



**Universidade de Brasília**  
**Departamento de Biologia Celular**  
**Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular**

**Diana Paola Gómez Mendoza**

**Proteômica aplicada à caracterização do secretoma de *Trichoderma harzianum***

**Brasília, Março de 2013**



**Universidade de Brasília**  
**Departamento de Biologia Celular**  
**Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular**

**Diana Paola Gómez Mendoza**

**Proteômica aplicada à caracterização do secretoma de *Trichoderma harzianum***

Tese apresentada à Pós-graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (UnB) para a obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica e Química de Proteínas)

Orientador: Dr. Carlos André Ornelas Ricart

Coorientador: Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

**Brasília, Março de 2013**

*Ao meu amado esposo*

## **Agradecimentos**

Quatro anos se passaram e foram muitas as pessoas que contribuíram na conclusão de esta etapa...

Agradeço em primeiro lugar a Deus que me deu a família e amigos que me acompanharam nesta jornada. Aos meus pais Wilson e Cecília pela doçura com que me educaram e a dedicação com que me incentivaram. Ao meu irmão Juan David agradeço o apoio destes anos e o empenho para cuidar dos meus pais. A toda minha família, em especial às minhas tias agradeço o amor, dedicação e apoio que sempre me brindaram.

Ao grupo de amigas Micaela, Elaine, Aline e Anne agradeço os bons momentos que tornaram fáceis os dias complicados, me demonstrando que a lealdade e o companheirismo estão acima de qualquer dificuldade. Aos amigos Adriana, Claudia, Carolina, Liudy, Carlos, Jaqueline, e Jaques que por tantos anos me acompanharam e me ensinaram sobre a responsabilidade de carregar o título de Amigo.

Aos colegas e companheiros do laboratório de bioquímica e química de proteínas (LBQP), Rayner, Jéssica, Andréia, Alessandra, Rosa, Pedro, César, Carol, Marina, Agenor e Agnelo que fizeram parte do meu dia-a-dia no laboratório e com os que dividi festas, churrascos, passeios, filas de RU, "confissões de copa" e desafios profissionais.

Aos amigos e colegas Adelson, Luis, Félix, Natália, Gabriel, Rafael e Gilvan que começaram comigo esta travessia...obrigada por tudo que vocês me ensinaram e pelos votos de confiança.

Aos professores do LBQP Marcelo, Mariana, Wagner, Consuelo, Sebastián, Fabiane e Pedro agradeço a recepção e carinho brindado durante estes anos.

Aos técnicos Nuno, Antônio, Marisia e Margarete que sempre se mostraram solícitos e prestativos agradeço a experiência, conhecimentos e amizade que dividiram comigo.

Ao professor Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, meu coorientador agradeço a compreensão e disposição que tornou possível a finalização de meu trabalho.

Agradeço com muito carinho ao professor Magno Junqueira e sua família pela colaboração brindada nas análises por LC-MS/MS e pela ponte que criou com a UFRJ e o

laboratório do professor Domont e sua equipe de trabalho. Por tudo que você me ensinou e que fez por meu trabalho serei sempre grata!

É com profundo sentimento que agradeço ao meu orientador o professor Carlos André, pois foram os seus valiosos conhecimentos e conselhos os melhores aliados da minha formação. A sua tranquilidade e doçura me mantiveram sempre no eixo mesmo nos momentos de mais preocupação, e o seu profissionalismo, respeito e bom humor os presentes que levarei comigo.

Finalmente dedico este trabalho ao meu esposo Janier Arias quem com tanto amor me ajudou a vencer este desafio. Pelas horas dedicadas, pelas palavras de consolo, pela paciência, parceria e apoio... amor obrigada.

## Resumo

*Trichoderma harzianum* é um fungo filamentoso capaz de secretar enzimas hidrolíticas ao meio extracelular as quais agem despolimerizando componentes da biomassa vegetal como celulose e hemicelulose. O conjunto de proteínas secretadas por uma célula é denominado de secretoma, uma subpopulação do proteoma total. Amostras correspondentes ao secretoma de *T. harzianum* foram obtidas por fermentação submersa (SmF) em meio sintético suplementado com 1 %(m/v) de glicose, celulose, xilana ou bagaço de cana como fonte de carbono. Os secretomas foram posteriormente submetidos à análise proteômica seguindo duas abordagens distintas, eletroforese bidimensional (2-DE) seguida de espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF para a identificação de polimorfismos proteicos provenientes do gel, e LC-MS/MS para identificação do total de proteínas presentes em cada amostra. Os secretomas de *T. harzianum* foram igualmente tratados com a enzima PNGase F a fim de detectar presença de proteínas glicosiladas e mudanças no perfil bidimensional das amostras. O crescimento nas diferentes fontes de carbono resultou na identificação de diversos grupos de proteínas extracelulares que incluíram glicosil hidrolases como celulasas, xilanasas, pectinases e quitinasas, bem como proteínas associadas à parede celular fúngica como hidrofobinas e proteínas elicitoras e um alto número de proteínas putativas, cuja expressão diferencial parece estar regulada pela natureza e complexidade da fonte de carbono utilizada na cultura. Adicionalmente este trabalho apresenta evidência sobre a ocorrência de complexos multienzimáticos no secretoma do fungo após o crescimento por SmF em bagaço de cana, graças à utilização de técnicas eletroforéticas, enzimológicas e espectrométricas como BN-PAGE, zimografia e LC-MS/MS, respectivamente. Os resultados indicam que proteínas secretadas por *T. harzianum* naturalmente envolvidas na desconstrução de substratos (hemi) celulolíticos e quitinolíticos formam parte de elementos oligoméricos constituídos por subunidades de diferente especificidade catalítica que aparentemente são requeridas para uma conversão eficiente e específica dos polímeros da biomassa.

**Palavras-chave:** *Trichoderma harzianum*, secretoma, enzimas hidrolíticas, espectrometria de massas, proteômica, complexos multienzimáticos

## Abstract

*Trichoderma harzianum* is a filamentous fungus able to secrete hydrolytic enzymes to the extracellular medium which act degrading the biopolymeric components of plant biomass such as cellulose and hemicellulose in fermentable sugars. This set of secreted proteins corresponds to the secretome, a subset of the proteome. The samples related to the *T. harzianum* secretome were obtained by submerged fermentation (SmF) in synthetic medium supplemented with 1% (w/v) glucose, cellulose, xylan or sugarcane bagasse as a carbon source. The secretomes were explored by two different proteomic approaches, gel-based proteomics using two-dimensional electrophoresis (2-DE) followed by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry for the identification of the protein polymorphisms from the gel, and gel-free proteomics using LC-MS/MS for identification of the total of protein present in each sample. The *T. harzianum* secretomes were also treated with the enzyme PNGase F in order to detect the presence of glycosylated proteins and changes in the dimensional profile of the samples. Growth on different carbon sources resulted in the identification of several groups of extracellular proteins such as glycoside hydrolases including cellulases, xylanases, pectinases, chitinases, as well as cell-wall associated hydrophobins and eliciting proteins, and putative proteins whose differential expression appears to be regulated by the nature and complexity of the carbon sources used in the culture. In addition the occurrence of multienzymatic complexes in the secretome after SmF growth in sugarcane bagasse containing medium was demonstrated by means of electrophoretic, spectrometric and enzymologic techniques, such as BN-PAGE, zimography, and LC-MS/MS, respectively. The results indicate that enzymes and proteins secreted by *T. harzianum* naturally involved in the deconstruction of (hemi) cellulolytic and chitinolytic substrates are part of oligomeric elements composed of subunits with different catalytic specificities apparently required for specific and efficient conversion of biomass polymers.

**Key words:** *Trichoderma harzianum* secretome, hydrolytic enzymes, mass spectrometry, proteomics, multienzymatic complexes.

## Lista de Figuras

	Página
<b>Figura 1.</b> Observação macroscópica e microscópica de <i>T. harzianum</i> .....	5
<b>Figura 2 .</b> Enzimas envolvidas na hidrólise da celulose. ....	11
<b>Figura 3.</b> Ação das enzimas xilanolíticas sobre a cadeia de arabinoxilana. ....	14
<b>Figura 4.</b> Sistema quitinolítico de <i>Trichoderma</i> sp. ....	17
<b>Figura 5.</b> Delineamento experimental. ....	32
<b>Figura 6.</b> Metodologia seguida na detecção de complexos proteicos .....	39
<b>Figura 7.</b> Atividade enzimática e dosagem de proteína do secretoma de <i>T. harzianum</i> . .....	43
<b>Figura 8.</b> Comparação do perfil bidimensional do secretoma de <i>T. harzianum</i> .....	45
<b>Figura 9.</b> Perfil bidimensional do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em meio contendo 1 %(m/v) de glicose.....	46
<b>Figura 10.</b> Perfil bidimensional do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em meio contendo 1 %(m/v) de celulose.....	47
<b>Figura 11.</b> Perfil bidimensional do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em meio contendo 1 %(m/v) de xilana.....	48
<b>Figura 12.</b> Perfil bidimensional do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em meio contendo 1 %(m/v) de bagaço de cana. ....	49
<b>Figura 13.</b> Sequenciamento de novo do peptídeo K.WLVGFDR.L da proteína $\beta$ -xilosidase.. ..	51
<b>Figura 14.</b> Sequenciamento de novo do peptídeo GEPNQWALR da proteína arabinofuranosidase.....	52
<b>Figura 15.</b> Ação de desglicosilação de proteínas controle.....	56
<b>Figura 16.</b> Desglicosilação do secretoma de <i>T. harzianum</i> . ....	56
<b>Figura 17.</b> N-desglicosilação do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em glicose. ....	57
<b>Figura 18.</b> N-desglicosilação do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em celulose. ....	58
<b>Figura 19.</b> N-desglicosilação do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em xilana. ....	58
<b>Figura 20.</b> N-desglicosilação do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em bagaço de cana... ..	59
<b>Figura 21.</b> Abundância de proteínas no secretoma de <i>T. harzianum</i> quando crescido nas diferentes fontes de carbono.....	62
<b>Figura 22.</b> Diagrama de <i>Venn</i> representando o total de proteínas exclusivas e comuns a cada secretoma analisado. ....	63
<b>Figura 23.</b> Classificação funcional das proteínas identificadas por LC-MS/MS no secretoma de <i>T. harzianum</i> .....	64
<b>Figura 24.</b> (A) 1D-BN-PAGE do secretoma de <i>T. harzianum</i> obtido em meio de cultura contendo 1 %(m/v) de bagaço de cana. (B) 1D-BN-PAGE do secretoma de <i>T. harzianum</i> .....	73



<b>Figura 25.</b> 2D-BN-PAGE do secretoma de <i>T. harzianum</i> obtido em meio contendo bagaço de cana. ....	74
<b>Figura 26.</b> Detecção de atividade xilanolítica e celulolítica usando zimograma em 1D-BN-PAGE do secretoma de <i>T. harzianum</i> . ....	75
<b>Figura 27.</b> Detecção de atividade xilanolítica e celulolítica usando zimografia em 2D-BN/BN-PAGE do secretoma de <i>T. harzianum</i> . ....	76

## Lista de Tabelas

	Página
<b>Tabela 1.</b> Proteômica de fungos filamentosos utilizando como ferramentas de pesquisa 2-DE e MS .....	23
<b>Tabela 2.</b> Proteômica de fungos filamentosos utilizando como ferramenta de pesquisa LC-MS/MS.....	26
<b>Tabela 3.</b> Atividade enzimática ( $U\cdot mL^{-1}$ ) do secretoma de <i>T. harzianum</i> obtido em G)glicose, C) celulose, X) xilana e BC) bagaço de cana .....	42
<b>Tabela 4.</b> Proteínas identificadas no secretoma de <i>T. harzianum</i> a partir dos géis 2-DE .....	53
<b>Tabela 5.</b> Polimorfismos proteicos que apresentaram mudanças de migração em géis 2-DE..	60
<b>Tabela 6.</b> Resumo dos dados obtidos a partir da análise <i>shotgun</i> do secretoma de <i>T. harzianum</i> nas quatro fontes de carbono.....	61
<b>Tabela 7.</b> Proteínas identificadas por geLC-MS/MS dos complexos proteicos detectados no secretoma de <i>T. harzianum</i> .....	79

## Lista de Abreviaturas e Siglas

2-DE	Eletroforese Bidimensional
ABF	Arabinofuranosidase
ACN	Acetonitrila
AF	Acido Fórmico
AXE	Acetil Xilan Esterase
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i> (Ácido bicinconínico)
BDA	Batata Dextrose Agar
BGL	Beta-Glicosidase
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta Básica de Busca por Alinhamento Local)
BSA	<i>Bovine Soroalbumin</i> (Albumina Sérica Bovina)
BN-PAGE	<i>Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese Nativa em Gel de Poliacrilamida em presença de Azul de Coomassie)
BXL	Beta-Xilosidase
CAZymes	<i>Carbohydrate-Active Enzymes</i> (Enzimas Ativas em Carboidratos)
CBH	Celobiohidrolase
CE	Carboidrato esterase
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i> (Dissociação Induzida por Colisão)
CMC	Carboxi Metil Celulose
DDA	<i>Data Dependent Acquisition</i> (Aquisição Dependente de Dados)
DHB	<i>2,5-Dihydroxy Benzoic Acid</i> (Ácido 2,5-Dihidroxibenzoico)
DNS	Ácido Dinitro-Salicílico
DTT	Ditiotreitol
EG	Endoglucanase
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionização por <i>electrospray</i> )
GlcNAc	N-Acetilglicosamina
GH	Glicosilhidrolase
GT	Glicosiltransferase
HCCA	<i>Alpha-Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid</i> (Ácido Alfa-Ciano Hidroxicinâmico)
IAA	Iodoacetamida
IEF	Focalização Isoelétrica
IPG	<i>Immobilized pHGradient</i> (Gradiente de pH Imobilizado)
iTRAQ	<i>Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification</i>
kDa	kilo Dalton
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida)

LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial)
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz)
MGF	MASCOT generic format (formato genérico MASCOT)
MM	Massa Molecular
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i> (Espectrometria de massas sequencial)
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
NAG	N-Acetilglicosaminidases
<i>pI</i>	Ponto Isoelétrico
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>
PL	Polissacarídeo Liase
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecil Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de SDS)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
SmF	<i>Submerged Fermentation</i> (Fermentação Submersa)
SPITC	Sulfofenil Isotiocianato
TFA	Ácido Trifluoroacético
TOF	<i>Time of Flight</i> (Tempo de Voo)
XLN	Beta-1,4-endoxilânase

## Sumário

	Página
1 Revisão bibliográfica	2
1.1 Importância do gênero trichoderma	2
1.1.1 <i>Trichoderma harzianum</i>	4
1.2 Mecanismos de secreção e glicosilação de proteínas	6
1.3 Enzimas hidrolíticas em trichoderma sp.	9
1.3.1 Celulases	10
1.3.2 Xilanases e outras hemicelulases	13
1.3.3 Enzimas associadas ao controle biológico	16
1.4 Regulação na síntese de enzimas hidrolíticas	18
1.5 Como estudar os secretomas fúngicos?	20
2 Objetivos	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 Metodologia	31
3.1 Cepa e condições de cultura	31
3.2 Pre-tratamento do bagaço de cana	31
3.3 Preparo de amostras	31
3.4 Determinação da concentração de proteínas	31
3.5 Atividade enzimática	32
3.6 Desglicosilação de amostras	33
3.7 Eletroforese em gel de sds-page	34
3.8 Eletroforese bidimensional (2-DE)	34
3.9 Identificação de proteínas por Maldi Tof/Tof	35
3.9.1 Digestão trípica <i>in-gel</i>	35
3.9.2 Derivatização química	35
3.9.3 Dessalinização e concentração de amostras	36
3.9.4 Espectrometria de massas	36
3.10 Proteômica "shotgun"	36
3.10.1 Digestão trípica em solução	36
3.10.2 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (lc-ms/ms)	37
3.10.3 Identificação de proteínas	38

3.11	1D- <i>Blue Native Page</i> (BN-PAGE)	38
3.12	2D- BN-PAGE	38
3.13	Zimografia usando 1D-BN-PAGE e 2D-BN/BN-PAGE	39
3.14	Espectrometria de massas LC- MS/MS	40
3.15	Análise de dados	40
4	Resultados e discussão	42
4.1	Atividade enzimática dos secretomas	42
4.2	Análise proteômica	44
4.3	Perfis bidimensionais dos secretomas	44
4.3.1	N-glicosilações detectadas a partir de perfis 2-de	55
4.3.2	Análise <i>shotgun</i> dos secretomas de <i>T. harzianum</i>	61
4.3.3	Comparação do secretoma de <i>T. harzianum</i> proveniente do inóculo micelial e conidial em meio contendo celulose	71
4.4	Detecção de complexos multienzimáticos no secretoma de <i>t. Harzianum</i> cultivado em meio contendo bagaço de cana	73
4.4.1	Análise do secretoma por BN-PAGE	73
4.4.2	Atividade enzimática <i>in gel</i> dos complexos proteicos	75
4.4.3	Identificação por lc-ms/ms das proteínas componentes dos complexos	76
5	Conclusões	81
6	Bibliografia	84
7	Anexos	99
7.1	Proteínas identificadas por LC MS/MS no secretoma de <i>T. harzianum</i>	99
7.2	Produção científica durante o doutorado	114
7.3	Publicações como primeiro autor	116
7.4	Publicações em colaboração	117

## Prólogo

O filo Ascomycota está integrado por gêneros amplamente estudados como *Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp. capazes de degradar biopolímeros encontrados na biomassa vegetal mediante a secreção de enzimas hidrolíticas. Esta propriedade tem aberto a possibilidade de agregar valor a resíduos vegetais provenientes de atividades agrícolas, na obtenção de materiais, metabólitos e bicompostíveis, favorecendo a reciclagem, e utilização ecológica de fontes renováveis.

As espécies do gênero *Trichoderma* representam a principal fonte de enzimas extracelulares principalmente glicosil hidrolases utilizadas em processos biotecnológicos como processamento de têxteis, polpa de papel, alimentos e bebidas, sendo as espécies *T. reesei* e *T. harzianum* as principais expoentes do gênero. Contudo ainda são necessários estudos que permitam a caracterização dos diferentes mecanismos de expressão e regulação de enzimas extracelulares, bem como modelos de reconhecimento de substratos e moléculas indutoras.

Recentemente técnicas proteômicas e genômicas têm permitido a identificação das proteínas ativas em carboidratos presentes nas secreções fúngicas, esse conjunto de proteínas secretadas ao meio extracelular recebe o nome de **secretoma**, alvo de estudo do presente trabalho. Em prévios estudos demonstramos que o secretoma de *T. harzianum* apresenta mudanças em presença de diferentes fontes de carbono, mas o nosso objetivo agora é o mapeamento desses secretomas a fim de entender a complexidade do metabolismo de polissacarídeos e a forma que estes modulam a síntese e secreção de proteínas em fungos filamentosos utilizando *T. harzianum* como organismo modelo.

Igualmente a hipótese de que a ação cooperativa das enzimas do secretoma seria resultado do estado oligomérico das mesmas foi testada a partir da análise por eletroforese nativa BN-PAGE do secretoma de *T. harzianum* proveniente do crescimento em bagaço de cana, indicando a presença de três principais complexos proteicos cuja composição heterogênea e funcionalidade foi corroborada após análise por espectrometria de massas LC-MS/MS e zimografia de tais complexos.

Para atingir nosso objetivo foram integradas técnicas proteômicas, enzimológicas e eletroforéticas que permitiram analisar e caracterizar a composição dos secretomas, presença de modificações pós-traducionais e perfis de atividade enzimática característicos de cada condição de crescimento.

## 1 Revisão Bibliográfica

### 1.1 Importância do gênero *Trichoderma*

Os membros do gênero *Trichoderma*, pertencem ao grupo dos *Ascomycetes*, e trata-se de organismos de vida livre encontrados como agentes predominantes da micobiota do solo, rizosfera de plantas e materiais celulósicos em decomposição (Samuels, 2006; Carreras-Villaseñor, Sánchez-Arreguín *et al.*, 2012). A ampla distribuição do gênero é devida à capacidade de produzir e secretar enzimas hidrolíticas e metabólitos secundários, sendo algumas espécies eficientes agentes decompositores de matéria orgânica, micoparasitas e antagonistas de fungos fitopatogênicos e nematoides (Benítez, Rincón *et al.*, 2004; Ren, Xue *et al.*, 2009; Carreras-Villaseñor, Sánchez-Arreguín *et al.*, 2012).

O sucesso na colonização de diferentes habitats se deve também à rápida resposta do fungo a diferentes estímulos do ambiente como luminosidade, temperatura e inanição, mediante a regulação do crescimento, conidiação e biossíntese de moléculas (Susi, Aktuganov *et al.*, 2011; Carreras-Villaseñor, Sánchez-Arreguín *et al.*, 2012).

Adicionalmente, algumas espécies do gênero *Trichoderma* interagem com diferentes vegetais, uma vez que atuam como simbioses oportunistas, favorecendo a resistência ao ataque de patógenos, promovendo a proliferação de raízes, incrementando a tolerância ao *stress* abiótico e estimulando o crescimento de plantas (Harman, Howell *et al.*, 2004; De Jaeger, De La Providencia *et al.*, 2011; Hermosa, Viterbo *et al.*, 2012)

Espécies do gênero *Trichoderma* como *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* e *T. citrinoviride* têm sido adicionalmente identificadas como patógenos oportunistas, causando infecções respiratórias e micoses em pacientes imunocomprometidos depois de transplantes de órgãos ou tratamento de doenças como leucemia e HIV (Kredics, Antal *et al.*, 2003). Por outro lado, as espécies *T. aggressivum* var. *europaeae* e *T. aggressivum* var. *aggressivum* tem sido associadas à "doença do mofo verde" que ataca cultivos dos fungos comestíveis *Agaricus bisporus* e *Pleurotus ostreatus* (Samuels, Dodd *et al.*, 2002; Hatvani, Antal *et al.*, 2007).

Atualmente o gênero *Trichoderma* compreende ao redor de 150 espécies, a maioria das quais foram descritas depois do ano 2000 com ajuda de técnicas moleculares como *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) e *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD) que facilitaram a identificação da espécie *T. reesei* como anamorfo de *Hypocrea*



*jecorina* assim como a revisão da seção *Longibrachiatum* (S., G. *et al.*, 2006; Druzhinina, Komoń-Zelazowska *et al.*, 2012).

A identificação de novas espécies do gênero *Trichoderma* pode ser auxiliada mediante a utilização dos programas de identificação TichOKey v. 1.0 (Druzhinina, Kopchinskiy *et al.*, 2005) e TrichoBLAST V. 1.0 (Kopchinskiy, Komoń *et al.*, 2005) os quais estão baseados na detecção de sequências nucleotídicas correspondentes a marcadores filogenéticos depositados em um banco de dados constantemente atualizado. Alguns dos marcadores filogenéticos utilizados correspondem aos espaçadores internos de transcrição 1 e 2 (ITS1-ITS2), os íntrons 4<sup>to</sup> e 5<sup>to</sup> e o 6<sup>to</sup> éxon do gene que codifica o fator de alongação 1-alfa (*tef1*).

Metabólitos secundários como os peptaibóis, sideróforos e micotoxinas produzidos pelas espécies do gênero *Trichoderma*, tem sido também utilizados em estudos de quimiotaxonomia, uma vez que a variabilidade dos genes envolvidos na síntese dos metabolitos secundários pode revelar relações evolutivas entre diferentes espécies do gênero (Degenkolb, Von Döhren *et al.*, 2008). Assim, análises dos principais produtos do metabolismo secundário feitas com auxílio de técnicas como *Intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight* (IC-MALDI-TOF) ajudaram na descrição da nova seção *Brevicompactum*, tanto quanto na reclassificação de espécies antigamente consideradas dentro do gênero *Gliocladium* (Neuhof, Dieckmann *et al.*, 2007).

Em fungos filamentosos o metabolismo secundário se encontra associado a processos de diferenciação como esporulação sexuada e assexuada, sobrevivência em condições adversas, interação com outros micro-organismos e sinalização (Mukherjee, Horwitz *et al.*, 2012). A coordenação entre o metabolismo secundário e morfogênese está mediada pela interação entre proteínas reguladoras da família VELVET e as metiltransferases LaeA no núcleo da célula fúngica (Bayram e Braus, 2012).

Outra propriedade que caracteriza aos fungos do gênero *Trichoderma* é a alternância entre o desenvolvimento sexuada e vegetativo, o que favorece a sua sobrevivência e propagação em diferentes ambientes. O ciclo sexuada acontece em *Trichoderma* sp. como resultado da fusão por plasmogamia de duas estirpes compatíveis MAT1-1 e MAT1-2 no ciclo sexuada heterotálico, ou das próprias hifas na ausência de uma outra hifa compatível no ciclo homotálico (Seidl, Seibel *et al.*, 2009). A fertilização começa com a formação do peritécio, um corpo de frutificação no qual acontece a formação do asco. Dentro do peritécio cada núcleo progenitor prolifera para depois dar passo à cariogamia,

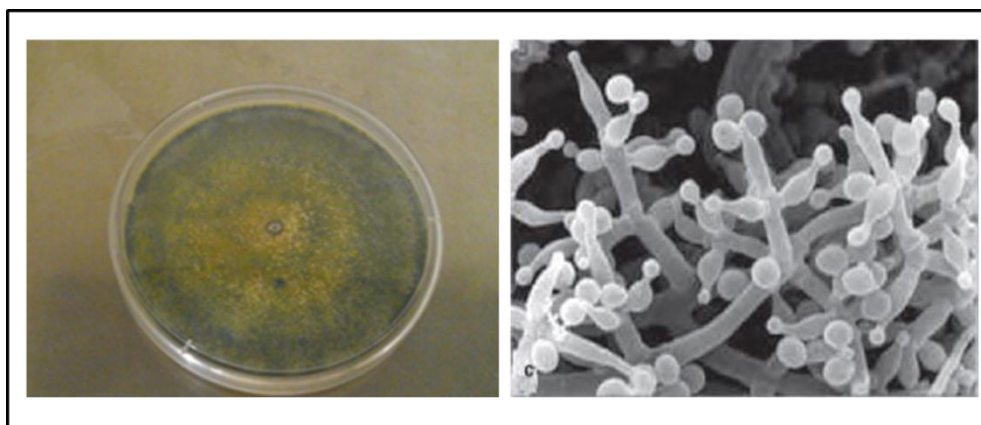
aproximadamente 16 ascósporos são produzidos em cada asco (Coppin, Debuchy *et al.*, 1997).

Por outro lado o ciclo vegetativo também conhecido como conidiação ou esporulação é induzido pela luz, carência de nutrientes, danos no micélio, pHs ácidos, presença de cálcio e compostos orgânicos voláteis no meio extracelular (Steyaert, Weld *et al.*, 2010; Carreras-Villaseñor, Sánchez-Arreguín *et al.*, 2012). Os conídios de natureza haplóide possuem um tamanho de aproximadamente 5 µm de diâmetro e podem ter formas globosas, subglobosas, elipsoidais ou alongadas com pouca ornamentação e cores que variam entre verde escuro a cinza dependendo da espécie (Samuels, 2006).

A formação do micélio vegetativo acontece a partir do surgimento da hifa uma vez que acontece a germinação dos conídios. A hifa cresce apicalmente e o processo inclui a expansão da membrana plasmática, biossíntese de componentes da membrana celular e direcionamento das vesículas provenientes do retículo endoplasmático (RE) para a formação do corpo de *Spitzenkörper* acúmulo de vesículas localizado no ápice que gera um gradiente de exocitose determinando a forma, direção e índice de crescimento da hifa (Steinberg, 2007; Bayram e Braus, 2012).

### **1.1.1 *Trichoderma harzianum***

*Trichoderma harzianum* é a mais comum das espécies do gênero *Trichoderma*, de ampla distribuição geográfica, principalmente encontrada em ecossistemas do solo e ocupando uma extensa diversidade de nichos ecológicos. Encontra-se associada ao controle biológico de fitopatógenos e faz parte da formulação de vários biofungicidas comerciais (Chaverri, Castlebury *et al.*, 2003; Druzhinina, Kubicek *et al.*, 2010; Chen, Huang *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Observação macroscópica e microscópica de *T. harzianum* (Romero-Arenas, Huerta Lara *et al.*, 2009).

Os isolados de *T. harzianum* foram no início morfológica e molecularmente associados a culturas provenientes de ascósporos de *Hypocrea lixii* pela primeira vez por (Chaverri, 2002) sugerindo assim uma natureza dimórfica da espécie. Não obstante estudos recentes utilizando dados da sequência de DNA de três loci não ligados provenientes de 93 isolados *T. harzianum*/*H. lixii* coletados em diferentes pontos geográficos, revelaram que a distância genética calculada entre *T. harzianum* stricto sensu e *H. lixii* foi semelhante à distância encontrada entre espécies divergentes dentro do gênero *Trichoderma* resultado que rejeita o holomorfo *T. harzianum*/*H. lixii* e se expõe a favor de manter duas espécies separadas. Da mesma forma o estudo indicou a coexistência e interação de diversas populações dentro do agregado *T. harzianum*/*H. lixii* que resultaram da sobreposição reprodutiva das mesmas e que inclui espécies hipotéticas e numerosas linhagens de posição filogenética ainda não resolvida (Druzhinina, Kubicek *et al.*, 2010).

O controle biológico de espécies fitopatogênicas é uma das principais características de *Trichoderma harzianum* que utiliza diversos mecanismos como a fungistase, que é dada pela capacidade que a espécie tem de produzir compostos orgânicos voláteis (VOCs) como álcoois, ésteres, ácidos graxos, ciclohexanos e ciclopentanos que inibem a germinação de esporos ou retardam o crescimento das hifas (Siddiquee, Cheong *et al.*, 2012). A antibiose também faz parte do arsenal químico de *T. harzianum* contra patógenos, se destacando na produção de Ciclosporina A, um dos antibióticos de amplo espectro que adicionalmente possui propriedades antifúngicas, anti-inflamatórias e antiparasíticas (Azam, 2012).

Outro mecanismo utilizado por *T. harzianum* consiste na competição por nutrientes com outros micro-organismos do solo, uma vez que se trata de uma espécie de rápida dispersão capaz de obter nutrientes a partir biopolímeros vegetais como a celulose e hemicelulose. Adicionalmente possui a capacidade de resistir naturalmente à presença de compostos tóxicos como herbicidas, fungicidas e pesticidas (Benítez, Rincón *et al.*, 2004).

O mais importante mecanismo antagônico empregado por *T. harzianum* é o micoparasitismo que consiste no ataque direto contra um fungo hospedeiro. O processo envolve eventos sequenciais que incluem reconhecimento, ataque, penetração e morte do hospedeiro. Durante o ataque *T. harzianum* secreta ao meio extracelular enzimas degradadoras da parede celular que incluem endoquitinases,  $\beta$ -glicosidases, manosidases, fosfatases ácidas e proteases as quais agem sinergicamente causando o controle efetivo de micoparasitas como *Botrytis cinerea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium* sp. (Monteiro, Do Nascimento Silva *et al.*, 2010).

Da mesma forma em que as propriedades antagônicas de *T. harzianum* têm sido utilizadas no desenvolvimento de produtos agrícolas alternativos ao uso de fungicidas químicos, preparações multienzimáticas têm sido formuladas no setor biotecnológico tendo em vista a capacidade de *T. harzianum* de secretar uma ampla gama de proteínas hidrolíticas que agem na desconstrução de diversos biopolímeros. A caracterização e otimização na produção de enzimas como celulases, mananases xilanases e lacases tem sido abordada por diferentes autores (De Paula Silveira, De Sousa *et al.*, 1999; H e X, 2004; Sadhasivam e Savitha, 2008; De Castro, Pedro *et al.*, 2010).

## **1.2 Mecanismos de secreção e glicosilação de proteínas**

A secreção de proteínas constitui uma função importante em fungos filamentosos, uma vez que tanto enzimas como proteínas estruturais são secretadas. As enzimas são liberadas da superfície da membrana plasmática dentro do espaço periplásmico, para serem incorporadas à parede celular ou secretadas através da mesma ao meio extracelular. Por outro lado as proteínas estruturais que são incorporadas à membrana e parede celular estão envolvidas em processos de reconhecimento e interação com outros fungos (Peberdy, 1994).

Em fungos filamentosos a secreção de proteínas acontece quase sempre em regiões apicais e subapicais das hifas, assim as proteínas direcionadas à via secretora são primeiro enoveladas no retículo endoplasmático (RE), com ajuda de chaperonas como a *Binding Protein* (BiP) cuja função é evitar a interação proteína - proteína, favorecer o correto

enovelamento das mesmas e participar na degradação de proteínas que não conseguem atingir a maturidade conformacional (Conesa, Punt *et al.*, 2001). Por outro lado calnexina e calreticulina participam no controle de qualidade do RE retendo as proteínas desdobradas, enquanto as foldases como a Proteína Dissulfato Isomerase (PDI) catalizam a oxidação, redução e isomerização de pontes dissulfeto, e a Peptidil Prolil Isomerase (PPIase) participa na isomerização *cis* e *trans* da ligação peptídica na extremidade N-terminal dos resíduos de prolina (Saloheimo e Pakula, 2012).

As proteínas que são sintetizadas como precursores carregam um peptídeo sinal que é reconhecido pela maquinaria celular. Este peptídeo sinal consiste de uma sequência de aminoácidos que direcionam as proteínas ao compartimento subcelular correto como núcleo, retículo endoplasmático (RE), complexo de Golgi, lisossomos, membrana celular, parede celular ou mitocôndria (Sallese, Giannotta *et al.*, 2009). Da mesma forma, o peptídeo sinal pode encaminhar as proteínas ao meio extracelular para cumprirem diferentes funções como aquisição de nutrientes, reparo e extensão da parede celular, e sensoriamento do ambiente externo (Lippincott-Schwartz, Roberts *et al.*, 2000).

Uma via de sinalização celular que exerce o controle de qualidade no enovelamento de proteínas e controla a acumulação de proteínas desdobradas no RE é a *unfolded protein response* (UPR), que leva a indução de um amplo conjunto de genes requeridos para aumentar o enovelamento, glicosilação e transporte de proteínas, liberando assim às células de proteínas desdobradas. Adicionalmente, outro sistema chamado degradação de proteínas associada ao retículo endoplasmático (*ER-associated protein degradation*- ERAD) elimina as proteínas não enoveladas com ajuda da calnexina e BiP que marcam as proteínas defeituosas, as quais são retranslocadas ao citosol e encaminhadas ao proteasoma 26S para degradação proteolítica (Aro, Pakula *et al.*, 2005).

Em fungos filamentosos, concomitantemente à ativação da via UPR existe um mecanismo que regula os genes que codificam proteínas extracelulares como celulasas e xilanases em resposta à diminuição no enovelamento e transporte de proteínas. Com o objetivo de elucidar este mecanismo regulatório, foram adicionadas as culturas de *T. reesei* substâncias como DTT que inibe a formação de pontes dissulfeto, e posterior transporte das proteínas provenientes do RE, brefeldina A que bloqueia o transporte entre o RE e o Complexo de Golgi e o ionóforo A23187 que perturba a homeostase do  $Ca^{+2}$ , dificultando o enovelamento de proteínas e a saída das mesmas do RE. O que revelou a existência de um mecanismo de regulação chamado RESS (*repression under secretion stress*) que consiste na diminuição nos níveis de mRNA que codifica exclusivamente proteínas extracelulares como celobiohidrolase I (CBH I), celobiohidrolase II (CBH II), endoglicanase II (EGL II) e

xilanase I (XYN I), entanto que genes que codificam proteínas intracelulares como a  $\beta$ -glicosidase II (BGL II) não estariam sob este controle (Pakula, Laxell *et al.*, 2003; Aro, Pakula *et al.*, 2005).

Na via secretora, as proteínas corretamente enoveladas são transportadas em direção ao complexo de Golgi com ajuda das vesículas provenientes da membrana do RE chamadas COP II que se fusionam com a membrana alvo (Spang, 2008). Vesículas COP I realizam o transporte inverso, do complexo de Golgi ao RE, a fim de recuperar as proteínas mal posicionadas. Uma vez no complexo de Golgi as modificações pós-traducionais das proteínas são completadas e encaminhadas para a exocitose. A glicosilação acontece posteriormente com a adição de cadeias de carboidratos por ação das enzimas glicosidases I, II e manosidases. Esta última etapa acontece com ajuda das vesículas formadas na porção *trans* do complexo de Golgi mediante as fibras de actina atingem a membrana plasmática (Valkonen, 2003).

O processo de N-glicosilação de proteínas em eucariotos requer o oligossacarídeo dolicol fosfato [DolPP-(GlcNAc)<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub>] como transportador, o qual é transferido por ação da oligosacaril transferase à asparagina localizada na sequência consenso (Asn-X-Ser/Thr) da proteína. A partir de diferentes cepas de *Trichoderma* sp. foram identificados sítios de N-glicosilação em diferentes hidrolases como celobiohidrolases (CBH I e II), endoglicanases (EG I, II,III, IV e V),  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glicosidase (BGL), acetilxilan esterase (AXE) e quitinases (Kruszewska, Perlińska-Lenart *et al.*, 2008).

O padrão de glicosilação é diferente para cada tipo de cepa, assim a CBH I, proveniente de *T. reesei* QM9414 quando crescida em lactose-celobiose apresentou resíduos de N-acetilglicosamina (GlcNAc) ligados à asparagina nas posições 45, 270 e 348 do domínio catalítico, entanto que a cepa RutC-30 sintetizou CBH I altamente manosilada, predominantemente do tipo GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>8</sub> (Kruszewska, Perlińska-Lenart *et al.*, 2008).

As condições do meio de cultura também influenciam o tipo de glicosilação da CBH I, assim em pH 2,5 observou-se o aparecimento de estruturas não carregadas (GlcMan<sub>7-8</sub>GlcNAc) e fosforiladas (ManPGlcMan<sub>7-8</sub>GlcNAc), sendo estas últimas ausentes em pH 5,0 e 7,0. A presença de diferentes glicofomas da CBH I também foi constatada. Tal heterogeneidade surge da formação de estruturas não manosiladas (GlcNAc) a altamente manosiladas, e presença ou ausência de grupos carregados como o ManPGlcMan<sub>7</sub>GlcNAc em um ou mais sítios do domínio catalítico (DC) da proteína o que explicaria a aparição de diferentes formas ácidas quando submetidas a focalização isoelétrica em gel de poliácridamida (PAG-IEF) (Stals, Sandra *et al.*, 2004).

Da mesma forma que acontecem N-glicosilações nas enzimas extracelulares, as O-glicosilações também tem lugar. Este tipo de glicosilação começa no RE com a transferência de um resíduo de manosil proveniente do precursor Dolicol Fosfato Manose (DFM), pela proteína O-manosiltransferase sobre o grupo –OH da serina ou treonina. O posterior alongamento da cadeia de açúcares acontece no complexo de Golgi com ajuda de manosiltransferases que utilizam a GDP-manose como doador de resíduos de manosil. Adicionalmente um O-glicano pode conter sulfato unido à cadeia de manoses, como é o caso da CBH I da cepa ALKO2287 de *T. reesei*, ao contrario da cepa Rut-C30 que em troca de sulfato possui uma molécula de fosfato unida a um dimanosídeo encontrado na mesma enzima (Kruszewska, Perlińska-Lenart *et al.*, 2008).

A modificação pós-traducional de proteínas é um passo fundamental no processamento de proteínas secretadas que afeta a conformação, estabilidade, secreção e atividade biológica de algumas enzimas hidrolíticas, como glicoamilases e CBHs. No gênero *Trichoderma*, celulasas e xilanases são altamente glicosiladas, encontrando-se N-glicosilações no domínio catalítico das proteínas, entanto que O-glicosilações se encontram restringidas ao conector peptídico entre o domínio catalítico (DC) e o modulo de ligação a carboidratos (CBM) (Kruszewska, Perlińska-Lenart *et al.*, 2008).

### 1.3 Enzimas hidrolíticas em *Trichoderma* sp.

As enzimas ativas em carboidratos *Carbohydrate-Active enZymes* (**CAZymes**) incluem enzimas que degradam, modificam ou criam ligações glicosídicas, as mesmas têm sido categorizadas em glicosil hidrolases (GHs), glicosil transferases (GTs), polissacarídeo liases (PLs) e carboidrato esterases (CEs) (<http://www.cazy.org>) (Cantarel, Coutinho *et al.*, 2009). Adicionalmente esta classificação inclui até a data 66 famílias de sítios de ligação aos carboidratos (CBMs), uma vez que grande parte das GHs possuem uma estrutura modular na qual o CBM desempenha um papel fundamental no reconhecimento e adesão do sítio catalítico ao substrato (Boraston, Bolam *et al.*, 2004).

O reconhecimento de várias CAZymes foi feito a partir do sequenciamento genômico de diferentes espécies de fungos filamentosos que incluíram também as espécies *T. reesei* (Martinez, Berka *et al.*, 2008), *T. virens* e *T. atroviridae* (Kubicek, Herrera-Estrella *et al.*, 2011), cujos genes codificam principalmente GHs, cuja classificação em famílias esta baseada na similaridade da sequência de aminoácidos, uma vez que esta reflete as características estruturais e ajuda a revelar a relação evolutiva das enzimas. O mecanismo de ação das GHs procede via retenção ou inversão do carbono anomérico (C<sub>1</sub>) do substrato depois da hidrólise. As enzimas cujo mecanismo de ação é a inversão, agem sobre uma

ligação e geram um produto de  $\alpha$ -configuração, dessa forma nas enzimas que retêm o carbono anomérico a  $\beta$ -configuração é preservada, este último tipo de enzimas adicionalmente possuem capacidade de transglicosilação e são capazes de formar oligossacarídeos a partir dos seus produtos da hidrólise quando os mesmos estão presentes em altas concentrações (Davies e Henrissat, 1995).

Várias GHs produzidas por *Trichoderma* sp que incluem celulasas, pectinases e xilanases têm sido tradicionalmente utilizadas no processamento de têxteis, papel, bebidas e alimentos para humanos e animais, mas recentemente o potencial celulolítico de algumas espécies como *T. reesei* tem sido empregado na bioconversão da biomassa vegetal em açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol, da mesma forma outras GHs como quitinases, glicanases e proteases que participam da degradação da parede celular de fungos são a base de formulações usadas no controle biológico de organismos fitopatogênicos (Viterbo, Ramot *et al.*, 2002; Sánchez, 2009).

