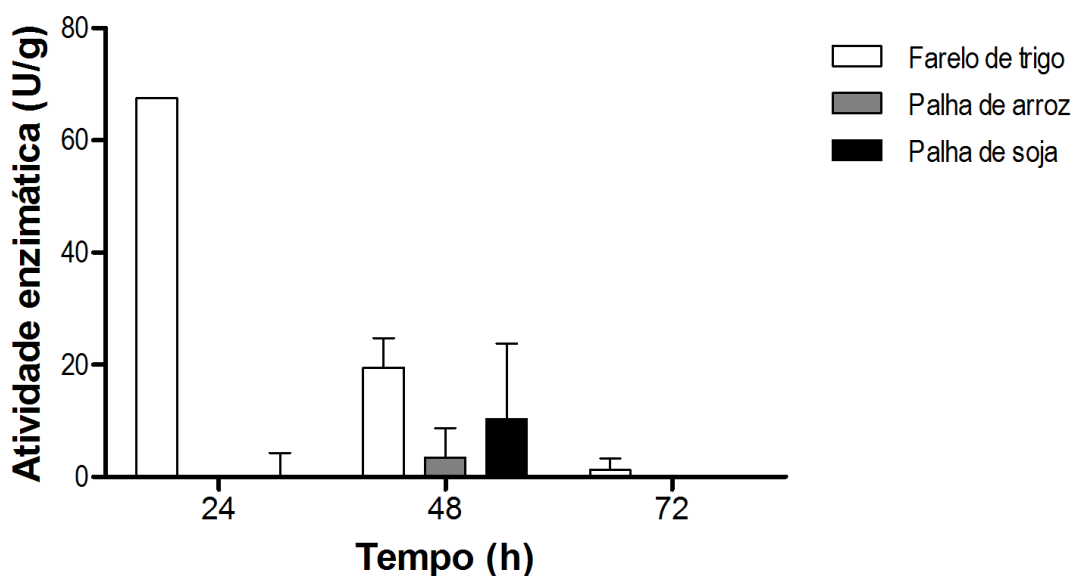
A produção de CMCase foi identificada em todos os cultivos e nos diferentes tempos de bioprocessamento. A maior produção de CMCase foi obtida com farelo de trigo e atingiu cerca de 900 U/g, em 24 h de cultivo. Nos cultivos com palha de arroz e de soja, as atividades máximas foram de 260 (48 h) e 350 (24 h) U/g, respectivamente (FIGURA 42).

Para o fungo filamentososo *Trichoderma virens*, o farelo de trigo também proporcionou as melhores atividades de CMCase e sua produção atingiu cerca de 120 U/g após 72 h (EL-SHISHTAWY et al., 2015).

O tempo de cultivo e o substrato exercem efeito direto sobre produção de enzimas e este mesmo comportamento também foi observado em outros estudos. *Myceliophthora* sp. JCP 1-4 apresentou cerca de 227 U/g quando cultivado em bagaço de cana de açúcar e farinha de soja, após 240 h de bioprocessamento. Este mesmo microrganismo produziu 357 U/g de CMCase após 96 h de bioprocessamento sólido com bagaço de cana e farelo de trigo (PEREIRA et al., 2015).

Por outro lado, neste mesmo meio, bagaço de cana e farelo de trigo, *M. heterothallica* produziu cerca de 1170 U/g de CMCase após 192 h (SILVA et al., 2016).

Figura 43 - Perfil de produção de FPase por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocessamento sólido com os resíduos agroindustriais: farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja



Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média \pm desvio padrão. Análise estatística: Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na FIGURA 43 a máxima atividade de celulases totais, detectada pela atividade em papel filtro (FPase), apresentou o mesmo comportamento que a atividade de CMCase.

No cultivo com farelo de trigo, a maior atividade de FPase foi obtida em 24 h e atingiu cerca de 65 U/g. As maiores atividades de FPase dos cultivos com palha de arroz e soja foram obtidas em 48 h de bioprocessamento e atingiram 3 U/g e 10 U/g, respectivamente.

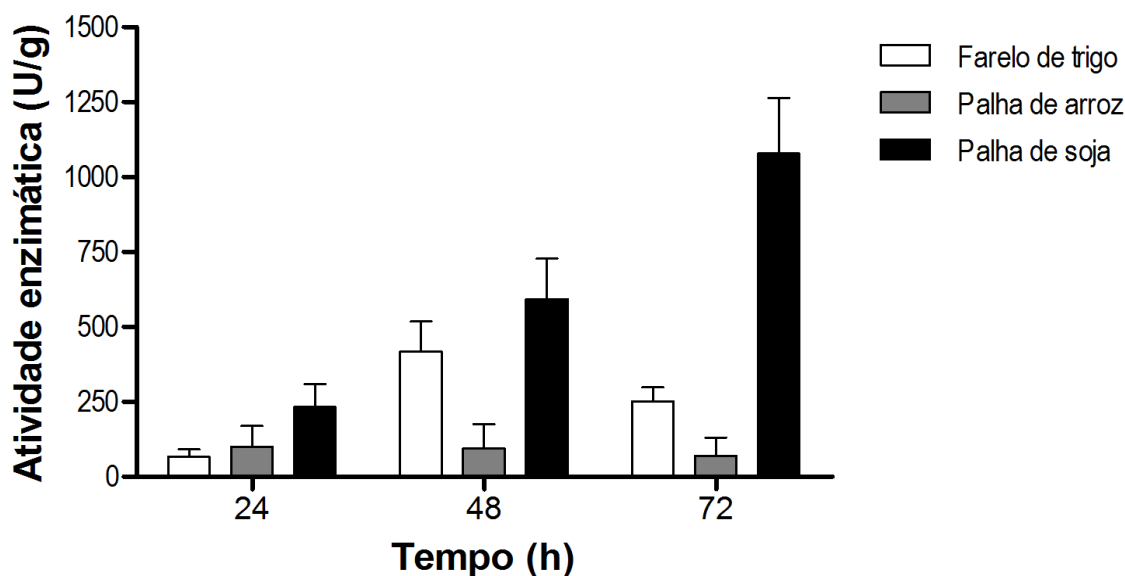
Outras linhagens de *Myceliophthora* apresentaram um desempenho inferior. *M. thermophila* JCP 1-4 e DABM 23/45 em bioprocessamento sólido com bagaço de cana e farelo de trigo produziram cerca de 0,24 U/g de FPase (PEREIRA et al., 2015). Entretanto, o fungo mesofílico *T. virens*, em bioprocessamento sólido com farelo de trigo, apresentou nível similar e atingiu cerca de 50 U/g (EL-SHISHTAWY et al., 2015).

Pereira e colaboradores (2016) também cultivaram *M. thermophila* JCP 1-4 em bioprocessamento sólido, com proporções iguais de bagaço de cana *in natura* e farinha de soja. A produção de FPase atingiu cerca de 10 U/g e a atividade desta enzima também foi monitorada em ensaios de sacarificação.

Os autores relataram a instabilidade desta enzima e, também que, durante a sacarificação de bagaço de cana *in natura* a 50 °C, não houve aumento da atividade de FPase. Por outro lado, durante a sacarificação de bagaço de cana submetido à ozonólise, ocorreu um aumento de cerca de 270 % de atividade, após 48 h de processos a 50 ou 60 °C (PEREIRA et al., 2016). O tratamento prévio do substrato sólido pode auxiliar a ação enzimática.

Nas condições utilizadas neste trabalho, o valor absoluto da produção de FPase, apresentada por *M. thermophila* em farelo de trigo, foi superior, entretanto a redução de atividade durante o cultivo, indica um comportamento similar quanto a sua estabilidade.

Figura 44 - Perfil de produção de β -glicosidase por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido com os resíduos agroindustriais: farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja



Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média \pm desvio padrão. Análise estatística: Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni.

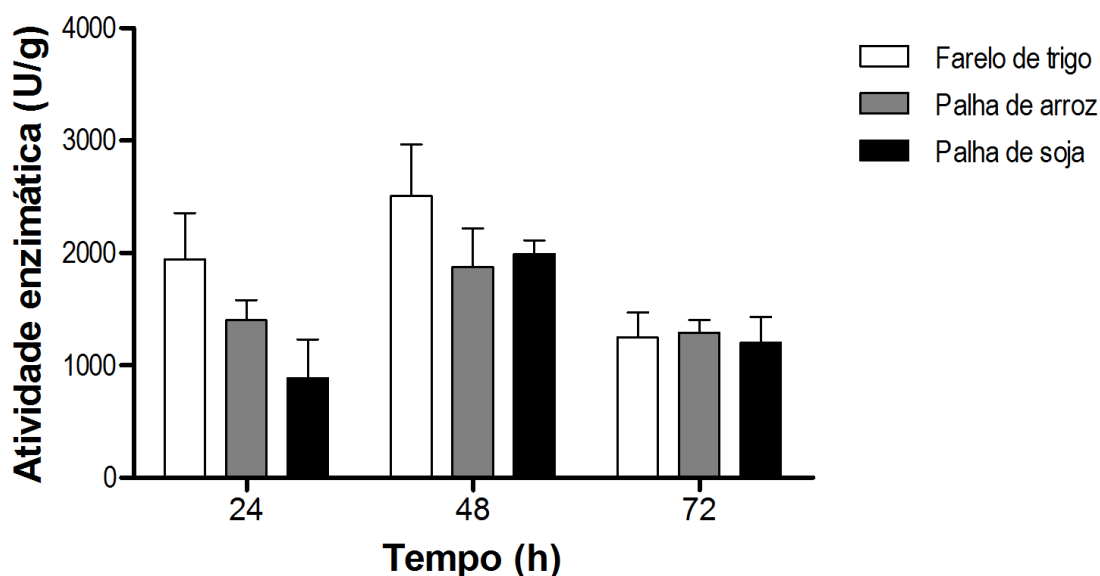
Fonte: Elaborado pela autora.

A produção de β -glicosidase foi maior no cultivo com palha de soja e atingiu cerca de 1000 U/g, em 72 h de bioprocessamento sólido. O farelo de trigo obteve cerca de 390 U/g, em 48 h de cultivo, enquanto que a palha de arroz atingiu cerca de 100 U/g, com 72 h (FIGURA 44).

Pereira e colaboradores (2015) compararam a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por fungos dos gêneros *Myceliophthora*, *Rhizopus* e *Rhizomucor*, que foram cultivados em bioprocessamento sólido com uma mistura de bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo, a 45 °C por 96 h. As maiores produções de β -glicosidase foram obtidas por *Rhizopus* sp. DABM 11/45 e *Myceliophthora* sp. JCP 1-4 e atingiram cerca de 55 e 45 U/g, respectivamente.

Com o mesmo meio de cultivo, *M. heterothallica* produziu cerca de 65 U/g de β -glicosidase, após 288 h de bioprocessamento a 45 °C (SILVA et al., 2016).

Figura 45 - Perfil de produção de xilanase por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido com os resíduos agroindustriais: farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja



Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média \pm desvio padrão. Análise estatística: Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni.

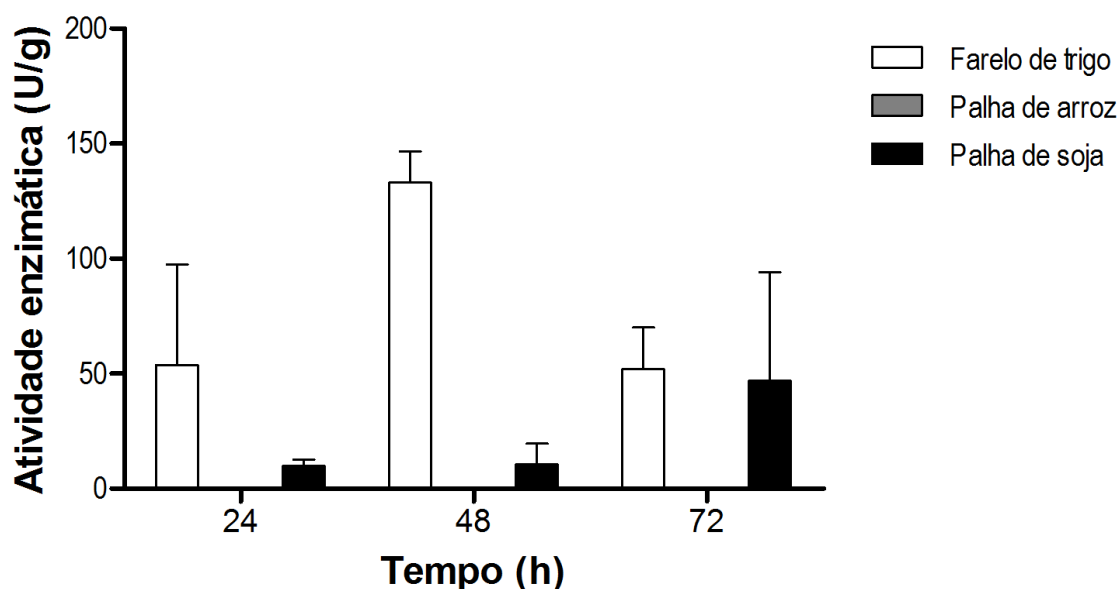
Fonte: Elaborado pela autora.

A atividade de xilanase se comportou de modo mais homogêneo, entre os substratos e os tempos de cultivos. As maiores produções de xilanase foram obtidas nos cultivos com farelo de trigo e palha de soja e atingiram, em 48 h de bioprocessamento, cerca de 2500 e 2000 U/g, respectivamente. No cultivo com palha de arroz, a atividade máxima foi cerca de 1900 U/g, também em 48 h de bioprocessamento (FIGURA 45).

No cultivo com farelo de trigo a 30 °C, o fungo *T. virens* produziu cerca de 350 U/g de xilanase, após 72 h de bioprocessamento (EL-SHISHTAWY et al., 2015).

A produção de elevados níveis de xilanase também já foi relatada para *Myceliophthora* sp. JCP 1-4 e DABM 23/45 que produziram cerca de 712 e 931 U/g de xilanase, respectivamente. O efeito do tempo de cultivo e do substrato também foi observado, uma vez que em bioprocessamento sólido a 45 °C, com bagaço de cana de açúcar e farinha de soja, a produção de xilanase foi de 1138 U/g, após 48 h de bioprocessamento (PEREIRA et al., 2015).

Figura 46 - Perfil de produção de pectinase por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido com os resíduos agroindustriais: farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja.



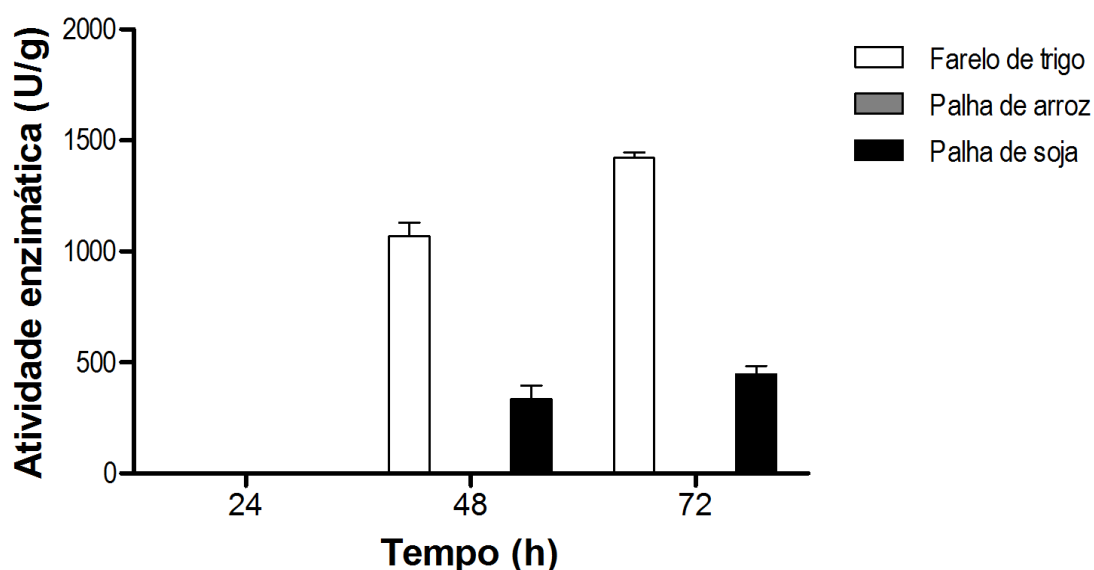
Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média \pm desvio padrão. Análise estatística: Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pela autora.

A atividade pectinolítica foi diferencialmente modulada pelos resíduos agroindustriais. A maior produção de pectinase foi obtida no cultivo com farelo de trigo e atingiu cerca de 130 U/g, equivalente a cerca de 15 U/mL, em 48 h de bioprocessamento. No cultivo com palha de soja, a atividade máxima foi cerca de 40 U/g, em 72 h de bioprocessamento. Nas condições de estudo não foi detectada a atividade de pectinase no cultivo com palha de arroz (FIGURA 46).

Outros estudos mostraram que a produção de pectinases por outros microrganismos foi superior aos níveis apresentados por *M. thermophila*. Martin e colaboradores (2010) utilizaram o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae*, em bioprocessamento sólido com farelo de trigo e bagaço de laranja, e obtiveram 120 U/mL. Além disso, no cultivo com folhas de palmeira, a produção de pectinase por *T. reesei* atingiu cerca de 500 U/g (EL-SHISHTAWY et al., 2015).

Figura 47 - Perfil de produção de amilase por *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido com os resíduos agroindustriais: farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja



Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média \pm desvio padrão. Análise estatística: Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pela autora.

A máxima produção de amilase, cerca de 1400 U/g, foi obtida no cultivo com farelo de trigo, em 72 h de bioprocessamento; e no mesmo tempo de cultivo, a produção de amilase com palha de soja atingiu cerca de 440 U/g. Nas condições do estudo, a palha de arroz não induziu a produção de amilase (FIGURA 47).

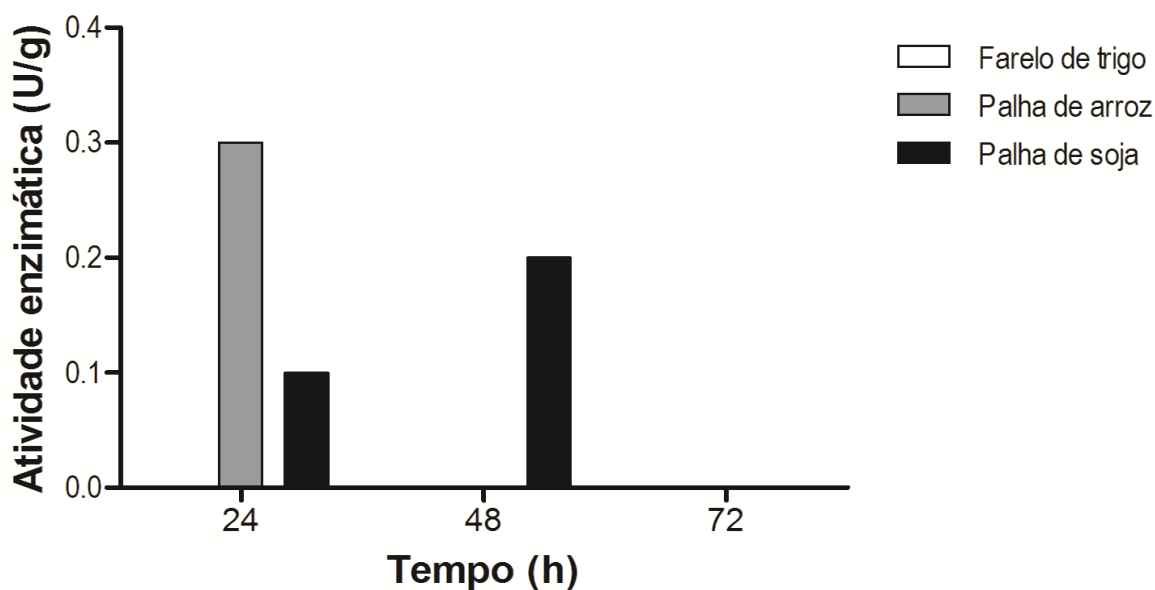
No cultivo com farelo de trigo, as máximas produções de amilase pelos fungos *Lichtheimia ramosa* e *Thermoascus aurantiacus* foram de 417,2 U/g e 144,5 U/g, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2016).

A análise global das atividades enzimáticas de peptidase, lipase, CMCase, FPase, β -glicosidase, xilanase, pectinase e amilase mostra que as condições utilizadas no bioprocessamento sólido com *M. thermophila* foram favoráveis. Além disso, o fungo *M. thermophila* confirmou o potencial apresentado pelas centenas de sequências gênicas relacionadas às enzimas envolvidas na hidrólise de ligação glicosídicas de polissacarídeos (KARNAOURI et al., 2014), entretanto é importante ressaltar que o processo de indução é dependente de uma série de fatores, entre os quais podemos listar os diferentes substratos utilizados (SANTOS et al., 2016).

Neste contexto, o desempenho do farelo de trigo nas atividades enzimáticas avaliadas também pode ser reflexo de sua composição, pois é um substrato rico em proteínas, carboidratos e sais minerais (SILVA et al., 2016).

