



**VARIAÇÕES DO SECRETOMA DE *Trichoderma harzianum* EM
RESPOSTA A DIFERENTES FONTES DE CARBONO**

DIANA PAOLA GÓMEZ MENDOZA

Orientador: Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart

Co-Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Filho

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

**Brasília - D.F
FEVEREIRO 2009**

“...Hoy hemos de sacrificar el estar unidos la amistad y el cariño;
mas la recompensa que espera al final de este recorrido
jamás será olvidada
transformándonos en seres infinitos,
donde el saber romperá las fronteras
que hoy nos alejan”

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a minha família pelo constante respaldo, cujo amor, apoio e união me armaram de valor para fazer possível esta travessia.

A minha mãe Carmen Cecília Mendoza Montaña, por me brindar sempre seu incondicional amor, dedicação e sacrifício, e me ensinar com doçura e compreensão sobre o valor da família e da educação.

Ao meu pai Wilson José Gómez Patiño por me demonstrar que a força da vida e a determinação fazem possível vencer as dificuldades, por ser meu exemplo a seguir e me ensinar sobre a importância da educação e do trabalho.

Ao meu irmão Juan David Gómez Mendoza, por viver do meu lado anos de histórias e vida em família, por fazer próprios os meus logros e se converter em incondicional cúmplice dos meus sonhos.

Agradeço também aos meus grandes amigos Claudia Maricela Gómez Muñetón, Carolina Rivero Rubio, Diego Alonso Reyes Pabón, Juan Fernando Eusse, Laura Rodrigues de Oliveira, Jackeline Benassuly Barbosa, Sonia Corina DiCunzolo, Sergio Andrés Conde Ocasionez e Sebastian Ujevic Tonino, por tornar maravilhosa minha estadia no Brasil, por compartilhar ao meu lado alegrias e dificuldades e por me oferecerem incondicional amizade, compreensão e apoio.

Ao grupo de estudantes colombianos Carlos Enrique Uribe Valencia, Carolina Santamaría, Carolina Sanchez Ospina, Diego Felipe, Sanchez Gómez, Janier Arias Garcia, Juliana Maria Serna Restrepo, Nelson Andrés Ortiz Cano, Rodrigo Muñoz e Wladimir Paez Guerra, por me dar a oportunidade de conhecê-los e me oferecer amizade, carinho, anedotas e experiências únicas.

Agradeço com profundo carinho aos meus queridos amigos e colegas, Adelson Joel da Silva, Gabriel Costa Nunes da Cruz, Felix Gonçalves Siqueira, Jimmy Alexander Guerrero Vargas, Liudy Hernandez Garcia, Luis Henrique do Vale, Rafael Augusto Pontes Guércio, Adriana Dias Magalhães e Natália Von Gal Milanezi, por compartilhar comigo seus conhecimentos, experiências e amizade, por me brindarem tantos momentos agradáveis, risadas e conselhos.

Aos professores, alunos e técnicos do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas: Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa, Prof. Dr. Wagner Fontes. Prof. Dr. Mariana Castro, Prof. Dr. Consuelo M.R de Lima, Prof. Dr. Pedro José P. Zanotta, Prof. Dr. Ricardo Bastos Cunha, Prof. Dr. Sebastián Charneu, Aline Magalhães, Anne Caroline Dias Neves, Elaine Nascimento Aquino, Liz Maria Tales, Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza, Rainer Myr Lauterjung Queiroz, Ana Caroline Ribeiro de Toledo Pinto, Pedro Alves Martins, Miguel Campelo de Melo Ferraz, Nuno Manuel Domingues, Fabio Coelho e Antônio Rufino dos Santos, pelo bom recebimento que me deram, e pelos conhecimentos e experiências que me transmitiram.

Aos professores, alunos e técnicos do Laboratório de Enzimologia, Prof. Dr. Carlos Roberto Félix, Prof. Eliane Ferreira Noronha, Leonora Rios Moreira, Ricardo Sposina Sobral Teixeira, Marisia F. Cortes e Margarete G. da Silva Lima, por me oferecer amizade, parceria e conhecimentos incalculáveis.

À Prof. Dr. Sônia Nair Bão, pela orientação e especial atenção brindada na consecução das imagens de microscopia eletrônica.

Ao Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro, por me dar a oportunidade de estudar na Universidade de Brasília, por me outorgar a sua confiança e me oferecer apoio e colaboração durante todo este tempo.

Ao Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, excelente pesquisador quem co-orientou com paciência minha pesquisa se mostrando como um constante respaldo durante a minha formação.

Finalmente agradeço especialmente ao Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart, meu orientador, mentor e educador, grande pesquisador e grande pessoa, quem me outorgou a confiança para fazer parte de uma excelente equipe de trabalho e quem com paciência e dedicação me infundiu o amor pelo estudo da Bioquímica.

A todas aquelas pessoas que com amizade e carinho contribuíram fazendo parte da incrível experiência de estudar no Brasil.

APOIO FINANCEIRO

Esta pesquisa foi desenvolvida com o apoio financeiro da Universidade de Brasília-**UnB**, e das entidades de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -**CAPES**, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -**CNPq** e Financiadora de Estudos e Projetos -**FINEP**.

ÍNDICE GERAL

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Fungos Filamentosos.....	1
1.2 Ascomycetes e <i>Trichoderma harzianum</i>	2
1.4 Secreção de Proteínas em Fungos Filamentosos.....	11
1.5 Avanços em Proteômica de Fungos Filamentosos	13
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3.1 Manutenção de <i>T. harzianum</i>	19
3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	19
3.3 Cinética de Indução Enzimática em Meio Contendo Bagaço de Cana	20
3.4 Produção de Secretomas.....	20
3.5 Determinação da Atividade Enzimática dos Filtrados das Culturas	21
3.6 Preparo das Amostras	22
3.7 SDS-PAGE	23
3.8 Zimografia	23
3.9 Eletroforese Bidimensional (2-DE).....	24
3.10 Análise de Imagens.....	25
3.11 Espectrometria de Massas.....	25
4. RESULTADOS	27
4.1 Cultivo de <i>T. harzianum</i>	27
4.2 Curva de Indução Enzimática	29

4.3 Atividades Celulolítica e Xilanolítica de <i>T. harzianum</i>	31
4.4 SDS-PAGE	32
4.5 Atividade enzimática in gel.....	33
4.6 Perfis bidimensionais dos secretomas.....	34
4.7 Análise de Imagens.....	39
4.8 Espectrometria de Massas MALDI TOF/TOF	44
5. DISCUSSÃO	48
7. PERSPECTIVAS.....	56
8. BIBLIOGRAFIA.....	57

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1- Estruturas características da reprodução sexuada e assexuada em Ascomycetes.....	3
Figura 2- Desconstrução enzimática dos polímeros de celulose e xilana.....	7
Figura 3- Metodologia utilizada na produção e análise dos secretomas produzidos por <i>T. harzianum</i>	21
Figura 4 - Vista macroscópica do crescimento de <i>T. harzianum</i> em meio MS contendo glicose1%, celulose1%, xilana 1% e bagaço de cana1%.	28
Figura 5 - Microscopia Eletrônica de Varredura de esporos obtidos dos cultivos de <i>T. harzianum</i> em meio sólido contendo glicose 1%, celulose 1%, xilana 1% e bagaço de cana 1%	28
Figura 6- Perfil protéico em SDS-PAGE 12% do crescimento de <i>T. harzianum</i> em bagaço de cana 1% durante 15 dias.	29
Figura 7 – Cinética de produção enzimática de CMCases, Xilanases e FPases, de <i>T. harzianum</i> , durante 15 dias de cultivo, utilizando bagaço de cana 1% como fonte de carbono	30
Figura 8 - Concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) durante 15 dias de cultivo de <i>T. harzianum</i> , utilizando bagaço de cana 1 % como fonte de carbono.....	30
Figura 9 – Detecção da atividade enzimática (UI/mL) dos filtrados de <i>T. harzianum</i>	32
Figura 10 - Perfil protéico em SDS-PAGE 12% dos filtrados de <i>T. harzianum</i> . .	33
Figura 11 - Zimograma para atividade de CMCCase das amostras obtidas a partir do crescimento de <i>T. harzianum</i>	34
Figura 12 - Perfil bidimensional do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em glicose 1%, celulose 1%, xilana 1% ou bagaço de cana 1%.	35
Figura 13- Perfil bidimensional do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em glicose 1%.....	36
Figura 14 - Perfil bidimensional do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em celulose1%.....	37

Figura 15 - Perfil bidimensional do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em xilana 1%.	38
Figura 16 - Perfil bidimensional do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em bagaço de cana 1%..	39
Figura 17 - <i>Spots</i> exclusivos e pareados nos perfis bidimensionais do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em glicose 1% e celulose 1% como fonte de carbono.	41
Figura 18 - <i>Spots</i> exclusivos e pareados nos perfis bidimensionais do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em glicose 1% e xilana 1% como fonte de carbono.	42
Figura 19 - <i>Spots</i> exclusivos e pareados nos perfis bidimensionais do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em glicose 1% e bagaço de cana 1% como fonte de carbono.	42
Figura 20 - <i>Spots</i> exclusivos e pareados nos perfis bidimensionais do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em bagaço de cana 1% e celulose 1% como fonte de carbono.	43
Figura 21 - <i>Spots</i> exclusivos e pareados nos perfis bidimensionais do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em bagaço de cana 1% e xilana 1% como fonte de carbono.	43
Figura 22 - <i>Spots</i> exclusivos e pareados nos perfis bidimensionais do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em celulose 1% e xilana 1% como fonte de carbono.	44
Figura 23 - Proteínas identificadas no perfil bidimensional de <i>T. harzianum</i> em bagaço de cana.....	45
Figura 24 - Identificação da alfa-arabinofuranosidase. Espectro MS/MS e Resultado da busca no programa MASCOT	46
Figura 25 - Identificação da N-Acetil- β -D-glucosaminidase. Espectro MS/MS e resultado da busca no programa MASCOT.....	47
Figura 26 - Reação catalisada pela enzima alfa-L-arabinofuranosidase.....	53

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Quantificação da atividade enzimática dos filtrados de <i>T. harzianum</i> .	31
Tabela 2. <i>Spots</i> exclusivos, pareados e diferencialmente expressos do secretoma de <i>T. harzianum</i> quando crescido em glicose 1% celulose 1% xilana 1% ou bagaço de cana 1% como fonte de carbono	41
Tabela 3. Proteínas identificadas a partir do perfil bidimensional do secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado em bagaço de cana 1% como fonte de carbono	45