### 1.3.1 Celulasas

A degradação de biomassa vegetal é feita na natureza em grande parte por fungos filamentosos que secretam ao meio extracelular enzimas hidrolíticas, a fim de transportar ao interior da célula os açúcares solúveis que resultam da digestão de materiais insolúveis como a celulose, hemicelulose e pectina, sendo assim responsáveis por grande parte do fluxo de materiais na biosfera e da manutenção do ciclo do carbono (Wilson, 2008b).

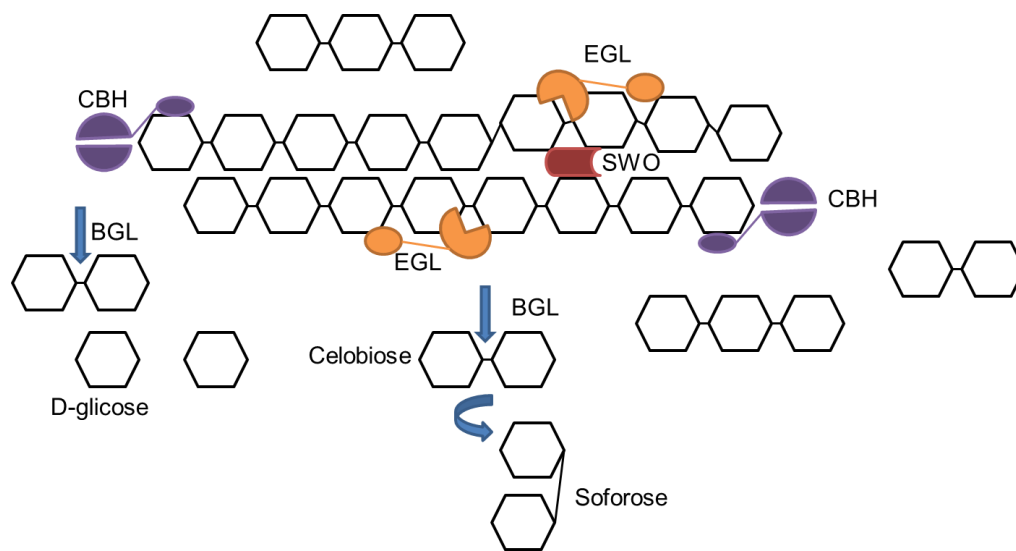
A celulose consiste de resíduos de glicose unidos por ligações  $\beta$ -1,4, formando microfibrilas que agregadas por pontes de hidrogênio e forças de *van der Waals* dão origem às estruturas cristalinas da celulose (Somerville, Bauer *et al.*, 2004). A hidrólise da celulose demanda três classes de enzimas, as endo 1-4  $\beta$ -glicanases (EGL), também conhecidas como endocelulasas capazes de hidrolisar ao interior da molécula de celulose, as exocelulasas ou celobiohidrolases (CBH) que catalisam a hidrólise da celulose insolúvel em celo-oligossacarídeos como a celobiose e as  $\beta$ -glicosidases (BGL) que convertem os oligossacarídeos em glicose (Fig. 2) (Gusakov, Salanovich *et al.*, 2007).

A espécie *T. reesei/H. jecorina*, caracteriza-se por ser o maior produtor de enzimas extracelulares, sendo altamente eficiente na produção de enzimas celulolíticas.

A celulase mais abundantemente produzida por *T. reesei* é a CBH I que pertence à família 7 das GHs e corresponde ao aproximadamente 70% de celulase total secretada pelo



fungo. A seguinte celulase mais abundante é a CBH II da família GH 6. O *T. reesei* também é capaz de produzir endoglicanases como as EGL I (GH 7) EGL II (GH 5), EGL III (GH 12), EGL IV (GH 61) e EGL V (GH 45). Outra proteína encontrada em secretomas de *T. reesei*, é a swolenina (SWO), que não possui atividade catalítica, porém participa da desconstrução da fibra de celulose, rompendo as pontes de hidrogênio (Martinez, Berka *et al.*, 2008; Wilson, 2008b).



**Figura 2** .Enzimas envolvidas na hidrólise da celulose. Sítios de ação das principais enzimas celulolíticas, celobiohidrolases (CBH), endoglicanases (EGL), swolenina (SWO) e β-glicosidase (BGL) encontradas em *Trichoderma* sp. Modificado de (Merino e Cherry, 2007).

O sítio catalítico das CBHs I e II apresenta na sua estrutura um túnel formado por pontes dissulfeto, através do qual passa a cadeia de celulose rendendo celobiose como produto da hidrólise. Na CBH I quatro *loops* formam um túnel de 50 Å enquanto que na CBH II o túnel de 20 Å é formado por dois *loops*. Esta estrutura na forma de túnel facilita a ação das CBHs, uma vez que o domínio catalítico se encontra próximo à saída do túnel de forma que as ligações glicosídicas podem ser clivados por retenção (CBH I) ou inversão (CBH II) do carbono anomérico causando assim uma despolimerização gradual da celulose (Zhang e Lynd, 2004).

As CBHs possuem uma estrutura modular que consiste em um sítio de ligação ao carboidrato (CBM) que permite o reconhecimento, aproximação e associação ao substrato conectado ao domínio catalítico (DC) por meio de um conector peptídico altamente glicosilado (Boraston, Bolam *et al.*, 2004). Os CBMs possuem uma massa que varia entre 4 e 20 kDa, e encontram-se localizados no final da sequência peptídica, utilizando para a interação com o substrato resíduos aromáticos e resíduos polares. Estas interações

encontram-se suplementadas pela formação de pontes de hidrogênio. Assim a união não covalente da estrutura cristalina da celulose ao CBM resulta no incremento da sua área superficial, em consequência da diminuição da agregação, redução na acidez da fibra e da polaridade da superfície (Lynd, Weimer *et al.*, 2002).

As endoglicanases (EGL) hidrolisam as regiões amorfas da celulose, e disponibilizam novas cadeias poliméricas, substrato das CBHs. As estruturas da EGL I e da EGL III apresentam curvaturas menores que formam um sulco, pelo qual passa a cadeia polimérica (Lynd *et al.* 2002)

Duas  $\beta$ -glicosidases (BGL) completam o sistema celulolítico de *T. reesei*, BGL I e BGL II (GH 1) que têm a função de hidrolisar celobiose e outros celo-oligossacarídeos em glicose. A diferença entre as duas enzimas se encontra no local de ação das mesmas, entanto a BGL II age a nível intracelular, a BGL I é encontrada no secretoma do fungo. Atividade de transglicosilação também tem sido reportada para estas enzimas, mostrando que quando a BGL II foi incubada em solução de celobiose, uma concentração de celotriose 20% maior do que a de glicose foi produzida. Da mesma forma pequenas quantidades de sofrorose e celotetraose também foram geradas (Saloheimo, Kuja-Panula *et al.*, 2002).

No sistema celulolítico de *T. reesei* pode acontecer sinergismo entre endo e exoglicanases, geralmente interpretado como um mecanismo sequencial da ação enzimática, na qual as endoglicanases em um ataque inicial sobre as regiões amorfas da celulose fornecem novas cadeias para a ação das CBHs. Exo-Exo sinergismo entre CBH I e CBH II também pode acontecer, uma vez que preparados enzimáticos da CBH I deixam o substrato mais facilmente hidrolisável para a CBH II e vice versa, o que indica que não é necessária uma ação sequencial das enzimas para que o sinergismo entre elas aconteça efetivamente (Nidetzky, Steiner *et al.*, 1994; Miettinen-Oinonen e Suominen, 2002).

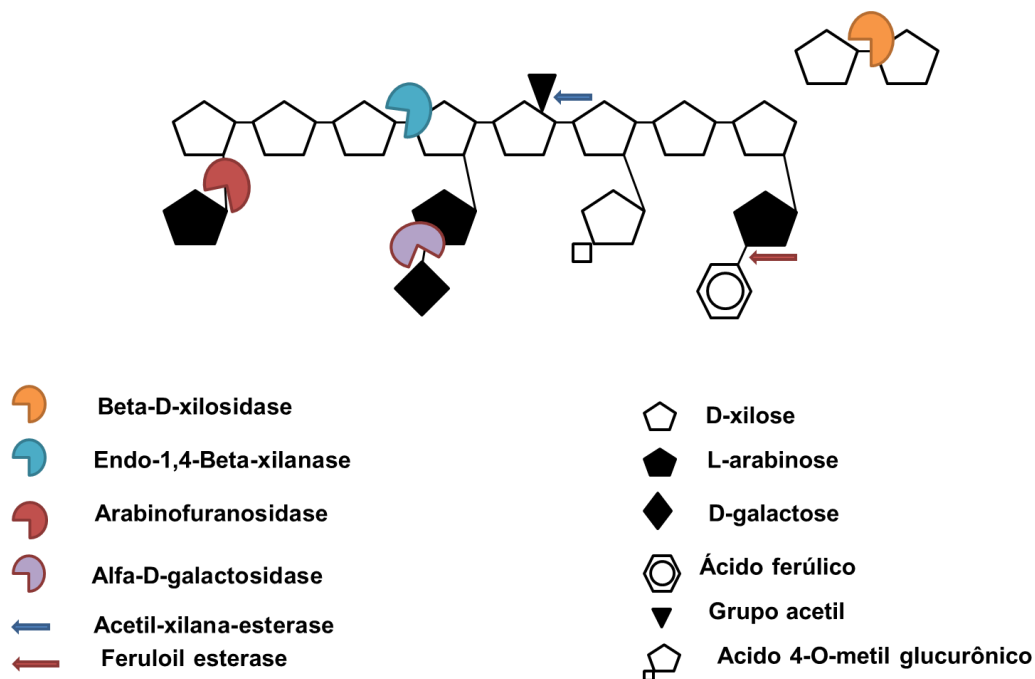
As condições ótimas de cultura para a produção de celulasas, assim como utilização de diversos substratos têm sido abordadas por diferentes pesquisadores a fim de estabelecer parâmetros cinéticos de produção tanto de cepas nativas quanto mutantes. Da mesma forma que recentemente foram identificados os genes e mecanismos responsáveis da expressão e regulação de celulasas (Miettinen-Oinonen e Suominen, 2002; Pérez, Muñoz-Dorado *et al.*, 2002; Martinez, Berka *et al.*, 2008).

### 1.3.2 Xilanases e outras hemicelulases

O segundo biopolímero mais abundante na biosfera é a hemicelulose, um complexo polimérico conformado por vários heteropolissacarídeos, cujo esqueleto possui unidades de xilose (xilanas), manose (mananas) ou glicose (glicomananas), além de cadeias laterais de arabinose, galactose, ácido acético e ácido glucurônico (Polizeli, Rizzatti *et al.*, 2005).

A hemicelulose é composta principalmente por xilana, um heteropolissacarídeo altamente ramificado que possui um esqueleto de unidades de xilopiranosas unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 que pode ter vários grupos laterais de glicopiranosil, 4-O-metil-D-glicuronopiranosil,  $\alpha$ -L-arabinofuranosil, acetil, feruol e *p*-cumaril. Em função do grau de substituição existem diferentes tipos de xilana, como a arabinoxilana, glucoronoxilana e glucoarabinoxilana que se encontram principalmente na parede celular secundária, em união covalente e não covalente com a lignina, celulose e outros polímeros essenciais mantendo assim a integridade da parede celular vegetal (Fig.2)(Collins, Gerday *et al.*, 2005).

As xilanases responsáveis pela hidrólise da xilana estão presentes em várias espécies do gênero *Trichoderma* formando parte da maquinaria enzimática secretada ao meio extracelular. Estas enzimas compreendem  $\beta$ -1,4-endoxilanases (XLN) que agem sobre a cadeia principal de xilana e  $\beta$ -xilosidases (BXL) que hidrolisam os xilooligosacarídeos em xilose. Várias enzimas acessórias como a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (ABF),  $\alpha$ -glucuronidase, acetilxilan esterase (AXE), ácido ferúlico esterase e ácido *p*-cumárico esterase, são necessárias para a hidrólise das diferentes cadeias laterais da xilana (Fig. 3) (Saha, 2003).



**Figura 3.** Ação das enzimas xilanolíticas sobre a cadeia de arabinoxilana. Adaptado de (Aro, Pakula *et al.*, 2005).

As  $\beta$ -1,4-endoxilanases (XLN) que pertencem à família 10 das GHs, geram como principal produto da hidrólise oligômeros de  $\beta$ -D-xilopiranosil, mas mono, di e trissacarídeos de  $\beta$ -D-xilopiranosil, podem também ser produzidos. Em *T. harzianum* tem sido purificadas e caracterizadas endoxilanases de baixo peso molecular (20 a 29 kDa) provenientes da cepa E 58 mostrando que a atividade ótima das mesmas acontece a temperaturas entre 50 e 60 °C e pH5,0 (Collins, Gerday *et al.*, 2005; Polizeli, Rizzatti *et al.*, 2005).

O acúmulo de oligômeros de  $\beta$ -D-xilopiranosil pode inibir a ação da endoxilanases, portanto a ação catalítica das  $\beta$ -D-xilosidases (BXL) é fundamental para dar continuidade ao processo, uma vez que estas clivam xilobiose e extremidades não redutoras de xilo-oligossacarídeos curtos, produzindo unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosil e, portanto removendo a causa da inibição, melhorando assim a eficiência na hidrólise da xilana (Knob, Terresan *et al.*, 2010).

A atividade hidrolítica das BXL (GH 3) diminui conforme aumenta o comprimento dos xilo-oligômeros, como indicado por (De Paula Silveira, De Sousa *et al.*, 1999) que mostra que a BXL, proveniente da cepa C de *T. harzianum* foi incapaz de degradar xilohexoses, confirmando que a afinidade pelo xilo-oligossacarídeo é inversamente

proporcional ao grau de polimerização do substrato. Da mesma forma, BXL mostrou atividade de transferase quando xilotetraose e xilopentose foram utilizados como substrato.

Na natureza, a xilana possui cadeias laterais de L-arabinose, ácido acetilglucurônico, 4-O-metilglucurônico, *p*-cumárico e ferúlico, que interrompem a estrutura helicoidal da xilana sem substituições. Conforme a esterificação e substituição aumentam, a digestibilidade da hemicelulose decresce. A remoção das cadeias laterais é realizada pela acetil xilana esterase (AXE) que pertence à família das CEs e remove os grupos O-acetil das posições 2 e/ou 3 dos resíduos de  $\beta$ -D-xilopiranosil da acetil xilana. Por outro lado, arabinofuranosidases (ABFs) removem resíduos de L-arabinose, glucuronidasas hidrolisam ligações  $\alpha$ -1,2 entre os resíduos de ácido glucurônico e  $\beta$ -D-xilopiranosil encontrados na glucuronoxilana, e finalmente ferúlico e cumárico esterases clivam ligações éster entre a arabinose ácido ferúlico e *p*-cumárico, respectivamente (Fig. 2) (Jeffries, 1996; Polizeli, Rizzatti *et al.*, 2005).

Substratos complexos como os provenientes de resíduos agrícolas e industriais, contém grandes quantidades de arabinoxilanas, que dificilmente podem ser degradadas pelas endoxilanases (XLN), assim uma associação com  $\alpha$ -arabinofuranosidases (ABFs) intensifica a sacarificação da arabinoxilana "pré-tratada". Este sinergismo entre xilanases se observa também com a adição de acetilxilan esterases (AXE) que resulta na liberação de ácido acético e xilana acetilada em menor grau, e por tanto mais acessível ao ataque das XLN (Polizeli *et al.* 2005).

Outras hemicelulasas como a  $\beta$ -1,4 endomananase (MAN) também têm sido isoladas em *Trichoderma* sp. A MAN age sobre o polímero de manana conformado por unidades de D-manopiranosose que se unem mediante ligações  $\beta$ -1,4. Na cepa T4 de *T. harzianum* a produção de MAN foi caracterizada a partir do crescimento do fungo em farelo de trigo por fermentação em estado líquido, mostrando que a indução da enzima aconteceu após o sexto dia de cultura atingindo um máximo de atividade (9 U/mL) aos nove dias de crescimento. Atividade das enzimas  $\beta$ -manosidase e  $\alpha$ -galactosidase também foram detectadas; estas enzimas acompanham à  $\beta$ -mananase na desconstrução do polímero de manana, agindo sobre a extremidade não redutora da manana e manano-oligosacarídeos, catalisando a hidrólise das cadeias laterais de D-galactopiranosil presentes na galactomanana e galactoglucomanana, respectivamente (Moreira e Filho, 2008).

Em diferentes espécies fúngicas, as xilanasas exibem múltiplas formas, sendo consideradas como multienzimas. Esta multiplicidade se deve a diferentes fenômenos como processamento diferencial do mRNA, modificações pós-secrecionais como digestão

proteolítica, e modificações pós-traducionais como glicosilação e auto-agregação, da mesma forma que múltiplas xilanases podem ser produto de diferentes alelos de um mesmo gene (Subramaniyan e Prema, 2002; Polizeli, Rizzatti *et al.*, 2005).

### 1.3.3 Enzimas associadas ao controle biológico

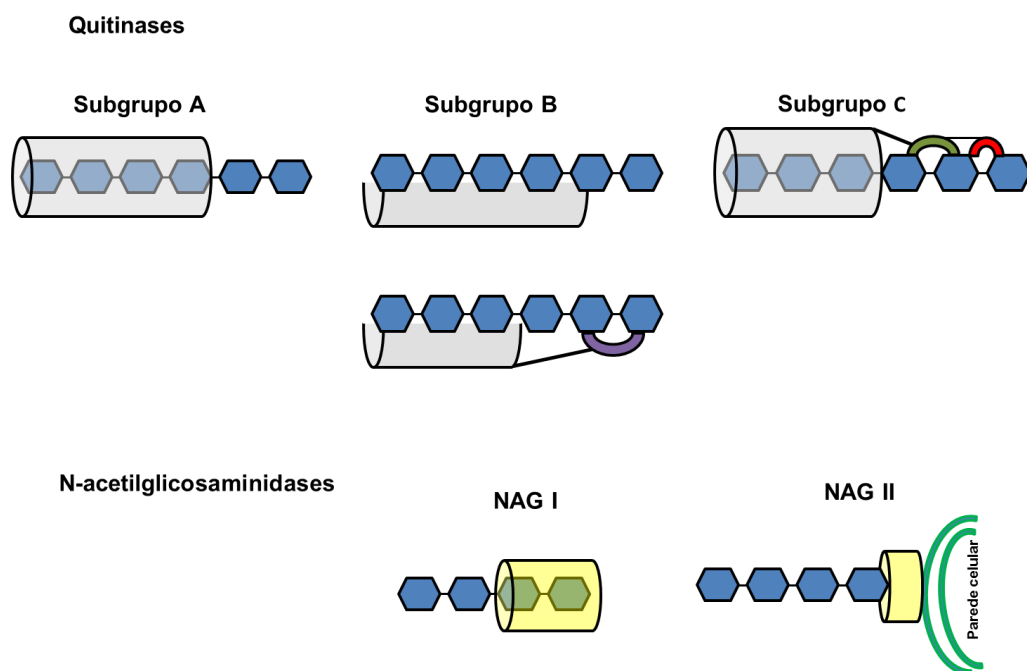
Várias espécies de *Trichoderma* são reconhecidas como agentes biocontroladores de fungos fitopatogênicos, e seus efeitos antagonísticos incluem mecanismos como interação física (micoparasitismo), síntese de compostos voláteis antifúngicos e secreção de enzimas hidrolíticas da parede celular como quitinases,  $\beta$ -(1,4)-,  $\beta$ -(1,3)-e  $\beta$ -(1,6)-glicanases e proteases (Viterbo, Ramot *et al.*, 2002).

O esqueleto da parede celular fúngica é composto principalmente de  $\beta$ -1,3, 1,6-glicanos (polímeros de glicose) ligados à quitina (polímero de GlcNAc) via ligações  $\beta$ -1,4. Este complexo quitina-glicano está ligado a outros polissacarídeos cuja composição varia de acordo com a espécie do fungo, assim alguns dos polissacarídeos encontrados podem ser galactomanana, manana e galactosaminogalactana. Estes polissacarídeos constituem 80-85% da massa da parede celular enquanto que glicoproteínas constituem o restante 15-20% (Latgé, 2007; 2010). Algumas glicoproteínas da parede celular podem estar ancoradas à membrana celular via glicosilfosfatidilinositol (GPI) participando do remodelamento da parede celular, entretanto outras GPI-proteínas podem estar covalentemente ligadas à quitina e são necessárias na transdução de sinais, formação de biofilmes, interação célula-célula e no caso de fungos patógenos no reconhecimento do tecido hospedeiro (Maddi e Free, 2010).

Durante o parasitismo *Trichoderma* se fixa ao hospedeiro e começa a crescer ao redor do micélio do mesmo para formar o apressório, dando início à secreção de enzimas hidrolíticas as quais afetam a integridade da parede celular do fungo hospedeiro, uma vez que acontece a hidrólise dos polissacarídeos que a compõem. Este processo causa a lise da parede celular e conseqüentemente a inviabilidade do hospedeiro ao mesmo tempo em que facilita o processo de penetração do micélio por parte de *Trichoderma sp.* (Benítez, Rincón *et al.*, 2004).

As quitinases (GH 18) catalisam a hidrólise de polímeros lineares de quitina, polissacarídeo formado por unidades de N-acetilglicosamina (GlcNAc) unidas por ligações  $\beta$ -(1,4), que estão classificadas em três subgrupos A, B, C considerando a similaridade da sequência de aminoácidos do domínio catalítico. Os subgrupos A e C possuem atividade de exoquitinases e um mecanismo de ligação ao substrato mediante uma fenda na forma de

túnel, entanto que o subgrupo B possui atividade de endoquitinases e uma fenda de ligação ao substrato mais aberta (Seidl, Huemer *et al.*, 2005) (Fig. 4). As quitinases além de participar de funções de parasitismo da própria parede celular em processos de germinação de esporos, crescimento e ramificação de hifas (Gruber e Seidl-Seiboth, 2012).



**Figura 4.** Sistema quitinolítico de *Trichoderma* sp. Quitinases classificadas em três subgrupos A, B e C e N-acetilglicosaminidases secretadas (NAG I) e ligadas à parede celular (NAG II). Adaptado de (Gruber e Seidl-Seiboth, 2012; Hartl, Zach *et al.*, 2012).

N-acetilglicosaminidases (NAG) também fazem parte do sistema quitinolítico de *Trichoderma* sp. e clivam o dímero quitobiose em monômeros de GlcNAc (Fig. 3). Pertencem à família 20 das GHs e podem ser secretadas ao meio extracelular como é o caso das NAG 1 ou permanecer ligadas à parede celular fúngica como as NAG 2 (López-Mondéjar, Catalano *et al.*, 2009).

As glicanases, grupo de enzimas envolvidas no micoparasitismo e morfogênese de *Trichoderma* sp. agem sinergicamente com as quitinases inibindo a germinação de esporos e o crescimento de patógenos, mediante a hidrólise dos  $\beta$ -glicanos, componentes estruturais da parede celular fúngica (Benítez, Rincón *et al.*, 2004). As  $\beta$ -1,3-glicanases (GH 55) podem ter atividade exo que clivam resíduos de glicose sequencialmente a partir da

extremidade não redutora, ou atividade endo que clivam aleatoriamente as ligações  $\beta$  dentro da cadeia de polissacarídeos liberando oligossacarídeos (Adams, 2004). Por outro lado as  $\beta$ -1,6-glicanases (GH 30) agem sobre as ligações  $\beta$ -1,6 presentes no  $\beta$ -1,6-glicano, polímero menos abundante que se encontra ligando as proteínas da parede celular com a mistura de polissacarídeos formada pelo  $\beta$ -1,3-glicano e quitina (Montero, Sanz *et al.*, 2005).

As proteases extracelulares são outro grupo de enzimas secretadas por *Trichoderma* sp. que facilitam a quebra da parede celular ao mesmo tempo que agem como inativadores proteolíticos de proteínas como poligalacturonase, pectina metil esterase e pectato liase, produzidas por agentes fitopatogênicos sobre as folhas de várias espécies vegetais (Elad, 1999). Da mesma forma, atividade entomopatogênica também foi associada à secreção de serina proteases como demonstrado na espécie *T. pseudokonigii* contra o nematódeo *Meloidogyne incognita*. As proteases extracelulares produzidas por *Trichoderma* sp. têm também um papel fundamental no desenvolvimento e fisiologia do fungo uma vez que participam no processamento pos-secrecional de proteínas, formação de micélio, autólise, nutrição, adaptação ao meio ambiente e formação de estruturas de frutificação (Yike, 2011).

#### **1.4 Regulação na síntese de enzimas hidrolíticas**

A regulação na biossíntese de celulasas parece ser dependente da produção de intermediários da hidrólise que agem como indutores enzimáticos, como é o caso da soforose, que consiste em duas moléculas de glicose unidas por uma ligação  $\beta$ -1,2 formada a partir da transglicosilação da celobiose por ação das  $\beta$ -glicosidases (BGLs). A adição de celobiose também resulta no incremento da síntese de celulasas em *T. reesei*, porém as BGLs também podem agir hidrolisando celobiose, o que produz acumulação de glicose causando a repressão catabólica, assim o sucesso da utilização de celobiose em meios de cultura depende do balanço hidrólise/transglicosilação, problema que não acontece quando o dissacarídeo lactose é adicionado ao meio de cultura. A lactose provoca um incremento na síntese de celulasas via formação do intermediário galactitol, por mecanismos ainda não resolvidos (Kubicek, Mikus *et al.*, 2009).

Por outro lado, a regulação transcricional da maioria dos genes (*cbh 1*, *cbh 2*, *egl 1* e *bgl 1*, *xyn 1*, *xyn 2* e *bxl 2*) que codificam as principais celulasas e hemicelulasas é estritamente dependente do regulador positivo Xyr 1, considerado o principal ativador da expressão de genes em *T. reesei* cuja regulação independe do tipo de expressão gênica (basal ou induzida), assim como da presença de indutores produto da degradação ou



transglicosilação como D-xilose, xilobiase, sofrorose e lactose. Adicionalmente age ativando a regulação transcricional de enzimas que dão origem a indutores como a BGL I no caso da produção de sofrorose (Stricker, Grosstessner-Hain *et al.*, 2006; Stricker, Steiger *et al.*, 2007).

No gênero *Trichoderma*, a produção de xilanases depende do reconhecimento do substrato e a presença de indutores e/ou repressores no meio de cultura uma vez que o comprimento das moléculas de xilana torna impossível sua entrada na célula. Moléculas de menor tamanho, têm um papel importante na ativação de genes, como é o caso da sofrorose por exemplo, que age como um indutor elevando o nível basal na produção da enzima endo- $\beta$ -1,4-xilanase (XLN II) quando o fungo cresce em glicose como única fonte de carbono. A produção constitutiva da XLN II permite uma hidrólise inicial do polímero e a geração de xilo-oligossacarídeos que desencadeiam a síntese das XLN I, assim como da  $\beta$ -xilosidase (BXL). A xilobiase é outro açúcar que age induzindo os genes envolvidos na síntese de xilanases, *xyn 1*, *xyn 2*, *bxl 1*, assim como genes que codificam a síntese de enzimas que agem sobre cadeias laterais como  $\alpha$ -galactosidase (*agl1*, *agl 2*) e  $\alpha$ -glucoronidase (*glr 1*) (Mach e Zeilinger, 2003; Aro, Pakula *et al.*, 2005; Seiboth e Metz, 2011).

Metabólitos da via da xilose, como o L-arabitol mostraram induzir os níveis de expressão dos genes que codificam xilanases na cepa de *T. reesei* QM 9414 agem da mesma forma que D-xilose induzindo a via D-xilose redutase 1, porém tal indução é estritamente dependente da concentração, assim baixas concentrações (0,5 a 1 mM) de D-xilose induzem a expressão de genes por até 3 h de cultivo, assim como altas concentrações de D-xilose causam diminuição dos transcritos (Mach-Aigner, Pucher *et al.*, 2010; Mach-Aigner, Gudynaite-Savitch *et al.*, 2011).

Por outro lado, a repressão de vários genes necessários para o uso de fontes de carbono alternativas resulta da presença de açúcares facilmente metabolizáveis no meio de cultura, como a glicose. Em *Trichoderma* sp. o mecanismo de repressão catabólica é mediado pelo fator de transcrição CRE 1 que age mediante a união ao sítio promotor dos genes que codificam hidrolases como *cbh 1* e *xyn 1* regulando a expressão de aproximadamente 207 genes, sendo que 118 são aparentemente reprimidos por CRE1 (Portnoy, Margeot *et al.*, 2011).

Além de genes que codificam hidrolases como celulases e hemicelulases, genes que codificam permeases de membrana representam a maior parte dos genes reprimidos por CRE1, o que indica que a repressão catabólica age preferencialmente à entrada dos

açúcares na célula. A funcionalidade do sítio de união de CRE 1 foi também observada sobre o promotor do *xyn1*, causando assim inibição na síntese da xilanase Xyn 1, mas não da Xyn 2 demonstrando que Xyn 1 e Xyn 2 possuem expressão diferencial e não se encontram reguladas pelos mesmos fatores (Mach, Strauss *et al.*, 1996; Aro, Pakula *et al.*, 2005).

Outros fatores de transcrição também envolvidos na modulação da síntese de hidrolases são o repressor Ace 1 (ativador de celulases 1) que regula negativamente a expressão das principais (hemi) celulases mesmo na presença de indutores como sofrorose e celulose, o mecanismo inibitório consiste na união à região promotora do gene *cbh 1* (Aro, Saloheimo *et al.*, 2001). Por outro lado Ace 2 (ativador de celulases 2) funciona como um regulador positivo, mediante a união ao elemento ativador de xilana XAE, no promotor do gene *xyn2* (Aro, Pakula *et al.*, 2005; Stricker, Grosstessner-Hain *et al.*, 2006).

## 1.5 Como estudar os secretomas fúngicos?

Com a finalização de diversos projetos que completaram a sequência genômica de vários fungos filamentosos, a proteômica tem agora o desafio de determinar a função do produto desses genes e entender como eles contribuem para tornarem um organismo viável em condições específicas. O proteoma abrange todas as proteínas de uma célula, tecido ou organismo, que são codificadas pelo genoma em uma determinada condição. E o proteoma pode por sua vez ser dividido em diferentes subpopulações como o **secretoma**, que se refere à coleção de proteínas secretadas por um organismo (Greenbaum, Luscombe *et al.*, 2001).

Fazendo parte do secretoma de fungos e bactérias aeróbicas encontra-se o sistema hidrolítico, caracterizado pela secreção individual de enzimas de arquitetura modular que agem de forma sinérgica na hidrólise extracelular de diferentes substratos poliméricos. Esta estratégia é diferente da utilizada por micro-organismos anaeróbicos, nos quais diversas enzimas com diferentes especificidades catalíticas se ligam entre si formando complexos multienzimáticos, que por sua vez permanecem ligados ao micro-organismo durante a degradação dos polímeros vegetais (Wilson, 2008a). Estes complexos também conhecidos como celulosomas se encontram firmemente unidos à superfície das bactérias e se caracterizam pela presença de um componente de integração celulosomal (*scaffolding protein*) de natureza não catalítica e no qual as subunidades enzimáticas são organizadas. A ligação firme das enzimas à proteína de integração celulosomal acontece pela interação do módulo de reconhecimento chamado de coesina (*cohesin*) ao módulo complementar encontrado nas enzimas conhecido como doquerina (*dockerin*) (Schwarz, 2001).

Porém recentemente complexos multienzimáticos de alto peso molecular têm sido também encontrados em secretomas de fungos aeróbicos como *Chaetomium* sp. e *Penicillium purpurogenum* agindo sobre substratos como a fibra de palma e polpa de beterraba respectivamente. A caracterização destes complexos mostrou a presença de componentes celulolíticos, xilanolíticos e pectinolíticos, cuja estabilidade se manteve em amplas faixas de pH (3-9) e elevadas temperaturas (até 60°C), assim com a sua expressão e montagem se mostraram dependentes da fonte de carbono utilizada (Ohtsuki, Suyanto *et al.*, 2005; Gonzalez-Vogel, Eyzaguirre *et al.*, 2011).

Diferentes técnicas têm sido utilizadas no estudo de complexos proteicos, como cromatografia de exclusão molecular, co-imunoprecipitação, *pull-down* de molécula única (SiMpull), transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET), transferência de energia de ressonância de bioluminescência (BRET) e eletroforese *blue-native* PAGE (BN-PAGE) entre outras (Rebois, Robitaille *et al.*, 2008; Jain, Liu *et al.*, 2011). Esta última tradicionalmente utilizada em combinação com eletroforese SDS-PAGE na segunda dimensão, na determinação da massa molecular, estado oligomérico, composição e grau de pureza de complexos e subcomplexos proteicos provenientes de membranas celulares e proteínas solúveis em água (Schägger, H., Cramer, W. A. *et al.*, 1994).

A eletroforese BN-PAGE é processada sem qualquer detergente na matriz do gel o que garante a manutenção do estado oligomérico das proteínas, cuja solubilização acontece em função das propriedades da molécula de CBB-G250 que se liga aos domínios hidrofóbicos encontrados na superfície das proteínas, carregando-as negativamente, conservando a estrutura nativa e promovendo a mobilidade eletroforética das espécies básicas em direção anódica. Da mesma forma o CBB-G250 reduz a agregação das proteínas e permite a visualização das bandas proteicas durante a corrida eletroforética (Schägger, H., Cramer, W. *et al.*, 1994; Neff e Dencher, 1999; Krause, 2006).

Para a identificação das subunidades que compõem o complexo é possível utilizar além da eletroforese SDS-PAGE, detecção com anticorpos, análise por espectrometria de massas, assim como visualização *in gel* da atividade enzimática (Reisinger e Eichacker, 2007).

Na atualidade o estudo de secretomas fúngicos pode seguir duas vertentes, a análise computacional baseada na predição de proteínas secretadas, a partir do estudo de peptídeos sinais observados nas sequências genômicas reportadas em diferentes bancos de dados, e no estudo experimental, que consiste na identificação por espectrometria de massas das proteínas secretadas. Secretomas reportados de diferentes espécies fúngicas,

tanto provenientes de análises computacionais quanto de evidências experimentais tem sido coletados em recentes bases de dados como a *FunSecKB* (<http://proteomics.ysu.edu/secretomes/fungi.php>), e a *FSD* (<http://fsd.snu.ac.kr/>) (Choi, Park *et al.*, 2010; Lum e Min, 2011).

As técnicas para a análise proteômica de misturas complexas de proteínas, como é o caso dos secretomas, requerem alta resolução, alta sensibilidade e alto rendimento juntamente com identificações confiáveis, assim duas abordagens podem ser seguidas, a primeira conhecida como proteômica *Top-down* na qual há uma análise direta da proteína intacta sem uma previa digestão proteolítica. Os métodos de fragmentação geralmente usados são *electron transfer dissociation* (ETD) e *electron capture dissociation* (ECD), métodos baseados na exposição de proteínas/peptídeos protonados a elétrons de baixa energia, resultando na clivagem de proteínas e peptídeos em diferentes posições do esqueleto de aminoácidos o que facilita a localização de modificações pós-traducionais (PTMs) em sítios específicos, e a dedução da estrutura primária completa da proteína. Os dados experimentais são usualmente analisados comparando as sequências obtidas com sequências preditas nas bases de dados (Syka, Coon *et al.*, 2004; Siuti e Kelleher, 2007; Kim e Pandey, 2012).

Por outro lado, a proteômica *Bottom up* consiste na digestão das proteínas de interesse com uma enzima como a tripsina, sendo que os peptídeos resultantes são analisados em fase gasosa mediante um espectrômetro de massas. Primeiramente a massa dos peptídeos tripticos é determinada e posteriormente os mesmos são fragmentados para gerar informação da sequência e modificações das proteínas. A identificação das proteínas é feita mediante busca em bases de dados, uma vez que os dados experimentais  $MS^n$  são comparados com fragmentos de peptídeos gerados *in silico* (Yates, Ruse *et al.*, 2009).

A análise de misturas complexas de proteínas, como são os proteomas, requer um eficiente fracionamento prévio à espectrometria de massas que garanta a detecção de peptídeos e proteínas com baixo nível de expressão, assim diferentes estratégias de fragmentação foram desenvolvidas explorando propriedades físico-químicas das proteínas como massa molecular (MM), *pI*, hidrofobicidade ou afinidade em uma interação molecular. Estas metodologias reduzem a complexidade da amostra a fim de incrementar o número de identificações (Ly e Wasinger, 2011).

Uma das técnicas de separação de amostra tradicionalmente utilizada na análise de proteomas é a eletroforese bidimensional (2-DE) que veio resolver as limitações da SDS-

PAGE, uma vez que facilita a resolução de misturas complexas de proteínas em função da carga (*pI*) e massa molecular (MM), assim como a observação de modificações pós traducionais (PTMs). Esta técnica vem seguida da espectrometria de massas (MS), para a identificação de peptídeos por *peptide mass fingerprint* (PMF) (Rabilloud, 2002). Com esta estratégia foram estudados proteomas de diferentes fungos filamentosos como *T. harzianum*, *T. reesei*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, entre outros (Tabela 1).

Mesmo que a 2-DE seja útil na separação de centenas de proteínas e seja uma técnica compatível com a MS, existem algumas limitações como a falta de sensibilidade e faixa dinâmica da 2-DE, uma vez que a quantidade de proteína que pode ser colocada no gel é limitada, adicionalmente proteínas pouco abundantes, hidrofóbicas ou com *pI*s e MM extremos podem não ser detectadas na 2-DE (Beranova-Giorgianii, 2003).

**Tabela 1.** Proteômica de fungos filamentosos utilizando como ferramentas de pesquisa 2-DE e MS

Organismo	Pesquisa	Referencia
<i>T. harzianum</i>	Proteoma de referencia do lisado celular	(Grinyer, Mckay, Nevalainen <i>et al.</i> , 2004)
	Subproteoma da mitocôndria	(Grinyer, Mckay, Herbert <i>et al.</i> , 2004)
	Secretoma induzido pela presença da parede celular de fungos fitopatogênicos	(Monteiro, Do Nascimento Silva <i>et al.</i> , 2010)
<i>T. reesei</i>	Proteoma da subunidade 20s do proteasoma	(Grinyer, Kautto <i>et al.</i> , 2007)
	Análise comparativa do secretoma das cepas RUT-C30 e CL847	(Herpoël-Gimbert, Margeot <i>et al.</i> , 2008)
<i>T. atroviride</i>	Análise comparativo da expressão de proteínas envolvidas na resposta à luz azul	(Sánchez-Arreguín, Pérez-Martínez <i>et al.</i> , 2012)
<i>A. oryzae</i>	Análise comparativa do proteoma total das cepas 3.042 e 100-8	(Oda, Kakizono <i>et al.</i> , 2006)
<i>A. niger</i>	Mudanças no proteoma e secretoma induzidas por maltose e xilose	(Lu, Sun <i>et al.</i> , 2010)
<i>B. cinerea</i>	Secretoma induzido metais pesados	(Cherrad, Girard <i>et al.</i> , 2012)

Uma técnica alternativa na separação de proteínas e peptídeos é a cromatografia líquida (LC), diferentes métodos cromatográficos como fase reversa, troca iônica, exclusão molecular e afinidade podem ser utilizadas individualmente ou em combinação, para posteriormente introduzir as amostras digeridas e separadas ao espectrômetro de massas, mediante uma interfase que pode ser *Electrospray Ionization* (ESI) ou *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) (Shi, Xiang *et al.*, 2004).

A LC e nano LC tem sido acoplada à espectrometria de massas sequencial (MS/MS), uma ferramenta utilizada no sequenciamento *de novo* a partir da fragmentação induzida por colisão (CID) de peptídeos parentais provenientes do espectrômetro de massas, assim o produto da reação é registrado em um espectro MS/MS que corresponde a uma sequência parcial de aminoácidos, específica o suficiente para identificar uma única proteína a partir de uma base de dados, resultando em maior vantagem para experimentos em proteômica do que a identificação por *peptide mass fingerprint* (PMF) na qual várias massas peptídicas provenientes de uma proteína são usadas para a identificação (Ishihama, 2005).

A MS/MS foi revolucionada com o desenvolvimento de espectrômetros de massas híbridos, que combinam as capacidades dos analisadores mais utilizados atualmente na proteômica, como o quadrupolo (Q), armadilha de íons, tempo de voo (TOF) e ressonância ciclotrônica de íons por transformada de *Fourier* (FTICR) (Yates, Ruse *et al.*, 2009). Outro tipo de analisador recentemente desenvolvido é o Orbitrap que consiste de um eletrodo interno, ao redor do qual os íons oscilam harmonicamente no eixo z, com uma frequência característica aos valores de *m/z*. A imagem gerada pelas oscilações é convertida a um espectro de frequências usando transformação de *Fourier*. O Orbitrap foi acoplado ao espectrômetro de massas *linear trap quadrupole* (LTQ), criando assim um híbrido que garante a alta qualidade e precisão dos espectros MS<sup>n</sup> a serem adquiridos, usando populações pequenas de íons em breves períodos de acumulação (Makarov, Denisov *et al.*, 2006).

A LC-MS/MS tem possibilitado o avanço das análises *shotgun*, uma técnica *gel-free* que consiste na digestão em solução de amostras complexas de proteínas e posterior separação cromatográfica da mistura de peptídeos resultantes da digestão a serem

analisados no espectrômetro de massas (Wu e Maccoss, 2002). Com o objetivo de reduzir a complexidade da amostra e incrementar a abundância e resolução dos peptídeos, uma combinação ortogonal de técnicas cromatográficas pode ser utilizada, como cromatografia de troca catiônica (SCX), afinidade ou exclusão molecular na primeira dimensão e cromatografia de fase reversa (RP) na segunda dimensão, metodologia conhecida como cromatografia multidimensional (2D-LC) (Shi, Xiang *et al.*, 2004).