Na FIGURA 48 está apresentada a atividade de lacase durante o bioprocessamento sólido com resíduos agroindustriais.

Figura 48 - Perfil de produção de lacase presente no secretoma de *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocessamento sólido com os resíduos agroindustriais farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja



Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média \pm desvio padrão. Análise estatística: Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pela autora.

A maior produção de lacase foi obtida com palha de arroz (0,3 U/g) no período inicial do cultivo, equivalente a cerca de 0,03 U/mL, em 24 h de bioprocessamento. No cultivo com palha de soja a maior produção foi cerca de 0,2 U/g, em 48 h de bioprocessamento.

Nas condições do estudo, a produção de lacase não foi identificada no cultivo com farelo de trigo. Também foi observado que, para os cultivos com farelo de trigo e palha de arroz, as máximas produções de peptidase e lacase são negativamente correlacionadas.

Santos e colaboradores (2016) avaliaram a produção de lacase por até 15 dias. No bioprocesso sólido com bagaço de cana de açúcar explodido, a produção máxima de lacase por *M. thermophila* M77, cerca de 0,004 U/mL, foi observada nos tempos iniciais do cultivo. Aqui, também observamos que a máxima produção se deu nos tempos iniciais de cultivo.

Mazumder, Basu e Mukherj (2009) mostraram que cultivos com *Pleurotus ostreatus* obtiveram cerca de 300 U/mL e 150 U/mL de lacase, em bioprocesso sólido e submerso, respectivamente. Além disso, os autores destacaram que no bioprocesso submerso a atividade proteolítica foi a responsável pela redução da atividade de lacase. Embora a produção de lacase por *M. thermophila* tenha sido incisivamente menor, em meio e tempo de cultivos diferentes; a observação acerca do efeito proteolítico corrobora com o que já relatamos anteriormente.

Lacases são enzimas secretadas por alguns fungos e; por catalisar a oxidação de aminas aromáticas, compostos fenólicos, tiols, entre outros, possui ação lignolítica. Por esse motivo, a ação das lacases é tão importante na degradação de compostos lignocelulósicos, já que a lignina é o principal agente de resistência mecânica e biológica (AKPINAR; UREK, 2017).

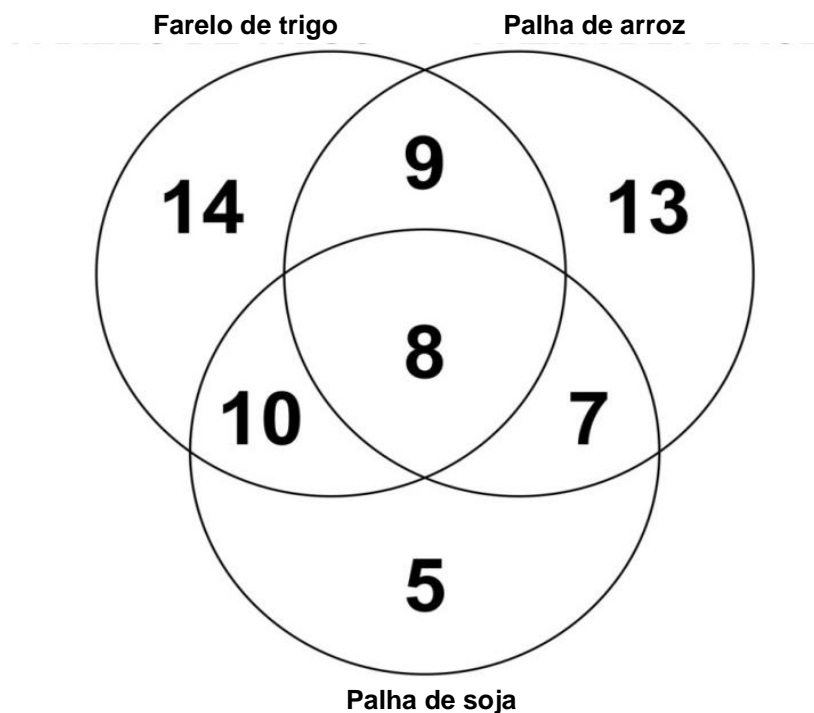
Sendo assim, a menor porcentagem de lignina no farelo de trigo quando comparadas às palhas de arroz e soja também podem justificar o perfil de produção de lacase por *M. thermophila*. A produção de lacase por *M. thermophila* confere um potencial oxidativo, que conjugado ao potencial hidrolítico, dá ao seu arsenal enzimático maior eficiência no que tange o processo de degradação de compostos complexos, como os lignocelulósicos.

4.9. Identificação de proteínas secretadas por *M. thermophila* em bioprocessos sólidos com resíduos agroindustriais

Além da detecção de atividades enzimáticas foi realizado um estudo sobre as proteínas secretadas por *M. thermophila* cultivado em bioprocessos sólidos. Estas proteínas foram adequadamente processadas e analisadas por espectrometria de massas.

No total foram identificadas 66 proteínas considerando todas as condições de cultivo e o padrão de distribuição qualitativo destas proteínas está apresentado na FIGURA 49.

Figura 49 - Diagrama de Venn das amostras de secretoma de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com 1% (m/v) de caseína ou farinha de pena



A distribuição das amostras foi determinada utilizando o software Scaffold versão 4.8.4.

Fonte: Elaborado pela autora.

Pelo diagrama de Venn é possível observar que as condições compartilham de 8 proteínas comuns aos 3 cultivos, 9 proteínas comuns aos cultivos farelo de trigo e palha de arroz, 10 proteínas comuns aos cultivos farelo de trigo e palha de soja, 7 proteínas comuns aos cultivos palha de arroz e palha de soja.

Além disso, dentro das proteínas 14, 13 e 5 foram identificadas exclusivamente nos cultivos com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja, respectivamente.

As proteínas identificadas e as suas características estão apresentadas na TABELA 9 e os dados adicionais sobre as proteínas identificadas estão apresentadas no APÊNDICE D.

Tabela 9 - Lista de proteínas secretadas por *M. thermophila* cultivado em bioprocesso sólido, com os resíduos agroindustriais farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja, identificadas por LC-ESI-MS/MS

| Acesso | Proteína (*) | Massa (kDa) | pl teor. | Peptídeo sinal |
|---|---|--------------------|-----------------|-----------------------|
| Proteínas do secretoma de <i>M. thermophila</i> cultivado em farelo de trigo | | | | |
| G2PZU5 | Alfa-manosidase (EC 3.2.1. -) | 123 | 6,17 | Não |
| G2QGN6 | Beta-xilanase (EC 3.2.1.8) | 42 | 6,42 | Sim |
| G2QLJ3 | Proteína do domínio WSC de ligação a carboidrato | 38 | 4,74 | Sim |
| G2QEK4 | Catalase (EC 1.11.1.6) | 78 | 5,98 | Sim |
| G2QBT1 | Catalase-Peroxidase (CP) (EC 1.11.1.21) | 82 | 5,96 | Não |
| G2Q6I7 | Proteína com domínio da fasciclina | 57 | 5,77 | Sim |
| G2QB71 | Formiato desidrogenase (FDH) (EC 1.2.1.2) (NAD-dependente Formiato desidrogenase) | 40 | 6,15 | Não |
| G2QPQ8 | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.12) | 36 | 6,54 | Não |
| G2QPS0 | Glicosil hidrolase da família 15 (Fragmento) | 67 | 5,07 | Sim |
| G2Q4L9 | Glicosil hidrolase da família 2 | 66 | 5,57 | Sim |
| G2QCQ3 | Glicosil hidrolase da família 3 (EC 3.2.1.21) | 95 | 5,05 | Sim |
| G2QAE3 | Glicosil hidrolase da família 31 | 103 | 6,34 | Sim |
| G2QD40 | Glicosil hidrolase da família 31 | 97 | 5,84 | Não |
| G2QCC8 | Glicosil hidrolase da família 43 | 61 | 4,91 | Sim |
| G2QF48 | Glicosil hidrolase da família 55 (EC 3.2.1.58) | 82 | 5,06 | Sim |
| G2QHM1 | Glicosil hidrolase da família 81 | 91 | 5,76 | Sim |

| Acesso | Proteína (*) | Massa (kDa) | pI teor. | Peptídeo sinal |
|---------------|--|--------------------|-----------------|-----------------------|
| G2Q1N1 | Glicosil hidrolase da família 92 | 90 | 5,82 | Sim |
| G2Q335 | Glioxal oxidase <i>like</i> | 105 | 4,64 | Sim |
| G2QAX0 | Nitroreductase-like | 23 | 5,6 | Não |
| G2Q8U9 | Nucleosídeo difosfato quinase (EC 2.7.4.6) | 17 | 6,84 | Não |
| G2QFY9 | Pectina liase- <i>like</i> (EC 4.2.2.10) | 37 | 7,75 | Sim |
| G2QH79 | Proteína da família 1 de polissacarídeo liase (EC 4.2.2.2) | 34 | 5,53 | Sim |
| G2QG74 | Proteína da família 3 de polissacarídeo liase (EC 4.2.2.2) | 26 | 5,36 | Sim |
| G2Q574 | Inibidor da dissociação Rab-GDP | 51 | 5,66 | Não |
| G2Q6Z6 | Serina protease | 57 | 5,71 | Sim |
| G2PZS2 | Trealase (EC 3.2.1.28) | 78 | 6,03 | Sim |
| G2Q0R5 | Proteína não caracterizada | 80 | 5,47 | Não |
| G2QAL0 | Proteína não caracterizada | 23 | 3,32 | Sim |
| G2Q9I1 | Proteína não caracterizada | 60 | 6,03 | Não |
| G2QD34 | Proteína não caracterizada | 64 | 6,3 | Não |
| G2QFL3 | Proteína não caracterizada | 76 | 4,63 | Sim |
| G2QQG6 | Proteína não caracterizada | 72 | 5,33 | Não |
| G2QAP6 | Proteína não caracterizada | 29 | 6,25 | Não |
| G2Q494 | Proteína não caracterizada | 63 | 6 | Sim |
| G2QFV6 | Proteína não caracterizada | 360 | 5,81 | Não |
| G2QNZ9 | Proteína não caracterizada | 71 | 5,1 | Não |
| G2QGJ6 | Proteína não caracterizada | 55 | 4,66 | Sim |
| G2QL49 | Proteína não caracterizada | 492 | 5,77 | Não |

| Acesso | Proteína (*) | Massa (kDa) | pI teor. | Peptídeo sinal |
|--|---|-------------|----------|----------------|
| G2QLX8 | Proteína não caracterizada | 119 | 8,88 | Não |
| G2QP35 | Proteína não caracterizada | 8 | 7,87 | Não |
| G2QGG5 | Proteína não caracterizada | 95 | 5,61 | Sim |
| Proteínas do secretoma de <i>M. thermophila</i> cultivado em palha de arroz | | | | |
| G2QGN6 | Beta-xilanase (EC 3.2.1.8) | 42 | 6,42 | Sim |
| O74240 | Módulo de ligação a carboidrato da família 1 (EC 1.1.99.18) (Celobiose desidrogenase) | 88 | 5,09 | Sim |
| G2QEK4 | Catalase (EC 1.11.1.6) | 78 | 5,98 | Sim |
| G2Q4S6 | Endo-1,4-beta-xilanase (EC 3.2.1.8) | 25 | 6,71 | Sim |
| G2PZK2 | Endonuclease/exonuclease/fosfatase-like | 65 | 5,01 | Sim |
| G2Q8W4 | Fosfatase alcalina | 73 | 6,01 | Sim |
| G2QB71 | Formiato desidrogenase (FDH) (EC 1.2.1.2) (NAD-dependente Formiato desidrogenase) | 40 | 6,15 | Não |
| G2QA39 | Glucanase (EC 3.2.1.-) | 51 | 5,28 | Sim |
| G2Q998 | Glucanase (EC 3.2.1.-) | 41 | 5,94 | Sim |
| G2QPQ8 | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.12) | 36 | 6,54 | Não |
| G2QPS0 | Glicosil hidrolase da família 15 (Fragmento) | 67 | 5,07 | Sim |
| G2Q4L9 | Glicosil hidrolase da família 2 | 66 | 5,57 | Sim |
| G2QCC8 | Glicosil hidrolase da família 43 | 61 | 4,91 | Sim |
| G2QNT0 | Glicosil hidrolase da família 61 | 24 | 6,64 | Sim |
| G2QLV4 | Glicosil hidrolase da família 62 | 40 | 5,52 | Sim |

| Acesso | Proteína (*) | Massa (kDa) | pI teor. | Peptídeo sinal |
|---------------|---|--------------------|-----------------|-----------------------|
| G2Q1N1 | Glicosil hidrolase da família 92 | 90 | 5,82 | Sim |
| G2QAX0 | Nitroreductase- <i>like</i> | 23 | 5,6 | Não |
| G2Q8U9 | Nucleosídeo difosfato quinase (EC 2.7.4.6) | 17 | 6,84 | Não |
| G2QNT3 | Peptídeo hidrolase (EC 3.4.-.-) | 54 | 5,57 | Sim |
| G2Q254 | Peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8) | 20 | 6,51 | Não |
| G2QGL4 | Protease | 40 | 4,9 | Sim |
| G2Q574 | Inibidor da dissociação Rab-GDP | 51 | 5,66 | Não |
| G2Q925 | Serina protease | 40 | 6,25 | Sim |
| G2PZS2 | Trealase (EC 3.2.1.28) | 78 | 6,03 | Sim |
| G2Q088 | Proteína não caracterizada | 28 | 5,91 | Não |
| G2Q701 | Proteína não caracterizada | 79 | 8,09 | Não |
| G2QCC9 | Proteína não caracterizada | 20 | 5,58 | Não |
| G2QBY9 | Proteína não caracterizada | 62 | 4,86 | Sim |
| G2Q8N3 | Proteína não caracterizada | 143 | 9,3 | Não |
| G2QKM4 | Proteína não caracterizada | 66 | 5,09 | Não |
| G2QLK6 | Proteína não caracterizada | 23 | 5,5 | Não |
| G2QPH6 | Proteína não caracterizada | 49 | 8,15 | Não |
| G2QAP6 | Proteína não caracterizada | 29 | 6,25 | Não |
| G2Q494 | Proteína não caracterizada | 63 | 6 | Sim |
| G2QFV6 | Proteína não caracterizada | 360 | 5,81 | Não |
| G2QNZ9 | Proteína não caracterizada | 71 | 5,1 | Não |
| G2QGG5 | Proteína não caracterizada | 95 | 5,61 | Sim |

| Acesso | Proteína (*) | Massa (kDa) | pI teor. | Peptídeo sinal |
|---|---|-------------|----------|----------------|
| Proteínas do secretoma de <i>M. thermophila</i> cultivado em palha de soja | | | | |
| G2QJ35 | Aldose epimerase-like | 41 | 4,82 | Não |
| G2PZU5 | Alfa-manosidase (EC 3.2.1.-) | 123 | 6,17 | Não |
| G2QGN6 | Beta-xilanase (EC 3.2.1.8) | 42 | 6,42 | Sim |
| O74240 | Módulo de ligação a carboidrato da família 1 (EC 1.1.99.18) (Celobiose desidrogenase) | 88 | 5,09 | Sim |
| G2QLJ3 | Proteína do domínio WSC de ligação a carboidrato | 38 | 4,74 | Sim |
| G2QEK4 | Catalase (EC 1.11.1.6) | 78 | 5,98 | Sim |
| G2Q4S6 | Endo-1,4-beta-xilanase (EC 3.2.1.8) | 25 | 6,71 | Sim |
| G2Q8W4 | Fosfatase alcalina | 73 | 6,01 | Sim |
| G2QB71 | Formiato desidrogenase (FDH) (EC 1.2.1.2) (NAD-dependente Formiato desidrogenase) | 40 | 6,15 | Não |
| G2Q998 | Glucanase (EC 3.2.1.-) | 41 | 5,94 | Sim |
| G2QPQ8 | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.12) | 36 | 6,54 | Não |
| G2QPS0 | Glicosil hidrolase da família 15 (Fragmento) | 67 | 5,07 | Sim |
| G2Q4L9 | Glicosil hidrolase da família 2 | 66 | 5,57 | Sim |
| G2QJS8 | Glicosil hidrolase da família 28 (EC 3.2.1.67) | 51 | 5,26 | Sim |
| G2QCQ3 | Glicosil hidrolase da família 3 (EC 3.2.1.21) | 95 | 5,05 | Sim |
| G2QNT0 | Glicosil hidrolase da família 61 | 24 | 6,64 | Sim |

| Acesso | Proteína (*) | Massa (kDa) | pl teor. | Peptídeo sinal |
|---------------|--|--------------------|-----------------|-----------------------|
| G2QHR7 | Glicosil hidrolase da família 74 | 79 | 4,58 | Sim |
| G2Q8U9 | Nucleosídeo difosfato quinase (EC 2.7.4.6) | 17 | 6,84 | Não |
| G2QFY9 | Pectina liase- <i>like</i> | 37 | 7,75 | Sim |
| G2QNT3 | Peptídeo hidrolase (EC 3.4.-.-) | 54 | 5,57 | Sim |
| G2Q1K5 | Proteína da família 1 de polissacarídeo liase (EC 4.2.2.2) | 35 | 5,69 | Sim |
| G2QH79 | Proteína da família 1 de polissacarídeo liase (EC 4.2.2.2) | 34 | 5,53 | Sim |
| G2QG74 | Proteína da família 3 de polissacarídeo liase (EC 4.2.2.2) | 26 | 5,36 | Sim |
| G2Q925 | Serina protease | 40 | 6,25 | Sim |
| G2Q714 | Superóxido dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1) | 16 | 6,03 | Não |
| G2QGJ6 | Proteína não caracterizada | 55 | 4,66 | Sim |
| G2QL49 | Proteína não caracterizada | 492 | 5,77 | Não |
| G2QLX8 | Proteína não caracterizada | 119 | 8,88 | Não |
| G2QP35 | Proteína não caracterizada | 8 | 7,87 | Não |
| G2QGG5 | Proteína não caracterizada | 95 | 5,61 | Sim |

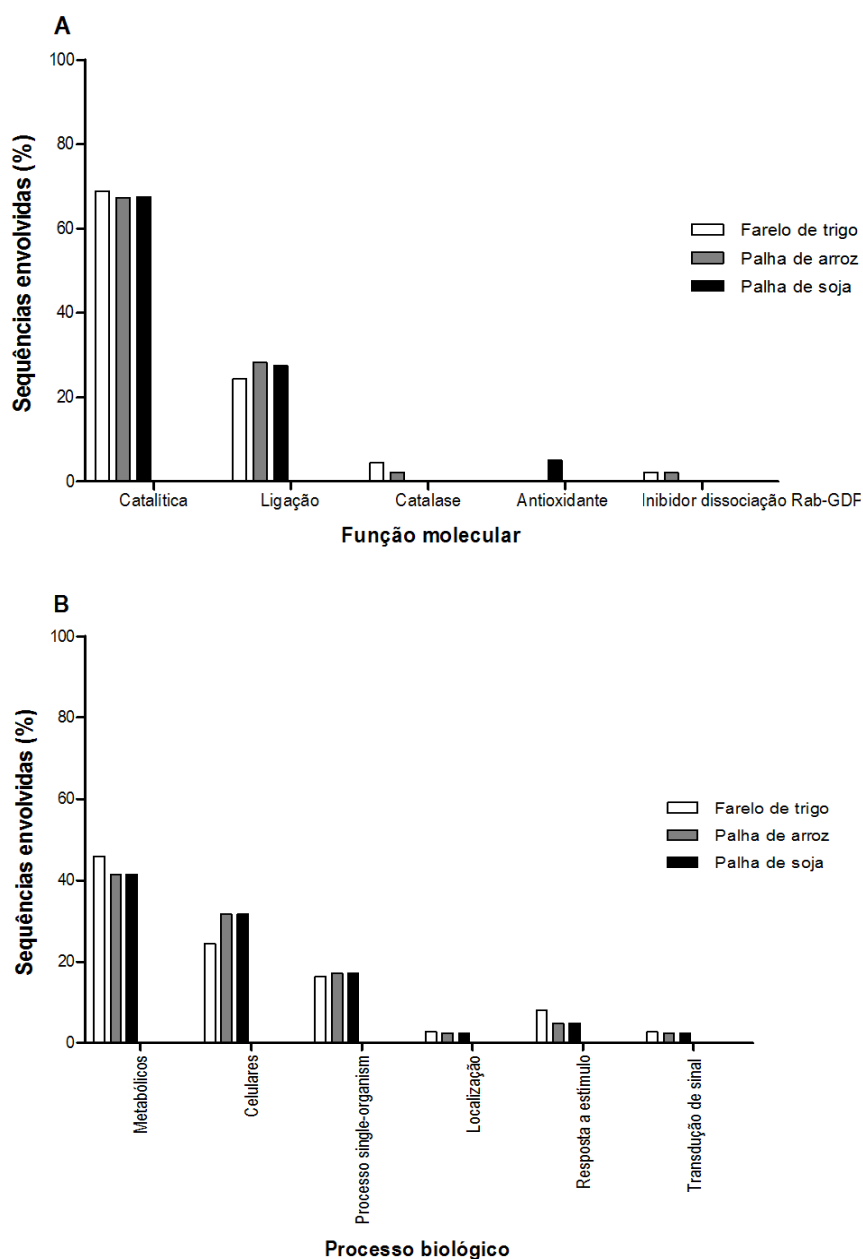
*Todas as sequências obtidas estão relacionadas às proteínas do banco de dados proteômicos UP000007322 da espécie *Myceliophthora thermophila* (strain ATCC 42464 / BCRC 31852 / DSM 1799).