ABREVIATURAS

BDA	Batata Dextrose Agar
CMC	Carboxi Metil Celulose
2-DE	Eletroforese Bidimensional
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNS	Ácido 3,5- Dinitrosalicílico
DTT	Ditiotreitol
FP	Papel de filtro (<i>Filter Paper</i>)
HCCA	Ácido α -ciano-4- hidroxinâmico
HSP	Proteína de Choque Térmico (<i>Heat Shock Protein</i>)
MALDI	Desorção e Ionização a Laser assistida por Matriz (<i>Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization</i>)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MPT	Modificação Pós-traducional
MS	Espectrometria de massa (<i>Mass Spectrometry</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucléico
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (<i>Sodium dodecyl Sulfate–Poliacrylamide Gel Eletroforesis</i>)
TOF	Tempo de voo (<i>Time of Flight</i>)
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
UI	Unidade Internacional
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>

RESUMO

O fungo filamentosso *Trichoderma harzianum* conhecido produtor de enzimas extracelulares como xilanases e celulases foi crescido em três fontes de carbono quimicamente definidas, glicose, celulose e xilana e uma fonte complexa, bagaço de cana, a fim de determinar-se as variações que cada uma geraria na atividade enzimática e na composição do secretoma do fungo. A produção enzimática de *T. harzianum* sobre bagaço de cana foi inicialmente avaliada durante 15 dias, evidenciando pouca variação em termos de concentração, produção de proteínas e perfis eletroforéticos ao longo do tempo. Após crescimento por 9 dias, detectou-se atividade xilanolítica (0,00610 UI/mL) e celulolítica (0,00497 UI/mL, 0,00926 UI/mL) no meio suplementado com glicose, indicando uma possível produção constitutiva das enzimas. A mais alta atividade xilanolítica(0,09514UI/mL) e celulolítica (0,03257UI/mL, 0,06353UI/mL) foram observadas quando *T. harzianum* foi cultivado em meio com bagaço de cana como fonte de carbono. Os secretomas foram submetidos a eletroforese bidimensional (2-DE) em faixa de pH 3-10 que mostrou perfil pouco complexo na amostra do meio com glicose e uma maior concentração de *spots* protéicos na região ácida dos demais géis. Foram então realizadas eletroforeses 2-DE na faixa de pH 4-7, a fim de obter melhor resolução de *spots* correspondentes a possíveis isoformas protéicas. Os géis bidimensionais na faixa de 4-7 foram submetidos a análise de imagens para determinar o número total de *spots* em cada gel assim como os *spots* exclusivos e os pareados entre as diferentes condições. Tentativas de identificação de *spots* por *peptide mass fingerprinting* e MS/MS mostraram baixa porcentagem de sucesso, provavelmente devido ao baixo número de sequências de *T. harzianum* em banco de dados e a existência de modificações pós-traducionais como glicosilações nas enzimas secretadas. N-acetil-glucosaminidase e α -L-Arabinofuranosidase, foram identificadas no secretoma obtido em meio contendo bagaço de cana. Espera-se que a conclusão dos mapas secretômicos possa contribuir na compreensão dos mecanismos de expressão e secreção de enzimas de *T. harzianum* e aplicações destas em processos biotecnológicos.

ABSTRACT

The filamentous fungus *Trichoderma harzianum* recognized producer of extracellular enzymes such as xylanase and cellulases was grown in three chemically defined carbon sources, glucose, cellulose and xylan, and a complex source, sugarcane bagasse, in order to determine the variations in enzyme activity and secretome composition of fungus. The enzyme production of *T. harzianum* on sugarcane bagasse, was initially evaluated for 15 days, showing little variation in terms of concentration, protein production and electrophoretic profiles over time. After 9 days of growth, xylanolytic (0,00610 UI/mL) and cellulolytic (0,00497 UI/mL, 0,00926 UI/mL) activities were detected in the medium supplemented with glucose, indicating a possible constitutive production of enzymes. The major cellulolytic (0,03257UI/mL, 0,06353UI/mL) and xylanolytic (0,09514UI/mL) activities were observed when the *T. harzianum* was grown in medium with sugarcane bagasse. The secretoms were subjected to two-dimensional electrophoresis (2-DE) in pH range 3-10 showed low complex profile in the sample of medium with glucose and a greater concentration of proteic spots in the acidic region of other gels. Electrophoresis were then performed 2-DE in the range of pH 4-7, to obtain greater resolution of spots corresponding to possible protein isoforms. The two-dimensional gels in the range of 4-7 were subjected to computational analysis of images that showed the total number of spots in each gel as well as exclusive and matched spots between the different conditions. Attempts to identify spots by peptide mass fingerprinting and MS / MS showed low percentage of success, probably due to the low number of sequences of *T. harzianum* in the database and the existence of posttranslational modifications as glycosylation in the secreted enzymes. N-acetyl-glucosaminidase and α -L- arabinofuranosidase, were identified in sugarcane bagasse secretome. It is expected that the conclusion of secretomic maps can contribute to a better understanding of the expression and secretion mechanisms of *T. harzianum* enzymes and their applications in biotechnological processes.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fungos Filamentosos

Os fungos filamentosos constituem um grupo de organismos multicelulares, eucarióticos típicos, que possuem um núcleo que contém vários cromossomas, delimitado por uma membrana nuclear e organelas citoplasmáticas como mitocôndrias, retículo endoplasmático, vacúolos, complexo de Golgi e ribossomos. O citoplasma encontra-se limitado pela membrana citoplasmática, uma dupla camada lipídica que contém proteínas e esteróides como o ergosterol. No exterior da membrana celular, encontra-se a parede celular, composta fundamentalmente por proteínas e polissacarídeos como quitina, manana e glucana (Alexopoulos *et al.* 1969).

Microscopicamente, nos fungos filamentosos observa-se a formação de estruturas tubulares, ramificadas, de crescimento apical, geralmente septadas e hialinas, conhecida como **hifas**. As hifas por sua vez, se agrupam formando o **micélio**, o qual se observa macroscopicamente com a formação de colônias cotonosas ou pulverulentas sobre meios sólidos. Na colônia de um fungo filamentoso ocorre uma diferenciação na função do micélio. Assim o micélio vegetativo penetra no substrato para obter os nutrientes, enquanto o micélio aéreo projecta-se ao exterior da colônia para produzir estruturas reprodutoras (Adrio *et al.* 2003).

Os fungos filamentosos estão comumente associados à matéria orgânica em decomposição, participando dos ciclos naturais reciclando carbono e outros elementos, ou como patógenos oportunistas em plantas e animais. De metabolismo quimioheterotrófico, alimentam-se por absorção dos metabólitos que se encontram no ambiente. Quando se trata de um substrato insolúvel os fungos sintetizam e secretam enzimas apropriadas a fim de solubilizar e absorver tais

metabólitos, o que tem favorecido a descoberta de exoenzimas de importância biotecnológica (Grondona *et al.*, 1997 Tilburg *et al.* 1993).

A maioria dos fungos filamentosos são pouco exigentes enquanto a requerimentos de pH e temperatura, tendo a capacidade de crescer em faixas de pH entre 2 e 9 e temperaturas que oscilam entre os 10⁰C e 40⁰C. Devido à facilidade que têm de serem cultivados em condições de laboratório, as diversas fontes de carbono e nitrogênio que podem usar e sua alta taxa metabólica, os fungos filamentosos vêm sendo utilizados em diferentes processos industriais como a produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, alcoóis, pigmentos, antibióticos, lipídeos e glicolipídeos (Adrio *et al.* 2003).

Outras características dos fungos filamentosos incluem atuação como agentes biocontroladores de patógenos, produção de metabólitos que favorecem o crescimento de plantas, atuação como agentes biorremediadores mediante a adsorção de compostos xenobióticos e a degradação de materiais vegetais que restam de atividades agrícolas devido à produção de enzimas hidrolíticas como lacases, celulasas, hemicelulasas e lignoperoxidases.

1.2 *Ascomycetes e Trichoderma harzianum*

Os *Ascomycetes* integram a classe mais numerosa do reino Fungi, conhecendo-se aproximadamente 15.000 espécies diferentes. Trata-se de fungos filamentosos dimórficos, de notável desenvolvimento micelial e estruturas reprodutoras especializadas que ocupam uma variedade de ambientes e ecossistemas (Alexopoulos, 1996).

O asco, estrutura característica que dá o nome à classe, origina-se dentro de um corpo frutífero chamado de ascocarpo. O asco é uma estrutura sexual que contém um número definido de ascósporos, células de origem meióticas, que se liberam com o rompimento ocorrido durante a maturidade do fungo, o número de

ascósporos, geralmente oito, varia em relação á espécie. Neste estágio sexual se conhecem como teleomorfos e são reconhecidos taxonomicamente como membros do *phylum* Ascomycota (Fig. 1a) (Chaverri *et al.* 2003).

Os *Ascomycetes* possuem adicionalmente reprodução assexuada com a formação de células de origem clonal que se originam por fissão binária ou fragmentação. Uma mesma espécie pode produzir um ou mais tipos de esporos assexuais, usualmente chamados de conídios ou clamidiosporas, e neste estado assexual são conhecidos como anamorfos (Fig. 1B) (Chaverri *et al.* 2003).

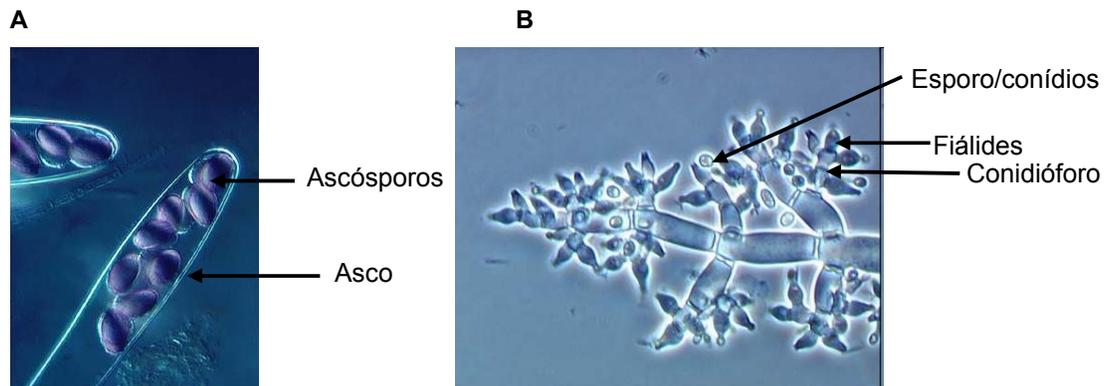


Figura. 1- Estruturas características da reprodução sexuada (A) e assexuada (B) em Ascomycetes.

Aproximadamente 40% dos *Ascomycetes* são só conhecidos pelos anamorfos e a contraparte no estado sexual, o teleomorfo, tem sido classificada separadamente, sem levar em conta a natureza dimórfica do *phylum*. Os fungos *Hipocreales* ilustram claramente esta situação, sendo exemplo o gênero *Trichoderma* (Chaverri *et al.* 2003).