Na proteômica *shotgun* os dados brutos provenientes dos espectros MS e MS/MS geram uma lista de picos, ponto de partida para a identificação das proteínas que pode ser realizada por três estratégias diferentes:

- Identificação por *Peptide-Spectrum Matches* (PSMs), baseada na correlação dos espectros MS/MS observados considerando a  $m/z$  do peptídeo precursor juntamente com espectros teóricos provenientes de uma base de dados. Os peptídeos identificados são coletados e o número de entrada da proteína é inferido a partir das sequências achadas nos bancos de dados (Nesvizhskii e Aebersold, 2005).
- Identificação por *Sequence Tag*, consiste na geração de uma sequência curta de resíduos de aminoácidos (2-4aa) deduzida a partir do espectro MS/MS, as massas das extremidades do "tag" e a razão  $m/z$  do peptídeo precursor serão comparados com uma base de dados na qual tanto a sequência de aminoácidos quanto a massa do precursor devem coincidir para conseguir a identificação da proteína (Mann e Wilm, 1994).
- Identificação por sequenciamento *de novo*, consiste na interpretação automática da sequência peptídica a partir dos espectros MS/MS gerados usando diferentes algoritmos. As sequências candidatas são posteriormente alinhadas com as sequências contidas numa base de dados, técnica que resulta favorável na identificação de proteínas provenientes de organismos cujo genoma não se encontra anotado nas bases de dados, uma vez que a busca pode ser feita por similaridade utilizando a sequência de proteínas já anotadas (Waridel, Frank *et al.*, 2007).

Com ajuda da LC-MS/MS tem sido possível a caracterização e quantificação das proteínas secretadas por diferentes espécies de fúngicas como *T. harzianum*, *T. reesei*, *A. nidulans* e *Fusarium graminearum* entre outros, na descoberta de complexos multienzimáticos (Da Silva, Gómez-Mendoza *et al.*, 2012), mecanismos de desconstrução da biomassa lignocelulósica (Adav, Ravindran *et al.*, 2011; Saykhedkar, Ray *et al.*, 2012) e subproteomas (Rampitsch, Tinker *et al.*, 2012) respectivamente (Tabela 2.).

**Tabela 2.** Proteômica de fungos filamentosos utilizando como ferramenta de pesquisa LC-MS/MS

<b>Organismo</b>	<b>Pesquisa</b>	<b>Abordagem</b>	<b>Referência</b>
<i>A. nidulans</i>	Proteoma extracelular produzido em sorgo	1D SDS-PAGE/LC MS-MS	(Saykhedkar, Ray <i>et al.</i> , 2012)
<i>A. fumigatus</i>	Análise comparativa do proteoma nos estágios iniciais do desenvolvimento	Quantificação <i>Label-free</i> (APEX)	(Suh, Fedorova <i>et al.</i> , 2012)
<i>F. graminearum</i>	Análise do fosfoproteoma	SCX,IMAC/LC MS-MS	(Rampitsch, Tinker <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. chrysosporum</i>	Análise do secretoma obtido em celulose e lignina	Quantificação iTRAQ	(Rampitsch, Tinker <i>et al.</i> , 2012)
	Análise genômico e proteômico da produção de enzimas ligninolíticas	LC MS/MS	(Fernandez-Fueyo, Ruiz-Dueñas <i>et al.</i> , 2012)
<i>T. harzianum</i>	Análise do secretoma obtido em celulose	1D SDS-PAGE/LC MS-MS	(Do Vale, Gómez-Mendoza <i>et al.</i> , 2012)
	Análise da formação de complexos em bagaço de cana	BN-PAGE/ LC MS-MS	(Da Silva, Gómez-Mendoza <i>et al.</i> , 2012)
<i>T. reesei</i>	Análise do secretoma em diferentes condições de pH	Zimografia, MALDI TOF MS e LC MS-MS	(Adav, Ravindran <i>et al.</i> , 2011)
	Análise do secretoma das cepas silvestre QM6a e mutante Rutc30 em biomassa lignocelulósica	Quantificação iTRAQ	(Adav, Chao <i>et al.</i> , 2012)



---

<i>Termobifida fusca</i>	Análise do secretoma em palha de milho, pó de serra, bagaço de cana, feno e lascas de madeira.	Quantificação <i>label-free</i> (emPAI)	(Adav, Cheow <i>et al.</i> , 2012)
<i>F. solani</i>	Análise do secretoma em resíduos de madeira	MudPit	(Scully, Hoover <i>et al.</i> , 2012)

---

Com o surgimento de novas tecnologias a proteômica tem se focando não apenas na identificação de proteínas, mas na combinação de quantificação e identificação, a fim de determinar a concentração de proteínas expressas em diferentes condições. A proteômica quantitativa permite a quantificação absoluta da concentração de uma proteína determinada em termos de ng/mL ou número de cópias da proteína por célula, mediante a utilização de peptídeos de referência externos para gerar curvas de calibração de polipeptídios provenientes de uma proteína ou então na utilização do índice de abundância proteica (PAI), definido como o número de peptídeos identificados divididos pelo número de peptídeos trípticos teoricamente observáveis para cada proteína, utilizado também para estimar a abundância de proteínas em experimentos de grande escala (Rappsilber, Ryder *et al.*, 2002; Ishihama, Oda *et al.*, 2005).

Da mesma forma, a quantificação relativa de proteínas também é realizada determinando mudança na abundância de uma mesma proteína em diferentes condições. Tanto quantificação relativa quanto absoluta de proteínas pode ser realizada por dois tipos diferentes de abordagens, a quantificação mediante o uso de isótopos estáveis para marcação química de peptídeos e a quantificação mediante técnicas *label-free* (Ong e Mann, 2005; Silva, Gorenstein *et al.*, 2006).

As técnicas mais comumente utilizadas que envolvem marcação química incluem a *isobaric tags for relative and absolute quantitation* (iTRAQ), *labelling proteins with isotope-coded affinity tags* (ICAT) e *stable isotope labels with amino acids in cell culture* (SILAC). Nestas técnicas isótopos estáveis de massas diferenciadas são incorporados nos peptídeos, seja por derivatização química ou por marcação metabólica. Posteriormente as amostras são combinadas e analisadas por MS resultando na detecção de analitos de uma determinada amostra que funcionam como padrões para analitos da mesma natureza química encontrados em outra amostra. De forma geral, estas técnicas são consideradas mais acuradas na quantificação da abundância de proteínas, porém requerem um preparo

especial da amostra, alto investimento na aquisição dos marcadores isotópicos e programas de análise específicos (Tao e Aebersold, 2003; Neilson, Ali *et al.*, 2011).

Por outro lado a proteômica quantitativa sem marcação (*label-free*) analisa o sinal MS observado de um determinado peptídeo e o correlaciona à sua abundância na amostra. Assim duas abordagens distintas, *spectral count* (SC) e determinação da intensidade do sinal do peptídeo podem ser seguidas na MS quantitativa. No caso da quantificação relativa por SC a abundância relativa de uma proteína é correlacionada ao número de *peptide spectrum matches* (PSMs) selecionados para MS/MS em experimentos *data dependent acquisition* (DDA), número de peptídeos distintos identificados e porcentagem de cobertura da proteína de interesse. Porém a acurácia das análises por SC é limitada e em vários casos proporciona uma estimativa semi-quantitativa da abundância da proteína na amostra (Bondarenko, Chelius *et al.*, 2002; Neilson, Ali *et al.*, 2011).

O processo de quantificação relativa de proteínas baseado na intensidade requer a integração da intensidade dos peptídeos ionizados eluidos dentro do espectrômetro de massas em um tempo de retenção ( $t_R$ ) específico. Utilizando a  $m/z$ , intensidade e o tempo de retenção ( $t_R$ ) de cada peptídeo identificado são gerados *extracted ion chromatograms* (XICs) a partir dos quais é possível calcular a área do pico-*area under the curve* (AUC) para indicar a relação lineal entre a área do pico e a concentração da proteína na amostra (Bondarenko, Chelius *et al.*, 2002; Neilson, Ali *et al.*, 2011).

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Caracterizar o secretoma de *T. harzianum* proveniente do crescimento em diferentes fontes de carbono, mediante o uso de técnicas enzimológicas clássicas integradas a técnicas proteômicas como eletroforese bidimensional (2-DE) e espectrometria de massas LC MS/MS, visando esclarecer o dinamismo da expressão de enzimas que participam na desconstrução de substratos (hemi) celulósicos.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1 Comparar o desempenho enzimático de *T. harzianum* com os respectivos secretomas obtidos a partir do crescimento em glicose, celulose, xilana ou bagaço de cana como fonte de carbono.

2.2.2 Elaborar mapas bidimensionais a partir da identificação das proteínas presentes nos secretomas de *T. harzianum* provenientes das culturas em glicose, celulose, xilana e bagaço de cana, utilizando eletroforese bidimensional e espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF.

2.2.3 Detectar a presença de proteínas glicosiladas a partir de mudanças observadas nos diferentes secretomas de *T. harzianum* como resultado do tratamento de desglicosilação com a enzima PNGase F.

2.2.4 Identificar as proteínas presentes nos secretomas de *T. harzianum* provenientes das culturas em glicose, celulose, xilana e bagaço de cana, mediante espectrometria de massas LC-MS/MS, bem como proteínas comuns a duas ou mais fontes de carbono.

2.2.5 Determinar a presença de complexos proteicos no secretoma de *T. harzianum* obtido por fermentação submersa em presença de bagaço de cana como fonte de carbono mediante a utilização da eletroforese nativa BN-PAGE.

2.2.6 Identificar os elementos monoméricos que conformam os complexos proteicos detectados utilizando espectrometria de massas LC-MS/MS.

2.2.7 Analisar os dados provenientes da espectrometria de massas mediante sequenciamento *de novo* e busca por homologia fim de melhorar a identificação das proteínas presentes nos complexos.

2.2.8 Verificar a funcionalidade catalítica dos complexos multienzimáticos identificados utilizando zimografia acoplada a eletroforese BN-PAGE.

2.2.9 Integrar dados provenientes da caracterização do secretoma de *T. harzianum* para esclarecer mecanismos chaves na secreção e regulação de proteínas extracelulares e identificar novos elementos requeridos no desenho de misturas enzimáticas que possam ser utilizados com fins biotecnológicos.

### **3 Metodologia**

#### **3.1 Cepa e condições de cultura**

A cepa de *T. harzianum* T 4 foi crescida a 28 °C e mantida a 4 °C em placas de *Batata Dextrose Agar* (BDA) após esporulação. Posteriormente o fungo foi cultivado aerobicamente a 28 °C em placas de agar que continham Meio Sintético (MS) (Suárez, Sanz *et al.*, 2005) e 10 g·L<sup>-1</sup> glicose (Sigma-Aldrich, Inc), 10 g·L<sup>-1</sup> Carboxi Metil Celulose (CMC) (Sigma-Aldrich, Inc), 10 g·L<sup>-1</sup> xilana *out spelt* (Sigma-Aldrich, Inc) ou 10 g·L<sup>-1</sup> de bagaço de cana pre-tratado. Após 6 dias de crescimento, uma suspensão de 10<sup>8</sup> esporos·mL<sup>-1</sup> foi preparada a partir de cada placa, e usada para inocular 300 mL de meio MS líquido suplementado com a respectiva fonte de carbono. O crescimento por fermentação submersa (SmF) aconteceu durante 9 dias a 28 °C/150 rpm. Todas as culturas foram realizadas em triplicata.

#### **3.2 Pré-tratamento do bagaço de cana**

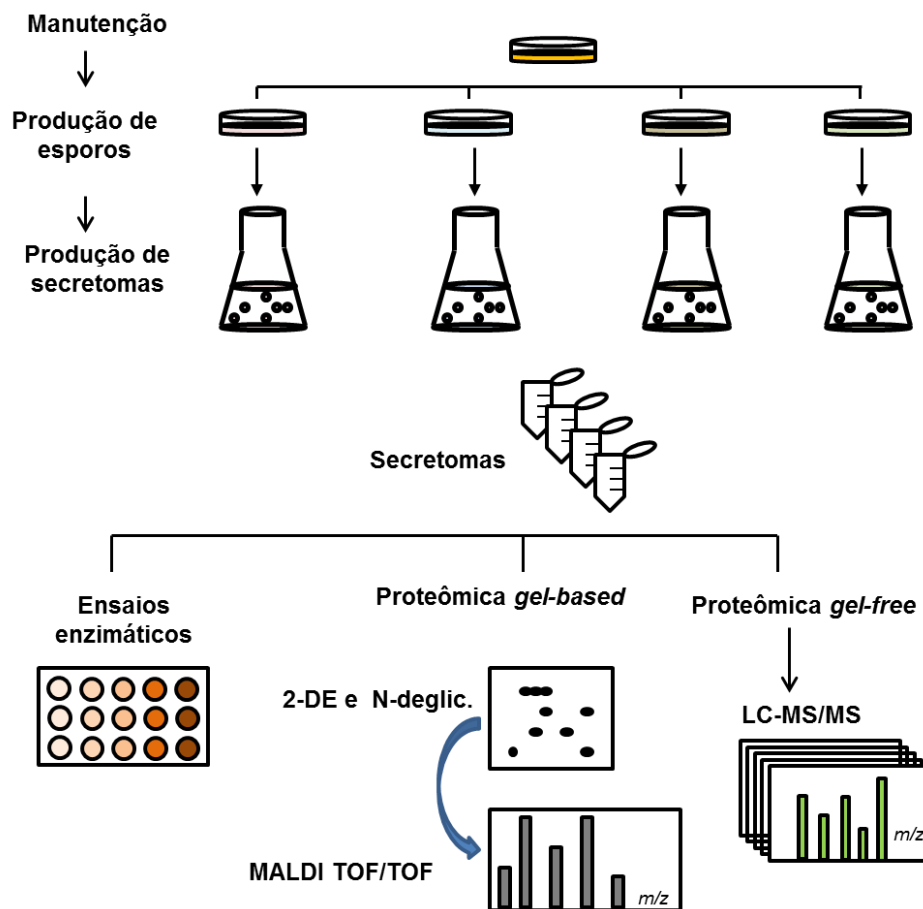
O bagaço de cana utilizado como fonte de carbono para o crescimento do fungo tanto em meio líquido quanto em meio sólido, foi pré-tratado mediante lavagem do material em água-corrente e posterior autoclavagem por duas horas a 121°C/1atm. Após escorrer o excesso de água da autoclavagem o bagaço de cana l foi disposto em bandejas para secagem a 65°C em estufa durante dois dias.

#### **3.3 Preparo de amostras**

As amostras correspondentes aos secretomas de *T. harzianum* obtidos a partir do crescimento em cada fonte de carbono (glicose, celulose, xilana ou bagaço de cana) foram filtrados e posteriormente dialisados contra água destilada, durante 4 h à 4 °C, em membrana de celulose (Sigma-Aldrich, Inc) com um *cutoff* de 10.000 Da, colocando 2,0 mL de cada filtrado, por cada 2,0 cm da membrana. As amostras dialisadas foram dispostas em tubos *falcon*, e liofilizadas. Finalmente os secretomas foram armazenados a -20 °C (Fig.5).

#### **3.4 Determinação da concentração de proteínas**

A concentração de proteínas correspondente a cada secretoma foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA) (Pierce Biotechnology, Inc) usando uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA).



**Figura 5.** Delineamento experimental seguido para caracterizar os secretomas de *T. harzianum* a partir do crescimento nas diferentes fontes de carbono.

### 3.5 Atividade enzimática

Os ensaios enzimáticos para determinação de CMCCase (endoglicanase) e xilanase pelo método do ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS) para determinação de açúcares redutores (Miller, 1959), tendo 50  $\mu$ L de enzima e 100  $\mu$ L de substrato que reagiram por 30 minutos a 50°C. Após este tempo foram adicionados 300  $\mu$ L de DNS e os tubos com os ensaios fervidos por 10 minutos. Adicionou-se 1,5 mL de água para leitura do ensaio no espectrômetro a 540 nm. A quantificação de celulasas totais (FPase) foi realizada colocando 150  $\mu$ L de cada secretoma em contato com papel DE filtro Whatman® No.1 de 1,0 x 0,6 cm, para posterior incubação por 1 h a 50 °C. Depois da adição do DNS, as amostras foram fervidas durante 10 min.

Para determinação de açúcares redutores liberados durante os ensaios enzimáticos foram construídas curvas de calibração com os monossacarídeos que formam as cadeias principais dos respectivos polissacarídeos usados como substrato. Para calibração foi utilizado uma solução estoque de 2 mg/mL para cada açúcar redutor (glicose, xilose). Variando a concentração do açúcar redutor com água destilada, totalizando sempre o volume de 150  $\mu\text{L}$ , utilizando cinco pontos para plotagem no gráfico de regressão linear, a partir do qual obtida a equação da reta utilizada para quantificar o total de açúcar redutor após a adição de 300  $\mu\text{L}$  de DNS, com fervura por 10 minutos e leitura a 540 nm. Para todos os ensaios enzimáticos foi utilizado  $\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$  como unidade de açúcar redutor liberada durante o tempo do ensaio enzimático.

### 3.6 Desglicosilação de amostras

Os secretomas dialisados e liofilizados, foram reconstituídos em 100  $\mu\text{L}$  de tampão de digestão que consistia de tampão fosfato de sódio  $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 7,5 ; SDS 0,2 % (m/v);  $\beta$ -mercaptoetanol 1  $\mu\text{L}$  e tergitol NP40 1  $\mu\text{L}$ . Posteriormente, as amostras reconstituídas foram aquecidas a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Logo após o resfriamento, 1 U da enzima PNGase F (E.C.3.5.1.52) (Sigma-Aldrich, Inc.) foi adicionada a cada amostra seguido de incubação durante 18 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Amostras controle (secretomas dialisados/liofilizados sem adição da PNGase) foram também incubadas nas mesmas condições (Fig. 5).

A glicoproteína RNAase B (E.C 3.1.27.5) (Sigma-Aldrich, Inc.) foi utilizada como substrato padrão da enzima PNGase F. Assim 90  $\mu\text{L}$  da solução estoque de RNAase B que continha  $1,1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , foram adicionados à 10  $\mu\text{L}$  do tampão de digestão previamente mencionado. 50  $\mu\text{L}$  da amostra foram separados como controle e 50  $\mu\text{L}$  entanto os outros 50  $\mu\text{L}$  foram digeridos com 2 U da enzima PNGase F durante 18 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ .

A fim de detectar a presença de O-glicosilações nos secretomas de *T. harzianum*, foi utilizado o *kit* de desglicosilação enzimática E-DEGLY (Sigma-Aldrich, Inc), que contém as enzimas:  $\alpha$ -2(3,6,8,9) neuraminidase, O-glicosidase ,  $\beta$ (1-4)-galactosidase e  $\beta$ -N-acetilglucosaminidase.

Os secretomas dialisados e liofilizados foram ressuspensos em 40  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q<sup>®</sup> e posteriormente adicionados com 10  $\mu\text{L}$  do tampão de reação, e 2,5  $\mu\text{L}$  de solução de desnaturação e 2,5  $\mu\text{L}$  de triton x-100. Logo após as amostras foram aquecidas a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Depois de resfriamento foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de cada uma das enzimas

acima mencionadas aos secretomas. Amostras de secretoma tratadas pelas mesmas condições sem tratamento enzimático foram usados como controle. As amostras (tratamento e controle) foram incubadas a 37 °C durante 18 h.

A proteína fetuína bovina (Sigma-Aldrich, Inc) foi utilizada como glicoproteína controle da O-desglicosilação, para o que 0,1 mg da proteína foram diluídos em 30 µL de água Milli-Q® e depois tratada como descrito anteriormente. Metade do volume foi preservado para o ensaio controle, entanto que a outra metade foi adicionada com a enzimas do *kit* E-DEGLY e incubado a 37 °C durante 18 h.

### 3.7 Eletroforese em gel de SDS-PAGE

A eletroforese em gel de SDS-PAGE vertical foi realizada em géis de 12 %(m/v) durante 4 h a corrente constante de 20 mA no sistema Hoefer®. Um volume de 10 µL de cada tipo de amostra, branco (b), controle (-) e tratamento (+) (PNGase e EDEGLY) foi adicionado a 10 µL de tampão de amostra (tris-HCl 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 6,8, SDS 2 %(m/v), DTT 100 mmol·L<sup>-1</sup>, glicerol 10 %(v/v) e azul de bromofenol), e aplicado em cada poço de um gel de SDS-PAGE conforme o procedimento de Laemli, 1970,. Foi utilizado o marcador de massa molecular que incluiu as proteínas: fosforilase b (97 kDa.), albumina (66 kDa.), ovoalbumina (45 kDa.), anidrase carbônica (30 kDa.), inibidor de tripsina (20,1 kDa.) e α-lactoalbumina (14,4 kDa.) (GE Healthcare). Os géis foram fixados e corados com *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G250 (Anderson *et al.* 1991).

### 3.8 Eletroforese bidimensional (2-DE)

Para a eletroforese bidimensional, géis de gradiente imobilizados de pH *Immobiline*™ *Dry Strip* (GE Healthcare) de 18 cm pH 4-7 foram usados. Os *strips* foram reidratados durante 18 h a 20 °C com 350 µL da amostra previamente dessalinizada com o *2D-Clean-Up Kit* (Amersham Biosciences) e dissolvida em tampão 2-DE que continha 85 mmol·L<sup>-1</sup> de DTT, 2,5 %(v/v) de triton X-100, 0,5 %(v/v) de tampão IPG pH 4-7 (GE Healthcare), 7 mol·L<sup>-1</sup> de uréia, 2 mol·L<sup>-1</sup> de tiouréia e 10 %(v/v) de isopropanol. A focalização isoeletrica ocorreu a 20 °C no suporte *Manifold* adaptado ao aparelho Ettan IPGphor III (GE Healthcare) e corrente constante de 75 µA/*strip*, que incluiu as seguintes etapas: *step* 1 h-500 V, grad 1 h – 1000 V, grad 3 h-10.000 V, *step* 1:50 h-10.000 V com um total de 36000 Vh.



Após a focalização as proteínas de cada *strip* foram reduzidas durante 40 min, em tampão de equilíbrio contendo tampão tris-HCl 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8,8, uréia 6 mol·L<sup>-1</sup>, glicerol 30 % (v/v), SDS 2 % (m/v) e DTT 125 mmol·L<sup>-1</sup>, seguidos de alquilação utilizando tampão de equilíbrio contendo tris-HCl 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8,8, uréia 6 mol·L<sup>-1</sup>, glicerol 30 % (v/v), SDS 2 % (m/v) e acrilamida 300 mmol·L<sup>-1</sup>. Imediatamente depois os *strips* foram transferidos a géis SDS-PAGE gradiente 8 a 15 % (m/v). A segunda dimensão foi feita usando a cuba Protean® II xi Cell (Bio-Rad), a corrente constante de 25 mA/gel. Os géis foram fixados e corados com CBB G250 (Anderson *et al.* 1991).

### **3.9 Identificação de proteínas por MALDI TOF/TOF**

#### **3.9.1 Digestão trípica *In-Gel***

Os *spots* proteicos foram excisados do gel bidimensional e transferidos a tubos de 0,5 mL. Cada *spot* foi lavado com 50 µL de acetonitrila 50 % (v/v), e posteriormente adicionados com 20 µL de tampão de bicarbonato de amônio 50 mmol·L<sup>-1</sup>, seguido de lavagem com acetonitrila durante 5 min, este procedimento foi repetido três vezes, ao termo das quais o *spot* foi macerado com ajuda de um pistilo e depois secado a vácuo durante 20 min. O *spot* foi reidratado com aproximadamente 10 µL de solução gelada de tripsina modificada 12,5 ng·µL<sup>-1</sup> (Promega™) em tampão: bicarbonato de amônio 25 mmol·L<sup>-1</sup>, cloreto de cálcio 5 mmol·L<sup>-1</sup>, e incubado em gelo durante 45 min. Aos *spots* foi então adicionado o mesmo volume da solução de digestão sem tripsina e estes foram incubados durante 18 h a 37 °C. Após a digestão, a solução de peptídeos foi recuperada e transferida a tubos de 0,5 mL. Cada amostra foi dividida em volumes iguais e guardadas à -20 °C.

#### **3.9.2 Derivatização química**

A derivatização de peptídeos foi feita com o reagente sulfofenil isotiocianeto (SPITC) (Sigma-Aldrich). Assim aproximadamente 5,0 µL da solução de peptídeos trípica foram adicionados 5,0 µL da solução SPITC (10 mg·mL<sup>-1</sup> em tampão bicarbonato de sódio 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8,6) e incubados durante 1 h à 56 °C. A reação foi interrompida com a adição de 1 µL de TFA 5 % (v/v).

### 3.9.3 Dessalinização e concentração de amostras

Uma microcoluna cromatográfica foi utilizada para a concentração e dessalinização da solução de peptídeos previamente à análise por espectrometria de massas. A coluna de fase reversa consistiu de aproximadamente 100 nL de resina Poros R2 (Applied Biosystems), empacotada em uma ponteira GELoader<sup>®</sup> (Eppendorf). A coluna foi equilibrada pela adição sucessiva de 10 µL de TFA 1% (v/v) e 20 µL de solução de TFA 0,1 % (v/v). A amostra contendo os peptídeos (aproximadamente 10 µL) foi aplicada e a coluna foi lavada novamente com TFA 0,1 % (v/v). Os peptídeos ligados à coluna foram eluídos com 2 µL da solução de matrizes que continha uma parte de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) (Fluka Analytical) 5 µg µL em acetonitrila 90 % (v/v) e 10 % ácido fórmico 5 % (v/v) e uma parte de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) (Sigma Aldrich, Inc) 5 µg µL<sup>-1</sup> em acetonitrila 90 % (v/v) e 10 % de TFA 0,1 % (v/v).

### 3.9.4 Espectrometria de massas

Os espectros MS foram obtidos no equipamento Autoflex II TOF/TOF (Bruker, Daltonics), em modo positivo com aproximadamente 300 tiros do *laser* por amostra. Os espectros foram calibrados externamente com o *kit* PepMix (Promega<sup>™</sup>) e internamente com picos conhecidos de tripsina e queratina. Para a identificação de proteínas, todos os espectros MS e MSMS provenientes da digestão trípica dos *spots*, foram submetidos à buscas contra as bases de dados NCBI *nr*, usando o programa de busca MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Adicionalmente, análises manuais dos espectros PFF foi realizada a fim de obter sequências *de novo*, que foram analisadas nos programas de busca MS Blast e BLASTp para sequência curtas. Os parâmetros de busca no MASCOT foram 1) categoria de taxonomia Fungi, 2) tolerância da massa do peptídeo 100 ppm, 3) máximo uma perda na clivagem da tripsina, 4) propionamidação da cisteína como modificação fixa e 5) oxidação da metionina como modificação variável. Uma proteína foi considerada identificada quando o MASCOT *score* indicou identidade ( $p < 0,05$ ).

## 3.10 Proteômica “shotgun”

### 3.10.1 Digestão trípica em solução

Alíquotas correspondentes a 100 µg de proteína provenientes de cada secretoma foram reduzidas em solução de 10 mmol L<sup>-1</sup> de DTT em 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 8,3 de

bicarbonato de amônio durante 1 h a 30 °C. Posteriormente as cisteínas foram bloqueadas usando uma solução de iodoacetamida (IAA) 40 mmol·L<sup>-1</sup> durante 30 min no escuro e à temperatura ambiente. Os secretomas reduzidos e alquilados foram adicionados com 175 µL de água Milli-Q® e 20 µL de tripsina (0,1 µg·µL<sup>-1</sup>) (Promega™). As amostras foram finalmente incubadas a 39°C durante 18 h. Os peptídeos trípticos foram acidificados adicionando-se 1 µL de TCA 0,1 % e dessalinizados usando *Ultra-Micro SpinColumns C-18* (Harvad Apparatus).

### 3.10.2 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)

A solução de peptídeos proveniente de cada secretoma foi secada no *speed vac* e reconstituída em 15 µL de ácido fórmico 0,5 %(v/v) para análise no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific) acoplado ao sistema de cromatografia líquida EASY-nLC II (Proxeon, Denmark). Os peptídeos foram enriquecidos usando uma coluna *trap* (200 µm x 2.0 cm) preenchida com resina Reprosil-Pur 120 C18-AQ (tamanho da partícula 5 µm- Dr. Maish). Depois de 4 min de lavagem usando o solvente A (acetonitrila 5 %(v/v), ácido fórmico 0.1 %(v/v)) os peptídeos foram separados em coluna analítica (200 µm x 10 cm) preenchida com resina Reprosil-Pur 120 C18-AQ (tamanho da partícula 3 µm- Dr. Maish) com fluxo de 200 nL·min<sup>-1</sup>. A separação cromatográfica foi realizada usando um gradiente de eluição de 5-20 % do solvente B (acetonitrila 95 %(v/v), ácido fórmico 0.1 %(v/v)) durante 30 min, seguido por 15 min de B 20-50%, 5 min de B 50-100 % e finalmente 10 min de B 100%. Os peptídeos foram eluídos da coluna analítica dentro do espectrômetro de massas com ajuda de uma sonda *nanospray* (Thermo Scientific) usando um *emitter* (20 µm i.d., 10 µm tip i.d.) (New Objective). A voltagem do spray foi de 1.8 kV e a temperatura de transferência capilar de 180 °C. O LTQ Orbitrap Velos operou no modo *Data Dependent Acquisition* (DDA) usando o programa Xcalibur 2.1 (Thermo Scientific) e resolução de 60,000 a 400 *m/z*. O ciclo de aquisição consistiu na fragmentação dos 10 íons precursores mais intensos a uma resolução de 60.000 e varredura de massas na região de 300-1800 *m/z* para geração dos espectros MS/MS usando para a fragmentação *higher energy dissociation* (HCD). Os íons selecionados para fragmentação foram dinamicamente excluídos durante 90 segundos. Para cada amostra foram realizadas duas corridas independentes.

### 3.10.3 Identificação de proteínas

Todos os espectros MS/MS foram processados usando o programa Proteome Discoverer v.1.3 (Thermo Scientific) e buscados contra o banco de dados NCBI *nr* da taxonomia Fungi que contém 174,581 sequências utilizando o programa Mascot v.2.1 (Matrix Science, Ltda) considerando os seguintes parâmetros de busca: 1) até duas perdas na clivagem da tripsina, 2) tolerância de até 20 ppm para o precursor e 0.5 Da de tolerância para os fragmentos, 3) carbamidometilação das cisteínas como modificação fixa e 4) oxidação da metionina como modificação variável. Foram consideradas buscas confiáveis aquelas cujo *score* total fosse superior a 60. O *false-discovery rate* FDR aceito para as identificações foi de 1 %. A fim de prever sítios de N-glicosilação nas proteínas identificadas a sequência de cada uma delas em formato FASTA foi analisada no programa NetNGlyc Server 1.0 ([www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc)).

### 3.11 1D-Blue Native-PAGE (BN-PAGE)

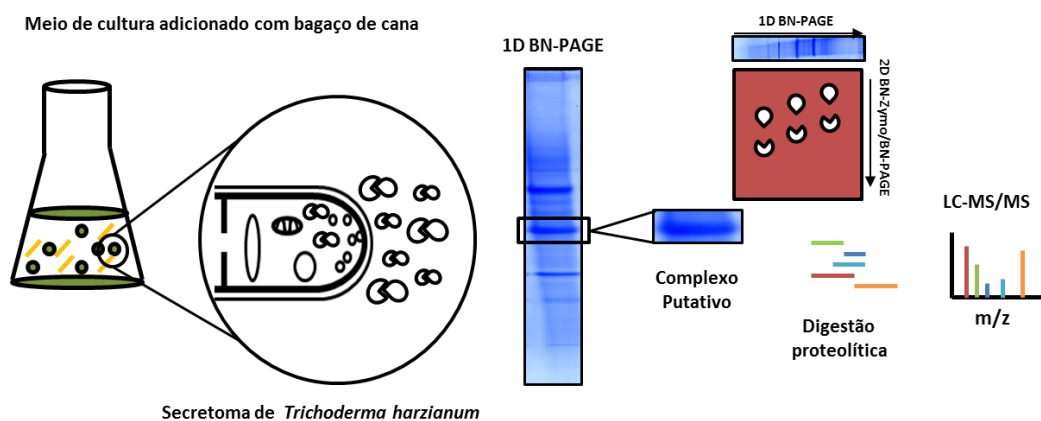
Eletroforese BN-PAGE foi realizada para proteínas solúveis em água segundo a metodologia proposta por (Schägger, H., Cramer, W. A. *et al.*, 1994). Deste modo, o secretoma liofilizado de *T. harzianum* proveniente do crescimento em meio contendo bagaço de cana foi ressuspenso em tampão contendo 0,5 mol·L<sup>-1</sup> de ácido  $\epsilon$ -aminocapróico, 0,05 mol·L<sup>-1</sup> de Bis/Tris-HCl 15 % (m/v) de glicerol e pH 7.0. Concentrações variáveis de proteína (0,2 mg·mL<sup>-1</sup>, 5,0 mg·mL<sup>-1</sup> e 10,0 mg·mL<sup>-1</sup>) foram aplicadas no gel gradiente (5-18 % (m/v)) de poliacrilamida que correu a corrente constante de 15 mA durante 4 h a 4 °C no sistema de eletroforese SE 600 (Hoefer, Inc). O tampão anódico utilizado esteve composto de 0,05 mol·L<sup>-1</sup> de Bis-Tris HCl pH 7.0, enquanto que o tampão catódico esteve composto de 0,05 mol·L<sup>-1</sup> de Tricina, 0,015 mol·L<sup>-1</sup> de Bis-Tris-HCl pH 7,0 e 0,02 % (m/v) de CBB G-250 (Bio-Rad) (Fig.6).

Após a corrida, os géis foram fixados e corados usando CBB G-250 como descrito anteriormente. As proteínas tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), lactato desidrogenase (158 kDa) e BSA (67 kDa) foram usadas como padrões de massa molecular.

### 3.12 2D- BN-PAGE

A segunda dimensão do gel BN-PAGE foi realizada usando um gel tricina-SDS-PAGE como descrito por (Schägger, H., Cramer, W. A. *et al.*, 1994). As bandas

correspondentes aos complexos putativos detectados a partir do gel BN-PAGE foram excisadas e incubadas em solução contendo 1 % (m/v) de SDS e 1 % (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol por 2 h a temperatura ambiente. As bandas de gel foram posteriormente lavadas com água Milli-Q<sup>®</sup> para remoção do excesso de mercaptoetanol e transferidas à placa de vidro do sistema eletroforético. Uma mistura de 16 % (m/v) poliacrilamida tricina SDS foi utilizada para preencher o espaço entre as placas, deixando um espaço de 2 cm abaixo das bandas de gel que continham os complexos. Uma vez polimerizado foi adicionada uma solução de 10 % (m/v) de poliacrilamida tricina SDS. Finalmente, as bandas de gel foram embebidas em solução nativa de 10 % (m/v) de poliacrilamida contendo 10 % (v/v) de glicerol e 0,2 % (m/v) de SDS (Fig.6). A eletroforese correu a corrente constante de 50 mA e 18 °C durante aproximadamente 10 h. O gel de tricina-SDS-PAGE foi fixado e corado com prata (Blum, Beier *et al.*, 1987).



**Figura 6.** Metodologia seguida na detecção de complexos proteicos no secretoma de *T. harzianum* a partir do crescimento em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono

### 3.13 Zimografia usando 1D-BN-PAGE e 2D-BN/BN-PAGE

O secretoma de *T. harzianum* foi submetido a análise zimográfica utilizando géis 1D-BN-PAGE co-polimerizados com 0,1 % (m/v) de xilana *oat spelts* ou CMC (Sigma-Aldrich) a fim de detectar atividade xilanolítica e celulolítica nos complexos putativos previamente detectados. O secretoma foi adicionalmente submetido a análise zimográfica usando 2D-BN/BN-PAGE, na qual uma primeira dimensão do gel BN-PAGE foi acoplada a uma segunda dimensão de BN-PAGE cuja malha continha CMC ou xilana como substrato para a detecção da atividade enzimática. Após a corrida eletroforética os géis 1D-BN-PAGE

e 2D-BN/BN-PAGE, foram lavados com solução de acetato de sódio 0,05 mol.L<sup>-1</sup> pH 5.5 e incubados por 10 min a 85 - 90 °C para detecção de atividade xilanólítica ou por 1 h a 55 °C para detecção de atividade celulolítica (Matsui e Ban-Tokuda, 2008). A reação foi parada incubando-se os géis à 4 °C durante 18 h. Posteriormente os géis foram corados usando solução de *congo red* 0,1 % (m/v) por 30 min. O halo de hidrolise do substrato foi observado após a adição de solução de ácido acético 0,5 %(v/v).

### 3.14 Espectrometria de massas LC- MS/MS

As três bandas mais intensas detectadas no gel 1D-BN-PAGE correspondentes aos três complexos proteicos foram excisadas para posterior identificação por LC-MS/MS no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific), conforme descrito na seção 4.9.2.

### 3.15 Análise de dados

A fim de identificar as proteínas presentes nos complexos putativos foi realizada uma busca convencional de proteínas no programa MASCOT em combinação com uma busca por similaridade como descrito por (Junqueira, Spirin *et al.*, 2008) no programa MS-BLAST.

- Identificação de proteínas por identidade: Os arquivos *.raw* provenientes da espectrometria de massas foram convertidos ao formato *.mgf* e posteriormente os espectros MS/MS de proteínas contaminantes foram removidos usando o servidor EagleEye v1.66 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/cgi-bin/msfilter/eagleeye.cgi>). Os arquivos *.mgf-good* foram descarregados do servidor para a busca contra a base de dados NCBI nr (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o programa MASCOT v.2.1 (Matrix Science, Ltda). Os parâmetros de busca estabelecidos foram (1) Taxonomia fungi, (2) tripsina como enzima de digestão, (3) acima de duas perdas na clivagem (4) 10 ppm de tolerância na massa do precursor, (5) 0.6 Da de tolerância na massa dos fragmentos (6) carboxiamidometilação das cisteínas como modificação fixa e (7) oxidação da metionina como modificação variável. As identificações foram confiáveis se no mínimo três espectros MS/MS tinham um *ion score* acima de 20 ou dois espectros com *ion score* acima de 30. Identificações com um único espectro pareado foram consideradas *borderline hits*.
- Sequenciamento *de novo* e identificação de proteínas por homologia: Os espectros MS/MS foram submetidos a sequenciamento de novo usando o programa PepNovo (Frank

e Pevzner, 2005) após a remoção dos espectros provenientes de proteínas contaminantes. As sequências geradas foram posteriormente buscadas no servidor MS BLAST ([http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/iblast\\_databases.html](http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/iblast_databases.html)) contra uma base de dados não redundante NCBI *nr* (nrdb95).

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Atividade enzimática dos secretomas

O cultivo do fungo *T. harzianum* foi realizado em meio sintético adicionado separadamente por quatro diferentes fontes de carbono, glicose, CMC, xilana e bagaço de cana a fim de avaliar a resposta do fungo em relação à produção de enzimas hidrolíticas. O meio de cultura suplementado com glicose como fonte de carbono foi usado como controle negativo devido ao esperado fenômeno da repressão catabólica provocada pela glicose.

Da mesma forma polissacarídeos frequentemente encontrados como componentes da parede celular de plantas como celulose e xilana foram utilizados no cultivo do fungo a fim de avaliar diferenças na expressão de enzimas relacionadas à hidrólise de hexoses e pentoses, respectivamente. Finalmente bagaço de cana foi também utilizado como fonte de carbono a fim de avaliar a capacidade do fungo de hidrolisar resíduos agrícolas de composição heterogênea. Assim o bagaço de cana recebeu um tratamento prévio que incluiu etapas de lavagem e redução do tamanho da partícula, com o objetivo de eliminar do bagaço compostos inibitórios derivados da prática agrícola, e ao mesmo tempo facilitar a acessibilidade dos polissacarídeos presentes no bagaço ao ataque enzimático de *T. harzianum*.

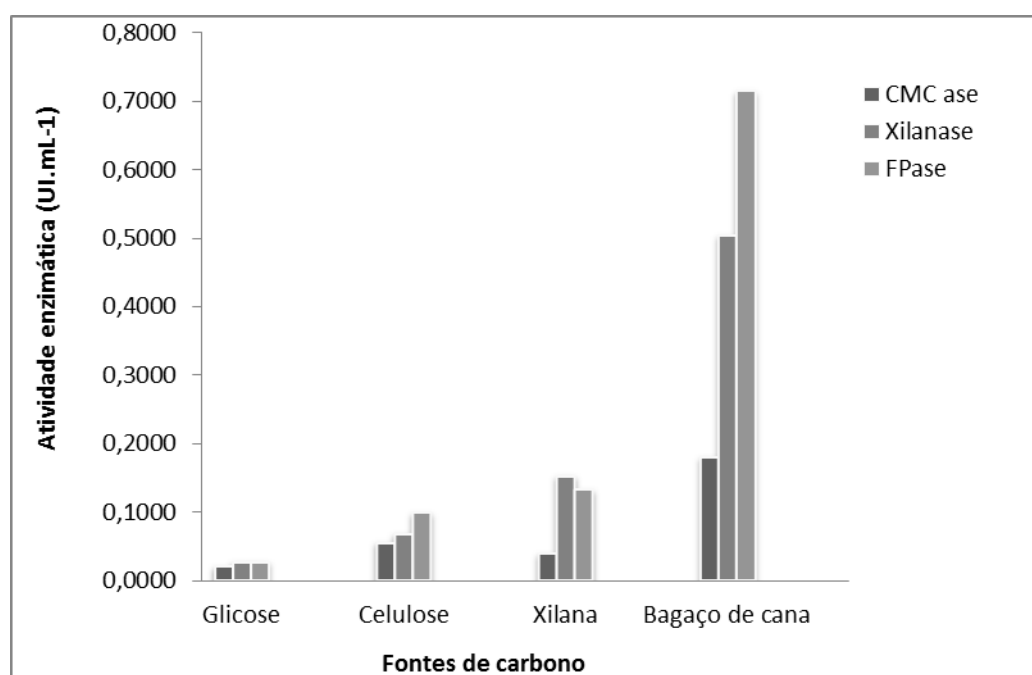
Em primeiro lugar foi avaliada a eficiência de cada secretoma na hidrólise de substratos como papel de filtro, xilana e CMC mediante determinação da atividade enzimática. Como resultado do crescimento em glicose foi observada baixa atividade celulolítica e xilanolítica se comparado às outras fontes de carbono testadas (Tabela 3) (Fig.7).