O ponto isoelétrico teórico (pl) foi determinado utilizando a ferramenta disponível em https://web.expasy.org/compute_pi/.

Fonte: Elaborado pela autora.

Para obtenção de informações sobre as funções moleculares e processos biológicos dos grupos de proteínas identificadas, a anotação de *Gene Ontology* foram feitas pelo *website* <http://www.uniprot.org/uploadlists/>. As informações geradas foram organizadas em gráficos função molecular (FIGURA 50A) e processos biológicos (FIGURA 50B).

Figura 50 - Funções moleculares e processos biológicos das proteínas identificadas no secretoma de *M. thermophila* cultivado em bioprocesso sólido com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja. **(A)** funções moleculares; **(B)** processos biológicos

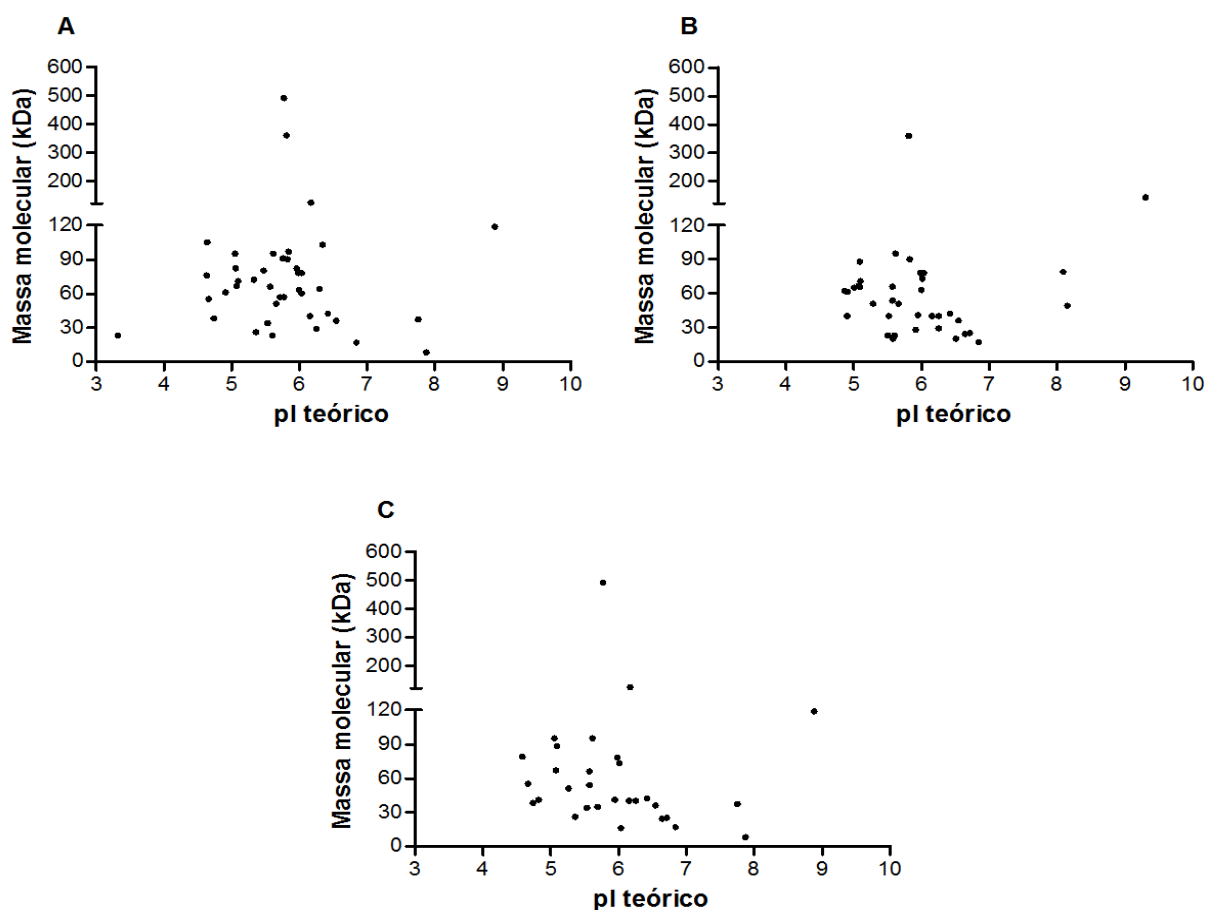


Fonte: Elaborado pela autora.

A maior porcentagem das proteínas identificadas nos secretomas dos cultivos com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja apresentou como principais funções moleculares as atividades catalíticas (cerca de 70%) e de ligação (cerca de 25%). Além disso, a maior porcentagem das proteínas identificadas nos secretomas dos cultivos com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja está envolvida em processos biológicos metabólicos (cerca de 40%) e celulares (cerca de 30%).

O ponto isoelétrico teórico (pI) de cada proteína identificada foi determinado utilizando a ferramenta disponível em https://web.expasy.org/compute_pi/. Os pontos isoelétricos teóricos foram correlacionados com as massas moleculares das proteínas identificadas no secretoma (FIGURA 51).

Figura 51 - Correlação entre massa molecular (kDa) e ponto isoelétrico teórico das proteínas identificadas no secretoma de *M. thermophila* cultivado em bioprocesso sólido com farelo de trigo **(A)**, palha de arroz **(B)** ou palha de soja **(C)**



O ponto isoelétrico teórico (pI) foi determinado utilizando a ferramenta disponível em https://web.expasy.org/compute_pi/.

Fonte: Elaborado pela autora.

A maior parte das proteínas identificadas no secretoma de *M. thermophila* cultivado com farelo de trigo (FIGURA 51A) possui pI teóricos distribuídos entre 3 e 9, além disso as massas estão distribuídas entre 10 e 500 kDa, com a maior porcentagem entre 10 e 120 kDa.

Por outro lado, a maior parte das proteínas identificadas no secretoma de *M. thermophila* cultivado com palha de arroz (FIGURA 51B) possui pI teóricos distribuídos entre 5 e 9,5, além disso as massas estão distribuídas entre 10 e 400 kDa, com a maior porcentagem entre 10 e 120 kDa.

A maior parte das proteínas identificadas no secretoma de *M. thermophila* cultivado com palha de soja (FIGURA 51C) possui pI teóricos distribuídos entre 4,5 e 9, além disso as massas estão distribuídas entre 10 e 500 kDa, com a maior porcentagem entre 10 e 120 kDa.

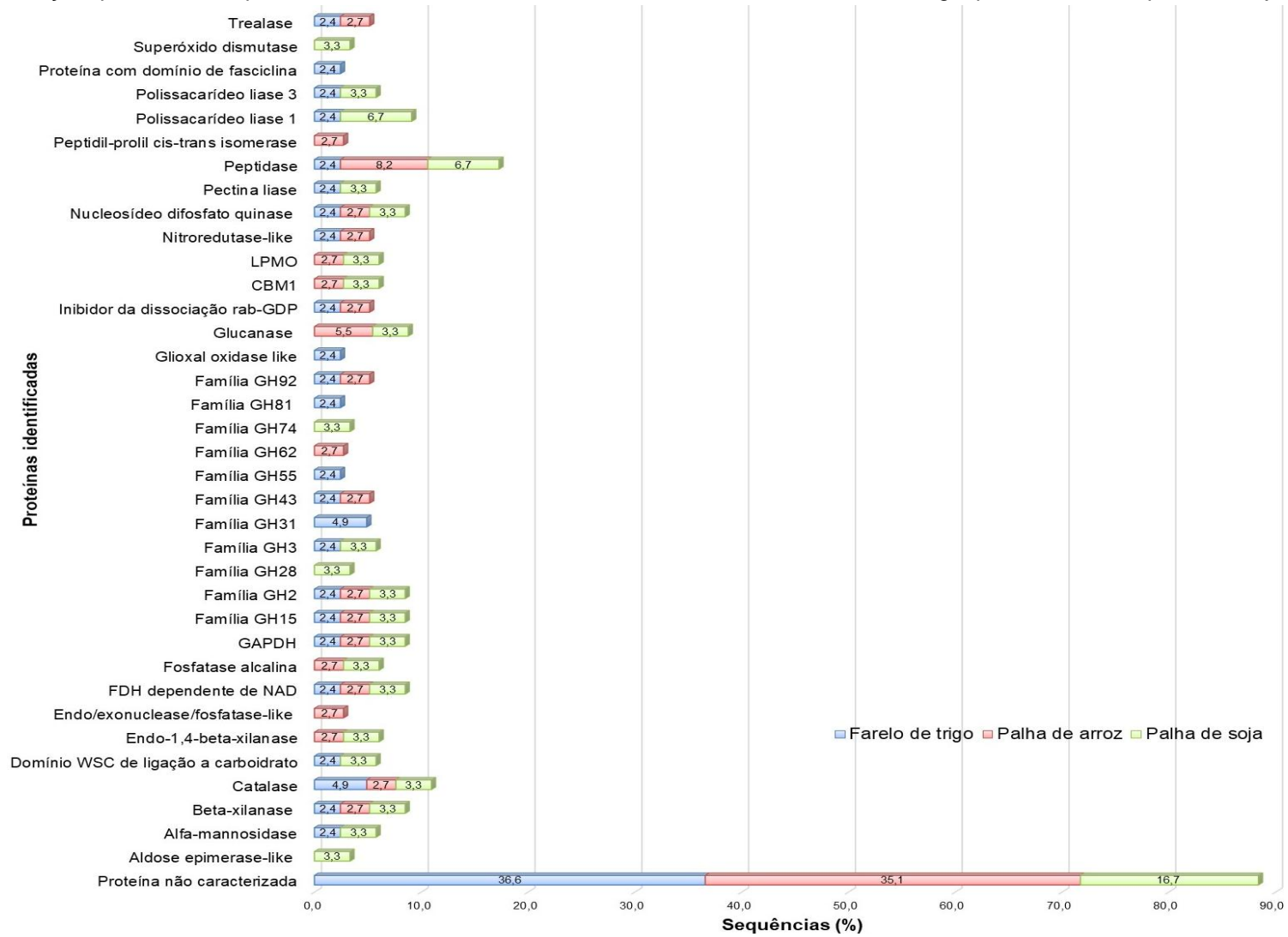
De modo geral, a correlação entre pI e massas moleculares das amostras identificadas foram similares entre as proteínas secretadas por *M. thermophila* nos cultivos com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja. A distribuição de massas moleculares da maior parte das proteínas estava entre 10 e 120 kDa, entretanto as faixas de ponto isoelétrico apresentaram diferenças sutis.

Análises utilizando o *software* Signal P 4.1 indicou que a proporção de proteínas secretadas entre os grupos foram 56,1 % para as proteínas do cultivo com farelo de trigo, 56,8 % para as proteínas do cultivo com palha de soja e 70 % para as proteínas do cultivo com palha de soja. Os resultados obtidos indicam que a maior parte das proteínas presentes no secretoma possuía peptídeo sinal.

Essa observação nos mostra que uma elevada porcentagem de proteínas secretadas por esses fungos ainda não foram estudadas o suficiente e que algumas destas podem ser fundamentais para o processo de degradação de biomassa lignocelulósica ou para outras aplicações biotecnológicas.

Na FIGURA 52 estão apresentadas a porcentagem de sequências proteicas identificadas no secretoma dos cultivos com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja.

Figura 52 - Distribuição qualitativa das proteínas identificadas nos secretomas dos cultivos com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja.



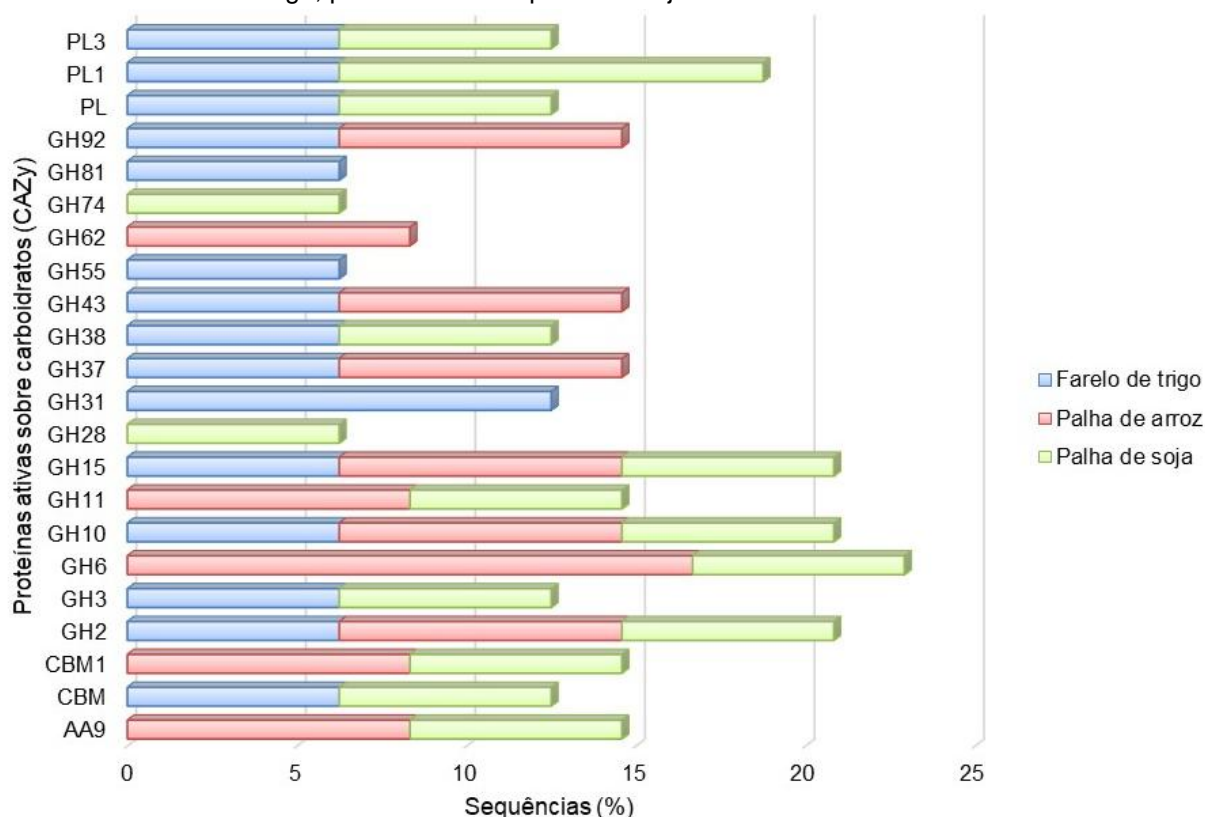
Legenda: CBM1 (módulo de ligação a carboidrato da família 1), Família GH (glicosil hidrolase da família), FDH (formiato desidrogenase), GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), LPMO (Monooxigenase lítica de polissacarídeos). Fonte: Elaborado pela autora.

Entre as proteínas detectadas nos secretomas de *M. thermophila* cultivado em bioprocesso sólido com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja cerca de 37, 35 e 17% das sequências foram identificadas como não caracterizadas, respectivamente. Este elevado percentual, já foi observado nos secretomas de *T. reesei*, utilizando bagaço de cana de açúcar, nos quais a porcentagem de proteínas hipotéticas ou não caracterizadas foi cerca de 35 e 31%, respectivamente (FLORÊNCIO et al., 2016).

As proteínas identificadas no secretoma de *M. thermophila* apresentam diferentes funções e o padrão de detecção confirmou a capacidade de *M. thermophila* produzir proteínas pertencentes à família de enzimas ativas sobre carboidratos (CAZy).

Na FIGURA 53 está apresentada a distribuição, em porcentagem relativa, das classes enzimáticas e proteínas identificadas da família CAZy.

Figura 53 - Distribuição relativa das proteínas da família CAZy identificadas nos secretomas dos cultivos com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja



Legenda: AA (atividade auxiliar), CBM (módulo de ligação à carboidrato), GH (glicosil hidrolase), PL (pectina liase).

Fonte: Elaborado pela autora.

As proteínas das famílias de CAZy estão diretamente relacionadas à degradação de biomassa lignocelulósica o que, em conjunto com os dados de atividade enzimática, confirma o potencial de *M. thermophila*. A elevada participação deste grupo de proteínas foi confirmada, já que nos cultivos com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja, correspondeu a cerca de 39, 32 e 53 % das proteínas identificadas, respectivamente, pertencem a esta família.

Entre as proteínas identificadas, as famílias de glicosil hidrolases (GH), de polissacarídeo liase (PL), os módulos de ligação a carboidratos (CBM) e enzimas com atividade auxiliar (LPMO) são pertencentes à família CAZy (<http://www.cazy.org/>). Por esse motivo, a discussão foi dividida em proteínas envolvidas na degradação de parede celular e proteínas com outras funções.

❖ Proteínas envolvidas na degradação de parede celular

Os resíduos agroindustriais (farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja) são substratos lignocelulósicos, que podem ser utilizados para a produção de enzimas com potencial biotecnológico, e que representam uma forma renovável e barata neste processo (FLORÊNCIO et al., 2016).

A biomassa lignocelulósica apresenta composição variável, de acordo com a espécie vegetal, clima, entre outros fatores, mas que, de maneira geral, é composta por celulose, hemicelulose, pectina, lignina, proteínas, amido, inulina e outros (BENOCCI et al., 2017). Como já relatado por outros autores, as proteínas identificadas no secretoma refletem a natureza do substrato (SANTOS et al., 2016); e por isso, é fundamental abordar seus componentes.

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na parede celular (BENOCCI et al., 2017) e a sua organização em microfibrilas dificulta a sua desconstrução (GLASS et al., 2013). A degradação da celulose é atribuída a ação sinérgica de hidrolases: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidasas (KARNAOURI et al., 2014) e de proteínas não hidrolíticas, como por exemplo, a monooxigenase lítica de polissacarídeos (LPMO) e os módulos de ligação a carboidrato (CBM), que aumentam a eficiência de degradação. A LPMO atua como oxirredutase, enquanto que o CBM ancora o sítio catalítico das celulasas no substrato (KUBICEK; KUBICEK, 2016).

Nas condições do estudo, foram identificadas nos secretomas de *M. thermophila* proteínas fundamentais para a degradação de celulose: do grupo das **exoglucanases**, temos a glucanase (celobiohidrolase, GH6); do grupo das **β -glicosidases**, temos a glicosil hidrolase da família 3 (GH3) e entre as proteínas **não hidrolíticas** temos a LPMO (AA9) e os módulos de ligação a carboidrato (CBM e CBM1).

Não foram identificadas proteínas do grupo de endoglucanases, entretanto as análises de atividade enzimática mostram a presença de CMCase, nas três condições de cultivo.

Estas proteínas foram identificadas, em diferentes proporções, nos secretomas de *M. thermophila*. Entre as CAZy identificadas, a porcentagem relativa de proteínas envolvidas na degradação de celulose foi de 19, 42 e 38%, para os cultivos com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja, respectivamente.

Análises gênicas de *M. thermophila* já haviam demonstrado o potencial celulolítico deste microrganismo, com destaque para as 25 sequências de LPMO, que supera as 7 e 9 sequências observadas nos principais microrganismos lignocelulolíticos, *A. niger* e *T. reesei*, respectivamente (KARNAOURI et al., 2014).

A hemicelulose é um grupo de polissacarídeos heterogêneos que interagem com as microfibrilas de celulose e cuja degradação envolve várias enzimas (GLASS et al., 2013), tais como, xilanases, arabinases, mananases e esterases (KARNAOURI et al., 2014).

Nos secretomas de *M. thermophila* foram identificadas proteínas envolvidas na degradação de hemicelulose: das **xilanase**, temos as glicosil hidrolases β -xilanase (GH10), endo-1,4- β -xilanase (GH11) e as xilosidases (GH43 e GH3); das **arabinases** (famílias GH43 e GH62); e das **mananases**, temos a α -manosidase (GH38) e manosidases (GH2).

As famílias GH2 e GH10 foram identificadas nas três condições de cultivo, e as demais enzimas foram identificadas, em diferentes proporções, nos secretomas de *M. thermophila*. Entre as CAZy identificadas, a porcentagem relativa de proteínas envolvidas na degradação de hemicelulose foi de 31, 42 e 31%, para os cultivos com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja, respectivamente.

A pectina é o polissacarídeo de parede celular com maior complexidade e possui quatro principais classes estruturais: homogalacturonana,

ramnogalacturonana I e II, homogalacturonana (GLASS et al., 2013). As pectinases que atuam sobre estas estruturas são poligalacturonases, ramnosidases, pectina liases e pectina esterases.

Nos secretomas de *M. thermophila* também foram identificadas proteínas envolvidas na degradação de pectina: a **poligalacturonase** (GH28), as **pectinas liases** das famílias 1 (PL1) e 3 (PL3); além das arabinases GH43 e GH62, que também podem atuar na cadeia lateral da ramnogalacturonana I.