Rifai em 1969 dividiu o gênero *Trichoderma* em nove "agregados de espécies", baseando-se numa análise das características morfológicas e microscópicas dos isolados, e relatando pela primeira vez a possível relação entre *Trichoderma* (anamorfo) e *Hypocrea* (teleomorfo). Posteriormente, Bissett *et al.*

(1991), agrupou as espécies em 5 seções: *T. sect. Longibranchiatum*, *T. sect. Hypocreanum*, *T. sect. Pachybasium*, *T. sect. Saturnisporium* e *T. sect. Trichoderma*. Mais recentemente, através de estudos baseados em análises morfológicas e moleculares foram descritas cerca de 75 espécies do gênero *Trichoderma*, (Chaverri *et al.*, 2002; Grondona *et al.* 1997).

Trichoderma harzianum Rifai (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae) é um fungo filamentosos, assexual, isolado comumente de solos tropicais, material vegetal, ecossistemas rizosféricos e material orgânico em decomposição, numa proporção de $10^1 - 10^3$ esporos por grama de solo (Samuels, 2006).

Na natureza, as formas assexuadas do fungo persistem como populações clonais e heterocarióticas, porém, o fungo tem sido inequivocamente relacionado à fase teleomorfa. Geralmente cultivos derivados de ascósporos do fungo sexual *Hypocrea lixii*, resultaram em espécies de *T. harzianum*, segundo análises morfológicas e moleculares feitas por Chaverri *et al.* (2003) quem concluiu que se tratava da mesma espécie.

Os isolados de *Trichoderma harzianum* são ubíquos devido a sua natureza saprofítica e encontra-se em solos e matéria orgânica coletadas em todas as latitudes. As condições ótimas para o crescimento e esporulação, variam entre as espécies, mas a maioria são mesófilas, crescem num pH de 6,0 e os esporos permanecem viáveis por um período de 45 dias (Samuels, 2006; Papavizas, 1985).

T. harzianum cresce rapidamente sobre diferentes substratos, utilizando monossacarídeos, dissacarídeos, e polissacarídeos complexos, assim como purinas, pirimidinas, aminoácidos, aldeídos, e ácidos orgânicos como fonte de carbono e energia e produzindo um amplo espectro de metabólitos que incluem antibióticos, antifúngicos, pigmentos, vitaminas, ácidos orgânicos e enzimas hidrolíticas (Grondona *et al.* 1997). Dentre as fontes de nitrogênio utilizados em meios de cultura para *T. harzianum* destaca-se o sulfato de amônio seguido de

outros compostos nitrogenados que incluem aminoácidos, uréia, e nitratos que favorecem o crescimento vegetativo do fungo (Papavizas, 1985).

Macroscopicamente, *T. harzianum*, forma colônias concêntricas, de bordas irregulares, cujo crescimento observa-se de cor branca nos primeiros dias, com posterior formação de esporos de cor amarela ou verde. Os conídios, ovóides e hialinos, formam-se a partir de células conidiógenas que se encontram ao final de estruturas ramificadas e aspecto piramidal, conhecidas como conidióforos, sobre as quais se situam células especiais, chamadas fiálides. Outro aspecto importante da esporulação de *Trichoderma* é a habilidade de produzir clamidiósporos, que são estruturas de resistência, de aspecto tipicamente globoso ou subgloboso, que se formam nos extremos das hifas (Grondona *et al.* 1997).

1. 3 Constituição da Parede Celular Vegetal

A fração lignocelulósica da parede celular vegetal está constituída por três tipos de polímeros, celulose, hemicelulose e lignina, fortemente entrecruzados e quimicamente unidos por ligações não covalentes (Perez *et al.* 2002).

A celulose, componente mais abundante da biomassa vegetal, corresponde a 35-50% do peso seco das plantas. Este polímero linear está composto por subunidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β 1-4, originando longas cadeias chamadas de fibras elementares, unidas entre si por pontes de hidrogênio e forças de van der Waals formando unidades maiores que recebem o nome de microfibrilas (Lynd *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.* 2002).

A celulose possui uma porção altamente organizada conhecida como região cristalina e uma pequena porcentagem de cadeias de celulose não organizadas ou região amorfa mais susceptível a ataque enzimático (Rabinovich *et al.* 2002).

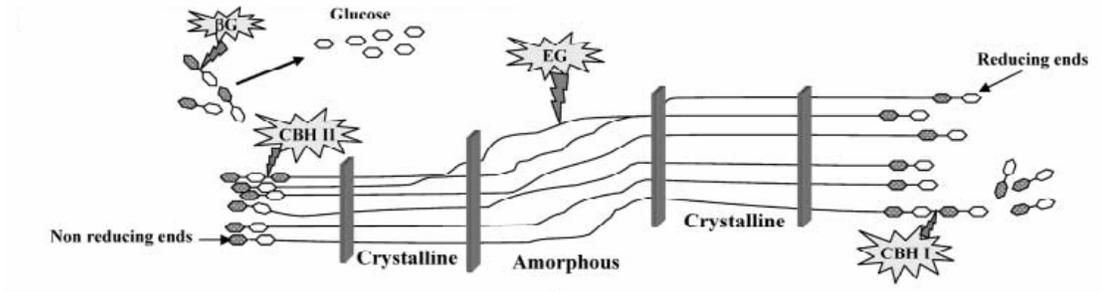
Outro componente da biomassa vegetal é a hemicelulose, que corresponde a 25-30% do peso seco da parede celular. A hemicelulose não é um composto quimicamente bem definido como a celulose, mas sim uma família de polissacarídeos complexos formado por resíduos de monossacarídeos de 5 e 6 carbonos como a D-xilose, D-manose, D-arabinose, D-galactose, D-glucose, e os ácidos, 4-O-metil-glucurônico, D-galacturônico e metil-galacturônico, unidos por meio de ligações glicosídicas. Um dos principais componentes da hemicelulose é a xilana, polímero formado por unidades monoméricas de D-xilose e segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (Perez *et al.* 2002 Selvaraj *et al.* 2000).

1.3.1 Degradação Enzimática da Parede Celular Vegetal

A fim de hidrolisar e metabolizar a celulose presente na biomassa vegetal, os fungos como *T. harzianum* precisam produzir celulasas extracelulares, cuja classificação está baseada nas propriedades estruturais de cada enzima, existindo três tipos principais de celulasas: endoglucanases, exoglucanases, e β -glicosidases (Ruegger *et al.* 2004).

As endoglucanases ou 1,4 β -D-glucano-4-glucanohidrolases (EC 3.2.1.4) clivam aleatoriamente no interior da região amorfa da cadeia de celulose, gerando oligossacarídeos de tamanho variável. Por outro lado as exoglucanases, também conhecidas como celodextrinases (EC 3.2.1.74), agem de forma progressiva sobre as extremidades redutoras ou não redutoras das cadeias de celulose liberando glicose no caso das glucanohidrolases ou celobiose no caso das celobiohidrolases. Finalmente as β -glicosidases, ou β -glicosil glucohidrolases (EC 3.2.1.21), hidrolisam celodextrinas e celobiose rendendo glicose (Fig. 2 A) (Lynd *et al.* 2002).

A



B

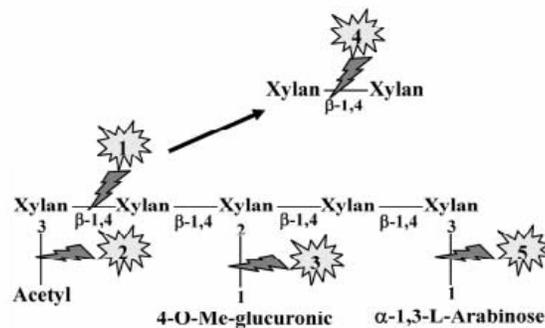


Figura. 2- Desconstrução enzimática dos polímeros de (A) celulose e (B) xilana. (Perez *et al*, 2002)

Pesquisas feitas na cepa E58 de *T. harzianum* indicaram que as atividades da β -glicosidase e endoglucanase acham-se principalmente localizadas em nível extracelular, detectando-se baixas quantidades destas atividades em extratos celulares e relativamente pouco associadas à parede celular (Saddler *et al*. 1985).

As enzimas que compõem os sistemas celulolíticos de fungos filamentosos consistem de estruturas modulares que geralmente incluem tanto módulos catalíticos, quanto módulos de ligação a carboidratos (CBM). A função dos CBMs é aproximar o domínio catalítico do substrato. O sistema celulolítico exibe uma alta atividade coletiva, conhecida como sinergismo, que pode apresentar-se entre várias exoglucanases, entre endo e exoglucanases, e entre exo e β -glicosidases, além de um sinergismo intramolecular que se apresenta entre os domínios catalíticos e os CBMs (Rabinovich *et al*. 2002).

A hidrólise completa da xilana requer a atuação sinérgica de um grupo de enzimas, dentro das quais encontram-se as endo 1,4 β -D xilanases (EC 3.2.1.8) que clivam aleatoriamente o esqueleto da xilana; β -D-xylosidases (EC 3.2.1.37) liberando monômeros de xilose a partir das extremidades não redutoras de xilooligosacarídeos e xilobiose; enquanto as cadeias laterais da xilana são removidas por ação de acetilxilana esterases que removem os grupos 0-acetil das posições 2 ou 3 dos resíduos de β -D-xilopiranosil da acetil xilana; p-cumárico esterases que clivam entre a arabinose e as cadeias laterais de ácido cumárico; ferúlico esterases que clivam entre a arabinose e o ácido p-ferúlico e arabinases que removem os resíduos de L-arabinose (Fig. 2B) (Polizeli *et al.* 2005; Selvaraj *et al.* 2000).

A produção de β -xilanases, β -xilosidases e α -arabinofuranosidases por *T. harzianum* tem sido realizada tanto em meios de cultura sólidos, usando fontes de carbono complexas como o bagaço de cana, quanto em meios de cultura líquidos e fontes de carbono quimicamente definidas como xilana, mostrando alta atividade enzimática e estabilidade a temperaturas que alcançaram os 50°C e pH de 5,0 (Rezende *et al.* 2002, Cacaís *et al.* 2001).

1.2.2 Celulases e Hemicelulases de *T. harzianum*

T. harzianum além de ser um reconhecido agente biocontrolador, efetivo contra fungos fitopatogênicos como *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora megasperma*, *Sclerotium rolfsii*, *Gaeumannomyces graminis* e *Cylindrocladium scoparium* (Kuçuk *et al.* 2007; Grondona *et al.* 1997), tem sido descrito como importante produtor de enzimas extracelulares como celulases e hemicelulases utilizadas em diferentes processos biotecnológicos envolvidas na degradação da biomassa vegetal.

Algumas enzimas que agem sobre o polímero de xilana como β -xilosidases, β -xilanasas e α -arabinofuranosidases pela cepa 4 de *T. harzianum* foram estudadas por Cacaís *et al.* (2001) a partir do cultivo do fungo em meio líquido contendo xilana. Mostrando que o tempo requerido para a indução da β -xilanasase foi de 10 h, alcançando o máximo valor de atividade às 106 h de cultivo, assim como baixos níveis de α -arabinofuranosidase foram achados ao início do período de crescimento e conseguindo o máximo valor de indução às 76h, e finalmente atividade da β -xilosidase que foi detectada a partir das 52 h de crescimento.