O secretoma proveniente do crescimento em celulose mostrou semelhança entre as atividades de CMCase e xilanases, e a atividade xilanolítica se destacou tanto para o secretoma obtido em xilana quanto para o proveniente de bagaço de cana (Tabela 3) (Fig.7). Por outro lado atividade da CMCase teve significância semelhante entre os secretados provenientes de celulose e bagaço de cana, diferentemente do crescimento em xilana que apresentou menor atividade de CMCase dentre os três substratos complexos testados (Tabela 3) (Fig.7).

**Tabela 3.** Atividade enzimática (U·mL<sup>-1</sup>) do secretoma de *T. harzianum* obtido em G)glicose, C) celulose, X) xilana e BC) bagaço de cana



	Atividade enzimática (UI.mL <sup>-1</sup> )			
	Glicose	Celulose	Xilana	Bagaço de cana
<b>CMC ase</b>	0,0208 ± 0,0081	0,0560 ± 0,0191	0,0395 ± 0,0165	0,1808 ± 0,0205
<b>Xilanase</b>	0,0273 ± 0,0137	0,0689 ± 0,0327	0,1530 ± 0,3822	0,5044 ± 0,0400
<b>FPase</b>	0,0274 ± 0,0951	0,0993 ± 0,0145	0,1328 ± 0,2091	0,7152 ± 0,4135



**Figura 7.** Atividade enzimática de endoglucanases (CMCase), celulases totais (FPase) e xilanases do secretoma de *T. harzianum* cultivado em meio sintético contendo 1 %(m/v) de glicose, celulose, xilana e bagaço de cana.

Os resultados da dosagem enzimática evidenciaram o mecanismo de repressão catabólica, que aconteceu como consequência do crescimento em um substrato mais facilmente metabolizável como a glicose, uma vez que atividade pouco significativa das enzimas foi observada. Este fenômeno tem sido igualmente identificado em várias espécies de fungos filamentosos como *A. nidulans* e *T. reesei*, nos quais o regulador catabólico CreA/Cre1 age principalmente no controle de genes que codificam permeases presentes na membrana plasmática do fungo, controlando assim a entrada de açúcares ao interior da célula (Mach, Strauss *et al.*, 1996; Mach e Zeilinger, 2003).

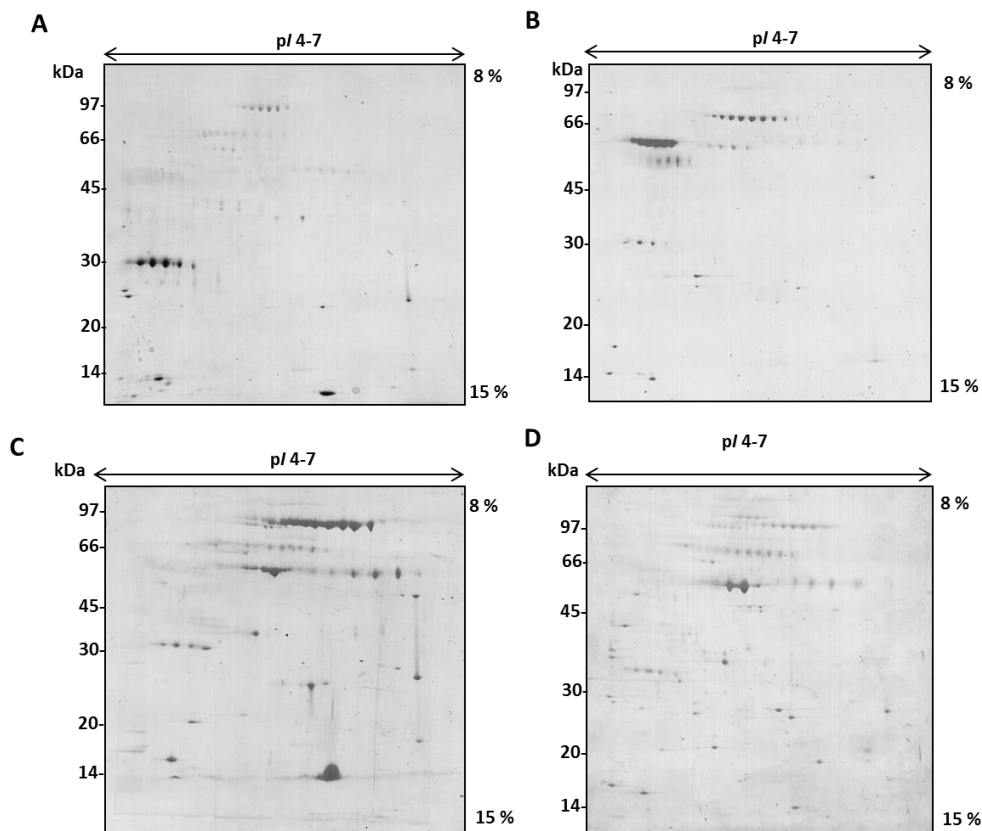
Da mesma forma CreA/Cre1 controla genes associados à síntese de enzimas extracelulares como (hemi) celulases regulando a indução dos mesmos mas não a sua expressão basal (Portnoy, Margeot *et al.*, 2011). Por outro lado genes envolvidos na conidiação e desenvolvimento de hifas como MedA, PhiA e RAS1 também são CreA/Cre1 dependentes, o que poderia explicar as diferenças de pigmentação e produção de conídios observadas a nível macroscópico a partir do crescimento do fungo nas diferentes fontes de carbono (Portnoy, Margeot *et al.*, 2011).

Em todos os secretomas foi observado maior atividade xilanólítica do que celulolítica; estes resultados sugerem que a cepa T4 de *T. harzianum* seja mais eficiente na produção de xilanases, como confirmado por (Ahmed, Imdad *et al.*, 2012) em estudos envolvendo produção de xilanases por *T. harzianum* a partir de diferentes substratos poliméricos. Da mesma forma foi evidenciado que conforme aumentava a complexidade da fonte de carbono no meio de cultura, maior se tornava a atividade enzimática detectada nos secretomas, demonstrando que uma fonte rica em polímeros vegetais como é o caso do bagaço de cana pode ser mais favorável na produção de enzimas de interesse biotecnológico, uma vez que estimula a secreção de diferentes tipos de enzimas necessárias para hidrolisar os polímeros constituintes da parede celular vegetal; e os monossacarídeos como a D-xilose e dissacarídeos como sofrorose, celobiose e xilobiose que resultam da atividade hidrolítica das enzimas, são acumulados atuando por sua vez como elementos indutores da expressão de xilanases e celulases (Schmoll e Kubicek, 2003; Mach-Aigner, Pucher *et al.*, 2010).

## **4.2 Análise proteômica**

### **4.3 Perfis bidimensionais dos secretomas**

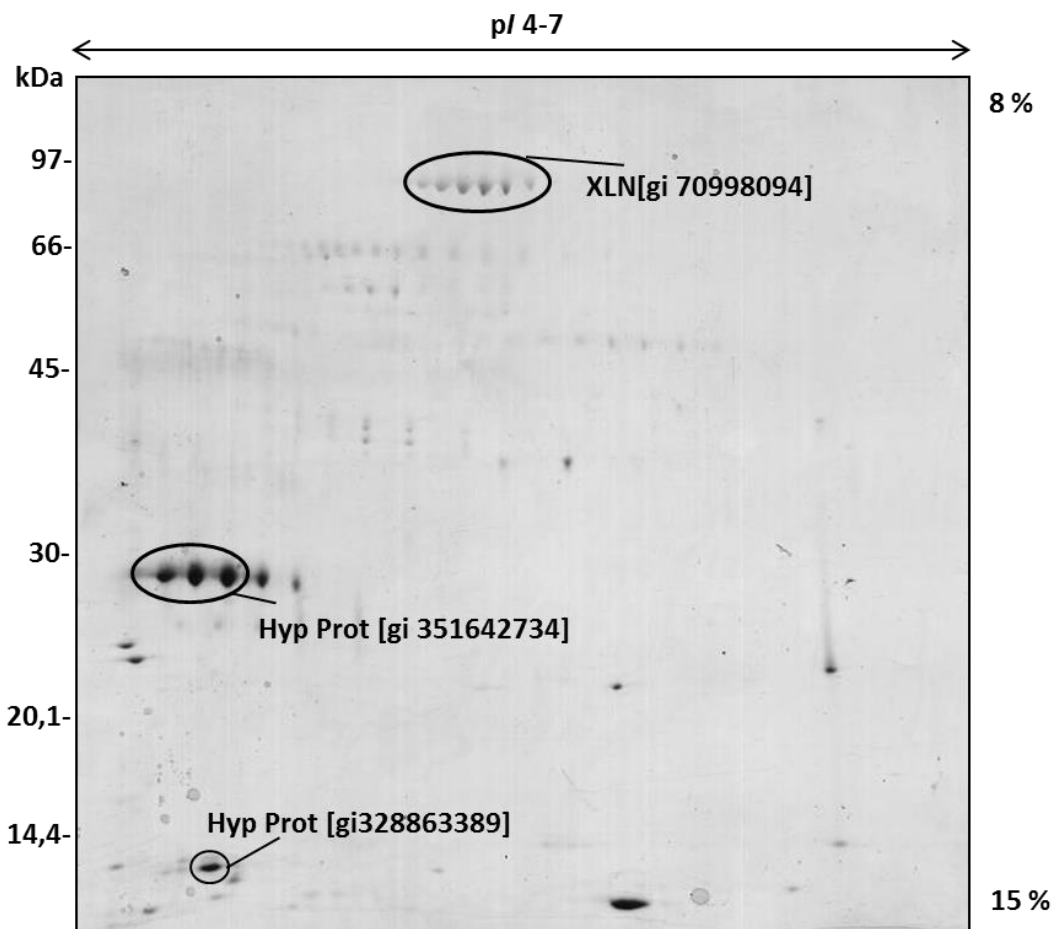
Para observação de polimorfismos proteicos e construção de mapas bidimensionais, géis 2-DE foram produzidos para cada um dos secretomas. Constatando-se uma evidente diferença entre os perfis bidimensionais de cada amostra, tanto em relação ao padrão de distribuição, quanto a abundância de proteínas e presença de isoformas. Em um estudo prévio foi demonstrado que um grande número das proteínas do secretoma de *T. harzianum* se encontrava concentrado na região ácida de géis 2-DE utilizando *strips* de faixa ampla de pH (3-10), portanto na presente pesquisa faixas estreitas de pH (4-7) foram utilizadas a fim de aumentar a resolução das isoformas encontradas nesta região e verificar padrões de distribuição de proteínas característicos de cada secretoma (Fig.8).



**Figura 8.** Comparação do perfil bidimensional do secretoma de *T. harzianum* obtido a partir do crescimento em meio contendo A) glicose, B) celulose, C) xilana e D) bagaçõ de cana. A primeira dimensõ dos géis foi feita usando IPG *strips* pH 4-7, de 18 cm e na segunda dimensõ SDS-PAGE gradiente de 8-15 % 20 x 20 cm x 1,5 mm. As proteínas foram visualizadas após coloraçõ com CBB G-250 como descrito na seçõ 3.

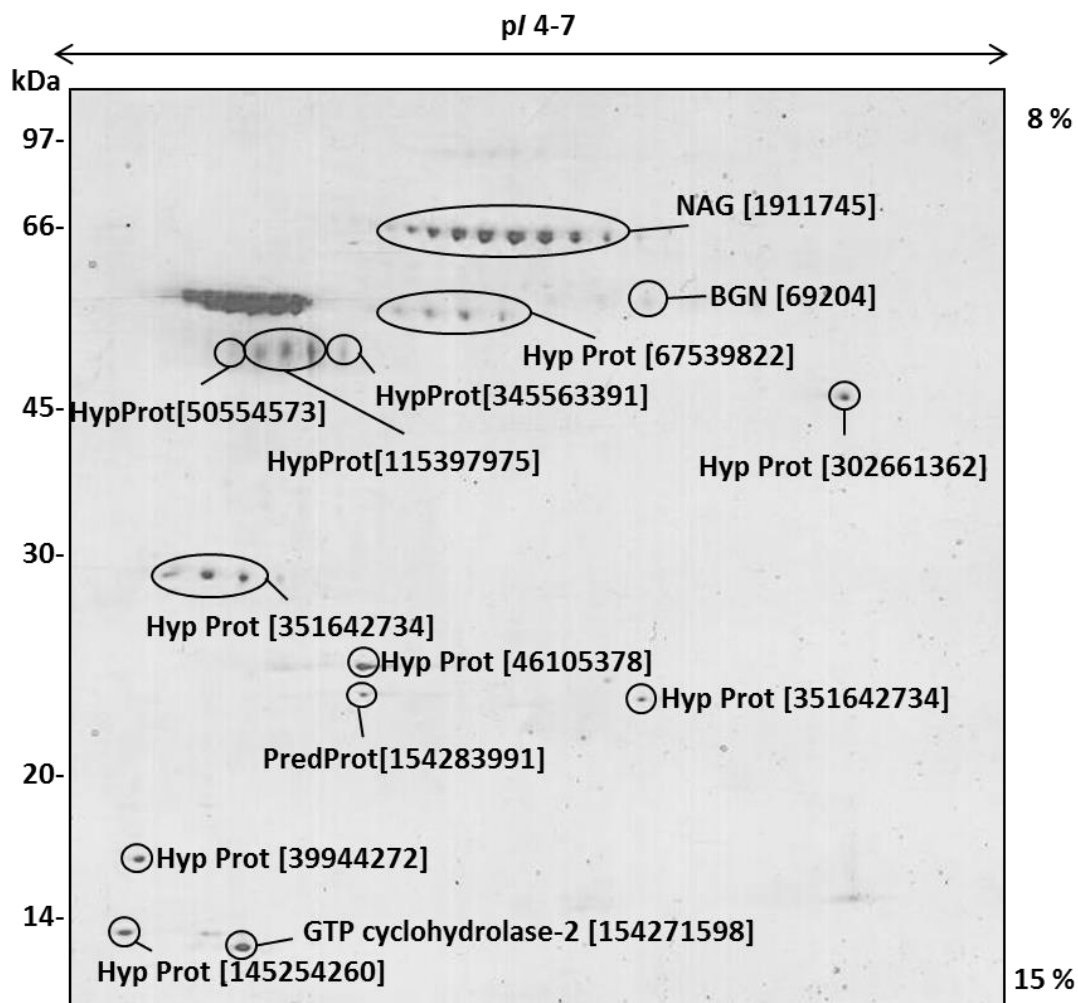
A partir dos perfis bidimensionais foi possível observar que em média as quatro condições testadas apresentaram entre 50 e 60 *spots*/gel dos quais a maioria correspondia a polimorfismos proteicos, principalmente os que estavam localizados na região de alta massa do gel (Fig. 8).

No caso do crescimento em glicose, um total de 55 *spots* foram observados dos quais 27 corresponderam a isoformas de proteínas, como a enzima endo-1,4-beta xilanase (XLN) que foi identificada exclusivamente a partir de esta fonte de carbono a partir dos *spots* 2-7 do secretoma (Fig.9) (Tabela 4).



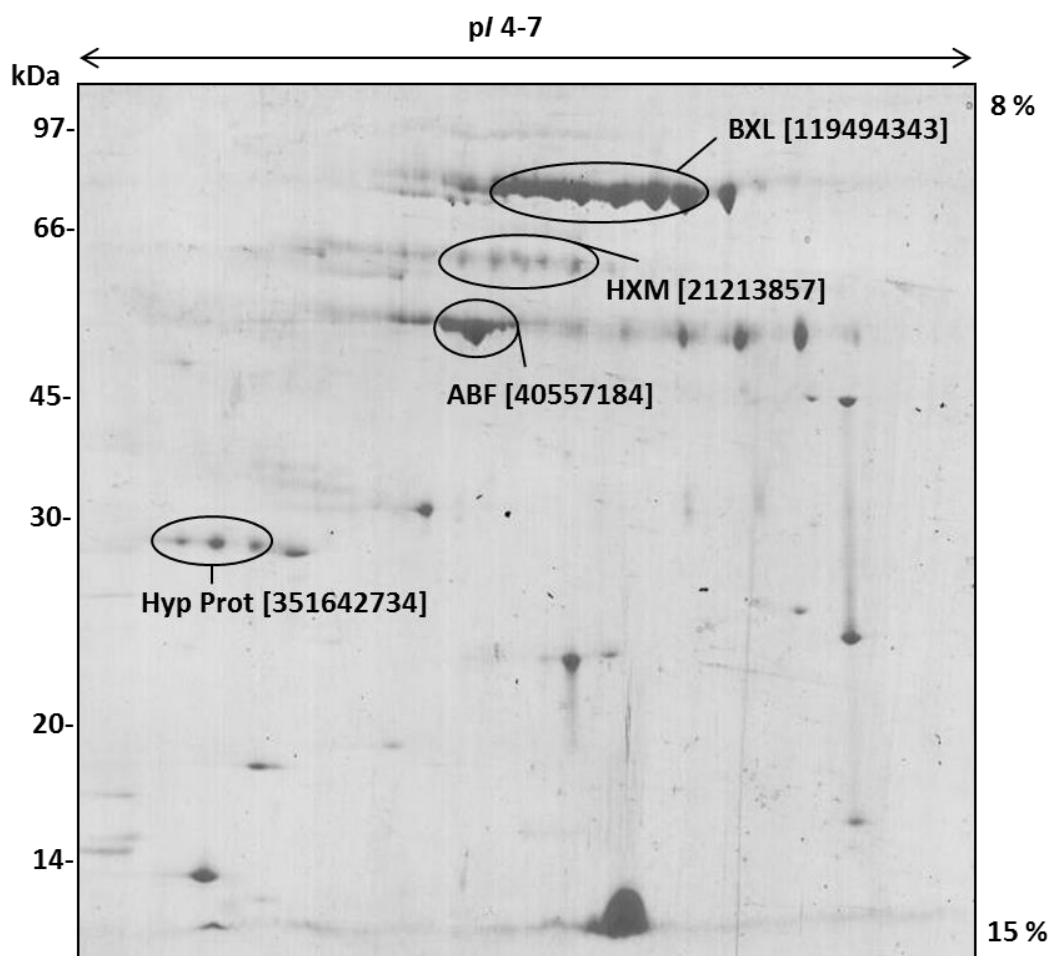
**Figura 9.** Perfil bidimensional do secretoma de *T. harzianum* cultivado em meio contendo 1 % (m/v) de glicose. Em total foram aplicados 110  $\mu$ l da amostra do secretoma para cada gel. Focalização isoeétrica em gradiente imobilizado de pH 4-7 e segunda dimensão em gel de gradiente 8-15% T foram realizadas como descrito na seção 3,7. As proteínas foram visualizadas após coloração com CBB G-250.

Como resultado do crescimento em celulose o perfil 2-DE de *T. harzianum* mostrou 58 spots (Fig.10) bem como a presença de polimorfismos proteicos de alta massa molecular que corresponderam a enzima  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (NAG) identificada nos spots 2-10 e proteínas hipotéticas que constituíram grande parte das proteínas presentes no gel (Tabela 4).



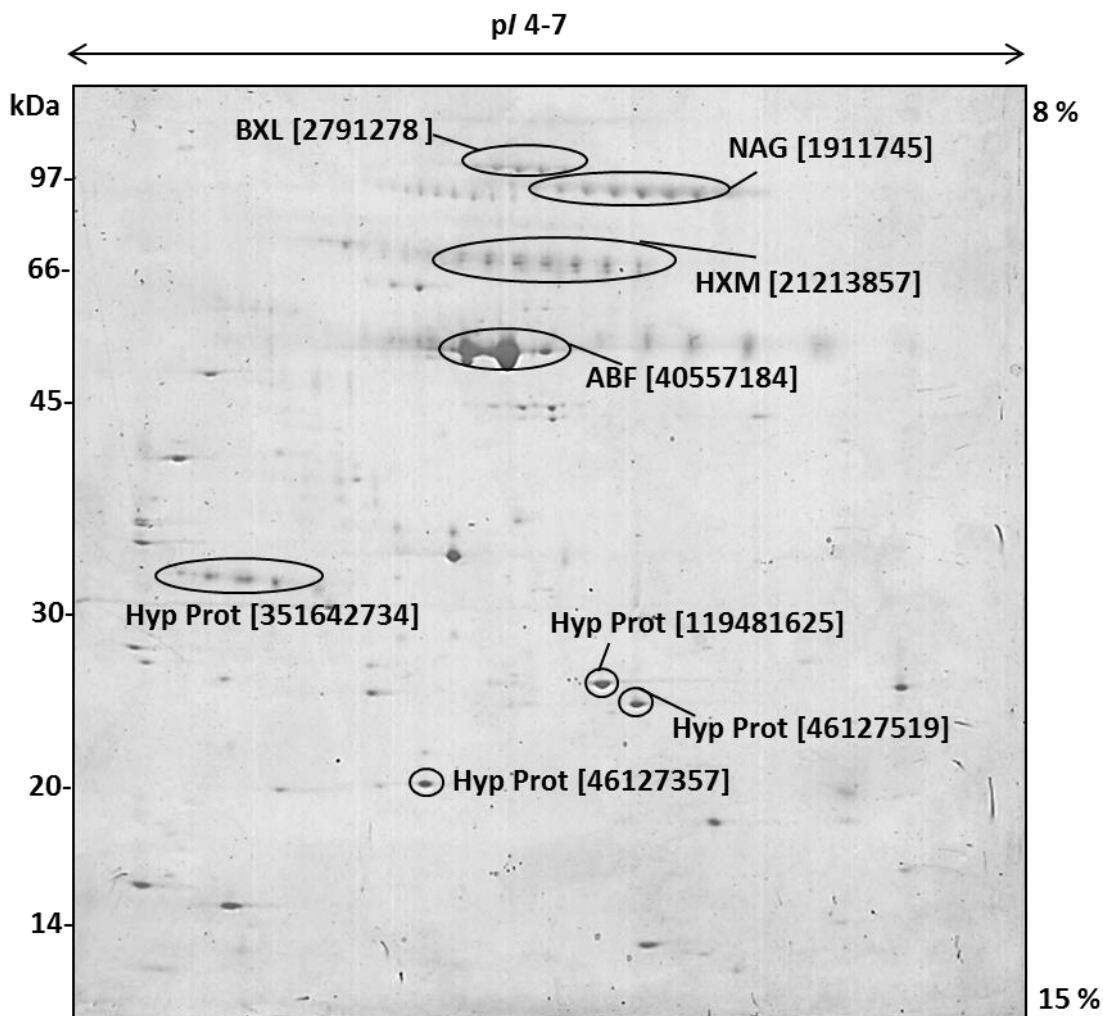
**Figura 10.** Perfil bidimensional do secretoma de *T. harzianum* cultivado em meio contendo 1 % (m/v) de celulose. Em total foram aplicados 110 µl da amostra para cada gel. Focalização isoelétrica em gradiente imobilizado de pH 4-7 e segunda dimensão em gel de gradiente 8-15% T foram realizadas como descrito na seção 3,7. As proteínas foram visualizadas após coloração com CBB G-250.

Em relação ao perfil bidimensional do secretoma obtido em xilana como fonte de carbono, as principais características estão relacionadas à natureza das isoformas de alta massa identificadas, como β-xilosidase (BXL) *spots* 1-10, hexosaminidase (HXM) *spots* 13-18 e arabinofuranosidase (ABF) *spots* 22-24. Um total de 54 *spots* foram observados nesta condição (Fig.11).



**Figura 11.** Perfil bidimensional do secretoma de *T. harzianum* cultivado em meio contendo 1 % (m/v) de xilana. Em total foram aplicados 110  $\mu$ l da amostra para cada gel. Focalização isoelétrica em gradiente imobilizado de pH 4-7 e segunda dimensão em gel de gradiente 8-15% T foram realizadas como descrito na seção 3,7. As proteínas foram visualizadas após coloração com CBB G-250.

A partir do perfil bidimensional do secretoma de *T. harzianum* produzido em meio contendo bagaço de cana foram detectados um total de 60 spots (Fig.12) que incluíram isoformas comuns às outras fontes de carbono testadas, como foi o caso da enzima NAG spots 25-30 expressa também em meio contendo celulose, e a ABF spots 10-13 e HXM spots 17-22 ambas também secretadas em meio contendo xilana. Foi também observada exclusivamente a secreção da enzima BXL(2791278) (Tabela 4).



**Figura 12.** Perfil bidimensional do secretoma de *T. harzianum* cultivado em meio contendo 1 % (m/v) de bagaço de cana. Em total foram aplicados 110  $\mu$ l da amostra para cada gel. Focalização isoeletrica em gradiente imobilizado de pH 4-7 e segunda dimensão em gel de gradiente 8-15% T foram realizadas como descrito na seção 3,7. As proteínas foram visualizadas após coloração com CBB G-250.

As enzimas identificadas a partir de géis bidimensionais corresponderam principalmente a isoformas de glicosil hidrolases que incluíram tanto enzimas associadas a mecanismos de interação parasítica que degradam a parede celular de organismos fitopatogénos, quanto enzimas que participam da desconstrução dos polissacarídeos da parede celular vegetal.

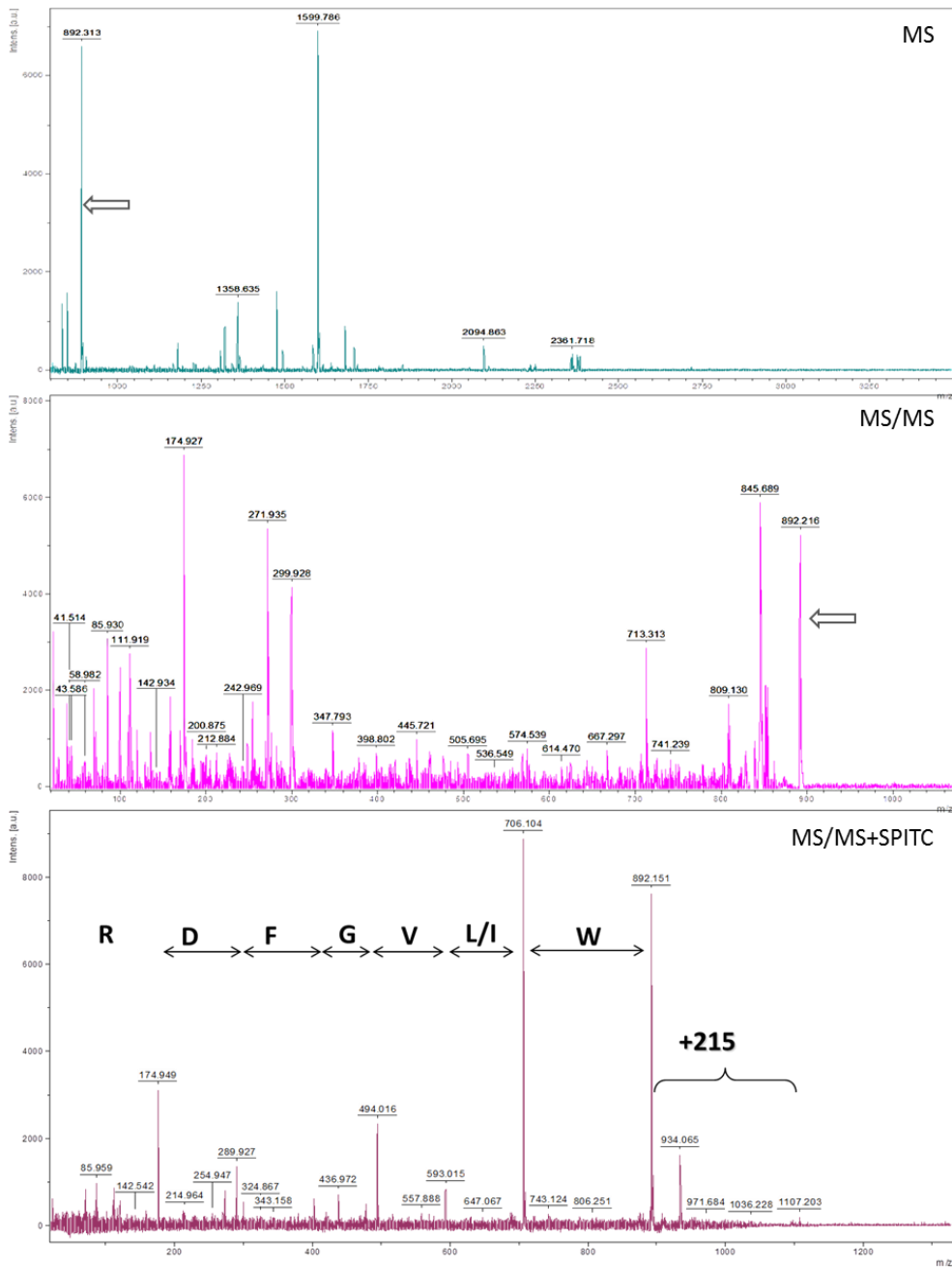
Foram identificadas em secretomas provenientes do crescimento em celulose, xilana e bagaço de cana N-acetilglicosaminidases NAG (gi-1911745) também conhecidas como hexosaminidases HXM (gi-21213857) membros das famílias GH 18 e GH 3, respectivamente. Estas enzimas agem na remoção de resíduos de N-acetil-D-glicosamina a

partir da extremidade não redutora de polissacarídeos como a quitina. Além de participar no antagonismo contra fungos fitopatogênicos, as NAG regulam a reconstrução da parede celular fúngica, permitindo o crescimento apical da hifa e o surgimento de sítios de ramificação na mesma, participando também da autólise de hifas envelhecidas encontradas em culturas fúngicas, e facilitando a liberação de nutrientes em condições saprofíticas e micoparasíticas (Slámová, Bojarová *et al.*, 2010).

Por outro lado enzimas xilanolíticas também foram identificadas nos secretomas analisados, como é o caso da endo-1,4-beta-xylanase XLN (gi-70998094) expressa exclusivamente no secretoma proveniente do crescimento em glicose. Esta enzima pertence à família GH 11 e participa da hidrólise da xilana agindo no interior do polímero sobre as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 tendo como produto desta hidrólise oligossacarídeos de xilana (Saha, 2003; Jeya, Thiagarajan *et al.*, 2009). A sua aparição no secretoma obtido em uma fonte de carbono simples poderia estar associada a uma expressão constitutiva da mesma, que ainda, em baixos níveis de atividade seria responsável por uma hidrólise inicial de substratos mais complexos, gerando oligossacarídeos indutores dos sistemas xilanolítico e celulolítico do fungo (Polizeli, Rizzatti *et al.*, 2005) (Tabela 4).

A  $\beta$ -xilosidase BXL (gi-2791278) foi identificada no secretoma proveniente de bagaço de cana a partir do sequenciamento *de novo* auxiliado pela derivatização de peptídeos com o reagente SPITC (Sigma-Aldrich), que facilitou a identificações de picos correspondendo à íons da série "y" em espectros de fragmentação (MS/MS) obtidos a partir de um peptídeo precursor ionizado (Fig. 13). A BXL é responsável pela remoção sucessiva de resíduos de D-xilose a partir das extremidades não redutoras da xilana. Esta enzima foi expressa em secretomas produzidos em bagaço de cana e xilana (Tabela 4).

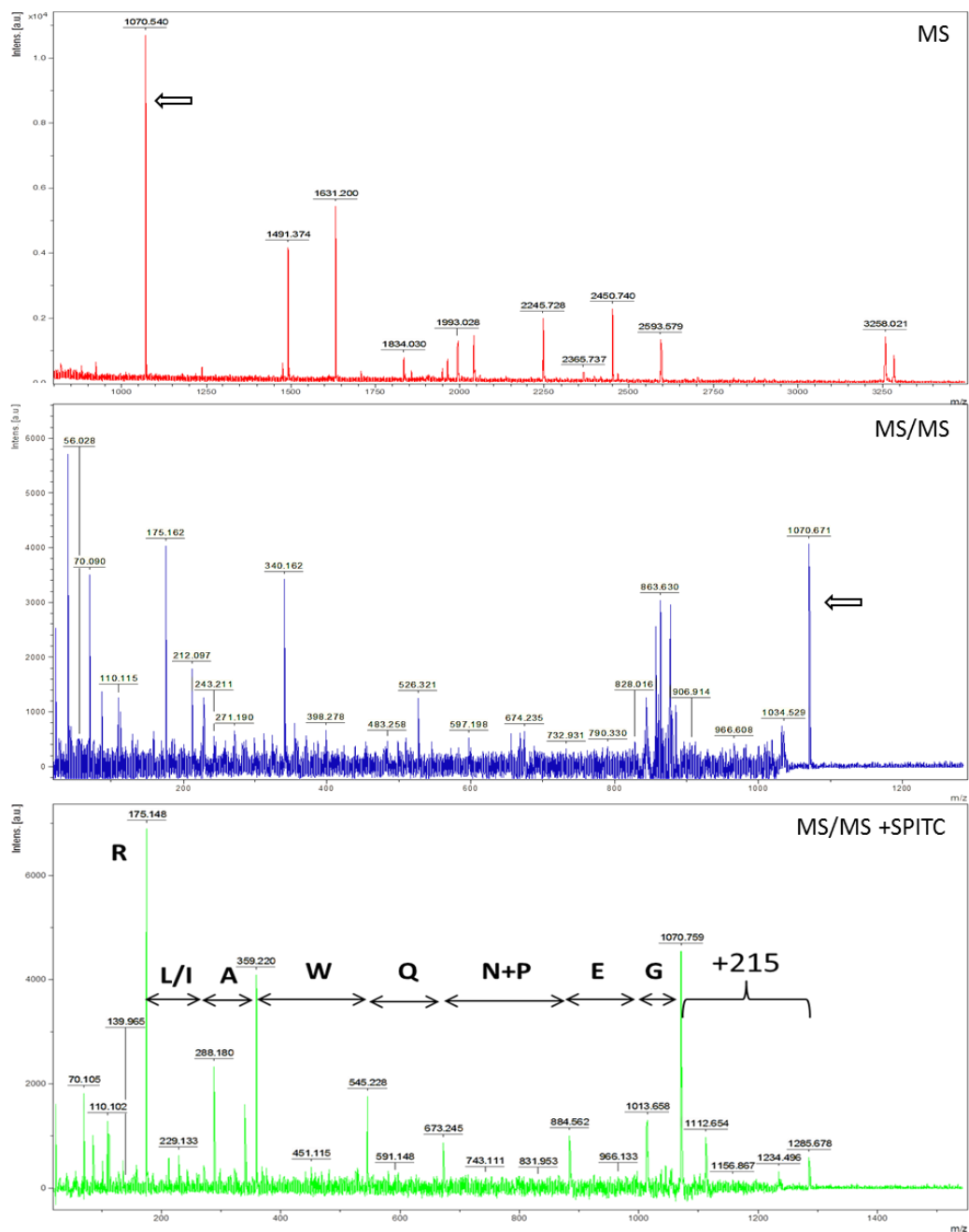




**Figura 13.** Sequenciamento *de novo* do peptídeo K.WLVGFDR.L da proteína  $\beta$ -xilidase. A) Espectro M S mostrando os picos mais intensos da proteína; B) Espectro MS/MS do pico m/z 892,2130 antes da reação de derivatização com reagente SPITC; C) Espectro MS/MS obtido depois da derivatização e sequência de aminoácidos deduzida a partir dos íons da série "y".

Sequenciamento *de novo* também facilitou a identificação da enzima arabinofuranosidase ABF (gi-40557184) (Fig. 14) em secretomas obtidos do crescimento em xilana e bagaço de cana. Esta enzima age hidrolisando as ligações de  $\alpha$ -L-arabinofuranosil presentes em moléculas de arabinoxilanas e também facilita a ação de

celobiohidrolases e  $\beta$ -xilosidases, uma vez que retira as ramificações que podem dificultar o ingresso das enzimas ao interior da fibra de bagaço de cana (Seiboth e Metz, 2011).



**Figura 14.** Sequenciamento de novo do peptídeo GEPNQWALR da proteína arabinofuranosidase. A) Espectro MS mostrando os picos mais intensos da proteína B) Espectro MS/MS do pico m/z 1070,540 antes da reação de derivatização C) Espectro MS/MS obtido depois da derivatização e sequencia de aminoácidos deduzida a partir dos íons da série "y".

**Tabela 4. Proteínas identificadas no secretoma de *T. harzianum* a partir dos géis 2-DE**

<i>spot</i> <sup>1</sup>	<i>gi</i> <sup>2</sup>	Proteína/Organismo	Mr (Da) <sup>3</sup>	<i>pI</i> <sup>4</sup>	Score <sup>5</sup>	% Cob. <sup>6</sup>	Match <sup>7</sup>	Método de ident.
<b>Glicose</b>								
2 a 7 32 a	70998094	endo-1,4-beta-xylanase /A. fumigatus Af293	20698	5,3	77	44	7	PMF
34	351642734	hypothetical protein MGG_17150 /M. oryzae 70-15	30836	11	76	40	11	PMF
44	328863389	hypothetical protein MELLADRAFT_88934 [M. larici-populina 98AG31]	14728	5,2	75	69	6	PMF
<b>Celulose</b>								
2 a 10 12 a	1911745	N-acetyl-beta-D-glucosaminidase /H. lixii	64990	5,6	85	12	7	PMF
15	67539822	hypothetical protein AN6081.2 /A. nidulans FGSCA4	70197	7,2	93	19	8	PMF
26	261202114	endo-beta-1,3-glucanase/A. dermatitidis SLH14081	69204	6,3	73	19	8	PMF
28 a	115397975	conserved hypothetical protein/A. terreus NIH2624	63962	5,4	92	17	12	PMF
27	345563391	hypothetical protein AOL_s00109g150/ A. oligospora ATCC 24927	59510	6	75	13	7	PMF
20	302661362	hypothetical protein TRV_03561 /T. verrucosum HKI0517	59017	8,3	79	17	8	PMF
32	50554573	YALI0E32659p /Y. lipolytica	31506	5,6	76	21	6	PMF
39	351642734	hypothetical protein MGG_17150/M. oryzae 70-15	30836	11	76	38	11	PMF
36-34	351642734	hypothetical protein MGG_17150 /M. oryzae 70-15	30836	11	76	40	10	PMF
41	46105378	hypothetical protein FG00317.1/G. zeae PH-1	26653	5	75	27	7	PMF
42	154283991	predicted protein/A. capsulatus NAM1	13894	6,6	75	29	5	PMF
43	39944272	hypothetical protein MGG_04147/M. oryzae 70-15	17742	6,7	78	21	5	PMF
44	145254260	hypothetical protein ANI_1_130164/A. niger CBS 513.88	41372	8,4	98	24	9	PMF
46	154271598	GTP cyclohydrolase-2/A. capsulatus NAM1	23441	9,9	86	35	9	PMF
<b>Xilana</b>								
13 a 18	21213857	hexosaminidase /Hypocrea lixii	64922	5,6	83	16	10	PMF

1 a 10	119494343	beta-xylosidase XylA /A. clavatus NRRL 1	81642	5,2	109	N.A	1	PFF
22 a								
24	40557184	Alpha arabinofuranosidase/A.pullulans	52410	5,4	45	N.A	1	PFF
42 a								
44	351642734	hypothetical protein MGG_17150 /M. oryzae 70-15	30836	11	76	40	11	PMF
<b>Bagaçõ de cana</b>								
4	145230682	nuclear segregation protein (Bfr1) /A. niger CBS 513.88	56710	9	73	32	16	PMF
8	71001144	conserved hypothetical protein/A. fumigatus Af293 beta-xylosidase/H. jecorina	71261	6,3	76	39	22	PMF
1 a 5	2791278		87563	5,5	105	N.A	1	PFF
10 a		Alpha arabinofuranosidase/A.pullulans						
13	40557184		52410	5,4	45	N.A	1	PFF
17 a		hexosaminidase /H. lixii						
22	21213857		64922	5,6	87	18	10	PMF
25 a								
30	1911745	N-acetyl-beta-D-glucosaminidase/H. lixii	64990	5,6	115	15	9	PMF
34	46127357	hypothetical protein FG08056.1 /G. zeae PH-1	78970	5,2	76	19	12	PMF
41	119481625	SAP domain protein, putative/N. fischeri NRRL 181	31623	6,8	83	34	13	PMF
43	46127519	hypothetical protein FG08137.1 [G. zeae PH-1]	32300	5,2	76	39	11	PMF

1- Fonte de carbono na qual a proteína foi identificada e numeração do *spot* correspondente a(as) proteína(s) identificada(s)

2- *gi number* da proteína conforme o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)

3- Massa nominal teórica da proteína

4- Ponto isoelétrico teórico da proteína

5- *Protein score* é  $-10 \cdot \log(P)$ , sendo  $P$  a probabilidade de que o pareamento seja resultado de um evento randômico.

*Protein scores* superiores a 65 são considerados significativos ( $p < 0.05$ ).

6- Porcentagem de cobertura

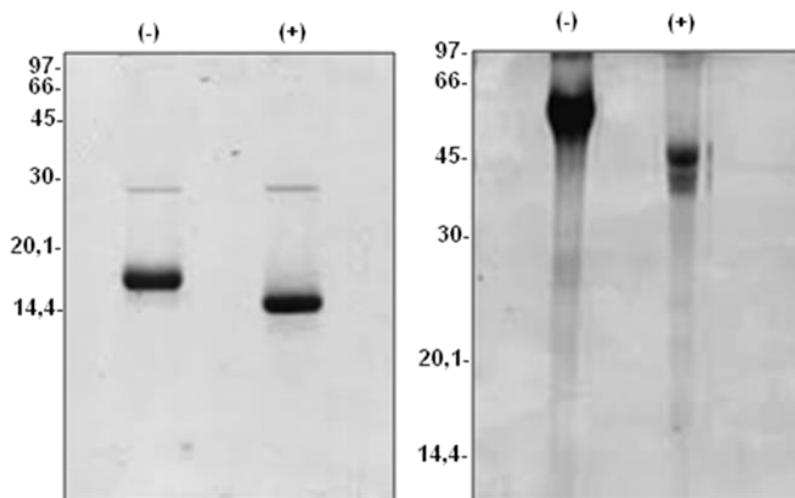
7- Número de peptídeos pareados

#### 4.3.1 N-glicosilações detectadas a partir de perfis 2-DE

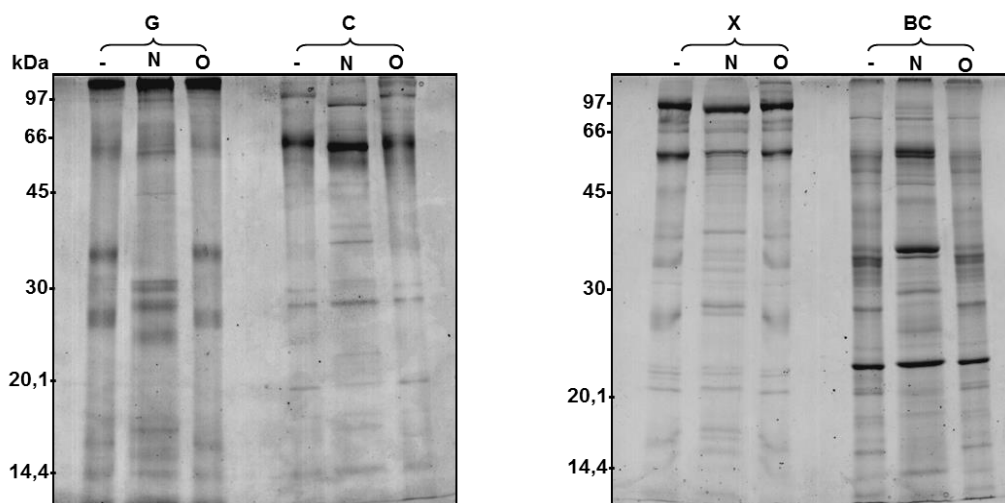
A enzima PNGase F (E.C 3.5.1.52) responsável pela remoção dos oligossacarídeos ligados a resíduos de asparagina (N-glicanos) de glicoproteínas foi utilizada para tratar os secretomas de *T. harzianum* a fim de verificar a existência de N-glicosilações nas proteínas extracelulares. A proteína RNAase B, substrato controle da PNGase F foi utilizada para comprovar a efetividade na eliminação de resíduos glicosídicos em proteínas, evidenciando a perda de aprox. 3 kDa na massa molecular da RNAase B após digestão (Fig. 15a).