Estas proteínas foram identificadas, em diferentes proporções, nos secretomas de *M. thermophila*; embora a GH28 e as polissacarídeos liases não tenham sido detectadas no cultivo com palha de arroz. Entre as CAZy identificadas, a porcentagem relativa de proteínas envolvidas na degradação de pectina foi de 25, 17 e 31%, para os cultivos com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja, respectivamente.

Nos secretomas de *M. thermophila*, cultivado com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja, também foram identificadas outras enzimas pertencentes às famílias das glicosil hidrolases: GH15, GH31, GH37, GH55, GH74, endo- β -1,3-glucanase (GH81) e GH92.

De acordo com a base de dados CAZy, a família GH15, que foi identificada nas três condições de cultivo, é composta por glucoamilase (EC 3.2.1.3) e outras enzimas. A família GH31, que foi identificada apenas no secretoma do cultivo com farelo de trigo, agrupa as enzimas α -glicosidase (EC 3.2.1.20) e α -xilosidase (EC 3.2.1.177), entre outras. Já enzima α,α -trealase (GH37), dos cultivos com farelo de trigo e palha de arroz, está envolvida na hidrólise da trealose em glicose.

As famílias GH15 e GH31 foram indicadas como participantes do processo de degradação de amido (ZHOU et al., 2014). Santos e colaboradores (2016) relataram uma maior abundância de GH31 (α -xilosidase) no cultivo com bagaço de cana de açúcar delignificado. O farelo de trigo possui, em sua composição, maior porcentagem de amido e menor teor de lignina; que pode ter repercutido na composição do seu secretoma.

As famílias GH55 (exo- β -1,3-glucanase EC 3.2.1.58; endo- β -1,3-glucanase EC 3.2.1.39) e GH 81 (endo- β -1,3-glucanase EC 3.2.1.39) também só foram identificadas no secretoma do cultivo com farelo de trigo. A família GH92 foi

identificada no secretoma com farelo de trigo e com palha de arroz.; e a família GH 74 foi identificada apenas com palha de soja.

As enzimas das famílias GH15, GH31, GH55, endo- β -1,3-glucanase (GH81) e GH92 também foram identificadas no secretoma de *M. thermophila* M77, cultivado com polissacarídeos de hemicelulose. Por outro lado, no cultivo com polissacarídeos de celulose foram identificadas as famílias GH31, GH55 e GH74 (SANTOS et al., 2016).

Neste contexto é possível sugerir que, no presente estudo, as famílias GH15, GH81 e GH92 estejam envolvidas na hidrólise de hemicelulose; e a família GH 74 na degradação de celulose, enquanto que as funções de GH31 e GH55 são inconclusivas. Outro trabalho também relatou que a família GH74 apresenta função celulolítica em *M. thermophila* (KARNAOURI et al., 2014).

A lignina é um heteroplímero aromático, que dificulta a degradação dos carboidratos da parede celular. A presença de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) é fundamental para a ocorrência da degradação de lignina, pois a ação de enzimas lignocelulolíticas (lignina peroxidase, manganês peroxidase, peroxidase polivalente) é dependente de H_2O_2 . Também já foi relatada a correlação entre degradação de lignina e produção de H_2O_2 em cultura (DAOU; FAULDS, 2017).

Nos cultivos com resíduos agroindustriais também foram identificadas catalase (CAT), formiato desidrogenase dependente de NAD (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina), glioxal oxidase e nitroreductase (NIT). Estas enzimas possuem atividade de oxirredutases e a presença de peptídeo sinal indica função extracelular. Estas enzimas podem estar envolvidas, de formas diferentes, na degradação de lignina.

A enzima formiato desidrogenase, dependente de NAD, está envolvida no metabolismo de oxalato, cuja decomposição leva a geração de CO_2 e NADH (WATANABE et al., 2008), e a presença de oxalato melhora a degradação de lignina mediada por manganês peroxidase (ZHU et al., 2017). Dessa forma, a presença da enzima formiato desidrogenase pode influenciar na ação de manganês peroxidase.

A enzima glioxal oxidase é secretada no meio extracelular e reduz O_2 a H_2O_2 . Esta enzima tem papel de destaque, uma vez que fontes intracelulares de H_2O_2 não permitiriam a ação das enzimas lignocelulolíticas. A enzima peroxidase (catalase) é

co-regulada com glioxal oxidase para evitar o acúmulo de H_2O_2 , o que levaria ao dano celular, pelo acúmulo de ERO (DAO; FAULDS, 2017).

A possibilidade de acúmulo de H_2O_2 também pode estar correlacionada com a identificação de superóxido dismutase e catalase-peroxidases, que não possuem peptídeo sinal.

Santos e colaboradores (2016) propuseram que, a glioxal oxidase, mais abundante no secretoma de *M. thermophila* M77, em cultivos com polissacarídeos de celulose, pode gerar um acúmulo de H_2O_2 e também oxidar ligações glicosídicas e fenólicas, por mecanismos ainda não totalmente elucidados.

❖ Proteínas com outras funções

Nos secretomas dos cultivos com resíduos agroindustriais foram identificadas peptidases. A caracterização do conteúdo de peptidases é fundamental, uma vez que a sua ação pode comprometer a atividade de outras proteínas. A identificação de peptidases no secretoma, por espectrometria de massas, está de acordo com a atividade proteolítica também identificada nas três condições de cultivo.

Santos e colaboradores (2016) identificaram peptidases no cultivo de *M. thermophila* M77 com hemicelulose. Florêncio e colaboradores (2016) também identificaram peptidases no secretoma de *A. niger* e *T. reesei*, que foram cultivados com bagaço de cana de açúcar.

A interferência mediada por peptidases já foi relatada por Santos e colaboradores (2016), que buscaram realizar um desenho experimental para evitar a ação de peptidases sobre os demais componentes.

As enzimas catalase-peroxidase e superóxido dismutase (SOD) são oxirredutases, que não possuem peptídeo sinal, e atuam na remoção de ERO como um mecanismo de defesa ao estresse oxidativo, buscando evitar o dano celular (DAO; FAULDS, 2017).

As proteínas fosfatase alcalina e endo/exonuclease/fosfatase-like estão envolvidas com mecanismos de regulação, uma vez que regulam a função de proteínas e ácidos nucleicos, respectivamente.

Fosfatases ácidas e alcalinas são reguladas por PacC, em função do pH extracelular, (ROSSI et al., 2013). Em outro estudo, a fosfatase alcalina foi mais abundante no cultivo de *M. thermophila* com hemicelulose (SANTOS et al., 2016).

A presença de PacC foi fundamental para o crescimento em celulose de *Neurospora crassa*; por outro lado, o pH ótimo de produção de enzimas pode variar entre os microrganismos, uma vez que a regulação gênica, em resposta ao pH, está relacionada a uma série de fatores (GLASS et al., 2013).

Aldose epimerases e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) são enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos. A aldose epimerase atua na epimerização de anômeros α e β ; e assim como GAPDH pode participar da glicólise.

A liberação de monossacarídeos, durante o processo de degradação dos resíduos agroindustriais, pode ter aumentado a produção destas enzimas. Santos e colaboradores (2016) também identificaram aldose epimerase e catalase no secretoma de *M. thermophila*, em diferentes condições de cultivo.

A enzima nucleosídeo difosfato quinase (NDK) controla os níveis intracelulares de ATP e regula diversos biológicos. A interação de NDK com outras proteínas interfere em diferentes vias de transdução de sinais (TANG et al., 2016). A detecção desta enzima pode ser um reflexo do processamento de glicose por *M. thermophila* e, conseqüentemente, do aumento dos níveis de ATP celular.

A enzima PPlase e o inibidor da dissociação rab-GDP estão envolvidas no dobramento e no transporte de proteínas, respectivamente (THE CONSORTIUM GENE ONTOLOGY, 2015). A identificação destas proteínas, nas condições do estudo, reflete os elevados níveis de produção e secreção de proteínas durante o bioprocessamento sólido.

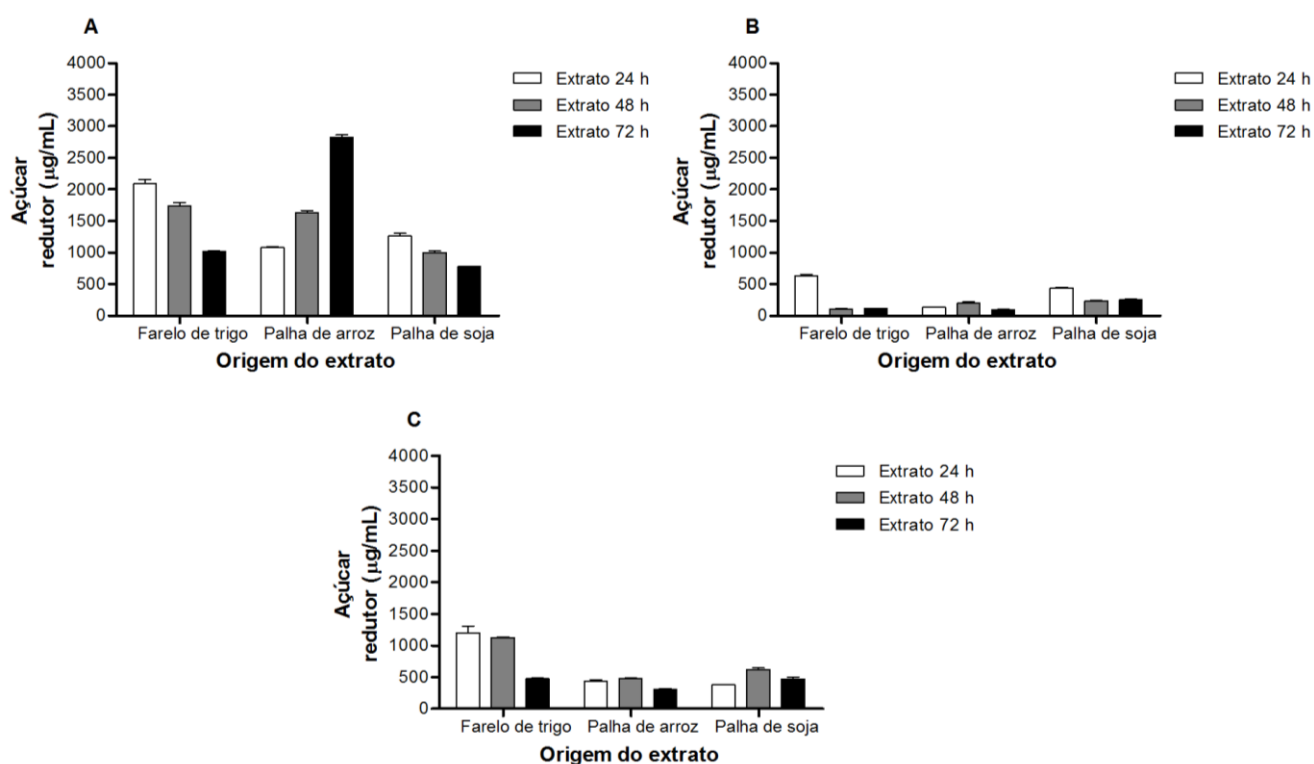
A identificação das proteínas nucleosídeo difosfato quinase, PPlase e inibidor da dissociação rab-GDP podem indicar a necessidade de adequação metabólica de *M. thermophila*, para a produção de enzimas e obtenção de nutrientes, como resultado da ativação e/ou inativação de gene, via transdução de sinais.

4.10. Degradação de resíduos agroindustriais pela ação do complexo enzimático produzido por *M. thermophila* em bioprocesso sólido

As atividades enzimáticas identificadas nos bioprocessos sólidos, com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja, confirmaram o potencial do arsenal enzimático de *M. thermophila*. Os extratos produzidos em 24, 48 e 72 h de bioprocesso sólido foram utilizados para avaliar os respectivos potenciais de degradação de biomassa lignocelulósica.

A liberação de açúcar redutor, sob a ação dos diferentes extratos, foi utilizada com um indicador da sacarificação destes resíduos e está apresentada na FIGURA 54.

Figura 54 - Perfil de liberação de açúcares redutores de resíduos agroindustriais com extratos enzimáticos induzidos em bioprocesso sólido com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja. Resíduos para degradação: **(A)** farelo de trigo, **(B)** palha de arroz e **(C)** palha de soja



O material foi incubado por 24 h a 35 °C. O valor da absorbância das amostras controle (enzima inativada) foi descontado para a determinação da quantidade de açúcares redutores. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média ± desvio padrão.

Fonte: Elaborado pela autora.

Para os extratos produzidos por *M. thermophila* com farelo de trigo, a melhor performance foi do obtido com 24 h de bioprocesso sólido. A maior liberação de açúcares redutores atingiu cerca de 2100, 600 e 1200 µg/mL da degradação de

farelo de trigo (FIGURA 54A), palha de arroz (FIGURA 54B) e palha de soja (FIGURA 54C), respectivamente.

Para os extratos produzidos por *M. thermophila* com palha de arroz, a melhor performance foi do obtido com 72 h de bioprocesso sólido. A maior liberação de açúcares redutores foi de 2750 µg/mL da degradação de farelo de trigo (FIGURA 54A).

Para os extratos produzidos por *M. thermophila* com palha de soja, a melhor performance foi do obtido com 24 h de bioprocesso sólido. A maior liberação de açúcares redutores foi cerca de 1200 e 450 µg/mL, dos resíduos farelo de trigo e palha de arroz, respectivamente. Por sua vez, a maior degradação de palha de soja ocorreu com o extrato de 48 h e atingiu cerca de 600 µg/mL de açúcares redutores.

Paralelamente, foi determinada a taxa de sacarificação de cada resíduo agroindustrial sob a ação dos diferentes extratos que se baseou na porcentagem de carboidratos na composição (TABELA 10).

Tabela 10 - Taxa de sacarificação de farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja em 24 h de incubação a 35 °C com extrato produzido por *M. thermophila* em bioprocesso sólido.

| Extrato obtido em | Farelo de trigo | Palha de arroz | Palha de soja |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Sacarificação (%) | Sacarificação (%) | Sacarificação (%) |
| Farelo de trigo 24 h | 34,2±1,1 | 9,5±0,3 | 17,5±1,5 |
| Farelo de trigo 48 h | 28,4±0,9 | 1,6±0,1 | 16,3±0,2 |
| Farelo de trigo 72 h | 16,7±0,1 | 1,7±0,1 | 6,9±0,1 |
| Palha de arroz 24 h | 17,7±0,1 | 2,0±0,1 | 6,3±0,4 |
| Palha de arroz 48 h | 26,7±0,6 | 3,1±0,2 | 7,0±0,1 |
| Palha de arroz 72 h | 46,2±0,7 | 1,5±0,0 | 4,6±0,1 |
| Palha de soja 24 h | 20,7±0,7 | 6,6±0,2 | 5,6±0,1 |
| Palha de soja 48 h | 16,4±0,4 | 3,5±0,1 | 9,1±0,4 |
| Palha de soja 72 h | 12,7±0,1 | 3,9±0,1 | 6,9±0,4 |

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as atividades foram expressas em média ± desvio padrão.

O farelo de trigo foi o resíduo mais suscetível à degradação pelos diferentes extratos avaliados e a taxa de sacarificação variou de 10 a 45 %. A palha de arroz

foi o substrato mais resistente à degradação com máxima sacarificação de 10%, enquanto que a palha de soja obteve um padrão intermediário com máxima sacarificação de cerca de 20 %.

Extratos enzimáticos de *T. reesei* e *A. niger* com diferentes níveis de celulases, hemicelulases e esterases também obtiveram cerca de 30 % de sacarificação utilizando bagaço de cana explodido (FLORÊNCIO et al., 2016).

Dados similares foram obtidos por *M. thermophila* JCP 1-4 na sacarificação de bagaço de cana de açúcar ozonado (PEREIRA et al., 2016). Por outro lado, a utilização de coquetéis enzimáticos disponíveis comercialmente (Celluclast 1.5; Novozyme 188 e Pectinase Ultra SP) obtiveram pelo menos 80 % de rendimento (LA TORRE et al., 2017).

Para correlacionar a degradação dos substratos com as atividades enzimáticas detectadas nos extratos foi idealizado um quadro resumo sobre o perfil de enzimas produzidas (QUADRO 4).

Quadro 4 - Quadro resumo das atividades enzimáticas detectadas no secretoma de *M. thermophila* em 24, 48 e 72 h de bioprocessamento sólido com os resíduos agroindustriais farelo de trigo; palha de arroz e palha de soja.

| Atividade enzimática | Farelo de trigo | | | Palha de arroz | | | Palha de soja | | |
|----------------------|-----------------|------|------|----------------|------|------|---------------|------|------|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 24 h | 48 h | 72 h | 24 h | 48 h | 72 h |
| Peptidase | | | | | | | | | |
| Lipase | X | | | X | | | X | | |
| CMCase | | | | | | | | | |
| FPase | | | | X | | X | X | | X |
| β-glicosidase | | | | | | | | | |
| Xilanase | | | | | | | | | |
| Pectinase | | | | X | X | X | | | |
| Amilase | X | | | X | X | X | X | | |
| Lacase | X | X | X | | X | X | | | X |

O preenchimento cinza indica a condição com a maior atividade enzimática, enquanto que o símbolo X indica a ausência da atividade enzimática. As marcações foram baseadas em análises estatísticas ($p < 0,05$) realizadas no GraphPad Prism: Two way ANOVA, com pós teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pela autora.

O farelo de trigo apresenta em sua composição cerca de 20% de amido (MERALI et al., 2015) que é um polissacarídeo de reserva com menor complexidade quando comparado a celulose, hemicelulose e pectina. A produção de amilase por

M. thermophila cultivado com farelo de trigo também é um indicativo da indução pelo substrato. Por esse motivo, é possível sugerir que parte dos açúcares redutores da degradação do farelo de trigo, que aumenta o índice de sacarificação, é produto da hidrólise do amido.

Em relação aos extratos produzidos por *M. thermophila*, o farelo de trigo foi o substrato mais eficiente na produção de hidrolases, embora a produção de lacase não tenha sido identificada. A palha de arroz apresentou a menor diversidade de atividades enzimáticas, entretanto foi o melhor indutor de lacase, por outro lado, a palha de soja foi o substrato mais eficiente na indução de lipase e β -glicosidase.

A lignina é o principal responsável pela recalcitrância da parede celular que dificulta a ação das enzimas produzidas pelos microrganismos, prejudicando a taxa de sacarificação e a sua degradação depende da ação de oxirredutases (ZHU et al., 2017).

Neste contexto é possível que o maior teor de lignina na palha de arroz e na palha de soja tenha induzido proteínas envolvidas no processo de delignificação, condizentes com a detecção de lacase nestes cultivos (FIGURA 48).

As menores taxas de sacarificação dos substratos palha de arroz e palha de soja corroboram esta hipótese. Santos e colaboradores (2016) também sugerem que o perfil de proteínas presentes no secretoma de *M. thermophila* é um reflexo da natureza do substrato.

Apesar da diferença marcante no arsenal enzimático, os extratos induzidos por farelo de trigo não apresentaram o melhor desempenho na degradação dos resíduos agroindustriais (FIGURA 54). Resultados similares foram observados no desempenho de extratos produzidos por *Penicillium oxalicum* GZ-2, que foi cultivado com farelo de trigo e palha de arroz. Embora a maior atividade de FPase tenha sido obtida com farelo de trigo, a maior sacarificação de espigas de milho foi observada no extrato com palha de arroz (LIAO et al., 2015).

As discrepâncias entre as atividades hidrolíticas e as taxas de sacarificação podem ser reflexos da ausência de lacases e de LPMO, uma vez que outros autores também já notaram estas discrepâncias e apontaram que os processos oxidativos são os responsáveis por estas diferenças (SANTOS et al., 2016). Liao e colaboradores (2015) também sugerem que fatores adicionais são necessários para a hidrólise destes substratos.

A elevada produção de enzimas durante o bioprocesso sólido com farelo de trigo é outro fator que pode ter influenciado o padrão de degradação dos resíduos agroindustriais, uma vez que o acúmulo dos produtos da ação de hidrolases, como por exemplo, glicose e celobiose pode levar a inibição enzimática (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). Os níveis de peptidase também podem atrapalhar a ação de proteínas pela clivagem das mesmas.

M. thermophila se mostrou um excelente produtor de peptidase, lipase e de enzimas envolvidas na degradação de celulose (CMCase, FPase, β -glicosidase), hemicelulose (Xilanase) e pectina (Pectinase), com destaque para a secreção de β -glicosidase, confirmando as análises gênicas de Karnaouri e colaboradores (2014).

Adicionalmente, as proteínas identificadas no secretoma reforçam as informações obtidas pelas atividades enzimáticas e adicionam outros protagonistas conhecidos pelo seu envolvimento na degradação de lignocelulose. Vale ressaltar que as proteínas identificadas como não caracterizadas também podem atuar de modo direto neste processo, mas não é possível estabelecer a função que assumem.