Outra enzima importante na hidrólise do polímero de manana, componente abundante da hemicelulose, é a β -mananase purificada em *T. harzianum* T 4 a partir de extratos brutos do crescimento do fungo em farelo de trigo como fonte de carbono. A atividade da enzima foi detectada no sexto dia de cultivo e mostrou uma massa molecular entre 32,5 e 36,5kDa (Ferrerira *et al.* 2004).

A importância biotecnológica da produção de enzimas hidrolíticas em *T. harzianum* reside na utilização das mesmas em diferentes processos industriais, que incluem produção de alimentos, bebidas, vinhos, alimento para animais, têxteis, polpa de papel, assim como açúcares fermentáveis a partir de resíduos agrícolas (Bhat, 2000).

Celulases (endoglucanases, exoglucanases e celobiohidrolases) assim como hemicelulases (endo-exo xilanasas, xiloglucanases e mananasas) são utilizadas na indústria alimentícia, na extração, clarificação e estabilização de sucos de frutas e vegetais. Estas enzimas facilitam a extração mecânica da polpa, aumentam o rendimento de obtenção de suco, reduzindo o tempo de processamento, são também utilizadas após a extração da polpa, reduzindo a viscosidade, incrementando a taxa de filtração e a estabilidade do produto final (Bhat, 2000).

Preparações enzimáticas que contêm altas concentrações de celulases e hemicelulases são utilizadas na produção de alimentos para animais ruminantes, a

fim de eliminar elementos anti-nutricionais presentes em grãos e vegetais, hidrolisar parcialmente os materiais lignocelulósicos dos cereais e melhorar a emulsificação, incrementando a digestibilidade, absorção e valor nutricional do alimento, ganho de massa e aumento na produção de leite (Bhat, 2000).

As celulases são utilizadas com sucesso no mundo inteiro, na indústria têxtil, devido à capacidade que tem de modificar as fibras de celulose de forma controlada, melhorando a aparência, brilho, cor e qualidade dos tecidos. As endoglucanases são utilizadas na indústria de "denim", para remover o excesso de tinta e microfibrilas do índigo no processo de "bio-stoning" (Bhat, 2000).

Na indústria farmacêutica, xilanases são utilizadas na formulação de produtos dietéticos, ou medicamentos para tratar problemas digestivos, e na indústria química, os produtos hidrolíticos da xilana, podem ser convertidos em combustíveis líquidos, solventes e adoçantes (Medeiros *et al.* 2007; Polizeli *et al.* 2005).

Na indústria do papel acha-se a principal aplicação de hemicelulases e celulases, facilitando a remoção da lignina associada à fração hemicelulósica da polpa, modificando as propriedades da mesma. Xilanases, mananases, β -xilosidases, e α -L-arabinofuranosidases são utilizadas no bio-branqueamento da polpa *Kraft*, tratamento levado a cabo em menor tempo, com menor consumo de energia, mostrando-se mais vantajoso em termos econômicos, e de menor impacto ambiental que o tratamento químico tradicional, devido à redução no consumo de produtos clorados, necessários no processamento da polpa de papel (Selvaraj *et al.* 2000).

A ação de celulases e hemicelulases sobre material vegetal e subprodutos de atividades agrícolas, como é o caso do bagaço de cana, o engaço de bananeira e o farelo de trigo, tem permitido a obtenção de açúcares fermentáveis que podem ser usados na produção de solventes orgânicos e combustíveis (Polizeli *et al.* 2005; Sanjust *et al.* 2003; Stevenson *et al.* 2002).

No caso do bioetanol, definido como o álcool que se obtém por fermentação dos açúcares de origem vegetal (Hamelinck *et al.* 2005), hemicelulases e celulases são utilizadas no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. No tratamento biológico, o primeiro passo na produção de bioetanol, consiste na remoção da lignina com a utilização de enzimas lignilíticas. Posteriormente, com a adição de água o polímero livre de hemicelulose é total ou parcialmente solubilizado por ação enzimática, obtendo-se principalmente xilana e posteriormente manana, galactana e arabinana, e apenas uma pequena fração da celulose é convertida em glicose, já que geralmente a conversão da celulose é levada a cabo em etapas diferentes do processo. O produto obtido é filtrado e prensado, os sólidos (celulose+lignina) são encaminhados a hidrólise da celulose, enquanto que o líquido contendo monossacarídeos é encaminhado à fermentação. Na hidrólise da celulose, enzimas celulolíticas catalisam a conversão a glicose. A hidrólise pode ser aumentada pela adição de surfactantes, a utilização de misturas de celulases de diferentes microorganismos ou inclusive com a adição de outras enzimas hidrolíticas como pectinases (Hamelinck *et al.* 2005).

1.4 Secreção de Proteínas em Fungos Filamentosos

A secreção de proteínas em fungos filamentosos tem um papel importante principalmente na nutrição dos mesmos. Muitas das proteínas e enzimas que são secretadas recebem atenção pelo potencial que têm de serem utilizadas em processos industriais, estimulando pesquisas relacionadas à genética e mecanismos de secreção das enzimas.

As células eucarióticas, devido à presença de compartimentos subcelulares, precisam do transporte de proteínas e outros materiais dentro desses compartimentos, a fim de garantir processos vitais como captação de nutrientes,

crescimento, expansão da membrana plasmática, endocitose e secreção de moléculas (Valkonen *et al.* 2003).

As proteínas sintetizadas no citoplasma encaminhadas na via secretora são primeiro translocadas ao lúmen do retículo endoplasmático (RE). No RE as proteínas são enoveladas nas suas conformações finais, e adquirem núcleos glicosilados. Posteriormente as proteínas são transportadas através da via de secreção por uma série de vesículas originadas na membrana do RE. Do RE as proteínas são transportadas ao complexo de Golgi onde as modificações pós-traducionais das proteínas são completadas e finalmente ocorre a exocitose, último estágio na secreção, no qual as vesículas que transportam as proteínas fusionam-se com a membrana plasmática como resultado do estímulo gerado pelo aumento na concentração de cálcio no citosol (Valkonen *et al.* 2003).

As modificações pós-traducionais (MPT) são um passo essencial no processamento de proteínas secretadas e ativas biologicamente. A glicosilação é a mais abundante e diversa forma de MPT, ocorre como resultado da união de um glicano a um resíduo de asparagina recebendo o nome de N-glicosilação, ou O-glicosilação, quando o glicano se une a serina ou treonina (Desphande *et al.* 2008).

No caso de *Trichoderma* sp, a maquinaria de modificações gera tanto O- quanto N- oligossacarídeos. A O- glicosilação de proteínas em *Trichoderma* sp ocorre de forma semelhante ao processo encontrado em *S. cerevisiae*. Um resíduo de manose do dolicol fosfato manose, é transferido no RE por ação da O-manosil transferase ao grupo OH da serina ou treonina. O oligossacarídeo é posteriormente alongado no complexo de Golgi com a adição de sete resíduos mais de manose por manosiltransferases que utilizam guanosina difosfato manose (GDP-manose) como doador de manosil no processo de alongação. A O-glicosilação em *Trichoderma* sp, está associada á secreção e estabilidade de uma das principais enzimas extracelulares, a celobiohidrolase I (CBHI), mantendo uma

distância fixa entre o domínio catalítico e de união ao substrato (Denier *et al.* 2003; Desphande *et al.* 2008).

As proteínas secretadas por *Trichoderma* sp, também podem ser N-glicosiladas. O processo de N-glicosilação em eucariotas requer o oligossacarídeo dolicol fosfato, o qual é transferido por ação da oligosacaril transferase à asparagina localizada na seqüência consenso (Asn-X-Ser/Thr). Em *Trichoderma* sp, a CBHI, possui quatro sítios de N-glicosilação, todos localizados no domínio catalítico. A estrutura dos N-sacarídeos vai depender do fungo e condições de cultivo (Kruszewska *et al.* 2008).

1.5 Avanços em Proteômica de Fungos Filamentosos

Mais de 25 genomas fúngicos foram completamente seqüenciados e vários outros projetos de seqüenciamento de genomas de fungos estão em andamento. Um grande desafio da biologia está no entendimento da expressão, função e regulação do grupo total de proteínas codificadas nos genomas fúngicos, o que forneceria importantes informações sobre mecanismos de colonização fúngica, interações planta-fungo, patogênese e adaptação ecológica (Bhadoria *et al.* 2007). Para tanto faz-se necessário o uso conjunto de estratégias pós-genômicas, incluindo a proteômica.

A **proteômica** é definida como a análise sistemática do **proteoma**, que segundo Mark Wilkins (1994), trata-se do conjunto de proteínas expressas por um genoma, célula ou tecido em uma condição específica. A proteômica permite identificar e quantificar o número de proteínas que influenciam diretamente a bioquímica celular, e prover uma análise do estado celular, ou mudanças que ocorrem durante o crescimento, desenvolvimento ou resposta a fatores ambientais, mostrando-se como uma tecnologia útil no estudo de sistemas biológicos altamente dinâmicos e complexos.

A pesquisa em proteômica de fungos filamentosos restringe-se devido às dificuldades associadas à eficiente extração de proteínas e a falta de seqüências genômicas de fungos nas bases de dados. Porém, a chegada de novas técnicas de extração e separação de proteínas, combinada com avanços na espectrometria de massas (MS), tem permitido aumentar o conhecimento sobre a expressão diferencial de proteínas de fungos com relevância biotecnológica, em relação às variáveis ambientais (Carberry *et al.* 2007).

Uma alta diversidade de proteínas acha-se presente nos proteomas de fungos filamentosos, heterogeneidade proporcionada pela aparição de múltiplas MPT, como glicosilação, fosforilação, sulfonação, acetilação e metilação, entre outras, que são extremamente importantes porque determinam a função, estabilidade e localização das proteínas (Kim *et al.* 2007).

Devido a alta complexidade dos proteomas, uma estratégia comumente adotada é o estudo de frações específicas do proteoma total, ou seja os sub-proteomas. Como exemplos de sub-proteomas podem ser citados sub-proteomas de organelas (mitocôndria, núcleo), glicoproteoma (proteínas glicosiladas), fosfoproteoma (proteínas fosforiladas) e secretoma (conjunto de proteínas secretadas por um organismo) (Kim *et al.* 2007).