Por outro lado a possível presença de O-glicosilações nos secretomas de *T. harzianum* foi estudada utilizando o *kit* de desglicosilação enzimática E-DEGLY (Sigma-Aldrich, Inc), que continha as enzimas:  $\alpha$ -2(3,6,8,9) neuraminidase, O-glicosidase,  $\beta$ (1-4)-galactosidase e  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase. A ação das enzimas do *kit* foi comprovada utilizando a proteína fetuina bovina como controle (Fig.15b).

Análises por SDS-PAGE dos quatro secretomas indicaram mudanças na posição, intensidade e número de bandas de cada amostra depois de receber o tratamento com a enzima PNGase F, sugerindo assim a presença de proteínas N-glicosiladas nos secretomas (Fig.16). Porém a partir dos géis unidimensionais não foi possível detectar mudanças como resultado da ação das enzimas do *kit* acima mencionado sobre os secretomas de *T. harzianum* (Fig 16).



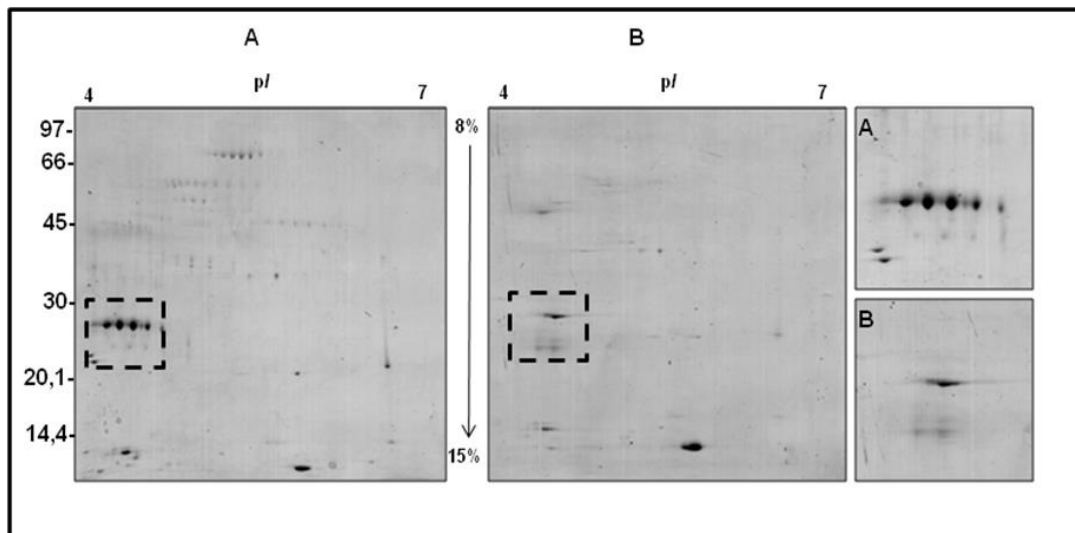
**Figura 15.** Ação de desglicosilação de proteínas controle. A) N-desglicosilação da proteína RNAase B. SDS-PAGE (15%). RNAase B (-) não tratada com a PNGase F e RNAase B (+) tratada com PNGase F. B) O-desglicosilação da proteína fetuina bovina com o kit E-DEGLY. Fetuina (-) não tratada com o kit E-DEGLY e fetuina tratada (+) com o kit E-DEGLY.



**Figura 16.** Desglicosilação do secretoma de *T. harzianum*. Amostras obtidas a partir do crescimento do fungo em Glicose (G), Celulose (C), Xilana (X) e Bagaço de cana (BC) foram analisadas usando SDS-PAGE (12 %) depois de receber o tratamento controle (-), N-desglicosilação com a enzima PNGaseF (N) e O-desglicosilação com o kit EDEGLY (O).

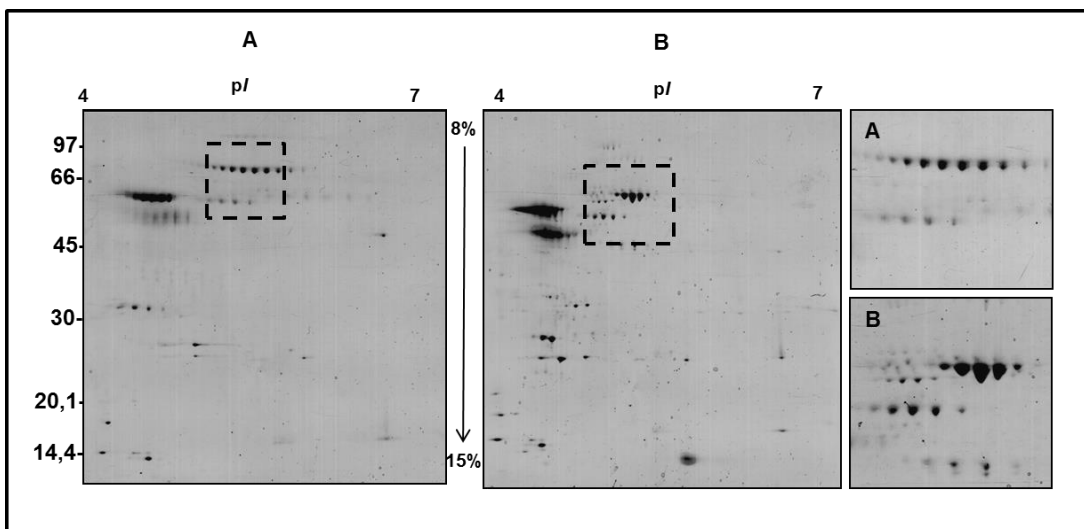
Baseando-nos nas mudanças do perfil eletroforético unidimensional observadas a partir da digestão com a enzima PNGase, cada secretoma do fungo submetido a N-desglicosilação, foi também analisado por 2-DE. Assim o gel 2-DE (faixa de gradiente de pH 4-7) obtido a partir do secretoma de *T. harzianum* crescido em glicose, mostrou que o

numero de *spots* correspondendo a possíveis isoformas se reduziu notavelmente em relação ao gel da amostra original que não passou por nenhum tratamento (Fig. 17).

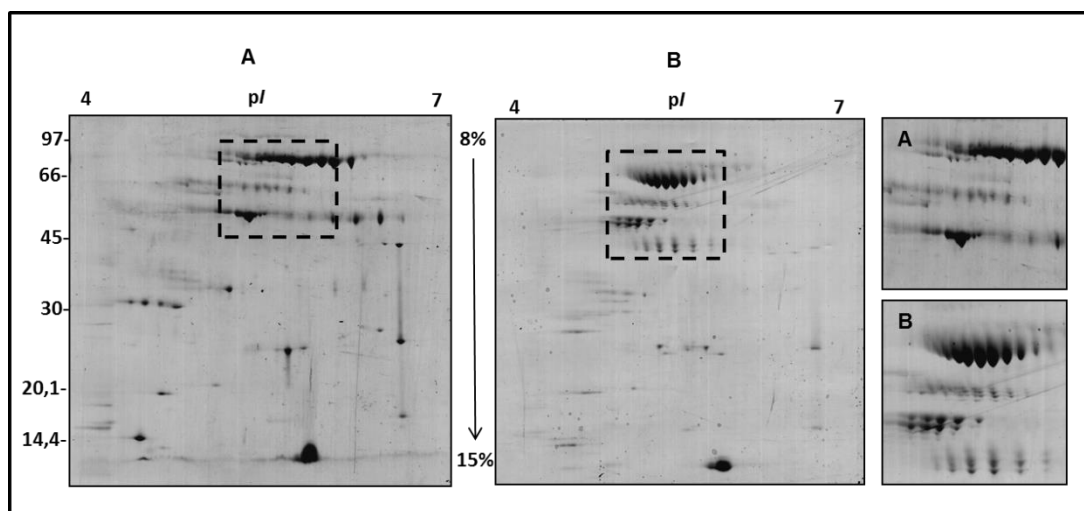


**Figura 17.** N-desglicosilação do secretoma de *T. harzianum* cultivado em glicose. A) Amostra sem adição da enzima PNGase e B) Amostra tratada com a enzima PNGase. Géis 2-DE corridos na primeira dimensão pH 4-7(18cm) e na segunda dimensão SDS-PAGE 8-15%. A região pontuada ressalta a área que sofreu maiores alterações após a N-desglicosilação. Os géis foram corados com CBB-G250.

Da mesma forma, no gel do secretoma produzido em celulose foi observado que após o tratamento de desglicosilação *spots* correspondentes a polimorfismos proteicos de alta massa molecular como a proteína identificada N-acetilglicosaminidase (gi-1911745) mudaram de posição em função do pI (Fig. 18), evento igualmente evidenciado na proteína  $\beta$ -xilosidase (gi- 119494343) identificada na amostra do secretoma obtido em meio contendo xilana (Fig. 19) e no gel 2-DE proveniente do secretoma obtido em bagaço de cana (Fig. 20).

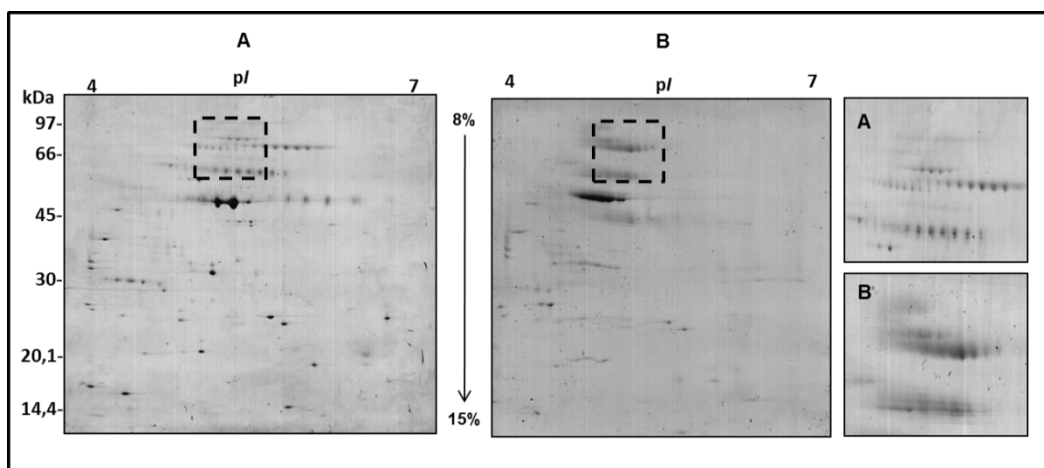


**Figura 18.** N-desglicosilação do secretoma de *T. harzianum* cultivado em celulose. A) Amostra sem adição da enzima PNGase e B) Amostra tratada com a enzima PNGase. Géis 2-DE corridos na primeira dimensão pH 4-7(18cm) e na segunda dimensão SDS-PAGE 8-15%. A região pontuada ressalta a área que sofreu maiores alterações após a N-desglicosilação. Os géis foram corados com CBB-G250.



**Figura 19.** N-desglicosilação do secretoma de *T. harzianum* cultivado em xilana. A) Amostra sem adição da enzima PNGase e B) Amostra tratada com a enzima PNGase. Géis 2-DE corridos na primeira dimensão pH 4-7(18cm) e na segunda dimensão SDS-PAGE 8-15%. A região pontuada ressalta a área que sofreu maiores alterações após a N-desglicosilação. Os géis foram corados com CBB-G250.





**Figura 20.** N-desglicosilação do secretoma de *T. harzianum* cultivado em bagaço de cana. A) Amostra sem adição da enzima PNGase e B) Amostra tratada com a enzima PNGase. Géis 2-DE corridos na primeira dimensão pH 4-7(18cm) e na segunda dimensão SDS-PAGE 8-15%. A região pontuada ressalta a área que sofreu maiores alterações após a N-desglicosilação. Os géis foram corados com CBB-G250.

A presença de N-glicosilações em glicosil hidrolases identificadas em géis 2D foi predita na sequência das proteínas usando o programa NetNGlyc v. 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>) (Gupta e Brunak, 2002), mostrando a presença de um ou mais sítios de glicosilação para cada proteína, resultado que valida a observação de modificações causadas pelo tratamento de desglicosilação dos secretomas, e sugere a relevância que as modificações pós-traducionais têm na variabilidade do secretoma de fungos filamentosos (Tabela 5).

A presença de múltiplas formas de uma mesma enzima no secretoma de fungos filamentosos como *T. harzianum* é um evento frequentemente observado em mapas bidimensionais (Mahajan e Master, 2010; Zhang, Guan *et al.*, 2012). Diversos autores têm demonstrado que tal multiplicidade pode surgir como resultado de diferentes fenômenos como processamento diferencial do mRNA, modificações pós-secrecionais como digestão proteolítica, e modificações pós-traducionais como a glicosilação (Subramaniyan e Prema, 2002; Polizeli, Rizzatti *et al.*, 2005).

**Tabela 5.** Polimorfismos proteicos que apresentaram mudanças de migração em géis 2-DE após tratamento de N-desglicosilação

FC <sup>1</sup>	gi <sup>2</sup>	Proteína/organismo	N-glicosilação <sup>3</sup>
g	70998094	endo-1,4-beta-xylanase /A. fumigatus Af293	N29
c, bc	1911745	N-acetyl-beta-D-glucosaminidase /H. lixii	N 144, N317, N353, N364,N402
c	261202114	endo-beta-1,3-glucanase/A. dermatitidis SLH14081	N448, N577
x, bc	21213857	hexosaminidase /H. lixii	N317, N 353, N364, N402
x, bc	40557184	Alpha arabinofuranosidase/A.pullulans	N 204
x	119494343	beta-xylosidase XylA /A. clavatus NRRL 1	N32, N157,N184
bc	2791278	beta-xylosidase/H. jecorina	N23, N28, N143, N327, N353, N404, N481, N657

**1-** Fonte de carbono na qual foi identificada a proteína

**2-**Número gi da proteína

**3-**Sítios de N-glicosilação preditos na sequencia da proteína usando o programa NetNGlyc v. 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>)

A glicosilação de proteínas em fungos filamentosos é um evento associado à manosição das glicoproteínas da parede celular que acontece no retículo endoplasmático (RE) e no aparato de Golgi (AG), processo fundamental na biossíntese da parede celular, transdução de sinais e invasão do hospedeiro no caso de fungos patógenos (Maddi e Free, 2010). Este tipo de modificação pós-traducional está associada à atividade de diversas enzimas encontradas no secretoma dos fungos, uma vez que N e O-glicosilações surgem em função das condições de cultura, tipo de cepa e presença de enzimas de recorte, processos estes que também podem afetar a atividade enzimática (Beckham, Dai *et al.*, 2012).

Em decorrência da arquitetura modular de diversas glicosil hidrolases, glicosilados presentes no domínio catalítico (DC) poderiam afetar a interação da enzima com o polímero, como estudado na celulase Cel7A purificada de uma preparação enzimática de *T. reesei*, que quando expressa em *A. niger. var. amorim* mostrou 6 vezes mais Anglicanos no DC e uma conseqüente redução da atividade enzimática e instabilidade térmica (Jeoh, Michener *et al.*, 2008). A relação entre abundância de N-glicanos no DC e a diminuição da atividade enzimática foi corroborada em trabalhos com a Cel7A de *P. funiculosum* e *P. decumbens* que mediante remoção individual por mutagênese dirigida dos N-glicanos da superfície do

DC e expressa também em *A. niger* demonstraram um incremento da atividade da enzima em relação à Cel7A não modificada (Adney, Jeoh *et al.*, 2009).

A glicosilação de enzimas pode também estar envolvida na proteção contra agregação proteica, aumento da estabilidade térmica, modificação da hidrofobicidade da proteína, incremento da ligação a carboidratos estruturais e indução de mudanças conformacionais nos domínios e diminuição do contato entre o CBM e o DC devido à presença de O-glicanos no *linker* peptídico (Beckham, Dai *et al.*, 2012).

#### 4.3.2 Análise *shotgun* dos secretomas de *T. harzianum*

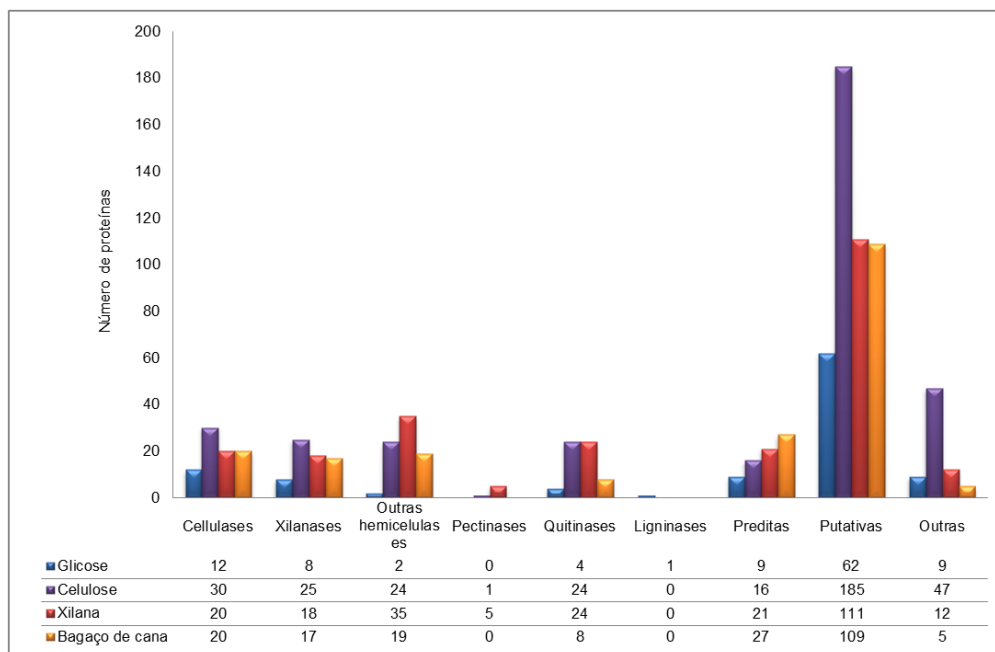
A análise *shotgun* dos quatro secretomas permitiu a identificação de 107, 352, 246 e 205 proteínas no secretoma do fungo quando cultivado em glicose, celulose, xilana ou bagaço de cana, respectivamente. Em total 626 proteínas diferentes foram identificadas no secretoma de *T. harzianum* (combinando as quatro fontes de carbono utilizadas) com um FDR (*False Discovery Rate*) de 1% a partir de 44112 PSMs e 13550 sequências peptídicas consolidando este como um dos trabalhos de caracterização de secretomas de micro-organismos mais completos realizado até a presente data (Tabela 6).

**Tabela 6.** Resumo dos dados obtidos a partir da análise *shotgun* do secretoma de *T. harzianum* nas quatro fontes de carbono

	Glicose	Celulose	Xilana	Bagaço de cana
<b>PSMs</b>	4719	15272	13493	10628
<b>Peptídeos únicos</b>	197	723	512	340
<b>Peptídeos</b>	1186	5258	4014	3092
<b>Proteínas</b>	107	352	246	205
<b>Famílias de proteínas</b>	194	1437	502	352
<b>Média Mw (kDa)</b>	55,06	59,18	65,13	62,20
<b>Média pI</b>	5,94	6,25	6,09	6,32

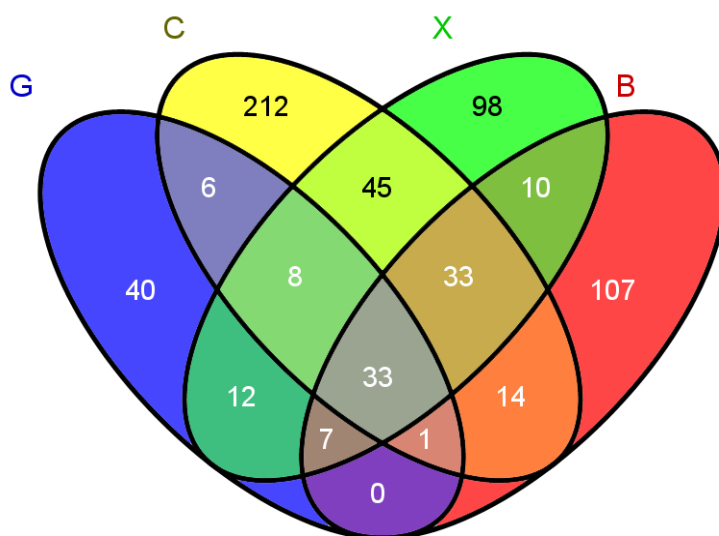
As proteínas identificadas no secretoma do fungo foram funcionalmente classificadas em celulasas, quitinases, xilanasas e outras hemicelulasas, ligninasas, pectinasas, proteínas putativas, preditas e outras, listadas nas Tabelas 7 a 9. Os dados apresentados foram resultado de análise técnica feita em triplicata correspondente a cada replica biológica.

O número de proteínas identificadas em cada categoria foi plotada contra cada fonte de carbono utilizada para a produção dos secretomas, evidenciando que proteínas putativas foram as mais abundantemente expressas, seguidas de celulases e hemicelulases (Fig. 21).



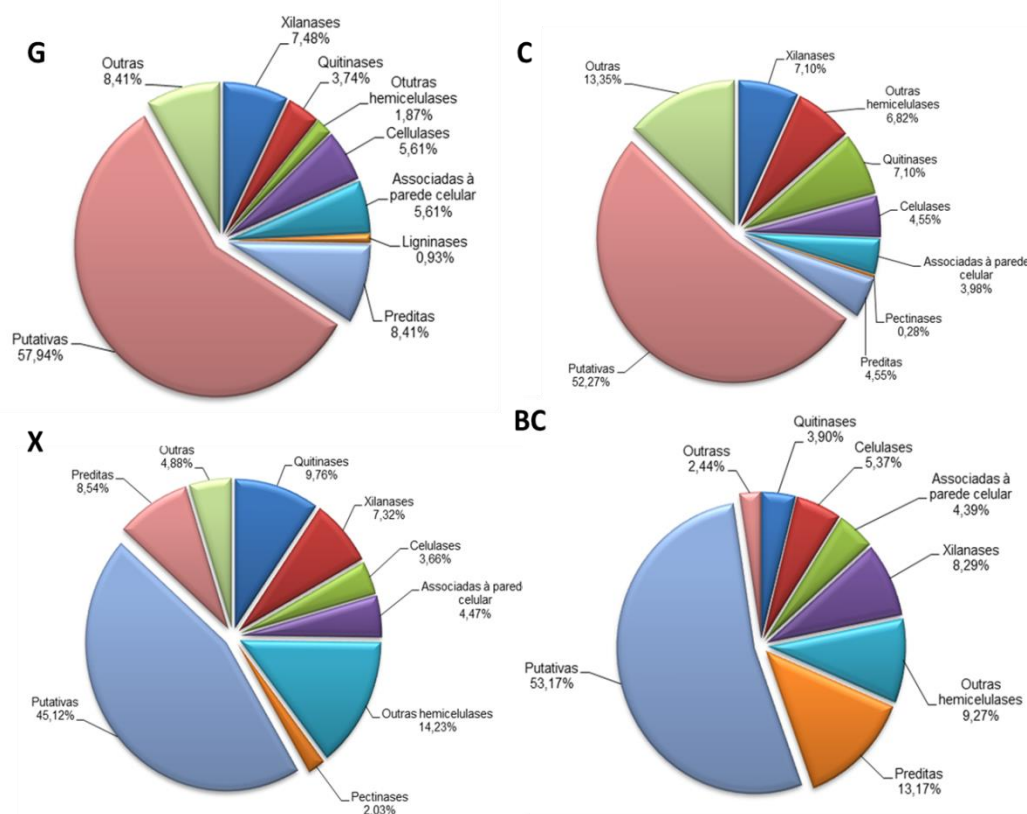
**Figura 21.** Abundância de proteínas no secretoma de *T. harzianum* quando crescido nas diferentes fontes de carbono.

O total das proteínas identificadas nas quatro condições testadas foram comparadas uma a uma mediante um algoritmo desenvolvido no programa SciLab V.5.4.0. Resultando na identificação das proteínas comuns às quatro fontes de carbono, bem como proteínas presentes em duas ou mais condições, além de proteínas exclusivas de cada secretoma (Fig.22). Em um total 33 proteínas identificadas comuns às quatro condições testadas, sete são hemicelulases, sete proteínas associadas à parede celular e morfogênese, uma quitinase, e dezessete proteínas putativas.



**Figura 22.** Diagrama de *Venn* representando o total de proteínas exclusivas e comuns a cada secretoma analisado. Em total 626 proteínas diferentes foram identificadas das quais 33 resultaram comuns às quatro fontes de carbono utilizadas para produzir os secretomas. G=glucose, C=celulose, X=xilana e B=bagaço de cana.

No secretoma proveniente do meio de cultura suplementado com glucose como fonte de carbono foram identificadas um total de 107 proteínas, sendo 40 exclusivas desta condição (Fig. 22). Tais proteínas exclusivas incluíram a lacase (C5H3G0), fosfolipase-C PLC-E (Q157R5), e proteínas das famílias de GHs 72 (G9N0W8-homologa a  $\beta$ -1,3-glicosiltransferase), GH 18 (G9NKD3-homologa a quitinas), GH 54 (G9MZ65-homologa a arabinofuranosidase) bem como uma variedade de proteínas putativas. Depois das proteínas putativas, a maior porcentagem de proteínas identificadas no secretoma em glucose correspondeu a celulasas (11,21 %) que incluíram celobiohidrolases e  $\beta$ -glicosidases e proteínas associadas à parede celular do fungo. Xilanasas como endoxilanasas,  $\beta$ -xilosidases e arabinofuranosidases foram também identificadas constituindo 7,48% do secretoma em esta condição (Fig. 23) (Seção 7,1, Tabela 1).



**Figura 23.** Classificação funcional das proteínas identificadas por LC-MS/MS no secretoma produzido a partir do crescimento em meio contendo (G) glicose, (C) celulose, (X) xilana e (BC) bagaço de cana.

Como resultado do crescimento em celulose foram identificadas 352 proteínas no secretoma de *T. harzianum*, sendo 212 exclusivas (Fig. 22). As proteínas identificadas incluíram as três principais celulases: endoglicanases, celobiohidrolases e glicosidases bem como enzimas auxiliares da hidrólise da celulose e módulos de ligação ao carboidrato CBMs que constituíram 8,52 % do secretoma (Fig. 23). Uma alta proporção das proteínas identificadas nesta condição também correspondeu à proteases, fosfatases e glicosil transferases, agrupadas na categoria outras (13,35 %).

Dentro das proteínas exclusivamente expressas nesta fonte de carbono se destacam as xilanases endo-1,4-beta-xilanase (D2XV89), GH 43 (G9P412-homologa a arabinofuranosidase), as carboidrato esterases CE 5 (G9NJW6-homologa a acetilxilanesterase), CE 15 (G0RV93 4-O-metil-glucuronil metil esterase), CE 1 (G9N0G0) e CE 3 (G9NU00), a hidrofobina (G9P387), a GH 5 (G9NPW5-homologa a beta-1,3-

mannanase), as celulasas GH 6 (G9MUN0), GH 74 (G9NZ09) e as endoquitinases (Q4JQJ0, O43111, Q12735, G9P606) (Seção 7,1, Tabela 2).

A utilização de xilana como fonte de carbono estimulou a secreção de 246 proteínas, sendo 98 exclusivamente secretadas nesta condição (Fig. 22). Enzimas hemicelulolíticas constituíram o principal grupo de enzimas secretadas (14, 23%). Fucosidases foram exclusivamente identificadas nesta fonte de carbono, assim como foi a fonte de carbono em que maior proporção de pectinases (2,03 %) e quitinases foram identificadas (9,76%) (Fig. 23) (Seção 7,1, Tabela 3).

O secretoma expresso pelo fungo em presença de bagaço de cana apresentou um total de 205 proteínas das quais 107 foram exclusivamente identificadas neste secretoma (Fig.22). Celulasas, xilanases e outras hemicelulasas foram secretadas em proporções semelhantes neste secretoma (Fig.23) (Seção 7,1, Tabela 4).

- Expressão de enzimas celulolíticas: as celulasas expressas por *T. harzianum* constituíram principalmente endoglicanases EGLs (Q6QNU5, Q8NJY4) e celobiohidrolases CBHs (G9NTY1, G9MUN0, G9NFV6), sendo as EGLs exclusivamente identificadas nos secretomas obtidos a partir de celulose, xilana e bagaço de cana, enquanto a CBH (G9NTY1) foi expressa nas quatro fontes de carbono. Estas celulasas são encontradas nas famílias de GHs 6, 7 e 74 e agem nas etapas iniciais da hidrólise da celulose rendendo como produto da hidrólise moléculas de celobiose, substrato das  $\beta$ -glicosidases (G9P180, G9P6W2G9MUU, G9NS06) membros da família GH 3 e expressas nas quatro fontes de carbono, e cuja expressão além do papel catalítico poderia estar associada ao favorecimento no acúmulo de moléculas de celobiose indutoras do sistema celulolítico, como indicado para algumas  $\beta$ -glicosidases expressas por *H. jecorina* (Zhou, Xu *et al.*, 2012).

Da mesma forma, foram identificadas nas quatro condições de crescimento proteínas auxiliares da hidrólise da celulose como as expansinas (G9PBA9, G9MY29). O mecanismo de ação das expansinas consiste na ruptura não catalítica das ligações não covalentes encontradas em microfibrilas de celulose, aumentando assim as cavidades da parede celular vegetal e facilitando o ingresso de enzimas hidrolíticas ao interior da parede celular (Arantes, V. e Saddler, J. N., 2010). Um tipo de expansina encontrada no secretoma de *T. harzianum* foi a swolenina (B3FRA5) proteína inicialmente isolada de *T. reesei* cuja função é a de permitir o deslocamento das microfibrilas deixando expostas as cadeias de

celulose para que possam ser mais facilmente atacadas por celulases (Saloheimo, Paloheimo *et al.*, 2002).

Outro tipo de proteína que incrementa a decomposição da celulose são as polissacarídeo mono-oxigenases dependentes de cobre (PMOs). Estas enzimas têm sido identificadas no secretoma de diversos Ascomicetes e Basidiomicetes como novos elementos do sistema celulolítico de fungos (Žifčáková e Baldrian, 2012). PMOs (G9NS04, G9NE55) foram identificadas no secretoma de *T. harzianum* exibido a partir do crescimento em celulose, xilana e BC. Estas enzimas da família GH 61 clivam oxidativamente as ligações glicosídicas do polímero de celulose inserindo oxigênio molecular na posição C1 como é o caso das PMOs tipo I, ou em C4 como feito pelas PMOs tipo II. A inserção de oxigênio desestabiliza a ligação glicosídica que depois é quebrada mediante uma reação de eliminação irreversível que pode ser catalisada pelas PMOs ou acontecer de forma espontânea (Beeson, Phillips *et al.*, 2012). Tanto PMOs tipo I quanto tipo II podem agir sinergicamente com outras celulases uma vez que geram novas extremidades a partir da quebra no meio da cadeia de celulose, ponto de ataque das CBHs. O cooperativismo pode acontecer também com a celobiose desidrogenase (CDH) enzima que age como um doador de elétrons para a reação das PMOs (Horn, Vaaje-Kolstad *et al.*, 2012)

Outra celulase acessória identificada foi a *cellulose induced protein* (CIP 1) (Q7Z9M9) que foi expressa apenas em meios contendo celulose e BC. As CIP 1 e CIP 2 foram inicialmente identificadas em análises transcricionais a partir de culturas que induzem a secreção de celulases em *T. reesei* (Foreman, Brown *et al.*, 2003). Estas duas proteínas apresentam CBMs e são co-reguladas com outras celulases conhecidas. A CIP 1 ainda tem uma função desconhecida embora alguns estudos tenham indicado baixa atividade sobre p-nitrofenil- $\beta$  D-celobiósido e sinergismo com PMOs e swolenina. Tanto a CIP 1 quanto a CIP 2 podem ter aplicabilidade na indústria têxtil, de detergentes e tratamento da polpa de papel (Foreman, Van Solingen *et al.*, 12 April 2011).

Módulos de ligação ao carboidrato CBMs (G9NKM4,G9NUY8) foram igualmente identificados a partir do crescimento em celulose e xilana. Estes CBMs fazem parte da família 13 que são módulos de aproximadamente 150 resíduos frequentemente encontrados em glicosil hidrolases e glicosil transferases, cuja função consiste na aproximação da enzima ao substrato alvo, aumento da sua concentração na superfície do substrato e favorecimento de mudanças conformacionais na estrutura dos polissacarídeos favorecendo a ação catalítica das enzimas (Boraston, Bolam *et al.*, 2004).



Uma proteína semelhante a *eliciting plant response* EPL (G9PB60) foi identificada comum às quatro fontes de carbono. A EPL também identificada no secretoma de outras espécies de *Trichoderma* como *H. atroviridis* e *H. virens* pertence à família de proteínas cerato-platanin e sua função pode estar relacionada a indução de mecanismos de defesa que alguns fungos filamentosos exercem em plantas. A secreção dessa proteína foi associada à culturas contendo fontes de carbono de diferente natureza (glicose, glicerol, L-arabinose, D-xilose, quitina coloidal e parede celular do fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani*) bem como condições de estresse osmótico e limitação de carbono e nitrogênio (Seidl, Marchetti *et al.*, 2006).

- Expressão de proteínas associadas à parede celular: a secreção de proteínas que normalmente encontram-se ligadas à parede celular do fungo foi observada nos quatro secretomas explorados. Resultados semelhantes foram previamente observados por (Oda, Kakizono *et al.*, 2006) em culturas submersas de *A. oryzae*, sugerindo que o fungo poderia alterar a secreção de proteínas que permanecem ligadas à parede do fungo em função ao tipo de cultura utilizada para a obtenção do secretoma (SSF ou SmF).

Proteínas envolvidas em processos de biossíntese da parede celular e morfogênese do fungo foram identificadas no nosso estudo, sendo o caso da glicano 1,3- $\alpha$ -glicosidases da família GH 17 (G9MZ09, G9P2J8, G9NNS5, G9N8G8) identificadas nos secretomas provenientes das quatro fontes de carbono e cuja participação poderia estar associada ao metabolismo de  $\beta$ -glicanos em processos de degradação da parede celular fúngica (Igarashi, Tani *et al.*, 2003).

Igualmente  $\alpha$ -1,3-glicanosiltransglicosilases membros da família GH72 (G9NSK7, G9P756, G9PBD3, G0RQW0, G9NIE1, G9NI23, G0RJJ2, G9N0W8) foram identificadas em todas as culturas. Estas enzimas também conhecidas como glicanosiltransferases são proteínas GPI-ancoradas e localizadas no espaço extracelular da parede celular catalisando o alongamento linear do polímero de glicose  $\beta$ -(1-3) glicano, e promovendo a formação de ramificações nas hifas do fungo tendo assim um papel importante na biogênese da parede celular (Mazáň, Ragni *et al.*, 2011). Outra proteína GPI ancorada (G9PBE5) identificada nas quatro fontes de carbono pode estar relacionada à processos de biossíntese, remodelamento e integridade da parede celular fúngica (Bowman e Free, 2006). Entanto que a hidrofobina (Q4F6W8) comumente encontrada em culturas submersas e aéreas de *T. harzianum* associada à esporulação do fungo e crescimento com limitação de nutrientes (Muñoz, Nakari-Setälä *et al.*, 1997), foi também detectada nos quatro secretomas analisados.

- Expressão de enzimas xilanólíticas e hemicelulolíticas: a hemicelulose constitui um complexo de polissacarídeos não linear constituído de resíduos de hexoses e pentoses, frequentemente acetilados cuja completa degradação requer ação sinérgica de um grupo diversificado de enzimas. A xilana, principal componente da hemicelulose, é hidrolisada por endoxilanasas (XLN). A completa desconstrução do polímero de xilana resulta da ação sinérgica das XLNs e enzimas com atividade exo, as  $\beta$ -xilosidases BXL (Q92458) que finalizam a hidrólise de xilo-oligômeros de baixa massa molecular em unidades monoméricas de xilose (Saha, 2003). Membros das XLN (Q9UVF9, G9NQ12, D2XV89, Q6QNU8, Q7Z8Q3, G9NE77) foram identificados nos secretomas de *T. harzianum* presentes nos quatro secretomas estudados.

Na remoção das cadeias laterais da xilana agem as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases ABFs (G9NNW8, G9NYH4, G9MZ65) incluídas atualmente nas famílias GH 54 e 62, que hidrolisam as extremidades redutoras  $\alpha$ -L-arabinofuranosídicas em arabinoxilanas, enquanto que exo- $\alpha$ -L-arabinanases (G9NKQ7) agrupadas nas GH 93 agem sobre as extremidades não redutoras produzindo moléculas de arabinobiose (Sakamoto e Thibault, 2001). O sistema arabinolítico previamente estudado em *T. reesei* por (Akel, Metz *et al.*, 2009) mostrou que os genes de codificam enzimas com atividade arabinofuranosídica foram transcritos em meios de cultura contendo L-arabinitol e L-arabinose, porém ausentes na cultura contendo glicose, resultado diferente do obtido em nosso estudo no qual foram identificadas duas ABFs no secretoma obtido a partir do crescimento em glicose.

Outras enzimas acessórias como as carboidrato esterases CE acetilxilanesterase AXE (Q7Z9M3, G9NU00, G9NPZ7) e ácido ferúlico esterase AFE foram encontradas no secretoma obtido em celulose e xilana. Estas enzimas assim como as ABFs tem um papel importante no incremento da solubilização da xilana, uma vez que catalisam a remoção de grupos acetilados e ácido ferúlico respectivamente, rendendo moléculas de xilose e xilobiose facilitando portanto a ação das xilanasas (Zhang, Siika-Aho *et al.*, 2011). Da mesma forma,  $\alpha$ -glucuronidasas (Q99024, G9NF15) agrupadas na família GH 67 agem nas extremidades não redutoras de xilo-oligossacarídeos clivando as ligações  $\alpha$  (1-2) entre o ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurônico e a xilose.

Fucosidases (G9NTF2, G9MVW6, G9NI38, G9NLB0) foram exclusivamente encontradas no secretoma produzido em xilana como única fonte de carbono. Estas enzimas agem sobre a fucose (6-deoxi-galactose) encontrada em glicoproteínas e polímeros das parede celular de plantas, nas quais a enzima hidrolisa a fucose, reação fundamental na completa desconstrução de alguns xiloglicanos. Estas enzimas têm sido

caracterizadas em diversas espécies de fungos filamentosos como *Fusarium oxysporum* e *F. graminearum* em meios de cultura adicionados com 1 % de fucose para a indução da  $\alpha$ -fucosidase (Paper, Scott-Craig *et al.*, 2012).

Além da xilana, outro abundante componente da hemicelulose é a manana, polímero unido por ligações  $\beta$ -1-4 que dependendo dos elementos componentes pode ser encontrada na forma de manana linear, galactomanana, glucomanana e galactoglucomanana (Moreira e Filho, 2008). Enzimas responsáveis pela hidrólise da manana foram identificadas no presente estudo, como  $\alpha$ -1,6 mananases (G9PB96, G9MSS0) concentradas na família GH 76, manosidases (G9P5N3, G9NK86, G9P297, G9NZE2, G9MZ53) encontradas nas famílias GH 2 e 92 e galactosidases (G9NPC7).

- Expressão de enzimas pectinolíticas: outro dos principais componentes da parede celular vegetal depois da celulose e das hemiceluloses é a pectina, heteropolissacarídeo cujos elementos estruturais incluem homogalacturonana, xilogalacturonana, rhamnogalacturonana, arabinana e arabinogalactana, entre outros (Voragen, Coenen *et al.*, 2009).

Três principais grupos de enzimas pectinolíticas atuam sinergisticamente na quebra da estrutura, são as protopectinases, as esterases e as despolimerases. Fazendo parte do grupo das despolimerases estão as exo e endopoligalacturonases da família das GH 28 (G9NQQ1, G9NE75), que catalisam a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1-4 nas moléculas de ácido-D-glucurônico da pectina, as quais foram exclusivamente identificadas no secretoma de *T. harzianum* obtido em celulose, xilana e bagaço de cana. Por outro lado, no grupo das esterases as pectina esterases (G9PB37, G9MMP9) identificadas a partir do crescimento em bagaço de cana e xilana hidrolisam as ligações ester da pectina rendendo como produto metanol e ácido pectínico (Jayani, Saxena *et al.*, 2005).