Neste contexto, os resíduos agroindustriais possuem grande apelo para a utilização como substratos em bioprocessos devido a elevada disponibilidade e baixo custo, além disso, esse destino também auxiliaria na redução dos problemas ambientais ocasionados pelo seu acúmulo (SOCCOLL et al., 2017). Adicionalmente, a conversão de resíduos agroindustriais em monômeros pode ser utilizado na produção de bioetanol e outros produtos com aplicação industrial e agrícola (LIAO et al., 2017).

A utilização de resíduos agroindustriais proporcionou elevada produção de enzimas com interesse biotecnológico e taxa de até 40 % de sacarificação, que pode ser otimizada, em estudos futuros, a partir de alterações dos parâmetros da hidrólise (pH, agitação, tempo, temperatura, entre outros).

Além disso, esta estratégia pode reduzir os custos da produção de enzimas sem comprometimento da eficiência. Sendo assim, é possível sugerir que os níveis enzimáticos e as proteínas auxiliares do processo de degradação estavam balanceados e que *M. thermophila* possui um grande potencial como produtor coquetéis enzimáticos com aplicações biotecnológicas.

5. CONCLUSÃO

Os fungos filamentosos têm sido explorados como sistemas de produção de moléculas com potencial biotecnológico, para os mais diversos setores industriais. Por esse motivo, é importante conhecer o comportamento destes microrganismos, sob diferentes condições de cultivo. O panorama geral da produção enzimática de *F. oxysporum* URM 7401 e *M. thermophila* gera muitas perspectivas acerca das enzimas, que podem ser individualmente estudadas, para futuras aplicações.

O pH extracelular e as diferentes fontes de nitrogênio modularam o conteúdo global de proteínas de *F. oxysporum* URM 740. Além disso, a identificação de enzimas da via das fosfopentoses também sugere o potencial de *F. oxysporum* URM 7401 para a execução de bioprocessos consolidados.

No bioprocessos sólido de *M. thermophila* cultivado com farelo de trigo, palha de arroz e palha de soja, identificamos o potencial hidrolítico e oxidativo do arsenal enzimático deste microrganismo, que sugere uma maior eficiência na degradação de biomassa lignocelulósica.

As produções de enzimas e o perfil de proteínas foi alterado de acordo com as diferentes condições de cultivos utilizadas. Nesse contexto, as ferramentas proteômicas podem auxiliar, ao desvendar o padrão de proteínas intra ou extracelular, os mecanismos biológicos mobilizados pelos microrganismos em resposta às variações das condições do meio de crescimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, A. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. **Nature**, v. 402, p. 715–720, 1999.
- ADAV, S.S.; RAVINDRAN, A.; CHAO, L.T.; TAN, L.; SINGH, S.; SZE, S.K. Proteomic Analysis of pH and Strains Dependent Protein Secretion of *Trichoderma reesei*. **Journal of Proteome Research**, v. 10, p. 4579–4596, 2011.
- ADAV, S.S.; RAVINDRAN, A.; SZE, S.K. Proteomic Analysis of Temperature Dependent Extracellular Proteins from *Aspergillus fumigatus* Grown under Solid-State Culture Condition. **J. Proteome Res.**, v. 12, p. 2715–2731, 2013.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, p. 198–207, 2003.
- AGHCHEH, R.K.; KUBICEK, C.P. Epigenetics as an emerging tool for improvement of fungal strains used in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p. 6167–6181, 2015.
- AHMED, I.; ZIA, M.A.; HUSSAIN, M.A.; AKRAM, Z.; NAVEED, M.T.; NOWROUZI, A. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*, its purification and characterization. **J Radiat Res Appl Sci.**, v. 9, p. 148-154, 2016.
- AKPINAR, M.; OZTURK, U.R. Induction of fungal laccase production under solid state bioprocessing of new agroindustrial waste and its application on dye decolorization. **3 Biotech.**, v. 7, p. 98, 2017. doi: 10.1007/s13205-017-0742-5.
- ALI, S.S.; KHAN, M.; MULLINS, E.; DOOHAN, F.M. Identification of *Fusarium oxysporum* Genes Associated with Lignocellulose Bioconversion Competency. **Bioenergy Res.**, v. 7, p. 110-119, 2014.
- ALI, S.S.; NUGENT, B.; MULLINS, E.; DOOHAN, F.M. Fungal-mediated consolidated bioprocessing: the potential of *Fusarium oxysporum* for the lignocellulosic ethanol industry. **AMB Expr**, v. 6, p. 13, 2016. doi: 10.1186/s13568-016-0185-0.
- ALI, S.S.; VIDHALE, N.N. Protease Production by *Fusarium oxysporum* in Solid-State Fermentation Using Rice Bran. **Am J Microbiol Res.**, v. 1, p. 45-47, 2013.
- ALKAN, N.; ESPESO, E.A.; PRUSKY, D. Virulence regulation of phytopathogenic fungi by pH. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 19, p. 1012–1025, 2013.
- AMSELEM, J.; CUOMO, C.A.; VAN KAN, J.A.L.; VIAUD, M.; BENITO, E.P.; et al. Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **PLoS Genetics**, v. 7, p. e1002230, 2011.
- ANASONTZIS, G.E.; KOURTOGLOU, E.; MAMMA, D.; VILLAS-BOÂS, S.G.; HATZINIKOLAOU, D.G.; CHRISTAKOPOULOS, P. Constitutive homologous expression of phosphoglucosyltransferase and transaldolase increases the metabolic flux of *Fusarium oxysporum*. **Microbial Cell Factories.**, v. 13, p. 43, 2014. doi: 10.1186/1475-2859-13-43
- ANASONTZIS, G.E.; KOURTOGLOU, E.; VILLAS-BOÂS, S.G.; HATZINIKOLAOU, D.G.; CHRISTAKOPOULOS, P. Metabolic Engineering of *Fusarium oxysporum* to Improve Its Ethanol-Producing Capability. **Front Microbiol.**, v. 7, p. 632, 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.00632

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **J Radiat Res Appl Sci.**, v. 7, p. 163-173, 2014.

ARANDA, A.; DEL OLMO, M.L. Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several ALD genes and is mediated by the general stress response pathway. **Yeast.**, v. 20, p. 747-759, 2003.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 29, p. 719-739, 2005.

ASHBURNER, M.; BALL, C.A.; BLAKE, J.A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.; CHERRY, J.M.; DAVIS, A.P.; DOLINSKI, K.; DWIGHT, S.S.; EPPIG, J.T.; HARRIS, M.A.; HILL, D.P.; ISSELTARVER, L.; KASARSKIS, A.; LEWIS, S.; MATESE, J.C.; RICHARDSON, J.E.; RINGWALD, M.; RUBIN, G.M.; SHERLOCK, G.. Gene ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, p. 25-29, 2000.

AYAR-KAYALI, H.; OZER, N.; TARHANA, L. Intracellular superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities and membrane lipid peroxide levels in *Fusarium acuminatum* upon environmental changes in a defined medium. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 400, p. 265-272, 2002.

BENOCCI, T.; AGUILAR-PONTES, M.V.; ZHOU, M.; SEIBOTH, B.; DE VRIES, R.P. Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. **Biotechnol. Biofuels.**, v. 10, p. 152, 2017. doi: 10.1186/s13068-017-0841-x.

BEREPIKI, A.; LICHIOUS, A.; READ, N.D. Actin organization and dynamics in filamentous fungi. **Nat Rev Microbiol.**, v.9, p. 876-887, 2011.

BERKA, R.M.; GRIGORIEV, I.V.; OTILLAR, R.; SALAMOV, A.; GRIMWOOD, J.; REID, I.; ISHMAEL, N.; JOHN, T.; DARMOND, C.; MOISAN, M.C.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.M.; LOMBARD, V.; NATVIG, D.O.; LINDQUIST, E.; SCHMUTZ, J.; LUCAS, S.; HARRIS, P.; POWLOWSKI, J.; BELLEMARE, A.; TAYLOR, D.; BUTLER, G.; DE VRIES, R.P.; ALLIJN, I.E.; VAN DEN BRINK, J.; USHINSKY, S.; STORMS, R.; POWELL, A.J.; PAULSEN, I.T.; ELBOURNE, L.D.; BAKER, S.E.; MAGNUSON, J.; LABOISSIERE, S.; CLUTTERBUCK, A.J.; MARTINEZ, D.; WOGULIS, M.; DE LEON, A.L.; REY, M.W.; TSANG, A. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. **Nat Biotechnol.**, v. 29, p. 922-927, 2011.

BHUNIA, B.; BASAK, B.; DEY, A. 2012. A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus spp.* **Journal of Biochemical Technology**, v. 3, p. 448-457, 2012.

BI, F.; BARAD, S.; MENT, D.; LURIA, N.; DUBEY, A.; CASADO, V.; GLAM, N.; MÍNGUEZ, J.D.; ESPESO, E.A.; FLUHR, R.; PRUSKY, D. Carbon regulation of environmental pH by secreted small molecules that modulate pathogenicity in phytopathogenic fungi. **Mol. Plant. Pathol.**, v.17, p.1178-1195, 2016.

BONINE, B.M. **Produção de lipase pelo fungo *Myceliophthora sp.* F. 2.1.4, caracterização e imobilização da solução enzimática bruta.** Dissertação (Mestrado). São José do Rio Preto: 2011, 74 p.

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, p. 54, 2010. doi:10.1186/1471-2164-11-584.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAVO-RUIZ, G.; RUIZ-ROLDÁN, C.; RONCERO, M.I.G. Lipolytic System of the Tomato Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **MPMI**, v. 26, p.1054–1067, 2013.

BUGEJA, H.E; HYNES, M.J.; ANDRIANOPOULOS, A. AreA controls nitrogen source utilisation during both growth programs of the dimorphic fungus *Penicillium marneffeii*. **Fungal biology**, v. 116, p. 145-154, 2012.

CANILHA, L.; CHANDEL, A.K.; MILESSI, T.S.S.; ANTUNES, F.A.F.; FREITAS, W.L.C.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, Article ID 989572, 15 páginas, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1155/2012/989572>

CARACUEL, Z.; RONCERO, M.I.G; ESPESO, E.A.; GONZÁLEZ-VERDEJO, C.I.; GARCÍA-MACEIRA, F.I.; DI PIETRO, A. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. **Molecular Microbiology**, v. 48, p. 765–779, 2003.

CASTELLANI A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **J Trop Med & Hyg**, v. 42, p. 225-226, 1939.

CHAMBERGO, F.S.; VALENCIA, E.Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 100, p. 2567-2577, 2016.

CHANDRASEKARAN, M.; THANGAVELUSE, B.; CHUN, S.C.; SATHIYABAMA, M. Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity. **Journal of General Plant Pathology**, v.82, p. 233–239, 2016.

CORADI, G.V.; VISITAÇÃO, V.L.; LIMA, E.A.; SAITO, L.Y.T.; PALMIERI, D.A.; TAKITA, M.A.; NETO, P.O.; LIMA, V.M.G. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. **Ann Microbiol.**, v. 63, p. 533-540, 2013.

COSTON, M.B.; LOOMIS, W.F.JR. Isozymes of beta-glucosidase in *Dictyostelium discoideum*. **J Bacteriol.**, v. 100, p. 1208-1217, 1969.

CULLETON, H.; MCKIE, V.; DE VRIES, R.P. Physiological and molecular aspects of degradation of plant polysaccharides by fungi: What have we learned from *Aspergillus*? **Biotechnol J.**, v. 8, p. 884-94, 2013.

DAOU, M.; FAULDS, C.B. Glyoxal oxidases: their nature and properties. **World J Microbiol Biotechnol.**, v. 33, p. 87, 2017. doi: 10.1007/s11274-017-2254-1.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; SYED, T.A.; QIN, W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **Int J Biochem Mol Biol.**, v. 1, p. 36-50, 2010.

DEAN, R.; VAN KAN, J.A.L.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D.; RUDD, J.J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v.13, p. 414–430, 2012.

DENG, G.-M.; YANG, Q.-S.; HE, W.-D.; LI, C.-Y.; YANG, J.; ZUO, C.-W.; GAO, J.; SHENG, O.; LU, S.-Y.; ZHANG, S.; YI, G.-J. Proteomic analysis of conidia germination in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 reveals new targets in ergosterol biosynthesis pathway for controlling Fusarium wilt of banana. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 99, p. 7189–7207, 2015.

DENNING, D.W.; BROMLEY, M.J. How to bolster the antifungal pipeline. **Science**, v. 347, p. 1414-1416, 2015.

DI PIETRO, A.; GARCÍA-MACEIRA, F.I.; MÉGLECZ, E.; RONCERO, M.I.G. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. **Mol. Microbiol.**, v. 39, p. 1140–1152, 2001.

DI PIETRO, A.; MADRID, M.P.; CARACUEL, Z.; DELGADO-JARANA, J.; RONCERO, M.I.G. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. **Mol. Plant Pathol.**, v.4, p.315–325, 2003.

DOYLE, S. Fungal proteomics: from identification to function. **FEMS Microbiology Letters**, v.321, p.1–9, 2011.

EL-ENSHASY, H. A. Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. In: Yang, S.T. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. 1 ed. Oxford: Elsevier B.V., 2007. Capítulo 9.

EL-SHISHTAWY, R.M.; MOHAMED, S.A.; ASIRI, A.M.; GOMAA, A-B.M.; IBRAHIM, I.H.; AL-TALHI, H.A. Saccharification and hydrolytic enzyme production of alkali pre-treated wheat bran by *Trichoderma virens* under solid state fermentation. **BMC Biotechnology**, v. 15, p. 37, 2015. doi 10.1186/s12896-015-0158-4

FACCHINI, F.D.A.; VICI, A.C.; PEREIRA, M.G.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Enhanced lipase production of *Fusarium verticillioides* by using response surface methodology and wastewater pretreatment application. **J Biochem Technol.**, v. 6, p. 996-1002, 2015.

FANG, H.; ZHAO, C.; SONG, X.Y. Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. **Bioresour. Technol.**, v.101, p.4111-4119, 2010.

FANG, X.; BARBETTI, M.J. Differential protein accumulations in isolates of the strawberry wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* differing in virulence. **Journal of Proteomics**, v. 108, p. 223-237, 2014. doi: 10.1016/j.jprot.2014.05.023.

FANG, X.; CHEN, J.; DAI, L.; MA, H.; ZHANG, H.; YANG, J.; WANG, F.; YAN, C. Proteomic dissection of plant responses to various pathogens. **Proteomics**, v. 15, p. 1525–1543, 2015.

FLECK, C.B.; SCHOBEL, F.; BROCK, M. Nutrient acquisition by pathogenic fungi: nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p. 400–407, 2011.

- FLORENCIO, C.; CUNHA, F.M.; BADINO, A.C.; FARINAS, C.S.; XIMENES, E.; LADISCH, M.R. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: Enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 90, p. 53-60, 2016.
- FRAVEL, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. **New Phytologist**, v. 157, p. 493-502, 2003.
- FREESE, S.; VOGTS, T.; SPEER, F.; SCHÄFER, B.; PASSOTH, V.; KLINNER, U. C- and N-catabolic utilization of tricarboxylic acid cycle-related amino acids by *Scheffersomyces stipitis* and other yeasts. **Yeast**, v.28, p.375–390, 2011.
- GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresour Technol.**, v. 99, p. 7623-7629, 2008.
- GAO, T.; CHEN, J.; SHI, Z. *Fusarium graminearum* pyruvate deshydrogenase kinase 1 (FgPDK1) Is Critical for Conidiation, Mycelium Growth, and Pathogenicity. **PLoS ONE**, v. 11, p. e0158077, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158077>
- GIESE, H.; SONDERGAARD, T.E.; SØRENSEN, J.L. The AreA transcription factor in *Fusarium graminearum* regulates the use of some nonpreferred nitrogen sources and secondary metabolite production. **Fungal biology**, v.117, p. 814-821, 2013.
- GLASS, N.L.; SCHMOLL, M.; CATE, J.H.D.; CORADETTI, S. Plant Cell Wall Deconstruction by Ascomycete Fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, p. 477-498, 2013.
- GÓMES-MENDOZA, D.P.; JUNQUEIRA, M.; DO VALE, L.H.F.; DOMONT, G.B.; FERREIRA FILHO, E.X.; DE SOUZA, M.V.; RICART, C.A.O. Secretomic survey of *Trichoderma harzianum* grown on plant biomass substrates. **Journal of Proteome Research**, v. 13, p. 1810-1822, 2014.
- GONÇALVES, H.B.; JORGE, J.A.; GUIMARÃES, L.H.S. Production and Characterization of an Extracellular β -d-Frucosyltransferase from *Fusarium graminearum* During Solid-State Fermentation Using Wheat Bran as a Carbon Source. **J Food Biochem.**, v. 40, p. 655-663, 2016.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; ALORIA, K.; VALERO-GALVÁN, J.; REDONDO, I.; ARIZMENDI, J. M.; JORRÍN-NOVO, J. V. Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains. **Journal of Proteomics**, v. 97, p. 195–221, 2014.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; JORRÍN-NOVO, J.V. Contribution of Proteomics to the Study of Plant Pathogenic Fungi. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 3–16, 2012.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; VALERO-GALVÁN, J.; GÓMEZ-GÁLVEZ, F.J.; JORRÍN-NOVO, J.V. Unraveling the *in vitro* secretome of the phytopathogen *Botrytis cinerea* to understand the interaction with its hosts. **Front. Plant. Sci.**, v. 6, p. 839, 2015.
- GREENBAUM, D.; LUSCOMBE, N.M.; JANSEN, R.; QIAN, J.; GERSTEIN, M. Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome: 'oming in on function. **Genome Research**, v. 11, p. 1463–1468, 2001.

GREENBERG, J.R.; PRICE, N.P.; OLIVER, R.P.; SHERMAN, F.; RUSTCHENKO, E. *Candida albicans* SOU1 encodes a sorbose reductase required for L-sorbose utilization. **Yeast.**, v. 22, p. 957-969, 2005.

GRIFFIN, T.J.; GOODLETT, D.R.; AEBERSOLD, R. Advances in proteome analysis by mass spectrometry. **Curr Opin Biotechnol**, v. 12, p. 607–612, 2001.

HÄKKINEN, M.; SIVASIDDARTHAN, D.; ARO, N.; SALOHEIMO, M.; PAKULA, T.M. The effects of extracellular pH and of the transcriptional regulator PACI on the transcriptome of *Trichoderma reesei*. **Microb Cell Fact.**, v. 14, p. 63, 2015. doi: 10.1186/s12934-015-0247-z.

HAMANN, A.; BRUST, D.; OSIEWACZ, H.D. Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing. **Trends Microbiol.**, v. 16, p. 276-283, 2008.

HAMIN NETO, Y.A.A.; COITINHO, L.B.; DE FREITAS, L.A.P.; CABRAL, H. Box-Behnken analysis and storage of spray-dried collagenolytic proteases from *Myceliophthora thermophila* submerged bioprocess. **Prep Biochem Biotechnol.**, v. 47, p. 473-480, 2017.

HASUNUMA, T.; OKAZAKI, F.; OKAI, N.; HARA, K.Y.; ISHII, J.; KONDO, A. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 513–522, 2013.

HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, E.M.; RIOS-LATORRE, R.A.; ÁLVAREZ-CERVANTES, J.; LOERA-CORRAL, O.; ROMÁN-GUTIÉRREZ, A.D.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; MERCADO-FLORES, Y. Xylanases, Cellulases, and Acid Protease Produced by *Stenocarpella maydis* Grown in Solid-state and Submerged Fermentation. **BioResources.**, v. 9, p. 2341-2358, 2014.

HOUTERMAN, P.M.; SPEIJER, D.; DEKKER, H.L.; DE KOSTER, C.G.; CORNELISSEN, B.J.C.; REP, M. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. **Mol. Plant Pathol.**, v.8, p.215–221, 2007.

HUBERMAN, L.B.; LIU, J.; QIN, L.; GLASS, N.L. Regulation of the lignocellulolytic response in filamentous fungi. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, p. 101-111, 2016.

HYNES, M.J.; MURRAY, S.L. ATP-Citrate Lyase Is Required for Production of Cytosolic Acetyl Coenzyme A and Development in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryot Cell.**, v. 9, p. 1039–1048, 2010.

INOUE, S.; TURGEON, B.G.; YODER, O.C.; AIST, J.R.. Role of fungal dynein in hyphal growth, microtubule organization, spindle pole body motility and nuclear migration. **Journal of Cell Science**, v. 111, p. 1555-1566, 1998.

JASHNI, M.K.; DOLS, I.H.M.; IIDA, Y.; BOEREN, S.; BEENEN, H.G.; MEHRABI, R.; COLLEMARE, J.; DE WIT, P.J.G.M. Synergistic action of a metalloprotease and a serine protease from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* cleaves chitin-binding tomato chitinases, reduces their antifungal activity, and enhances fungal virulence. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 28, p. 996–1008, 2015.