Um dos principais estudos em proteômica de fungos filamentosos foi realizado por Grinyer *et al.*(2004-b) no qual foi analisado o sub-proteoma da mitocôndria do fungo *T. harzianum* conseguindo-se a eficiente extração das proteínas contidas na mitocôndria e a posterior separação de centenas de proteínas por 2-DE e identificação positiva de 31 spots, combinando técnicas de MALDI TOF (MS) e LC-MS/MS. Algumas das proteínas identificadas incluíram *cis-trans* isomerases, gliceraldeido 3- fosfato desidrogenases, fosfoglicerato cinases, enolases, β - fosfogluconate desidrogenases, assim como proteínas de choque térmico.

O proteoma intracelular do fungo *T. harzianum* foi estudado pela primeira vez por Grinyer *et al.* (2004-a) utilizando em paralelo vários métodos para a identificação de proteínas (MALDI TOF/TOF, LC-MS MS, seqüenciamento *de novo*) a fim de aumentar a quantidade de proteínas identificadas, considerando a limitada informação de proteínas de *T. harzianum* disponíveis nas bases de dados e o genoma não seqüenciado da espécie. Algumas das proteínas identificadas foram HSP60, HSP80, fator de iniciação eucariótico 4a, actina, fosfoglicerato quinase, gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase e 6- fosfogluconato desidrogenase, entre outras.

Mais recentemente, Grinyer *et al.* (2007) descreveram, o mapeamento proteômico da sub-unidade 20S do proteasoma de *T. reesei*, identificando algumas proteínas UPR (*unfolded protein response*) como a proteína regulada por glicose, chaperonas que incluíram HSP 70, HSP98, e o regulador negativo UPR, serina/treonina fosfatasa, algumas proteínas de interação também foram identificadas, como a 14-3-3 gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, transaldolase, enolase, ATPases e fatores de elongação e tradução.

Sub-proteomas de outros fungos filamentosos também já foram analisados, exemplo o sub-proteoma da membrana de *Neurospora crassa*, *Phanerochaete chrysosporium* (Schmitt *et al.* 2006; Hernández-Macedo *et al.* 2002) proteoma intracelular de *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus* (Asif *et al.* 2007; Carberry *et al.* 2006; Bruneau *et al.* 2001), *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotium* (Fernández-Acero *et al.* 2007; Yajina *et al.* 2006).

Considerado como uma fração do proteoma total do organismo, ou seja, um sub-proteoma, está o **secretoma**, que segundo a definição dada por Tjalsma *et al.*(2000) é o conjunto de enzimas e demais proteínas secretadas por um determinado tipo celular ou por um conjunto de células, assim como a maquinaria responsável pela secreção destas proteínas. Análises do secretoma de fungos filamentosos são indispensáveis para conhecer a identidade e função do arsenal

de enzimas hidrolíticas extracelulares que participam na degradação de compostos lignocelulósicos e outros biopolímeros em resposta à adaptação a diferentes fontes de carbono e nitrogênio, visando uma aplicação biotecnológica de tais enzimas (Bouws *et al.* 2008)

Em experimentos relacionados ao controle biológico de *T. harzianum*, foi feita uma análise proteômica da produção das proteínas extracelulares, que avaliou as variações que ocorriam no secretoma do fungo, quando crescia em presença de quitina e paredes celulares de fungos fitopatogênicos como *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* e *Phytophthora ultimum*, demonstrando diferenças significantes nos mapas bidimensionais das proteínas extracelulares e a presença de proteases tipo tripsina e uma nova aspartato-protease (P6281), proteínas que tem um papel fundamental na atividade parasítica de *Trichoderma* sp (Suárez *et al.* 2005).

A secretômica de *Trichoderma* sp e outros *Ascomycetes* tem sido abordada por diferentes pesquisadores no mundo inteiro como por exemplo os experimentos realizados por Medina *et al.* (2004), na análise das proteínas secretadas diferencialmente expressas por *Aspergillus flavus*, utilizando para o crescimento diferentes fontes de carbono (glicose, batata dextrose e rutina), achando proteínas comuns aos três meios, como proteases alcalinas, β 1-3 endoglucanases, glucoamilase, aminopeptidase e β -glicosidases, entre outras. Duas das proteínas acharam-se únicas para o meio de Batata Dextrose, 10 para o meio onde a glicose foi a fonte de carbono e finalmente 18 proteínas achadas só para a degradação do rutina.

Em *Aspergillus oryzae*, Oda *et al.* (2006) fizeram uma análise das proteínas extracelulares do fungo, quando cultivado em meio líquido e sólido usando farelo de trigo como substrato, classificando o total das proteínas identificadas, em quatro grupos: 1-proteínas extracelulares produzidas exclusivamente em meio sólido como a glucoamilase B e alanil dipeptidil peptidase; 2- proteínas extracelulares produzidas exclusivamente em meio líquido como a glucoamilase A

e xilanase G2; 3- proteínas produzidas nas duas condições de crescimento como a xilanase G1; e 4- proteínas que foram secretadas no meio sólido, entanto que no meio líquido ficaram presas na parede celular como α -amilases e β -glicosidases. Adicionalmente o estudo revelou que a produção de proteínas extracelulares em meio sólido era superior ao cultivo em meio líquido, devido a que o meio sólido aproximam-se mais as condições naturais em que se acha o fungo, mostrando-se mais conveniente para produção comercial de enzimas extracelulares.

Outras pesquisas em secretômica de fungos filamentosos incluíram a análise das proteínas secretadas pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em meios de cultura contendo exoesqueleto de *Callosobruchus maculatos*, coleóptero que ataca cultivos de cotiledôneas (Murad *et al.* 2006); análise do exoproteoma do fungo fitopatogênico, *Fusarium graminearum* crescido sobre glicose e diferentes paredes celulares vegetais (Phalip *et al.* 2005); análise da expressão de proteínas extracelulares do fungo *Phanerochaete chrysosporium* cultivado meio líquido e sólido (Sato *et al.* 2007); perfil proteômico do fungo *Monascus pilosus* durante crescimento em condições limitantes de nitrogênio (Lin *et al.* 2008) e estudo proteômico da interação entre *Trichoderma atroviride*, plantas e fungos fitopatogênicos (Marra *et al.* 2006).

O recente desenvolvimento da proteômica e genômica de fungos filamentosos complementadas com metodologias clássicas de cinética de enzimas e bioensaios tem melhorado a precisão e sensibilidade na análise das proteínas secretadas, participação das mesmas na interação hospedeiro-patógeno, assim como mecanismos de regulação e secreção. Com ajuda de ferramentas da bioinformática mediante estudos *in silico*, importantes na confirmação dos dados teóricos disponíveis nas bases de dados, pode-se criar uma rede de informação sobre proteínas a fim de ajudar no nosso entendimento sobre mecanismos de ação, estabilidade e resposta dos secretomas fúngicos e o potencial deste a nível biotecnológico (Pereira *et al.* 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar as possíveis variações que ocorrem no secretoma de *Trichoderma harzianum*, em resposta a glicose, celulose, xilana e bagaço de cana como fontes de carbono.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Estabelecer condições apropriadas para o crescimento de *T. harzianum* em diferentes fontes de carbono para obtenção dos filtrados
- 2.2.2 Determinar atividades enzimáticas xilanolítica e celulolítica dos filtrados
- 2.2.3 Obter perfis bidimensionais dos secretomas de *T. harzianum* obtidos após o crescimento do fungo nas diferentes fontes de carbono
- 2.2.5 Realizar análises computacionais de imagens dos géis bidimensionais dos secretomas a fim de determinar *spots* exclusivos e diferencialmente expressos.
- 2.2.6 Identificar, proteínas dos perfis bidimensionais dos secretomas de *T. harzianum* usando técnicas de espectrometria de massas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Manutenção de *T. harzianum*

A cepa de *T. harzianum* T4 provista por Itamar S. Melo (Embrapa/CNPMA, Brasil) e mantida como cepa de coleção do Laboratório de Enzimologia (UnB) foi crescida em placas de Batata, Dextrose, Agar (BDA) e armazenada a 4°C após o crescimento .

3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

O material para a análise por microscopia eletrônica de varredura-MEV do crescimento de *T. harzianum*, foi obtido por cultivo do fungo em meios sólidos MS (ver 4.3) suplementados com glicose 1%(m/v), celulose 1%(m/v),, xilana 1%(m/v), ou bagaço de cana 1%(m/v),, durante 6 dias a 28°C. Pedacos do meio de cultura crescidos foram excisados e fixados *over night* com solução de Karnovsky modificada, que continha glutaraldeido 2%(v/v),paraformaldeido 2%(v/v), e sacarose 3%(m/v) em tampão cacodilato de sódio pH 7,2 0,05mol/L. A pós fixação das amostras foi feita adicionando uma gota da solução que continha ferrocianato de potasio 1,6%(m/v), cloreto de cálcio 10mMol/L e tampão cacodilato de sódio 0,2mol/L, e uma gota de tetróxido de ósmio por uma hora. As amostras foram desidratadas com acetona em séries de 30%, 50%, 70%, 90% e 100% durante 15 min em cada intervalo. As amostras foram secadas ao ponto crítico no equipamento CPD 030-Balzers e metalizadas com ouro no equipamento Sputter Coater SCD 050-Balzers, para posterior visualização no microscópio de varredura JSM 840A (Báo, 2007).

3.3 Cinética de Indução Enzimática em Meio Contendo Bagaço de Cana

A curva de indução enzimática, foi feita em 300mL de Meio Sintético –MS (Suárez *et al.* 2005), que continha: 0,68 g/L KH_2PO_4 ; 0,87g/L K_2HPO_4 ; 1,7g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2g/L KCl; 0,2g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2g/L CaCl_2 ; 2×10^{-3} g/L ZnSO_4 ; 2×10^{-3} g/L FeSO_4 ; 2×10^{-3} g/L MnSO_4 , pH 6,0 adicionado com bagaço de cana 1%(m/v), como fonte de carbono, temperatura de 28°C, e agitação constante de 150 rpm, utilizando um inóculo de 10^8 esporos/mL de *T. harzianum*. Atividades de CMCase, Xilanase, FPase, e proteína total pelo método de Bradford (Bradford, 1976) foram dosadas ao longo de 15 dias. A curva de indução foi realizada em triplicata.

3.4 Produção de Secretomas

T. harzianum foi cultivado durante 6 dias a 28°C em placas de Meio Sintético-MS, adicionadas com 1% da respectiva fonte de carbono (glicose, celulose, xilana ou bagaço de cana). Após o crescimento em meio sólido, os esporos de *T. harzianum*, foram recolhidos, usando 15 mL da solução de NaCl 0,9%(m/v), até obter uma suspensão de 10^8 esporos/mL para cada cultivo.

Uma suspensão conidial de 5 mL, foram utilizados para inocular 300 mL do meio MS suplementado com a respectiva fonte de carbono, considerando uma triplicata para cada crescimento. Os meios inoculados foram levados a incubação em agitação constante de 150 rpm durante 9 dias a 28°C.

Finalizado o tempo de incubação os meios crescidos foram retirados, e filtrados em papel filtro (Whatman No. 1), a fim de reter a massa do fungo. Os filtrados obtidos foram preservados a -20°C (Fig. 1).