- Expressão de enzimas ligninolíticas: a lignina é um complexo fenólico por unidades dimetoxiladas (siringil), monometoxiladas (guaiacil) e não metoxiladas (*p*-hidroxifenil) derivadas dos correspondentes *p*-hidroxicinamil álcoois dando origem a uma estrutura altamente recalcitrante que junto com a hemicelulose formam uma matriz amorfa na qual as fibras de celulose se encontram embebidas e protegidas contra a biodegradação (Martínez, Speranza *et al.*, 2005).

Diferentes enzimas estão envolvidas na degradação da lignina, como as lacases que catalisam a oxidação de compostos fenólicos por redução de O<sub>2</sub> em água. As lacases são mais frequentemente encontradas em secretomas de fungos Basidiomycetes, porém a sua secreção tem sido também confirmada em Ascomycetes das espécies *T. harzianum* e *T. atroviride* associada à superfície de esporos provenientes de meios de cultura sólidos contendo glicose como fonte de carbono (Hölker, Dohse *et al.*, 2002).

Em nosso estudo, foi identificada uma lacase (C5H3G0) exclusivamente no secretoma obtido do crescimento em glicose. Sua participação pode estar relacionada à degradação de material lignocelulósico assim como à eventos fisiológicos que envolvem reações de oxidação de compostos orgânicos como síntese de pigmentos semelhantes a melanina em conídios e indução na formação de corpos de frutificação (Sadhasivam e Savitha, 2008).

- Expressão de enzimas associadas a controle biológico: a parede celular fúngica é uma estrutura complexa tipicamente composta por quitina,  $\beta$ -1,6 e  $\beta$ -1,3 glicanos, manana e proteínas. Enzimas hidrolíticas associadas à parede celular estão envolvidas na morfogênese de fungos filamentosos como expansão e divisão celular, germinação de esporos, formação de septos e ramificação de hifas (Horiuchi e Takagi, 1998). Da mesma forma, quitinases e glicanases têm um papel fundamental no ataque micoparasítico que espécies do gênero *Trichoderma* exercem hidrolisando polímeros da parede celular de outros fungos (Benítez, Rincón *et al.*, 2004).

O polímero de quitina pode ser enzimaticamente clivado por dois tipos de enzimas, as quitinases encontradas na família GH 18 que degradam eficazmente o polímero de quitina em quito-oligômeros, e as N-acetilglicosaminidases NAG que convertem o produto das quitinases em monômeros de N-acetilglicosamina. Em nosso estudo foram identificadas várias quitinases com atividade endo (I3NN23, D9MWV9, Q12735, O43111, Q9UV49, Q4JQJ0) presentes nas quatro condições de cultura, assim como as NAGs (P87258, Q0ZLH7, Q8NIN7) em meios contendo celulose, xilana e bagaço de cana.

Reações de transglicosilação também podem ser catalisadas por algumas quitinases expressas por *T. harzianum* como as quitinases de 33kD (Chit33) e 42kDa (Chit42) na presença de quito-oligossacarídeos complexos (Boer, Munck *et al.*, 2004).

Quitosanases como as exo- $\beta$ -D-glicosaminidases da família GH 2 também foram encontradas no secretoma de *T. harzianum* (G9P602, 9MZV2) estas enzimas participam na

etapa final da hidrólise da quitina, uma vez que rendem resíduos de D-glicosamina principal componente do quitosano, um derivado da quitina que pode estar total ou parcialmente N-desacetilado (Nogawa, Takahashi *et al.*, 1998).

Outro tipo de enzimas que foram identificadas foram  $\beta$ -1-3 glicanases (G9MX73, G9NEC2, G9NTC3) encontradas nas famílias GH 55, 64 e 71. Uma vez que o  $\beta$ -glucano é o componente mais abundante da parede celular fúngica, as  $\beta$ -glicanases tem um papel fundamental em processos que incluem remodelamento, extensão e autólise quando associadas à parede celular, porém algumas  $\beta$ -glicanases podem ser produzidas exocelularmente em resposta a escassez de nutrientes ou fazendo parte do ataque micoparasítico (Martin, Mcdougall *et al.*, 2007).

Além das enzimas hidrolíticas acima mencionadas outras proteínas identificadas no secretoma de *T. harzianum* corresponderam a proteínas intracelulares provavelmente como resultado de eventos de lise de células pequenas que poderiam estar presentes nos secretomas, morte celular ou mecanismos não convencionais de secreção de proteínas.

#### **4.3.3 Comparação do secretoma de *T. harzianum* proveniente do inóculo micelial e conidial em meio contendo celulose**

Em estudos realizados por nosso grupo (Do Vale, Gómez-Mendoza *et al.*, 2012) utilizando micélio como inóculo para a produção por SmF do secretoma de *T. harzianum* em meio contendo celulose como fonte de carbono foi observada a produção de um total de 56 proteínas que corresponderam em grande parte a quitinases e endoquitinases (31,80 %), proteases (8,90 %) e proteínas intracelulares (17,60 %) identificadas a partir de mapas bidimensionais seguidos de espectrometria MALDI TOF/TOF e análise por geLC-MS/MS.

Na presente tese foi utilizado um inóculo conidial para a produção do secretoma em meio contendo celulose como substrato carbonado. Se observando a expressão mais abundante de glicosil hidrolases associadas à degradação de material lignocelulósico (Fig. 23), sendo estes resultados bem diferentes dos obtidos no trabalho supracitado.

Diferenças na expressão de proteínas nos dois tipos de secretomas produzidos pelo fungo podem ter sido resultado da ativação ou repressão de genes das principais enzimas secretadas, como é o caso dos genes de enzimas quitinolíticas cuja secreção por parte de *T. harzianum* se encontra induzidas em presença de quitina, parede celular de outros

fungos e baixa concentração da fonte de carbono, e inibidas em presença de glicose e glicerol. Recentemente foi demonstrado que o gene *chi42* que expressa a endoquitinase 42kDa não é diretamente induzido por quitina, e em contraste há expressão significativa da endoquitinase depois de períodos prolongados de inanição e estresse fisiológico (García, Lora *et al.*, 1994; Viterbo, Montero *et al.*, 2002; Liu e Yang, 2005).

Assim provavelmente o micélio do fungo produzido como inoculo ao ser transferido ao meio de cultura fresco, resultou na secreção de um grande número de quitinases devido ao estresse causado pela incapacidade do fungo de consumir a fonte de carbono. Igualmente enzimas como a quitinase 42 kDa são conhecidas por fazer parte de processos de autodigestão de hifas em culturas mais antigas, o que poderia explicar a sua abundância no secretoma produzido (47,82 % do total das quitinases produzidas correspondeu à quitinase 42 kDa) (Gruber e Seidl-Seiboth, 2012).

Por outro lado expressão aumentada de diversas celulases, hemicelulases e proteínas transportadoras de carboidratos foi também observada por (Metz, Seidl-Seiboth *et al.*, 2011) em culturas de *T. reesei*, nas quais aconteceu uma simultânea diminuição de proteases e transportadores de aminoácidos, fenômeno que pode ser explicado devido ao pré-condicionamento dos esporos do fungo para reiniciar o metabolismo em substratos (hemi) celulósicos

Da mesma forma a expressão diferencial de proteínas que aconteceu entre os dois secretomas analisados (proveniente de inóculo micelial e conidial), demonstra que não apenas a natureza da fonte de carbono gera diferenças na expressão de glicosil hidrolases, mas que outros fatores como estágio de desenvolvimento da pré-cultura do fungo, tipo de fermentação, tamanho do inóculo, fornecimento de oxigênio, presença de cofatores de crescimento e estado morfológico do organismo possivelmente influenciam o conjunto de enzimas hidrolíticas que são secretadas ao meio extracelular. Tais diferenças podem resultar destas alterações na estrutura e permeabilidade da membrana que acontece durante o processo de diferenciação de conídios e micélio e expressão diferencial de genes que ocorre durante a conidiogênese (Domingues, Queiroz *et al.*, 2000; Papagianni, 2004).

#### 4.4 Detecção de complexos multienzimáticos no secretoma de *T. harzianum* cultivado em meio contendo bagaço de cana

##### 4.4.1 Análise do secretoma por BN-PAGE

A partir do crescimento de *T. harzianum* em meio adicionado com bagaço de cana como fonte de carbono foi verificada a presença de possíveis complexos proteicos no secretoma mediante eletroforese nativa BN-PAGE. Este experimento evidenciou várias bandas das quais foram selecionadas as mais intensas e nomeadas como complexos [I], [II] e [III] para posteriores ensaios (Fig. 24A).

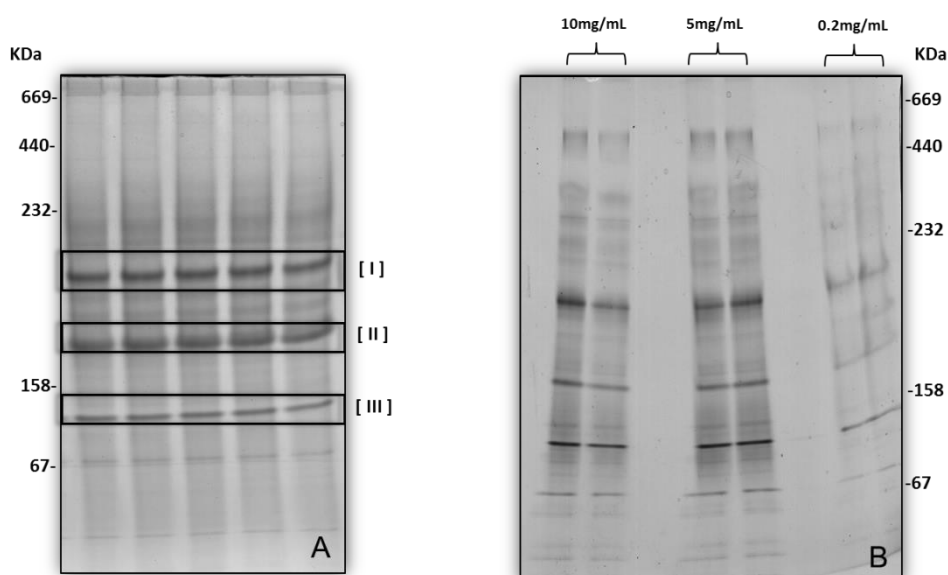


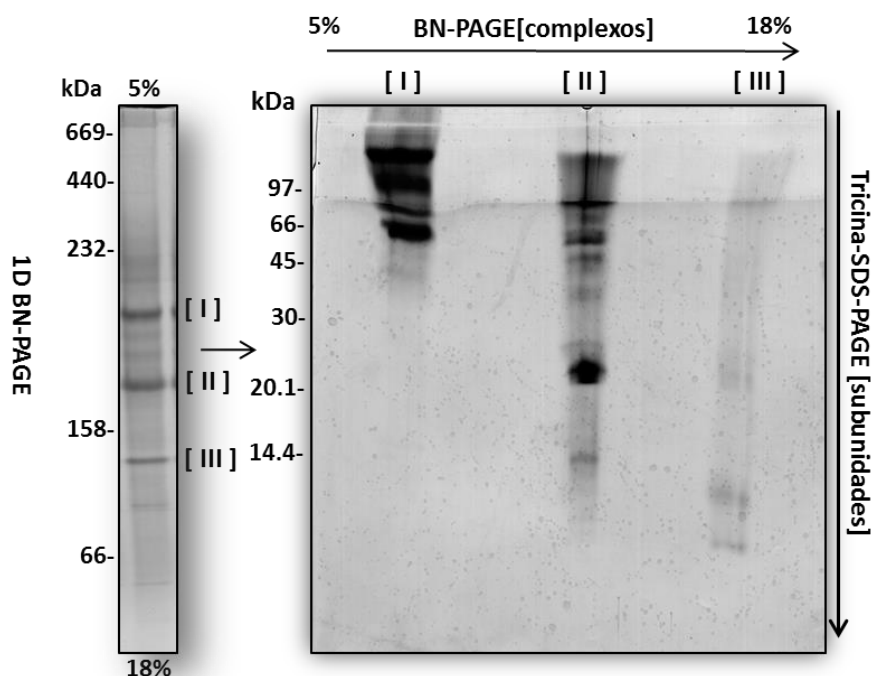
Figura 24. (A) 1D-BN-PAGE do secretoma de *T. harzianum* obtido em meio de cultura contendo 1 % (m/v) de bagaço de cana. Uma quantidade de 200  $\mu\text{g}$  de proteína foram aplicados em um gel de gradiente de 5-18 % T. (B) 1D-BN-PAGE do secretoma de *T. harzianum* utilizando diferentes concentrações de proteína ( $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Diferentes volumes de cada concentração foram aplicados para facilitar a visibilidade das bandas:  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  (400  $\mu\text{L}$ ),  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  (60  $\mu\text{L}$ ) e  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  (20  $\mu\text{L}$ ).

A observação de complexos como bandas visíveis no gel BN-PAGE foi constatada aplicando no gel concentrações variáveis de proteína ( $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ), com o objetivo de esclarecer a relação entre a concentração de proteína aplicada e a formação do complexo. Este experimento mostrou que o perfil eletroforético do secretoma se manteve sem alterações nas três concentrações testadas, demonstrado assim que mesmo quando alta concentração de proteínas foi utilizada a distribuição das bandas no gel e por tanto a aparição dos complexos permaneceu inalterável (Fig. 24B).

A visualização dos complexos putativos permaneceu inalterada devido ao uso de CBB-G250 no tampão catódico da eletroforese BN-PAGE útil por reduzir em grande parte o problema da associação inespecífica de proteínas em função da repulsão eletrostática criada pela presença de cargas negativas na superfície das proteínas, como consequência da ligação do CBB-G250 aos domínios hidrofóbicos das mesmas (Schägger, H., Cramer, W. A. *et al.*, 1994).

As bandas proteicas correspondentes aos complexos putativos [I], [II] e [III] foram retiradas do gel e submetidas a segunda dimensão em eletroforese desnaturante Tricina-SDS-PAGE para determinação da presença de subunidades provenientes de cada complexo, mostrando que cada um foi decomposto em componentes de diferentes massas moleculares.

Entanto que para o complexo [I] apenas altas massas foram evidenciadas (>45 kDa), para os complexos [II] e [III] massas entre os 14 e 97 kDa foram observadas, resultado que sugere uma possível incompleta dissociação dos complexos mesmo após o tratamento desnaturante realizado nas bandas, prévio à segunda dimensão (Fig. 25).

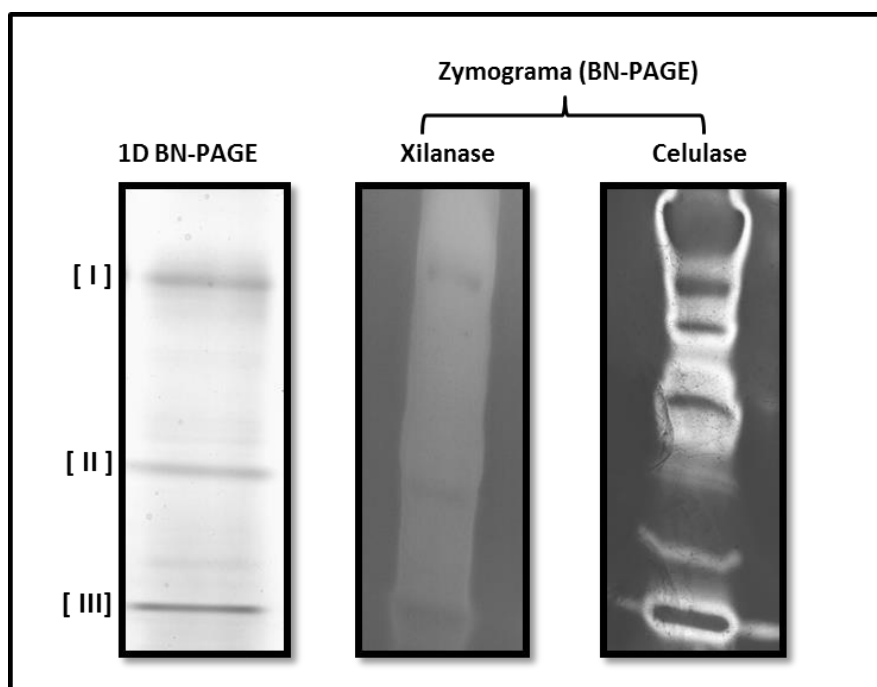


**Figura 25.** 2D-BN-PAGE do secretoma de *T. harzianum* obtido em meio contendo bagaço de cana. Na esquerda gel gradiente 1D-BN-PAGE (5-18 % (m/v) usado para visualização dos complexos. Na direita segunda dimensão de Tricina-SDS-PAGE usado para analisar composição monomérica dos complexos [I], [II] e [III].



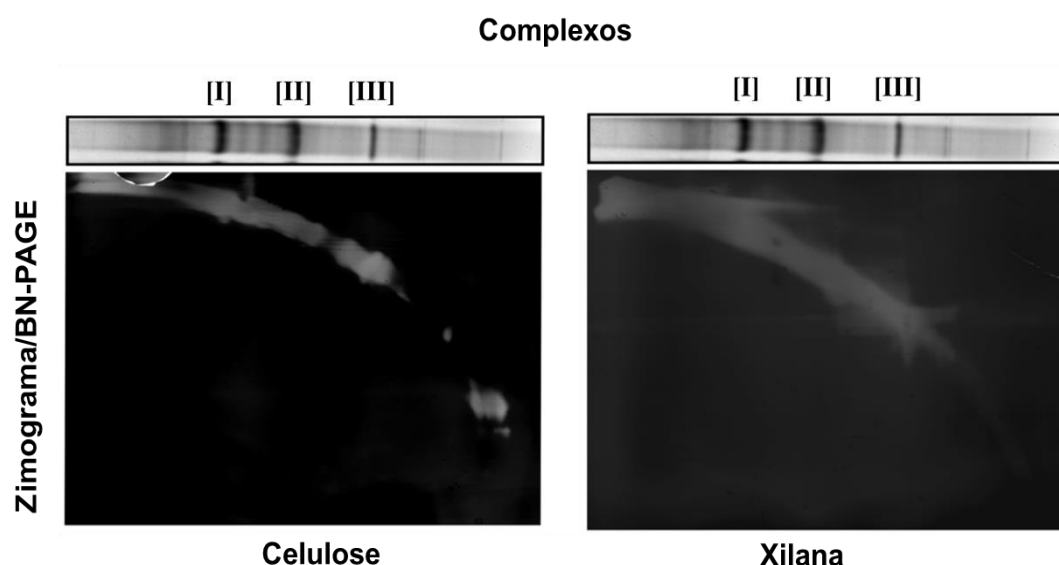
#### 4.4.2 Atividade enzimática *in gel* dos complexos proteicos

Atividade enzimática *in gel* dos complexos foi realizada usando géis BN-PAGE copolimerizados com 1 % (m/v) de celulose ou xilana, tanto na primeira como na segunda dimensão. O experimento revelou a funcionalidade dos complexos proteicos do secretoma, uma vez que tanto atividade a celulolítica quanto a xilanolítica foi evidenciada. No zimograma 1D-BN-PAGE que continha xilana como substrato foi observada zona de clareamento ao longo da corrida eletroforética que poderia ser consequência de interferência da técnica de BN-PAGE com o protocolo da zimografia ou então da atividade enzimática de xilanases com diferentes massas moleculares (Fig. 26).



**Figura 26.** Detecção de atividade xilanolítica e celulolítica usando zimograma em 1D-BN-PAGE do secretoma de *T. harzianum*. O gel controle foi corado com CBB e atividade enzimática visualizada após coloração com Congo Red.

Assim com o objetivo de confirma e evidenciar claramente a capacidade dos complexos de degradar os substratos utilizados no experimento de zimografia, o gel 1D-BN-PAGE foi submetido a zimografia em gel BN-PAGE na segunda dimensão (2D-BN/BN-PAGE), experimento que corroborou a detecção de atividade celulolítica e xilanolítica dos complexos putativos bem como presença de proteínas de diferente massa molecular presentes em cada complexo (Fig. 27)



**Figura 27.** Detecção de atividade xilanolítica e celulolítica usando zimografia em 2D-BN/BN-PAGE do secretoma de *T. harzianum*. Na primeira dimensão os complexos foram separados usando gel gradiente BN-PAGE (5-18 % (m/v)). Uma fita de gel que continha os complexos foi retirada e submetida a segunda dimensão usando gel BN-PAGE contendo celulose ou xilana. Hidrólise do substrato foi evidenciada após coloração com *Congo Red*.

#### 4.4.3 Identificação por LC-MS/MS das proteínas componentes dos complexos

A identificação das proteínas presentes em cada complexo foi realizada seguindo duas abordagens ortogonais. Em primeiro lugar uma busca das sequências resultantes do sequenciamento *de novo* usando o programa MASCOT e por outro lado uma busca tolerante à erro por homologia usando o programa MS-BLAST.

Como esperado, a busca por homologia rendeu um maior número de proteínas identificadas em relação à busca convencional (Junqueira, Spirin *et al.*, 2008). Da mesma forma proteínas diferentes foram identificadas como no caso do complexo [I] no qual as xilanases ABF e XLN foram identificadas apenas após a busca por homologia (Tabela 11).

Em relação ao complexo [II], CBHs, xilanases e quitinases foram identificadas por ambos os métodos de busca, porém as enzimas cutinase e galactosidase foram apenas identificadas quando a busca foi realizada no programa MS-BLAST. Para o complexo [III], a busca de proteínas pelo programa MASCOT não apresentou resultados positivos, enquanto que usando o MS-BLAST diversas proteínas presentes no complexo como  $\alpha$ - e  $\beta$ -glicanases, glicoamilases, foram identificadas (Tabela 11).

A capacidade de *T. harzianum* de secretar ao meio extracelular complexos multienzimáticos ativos em meio contendo bagaço de cana, foi comprovada. A natureza

heterogênea de tais complexos sugere uma possível ação sinérgica entre os componentes o que resultaria na degradação cooperativa e eficiente dos polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica.

Baseado nos resultados de identificação dos componentes dos complexos de *T. harzianum*, pode-se sugerir possíveis mecanismos de ação para os mesmos como segue abaixo.

- Complexo multienzimático (I): a conversão da xilana encontrada no bagaço de cana, resultaria da ação cooperativa entre ABFs (gi-315259518) que na retirada das ramificações facilitaria a ação catalítica de XLNs ao interior da molécula, ao mesmo tempo que BXLs (gi-297197679) agiria sobre os xilo-oligossacarídeos gerados, retirando monômeros de xilose e por sua vez facilitando a penetração de CBHs (gi-194719525) ao profundo da parede celular. Este mecanismo de cooperação entre celulasas e hemicelulasas tem sido estudado na degradação de fontes complexas de carbono como palha de trigo e milho usando enzimas provenientes de fungos filamentosos (Tabka e Sigoillot, 2006).
- Complexo multienzimático (II): Da mesma forma que as ABFs outra hemicelulase encontrada neste complexo a acetilxilana esterase AXE (gi-41016921), poderia favorecer a acessibilidade de xilanasas e celulasas uma vez que age retirando as ramificações acetiladas da xilana. Ao mesmo tempo que cutinase (gi-310799541) catalisaria a hidrólise da cutina, facilitando que outras enzimas hidrolíticas chegassem até os polímeros da parede celular (Rubio, Cardoza *et al.*, 2008). Xilanasas e celulasas poderiam também agir como indutores na síntese de outras enzimas como quitinasas (gi-88191687), cuja secreção pode ser explorada no desenvolvimento de produtos biocontroladores contra fungos fitopatogênicos como *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* (Yang, Yang *et al.*, 2009; Mishra, Kshirsagar *et al.*, 2012).
- Complexo multienzimático (III): Além de proteínas com atividade catalítica, outras como a swolenina SWO (gi-8052455) poderiam promover a amorfogênese nas microfibrilas de celulose incrementando a eficiência hidrolítica de CBHs (Saloheimo, Paloheimo *et al.*, 2002; Arantes, V. e Saddler, J., 2010). De forma semelhante, o domínio de ligação ao amido (SBD) presente em glicoamilases (gi- 61657886) agiria causando a hidrólise do amido e outros oligossacarídeos semelhantes, podendo concentrar o domínio catalítico de amilases assim como outras glicosil hidrolases no substrato (Southall, Simpson *et al.*, 1999; Giardina, Gunning *et al.*, 2001; Tung, Chang *et al.*, 2008). Em relação à endoglicanase ancorada a GPI GPI-EglC (gi-320590163) encontrada no complexo III, a mesma poderia participar no remodelamento dos polissacarídeos da parede celular fúngica ou

possivelmente aproximando o complexo à célula fúngica podendo favorecer um incremento na eficiência degradadora das subunidades do complexo.

Por esta metodologia não foi possível identificar alguma proteína de natureza estrutural semelhante ao componente de integração celulosomal como a escafoldina encontrada em complexos multienzimáticos de organismos anaeróbios, como no caso dos fungos *Piromyces equi* e *Neocallimastix patriciarum* nos quais foram identificados polipeptídeos de 116 e 97 kDa respectivamente, que estariam mediando a interação proteína-proteína em complexos multienzimáticos de celulases-hemicelulases sintetizados por estes fungos. No caso de organismos aeróbios como *T. harzianum* a montagem das enzimas no complexo poderia acontecer entre o polipeptídeo e o CBM de algumas enzimas hidrolíticas que não estariam cumprindo um papel na ligação ao carboidrato e sim atuando como doquerinas (Fanutti, Panyi *et al.*, 1995; Nagy, Tunncliffe *et al.*, 2007).

As mudanças observadas no secretoma de *T. harzianum* em função da fonte de carbono, podem ser um indicio de que a composição dos complexos multienzimáticos secretados pelo fungo estariam igualmente sob influência da fonte de carbono utilizada na cultura. Resultados semelhantes foram obtidos por (Gonzalez-Vogel, Eyzaguirre *et al.*, 2011) na detecção de complexos no secretoma do fungo aeróbico *Penicillium purpurogenum* no qual foram observadas diferenças nas enzimas dos complexos em função ao uso de polpa de beterraba, sabugo de milho ou xilana acetilada como fonte de carbono.

**Tabela 7.** Proteínas identificadas por geLC-MS/MS dos complexos proteicos detectados no secretoma de *T. harzianum*

Complexo [I]					Complexo [II]				
MASCOT					MS BLAST				
Proteína	Organismo	gi <sup>a</sup>	#Match <sup>b</sup>	Score <sup>c</sup>	Proteína	Organismo	gi	#HSPs <sup>d</sup>	Score <sup>e</sup>
Cellobiohidrolase I	<i>T. asperellum</i>	42741023	21	87	Cellobiohidrolase I	<i>H. virens</i>	194719525	39	2355
Predicted Protein	<i>T. reesei</i>	340516597	1	58	Cellobiohidrolase I-II	<i>V. volvacea</i>	49333365	4	234
					Alpha-L- arabinofuranosidase	<i>Penicillium</i> sp.	315259518	4	308
					Xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase	<i>S. sviceps</i>	297197679	3	207
Complexo [III]									
Chain A, Cat Core Dom Acetyl Xylan Esterase	<i>T. reesei</i>	11513450	21	130	Acetylxylan esterase	<i>H. jecorina</i>	41016921	43	2665
Endochitinase	<i>H. lixii</i>	487419	6	117	Endochitinase	<i>H. lixii</i>	88191687	1	84
Endochitinase 42	<i>T. stromaticum</i>	310892959	5	63	Arabinogalactan endo-1,4- $\beta$ -galactosidase GalA	<i>T. stipitatus</i>	242822204	13	849
CellobiohidrolaseII	<i>A. cellulolyticus</i>	4200031	4	98	Cellobiohidrolase I	<i>H. virens</i>	194719525	9	537

Cellobiohidrolase I	<i>P. occitanis</i>	51243029	8	100	Cutinase	<i>G. graminicola</i>	310799541	8	485
					$\alpha$ -N-arabinofuranosidase				
GH 18	<i>T.reesei</i>		4	88	precursor	<i>A. terreus</i>	115401944	8	453
Endo-1,4-xylanaseD	<i>P. funiculosum</i>	53747929	1	56	Endo- $\beta$ -1,4-xylanase	<i>Bispora sp.</i>	225420804	12	955
<b>Complexo [III]</b>									
					Glucoamilase	<i>H. lixii</i>	61657886	10	748
					Endo-beta-1,4-glucanase	<i>H. jecorina</i>	60593233	2	189
					Swollenin	<i>H. jecorina</i>	8052455	2	163
					GPI-anchored cell wall				
					beta-Endoglucanase	<i>G. clavigera</i>	320590163	2	153
					Fungal alpha-L-arabinofuranosidase,	<i>P. marneffeii</i>			
					Putative		212528630	1	84
					$\alpha$ -1,3-glucanase	<i>H. lixii</i>	18076080	1	79

<sup>b</sup> Número de peptídeos pareados

<sup>c</sup> Protein mowse score ( <http://www.matrixscience.com>). Scores acima de 52 foram considerados significativos

<sup>d</sup> Sequencias de peptídeos que produziram "High Scoring Pairs" na busca por MS BLAST

<sup>e</sup> Score estadisticamente significativo de HSP

## 5 Conclusões

- 1) A análise proteômica do secretoma de *T. harzianum* revelou que a utilização de fontes de carbono de diferente natureza química no meio de cultura em fermentação submersa influencia fortemente a composição do secretoma do fungo.
- 2) A dosagem da atividade enzimática do secretoma de *T. harzianum* sobre celulose, papel de filtro e xilana indicou maior atividade xilanolítica para todas as fontes de carbono utilizadas na fermentação, sendo o bagaço de cana o substrato que estimulou uma maior atividade enzimática.
- 3) A utilização de técnicas proteômicas *gel based* como 2-DE/MALDI TOF-TOF mostrou abundância de polimorfismos proteicos de natureza ácida (4,5-5,5) e alta massa molecular (>60 kDa) correspondentes a enzimas hidrolíticas como  $\beta$ -glicosidase, N-acetilglicosaminidase, xilanase e arabinofuranosidase.
- 4) Diferenças visíveis a partir de perfis eletroforéticos foram observadas nos secretomas como resultado da N-desglicosilação das amostras, indicando que este tipo de modificação pós-traducional poderia constituir uma importante forma de diversificação do secretoma do fungo.
- 5) Análise *gel-free* dos secretomas mediante *shotgun* LC-MS/MS permitiu a identificação de 626 proteínas diferentes, expressas nas quatro fontes de carbono avaliadas. As proteínas identificadas incluíram diferentes famílias de glicosil hidrolases, que são proteínas extracelulares associadas à parede celular do fungo e módulos de ligação ao carboidrato CBMs.
- 6) Das proteínas identificadas no secretoma, 40 resultaram exclusivamente secretadas em meio contendo glicose, 212 em meio contendo celulose, 92 em meio contendo xilana e 107 em meio contendo bagaço de cana, sendo 33 expressas nas quatro condições testadas.
- 7) Novos elementos do sistema celulolítico de fungos filamentosos foram pela primeira vez identificadas nos secretoma de *T. harzianum*, sendo o caso das proteínas *cellulose induced protein* (CIP 1) e polissacarídeo mono-oxigenases (PMOs).

- 8) Outras enzimas associadas à degradação de polissacarídeos da parede celular vegetal como fucosidases e pectinases foram identificadas dentro da maquinaria enzimática de *T. harzianum* exclusivamente secretadas em meio contendo xilana e celulose respectivamente.
- 9) Proteínas secretadas porém ligadas à parede celular do fungo foram também encontradas no secretoma, sendo o caso de, hidrofobinas e proteínas GPI ancoradas, cuja função poderia não estaria diretamente associada a processos catalíticos, mas a sua expressão no secretoma pode ser um indício da função auxiliar que as mesmas tem na eficiente secreção de enzimas e consequente degradação de açúcares poliméricos.
- 10) Foi corroborada a capacidade do fungo de secretar enzimas envolvidas em processo de controle biológico de fitopatógenos como quitinases, glicanases e proteases, propriedade esta mais amplamente estudada na espécie.
- 11) Adicional a variação na secreção de proteínas por parte de *T. harzianum* provocada pela utilização de diferentes fontes de carbono, mudanças em relação a secreção de quitinases e hemi(celulases) foram verificadas como consequência da utilização de inóculos de diferente morfologia para a produção do secretoma em meio contendo celulose como fonte de carbono.
- 12) A análise por BN-PAGE em combinação com geLC-MS/MS do secretoma do fungo obtido a partir do crescimento em bagaço de cana revelou a presença de complexos proteicos constituídos de enzimas de diferente especificidade catalítica bem como proteínas auxiliares.
- 13) A funcionalidade dos complexos multienzimáticos sintetizados por *T. harzianum* foi corroborada mediante a combinação da eletroforese BN-PAGE com zimografia indicando que a capacidade catalítica e estado nativo dos mesmos foi mantido nas condições do experimento.
- 14) Atividade celulolítica e xilanolítica foi evidenciada para cada complexo proteico mediante a zimografia/BN-PAGE, corroborando a natureza multienzimática dos complexos.
- 15) Este estudo é até a data a mais completa análise do secretoma da espécie *T. harzianum*, mostrando que ocorre um extenso rearranjo na composição do secretoma em função do sensoriamento do substrato carbonado, bem como a montagem das enzimas e proteínas do secretoma na forma de complexos multiproteicos.



- 16) A diversidade de proteínas verificada no secretoma de *T. harzianum* resulta de grande importância na escolha da combinação eficiente de enzimas aplicáveis na bioconversão de diferentes tipos de biomassas, obtenção de açúcares fermentescíveis e tratamento de alimentos e materiais.
- 17) Futuros experimentos serão necessários a fim de verificar a importância que N-glicosilações exercem na atividade enzimática do secretomas produzidos por *T.harzianum*, bem como verificar a presença de outros tipos de modificações pós-traducionais que estejam contribuindo à diversificação e funcionalidade das proteínas secretadas.
- 18) Análise quantitativa *label-free* por contagem espectral normalizada, bem como determinação da área do pico será imprescindível para verificar expressão diferencial de proteínas identificadas comuns a duas ou mais fontes de carbono na metodologia *shotgun* seguida.
- 19) Serão necessárias pesquisas objetivando a caracterização dos complexos multienzimáticos identificados em termos de estequiometria, manutenção do estado oligomérico e influencia da fonte de carbono, para esclarecer o dinamismo das interações

## 6 Bibliografia

ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, n. Pt 7, p. 2029-35, Jul 2004. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15256547> >.

ADAV, S. S.; CHAO, L. T.; SZE, S. K. Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. **Mol Cell Proteomics**, v. 11, n. 7, p. M111.012419, Jul 2012. ISSN 1535-9484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22355001> >.

ADAV, S. S. et al. Label free quantitative proteomic analysis of secretome by *Thermobifida fusca* on different lignocellulosic biomass. **J Proteomics**, v. 75, n. 12, p. 3694-706, Jun 2012. ISSN 1876-7737. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22575269> >.

\_\_\_\_\_. Proteomic analysis of pH and strains dependent protein secretion of *Trichoderma reesei*. **J Proteome Res**, v. 10, n. 10, p. 4579-96, Oct 2011. ISSN 1535-3907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21879708> >.

ADNEY, W. S. et al. Probing the role of N-linked glycans in the stability and activity of fungal cellobiohydrolases by mutational analysis. *Cellulose*, v. 16, p. 699-709, 2009. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10570-009-9305-1?LI=true#page-2> >.

AHMED, S.; IMDAD, S. S.; JAMIL, A. Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 3, 2012. ISSN 0717-3458. Disponível em: < [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-34582012000300003&script=sci\\_arttext#2](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-34582012000300003&script=sci_arttext#2) >.

AKEL, E. et al. Molecular regulation of arabinan and L-arabinose metabolism in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 12, p. 1837-44, Dec 2009. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19801419> >.

ARANTES, V.; SADDLER, J. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology For Biofuels**, v. 3, FEB 23 2010 2010. ISSN 1754-6834.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol Rev**, v. 29, n. 4, p. 719-39, Sep 2005. ISSN 0168-6445. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16102600](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16102600) >.

ARO, N. et al. ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. **J Biol Chem**, v. 276, n. 26, p. 24309-14, Jun 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304525> >.

AZAM, A. *Trichoderma harzianum*: A new fungal source for the production of cyclosporin A. ANJUM, T.: Bangladesh J Pharmacol. 7: 33-35 p. 2012.

BAYRAM, O.; BRAUS, G. H. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 1, p. 1-24, Jan 2012. ISSN 1574-6976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21658084> >.

BECKHAM, G. T. et al. Harnessing glycosylation to improve cellulase activity. **Curr Opin Biotechnol**, v. 23, n. 3, p. 338-45, Jun 2012. ISSN 1879-0429. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22186222> >.

BEESON, W. T. et al. Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monoxygenases. **J Am Chem Soc**, v. 134, n. 2, p. 890-2, Jan 2012. ISSN 1520-5126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22188218> >.

BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **Int Microbiol**, v. 7, n. 4, p. 249-60, Dec 2004. ISSN 1139-6709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15666245> >.

BERANOVA-GIORGIANI, S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 273-281, 2003. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993603005089> >.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide **gels**. 8: 93-99 p. 1987.

BOER, H. et al. Differential recognition of animal type beta4-galactosylated and alpha3-fucosylated chito-oligosaccharides by two family 18 chitinases from *Trichoderma harzianum*. **Glycobiology**, v. 14, n. 12, p. 1303-13, Dec 2004. ISSN 0959-6658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15229194> >.

BONDARENKO, P. V.; CHELIUS, D.; SHALER, T. A. Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Chem**, v. 74, n. 18, p. 4741-9, Sep 2002. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12349978> >.

BORASTON, A. B. et al. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **Biochem J**, v. 382, n. Pt 3, p. 769-81, Sep 2004. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15214846> >.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, Aug 2006. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16927300> >.

CANTAREL, B. L. et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. Database issue, p. D233-8, Jan 2009. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18838391> >.

CARRERAS-VILLASEÑOR, N.; SÁNCHEZ-ARREGUÍN, J. A.; HERRERA-ESTRELLA, A. H. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 1, p. 3-16, Jan 2012. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21964734> >.

CHAVERRI, P. SAMUELS, G. *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. **Mycological Progress**. 1: 283-286 p. 2002.

CHAVERRI, P. et al. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. **Mol Phylogenet Evol**, v. 27, n. 2, p. 302-13, May 2003. ISSN 1055-7903. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12695093](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12695093) >.

CHEN, L. H. et al. Application of *Trichoderma harzianum* SQR-T037 bio-organic fertiliser significantly controls *Fusarium* wilt and affects the microbial communities of continuously cropped soil of cucumber. **J Sci Food Agric**, Apr 2012. ISSN 1097-0010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22513876> >.

CHERRAD, S. et al. Proteomic analysis of proteins secreted by *Botrytis cinerea* in response to heavy metal toxicity. **Metalomics**, v. 4, n. 8, p. 835-46, Aug 2012. ISSN 1756-591X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22706205> >.

CHOI, J. et al. Fungal secretome database: integrated platform for annotation of fungal secretomes. **BMC Genomics**, v. 11, p. 105, 2010. ISSN 1471-2164. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20146824](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20146824) >.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiol Rev**, v. 29, n. 1, p. 3-23, Jan 2005. ISSN 0168-6445. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15652973](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15652973) >.

CONESA, A. et al. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. **Fungal Genet Biol**, v. 33, n. 3, p. 155-71, Aug 2001. ISSN 1087-1845. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11495573](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11495573) >.

COPPIN, E. et al. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 61, n. 4, p. 411-28, Dec 1997. ISSN 1092-2172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409146> >.

DA SILVA, A. J. et al. Blue native-PAGE analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2729-38, Aug 2012. ISSN 1615-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22744980> >.

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, n. 9, p. 853-9, Sep 1995. ISSN 0969-2126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8535779> >.

DE CASTRO, A. M. et al. *Trichoderma harzianum* IOC-4038: A promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant  $\beta$ -glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 162, n. 7, p. 2111-22, Nov 2010. ISSN 1559-0291. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20455032> >.

DE JAEGER, N. et al. *Trichoderma harzianum* might impact phosphorus transport by arbuscular mycorrhizal fungi. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 77, n. 3, p. 558-67, Sep 2011. ISSN 1574-6941. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21609342> >.

DE PAULA SILVEIRA, F. Q. et al. A new xylanase from *Trichoderma harzianum* strain. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, n. 23, p. 682-685, 1999.

DEGENKOLB, T. et al. Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. **Chem Biodivers**, v. 5, n. 5, p. 671-80, May 2008. ISSN 1612-1880. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18493954> >.

DO VALE, L. H. et al. Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2716-28, Aug 2012. ISSN 1615-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22745025> >.

DOMINGUES, F. C. et al. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme Microb Technol**, v. 26, n. 5-6, p. 394-401, Mar 2000. ISSN 1879-0909. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713213> >.

DRUZHININA, I. et al. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. **BMC Evol Biol**, v. 10, n. 1, p. 94, Apr 2010. ISSN 1471-2148. Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20359347](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20359347) >.

DRUZHININA, I. S. et al. Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. **Fungal Genet Biol**, Mar 2012. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22405896> >.

\_\_\_\_\_. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma*. **Fungal Genet Biol**, v. 42, n. 10, p. 813-28, Oct 2005. ISSN 1087-1845. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16154784> >.

ELAD, Y., A. The Role of *Trichoderma harzianum* Protease in the Biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, n. 105, p. 177-189, 1999. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/j2p11446h67h2635/fulltext.pdf> >.

FANUTTI, C. et al. The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. **J Biol Chem**, v. 270, n. 49, p. 29314-22, Dec 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7493964> >.

FERNANDEZ-FUEYO, E. et al. Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 14, p. 5458-63, Apr 2012. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22434909> >.

FOREMAN, P. et al. **CIP1 polypeptides and their uses**. PATENT, U. S. USA. 7,923,235 12 April 2011.

FOREMAN, P. K. et al. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **J Biol Chem**, v. 278, n. 34, p. 31988-97, Aug 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12788920> >.

FRANK, A.; PEVZNER, P. PepNovo: de novo peptide sequencing via probabilistic network modeling. **Anal Chem**, v. 77, n. 4, p. 964-73, Feb 2005. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15858974> >.

GARCÍA, I. et al. Cloning and characterization of a chitinase (chit42) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. **Curr Genet**, v. 27, n. 1, p. 83-9, Dec 1994. ISSN 0172-8083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7750151> >.

GIARDINA, T. et al. Both binding sites of the starch-binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase are essential for inducing a conformational change in amylose. **J Mol Biol**, v. 313, n. 5, p. 1149-59, Nov 2001. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700070> >.