JÖNSSON, L.J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.-O.. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnol Biofuels.**, v. 6, p. 16, 2013. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>

- KARNAOURI, A.; TOPAKAS, E.; ANTONOPOULOU, I.; CHRISTAKOPOULOS, P. Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila*. **Front. Microbiol.**, v. 5, p. 281, 2014.
- KAUR G, SINGH S, SINGH H, CHAWLA M, DUTTA T, KAUR H, BENDER K, SNEDDEN WA, KAPOOR S, PAREEK A, SINGH P. Characterization of Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase- and Calmodulin-Binding Activity of a Cytosolic Arabidopsis thaliana Cyclophilin AtCyp19-3. **PLoS One.**, v. 10, p. e0136692, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0136692.
- KIM, Y.; NANDAKUMAR, M.P.; MARTEN, M.R. Proteomics of filamentous fungi. **Trends Biotechnol.**, v. 25, p. 395-400, 2007.
- KIM, Y.; NANDAKUMAR, M.P.; MARTEN, M.R. The state of proteome profiling in the fungal genus *Aspergillus*. **Briefings in the functional genomics and proteomics**, v. 7, p. 87-94, 2008.
- KNIEMEYER, O. Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. *Proteomics*, v. 11, p. 3232-3243, 2011.
- KOSALKOVÁ, K.; GARCÍA-ESTRADA, C.; BARREIRO, C.; FLÓREZ, M.G.; JAMI, M.S.; PANIAGUA, M.A.; MARTÍN, J.F. Casein phosphopeptides drastically increase the secretion of extracellular proteins in *Aspergillus awamori*. Proteomics studies reveal changes in the secretory pathway. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 5, 2012. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-5>
- KRAPPMANN, S.; BRAUS, G.H. Nitrogen metabolism of *Aspergillus* and its role in pathogenicity. **Medical Mycology**, v. 43, p. S31-S40, 2005.
- KROLL, K.; PÄHTZ, V.; KNIEMEYER, O. Elucidating the fungal stress response by proteomics. *J. Proteomics.*, v. 97, p. 151–163, 2014.
- KUBICEK, C.P.; KUBICEK, E.M. Enzymatic deconstruction of plant biomass by fungal enzymes. **Curr Opin Chem Biol**, v. 35, p. 51–57, 2016
- KUBICEK, C.P.; STARR, T.L.; GLASS, N.L. Plant Cell Wall–Degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, p. 427-451, 2014.
- KUHAD, R.C.; MANCHANDA, M.; SINGH, A. Hydrolytic potential of extracellular enzymes from a mutant strain of *Fusarium oxysporum*. **Bioprocess. Biosyst. Eng.**, v. 20, p. 133-135, 1999.
- LA TORRE, I.; RAVELO, M.; SEGARRA, S.; TORTAJADA, M.; SANTOS, V.E.; LADERO, M. Study on the effects of several operational variables on the enzymatic batch saccharification of orange solid waste. **Bioresour Technol.**, v. 245, p. 906-915, 2017.
- LEE, S.H.; KIM, Y.K.; YUN, S.H.; LEE, Y.W. Identification of differentially expressed proteins in a mat1-2-deleted strain of *Gibberella zeae* using a comparative proteomics analysis. **Current Genetics**, v. 53, p. 175–184, 2008.
- LI, B.; WANG, W.; ZONG, Y.; QIN, G.; TIAN, S. Exploring Pathogenic Mechanisms of *Botrytis cinerea* Secretome under Different Ambient pH Based on Comparative Proteomic Analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 4249–4260, 2012.

- LI, E.; LING, J.; WANG, G.; XIAO, J.; YANG, Y.; MAO, Z.; WANG, X.; XIE, B. Comparative Proteomics Analyses of Two Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* that Differ in Pathogenicity. **Scientific Reports**, v. 5, p. 13663, 2015.
- LI, J.; JIA, B.; LIANG, X.; LIU, J.; WANG, Y.; LIANG, X.; YAN, H.; WANG, Y.; ZHANG, S. An adenosine kinase in apoplastic location is involved in *Magnaporthe oryzae* cold acclimation. **J Basic Microbiol.**, v. 54, p. 269-177, 2014.
- LIAO, H.; FAN, X.T.; MEI, X.; WEI, Z.; RAZA, W.; SHEN, Q.; XU, Y. Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification. **Biomass and Bioenergy**, v. 74, p. 122-134, 2015.
- LIMA, F.B.; FÉLIX, C.; OSÓRIO, N.; ALVES, A.; DOMINGUES, P.; RIBEIRO, R.T.S.; ESTEVES, A.C. *Trichoderma harzianum* T1A constitutively secretes proteins involved in the biological control of *Guignardia citricarpa*. **Biological Control**, v. 106, p. 99-109, 2017.
- LOBEDANZ, S.; DAMHUS, T.; BORCHERT, T.V.; HANSEN, T.T.; LUND, H.; LAI, W., LIN, M.; LECLERC, M.; KIRK, O. Enzymes in Industrial Biotechnology. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, p.1–73, 2016. DOI: 10.1002/0471238961.0914042114090512.a01.pub3
- LOMBARD, V.; RAMULU, H.G.; DRULA, E.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Res**, v. 42, p. D490–D495, 2014.
- LOPES, A.M.; OLIVEIRA-NASCIMENTO, L.; RIBEIRO, A.; TAIRUM JR, C.A.; BREYER, C.A.; OLIVEIRA, M.A.; MONTEIRO, G.; SOUZA-MOTTA, C.M.; MAGALHÃES, P.O.; AVENDAÑO, J.G.F.; CAVACO-PAULO, A.M.; MAZZOLA, P.G.; RANGEL-YAGUI, C.O.; SETTE, L.D.; CONVERTI, A.; PESSOA, A. Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, p.82-99, 2015.
- LÓPEZ-CRUZ, J.; ÓSCAR, C.S.; EMMA, F.C.; PILAR, G.A.; CARMEN, G.B. Absence of Cu-Zn superoxide dismutase BCSOD1 reduces *Botrytis cinerea* virulence in *Arabidopsis* and tomato plants, revealing interplay among reactive oxygen species, callose and signalling pathways. **Mol. Plant. Pathol.**, v. 18, p. 16-31, 2017.
- 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, p.23, 2010.
- MACÍAS-SÁNCHEZ, K.L.; GARCÍA-SOTO, J.; RONCERO, M.I.G.; HERNÁNDEZ-MONJARAZ, W.; CAUDILLO-PÉREZ, C.; MARTÍNEZ-CADENA, M.G. Isolation and Expression of Enolase Gene in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.175, p.902–908, 2015.
- MÄKELÄ, M.K.; HILDÉN, K.; HATAKKA, A.; LUNDELL, T.K. Oxalate decarboxylase of the white-rot fungus *Dichomitus squalens* demonstrates a novel enzyme primary structure and non-induced expression on wood and in liquid cultures. **Microbiology**, v.155, p.2726-2738, 2009.
- MANTEAU, S.; ABOUNA, S.; LAMBERT, B.; LEGENDRE, L. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v.43, p.359-366, 2003.

MARTELLI-TOSI, M.; TORRICILLAS, M.S.; MARTINS, M.A.; DE ASSIS, O.B.G.; TAPIA-BLÁCIDO, D.R. Using Commercial Enzymes to Produce Cellulose Nanofibers from Soybean Straw. **J Nanomater.**, v. 2016, Article ID 8106814, 10 páginas, 2016.

MARTIN, N.; GUEZ, M.A.; SETTE, L.D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by a Brazilian thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in solid-state and submerged fermentation. **Mikrobiologija**, v. 79, p. 321-328, 2010.

MAZUMDER, S.; BASU, S.K.; MUKHERJ, M. Laccase production in solid-state and submerged fermentation by *Pleurotus ostreatus*. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, p. 45-52, 2009.

MERALI, Z.; COLLINS, S.R.; ELLISTON, A.; WILSON, D.R.; KÄSPER, A.; WALDRON, K.W. Characterization of cell wall components of wheat bran following hydrothermal pretreatment and fractionation. **Biotechnol Biofuels.**, v. 8, p. 23, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0207-1>

MEYER, V.; ANDERSEN, M.R.; BRAKHAGE, A.A.; BRAUS, G.H.; CADDICK, M.X.; CAIRNS, T.C.; DE VRIES, R.P.; HAARMANN, T.; HANSEN, K.; HERTZ-FOWLER, C.; KRAPPMANN, S.; MORTENSEN, U.H.; PEÑALVA, M.A.; RAM, A.F.J.; HEAD, R.M. Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. **Fungal Biol Biotechnol.**, v. 3, p. 6, 2016. doi: 10.1186/s40694-016-0024-8.

MEYERS, S. P.; AHEARN, D. G. Extracellular proteolysis by *Candida lipolytica*. **Mycologia**, v. 69, p. 646-651, 1977.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Adv Biochem Eng Biotechnol.**, v. 68, p. 61-138, 2000.

MUNZI, S.; SHEPPARD, L.J.; LEITH, I.D.; CRUZ, C.; BRANQUINHO, C.; BINI, L.; GAGLIARDI, A.; CAI, G.; PARROTTA, L. The cost of surviving nitrogen excess: energy and protein demand in the lichen *Cladonia portentosa* as revealed by proteomic analysis. **Planta**, v. 245, p. 819-833, 2017.

NADLER, W.M.; WAIDELICH, D.; KERNER, A.; HANKE, S.; BERG, R.; TRUMPP, A.; RÖSLI, C. MALDI versus ESI: The Impact of the Ion Source on Peptide Identification. **J. Proteome Res.**, v. 16, p. 1207–1215, 2017.

NAVARRETE, M.; CALLEGARI, E.; EYZAGUIRRE, J. The effect of acetylated xylan and sugar beet pulp on the expression and secretion of enzymes by *Penicillium purpurogenum*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.93, p.723–741, 2012.

NETO, Y.A.; DE OLIVEIRA, L.C.; DE OLIVEIRA, A.H.; ROSA, J.C.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; RODRIGUES, A.; CABRAL, H. Determination of Specificity and Biochemical Characteristics of Neutral Protease Isolated from *Myceliophthora thermophila*. **Protein Pept Lett.**, v. 22, p. 972-982, 2015.

NIAZ, M.; IFTIKHAR, T.; QURESHI, F.F.; NIAZ, M. Extracellular lipase production by *Aspergillus nidulans* MBL-S-6; under submerged fermentation. **Int J Agric Biol.**, v. 16, p. 536-542, 2014.

NING, Y.J.; WANG, S.S.; CHEN, Q.J.; LING, Z.R.; WANG, S.N.; WANG, W.P.; ZHANG, G.Q.; ZHU, M.J. An extracellular yellow laccase with potent dye decolorizing ability from the fungus *Leucoagaricus naucinus* LAC-04. **Int J Biol Macromol.**, v. 93, p. 837-842, 2016.

NORMILE, D. Spoiling for a Fight With Mold. **Science**, v. 327, p. 807, 2010. doi: 10.1126/science.327.5967.807

NOVOZYMES, 2017. **Novozymes: Quality Environmentally-Friendly Enzymes**. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=14572954>. Acesso em 07 de novembro de 2017.

OBRUCA, S.; MAROVA, I.; MATOUSKOVA, P.; HARONIKOVA, A.; LICHNOVA, A. Production of lignocellulose-degrading enzymes employing *Fusarium solani* F-552. **Folia Microbiol.**, v. 57, p. 221-227, 2012.

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

OLAJUYIGBE, F.M.; NLEKEREM, C.M.; OGUNYEW, O.A. Production and Characterization of Highly Thermostable β -Glucosidase during the Biodegradation of Methyl Cellulose by *Fusarium oxysporum*. **Biochem Res Int.**, v. 2016, Article ID 3978124, 8 páginas, 2016.

OLIVEIRA, A.P.A.; SILVESTRE, M.A.; GARCIA, N.F.L.; ALVES-PRADO, H.F.; RODRIGUES, A.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. Production and Catalytic Properties of Amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by Solid-State Fermentation. **The Scientific World Journal**, v. 2016, Article ID 7323875, 10 páginas, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7323875>.

OLIVEIRA, B.H.; LIMA, V.M.G. Chicken fat and inorganic nitrogen source for lipase production by *Fusarium* sp. *Gibberella fujikuroi* complex. **Afr J Biotechnol.**, v. 13, p. 1393-1401, 2014.

OLIVEIRA, J.M.P.F.; van PASSEL, M.W.J.; SCHAAP, P.J.; de GRAAFF, L.H. Proteomic Analysis of the Secretory Response of *Aspergillus niger* to D-Maltose and D-Xylose. **PLoS ONE**, v. 6, p. e20865, 2011.

OLIVEIRA, J.M.P.F.; GRAAFF, L.H. Proteomics of industrial fungi: trends and insights for biotechnology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 89, p. 225-237, 2011.

ORDAZ-HERNÁNDEZ, A.; ORTEGA-SÁNCHEZ, E.; MONTESINOS-MATÍAS, R.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; TORRES-MARTÍNEZ, D.; LOERA, O. Morphological and enzymatic response of the thermotolerant fungus *Fomes* sp. EUM1 in solid state fermentation under thermal stress. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 363, pii: fnw177, 6 páginas, 2016.

ORTEGA, L.M.; KIKOT, G.E.; ASTORECA, A.L.; ALCONADA, T.M. Screening of *Fusarium graminearum* Isolates for Enzymes Extracellular and Deoxynivalenol Production. **J. Mycology.**, 2013, Article ID 358140, 2013.

PEDRI, Z.C.; LOZANO, L.M.S.; HERMANN, K.L.; HELM, C.V.; PERALTA, R.M.; TAVARES, L.B.B. Influence of nitrogen sources on the enzymatic activity and grown by *Lentinula edodes* in biomass *Eucalyptus benthamii*. **Braz J Biol.**, v. 75, p. 940-947, 2015.

PEÑALVA, M.A.; TILBURN, J.; BIGNELL, E.; JR ARST, H.N. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 291-300, 2008.

PEREIRA, J.C.; MARQUES, N.P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T.B.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; GOMES, E.; BOCCHINI, D.A.M. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **J Appl Microbiol.**, v. 118, p. 928-939, 2015.

PEREIRA, J.C.; TRAVAINI, R.; MARQUES, N.P.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S.; BOCCHINI, D.A.M. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. **Bioresour Technol.**, v. 204, p. 122-129, 2016.

PEREIRA, M.G.; VICI, A.C.; FACCHINI, F.D.A.; TRISTÃO, A.P.; CURSINO-SANTOS, J.R.; SANCHES, P.R.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Screening of filamentous fungi for lipase production: *Hypocrea pseudokoningii* a new producer with a high biotechnological potential. **Biocat. Biotransf.**, v. 32, p. 74-83, 2014.

PESSÔA, M.G.; PAULINO, B.N.; MANO, M.C.R.; NERI-NUMA, I.A.; MOLINA, G.; PASTORE, G.M.; *Fusarium* species - a promising tool box for industrial biotechnology. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 101, p. 3493-3511, 2017.

PETERSEN, T.N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, p. 785-786, 2011. doi: 10.1038/nmeth.1701

PORTUGAL-PEREIRA, J.; SORIA, R.; RATHMANN, R.; SCHAEFFER, R.; SZKLO, A. Agricultural and agro-industrial residues-to-energy: Technoeconomic and environmental assessment in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 521-533, 2015.

POTTERS, G.; VAN GOETHEM, D.; SCHUTTE, F. Promising Biofuel Resources: Lignocellulose and Algae. **Nature Education**, v. 3, p. 14, 2010.

RABILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 1829-1841, 2011.

RAMANJANEYULU, G.; REDDY, B.R. Optimization of Xylanase Production through Response Surface Methodology by *Fusarium* sp. BVKT R2 Isolated from Forest Soil and Its Application in Saccharification. **Front Microbiol.**, v. 7, Article 1450, 16 páginas, 2016.

RATHORE, S.S.; SAXENA, S.N.; SHRMA, Y.K.; MISHRA, B.K.; SINGH, B. Effect of pH and salt levels on growth of *Fusarium oxysporum* f.sp.cumini isolate from cumin. **Int. J. Seed Species**, v. 5, p. 100-101, 2015.

RAVALASON, H.; GRISEL, S.; CHEVRET, D.; FAVEL, A.; BERRIN, J.G.; SIGOILLOT, J.C.; HERPOËL-GIMBERT, I. *Fusarium verticillioides* secretome as a source of auxiliary enzymes to enhance saccharification of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 589-596, 2012.

RAVEENDRAN, K.; GANESH, A.; KHILAR, K.C. Influence of mineral matter on biomass pyrolysis characteristics. **Fuel.**, v. 74, p. 1812-1822, 1995.

REDDY, M.P.; SARITHA, K.V. Bio-catalysis of mango industrial waste by newly isolated *Fusarium* sp. PSTF1; for pectinase production. **3 Biotech.**, v. 5, p. 893-900, 2015.

- REIS, L.; RITTER, C.E.T.; FONTANA, R.C.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P. Statistical optimization of mineral salt and urea concentration for cellulose and xylanase production by *Penicillium echinulatum* in submerged fermentation. **Braz J Chem Eng.**, v. 32, p. 13-22, 2015.
- ROSA-GARZON, N.G.; LAURE, H.J.; SOUZA-MOTTA, C.M.; ROSA, J.C.; CABRAL, H. Medium pH in submerged cultivation modulates differences in the intracellular protein profile of *Fusarium oxysporum*. **Prep Biochem Biotechnol.**, v. 10, p. 1-9, 2017.
- ROSSI, A.; CRUZ, A.H.; SANTOS, R.S.; SILVA, P.M.; SILVA, E.M.; MENDES, N.S.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Ambient pH sensing in filamentous fungi: pitfalls in elucidating regulatory hierarchical signaling networks. **IUBMB Life**, v.65, p.930-935, 2013.
- RUSTIGUEL, C.B.; JORGE, J.A.; GUIMARÃES, L.H.S. Characterization of a thermo-tolerant mycelial β -fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis* under submerged fermentation using wheat bran as carbon source. **Biocatal Agric Biotechnol.**,v. 4, p. 362-369, 2015.
- SALEKDEH, G.H.; KOMATSU, S. Crop proteomics: Aim at sustainable agriculture of tomorrow. **Proteomics**, v. 7, p. 2976–2996, 2007.
- SALIHU,A.; ALAM, M.Z.; KARIM, M.I.A.; SALLEH, H.M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p.36-44, 2012.
- SANCHÉZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol Adv.**, v. 27, p. 185-194, 2009.
- SANTOS, H.B.; BEZERRA, T.M.S.; PRADELLA, J.G.C.; DELABONA, P.; LIMA, D.; GOMES, E.; HARTSON, S.D.; ROGERS, J.; COUGER, B.; PRADE, R. *Myceliophthora thermophila* M77 utilizes hydrolytic and oxidative mechanisms to deconstruct biomass. **AMB Express**, v. 6, p. 103, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0276-y>
- SARATH, G.; DE LA MOTTE, R.S.; WAGNER, F.W. In **Proteolytic Enzymes: A Practical Approach**, 1996; BEYNON, R.J., BOND, J.S., Eds.; IRL Press: New York, USA, 1996; pp. 25–55.
- SARKAR, P.; SURAIISKUMAR, G.K. pH and Temperature Stresses in Bioreactor Cultures: Intracellular Superoxide Levels. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.50; p.13129-13136, 2011.
- SATO I; SHIMATANI K; FUJITA K; ABE T; SHIMIZU M; FUJII T; HOSHINO T; TAKAYA N. Glutathione reductase/glutathione is responsible for cytotoxic elemental sulfur tolerance via polysulfide shuttle in fungi. **J Biol Chem.**, v. 286, p. 20283-20291, 2011.
- SCULLY, E.D.; HOOVER, K.; CARLSON, J.; TIEN, M.; GEIB, S.M. Proteomic Analysis of *Fusarium solani* Isolated from the Asian Longhorned Beetle, *Anoplophora glabripennis*. **PLoS One.**, v.7, e32990, 2012.
- SELVIG, K.; ALSPAUGH, J.A. pH Response Pathways in Fungi: Adapting to Host-derived and Environmental Signals. **Mycobiology**, v. 39, p. 249–256, 2011.
- SERVIER. **Banco de imagens científicas**. Disponível em: <http://servier.com.br/content/slide-kit?item=7>. Acesso em 07 de novembro de 2017.

SETHI, B.K.; DIKSHIT, B.; SAHOO, S.L.; PRADHAN, C.; SENA, S.; BEHERA, B.C. Extracellular Production of Amylase and Protease by *Penicillium purpurogenum* BKS9. **Bioeng Biosci.**, v. 5, p. 1-6, 2017.

SHAHEEN, I.; BHATTI, H.N.; ASHRAF, T. Production, purification and thermal characterisation of invertase from a newly isolated *Fusarium* sp. under solid-state fermentation. **Int J Food Sci Technol.**, v. 43, p. 1152-1158, 2008.

SHARMA, V.; KAUSHIK, N.; SHARMA, S.; KUMAR V. Isolation, screening, characterization and optimization of xylanase production from thermostable alkalophilic *Fusarium* sp. XPF5. **J Biochem Technol.**, v. 7, p. 1089-1092, 2016.

SHARMIN, D.; SASANO, Y.; SUGIYAMA, M.; HARASHIMA, S. Effects of deletion of different PP2C protein phosphatase genes on stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast.**, v. 31, p. 393-409, 2014.

SIALA, R.; FRIKHA, F.; MHAMDI, S.; NASRI, M.; KAMOUN, A.S. Optimization of acid protease production by *Aspergillus niger* I1 on shrimp peptone using statistical experimental design. **Scientific World Journal.**, v. 2012, Article ID564932, 11 páginas, 2012.