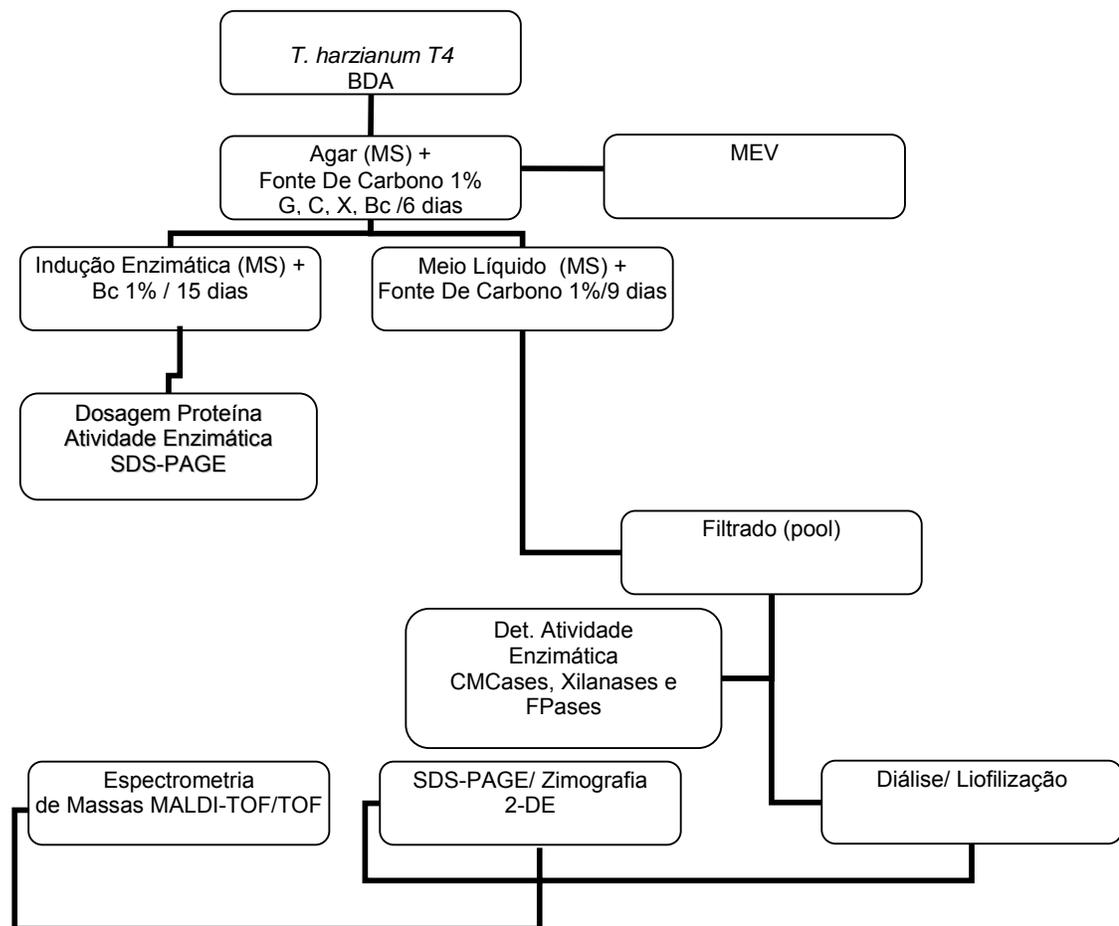


Figura 3- Metodologia utilizada na produção e análise dos secretomas produzidos por *T. harzianum*

3.5 Determinação da Atividade Enzimática dos Filtrados das Culturas

A partir dos filtrados das triplicatas do crescimento em meio líquido foi feito um pool que foi posteriormente utilizado para determinação das atividades enzimáticas, as quais estavam baseadas na quantificação de açúcares redutores produzidos nos ensaios de acordo com Miller (1959). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata. A atividade xilanolítica dos filtrados de *T. harzianum*,

foi dosada utilizando-se xilana como substrato. Resumidamente, 100µL de solução de xilana 1% foram adicionados com 50µL do filtrado seguidos de incubação a 50°C durante 30 min. Transcorrido o tempo de reação, foram adicionados 300µL de DNS, e os tubos contendo as amostras foram fervidos por 10 min. Finalmente 1500µL de água destilada, foram adicionados. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a λ_{540} (Miller, 1959). Para determinação de endoglucanases foi utilizado como substrato uma solução de carboxi metil celulose (CMC) 1%(m/v). A reação incluiu 50µL do filtrado e 100µL de solução de CMC1%(m/v) seguida de incubação a 50°C durante 30 min. Posteriormente 300µL de DNS foram adicionados a cada tubo e finalmente fervidos durante 10 min. Um volume de 1500µL de água destilada, foi adicionado para posterior leitura no espectrofotômetro a λ_{540} . Cada atividade foi expressa como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol do açúcar redutor. $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ (Unidade Internacional).

Para a determinação de atividades de celulases totais sobre papel de filtro (FPase) utilizaram-se como substrato tiras de papel filtro Whatman No. 1 de 1x6 cm. Assim, 150µL do extrato de *T. harzianum* foram utilizados em cada reação. Após 60 min de incubação a 50°C, 300µL de DNS foram adicionados a cada tubo que posteriormente foram fervidos durante 10 min. 1500µL de água destilada, foram adicionados para posterior leitura no espectrofotômetro a λ_{540} . Indicando-se uma Unidade Internacional de FPase como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol do açúcar redutor. $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ (Mendels *et al.* 1976).

3.6 Preparo das Amostras

O pool dos filtrados obtidos a partir de cada meio de cultivo foram dialisados, utilizando-se uma membrana de celulose Sigma[®] com um *cutoff* de 10000 Da. As membranas foram inicialmente lavadas com abundante água destilada, e posteriormente colocadas numa solução de 2%(m/v) de NaHCO₃ e

1mmol/L de EDTA, durante 2 h a 60°C, ao final das 2 h, as membranas foram novamente lavadas com água destilada e dispuseram-se 2 mL dos extratos, por cada 2 cm da membrana. A diálise foi feita contra água destilada, durante 4 h a 4°C, trocando a água destilada a cada hora. 3,5mL de cada amostra dialisada foram distribuídos em tubos de hemólise, e secados o vácuo em Speed Vac SC100 Savant®. As amostras foram armazenadas a -20°C.

3.7 SDS-PAGE

As amostras liofilizadas provenientes de um volume original de 3,5 mL de filtrado foram ressuspensas em um volume de 350 µL de água Milli-Q. 10µL de cada amostra concentrada foram aplicadas em cada poço do gel de eletroforese.

A eletroforese em gel SDS-PAGE vertical, foi realizada em géis de 12% poliacrilamida durante 3 h a corrente constante de 20mA no sistema Hoefer®.

3.8 Zimografia

Para a detecção de atividades celulolíticas, CMC 0,1%(m/v), foi adicionada à malha de SDS-PAGE 12% antes da polimerização. Depois da eletroforese, os géis foram incubados numa solução de isopropanol 25% durante 30 minutos a fim de renaturar as proteínas. Posteriormente foram lavados 4 vezes em tampão acetato de sódio 0,1 mol/L pH 5,5. Após de incubação por 1 hora a 50°C, os géis foram corados com solução de Vermelho Congo 0,1% por 30 minutos, e lavados com solução de NaCl 1mol/L, para retirar o excesso de corante. Ácido acético 0,5(v/v) foi utilizado para contrastar o gel, e identificar as bandas (Ratanakhanokchai *et al.* 1999).

3.9 Eletroforese Bidimensional (2-DE)

Para a eletroforese bidimensional, géis de gradiente imobilizado de pH, Immobiline™ Dry Strip 18 cm, foram utilizados, na faixa de pH 3-10 Linear. Amostras dialisadas e liofilizadas (correspondendo a 1 mL de cada amostra) foram ressuspensas em 350 µL de tampão 2DE, composto de DTT 85mmol/L, Triton X-100 2,5%(m/v), IPG buffer pH 3-10 GE® 0,5%(m/v),, uréia 7 mol/L, tiouréia 2 mol/L e isopropanol 10%. A amostra foi aplicada por reidratação *in gel* durante 6 horas a 20°C. A focalização isoelétrica foi realizada no aparelho Ettan IPGphor III GE®, a 20°C, e corrente constante de 50 µA/strip com um total de 33680 Vh, usando as seguintes etapas: *step* 6 h -30 V, *step* 1 h-500 V, *step* 1h – 1000 V *step* 4 h– 8000 V. Após a focalização, os *strips* foram reduzidos em solução de equilíbrio, que continha Tris 1 mol/L pH 8,0 50 mmol/L, uréia 6 mol/L, glicerol 30%(v/v), SDS 2%(m/v), adicionado com 125 mmol/L de DTT, durante 40 min, e posteriormente alquilados na mesma solução de equilíbrio adicionada com acrilamida 300 mmol/L (Mineki *et al.* 2002; Yan *et al.* 1999; Sanchez *et al.* 1997).

Immobiline™ Dry Strip 18 cm pH 4-7 também foram usados a fim de abrir a região ácida dos géis bidimensionais. Os *strips* foram reidratados *over night* a 20°C com 350µL da amostra dissolvida em tampão 2DE que tinha DTT 85mM, Triton X-100 2,5%(m/v), IPG buffer pH 4-7 GE® 0,5%, uréia 7 mol/L, tiouréia 2 mol/L e isopropanol 10%(m/v). A focalização isoelétrica ocorreu a 20°C no suporte Manifold® adaptado ao aparelho Ettan IPGphor III GE® e corrente constante de 75 µA/strip, com um total de 36000 Vh, 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.

Os *strips* 3-10 equilibrados foram transferidos a géis de SDS-PAGE (20 x 20 cm) 12%, enquanto os *strips* 4-7 equilibrados foram transferidos a géis gradiente SDS-PAGE 8-15%. 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 nitrato de prata (Blum *et al.* 1987).

3.10 Análise de Imagens

Os géis foram escaneados no equipamento Image Scanner (Amersham Biosciences) usando o programa PowerLook 1120 (Amersham Biosciences) e as imagens digitais analisadas com o programa *Image Master 2D platinum v. 6.0* com o intuito de quantificar o número total de *spots* presentes em cada gel, assim como de determinar proteínas específicas ou diferencialmente expressas em cada condição de cultura do fungo. Testes estatísticos para análise de variância T-student, ANOVA de uma via e Tukey foram levados a cabo usando o programa estatístico SPSS V. 17 para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à porcentagem de volume dos *spots* correspondentes a cada gel bidimensional.