GONZALEZ-VOGEL, A. et al. Proteomic analysis in non-denaturing condition of the secretome reveals the presence of multienzyme complexes in *Penicillium purpurogenum*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89, n. 1, p. 145-55, Jan 2011. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20972675> >.

GREENBAUM, D. et al. Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome: coming in on function. **Genome Res**, v. 11, n. 9, p. 1463-8, Sep 2001. ISSN 1088-9051. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544189> >.

GRINYER, J. et al. Proteome mapping of the *Trichoderma reesei* 20S proteasome. **Curr Genet**, v. 51, n. 2, p. 79-88, Feb 2007. ISSN 0172-8083. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17119969](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17119969) >.

\_\_\_\_\_. Fungal proteomics: mapping the mitochondrial proteins of a *Trichoderma harzianum* strain applied for biological control. **Curr Genet**, v. 45, n. 3, p. 170-5, Mar 2004. ISSN 0172-8083. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14652694](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14652694) >.

\_\_\_\_\_. Fungal proteomics: initial mapping of biological control strain *Trichoderma harzianum*. **Curr Genet**, v. 45, n. 3, p. 163-9, Mar 2004. ISSN 0172-8083. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14685766](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14685766) >.

GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 1, p. 26-34, Jan 2012. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21873410> >.

GUPTA, R.; BRUNAK, S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. **Pac Symp Biocomput**, p. 310-22, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11928486> >.

GUSAKOV, A. V. et al. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnol Bioeng**, v. 97, n. 5, p. 1028-38, Aug 2007. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17221887> >.

H, M.-F.; X, F.-F. E. Purification and characterization of a b-mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. *Carbohydrate Polymers*: 23-29 p. 2004.

HARMAN, G. et al. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 1, p. 43-56, Jan 2004. ISSN 1740-1526. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15035008](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15035008) >.

HARTL, L.; ZACH, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 93, n. 2, p. 533-43, Jan 2012. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22134638> >.

HATVANI, L. et al. Green Mold Diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. Are Caused by Related but Phylogenetically Different *Trichoderma* Species. **Phytopathology**, v. 97, n. 4, p. 532-7, Apr 2007. ISSN 0031-949X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18943294> >.

HERMOSA, R. et al. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 1, p. 17-25, Jan 2012. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998166> >.

HERPOËL-GIMBERT, I. et al. Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. **Biotechnol Biofuels**, v. 1, n. 1, p. 18, 2008. ISSN 1754-6834. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19105830> >.

HORIUCHI, H.; TAKAGI, M. [The roles of chitin synthases and chitinases on the tip growth and the differentiation of filamentous fungi]. **Tanpakushitsu Kakusan Koso**, v. 43, n. 15, p. 2182-90, Dec 1998. ISSN 0039-9450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9868354> >.

HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012. ISSN 1754-6834. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22747961> >.

HÖLKER, U.; DOHSE, J.; HÖFER, M. Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 47, n. 4, p. 423-7, 2002. ISSN 0015-5632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12422522> >.

IGARASHI, K. et al. Family 3 beta-glucosidase from cellulose-degrading culture of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is a glucan 1,3-beta-glucosidase. **J Biosci Bioeng**, v. 95, n. 6, p. 572-6, 2003. ISSN 1389-1723. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233459> >.

ISHIHAMA, Y. Proteomic LC-MS systems using nanoscale liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1067, n. 1-2, p. 73-83, Mar 2005. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15844511> >.

ISHIHAMA, Y. et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 9, p. 1265-72, Sep 2005. ISSN 1535-9476. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15958392> >.

JAIN, A. et al. Probing cellular protein complexes using single-molecule pull-down. **Nature**, v. 473, n. 7348, p. 484-8, May 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21614075> >.

JAYANI, R.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511305001765> >.

JEFFRIES, T. W. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. **Curr Opin Biotechnol**, v. 7, n. 3, p. 337-42, Jun 1996. ISSN 0958-1669. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8785441> >.

JEOH, T. et al. Implications of cellobiohydrolase glycosylation for use in biomass conversion. **Biotechnol Biofuels**, v. 1, n. 1, p. 10, 2008. ISSN 1754-6834. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18471276> >.

JEYA, M. et al. Cloning and expression of GH11 xylanase gene from *Aspergillus fumigatus* MKU1 in *Pichia pastoris*. **J Biosci Bioeng**, v. 108, n. 1, p. 24-9, Jul 2009. ISSN 1347-4421. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577187> >.

JUNQUEIRA, M. et al. Protein identification pipeline for the homology-driven proteomics. **J Proteomics**, v. 71, n. 3, p. 346-56, Aug 2008. ISSN 1874-3919. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18639657](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18639657) >.

KIM, M. S.; PANDEY, A. Electron transfer dissociation mass spectrometry in proteomics. **Proteomics**, v. 12, n. 4-5, p. 530-42, Feb 2012. ISSN 1615-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22246976> >.

KNOB, A.; TERRESAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. b-Xylosidases from filamentous fungi: an overview. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 389-407, 2010. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/wx266565k732w28p/fulltext.pdf> >.

KOPCHINSKIY, A. et al. TrichoBLAST: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. **Mycol Res**, v. 109, n. Pt 6, p. 658-60, Jun 2005. ISSN 0953-7562. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16080389> >.

KRAUSE, F. Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. **Electrophoresis**, v. 27, n. 13, p. 2759-81, Jul 2006. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16817166> >.

KREDICS, L. et al. Clinical importance of the genus *Trichoderma*. A review. **Acta Microbiol Immunol Hung**, v. 50, n. 2-3, p. 105-17, 2003. ISSN 1217-8950. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12894482> >.

KRUSZEWSKA, J. S. et al. Alterations in protein secretion caused by metabolic engineering of glycosylation pathways in fungi. **Acta Biochim Pol**, v. 55, n. 3, p. 447-56, 2008. ISSN 0001-527X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18797519> >.

KUBICEK, C. P. et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. **Genome Biol**, v. 12, n. 4, p. R40, 2011. ISSN 1465-6914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21501500> >.

\_\_\_\_\_. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnol Biofuels**, v. 2, p. 19, 2009. ISSN 1754-6834. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19723296> >.

LATGÉ, J. P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Mol Microbiol**, v. 66, n. 2, p. 279-90, Oct 2007. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17854405> >.

\_\_\_\_\_. Tasting the fungal cell wall. **Cell Microbiol**, v. 12, n. 7, p. 863-72, Jul 2010. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20482553> >.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; ROBERTS, T. H.; HIRSCHBERG, K. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 16, p. 557-89, 2000. ISSN 1081-0706. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11031247> >.

LIU, P. G.; YANG, Q. Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. **Res Microbiol**, v. 156, n. 3, p. 416-23, Apr 2005. ISSN 0923-2508. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15808946> >.

LU, X. et al. The intra- and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. **Microb Cell Fact**, v. 9, p. 23, 2010. ISSN 1475-2859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20406453> >.

LUM, G.; MIN, X. J. FunSecKB: the Fungal Secretome KnowledgeBase. **Database (Oxford)**, v. 2011, p. bar001, 2011. ISSN 1758-0463. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21300622> >.

LY, L.; WASINGER, V. C. Protein and peptide fractionation, enrichment and depletion: tools for the complex proteome. **Proteomics**, v. 11, n. 4, p. 513-34, Feb 2011. ISSN 1615-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21241016> >.

LYND, L. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 66, n. 3, p. 506-77, table of contents, Sep 2002. ISSN 1092-2172. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12209002](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12209002) >.

LÓPEZ-MONDÉJAR, R. et al. The beta-N-acetylglucosaminidases NAG1 and NAG2 are essential for growth of *Trichoderma atroviride* on chitin. **FEBS J**, v. 276, n. 18, p. 5137-48, Sep 2009. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19674110> >.

MACH, R.; ZEILINGER, S. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, n. 5, p. 515-22, Jan 2003. ISSN 0175-7598. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12536250](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12536250) >.

MACH, R. L. et al. Carbon catabolite repression of xylanase I (xyn1) gene expression in *Trichoderma reesei*. **Mol Microbiol**, v. 21, n. 6, p. 1273-81, Sep 1996. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8898395> >.



MACH-AIGNER, A. R.; GUDYNAITE-SAVITCH, L.; MACH, R. L. L-arabitol is the actual inducer of xylanase expression in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 17, p. 5988-94, Sep 2011. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21742908> >.

MACH-AIGNER, A. R.; PUCHER, M. E.; MACH, R. L. D-Xylose as a repressor or inducer of xylanase expression in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 6, p. 1770-6, Mar 2010. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20097821> >.

MADDI, A.; FREE, S. J.  $\alpha$ -1,6-Mannosylation of N-linked oligosaccharide present on cell wall proteins is required for their incorporation into the cell wall in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 11, p. 1766-75, Nov 2010. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870880> >.

MAHAJAN, S.; MASTER, E. R. Proteomic characterization of lignocellulose-degrading enzymes secreted by *Phanerochaete carnos* grown on spruce and microcrystalline cellulose. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 86, n. 6, p. 1903-14, May 2010. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20306191> >.

MAKAROV, A. et al. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. **Anal Chem**, v. 78, n. 7, p. 2113-20, Apr 2006. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16579588> >.

MANN, M.; WILM, M. Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. **Anal Chem**, v. 66, n. 24, p. 4390-9, Dec 1994. ISSN 0003-2700. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7847635](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7847635) >.

MARTIN, K. et al. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal beta-(1,3)- and beta-(1,6)-glucanases. **FEMS Microbiol Rev**, v. 31, n. 2, p. 168-92, Mar 2007. ISSN 0168-6445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17313520> >.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 5, p. 553-60, May 2008. ISSN 1546-1696. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18454138](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18454138) >.

MARTÍNEZ, A. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **Int Microbiol**, v. 8, n. 3, p. 195-204, Sep 2005. ISSN 1139-6709. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16200498](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16200498) >.

MATSUI, H.; BAN-TOKUDA, T. Studies on carboxymethyl cellulase and xylanase activities of anaerobic fungal isolate CR4 from the bovine rumen. **Curr Microbiol**, v. 57, n. 6, p. 615-9, Dec 2008. ISSN 1432-0991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18791765> >.

MAZÁŇ, M. et al. Catalytic properties of the Gas family  $\beta$ -(1,3)-glucanosyltransferases active in fungal cell-wall biogenesis as determined by a novel fluorescent assay. **Biochem J**, v. 438, n. 2, p. 275-82, Sep 2011. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21651500> >.

MERINO, S. T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 108, p. 95-120, 2007. ISSN 0724-6145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17594064> >.

METZ, B. et al. Expression of biomass-degrading enzymes is a major event during conidium development in *Trichoderma reesei*. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 11, p. 1527-35, Nov 2011. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21890820> >.

MIETTINEN-OINONEN, A.; SUOMINEN, P. Enhanced production of *Trichoderma reesei* endoglucanases and use of the new cellulase preparations in producing the stonewashed effect on denim fabric. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 8, p. 3956-64, Aug 2002. ISSN 0099-2240. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12147496](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12147496) >.

MISHRA, P. et al. Statistical optimization of medium components for production of extracellular chitinase by *Basidiobolus ranarum*: a novel biocontrol agent against plant pathogenic fungi. **J Basic Microbiol**, v. 52, n. 5, p. 539-48, Oct 2012. ISSN 1521-4028. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22359366> >.

MONTEIRO, V. N. et al. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. **Curr Microbiol**, v. 61, n. 4, p. 298-305, Oct 2010. ISSN 1432-0991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20213103> >.

MONTERO, M. et al. BGN16.3, a novel acidic beta-1,6-glucanase from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413. **FEBS J**, v. 272, n. 13, p. 3441-8, Jul 2005. ISSN 1742-464X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15982190> >.

MOREIRA, L. R.; FILHO, E. X. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 79, n. 2, p. 165-78, May 2008. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385995> >.

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M. Secondary metabolism in *Trichoderma*-a genomic perspective. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 1, p. 35-45, Jan 2012. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998165> >.

MUÑOZ, G. et al. Hydrophobin gene *srh1*, expressed during sporulation of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Curr Genet**, v. 32, n. 3, p. 225-30, Sep 1997. ISSN 0172-8083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9339348> >.

NAGY, T. et al. Characterization of a double dockerin from the cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces equi*. **J Mol Biol**, v. 373, n. 3, p. 612-22, Oct 2007. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17869267> >.

NEFF, D.; DENCHER, N. A. Purification of multisubunit membrane protein complexes: isolation of chloroplast FoF1-ATP synthase, CFo and CF1 by blue native electrophoresis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 259, n. 3, p. 569-75, Jun 1999. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364459> >.

NEILSON, K. A. et al. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. **Proteomics**, v. 11, n. 4, p. 535-53, Feb 2011. ISSN 1615-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21243637> >.

NESVIZHSKII, A. I.; AEBERSOLD, R. Interpretation of shotgun proteomic data: the protein inference problem. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 10, p. 1419-40, Oct 2005. ISSN 1535-9476. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009968> >.

NEUHOF, T. et al. Direct identification of hydrophobins and their processing in *Trichoderma* using intact-cell MALDI-TOF MS. **FEBS J**, v. 274, n. 3, p. 841-52, Feb 2007. ISSN 1742-464X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17288563> >.

NIDETZKY, B. et al. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. **Biochem J**, v. 298 Pt 3, p. 705-10, Mar 1994. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8141786> >.

NOGAWA, M. et al. Purification and Characterization of Exo-beta-d-Glucosaminidase from a Cellulolytic Fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7. **Appl Environ Microbiol**, v. 64, n. 3, p. 890-5, Mar 1998. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16349528> >.

ODA, K. et al. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 5, p. 3448-57, May 2006. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672490> >.

OHTSUKI, T. et al. Production of large multienzyme complex by aerobic thermophilic fungus *Chaetomium* sp. nov. MS-017 grown on palm oil mill fibre. **Lett Appl Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 111-6, 2005. ISSN 0266-8254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15644109> >.

ONG, S. E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nat Chem Biol**, v. 1, n. 5, p. 252-62, Oct 2005. ISSN 1552-4450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16408053> >.

PAKULA, T. et al. The effects of drugs inhibiting protein secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Evidence for down-regulation of genes that encode secreted proteins in the stressed cells. **J Biol Chem**, v. 278, n. 45, p. 45011-20, Nov 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12941955](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12941955) >.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnol Adv**, v. 22, n. 3, p. 189-259, Jan 2004. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14665401> >.

PAPER, J. M. et al.  $\alpha$ -Fucosidases with different substrate specificities from two species of *Fusarium*. **Appl Microbiol Biotechnol**, Sep 2012. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23011349> >.

PEBERDY, J. F. Protein secretion in filamentous fungi--trying to understand a highly productive black box. **Trends Biotechnol**, v. 12, n. 2, p. 50-7, Feb 1994. ISSN 0167-7799. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7764536> >.

POLIZELI, M. L. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 67, n. 5, p. 577-91, Jun 2005. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944805> >.

PORTNOY, T. et al. The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. **BMC Genomics**, v. 12, p. 269, 2011. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21619626> >.

PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int Microbiol**, v. 5, n. 2, p. 53-63, Jun 2002. ISSN 1139-6709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12180781> >.

RABILLOUD, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. **Proteomics**, v. 2, n. 1, p. 3-10, Jan 2002. ISSN 1615-9853. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11788986](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11788986) >.

RAMPITSCH, C. et al. Phosphoproteome profile of *Fusarium graminearum* grown in vitro under nonlimiting conditions. **Proteomics**, v. 12, n. 7, p. 1002-5, Apr 2012. ISSN 1615-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22522806> >.

RAPPSILBER, J. et al. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. **Genome Res**, v. 12, n. 8, p. 1231-45, Aug 2002. ISSN 1088-9051. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176931> >.

REBOIS, R. V. et al. Combining protein complementation assays with resonance energy transfer to detect multipartner protein complexes in living cells. **Methods**, v. 45, n. 3, p. 214-8, Jul 2008. ISSN 1095-9130. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18586102> >.

REISINGER, V.; EICHACKER, L. A. How to analyze protein complexes by 2D blue native SDS-PAGE. **Proteomics**, v. 7 Suppl 1, p. 6-16, Sep 2007. ISSN 1615-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17893852> >.

REN, J. et al. Asperelins A-F, peptaibols from the marine-derived fungus *Trichoderma asperellum*. **J Nat Prod**, v. 72, n. 6, p. 1036-44, Jun 2009. ISSN 1520-6025. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19514743> >.

ROMERO-ARENAS, O. et al. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 11, n. 2, p. 143-151, 2009. Disponível em: < <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v11n2/v11n2a15.pdf> >.

RUBIO, M. B. et al. Cloning and characterization of the Thcut1 gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. **Curr Genet**, v. 54, n. 6, p. 301-12, Dec 2008. ISSN 1432-0983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18987860> >.

S., D. I.; G., K. A.; P., K. C. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. **Mycoscience**. 47: 55-64 p. 2006.

SADHASIVAM, S.; SAVITHA, S., KLIN, FENG-HUEI. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum*WL1. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 736-742, 2008. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511308000755> >.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 30, n. 5, p. 279-91, May 2003. ISSN 1367-5435. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12698321> >.

SAKAMOTO, T.; THIBAUT, J. F. Exo-arabinanase of *Penicillium chrysogenum* able to release arabinobiose from alpha-1,5-L-arabinan. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 7, p. 3319-21, Jul 2001. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425761> >.

SALLESE, M.; GIANNOTTA, M.; LUINI, A. Coordination of the secretory compartments via inter-organelle signalling. **Semin Cell Dev Biol**, v. 20, n. 7, p. 801-9, Sep 2009. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19447052> >.

SALOHEIMO, M. et al. Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* beta-glucosidase BGLII (cel1A). **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 9, p. 4546-53, Sep 2002. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200312> >.

SALOHEIMO, M.; PAKULA, T. M. The cargo and the transport system: secreted proteins and protein secretion in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). **Microbiology**, v. 158, n. Pt 1, p. 46-57, Jan 2012. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22053009> >.

SALOHEIMO, M. et al. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **Eur J Biochem**, v. 269, n. 17, p. 4202-11, Sep 2002. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12199698> >.

SAMUELS, G. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195-206, Feb 2006. ISSN 0031-949X. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18943925](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18943925) >.

SAMUELS, G. J. et al. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, v. 94, n. 1, p. 146-70, 2002 Jan-Feb 2002. ISSN 0027-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21156486> >.

SAYKHEDKAR, S. et al. A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum stover. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 52, 2012. ISSN 1754-6834. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22835028> >.

SCHMOLL, M.; KUBICEK, C. P. Regulation of *Trichoderma* cellulase formation: lessons in molecular biology from an industrial fungus. A review. **Acta Microbiol Immunol Hung**, v. 50, n. 2-3, p. 125-45, 2003. ISSN 1217-8950. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12894484> >.

SCHWARZ, W. H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 56, n. 5-6, p. 634-49, Sep 2001. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11601609> >.

SCHÄGGER, H.; CRAMER, W.; VON JAGOW, G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. **Anal Biochem**, v. 217, n. 2, p. 220-30, Mar 1994. ISSN 0003-2697. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8203750](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8203750) >.

SCULLY, E. D. et al. Proteomic analysis of *Fusarium solani* isolated from the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis*. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e32990, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22496740> >.

SEIBOTH, B.; METZ, B. Fungal arabinan and L-arabinose metabolism. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89, n. 6, p. 1665-73, Mar 2011. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21212945> >.

SEIDL, V. et al. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. **FEBS J**, v. 272, n. 22, p. 5923-39, Nov 2005. ISSN 1742-464X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16279955> >.

\_\_\_\_\_. Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. **FEBS J**, v. 273, n. 18, p. 4346-59, Sep 2006. ISSN 1742-464X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16939625> >.

\_\_\_\_\_. Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 33, p. 13909-14, Aug 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19667182> >.

SHI, Y. et al. The role of liquid chromatography in proteomics. **J Chromatogr A**, v. 1053, n. 1-2, p. 27-36, Oct 2004. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15543969> >.

SIDDIQUEE, S. et al. Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. **J Chromatogr Sci**, v. 50, n. 4, p. 358-67, Apr 2012. ISSN 1945-239X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22407347> >.

SILVA, J. C. et al. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. **Mol Cell Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 144-56, Jan 2006. ISSN 1535-9476. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16219938> >.

SIUTI, N.; KELLEHER, N. L. Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry. **Nat Methods**, v. 4, n. 10, p. 817-21, Oct 2007. ISSN 1548-7091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17901871> >.

SLÁMOVÁ, K. et al.  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase: what's in a name...? **Biotechnol Adv**, v. 28, n. 6, p. 682-93, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 1873-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20438826> >.

SOMERVILLE, C. et al. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. **Science**, v. 306, n. 5705, p. 2206-11, Dec 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15618507> >.

SOUTHALL, S. M. et al. The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. **FEBS Lett**, v. 447, n. 1, p. 58-60, Mar 1999. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10218582> >.

SPANG, A. The life cycle of a transport vesicle. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 18, p. 2781-9, Sep 2008. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18726180> >.

STALS, I. et al. Factors influencing glycosylation of *Trichoderma reesei* cellulases. I: Postsecretorial changes of the O- and N-glycosylation pattern of Cel7A. **Glycobiology**, v. 14, n. 8, p. 713-24, Aug 2004. ISSN 0959-6658. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15070858](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15070858) >.

STEINBERG, G. Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 3, p. 351-60, Mar 2007. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17259546> >.

STEYAERT, J. M. et al. Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 10, p. 2887-900, Oct 2010. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20688823> >.

STRICKER, A. et al. Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 12, p. 2128-37, Dec 2006. ISSN 1535-9778. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17056741](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17056741) >.

STRICKER, A.; STEIGER, M.; MACH, R. Xyr1 receives the lactose induction signal and regulates lactose metabolism in *Hypocrea jecorina*. **FEBS Lett**, v. 581, n. 21, p. 3915-20, Aug 2007. ISSN 0014-5793. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17662982](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17662982) >.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Crit Rev Biotechnol**, v. 22, n. 1, p. 33-64, 2002. ISSN 0738-8551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11958335> >.

SUH, M. J. et al. Development stage-specific proteomic profiling uncovers small, lineage specific proteins most abundant in the *Aspergillus fumigatus* conidial proteome. **Proteome Sci**, v. 10, n. 1, p. 30, 2012. ISSN 1477-5956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22545825> >.

SUSI, P. et al. Biological control of wood decay against fungal infection. **J Environ Manage**, v. 92, n. 7, p. 1681-9, Jul 2011. ISSN 1095-8630. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21440981> >.

SUÁREZ, M. B. et al. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. **Fungal Genet Biol**, v. 42, n. 11, p. 924-34, Nov 2005. ISSN 1087-1845. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16226906> >.

SYKA, J. E. et al. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 26, p. 9528-33, Jun 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15210983> >.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol Adv**, v. 27, n. 2, p. 185-94, 2009 Mar-Apr 2009. ISSN 1873-1899. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19100826](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19100826) >.

SÁNCHEZ-ARREGUÍN, A.; PÉREZ-MARTÍNEZ, A. S.; HERRERA-ESTRELLA, A. Proteomic analysis of *Trichoderma atroviride* reveals independent roles for transcription factors BLR-1 and BLR-2 in light and darkness. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 1, p. 30-41, Jan 2012. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22058143> >.

TABKA, M. G.; SIGOILLOT, I. H.-G. F. M. M. A. J. C. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. 39: 897-902 p. 2006.

TAO, W. A.; AEBERSOLD, R. Advances in quantitative proteomics via stable isotope tagging and mass spectrometry. **Curr Opin Biotechnol**, v. 14, n. 1, p. 110-8, Feb 2003. ISSN 0958-1669. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12566010> >.

TUNG, J. Y. et al. Crystal structures of the starch-binding domain from *Rhizopus oryzae* glucoamylase reveal a polysaccharide-binding path. **Biochem J**, v. 416, n. 1, p. 27-36, Nov 2008. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18588504> >.

VALKONEN, M. Functional studies of the secretory pathway of filamentous fungi. The effect of unfolded protein response on protein production. 2003. 114p + app. 68p Faculty of Science Department of Biosciences Division of Plant Physiology, University of Helsinki, Helsinki, Finland.

VITERBO, A. et al. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). **Curr Genet**, v. 42, n. 2, p. 114-22, Nov 2002. ISSN 0172-8083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12478390> >.

\_\_\_\_\_. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1-4, p. 549-56, Aug 2002. ISSN 0003-6072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12448750> >.

VORAGEN, A. G. J. et al. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Struct Chem**, n. 20, p. 263-275, 2009. Disponível em: < <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11224-009-9442-z> >.

WARIDEL, P. et al. Sequence similarity-driven proteomics in organisms with unknown genomes by LC-MS/MS and automated de novo sequencing. **Proteomics**, v. 7, n. 14, p. 2318-29, Jul 2007. ISSN 1615-9853. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17623296> >.

WILSON, D. B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1125, p. 289-97, Mar 2008a. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18378599> >.

\_\_\_\_\_. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1125, p. 289-97, Mar 2008b. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18378599> >.

WU, C. C.; MACCOSS, M. J. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. **Curr Opin Mol Ther**, v. 4, n. 3, p. 242-50, Jun 2002. ISSN 1464-8431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12139310> >.

YANG, H. H. et al. Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. **Mycol Res**, v. 113, n. Pt 9, p. 924-32, Sep 2009. ISSN 1469-8102. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19422913> >.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 11, p. 49-79, 2009. ISSN 1545-4274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400705> >.

YIKE, I. Fungal proteases and their pathophysiological effects. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 299-323, May 2011. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21259054> >.

ZHANG, B. et al. Secretome of *Aspergillus oryzae* in Shaoxing rice wine koji. **Int J Food Microbiol**, v. 155, n. 3, p. 113-9, Apr 2012. ISSN 1879-3460. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22341915> >.

ZHANG, J. et al. The role of acetyl xylan esterase in the solubilization of xylan and enzymatic hydrolysis of wheat straw and giant reed. **Biotechnol Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 60, 2011. ISSN 1754-6834. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22185437> >.

ZHANG, Y. H.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnol Bioeng**, v. 88, n. 7, p. 797-824, Dec 2004. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15538721> >.

ZHOU, Q. et al. Differential involvement of  $\beta$ -glucosidases from *Hypocrea jecorina* in rapid induction of cellulase genes by cellulose and cellobiose. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 11, p. 1371-81, Nov 2012. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23002106> >.

ŽIFČÁKOVÁ, L.; BALDRIAN, P. Fungal polysaccharide monooxygenases: new players in the decomposition of cellulose. **Fungal Ecology**, v. 5, n. 5, p. 481-489, 2012. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1754504812000505> >.



## 7 Anexos

### 7.1 Proteínas identificadas por proteômica *shotgun* nos secretomas de *T. harzianum* utilizando glicose, celulose, xilana e bagaço de cana como fonte de carbono

Tabela 1. Proteínas identificadas por LC-MS/MS no secretoma de *T. harzianum* crescido em meio contendo glicose como fonte de carbono

No. Acesso	Proteína/ Organismo	Celulases								
		Cob. <sup>1</sup>	Prot. <sup>2</sup>	NPU <sup>3</sup>	Pep. <sup>4</sup>	PSMs <sup>5</sup>	Score <sup>6</sup>	MW [kDa]	pI	
<b>Celobiohidrolases</b>										
G9NTY1	Glycoside hydrolase family 7 protein/H. atroviridis (CBH)	13,81	2	1	4	5	3,47	52,8	5,01	
<b>Beta glicosidases</b>										
G9NS06	Glycoside hydrolase family 3 protein /H. atroviridis (BGL)	36,07	5	4	31	214	299,18	92,9	5,72	
G9MUM1	Glycoside hydrolase family 3 protein /H. virens (BGL)	37,23	5	2	30	209	331,47	92,9	6,07	
<b>Outras celulases auxiliares</b>										
O74567	QI74 protein OS=T.a harzianum	72,02	2	2	41	94	38,39	77,9	8,05	
G9PBA9	Expansin module family protein /H. atroviridis	10,44	1	2	4	75	102,96	29,7	5,24	
<b>Glucoamilase</b>										
G9NJG0	Glucoamilase /H.atroviridis	35,89	4	6	16	81	79,10	66,7	5,72	
<b>Biosíntese da parede celular e morfogênese</b>										
G9PBE5	GPI-anchored cell wall organization protein /H. atroviridis	28,14	1	4	8	29	37,31	41,2	5,36	
G9P2J8	Glycoside hydrolase family 17 protein /H. atroviridis	4,71	1	1	2	5	7,04	50,1	4,51	
G9NI23	Glycoside hydrolase family 72 protein/H.atroviridis	15,90	1	1	7	17	6,96	56,3	4,67	
G9N0W8	Glycoside hydrolase family 72 protein/H. virens	18,77	1	1	5	8	3,31	56,2	4,46	
G9PB60	Eliciting plant response-like protein /H. atroviridis	34,78	6	2	4	112	185,53	14,5	6,49	
Q4F6W8	Spore-related hydrophobin /T. viride	46,07	1	1	2	4	12,47	9,1	4,72	
<b>Xilanases</b>										
<b>Endoxilanases</b>										
Q9UVF9	Endo-1,4-beta-xylanase /T. viride	30,94	15	2	4	16	26,50	24,2	8,76	
G9NQ12	Endo-1,4-beta-xylanase /H. atroviridis	23,11	2	1	3	11	7,17	24,0	5,77	
G9NRZ0	Glycoside hydrolase family 11 protein /H. atroviridis	21,13	2	1	4	5	5,38	29,6	6,28	

G9NXF5	Glycoside hydrolase family 10 protein /H. atroviridis	32,82	2	1	6	13	13,24	34,8	7,52
<b>Beta xilosidases</b>									
Q92458	Beta-xylosidase /H. jecorina	23,34	1	1	13	42	20,34	87,1	5,78
G9P179	Glycoside hydrolase family 3 protein /H. atroviridis (BXL)	25,31	2	3	15	46	29,28	86,7	5,81
<b>Enzimas acessórias</b>									
G9NYH4	Glycoside hydrolase family 54 protein/H. atroviridis (ABF)	35,42	1	2	7	18	33,90	53,0	5,48
G9MZ65	Glycoside hydrolase family 54 protein/H. virens (ABF)	21,37	2	1	7	13	17,37	52,6	5,59
<b>Outras hemicelulases</b>									
G9NVY5	Glycoside hydrolase family 16 protein (Fragment)/H. atroviridis	30,84	3	5	10	76	132,13	36,0	4,86
G9NZ16	Glycoside hydrolase family 2 protein/H. atroviridis	18,90	3	2	15	46	18,93	104,9	4,91
<b>Ligninases</b>									
C5H3G0	Laccase OS=Trichoderma sp.	27,46	1	2	12	81	71,39	64,9	6,83
<b>Quitinases e glicanases</b>									
<b>Glicanases</b>									
G9NKB3	Glycoside hydrolase family 55 protein /H. atroviridis	21,02	2	3	7	44	57,14	78,9	5,33
G9P136	Glycoside hydrolase family 55 protein /H. atroviridis	11,88	5	3	8	33	36,70	107,2	4,87
<b>Quitinases</b>									
G9NET4	Glycoside hydrolase family 18 protein /H. atroviridis	8,63	3	3	3	16	24,88	41,5	4,53
G9NKD3	Glycoside hydrolase family 18 protein/H. atroviridis	11,54	1	1	2	6	3,50	42,9	4,68
<b>Outras proteínas</b>									
G9P0B2	Structural maintenance of chromosomes protein /H. atroviridis	37,39	1	1	51	112	7,39	168,5	5,82
G0RK35	RasGAP protein /H. jecorina	35,39	1	1	51	94	7,47	190,9	7,83
G0RFB0	Glycoside hydrolase /H. jecorina	31,87	2	1	7	58	70,00	45,2	4,83
G9P728	Glycoside hydrolase family 65 protein /H. atroviridis	30,40	1	1	23	38	7,97	116,8	6,79
Q157R5	PLC-E /H. jecorina	21,69	3	2	8	33	20,69	69,2	5,22
G0RWS1	Lysophospholipase /H. jecorina	13,69	2	1	5	14	3,95	66,2	4,64
G9NNT5	Small GTPase Rho3 /H. atroviridis	54,29	1	1	9	13	3,25	23,2	4,78
G0RRS8	Acid phosphatase /H. jecorina	15,12	2	1	6	12	3,84	69,7	5,00
G0RAJ4	Glycoside hydrolase family 25/H. jecorina	22,81	2	1	4	23	45,48	24,2	6,37

Tabela 2. Proteínas identificadas por LC-MS/MS no secretoma de *T.harzianum* crescido em meio contendo

No. Acesso	Proteína/Organismo	Celulases					Score <sup>6</sup>	MW [kDa]	pI
		Cob. <sup>1</sup>	Prot. <sup>2</sup>	NPU <sup>3</sup>	Pep. <sup>4</sup>	PSMs <sup>5</sup>			
<b>Endoglicanases, celobiohidrolases e beta-glicosidases</b>									
Q6QNU5	Egl1 (Fragment) / <i>T. asperellum</i>	9,94	1	1	1	24	49,16	18,7	4,09
G9P6W2	Glycoside hydrolase family 3 protein / <i>H. atroviridis</i> (BGL)	42,64	3	9	29	78	68,14	84,0	5,77
G9MUU2	Glycoside hydrolase family 3 protein / <i>H. virens</i> (BGL)	23,36	1	1	14	37	1,63	86,2	6,74
G9P180	Glycoside hydrolase family 3 protein / <i>H. atroviridis</i> (BGL)	39,15	4	12	22	203	332,58	76,4	6,54
G9NFV6	Glycoside hydrolase family 6 protein / <i>H. atroviridis</i> (CBH2)	22,34	1	4	9	90	184,94	49,0	5,43
G9MUN0	Glycoside hydrolase family 6 protein / <i>H. virens</i> (CBH2)	29,51	11	1	7	16	2,00	49,4	5,64
G9NTY1	Glycoside hydrolase family 7 protein / <i>H. atroviridis</i> (CBH1)	27,61	16	5	10	201	180,82	52,8	5,01
<b>Outras proteínas auxiliares da hidrólise da celulose</b>									
G9NJG0	Glucoamylase / <i>H. atroviridis</i>	39,71	3	7	20	81	98,98	66,7	5,72
G9P135	Glucoamylase / <i>H. atroviridis</i>	16,56	1	4	9	43	51,82	68,6	5,17
B3FRA5	Swollenin / <i>T. asperellum</i>	23,64	2	2	6	24	19,45	52,2	5,11
G9PBA9	Expansin module family protein / <i>H. atroviridis</i>	13,47	1	2	5	14	23,25	29,7	5,24
Q7Z9M9	Cip1 / <i>H. jecorina</i>	15,51	1	1	3	7	7,07	32,9	5,19
G9NS04	Glycoside hydrolase family 61 protein / <i>H. atroviridis</i>	12,32	1	1	3	35	52,47	35,9	5,47
G9NE55	Glycoside hydrolase family 61 protein / <i>H. atroviridis</i>	28,69	1	4	4	55	113,38	26,8	7,75
<b>Biossíntese da parede celular e morfogênese</b>									
G9PB60	Eliciting plant response-like protein / <i>H. atroviridis</i>	34,78	6	2	4	39	77,74	14,5	6,49
G9PBE5	GPI-anchored cell wall organization protein / <i>H. atroviridis</i>	20,85	1	4	7	37	45,10	41,2	5,36
G0RDC0	Cell wall protein / <i>H. jecorina</i>	31,88	2	1	10	14	5,38	45,5	5,43
Q4F6W8	Spore-related hydrophobin / <i>T. viride</i>	52,81	1	1	2	5	19,39	9,1	4,72
G9P387	Hydrophobin / <i>H. atroviridis</i>	33,67	1	1	2	5	1,67	10,0	4,82
O74567	QI74 protein / <i>T. harzianum</i>	39,77	2	1	23	33	1,89	77,9	8,05
G9MZ09	Glycoside hydrolase family 17 protein / <i>H. virens</i>	26,86	2	2	7	15	6,49	51,6	4,48

G9P2J8	Glycoside hydrolase family 17 protein /H. atroviridis	8,24	1	1	3	8	14,11	50,1	4,51
G9NNS5	Glycoside hydrolase family 17 protein /H. atroviridis	37,07	2	7	9	34	42,04	42,6	5,39
G9NSK7	Glycoside hydrolase family 72 protein (Fragment) /H. atroviridis	30,26	1	1	9	15	10,96	42,8	4,72
G9P756	Glycoside hydrolase family 72 protein /H. atroviridis	43,60	2	4	14	28	25,04	52,3	4,89
G9PBD3	Glycoside hydrolase family 72 protein /H. atroviridis	39,74	2	4	15	45	29,28	48,3	5,31
G0RQW0	Glycoside hydrolase family 72 /H. jecorina	37,41	1	1	9	18	5,58	57,3	4,89
G9NIE1	Glycoside hydrolase family 72 protein /H. atroviridis	29,23	1	4	11	27	43,21	57,3	4,89
G9NKM4	Carbohydrate-binding module family 13 protein /H. atroviridis	17,20	1	1	11	23	2,66	91,3	5,34
G9NUY8	Carbohydrate-binding module family 13 protein/H. atroviridis	20,13	3	2	3	9	11,72	16,7	6,79

### Xilanases

#### Endoxilanases

D2XV89	Endo-1,4-beta-xylanase /Trichoderma sp.	29,73	13	1	4	301	554,81	24,1	7,47
Q6QNU8	Endo-1,4-beta-xylanase (Fragment) /T. asperillum	79,10	1	1	3	204	473,60	7,6	5,02
Q7Z8Q3	Endo-1,4-beta-xylanase /T. viride	32,29	11	1	4	389	691,20	24,2	7,47
G9NXF5	Glycoside hydrolase family 10 protein /H. atroviridis	54,80	1	5	14	261	424,98	34,8	7,52
G9NBD2	Glycoside hydrolase family 10 protein /H.virens	27,86	1	1	6	140	276,17	35,0	7,87
G9NRZ0	Glycoside hydrolase family 11 protein /H. atroviridis	19,01	1	3	3	12	26,30	29,6	6,28
G9NZ09	Glycoside hydrolase family 74 protein /H. atroviridis (XLN)	18,59	3	2	10	19	9,33	87,5	5,38

#### Beta xilosidases

Q92458	Beta-xylosidase /H. jecorina	32,37	1	1	20	105	97,28	87,1	5,78
G9P179	Glycoside hydrolase family 3 protein /H. atroviridis (BXL)	49,12	2	8	27	144	176,81	86,7	5,81
G9PBA1	Glycoside hydrolase family 43 protein /H. atroviridis	21,41	1	1	10	25	5,02	53,7	4,94
G9P412	Glycoside hydrolase family 43 protein /H. atroviridis	17,80	1	1	4	6	2,26	36,9	5,58

#### Enzimas acessórias

G9N0G0	Carbohydrate esterase family 1 protein /H. virens(AFE)	32,56	1	2	8	23	3,69	36,2	7,71
G9NU00	Carbohydrate esterase family 3 protein /H. atroviridis (AXE)	47,03	1	1	22	29	3,40	87,8	5,16
G9NPZ7	Carbohydrate esterase family 5 protein/H. atroviridis (AXE)	19,25	7	2	2	27	46,17	24,5	6,64
G9NPZ7	Carbohydrate esterase family 5 protein/H. atroviridis (AXE)	19,25	7	2	2	27	46,17	24,5	6,64
G9P6M2	Carbohydrate esterase family 5 protein /H.atroviridis (AXE)	3,04	1	1	1	7	3,28	29,5	5,96
G9NJW6	Carbohydrate esterase family 5 protein /H. atroviridis (AXE)	24,01	3	1	5	10	2,21	30,5	5,35

G9PBZ9	Carbohydrate esterase family 15 protein /H. atroviridis	19,04	1	2	5	11	13,53	47,8	7,31
G9NYH4	Glycoside hydrolase family 54 protein /H. atroviridis	62,82	3	5	13	31	42,01	53,0	5,48
G9NNW8	Glycoside hydrolase family 54 protein/H. atroviridis	20,75	1	5	6	25	33,52	52,1	6,02
G9NUB8	Glycoside hydrolase family 62 protein /H. atroviridis	4,71	1	1	2	9	11,26	40,3	5,30
G9P212	Glycoside hydrolase family 62 protein /H. atroviridis	28,92	3	4	6	56	104,46	34,8	7,49
G9NF15	Glycoside hydrolase family 67 protein /H. atroviridis	39,60	2	5	23	41	20,44	93,2	6,11
G9NKQ7	Glycoside hydrolase family 93 protein/H. atroviridis	20,73	1	1	8	19	9,07	41,9	6,27
G9NFR0	Glycoside hydrolase family 93 protein /H. atroviridis	35,08	1	1	8	14	1,90	38,5	5,12

#### Outras hemicelulases

##### Glicosil hidrolases

G9MY30	Glycoside hydrolase family 5 protein/H. virens	40,43	2	1	17	49	45,93	52,0	5,49
G9NTZ4	Glycoside hydrolase family 5 protein /H. atroviridis	38,92	1	1	16	44	47,49	51,9	5,92
G9NWX8	Glycoside hydrolase family 5 protein (Fragment) /H. atroviridis	6,62	2	1	2	16	12,02	46,6	5,15
G9NPV0	Glycoside hydrolase family 5 protein /H. atroviridis	35,79	2	1	9	25	2,21	47,3	4,68
G9NWX8	Glycoside hydrolase family 5 protein /H. atroviridis	13,74	2	2	3	22	28,62	44,4	4,86
G9MMQ0	Glycoside hydrolase family 5 protein/H. virens	16,93	2	1	4	30	24,42	47,7	6,04
G9NPW5	Glycoside hydrolase family 5 protein /H. atroviridis	15,93	1	1	4	10	7,05	47,0	5,12
G9NNL4	Glycoside hydrolase family 12 protein /H. atroviridis	4,29	2	1	1	20	23,19	25,1	7,11
G9NN07	Glycoside hydrolase family 16 protein /H. atroviridis	31,75	3	7	11	96	130,07	40,6	5,16
G9NV80	Glycoside hydrolase family 16 protein /H. atroviridis	22,46	1	1	4	24	21,33	30,2	4,98
G9NRQ3	Glycoside hydrolase family 16 protein /H. atroviridis	24,53	2	1	8	19	14,34	49,0	4,86
G9NVY5	Glycoside hydrolase family 16 protein (Fragment) /H. atroviridis	33,23	1	2	8	22	11,96	36,0	4,86
G9NGV2	Glycoside hydrolase family 27 protein/H. atroviridis	42,01	1	1	10	16	6,68	47,2	5,41
G9NI50	Glycoside hydrolase family 30 protein /H. atroviridis	24,79	1	1	10	32	5,29	51,5	6,35