SILVA, M.C.; BERTOLINI, M.C.; ERNANDES, J.R. Biomass production and secretion of hydrolytic enzymes are influenced by the structural complexity of the nitrogen source in *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus nidulans*. **Journal of Basic Microbiology**, v.41, p.269–280, 2001.

SILVA, R.R.; CABRAL, T.P.F.; RODRIGUES, A.; CABRAL, H. Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation. **Braz J Microbiol.**, v. 44, p. 235-243, 2013.

SILVA, V.C.T.; COTO, A.L.S.; SOUZA, R.C.; NEVES, M.B.S.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Effect of pH, Temperature, and Chemicals on the Endoglucanases and β -Glucosidases from the Thermophilic Fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. Obtained by Solid-State and Submerged Cultivation. **Biochem Res Int.**, v. 2016, p. 9781216, 2016. doi: 10.1155/2016/9781216.

SINGH, A.; KUMAR, P.K. *Fusarium oxysporum*: status in bioethanol production. **Crit Rev Biotechnol.**, v.11, p.129-147, 1991.

SINGH, B. *Myceliophthora thermophila* syn. *Sporotrichum thermophile*: A thermophilic mould of biotechnological potential. **Crit Rev Biotechnol**, v. 36, p. 59-69, 2016.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P.K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech.**, v. 6, p. 174, 2016. doi: 10.1007/s13205-016-0485-8

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SIQUEIRA, A.C.R. **Produção de peptidase e lipase nativas por *Fusarium oxysporum* e obtenção de uma quimera recombinante de peptidase e lipase expressa em *Pichia pastoris***. Tese (Doutorado). Ribeirão Preto: 2017, 116 p.

SMITH, L.M.; KELLEHER, N.L. The Consortium for Top Down Proteomics. Proteoform: a single term describing protein complexity. **Nature Methods**, v.10, p.186–187, 2013.

SOCCOL, C.R.; COSTA, E.S.F.; LETTI, L.A.J.; KARP, S.G.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P.S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>. No prelo.

SPALDING, M.D.; PRIGGE, S.T. Lipoic Acid Metabolism in Microbial Pathogens. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v.74, p.200–228, 2010.

SPERSCHNEIDER, J.; GARDINER, D.M.; DODDS, P.N.; TINI, F.; COVARELLI, L.; SINGH, K.B.; MANNERS, J.M.; TAYLOR, J.M. EffectorP: Predicting Fungal Effector Proteins from Secretomes Using Machine Learning. **New Phytologist**, v. 210, p. 743-761, 2015.

SUN, H.H.; FUKAO, Y.; ISHIDA, S.; YAMAMOTO, H.; MAEKAWA, S.; FUJIWARA, M.; SATO, T.; YAMAGUCHI, J. Proteomics Analysis Reveals a Highly Heterogeneous Proteasome Composition and the Post-translational Regulation of Peptidase Activity under Pathogen Signaling in Plants. **J. Proteome Res.**, v.12, p.5084–5095, 2013.

SUN, Y.; YI, X.; PENG, M.; ZENG, H.; WANG, D.; LI, B.; TONG, Z.; CHANG, L.; JIN, X.; WANG, X. Proteomics of *Fusarium oxysporum* Race 1 and Race 4 Reveals Enzymes Involved in Carbohydrate Metabolism and Ion Transport That Might Play Important Roles in Banana Fusarium Wilt. **PLoS ONE**, v.9, e113818, 2014.

SUZUKI, K. Selective autophagy in budding yeast. **Cell Death and Differentiation**, v.20, p.43–48, 2013.

TAKAHASHI, J.A; TELES, A.P.C; BRACARENSE, A.A.P.; GOMES, D.C. Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungi. **Phytochemistry Reviews**, v.12, p.773-789, 2013.

TAKESHITA, N.; MANCK, R.; GRÜN, N.; DE VEJA, S.H.; FISCHER, R. Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. **Curr Opin Microbiol.**, v.20, p.34-41, 2014.

TANG, L.H.; TAN, Q.; BAO, D.P.; ZHANG, X.H.; JIAN, H.H.; LI, Y.; YANG, R.H.; WANG, Y. Comparative Proteomic Analysis of Light-Induced Mycelial Brown Film Formation in *Lentinula edodes*. **Biomed Res Int.**, v. 2016, p. 5837293, 2016. doi: 10.1155/2016/5837293

TE BIESEBEKE, R.; BOUSSIER, A.; VAN BIEZEN, N.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J.; PUNT, P.J. Identification of secreted proteins of *Aspergillus oryzae* associated with growth on solid cereal substrates. **Journal of Biotechnology**, v.121, p.482–485, 2006.

TEICHERT, S.; WOTTAWA, M.; SCHÖNIG, B.; TUDZYNSKI, B. Role of the *Fusarium fujikuroi* TOR kinase in nitrogen regulation and secondary metabolism. **Eukaryot Cell.**, v. 5, p. 1807-1819, 2006.

TEN HAVE, A.; ESPINO, J.J; DEKKERS, E.; VAN SLUYTER, S.C.; BRITO, N.; KAY, J.; GONZÁLEZ, C.; VAN KAN, J.A.L. The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family. **Fungal Genetics and Biology**, v.47, p.53–65, 2010.

TER SCHURE, E.G.; VAN RIEL, N.A.W.; VERRIPS, C.T. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.67-83, 2000.

THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. Gene Ontology Consortium: going forward. **Nucleic Acids Research**, v.43, p.D1049–D1056., 2015.

- THOMAS, L.; PARAMESWARAN, B.; PANDEY, A. Hydrolysis of pretreated rice straw by an enzyme cocktail comprising acidic xylanase from *Aspergillus* sp. for bioethanol production. **Renew Energy**, v. 98, p. 9-15, 2016.
- THOMPSON, D.M.; PARKER, R. The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Biol.**, v. 185, p. 43-50, 2009. doi: 10.1083/jcb.200811119.
- TRAN, L.H.; NAGANO, H. Isolation and Characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and its Collagenase Production. **J Food Sci.**, v. 67, p. 1184-1187, 2002.
- TUDZYNSKI, B. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. **Front Microbiol.**, v. 5, p. 656, 15 páginas, 2014.
- TYAGI, S.; PAUDEL, R. Effect of different pH on the growth and sporulation of *Fusarium oxysporum*: The causal organism of wilt disease of Tomato. **International Journal of Basic and Applied Biology (IJBAB)**, v.2, p.103-106, 2014.
- VAN DEN HOMBERGH, J.P.; VAN DE VONDERVOORT, P.J.; FRAISSINET-TACHET, L.; VISSER, J. *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. **Trends Biotechnol.**, v.15, p.256-263, 1997.
- VILELA, L.F.; ARAUJO, V.P.G.; PAREDES, R.S.; BOM, E.P.S.; TORRES, F.A.G.; NEVES, B.C.; ELEUTHERIO, E.C.A. Enhanced xylose fermentation and ethanol production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. **AMB Express**, v.5, p.16, 2015. doi: 10.1186/s13568-015-0102-y
- VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C.N.; RÓMERO-GOMEZ, S.J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGURD, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 157-167, 2003.
- VYLKOVA S. Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. **PLoS Pathog.**, v. 13, p. e1006149, 2017. doi: 10.1371/journal.ppat.1006149.
- WANG, K.; ZHANG, X.; GOATLEY, M.; ERVIN, E. Heat Shock Proteins in Relation to Heat Stress Tolerance of Creeping Bentgrass at Different N Levels. **PLoS One**, v.9, e102914, 2014.
- WATANABE, T.; FUJIWARA, T.; UMEZAWA, T.; SHIMADA, M.; HATTORI, T. Cloning of a cDNA encoding a NAD-dependent formate dehydrogenase involved in oxalic acid metabolism from the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota* and its gene expression analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 279, p. 64–70, 2008.
- WEBER, S.S.; PARENTE, A.F.; BORGES, C.L.; PARENTE, J.A.; BAILÃO, A.M.; SOARES, C.M.A. Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides* mycelia and yeast cells. **PLoS One**, v. 7, p. e52470, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0052470.
- WELFLE, A. Balancing growing global bioenergy resource demands - Brazil's biomass potential and the availability of resource for trade. **Biomass Bioenergy**, v. 105, p. 83-95, 2017.
- WERNER, T. Promoters can contribute to the elucidation of protein function. **Trends Biotechnology**, v.21, p.9–13, 2003.

WINTERBERG, B.; FALL, L.A.D.; SONG, X.; PASCOVICI, D.; CARE, N.; MOLLOY, M.; OHMS, S.; SOLOMON, P.S. The necrotrophic effector protein SnTox3 re-programs metabolism and elicits a strong defence response in susceptible wheat leaves. **BMC Plant Biology**, v.14, 215, 2014.

WU, C.C.; MACCOSS, M.J. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. **Curr Opin Mol Ther.**, v. 4, p. 242-250, 2002.

YIKE, I. Fungal Proteases and Their Pathophysiological Effects. **Mycopathologia**, v.171, p.299–323, 2011.

ZANPHORLIN, L.M.; FACCHINI, F.D.; VASCONCELOS, F.; BONUGLI-SANTOS, R.C.; RODRIGUES, A.; SETTE, L.D.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **J Microbiol.**, v. 48, p. 331-336, 2010.

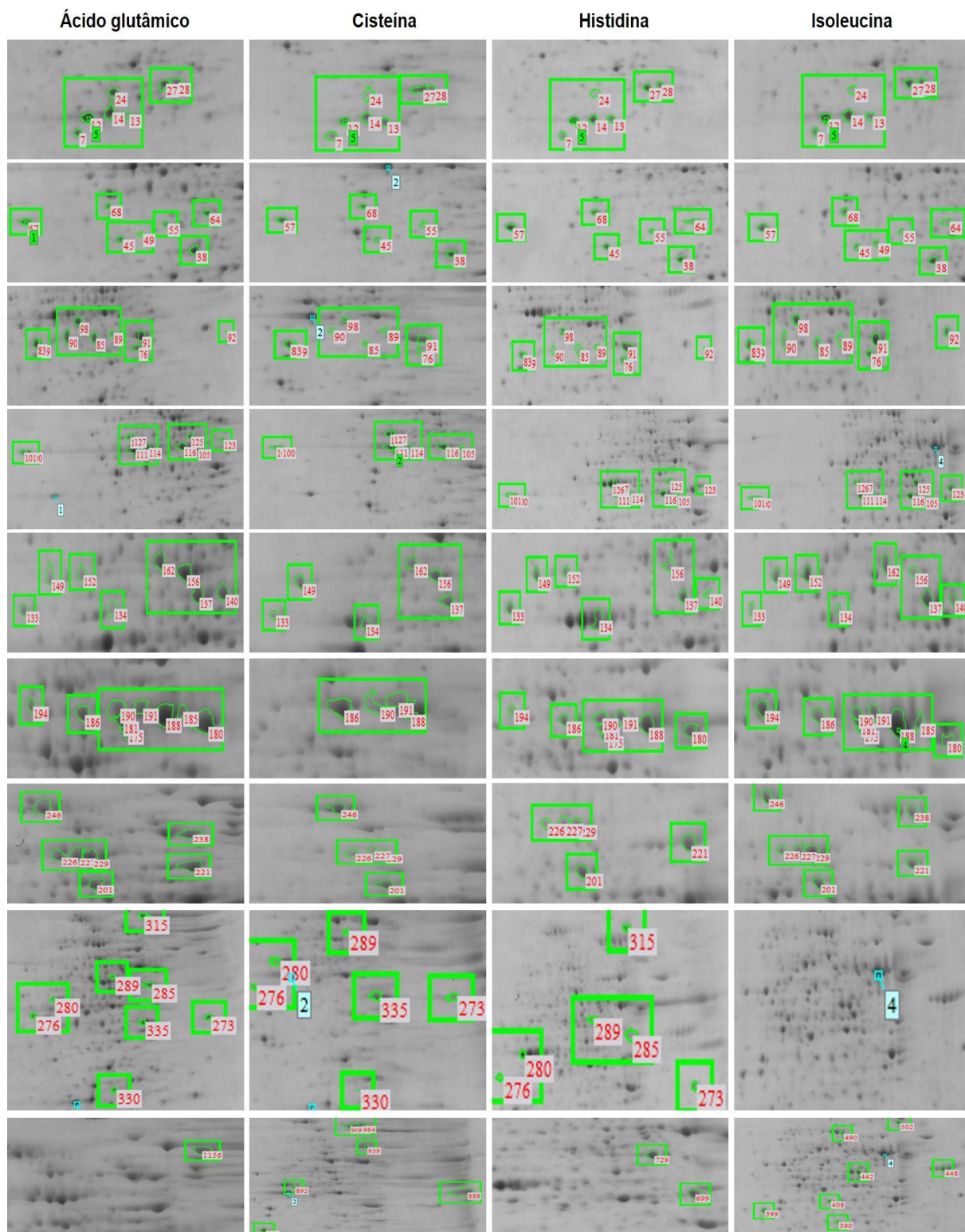
ZHANG, X.; FU, J.; HIROMASA, Y.; PAN, H.; BAI, G. Differentially Expressed Proteins Associated with Fusarium Head Blight Resistance in Wheat. **PLoS One.**, v.8, e82079, 2013.

ZHAO, G.; HOU, L.; YAO, Y.; WANG, C.; CAO, X. Comparative proteome analysis of *Aspergillus oryzae* 3.042 and *A. oryzae* 100–8 strains: Towards the production of different soy sauce flavors. **Journal of Proteomics**, v. 75, p.3914-3924, 2012.

ZHOU, P.; ZHANG, G.; CHEN, S.; JIANG, Z.; TANG, Y.; HENRISSAT, B.; YAN, Q.; YANG, S.; CHEN, C.F.; ZHANG, B.; DU, Z. Genome sequence and transcriptome analyses of the thermophilic zygomycete fungus *Rhizomucor miehei*. **BMC Genomics.**, v. 15, p. 294, 2014. doi: 10.1186/1471-2164-15-294.

ZHU, D.; ZHANG, P.; XIE, C.; ZHANG, W.; SUN, J.; QIAN, W.-J.; YANG, B. Biodegradation of alkaline lignin by *Bacillus ligniniphilus* L1. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, p. 44, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0735-y>

APÊNDICE A - Spots identificados dos géis bidimensionados com os perfis de proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com aminoácidos



Os spots foram demarcadas em verde e as respectivas identificações com números em vermelho. As marcações foram realizadas no *software* de análise Image Master 2D Platinum v7.0

Fonte: Elaborado pela autora.

APÊNDICE B – Quadro com as informações adicionais das proteínas identificadas no secretoma de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com caseína ou farinha de pena realizadas com o *software* Scaffold 4.8.4

| Proteína (*) | Número de acesso | MM (kDa) | Teste de Fisher (p-valor) | Perfil quantitativo | Espectros normalizados | | Probabilidade de identificação (%) | |
|---|-------------------|----------|---------------------------|---------------------|------------------------|----|------------------------------------|-----|
| | | | | | Cas | FP | Cas | FP |
| <i>Subtilisin</i> | X0B8T7_FUSOX (+1) | 42 | 0,0047 | Aumentado em FP | 0 | 6 | | 100 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0BM87_FUSOX | 18 | < 0,00010 | Aumentado em FP | 0 | 18 | | 100 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0BMV8_FUSOX | 61 | < 0,00010 | Aumentado em FP | 0 | 19 | | 100 |
| <i>Trypsin</i> | X0BRZ0_FUSOX | 25 | < 0,00010 | Aumentado em FP | 0 | 15 | | 100 |
| <i>Ribonuclease T2 family protein</i> | X0BT45_FUSOX | 29 | 0,0041 | Aumentado em Cas | 4 | 0 | 100 | |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0BT91_FUSOX (+1) | 28 | 0,025 | Aumentado em FP | 0 | 5 | | 100 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0BTD9_FUSOX | 24 | < 0,00010 | Aumentado em Cas | 69 | 0 | 100 | |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0BTP5_FUSOX (+1) | 86 | 0,67 | | 0 | 1 | | 100 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0BVZ4_FUSOX | 10 | 0,19 | | 0 | 3 | | 100 |
| <i>Fructose-bisphosphate aldolase, class II</i> | X0BZ89_FUSOX (+1) | 40 | 0,11 | | 3 | 0 | 100 | |
| <i>Superoxide dismutase</i> | X0BZT7_FUSOX | 28 | < 0,00010 | Aumentado em Cas | 11 | 0 | 100 | 18 |
| <i>Carboxypeptidase A4</i> | X0BZX8_FUSOX | 45 | 0,67 | | 0 | 1 | | 100 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0C4X7_FUSOX | 20 | 0,011 | Aumentado em FP | 0 | 5 | | 100 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0C517_FUSOX | 34 | < 0,00010 | Aumentado em FP | 0 | 18 | | 100 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0CB40_FUSOX (+2) | 290 | 0,29 | | 0 | 2 | 45 | 100 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0CC99_FUSOX | 63 | < 0,00010 | Aumentado em FP | 0 | 13 | | 100 |

| Proteína (*) | Número de acesso | MM (kDa) | Teste de Fisher (p-valor) | Perfil quantitativo | Espectros normalizados | | Probabilidade de identificação (%) | |
|--|-------------------|----------|---------------------------|---------------------|------------------------|----|------------------------------------|-----|
| | | | | | Cas | FP | Cas | FP |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0CEL7_FUSOX | 13 | < 0,00010 | Aumentado em Cas | 16 | 0 | 100 | |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0CES0_FUSOX | 22 | 0,0013 | Aumentado em Cas | 6 | 0 | 100 | |
| <i>Elongation factor 1-beta</i> | X0CET8_FUSOX | 25 | 0,33 | | 1 | 0 | 100 | |
| <i>Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a</i> | X0CFY1_FUSOX (+1) | 18 | 0,71 | | 1 | 2 | 100 | 100 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0CI54_FUSOX | 15 | 0,037 | Aumentado em Cas | 3 | 0 | 100 | 55 |
| <i>Dynein heavy chain, cytoplasmic</i> | X0CJ84_FUSOX | 493 | 0,44 | | 0 | 2 | 68 | 100 |
| <i>Transcription elongation factor SPT6</i> | X0CKE4_FUSOX | 162 | 0,13 | | 0 | 3 | | 100 |
| <i>N4-(Beta-N-acetylglucosaminyl)-L-asparaginase</i> | X0CLS5_FUSOX | 36 | < 0,00010 | Aumentado em FP | 0 | 20 | | 100 |
| <i>Peptide hydrolase</i> | X0CM44_FUSOX | 52 | < 0,00010 | Aumentado em FP | 0 | 23 | | 100 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0CNB5_FUSOX | 286 | 0,67 | | 0 | 1 | 68 | 100 |
| <i>Aminopeptidase</i> | X0CQI2_FUSOX (+1) | 99 | 0,025 | Aumentado em FP | 0 | 5 | | 100 |
| <i>Subtilisin</i> | X0CQK4_FUSOX | 43 | 0,086 | | 0 | 2 | | 100 |
| <i>Nucleoside diphosphate kinase</i> | X0CRV2_FUSOX | 26 | 0,00035 | Aumentado em Cas | 13 | 3 | 100 | 100 |
| <i>Glucoamylase</i> | X0CSR7_FUSOX | 72 | 0,67 | | 0 | 1 | | 100 |
| <i>Glutathione reductase</i> | X0CT61_FUSOX | 55 | 0,67 | | 0 | 1 | | 100 |
| <i>Dihydrolipoyl dehydrogenase</i> | X0CUD2_FUSOX (+1) | 54 | 0,67 | | 0 | 1 | | 100 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0CXS3_FUSOX | 31 | 0,11 | | 3 | 0 | 100 | |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0CYT3_FUSOX (+1) | 94 | 0,67 | | 0 | 1 | | 100 |

| Proteína (*) | Número de acesso | MM (kDa) | Teste de Fisher (p-valor) | Perfil quantitativo | Espectros normalizados | | Probabilidade de identificação (%) | |
|--|-------------------|----------|---------------------------|---------------------|------------------------|----|------------------------------------|-----|
| | | | | | Cas | FP | Cas | FP |
| <i>Glucose-6-phosphate isomerase</i> | X0CZH1_FUSOX (+1) | 43 | 0,67 | | 0 | 1 | | 100 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0CZR2_FUSOX | 37 | < 0,00010 | Aumentado em FP | 48 | 27 | 100 | 100 |
| <i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i> | X0CZT7_FUSOX | 24 | < 0,00010 | Aumentado em Cas | 8 | 0 | 100 | |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0DSH3_FUSOX | 26 | 0,012 | Aumentado em Cas | 6 | 0 | 100 | |
| <i>Uncharacterized protein</i> | X0DZU6_FUSOX | 27 | 0,037 | Aumentado em Cas | 4 | 0 | 100 | |

Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: MM (Massa molecular), Cas (Caseína), FP (Farinha de pena).

*Todas as sequências obtidas estão relacionadas às proteínas do banco de dados proteômicos UP000030663 da espécie *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 54005.