3.11 Espectrometria de Massas

Os *spots* manualmente excisados a partir dos géis bidimensionais foram decorados com solução de ferrocianeto de potássio 0,5%, tiosulfato de sódio 0,8%(m/v) , e posteriormente submetidos a lavagens sucessivas de acetonitrila-carbonato de sódio. 2 μ l de solução gelada de tripsina modificada (Promega™) (12,5 ng/ μ l) em tampão: 50 mmol/L NH_4HCO_3 , 5mmol/L CaCl_2 , foram utilizados para a digestão triptica dos *spots*. 1 μ L da amostra foi disposto na placa de amostras AnchorChip™ (Bruker), misturado com 1 μ L da solução da matriz HCCA, contendo 20 μ g/ μ L em acetonitrila 70%(m/v) e ácido trifluoroacético 0,1%(m/v).

MALDI-TOF MS e MS/MS dos peptídeos tripticos e fragmentos de íons foram gerados no equipamento Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics). As massas dos espectros foram calibradas externamente com o kit Pep Mix (Promega™). Tanto os peptídeos trípticos quanto os fragmentos de íons obtidos a partir dos MALDI-TOF MS e MS/MS respectivamente, foram usados para a busca das proteínas candidatas na base de dados não redundante NCBI usando o software

MASCOT (Matrix Science), seguindo os seguintes parâmetros de busca: categoria da taxonomia Fungi, erro máximo permitido na massa do peptídeo 0,1Da, oxidação da metionina e consideração de máximo uma perda na clivagem da tripsina.

4. RESULTADOS

4.1 Cultivo de *T. harzianum*

Diferenças macroscópicas no aspecto do isolado de *T. harzianum*, foram evidentes a partir do crescimento nos meios de cultura sólidos que continham meio sintético (MS) adicionado com glicose 1% (m/v), celulose 1%(m/v) , xilana 1%(m/v) ou bagaço de cana 1%(m/v) (Fig. 4).

Tanto a abundância, quanto a cor dos esporos, variaram para cada meio, observando-se no meio que continha glicose 1%(m/v), predominância de esporos de cor amarela, próximas ao ponto de inoculação, e esporos de cor verde nos extremos (Fig. 4A). Colônias pequenas e concêntricas formadas de a partir do ponto de inoculação e predominante aparição de esporos de cor verde oliva foram evidentes no meio que continha celulose 1% (Fig 4B). Crescimento abundante de esporulada verde escura característica da espécie foi observada a partir do crescimento do fungo nos meios contendo xilana 1%(m/v) (Fig 4C) e bagaço de cana 1%(m/v) (Fig 4 D).

A microscopia eletrônica de varredura não evidenciou nenhuma diferença em relação à morfologia dos esporos, os quais mostraram-se elipsoidais, com parede celular regular (Fig.5).

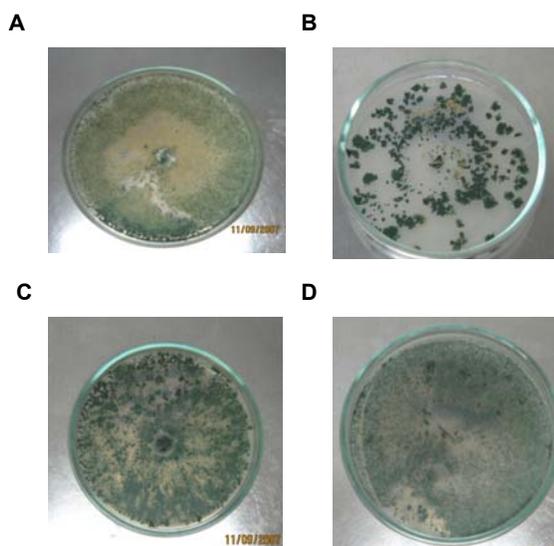


Figura 4 - Vista macroscópica ao sexto dia de crescimento de *T. harzianum* em meio MS contendo (A) glicose 1%, (B) celulose 1%, (C) xilana 1% e (D) bagaçõ de cana 1%.

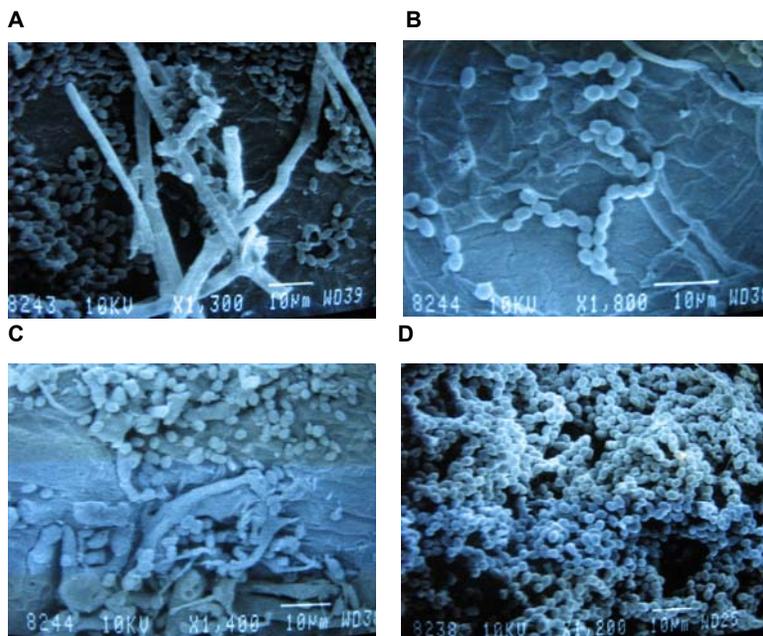


Figura 5 - Microscopia Eletrônica de Varredura. Observação de esporos obtidos dos cultivos de *T. harzianum* em meio sólido contendo (A) glicose 1%, (B) celulose 1%, (C) xilana 1% e (D) bagaçõ de cana 1%

4.2 Curva de Indução Enzimática

A fim de verificarmos as variações do secretoma de *T. harzianum* ao longo do tempo em relação à composição protéica e atividades enzimáticas, o fungo foi crescido em meio contendo bagaço de cana 1%(m/v) por um período de 15 dias. O perfil eletroforético das amostras não evidenciou nenhuma banda correspondente ao primeiro dia de crescimento e após o segundo dia, o perfil de bandas mostrou-se qualitativamente constante ao longo do tempo, havendo, porém um aumento na intensidade das bandas até os dias 8 e 9 e uma posterior diminuição até o 15º dia (Fig.6). As atividades enzimáticas (CMCase, xilanase e FPase) mantiveram-se praticamente constantes a partir do dia 2 (Fig.7), enquanto a curva de concentração de proteínas apresentou comportamento similar (Fig.8).

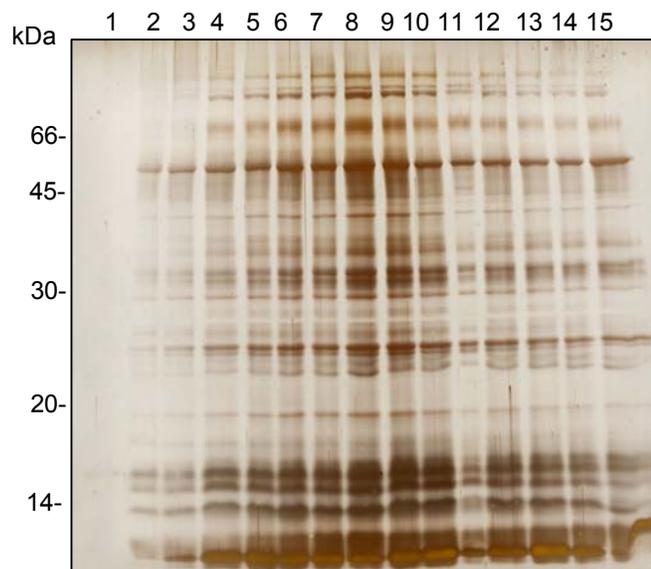


Figura 6- Perfil protéico em SDS-PAGE 12% do crescimento de *T. harzianum* em bagaço de cana 1% durante 15 dias.

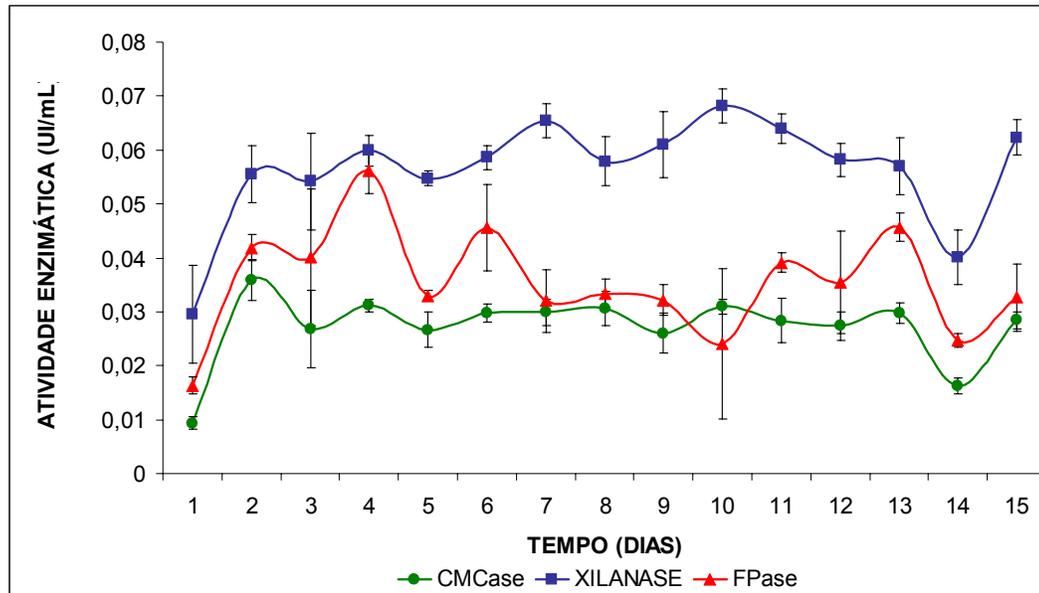


Figura 7 – Cinética de produção enzimática de CMCases, Xilanases e FPases, de *T. harzianum*, durante 15 dias de cultivo, utilizando bagaço de cana 1% como fonte de carbono