##### Mananases

G9PB96	Glycoside hydrolase family 76 protein /H. atroviridis	27,99	1	1	9	30	4,78	47,3	5,19
G9MSS0	Glycoside hydrolase family 76 protein /H. virens	21,22	3	1	5	12	2,30	43,9	5,80
G9NZ16	Glycoside hydrolase family 2 protein /H. atroviridis (MAN)	28,45	3	3	16	39	11,63	104,9	4,91
G9NI96	Glycoside hydrolase family 2 protein /H. atroviridis (MAN)	33,40	1	1	21	43	1,72	104,7	6,07
G9NPC7	Beta-galactosidase /H. atroviridis	24,31	3	4	16	35	34,05	111,1	5,92

G9P5N3	Glycoside hydrolase family 47 protein /H. atroviridis	23,20	1	5	8	29	57,42	56,1	5,05
G9NK86	Glycoside hydrolase family 92 protein /H. atroviridis	26,05	3	7	18	56	58,83	88,8	5,40
G9P297	Glycoside hydrolase family 92 protein/H. atroviridis	45,06	1	2	24	51	26,12	86,3	6,07
G9NZE2	Glycoside hydrolase family 92 protein /H. atroviridis	29,48	3	6	20	38	31,62	88,9	5,49
G9MZ53	Glycoside hydrolase family 92 protein /H. virens	32,91	1	1	15	24	10,59	85,5	6,76

#### Pectinases

G9NQQ1	Glycoside hydrolase family 28 protein /H.atroviridis	25,60	3	5	9	50	64,96	50,1	5,22
--------	--	-------	---	---	---	----	-------	------	------

#### Quitinases e Glicanases

##### Quitinases

Q12735	Chitinase /T. harzianum	43,87	190	1	13	195	237,49	46,3	5,31
O43111	Endochitinase/T. hamatum	53,77	30	0	12	139	208,33	46,1	5,67
Q9UV49	42 kDa endochitinase (Fragment) /T. koningii	59,14	18	1	13	138	155,96	46,1	5,22
Q4JQJ0	Endochitinase (Fragment)/H. atroviridis	52,49	93	0	14	137	167,70	45,9	5,30
I3NN23	Endochitinase /T. asperellum	39,39	97	0	11	123	161,43	46,2	5,40
D9MWV9	Endochitinase 42 (Fragment) /Trichoderma sp.	36,24	4	2	7	78	130,76	31,1	5,24
D6N0Y7	Chitinase chi18-15 (Fragment) /T. viride	35,40	5	1	5	15	8,68	34,1	4,65
G9NJ64	Glycoside hydrolase family 18 protein /H. atroviridis	12,58	1	2	4	15	23,81	29,7	4,61
G9P630	Glycoside hydrolase family 18 protein/H. atroviridis	22,42	1	3	10	15	10,07	56,0	4,93
G9NJ64	Glycoside hydrolase family 18 protein /H. atroviridis	12,58	1	2	4	15	23,81	29,7	4,61
G9P630	Glycoside hydrolase family 18 protein /H. atroviridis	22,42	1	3	10	15	10,07	56,0	4,93
G9NJK8	Glycoside hydrolase family 18 protein /H. atroviridis	26,40	6	4	6	29	44,05	34,1	4,94
G9NET4	Glycoside hydrolase family 18 protein /H. atroviridis	9,90	3	3	4	27	51,07	41,5	4,53
G9P606	Glycoside hydrolase family 18 protein /H. atroviridis	50,13	3	2	16	32	8,38	40,6	5,05

##### N-acetilglucosaminidases

P87258	N-acetyl-beta-D-glucosaminidase /T. harzianum	45,17	11	3	27	94	93,16	64,5	5,94
Q8NIN7	Hexosaminidase/T. harzianum	54,83	8	1	25	82	61,75	64,5	5,91
G9P602	Glycoside hydrolase family 2 protein/H. atroviridis(GLcNase)	25,84	1	2	21	41	6,94	98,4	5,73
G9MZV2	Glycoside hydrolase family 2 protein/H. virens(GLcNase)	38,43	3	1	22	36	6,89	98,7	6,23
Q0ZLH7	N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (Fragment) /H. atroviridis	22,86	4	2	11	29	12,01	63,8	5,50

##### Glicanases

G9MX73	Glycoside hydrolase family 64 protein /H. virens	59,37	1	1	16	32	1,81	39,8	5,38
G9NEC2	Glycoside hydrolase family 64 protein/H. atroviridis	48,28	1	6	14	40	48,12	39,4	5,44
G9NTC3	Glycoside hydrolase family 64 protein /H. atroviridis	17,86	1	1	5	15	5,15	46,4	5,82
G9P3C0	Glycoside hydrolase family 71 protein /H. atroviridis	27,40	3	3	8	20	20,98	46,6	5,45
G9P136	Glycoside hydrolase family 55 protein /H. atroviridis	15,00	5	1	9	21	8,98	107,2	4,87
G9P6P8	Glycoside hydrolase family 55 protein /H. atroviridis	26,53	2	1	15	40	6,65	81,8	5,86

#### Outras proteínas

Q56PC8	Non-ribosomal peptide synthetase (Fragment)/H. virens	36,13	2	1	100	177	2,91	451,3	6,02
A9Q1E6	Non ribosomal peptide synthase /H. virens	30,96	2	1	51	94	3,32	226,6	5,91
G0RRY3	Oligomeric Golgi complex component /H. jecorina	47,46	1	1	34	78	2,25	90,3	5,64
G0RCE3	DNA polymerase/H. jecorina	36,61	1	1	27	68	4,65	83,3	7,58
G9P071	Glycosyltransferase family 69 protein /H. atroviridis	43,04	1	1	25	62	6,23	62,1	9,20
G0RKZ4	Glycosyltransferase family 4 /H.jecorina (strain QM6a)	38,28	3	1	15	34	2,16	56,2	7,87
G9MI10	Disulfide isomerase PDI1 protein /H. virens	56,02	2	1	26	60	21,87	54,6	4,83
Q99023	Actin /H.jecorina	63,30	54	1	21	56	2,33	41,7	5,68
G9NLF0	Alkaline phosphatase /H. atroviridis	50,18	2	5	22	52	19,16	60,0	5,99
G0RTL4	Glycine decarboxylase-like protein /H. jecorina	30,94	1	1	24	52	5,52	107,0	7,21
G9NJC1	60 kDa chaperonin /H. atroviridis	48,37	3	1	23	50	4,31	61,3	5,62
G9N786	ATP synthase subunit alpha /H. virens	42,65	3	1	22	47	1,84	59,5	9,10
G9NP88	ATP synthase subunit beta /H. atroviridis	54,28	3	6	22	44	29,32	54,9	5,69
G9NVC6	Catalase /H. atroviridis	48,68	1	1	17	43	1,91	55,6	7,42
G9P4S7	Serine/threonine-protein phosphatase /H. atroviridis	49,51	3	1	11	40	1,64	35,7	5,48
G9NNI9	Adenosylhomocysteinase /H. atroviridis	51,00	2	3	17	39	42,81	48,5	6,04
B3VTV5	Vacuolar protease A /T. aureoviride	65,06	4	5	15	37	43,09	42,3	5,03
G9P751	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase/H. atroviridis	40,34	3	4	25	36	13,81	85,6	6,57
G9NHJ7	Enolase /H. atroviridis	46,35	3	1	16	34	2,06	47,3	5,17
P34825	Elongation factor 1-alpha /H. jecorina	53,48	182	2	18	33	32,95	49,8	9,10
G9P304	Elongation factor 1-alpha /H. atroviridis	50,68	92	1	17	33	25,30	48,0	8,90
G9NPH3	Transaldolase /H. atroviridis	51,23	3	3	17	32	11,45	35,6	6,10

G9NYI6	Histone H2B /H. atroviridis	67,15	3	2	10	32	4,11	14,8	10,13
G9P2G8	Sterol 24-C-methyltransferase /H. atroviridis	61,38	1	1	17	32	2,16	41,9	6,34
G9N286	60S ribosomal protein L20 (Fragment) /H. virens	80,46	3	1	19	32	2,07	20,4	10,27
G0RIF9	N-terminal binuclear Zn cluster-containing/DNA binding domain-containing protein (Fragment) /H. jecorina	18,69	1	1	12	26	2,11	78,7	7,12
G9N875	Adenosylhomocysteinase /H. virens (strain Gv29-8 / FGSC 10586)	41,87	1	1	17	26	16,80	48,8	6,02
G9PA61	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase /H. atroviridis	65,79	3	3	13	25	10,09	25,1	9,39
G0R756	ER-resident thioredoxin protein/H. jecorina	38,86	3	1	16	24	1,89	40,2	5,87
G0R803	RNA polymerase III transcription initiation factor complex component/H. jecorina	48,64	3	1	10	24	3,44	32,4	5,78
G0RJQ4	40s ribosomal protein S19e /H. jecorina	59,33	3	1	9	24	1,63	16,6	8,94
Q5GQ79	Mutanase /T. asperellum	32,28	7	3	12	20	7,69	67,6	5,40
G9NDR1	Regulatory protein calmodulin/H. virens	59,06	2	4	12	20	16,13	17,0	4,27
G0RNB9	Ceramidase family protein /H. jecorina	21,85	2	2	11	20	13,03	78,3	5,17
G9MQA8	Histone H2A /H. virens (strain Gv29-8 / FGSC 10586)	48,15	5	1	6	18	3,67	14,2	10,55
G0RKS8	Zinc-binding dehydrogenase (Fragment) /H. jecorina	32,68	1	1	6	17	2,98	37,7	6,35
G0RQF9	Histone H4 /H. jecorina (strain QM6a)	61,17	1	1	8	14	3,87	11,3	11,36
G0RV93	4-O-methyl-glucuronoyl methylesterase /H. jecorina	21,52	2	2	8	13	10,78	48,3	7,31
G9NWE8	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase/H. atroviridis	30,39	1	1	4	12	4,47	21,1	6,19
G0RCQ5	60S ribosomal protein L11, L5 family/H. jecorina	47,98	3	1	7	12	2,74	20,0	10,33
G9NVZ8	Outer mitochondrial membrane protein porin /H. atroviridis	41,34	3	1	7	11	1,75	29,9	8,84
G9N428	Proteasome subunit alpha type O/H.virens	42,60	3	1	8	11	1,72	30,1	5,55
G9NPH1	Superoxide dismutase [Cu-Zn] /H. atroviridis	37,01	3	3	5	9	13,30	15,9	6,00
G9P728	Glycoside hydrolase family 65 protein /H. atroviridis	25,12	3	4	20	36	16,33	116,8	6,79
G9ML11	Molecular chaperone bip1 /H. virens	49,62	3	1	23	35	3,78	72,4	5,00
G9NNK6	Glycoside hydrolase family 37 protein /H. atroviridis	21,93	1	2	12	23	3,92	75,9	7,18
G0RAJ4	Glycoside hydrolase family 25 /H. jecorina	22,81	2	1	5	26	16,31	24,2	6,37



Tabela 3. Proteínas identificadas LC-MS/MS no secretoma de *T.harzianum* crescido em meio contendo xilana como fonte de carbono

No. Acesso	Proteína/Organismo	Celulases							
		cob. <sup>1</sup>	Prot. <sup>2</sup>	NPU <sup>3</sup>	Pep. <sup>4</sup>	PSMs <sup>5</sup>	Score <sup>6</sup>	MW [kDa]	pI
<b>Endoglucanases e celobiohidrolases</b>									
G9NFV6	Glycoside hydrolase family 6 protein /H. atroviridis (CBH)	17,66	1	1	7	19	1,91	49,0	5,43
G9NTY1	Glycoside hydrolase family 7 protein /H. atroviridis (CBH)	23,67	16	2	11	17	11,77	52,8	5,01
<b>Outras enzimas auxiliares da hidrólise da celulose</b>									
G9NS04	Glycoside hydrolase family 61 protein/H. atroviridis	12,32	1	1	3	8	2,63	35,9	5,47
O74567	QI74 protein /T. harzianum	69,46	1	1	42	74	2,54	77,9	8,05
G9NJG0	Glucoamylase /H.atroviridis	37,96	2	6	19	57	79,71	66,7	5,72
G9PBA9	Expansin module family protein /H.atroviridis	10,44	1	2	4	47	98,02	29,7	5,24
G9PB60	Eliciting plant response-like protein /H. atroviridis	28,99	6	2	3	141	185,23	14,5	6,49
G9NKM4	Carbohydrate-binding module family 13 protein /H. atroviridis	20,73	1	1	11	25	2,31	91,3	5,34
G9NUY8	Carbohydrate-binding module family 13 protein /H.atroviridis	11,69	1	1	2	6	9,36	16,7	6,79
<b>Biossíntese da parede celular e morfogênese</b>									
G9NNS5	Glycoside hydrolase family 17 protein /H. atroviridis	37,32	1	1	10	24	23,00	42,6	5,39
G9MZ09	Glycoside hydrolase family 17 protein /H. virens	15,69	2	1	6	16	14,72	51,6	4,48
G9P2J8	Glycoside hydrolase family 17 protein /H.atroviridis	9,61	2	1	5	27	50,50	50,1	4,51
G9N8G8	Glycoside hydrolase family 17 protein /H. virens	21,41	2	1	8	24	25,24	42,6	5,38
G0RJJ2	Glycoside hydrolase family 72 /H. jecorina	37,24	2	1	12	19	1,73	52,1	5,03
G0RQW0	Glycoside hydrolase family 72 /H.jecorina	37,22	1	1	14	32	11,35	57,3	4,89
G9PBD3	Glycoside hydrolase family 72 protein /H.atroviridis	33,62	2	2	16	65	6,28	48,3	5,31
G9NI23	Glycoside hydrolase family 72 protein /H. atroviridis	19,54	1	1	10	44	10,21	56,3	4,67
G9NIE1	Glycoside hydrolase family 72 protein /H. atroviridis	15,44	1	5	11	100	142,79	57,3	4,89
Q4F6W8	Spore-related hydrophobin /T. viride	20,22	1	1	1	5	22,76	9,1	4,72
G9PBE5	GPI-anchored cell wall organization protein /H. atroviridis	18,34	1	4	7	68	120,78	41,2	5,36
<b>Xilanases</b>									
<b>Endoxilanases</b>									
G9NE77	Endo-1,4-beta-xylanase /H. atroviridis	43,91	1	2	6	135	116,55	24,5	5,40
Q9UVF9	Endo-1,4-beta-xylanase /T. viride	24,22	14	1	5	11	13,97	24,2	8,76
G9NQ12	Endo-1,4-beta-xylanase /H. atroviridis	24,00	3	1	4	135	107,66	24,0	5,77

G9NXF5	Glycoside hydrolase family 10 protein /H. atroviridis	61,30	1	3	16	59	90,88	34,8	7,52
G9NBD2	Glycoside hydrolase family 10 protein/H. virens	48,61	1	1	13	24	34,51	35,0	7,87
G9NRZ0	Glycoside hydrolase family 11 protein /H. atroviridis	36,27	2	4	6	64	111,25	29,6	6,28
<b>Beta xilosidases</b>									
Q92458	Beta-xylosidase /H. jecorina	45,29	1	1	34	389	601,78	87,1	5,78
<b>Enzimas acessórias</b>									
Q7Z9M3	Axe2 /H. jecorina	41,81	3	1	6	15	4,00	30,5	4,73
G9NPZ7	Carbohydrate esterase family 5 protein /H. atroviridis	32,22	7	2	3	27	46,60	24,5	6,64
G9P6M2	Carbohydrate esterase family 5 protein /H. atroviridis	3,04	1	1	1	21	7,16	29,5	5,96
Q99024	Alpha-glucuronidase /H. jecorina	43,80	1	1	27	44	4,76	93,4	6,90
G9NYH4	Glycoside hydrolase family 54 protein /H. atroviridis	52,84	1	7	11	205	492,86	53,0	5,48
G9NNW8	Glycoside hydrolase family 54 protein /H. atroviridis	35,77	1	7	12	95	130,06	52,1	6,02
G9P212	Glycoside hydrolase family 62 protein /H. atroviridis	28,92	3	3	5	27	42,11	34,8	7,49
G9NUB8	Glycoside hydrolase family 62 protein /H. atroviridis	4,19	1	1	2	6	5,10	40,3	5,30
G9NF15	Glycoside hydrolase family 67 protein /H. atroviridis	45,39	2	7	36	87	50,12	93,2	6,11
G9NKQ7	Glycoside hydrolase family 93 protein /H. atroviridis	42,78	1	4	11	41	33,98	41,9	6,27
G9NFR0	Glycoside hydrolase family 93 protein /H. atroviridis	31,22	1	1	9	18	1,77	38,5	5,12
<b>Outras hemicelulases</b>									
<b>Glicosil hidrolases</b>									
G9NRV4	Glycoside hydrolase family 3 protein /H. atroviridis	23,70	2	2	14	24	13,88	91,8	4,92
G9MSH8	Glycoside hydrolase family 3 protein /H. virens	22,61	2	1	13	21	1,72	78,2	7,23
G9P179	Glycoside hydrolase family 3 protein/H. atroviridis	56,80	2	17	42	697	1298,87	86,7	5,81
G9N9E3	Glycoside hydrolase family 3 protein /H. virens	49,10	2	1	33	147	92,64	83,7	5,47
G9NS06	Glycoside hydrolase family 3 protein /H. atroviridis	40,35	1	2	29	97	153,33	92,9	5,72
G9P291	Glycoside hydrolase family 3 protein /H. atroviridis	32,73	2	3	16	36	19,02	83,8	5,15
G9P6W2	Glycoside hydrolase family 3 protein /H. atroviridis	38,54	2	7	36	178	166,73	84,0	5,77
G9MUM1	Glycoside hydrolase family 3 protein /H. virens	30,52	1	3	24	92	162,83	92,9	6,07
G9NTZ4	Glycoside hydrolase family 5 protein /H. atroviridis	62,37	1	4	26	89	72,56	51,9	5,92
G9MY30	Glycoside hydrolase family 5 protein /H. virens	55,05	2	2	24	76	70,02	52,0	5,49
G9NNL4	Glycoside hydrolase family 12 protein /H. atroviridis	4,29	2	1	1	3	6,82	25,1	7,11
G9NN07	Glycoside hydrolase family 16 protein /H. atroviridis	43,75	3	7	14	99	157,41	40,6	5,16
G9NVY5	Glycoside hydrolase family 16 protein (Fragment) /H. atroviridis	27,25	3	5	7	69	113,39	36,0	4,86
G9NV80	Glycoside hydrolase family 16 protein /H. atroviridis	27,02	1	1	5	50	18,72	30,2	4,98
G9NRQ3	Glycoside hydrolase family 16 protein/H. atroviridis	32,49	2	2	8	30	32,32	49,0	4,86
G0RU13	Glycoside hydrolase family 16 /H. jecorina	20,21	1	1	6	9	2,19	30,9	5,49

G9N115	Glycoside hydrolase family 27 protein (Fragment) /H. virens	19,14	1	1	6	6	3,16	48,0	4,67	
G9NGV2	Glycoside hydrolase family 27 protein /Hypocrea. atroviridis	37,21	4	5	11	52	85,22	47,2	5,41	
G9NRI8	Glycoside hydrolase family 30 protein/H. atroviridis	16,29	1	1	6	26	11,81	52,0	4,63	
G9NQNO	Glycoside hydrolase family 39 protein/H. atroviridis	41,38	1	4	15	40	33,18	48,6	6,70	
G9P0X1	Glycoside hydrolase family 39 protein /H. atroviridis	14,19	1	1	4	9	4,54	48,3	4,73	
<b>Mananases</b>										
G9MSS0	Glycoside hydrolase family 76 protein H. virens	23,66	3	1	8	20	8,87	43,9	5,80	
G9NZ16	Glycoside hydrolase family 2 protein /H. atroviridis (MAN)	19,85	1	1	14	31	7,97	104,9	4,91	
G9P368	Glycoside hydrolase family 2 protein /H.atroviridis	19,84	3	2	10	34	16,51	67,8	6,19	
G9NI96	Glycoside hydrolase family 2 protein /H. atroviridis (MAN)	30,53	2	4	21	58	32,73	104,7	6,07	
G9P5N3	Glycoside hydrolase family 47 protein /H.atroviridis	28,07	1	5	8	34	66,87	56,1	5,05	
G9NK86	Glycoside hydrolase family 92 protein /H.atroviridis	40,32	3	4	27	93	64,31	88,8	5,40	
G9NZE2	Glycoside hydrolase family 92 protein/H.atroviridis	35,87	2	6	30	73	36,19	88,9	5,49	
G9P297	Glycoside hydrolase family 92 protein /H. atroviridis	32,41	2	4	19	55	29,12	86,3	6,07	
G9P5G2	Isoamyl alcohol oxidase /H.atroviridis	16,90	2	3	6	21	36,70	60,4	5,91	
G9NPC7	Beta-galactosidase /H. atroviridis	13,82	3	2	10	14	5,25	111,1	5,92	
<b>Fucosidases</b>										
G9NTF2	Glycoside hydrolase family 95 protein /H. atroviridis	42,50	2	5	29	65	13,46	86,3	5,71	
G9MVW6	Glycoside hydrolase family 95 protein/H. virens	41,44	1	2	24	62	31,60	84,8	7,61	
G9NI38	Glycoside hydrolase family 95 protein/H. atroviridis	31,47	3	3	17	24	6,75	86,2	5,40	
G9NLB0	Glycoside hydrolase family 95 protein/H.atroviridis	29,49	1	7	19	70	97,82	84,9	6,42	
<b>Pectinases</b>										
G9NE75	Glycoside hydrolase family 28 protein /H.atroviridis	25,26	4	2	7	11	19,80	38,3	5,24	
G9NQQ1	Glycoside hydrolase family 28 protein /H.atroviridis	21,23	3	3	8	26	16,92	50,1	5,22	
G9PB37	Pectinesterase /H. atroviridis	38,41	1	2	6	12	13,80	34,3	6,90	
G9NKB9	Polysaccharide lyase family 7 protein /H. atroviridis	32,13	3	2	6	17	15,70	25,9	6,05	
G9MMP9	Pectinesterase /H. virens	17,07	1	1	4	9	9,89	34,5	6,90	
<b>Quitinases e glicanases</b>										
<b>Quitinases</b>										
I3NN23	Endochitinase /T. asperellum	42,45	50	2	15	46	32,09	46,2	5,40	
D9MWV9	Endochitinase 42 (Fragment) /Trichoderma sp.	41,46	22	1	9	28	19,75	31,1	5,24	
D6N0Y7	Chitinase chi18-15 (Fragment) /T. viride	40,68	5	1	5	35	22,16	34,1	4,65	
D6N0Y3	Chitinase chi18-13 (Fragment)/Trichoderma sp.	19,40	1	1	4	12	14,09	41,3	4,88	
G9NJ64	Glycoside hydrolase family 18 protein /H. atroviridis	37,10	3	3	9	37	56,71	29,7	4,61	
G9NQ98	Glycoside hydrolase family 18 protein /H. atroviridis	21,17	1	1	6	11	5,59	42,0	4,98	

G9NET4	Glycoside hydrolase family 18 protein /H. atroviridis	9,90	3	3	4	44	73,32	41,5	4,53
G9NET4	Glycoside hydrolase family 18 protein /H. atroviridis	9,90	3	3	4	44	73,32	41,5	4,53
G9NE26	Glycoside hydrolase family 18 protein /H. atroviridis	9,45	1	1	3	9	11,60	34,4	4,34
G9NP23	Glycoside hydrolase family 18 protein /H.atroviridis	4,59	1	1	1	4	12,64	41,6	4,21
<b>N-acetilglucosaminidasas</b>									
Q6IYG0	N-acetyl-beta-D-glucosaminidase /H. atroviridis	56,38	10	6	28	171	195,62	64,5	5,94
Q0ZLH7	N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (Fragment) /H. atroviridis	42,06	2	2	22	53	35,36	63,8	5,50
Q0ZLH7	N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (Fragment) /H. atroviridis	42,06	2	2	22	53	35,36	63,8	5,50
G9P602	Glycoside hydrolase family 2 protein /H.atroviridis (GLcNase)	34,72	1	5	29	65	37,11	98,4	5,73
G9MZV2	Glycoside hydrolase family 2 protein /H. virens (GLCNase)	33,03	3	1	24	57	6,17	98,7	6,23
G9NEC2	Glycoside hydrolase family 64 protein /H.atroviridis	51,19	2	6	15	94	102,45	39,4	5,44
Q8NIN7	Hexosaminidase /T. harzianum	41,03	1	1	21	130	128,05	64,5	5,91
Q8NIN6	Hexosaminidase /T. harzianum	32,51	2	1	17	35	28,95	67,7	5,47
<b>Glicanasas</b>									
G9NKB3	Glycoside hydrolase family 55 protein /H. atroviridis	16,43	2	3	7	17	13,55	78,9	5,33
G9P6P8	Glycoside hydrolase family 55 protein /H. atroviridis	22,24	3	1	15	37	4,11	81,8	5,86
G9MX73	Glycoside hydrolase family 64 protein /H.virens	39,84	2	1	12	37	21,62	39,8	5,38
G9NTC3	Glycoside hydrolase family 64 protein /H. atroviridis	22,32	1	1	4	17	10,80	46,4	5,82
G9NRY6	Glycoside hydrolase family 71 protein /H. atroviridis	28,55	3	1	13	16	2,15	67,4	5,49
G9PAW8	Glycoside hydrolase family 71 protein /H. atroviridis	17,62	1	1	9	33	5,62	62,5	5,02
<b>Outras proteínas</b>									
G9N514	Serine/threonine kinase IRE1 /H. virens	52,88	2	1	43	123	23,11	137,7	6,01
G0RNP4	Histidine kinase /H. jecorina	49,33	1	1	52	105	6,06	149,9	5,17
G0RWF6	Epsin-like clathrin-binding protein (Fragment) /H. jecorina	46,26	1	1	21	40	1,71	58,6	6,09
G0RGK1	DNA polymerase /H. jecorina (strain QM6a)	43,23	1	1	58	96	3,30	181,9	7,30
G0RLE4	Holo-[acyl-carrier-protein] synthase 2 /H. jecorina	42,58	1	1	66	126	3,37	204,0	6,40
G9N616	Calcium P-type ATPase /H. virens	36,84	1	1	43	82	6,08	150,7	5,68
G0RTL4	Glycine decarboxylase-like protein /H. jecorina	31,76	1	1	21	31	3,92	107,0	7,21
G0RNB9	Ceramidase family protein /H. jecorina	28,77	3	2	17	26	7,76	78,3	5,17
G9NSW2	Ca <sup>2+</sup> transporter /H. atroviridis	20,09	1	1	16	51	2,20	119,3	6,25
G0RF14	Oxalate decarboxylase (Fragment) /H. jecorina	19,14	2	1	5	11	1,85	48,2	4,87
Q64ID0	Aspartyl protease /T.asperillum	15,80	2	1	5	19	9,88	42,4	5,62
G0RRS8	Acid phosphatase /H.jecorina	11,88	2	1	6	12	1,82	69,7	5,00
G9P728	Glycoside hydrolase family 65 protein /H. atroviridis	32,25	3	6	33	95	77,72	116,8	6,79
G0RAJ4	Glycoside hydrolase family 25 /H. jecorina	29,39	2	2	6	34	67,18	24,2	6,37

Tabela 4. Proteínas identificadas por LC-MS/MS no secretoma de *T.harzianum* crescido em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono

No. Acesso	Proteína/Organismo	Celulases						MW [kDa]	pI
		cob. <sup>1</sup>	Prot. <sup>2</sup>	NPU <sup>3</sup>	Pep. <sup>4</sup>	PSMs <sup>5</sup>	Score <sup>6</sup>		
<b>Endoglicanases e celobiohidrolases</b>									
Q8NJY4	Endoglucanase / <i>T. viride</i>	26,61	2	1	3	11	18,21	24,9	5,96
G9NFV6	Glycoside hydrolase family 6 protein / <i>H. atroviridis</i> (CBH)	21,49	1	5	9	80	163,64	49,0	5,43
G9NTY1	Glycoside hydrolase family 7 protein / <i>H. atroviridis</i> (CBH)	37,87	16	5	13	127	164,42	52,8	5,01
Q6QNU5	Egl1 (Fragment) / <i>T. asperellum</i>	9,94	1	1	1	12	17,72	18,7	4,09
<b>Outras enzimas auxiliares da hidrolise da celulose</b>									
G9NS04	Glycoside hydrolase family 61 protein/ <i>H. atroviridis</i>	12,32	1	1	3	33	71,83	35,9	5,47
G9NE55	Glycoside hydrolase family 61 protein / <i>H. atroviridis</i>	31,08	1	4	5	63	130,52	26,8	7,75
G9NJG0	Glucoamylase/ <i>H. atroviridis</i>	32,70	1	3	16	40	36,22	66,7	5,72
B3FRA5	Swollenin / <i>T. asperellum</i>	25,45	3	2	8	18	19,83	52,2	5,11
G9PBA9	Expansin module family protein / <i>H. atroviridis</i>	14,81	1	1	3	18	20,95	29,7	5,24
G9MY29	Expansin-like protein / <i>H. virens</i>	14,66	2	1	5	13	18,04	51,4	5,60
Q7Z9M9	Cip1 / <i>H. jecorina</i>	14,24	1	1	2	5	13,74	32,9	5,19
<b>Biossíntese da prede celular e morfogênese</b>									
G9P2J8	Glycoside hydrolase family 17 protein / <i>H. atroviridis</i>	10,20	1	1	3	10	11,38	50,1	4,51
G9NNS5	Glycoside hydrolase family 17 protein / <i>H. atroviridis</i>	28,78	2	1	8	18	8,89	42,6	5,39
G9PBD3	Glycoside hydrolase family 72 protein / <i>H. atroviridis</i>	39,96	1	2	16	42	11,85	48,3	5,31
G9NI23	Glycoside hydrolase family 72 protein/ <i>H. atroviridis</i>	30,46	1	1	10	42	7,80	56,3	4,67
G9NIE1	Glycoside hydrolase family 72 protein / <i>H. atroviridis</i>	21,51	1	4	11	38	48,93	57,3	4,89
G9PB60	Eliciting plant response-like protein / <i>H. atroviridis</i>	64,49	6	2	6	57	103,87	14,5	6,49
G9PBE5	GPI-anchored cell wall organization protein/ <i>H. atroviridis</i>	22,11	1	4	7	31	36,09	41,2	5,36
Q4F6W8	Spore-related hydrophobin / <i>T. viride</i>	20,22	1	1	1	3	10,81	9,1	4,72
O74567	QI74 protein / <i>T. harzianum</i>	56,53	1	1	33	53	7,62	77,9	8,05
<b>Xilanases</b>									
<b>Endoxilanases</b>									
Q6QNU8	Endo-1,4-beta-xylanase (Fragment)/ <i>T. asperellum</i>	83,58	1	1	4	135	272,81	7,6	5,02
G9NQ12	Endo-1,4-beta-xylanase / <i>H. atroviridis</i>	33,78	3	1	6	334	449,89	24,0	5,77
Q7Z8Q3	Endo-1,4-beta-xylanase / <i>T. viride</i>	32,29	14	2	4	397	641,47	24,2	7,47

G9NE77	Endo-1,4-beta-xylanase /H. atroviridis	23,91	1	2	4	303	386,09	24,5	5,40
G9NXF5	Glycoside hydrolase family 10 protein /H. atroviridis	64,09	1	4	16	358	514,96	34,8	7,52
G9NBD2	Glycoside hydrolase family 10 protein /H. virens	39,63	1	1	10	126	288,81	35,0	7,87
G9NRZ0	Glycoside hydrolase family 11 protein /H. atroviridis	36,27	2	4	8	246	243,23	29,6	6,28
<b>Beta xilosidases</b>									
Q92458	Beta-xylosidase /H. jecorina	30,36	1	1	21	134	161,47	87,1	5,78
<b>Enzimas acessórias</b>									
G9NSZ2	Carbohydrate esterase family 1 protein /H. atroviridis	9,20	1	2	3	26	57,54	36,4	5,29
G9NPZ7	Carbohydrate esterase family 5 protein /H.atroviridis	36,82	7	2	4	71	121,03	24,5	6,64
G9P6M2	Carbohydrate esterase family 5 protein /H.atroviridis	17,23	1	1	4	31	27,52	29,5	5,96
G9PBZ9	Carbohydrate esterase family 15 protein /H.atroviridis	23,85	1	2	10	19	18,20	47,8	7,31
G9NYH4	Glycoside hydrolase family 54 protein /H. atroviridis	53,03	3	6	12	62	136,30	53,0	5,48
G9NNW8	Glycoside hydrolase family 54 protein /H. atroviridis	46,44	1	7	12	86	129,04	52,1	6,02
G9P212	Glycoside hydrolase family 62 protein /H. atroviridis	24,62	2	4	4	85	139,44	34,8	7,49
G9MV83	Glycoside hydrolase family 62 protein /H.virens	12,43	2	1	4	13	15,27	40,3	4,89
G9NUB8	Glycoside hydrolase family 62 protein /H. atroviridis	4,71	2	1	2	9	13,07	40,3	5,30
<b>Outras hemicelulases</b>									
<b>Glicosil hidrolases</b>									
G9P179	Glycoside hydrolase family 3 protein /H. atroviridis	44,96	2	9	31	214	298,52	86,7	5,81
G9MUM1	Glycoside hydrolase family 3 protein /H. virens	44,86	2	5	27	62	56,54	92,9	6,07
G9P180	Glycoside hydrolase family 3 protein /H. atroviridis	44,75	4	10	22	100	151,71	76,4	6,54
G9P6W2	Glycoside hydrolase family 3 protein /H. atroviridis	33,42	3	6	30	107	62,42	84,0	5,77
G9MMQ0	Glycoside hydrolase family 5 protein /H. virens	22,57	3	2	6	20	19,60	47,7	6,04
G9PBZ8	Glycoside hydrolase family 5 protein /H. atroviridis	37,04	3	4	10	35	51,41	48,6	6,77
G9NWY0	Glycoside hydrolase family 5 protein/H. atroviridis	13,51	2	2	3	24	31,48	44,4	4,86
G9NVY5	Glycoside hydrolase family 16 protein (Fragment) /H. atroviridis	44,91	3	1	9	16	4,50	36,0	4,86
G9NN07	Glycoside hydrolase family 16 protein /H. atroviridis	31,75	3	5	11	52	79,56	40,6	5,16
G9NRQ3	Glycoside hydrolase family 16 protein /H. atroviridis	23,90	2	1	7	29	24,07	49,0	4,86
G9NV80	Glycoside hydrolase family 16 protein /H. atroviridis	9,47	1	1	4	8	9,60	30,2	4,98
G9NGV2	Glycoside hydrolase family 27 protein /H. atroviridis	39,04	4	4	13	27	38,54	47,2	5,41
G9MFL1	Glycoside hydrolase family 88 protein /H. virens	36,45	1	1	18	44	5,05	50,0	5,92
<b>Pectinases</b>									
G9PB37	Pectinesterase /H. atroviridis	38,11	1	2	6	15	29,37	34,3	6,90
G9MMP9	Pectinesterase /H. virens	25,00	1	1	4	10	11,72	34,5	6,90
G9P185	Polysaccharide lyase family 1 protein /H.atroviridis	27,98	1	1	7	55	4,41	37,7	6,02

G9NE75	Glycoside hydrolase family 28 protein /H. atroviridis	18,95	4	3	5	43	73,68	38,3	5,24
<b>Manosidases</b>									
G9P297	Glycoside hydrolase family 92 protein /H. atroviridis	28,10	1	2	15	22	7,87	86,3	6,07
G9MLE1	Glycoside hydrolase family 92 protein/H. virens	28,04	3	1	21	40	5,09	89,1	6,07
<b>Quitinases e glucanases</b>									
<b>Quitinases</b>									
D6N0Y7	Chitinase chi18-15 (Fragment) /T. viride	4,97	5	1	2	4	5,09	34,1	4,65
G9N2J9	Glycoside hydrolase family 18 protein /H. virens	30,10	1	1	7	13	2,88	43,9	5,80
G9NJ64	Glycoside hydrolase family 18 protein /H. atroviridis	12,58	1	2	4	15	13,38	29,7	4,61
G9NET4	Glycoside hydrolase family 18 protein /H.atroviridis	8,63	3	1	3	20	6,81	41,5	4,53
<b>N-acetilglucosaminidases</b>									
P87258	N-acetyl-beta-D-glucosaminidase /T. harzianum	45,17	4	3	20	37	13,64	64,5	5,94
<b>Glicanases</b>									
G9MX73	Glycoside hydrolase family 64 protein /H. virens	34,04	2	1	11	18	8,01	39,8	5,38
G9NEC2	Glycoside hydrolase family 64 protein /H. atroviridis	22,55	2	3	8	42	34,63	39,4	5,44
G9MWV6	Glycoside hydrolase family 71 protein /H. virens	16,89	3	1	9	23	2,42	63,0	5,88
<b>Outras proteínas</b>									
G0RHC3	N-terminal binuclear Zn cluster-containing/DNA binding domain-containing protein /H. jecorina	44,60	1	1	28	61	19,42	87,6	5,86
G9NSJ1	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH 1/H. atroviridis	39,36	1	1	25	57	2,93	88,5	9,01
Q2MJD3	Actin (Fragment) /T. caribbaeum	23,85	1	1	7	17	2,88	24,0	5,06
G0RAJ4	Glycoside hydrolase family 25 /H. jecorina	22,81	2	2	5	48	41,25	24,2	6,37
Q5GQ79	Mutanase /T. asperillum	19,84	3	1	9	18	4,16	67,6	5,40

## 7.2 Produção científica durante o doutorado

### Resumos em congressos

Gómez-Mendoza D.P, Silva, A. J., Junqueira, M., Domont, G. B., Ximenes Filho, E., Sousa, M.V, Ricart, C.A.O., BN-Page analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes, 2012. Blumenau; Evento: X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática-Enzitec; Inst.promotora/financiadora: Fundação Universidade Regional de Blumenau

Gómez-Mendoza D.P, Ximenes Filho, E., Sousa, M.V, Ricart, C.A.O., Analysis of *Trichoderma harzianum* Secretome: Effect of N-Deglycosylation on 2-DE Profiles in: Xxxix Annual Meeting Of Sbbq, 2010, Foz Do Iguaçu-Paraná.

Gómez-Mendoza D.P, Sousa, M.V, Ximenes Filho, E., Ricart, C.A.O., *Trichoderma Harzianum* Secretome: Changes in Response to Different Carbon Sources in: Xxxviii, 2009, Águas De Lindóia-São Paulo.

Mendoza, Diana Paola Gómez, Filho, Edivaldo Ximenes Ferreira, Sousa, M.V, Ricart, Carlos André Ornelas., *Trichoderma harziaum* secretome: changes in response to different carbon sources in: 3 rd EuPA Congress, 2009, Stockholm. 3 EuPA Congress-Clinical Proteomics. Stockholm: , 2009. p.225 -

### Apresentação oral de trabalhos em congressos

Gómez-Mendoza D.P, Silva, A. J., Junqueira, M., Domont, G. B., Ximenes Filho, E., Sousa, M.V, Ricart, C.A.O., BN-Page analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes, 2012. Blumenau; Evento: X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática-Enzitec; Inst.promotora/financiadora: Fundação Universidade Regional de Blumenau

Gómez-Mendoza D.P. Secretomics of filamentous fungi: discovering the natural tool-box of *T. harzianum*, 2012. . Escola de Comando e Estado-Maior do Exército-ECEME; Cidade: Rio de Janeiro; Evento: Encontro de Proteômicos; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Proteômica

### Prêmios

Prêmio Melhor Poster, Novozymes Latin America (2012). Evento: X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática-Enzitec; Inst.promotora/financiadora: Fundação Universidade Regional de Blumenau



### **Cursos de extensão**

Curso de curta duração em Curso básico sobre técnica de LC-MS/MS. Centro de Espectrometria de Massas Aplicada, CEMSA, São Paulo, Brasil (2012).

Curso de curta duração em Planejamento de experimentos. Fundação Universidade Regional de Blumenau, FURB, Blumenau, Brasil (2012).

Curso de curta duração em Identificação de Micro-organismos por Espectrometria. Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas, BRMASS, Brasil (2011).

### **Publicações**

SILVA, A. J., **GÓMEZ-MENDOZA D.P**, JUNQUEIRA, M., DOMONT, G. B., XIMENES FILHO, E., SOUSA, M.V, RICART, C.A.O., Blue native-PAGE analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes. *Proteomics* (Weinheim. Print). , v.12, p.2729 - 2738, 2012. [<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.201200048/full>]

VALE, L. H., **GÓMEZ-MENDOZA D.P**, KIM, M., PANDEY, A., RICART, C.A.O, XIMENES FILHO, E., SOUSA, M.V. Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. *Proteomics* (Weinheim. Print). , v.12, p.2716 - 2728, 2012. [<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.201200063/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+disrupted+on+15+September+from+10%3A00-12%3>]

Gal Milanezi, Natália, Mendoza, **Diana Paola Gómez**, Siqueira, Félix Gonçalves, Silva, Luciano Paulino, Ricart, Carlos André Ornelas, Filho, Edivaldo Ximenes Ferreira., Isolation and Characterization of a Xylan-Degrading Enzyme from *Aspergillus niger* van Tieghem LPM 93 with Potential for Industrial Applications. *BIOENERG RES.* , v.5, p.363 - 371, 2012. [<http://www.springerlink.com/content/m361r32620770103/fulltext.pdf>]

Duarte, Gilvan, Moreira, Leonora, **Gómez-Mendoza,Diana**, Siqueira, Félix Gonçalves de, Batista, Luís, Amaral, Lourdes, Ricart, Carlos, Filho, Edivaldo., Use of Residual Biomass from the Textile Industry as Carbon Source for Production of a Low-Molecular-Weight Xylanase from *Aspergillus oryzae*. *Applied Sciences.* , v.2, p.754 - 772, 2012.[doi:10.3390/app2040754]

### **7.3 Publicações como primeiro autor**

#### **7.4 Publicações em colaboração**