APÊNDICE C - Predição de efetores a partir de proteínas identificadas no secretoma de *F. oxysporum* URM 7401 cultivado com 1% (m/v) de caseína ou farinha de pena

| Acesso | Proteína | Peptídeo sinal | Efector | Probabilidade |
|---|---|---------------------------|----------------|----------------------|
| Proteínas comuns aos secretomas obtidos dos cultivos com caseína e farinha de pena | | | | |
| X0BZT7 | Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) | Sim | Não | 0,922 |
| X0CFY1 | Proteína ribossomal S27a ubiquitina-40S | Não | Sim | 0,514 |
| X0CJ84 | Cadeia pesada da dineína citoplasmática | Não | Não | 1 |
| X0CRV2 | Nucleosídeo difosfato quinase (EC 2.7.4.6) | Não | Não | 0,695 |
| X0CB40 | Proteína não caracterizada | Não | Não | 1 |
| X0CI54 | Proteína não caracterizada | Sim | Sim | 0,996 |
| X0CNB5 | Proteína não caracterizada | Não | Não | 0,994 |
| X0CZR2 | Proteína não caracterizada | Sim | Não | 0,997 |
| Proteínas identificadas no secretoma do cultivo com caseína | | | | |
| X0BT45 | Proteína de ribonuclease da família T2 | Sim | Não | 0,525 |
| X0BZ89 | Frutose-bifosfato aldolase, class II | Não | Não | 0,999 |
| X0CET8 | Fator de alongação 1-beta | Não | Não | 1 |
| X0CZT7 | Peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8) | Não | Sim | 0,885 |
| X0BTD9 | Proteína não caracterizada | Sim | Sim | 0,543 |
| X0CEL7 | Proteína não caracterizada | Não | Sim | 0,822 |
| X0CES0 | Proteína não caracterizada | Sim | Sim | 0,946 |
| X0CXS3 | Proteína não caracterizada | Não | Não | 0,985 |
| X0DSH3 | Proteína não caracterizada | Sim | Sim | 0,854 |
| X0DZU6 | Proteína não caracterizada | Não | Não | 0,947 |

| Acesso | Proteína | Peptídeo sinal | Efector | Probabilidade |
|--|--|---------------------------|----------------|----------------------|
| Proteínas identificadas no secretoma do cultivo com farinha de pena | | | | |
| X0B8T7 | Subtilisin | Sim | Não | 1 |
| X0BRZ0 | Tripsin | Sim | Não | 1 |
| X0BZX8 | Carboxipeptidase A4 | Sim | Não | 1 |
| X0CKE4 | Fator de alongação da transcrição SPT6 | Não | Não | 1 |
| X0CLS5 | <i>N4-(Beta-N-acetylglucosaminyl)-L- asparaginase</i> | Sim | Não | 0,996 |
| X0CM44 | Peptídeo hidrolase (EC 3.4.-.-) | Sim | Não | 1 |
| X0CQI2 | Aminopeptidase (EC 3.4.11.-) | Não | Não | 1 |
| X0CQK4 | Subtilisin | Sim | Não | 1 |
| X0CSR7 | Glicoamilase (EC 3.2.1.3) (<i>1,4- alpha-D-glucan glucohidrolase</i>) (<i>Glucan 1,4-alpha-glucosidase</i>) | Não | Não | 1 |
| X0CT61 | Glutationa redutase | Não | Não | 1 |
| X0CUD2 | Diidrolipoil desidrogenase (EC 1.8.1.4) | Não | Não | 1 |
| X0CZH1 | Glicose-6-fosfato isomerase (EC 5.3.1.9) | Não | Não | 1 |
| X0BM87 | Proteína não caracterizada | Sim | Sim | 0,995 |
| X0BMV8 | Proteína não caracterizada | Sim | Não | 1 |
| X0BT91 | Proteína não caracterizada | Não | Não | 0,775 |
| X0BTP5 | Proteína não caracterizada | Não | Não | 1 |
| X0BVZ4 | Proteína não caracterizada | Não | Não | 0,547 |
| X0C4X7 | Proteína não caracterizada | Sim | Sim | 0,941 |
| X0C517 | Proteína não caracterizada | Não | Não | 0,995 |
| X0CC99 | Proteína não caracterizada | Não | Não | 1 |
| X0CYT3 | Proteína não caracterizada | Sim | Não | 1 |

As informações foram obtidas utilizando a ferramenta Effector P disponível em <http://effectorp.csiro.au/>.

Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE D – Quadro com as informações adicionais das proteínas identificadas no secretoma de *M. thermophila* cultivado em resíduos agroindustriais realizadas com o *software* Scaffold 4.8.4

| Proteína (*) | Número de acesso | MM (kDa) | ANOVA (p-valor) | Perfil quantitativo | Espectros normalizados | | | Probabilidade de identificação (%) | | |
|--|------------------|----------|-----------------|---------------------|------------------------|----|----|------------------------------------|-----|-----|
| | | | | | FT | PA | PS | FT | PA | PS |
| <i>Glycoside hydrolase family 2 protein</i> | G2Q4L9_MYCTT | 66 | 0,000 | Aumentado em FT | 95 | 2 | 42 | 100 | 100 | 100 |
| <i>Polysaccharide lyase family 1 protein</i> | G2QH79_MYCTT | 34 | 0,000 | Aumentado em PS | 4 | 0 | 67 | 100 | | 100 |
| <i>Catalase</i> | G2QEK4_MYCTT | 78 | 0,190 | | 36 | 19 | 19 | 100 | 100 | 100 |
| <i>Glycoside hydrolase family 15 protein (Fragment)</i> | G2QPS0_MYCTT | 67 | 0,020 | Aumentado em FT | 36 | 4 | 8 | 100 | 100 | 100 |
| <i>Pectin lyase-like protein</i> | G2QFY9_MYCTT | 37 | < 0,0001 | Aumentado em PS | 0 | 0 | 53 | 43 | | 100 |
| <i>Nucleoside diphosphate kinase</i> | G2Q8U9_MYCTT | 17 | 0,013 | Aumentado em PA | 5 | 28 | 8 | 100 | 100 | 100 |
| <i>Peptide hydrolase</i> | G2QNT3_MYCTT | 54 | 0,003 | Aumentado em PA | 0 | 17 | 8 | | 100 | 100 |
| <i>Glycoside hydrolase family 43 protein</i> | G2QCC8_MYCTT | 61 | 0,130 | | 15 | 11 | 0 | 100 | 100 | |
| <i>Glycoside hydrolase family 3 protein</i> | G2QCQ3_MYCTT | 95 | 0,000 | Aumentado em FT | 9 | 0 | 0 | 100 | | 92 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | G2QGG5_MYCTT | 95 | 0,140 | | 7 | 8 | 4 | 100 | 100 | 99 |
| <i>Serine protease</i> | G2Q925_MYCTT | 40 | 0,005 | Aumentado em PA | 0 | 21 | 10 | | 100 | 100 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | G2QGJ6_MYCTT | 55 | 0,004 | Aumentado em FT | 9 | 0 | 0 | 100 | | 87 |
| <i>Polysaccharide lyase family 3 protein</i> | G2QG74_MYCTT | 26 | 0,009 | Aumentado em PS | 0 | 0 | 16 | 79 | | 100 |
| <i>Alpha-mannosidase</i> | G2PZU5_MYCTT | 123 | < 0,00010 | Aumentado em FT | 5 | 0 | 0 | 100 | | 54 |
| <i>Glucanase</i> | G2QA39_MYCTT | 51 | 0,012 | Aumentado em PA | 0 | 28 | 0 | | 100 | |
| <i>Glycoside hydrolase family 74 protein</i> | G2QHR7_MYCTT | 79 | 0,008 | Aumentado em PS | 0 | 0 | 11 | | | 100 |

| Proteína (*) | Número de acesso | MM (kDa) | ANOVA (p-valor) | Perfil quantitativo | Espectros normalizados | | | Probabilidade de identificação (%) | | |
|---|-------------------|----------|-----------------|---------------------|------------------------|----|----|------------------------------------|-----|-----|
| | | | | | FT | PA | PS | FT | PA | PS |
| <i>Glycoside hydrolase family 92 protein</i> | G2Q1N1_MYCTT | 90 | 0,160 | | 5 | 10 | 0 | 100 | 100 | |
| <i>Beta-xylanase</i> | G2QGN6_MYCTT | 42 | 0,170 | | 2 | 6 | 3 | 100 | 100 | 100 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | G2Q494_MYCTT | 63 | 0,430 | | 3 | 2 | 0 | 100 | 100 | |
| <i>Alkaline phosphatase</i> | G2Q8W4_MYCTT | 73 | 0,001 | Aumentado em PA | 0 | 13 | 0 | | 100 | 76 |
| <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> | G2QPQ8_MYCTT | 36 | 0,005 | Aumentado em PA | 2 | 11 | 1 | 100 | 100 | 100 |
| <i>Carbohydrate-binding WSC domain protein</i> | G2QLJ3_MYCTT | 38 | 0,130 | | 4 | 0 | 1 | 100 | | 99 |
| <i>Endo-1,4-beta-xylanase</i> | G2Q4S6_MYCTT (+1) | 25 | 0,020 | Aumentado em PA | 0 | 15 | 1 | | 100 | 97 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | G2QCC9_MYCTT | 20 | < 0,00010 | Aumentado em PA | 0 | 11 | 0 | | 100 | |
| <i>Glycoside hydrolase family 31 protein</i> | G2QAE3_MYCTT | 103 | 0,210 | | 7 | 0 | 0 | 100 | | |
| <i>Uncharacterized protein</i> | G2QD34_MYCTT | 64 | 0,034 | Aumentado em FT | 6 | 0 | 0 | 100 | | |
| <i>Uncharacterized protein</i> | G2QAL0_MYCTT | 23 | 0,021 | Aumentado em FT | 2 | 0 | 0 | 100 | | |
| <i>Formate dehydrogenase</i> | G2QB71_MYCTT | 40 | 0,410 | | 1 | 0 | 1 | 100 | 97 | 94 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | G2Q0R5_MYCTT | 80 | < 0,00010 | Aumentado em FT | 2 | 0 | 0 | 100 | | |
| <i>Uncharacterized protein</i> | G2QFL3_MYCTT | 76 | 0,013 | Aumentado em FT | 4 | 0 | 0 | 100 | | |
| <i>Uncharacterized protein</i> | G2QAP6_MYCTT | 29 | 0,010 | Aumentado em PA | 0 | 9 | 0 | 30 | 100 | |
| <i>Glucanase</i> | G2Q998_MYCTT | 41 | 0,005 | Aumentado em PA | 0 | 7 | 1 | | 100 | 98 |
| <i>Glycoside hydrolase family 62 protein</i> | G2QLV4_MYCTT | 40 | 0,110 | | 0 | 10 | 0 | | 100 | |
| <i>Fasciclin domain protein</i> | G2Q6I7_MYCTT | 57 | 0,002 | Aumentado em FT | 2 | 0 | 0 | 100 | | |

| Proteína (*) | Número de acesso | MM (kDa) | ANOVA (p-valor) | Perfil quantitativo | Espectros normalizados | | | Probabilidade de identificação (%) | | |
|---|------------------|----------|-----------------|---------------------|------------------------|----|----|------------------------------------|-----|-----|
| | | | | | FT | PA | PS | FT | PA | PS |
| <i>Polysaccharide lyase family 1 protein</i> | G2Q1K5_MYCTT | 35 | 0,034 | Aumentado em PS | 0 | 0 | 5 | | | 100 |
| <i>Protease</i> | G2QGL4_MYCTT | 40 | 0,001 | Aumentado em PA | 0 | 7 | 0 | | 100 | |
| <i>Catalase-peroxidase</i> | G2QBT1_MYCTT | 82 | 0,460 | | 1 | 0 | 0 | 99 | | |
| <i>Glycoside hydrolase family 61 protein</i> | G2QNT0_MYCTT | 24 | 0,540 | | 0 | 0 | 1 | | | 98 |
| <i>Glycoside hydrolase family 31 protein</i> | G2QD40_MYCTT | 97 | 0,099 | | 1 | 0 | 0 | 100 | | |
| <i>Uncharacterized protein</i> | G2QKM4_MYCTT | 66 | 0,001 | Aumentado em PA | 0 | 6 | 0 | | 100 | |
| <i>Uncharacterized protein</i> | G2Q088_MYCTT | 28 | 0,001 | Aumentado em PA | 0 | 6 | 0 | | 100 | |
| <i>Uncharacterized protein</i> | G2QL49_MYCTT | 492 | 0,460 | | 0 | 0 | 0 | 100 | | 35 |
| <i>Carbohydrate-binding module family 1 protein</i> | O74240_MYCTT | 88 | 0,150 | | 0 | 4 | 1 | | 100 | 95 |
| <i>Glycoside hydrolase family 55 protein</i> | G2QF48_MYCTT | 82 | 0,099 | | 3 | 0 | 0 | 100 | | |
| <i>Aldose epimerase-like protein</i> | G2QJ35_MYCTT | 41 | 0,130 | | 0 | 0 | 3 | | | 100 |
| <i>Uncharacterized protein</i> | G2QP35_MYCTT | 8 | 0,460 | | 1 | 0 | 0 | 99 | | 5 |
| <i>Endonuclease/exonuclease/p hosphatase-like protein</i> | G2PZK2_MYCTT | 65 | 0,001 | Aumentado em PA | 0 | 4 | 0 | | 100 | |
| <i>Glycoside hydrolase family 28 protein</i> | G2QJS8_MYCTT | 51 | 0,066 | | 0 | 0 | 3 | | | 100 |
| <i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i> | G2Q254_MYCTT | 20 | 0,460 | | 0 | 3 | 0 | | 100 | |
| <i>Trehalase</i> | G2PZS2_MYCTT | 78 | 0,460 | | 0 | 4 | 0 | 47 | 100 | |
| <i>Glycoside hydrolase family 81 protein</i> | G2QHM1_MYCTT | 91 | 0,002 | Aumentado em FT | 1 | 0 | 0 | 100 | | |
| <i>Uncharacterized protein</i> | G2QBY9_MYCTT | 62 | 0,082 | | 0 | 4 | 0 | | 100 | |
| <i>Uncharacterized protein</i> | G2Q9I1_MYCTT | 60 | 0,460 | | 1 | 0 | 0 | 100 | | |

| Proteína (*) | Número de acesso | MM (kDa) | ANOVA (p-valor) | Perfil quantitativo | Espectros normalizados | | | Probabilidade de identificação (%) | | |
|---------------------------------------|------------------|----------|-----------------|---------------------|------------------------|----|----|------------------------------------|-----|----|
| | | | | | FT | PA | PS | FT | PA | PS |
| Rab GDP dissociation inhibitor | G2Q574_MYCTT | 51 | 0,001 | Aumentado em PA | 0 | 2 | 0 | 22 | 100 | |
| Uncharacterized protein | G2QFV6_MYCTT | 360 | 0,460 | | 1 | 0 | 0 | 100 | 90 | |
| Uncharacterized protein | G2QPH6_MYCTT | 49 | 0,460 | | 0 | 2 | 0 | | 99 | |
| Nitroreductase-like protein | G2QAX0_MYCTT | 23 | 0,460 | | 0 | 2 | 0 | 93 | 100 | |
| Uncharacterized protein | G2QLK6_MYCTT | 23 | 0,460 | | 0 | 2 | 0 | | 100 | |
| Uncharacterized protein | G2QNZ9_MYCTT | 71 | 0,460 | | 0 | 2 | 0 | 76 | 100 | |
| Uncharacterized protein | G2QLX8_MYCTT | 119 | 0,460 | | 1 | 0 | 0 | | | 9 |
| Uncharacterized protein | G2QQG6_MYCTT | 72 | 0,460 | | 1 | 0 | 0 | 100 | | |
| Uncharacterized protein | G2Q701_MYCTT | 79 | 0,460 | | 0 | 2 | 0 | | 100 | |
| Glyoxal oxidase like protein | G2Q335_MYCTT | 105 | 0,460 | | 1 | 0 | 0 | 99 | | |
| Serine protease | G2Q6Z6_MYCTT | 57 | 0,460 | | 1 | 0 | 0 | 100 | | |
| Uncharacterized protein | G2Q8N3_MYCTT | 143 | 0,460 | | 0 | 2 | 0 | | 100 | |
| Superoxide dismutase [Cu-Zn] | G2Q714_MYCTT | 16 | 0,460 | | 0 | 0 | 1 | | | 99 |

Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: MM (Massa molecular), FT (farelo de trigo), PA (palha de arroz), OS (palha de soja).

* Todas as sequências obtidas estão relacionadas às proteínas do banco de dados proteômicos UP000007322 da espécie *Myceliophthora thermophila* (strain ATCC 42464 / BCRC 31852 / DSM 1799).

APÊNDICE E – Quadro ilustrativo das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio relacionadas à parede celular, citoesqueleto e transporte intracelular

| Processo biológico | Cas | FP | Glu | Cys | His | Ile | SA | Ur |
|--------------------------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|
| Citoesqueleto | | | | | | | | |
| Parede celular | | | | | | | | |
| Transporte intracelular | | | | | | | | |

Cas: proteínas do cultivo com Caseína, FP: proteínas do cultivo com Farinha de pena; Glu: proteínas do cultivo com ácido glutâmico; Cys: proteínas do cultivo com cisteína; His: proteínas do cultivo com histidina; Ile: proteínas do cultivo com isoleucina; SA: proteínas do cultivo com sulfato de amônio; Ur: proteínas do cultivo com ureia.

APÊNDICE F – Quadro ilustrativo das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas na regulação e processamento de proteínas

| Processo biológico | Cas | FP | Glu | Cys | His | Ile | SA | Ur |
|---|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|
| Biossíntese de proteínas | | | | | | | | |
| Transdução e regulação de sinais | | | | | | | | |
| Processamento – peptidases | | | | | | | | |
| Processamento – <i>foldíng</i> | | | | | | | | |
| Deubiquitinação/Proteassoma | | | | | | | | |

Cas: proteínas do cultivo com Caseína, FP: proteínas do cultivo com Farinha de pena; Glu: proteínas do cultivo com ácido glutâmico; Cys: proteínas do cultivo com cisteína; His: proteínas do cultivo com histidina; Ile: proteínas do cultivo com isoleucina; SA: proteínas do cultivo com sulfato de amônio; Ur: proteínas do cultivo com ureia.

APÊNDICE G – Quadro ilustrativo das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas no metabolismo de aminoácidos e reciclagem de nitrogênio

| Processo biológico | Cas | FP | Glu | Cys | His | Ile | SA | Ur |
|-----------------------------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|
| Metabolismo de aminoácidos | | | | | | | | |

Cas: proteínas do cultivo com Caseína; FP: proteínas do cultivo com Farinha de pena; Glu: proteínas do cultivo com ácido glutâmico; Cys: proteínas do cultivo com cisteína; His: proteínas do cultivo com histidina; Ile: proteínas do cultivo com isoleucina; SA: proteínas do cultivo com sulfato de amônio; Ur: proteínas do cultivo com ureia.

APÊNDICE H – Quadro ilustrativo das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas nos mecanismos de resistência ao estresse e em processos de desintoxicação

| Processo biológico | Cas | FP | Glu | Cys | His | Ile | SA | Ur |
|---|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|
| Estresse oxidativo | | | | | | | | |
| Proteínas de choque térmico (HSP) | | | | | | | | |
| Geração de formiato/desintoxicação | | | | | | | | |
| Beta-lactamase | | | | | | | | |
| Defesa de dano ao DNA | | | | | | | | |

Cas: proteínas do cultivo com Caseína, FP: proteínas do cultivo com Farinha de pena; Glu: proteínas do cultivo com ácido glutâmico; Cys: proteínas do cultivo com cisteína; His: proteínas do cultivo com histidina; Ile: proteínas do cultivo com isoleucina; SA: proteínas do cultivo com sulfato de amônio; Ur: proteínas do cultivo com ureia.

APÊNDICE I – Quadro ilustrativo das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas no metabolismo de carboidratos

| Processo biológico | Cas | FP | Glu | Cys | His | Ile | SA | Ur |
|-----------------------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|
| Glicólise | | | | | | | | |
| Gliconeogênese | | | | | | | | |
| Ciclo dos TCA | | | | | | | | |
| Via das fosfopentose | | | | | | | | |

Cas: proteínas do cultivo com Caseína, FP: proteínas do cultivo com Farinha de pena; Glu: proteínas do cultivo com ácido glutâmico; Cys: proteínas do cultivo com cisteína; His: proteínas do cultivo com histidina; Ile: proteínas do cultivo com isoleucina; SA: proteínas do cultivo com sulfato de amônio; Ur: proteínas do cultivo com ureia.

APÊNDICE J – Quadro ilustrativo das proteínas intracelulares de *F. oxysporum* URM 7401 identificadas nos cultivos com diferentes fontes de nitrogênio envolvidas na geração de energia

| Processo biológico | Cas | FP | Glu | Cys | His | Ile | SA | Ur |
|-------------------------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|
| Fosforilação oxidativa | | | | | | | | |
| Fermentação – ALDH | | | | | | | | |
| Fermentação alcoólica | | | | | | | | |

Cas: proteínas do cultivo com Caseína, FP: proteínas do cultivo com Farinha de pena; Glu: proteínas do cultivo com ácido glutâmico; Cys: proteínas do cultivo com cisteína; His: proteínas do cultivo com histidina; Ile: proteínas do cultivo com isoleucina; SA: proteínas do cultivo com sulfato de amônio; Ur: proteínas do cultivo com ureia.