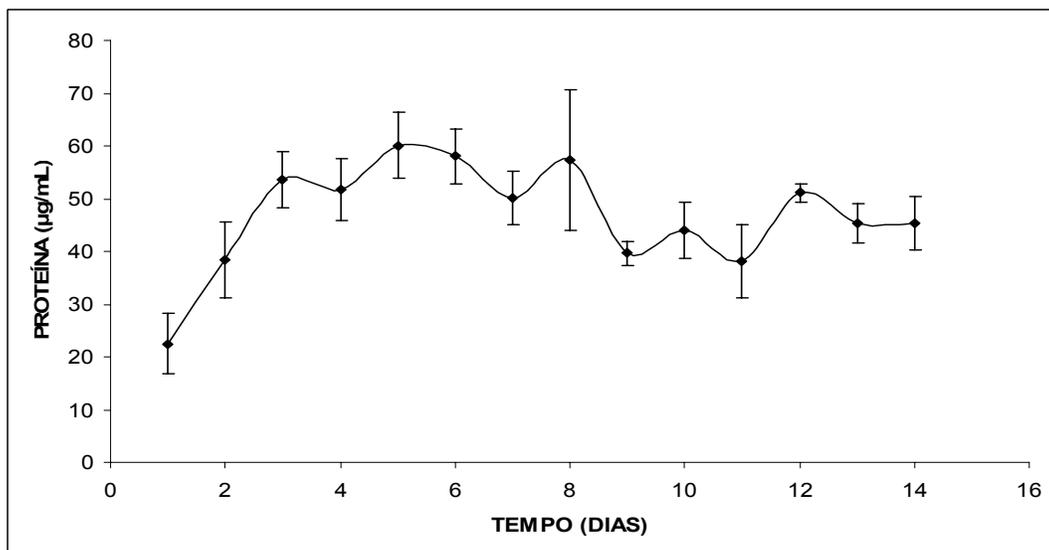


Figura 8 - Concentração de proteínas (µg/mL) durante 15 dias de cultivo de *T. harzianum*, utilizando bagaço de cana 1 % como fonte de carbono

4.3 Atividades Celulolítica e Xilanolítica de *T. harzianum*

O crescimento de *T. harzianum* em meio líquido contendo as diferentes fontes de carbono foi levado a cabo durante 9 dias e os filtrados resultantes das culturas (contendo os respectivos secretomas) foram submetido a ensaios enzimáticos. Atividade xilanolítica de cada filtrado foi dosada, observando-se a maior atividade xilanolítica (0,095UI/mL) no meio que continha bagaço de cana 1%(m/v) como fonte de carbono, seguido pelo meio suplementado com xilana 1 % (m/v) (0,049UI/mL), celulose 1%(m/v) (0,035UI/mL) e em último lugar o meio adicionado com glicose que também mostrou atividade xilanolítica (0,006UI/mL) (Tabela 1 e Fig. 7).

Endoglucanases e celulases totais foram quantificadas nos ensaios de CMCases e FPases respectivamente. A atividade de CMCCase, foi semelhante (0,032 UI) nos meios adicionados com celulose 1%(m/v) e bagaço de cana 1%(m/v). Por outro lado, a atividade de CMCCase mostrou-se bem menor no meios que continham xilana 1%(m/v) (0,009UI/mL) e glicose 1%(m/v) (0,004UI/mL). No meio que continha bagaço de cana 1%(m/v) como fonte de carbono, detectou-se a mais alta atividade de FPases (0,06UI/mL), seguido do meio adicionado com celulose 1% (m/v) (0,034UI/mL), e xilana 1%(m/v) (0,019UI/mL), e por último, uma menor atividade da FPase foi detectada no meio que tinha glicose 1%(m/v) como fonte de carbono (0,009UI/mL)(Fig.7)

Tabela 1. Quantificação da atividade enzimática dos filtrados de *T. harzianum*

Fonte de Carbono	Xilanase (UI/mL)	CMCcases (UI/mL)	FPase (UI/mL)
MS+ Xilana 1%	0,04918	0,00974	0,01923
MS+ Celulose 1%	0,03528	0,03288	0,03406
MS+Glicose1%	0,00610	0,00497	0,00926
MS+ Bagaço de Cana 1%	0,09514	0,03257	0,06353

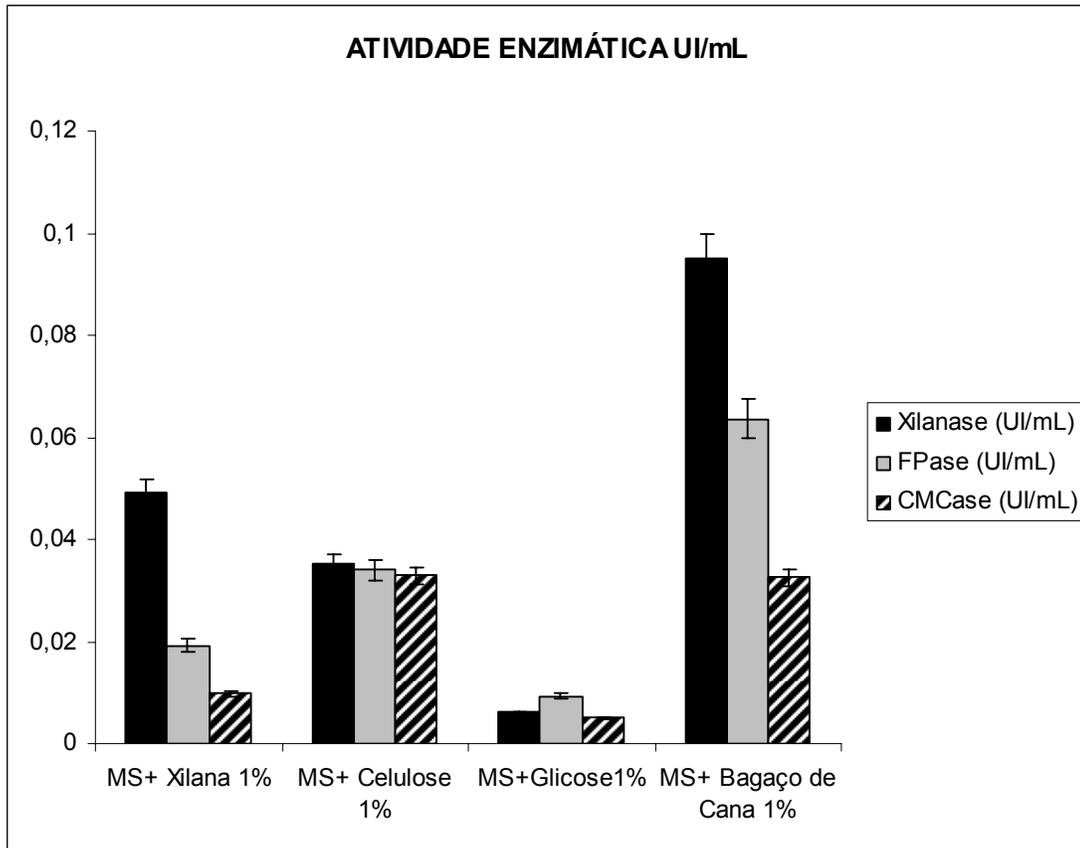


Figura 9 – Detecção da atividade enzimática (UI/mL) dos filtrados de *T. harzianum*

4.4 SDS-PAGE

A eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) das proteínas secretadas por *T. harzianum* durante nove dias de crescimento nas quatro diferentes fontes de carbono, revelou perfis protéicos característicos para cada amostra (Fig 10). Algumas bandas estavam presentes em mais de uma amostra, enquanto outras eram exclusivas ou muito mais expressas em um determinado secretoma. Foi observado que a amostra proveniente da cultura em glicose mostrou um perfil protéico mais simples do que as demais. Por outro lado, a amostra crescida em

meio contendo xilana mostrou mais bandas que as amostras coletadas dos meios contendo celulose e bagaço de cana.

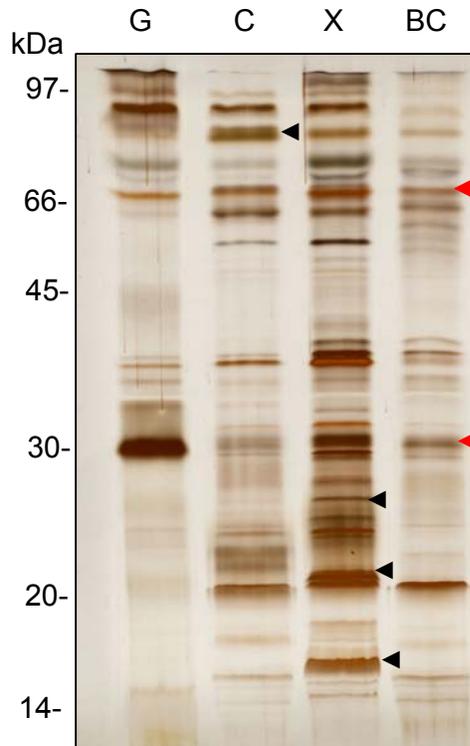


Figura 10 - Perfil protéico em SDS-PAGE 12% dos filtrados de *T. harzianum*, obtidos a partir do crescimento nos meios com (G) glicose 1%; (C) celulose 1%; (X) xilana 1% e (BC) bagaço de cana 1%. Setas pretas (▲) indicam exemplos de bandas exclusivas. Setas vermelhas (▲) mostram bandas presentes em todas as amostras.

4.5 Atividade enzimática *in gel*

Bandas protéicas contendo atividade enzimática sobre o substrato CMC foram detectadas em zimogramas onde géis de SDS-PAGE contendo CMC foram corados com *Congo Red*. Como se pode visualizar na Fig. 11, enzimas com

atividade sobre CMCase (celulases) foram detectadas nas amostras crescidas em celulose e bagaço de cana. Nenhuma atividade enzimática foi detectada por esta metodologia para as amostras dos extratos obtidos em glicose e xilana.

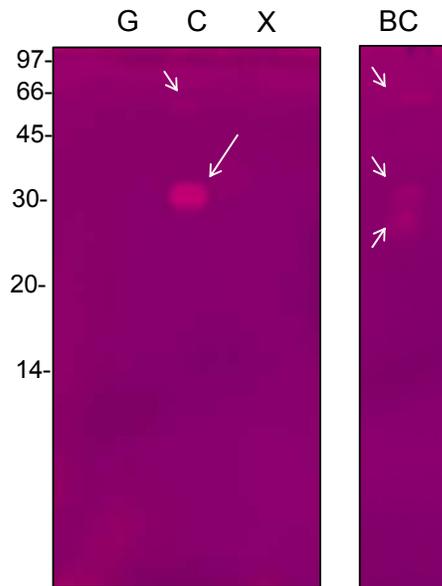


Figura 11 - Zimograma para atividade de CMCase das amostras obtidas a partir do crescimento de *T. harzianum* em meio contendo (G) glicose 1%, (C) celulose 1% e (X) xilana 1% e (B) bagaço de cana 1%.

4.6 Perfis bidimensionais dos secretomas

Os perfis bidimensionais dos secretomas de *T. harzianum* nas diferentes fontes de carbono foram obtidos na faixa de pH 3-10 (Fig. 12). Em concordância com os resultados de SDS-PAGE, a amostra proveniente da cultura em glicose apresentou um perfil protéico bem mais simples que as demais. De um modo geral, pôde-se perceber um maior número de spots na faixa ácida de pH dos géis 2-DE, o que dificultou a resolução dos mesmos. Também foram observados

conjuntos de *spots* de mesma massa e diferentes pI/s, indicando serem isoformas do mesmo polipeptídio (Fig. 12).

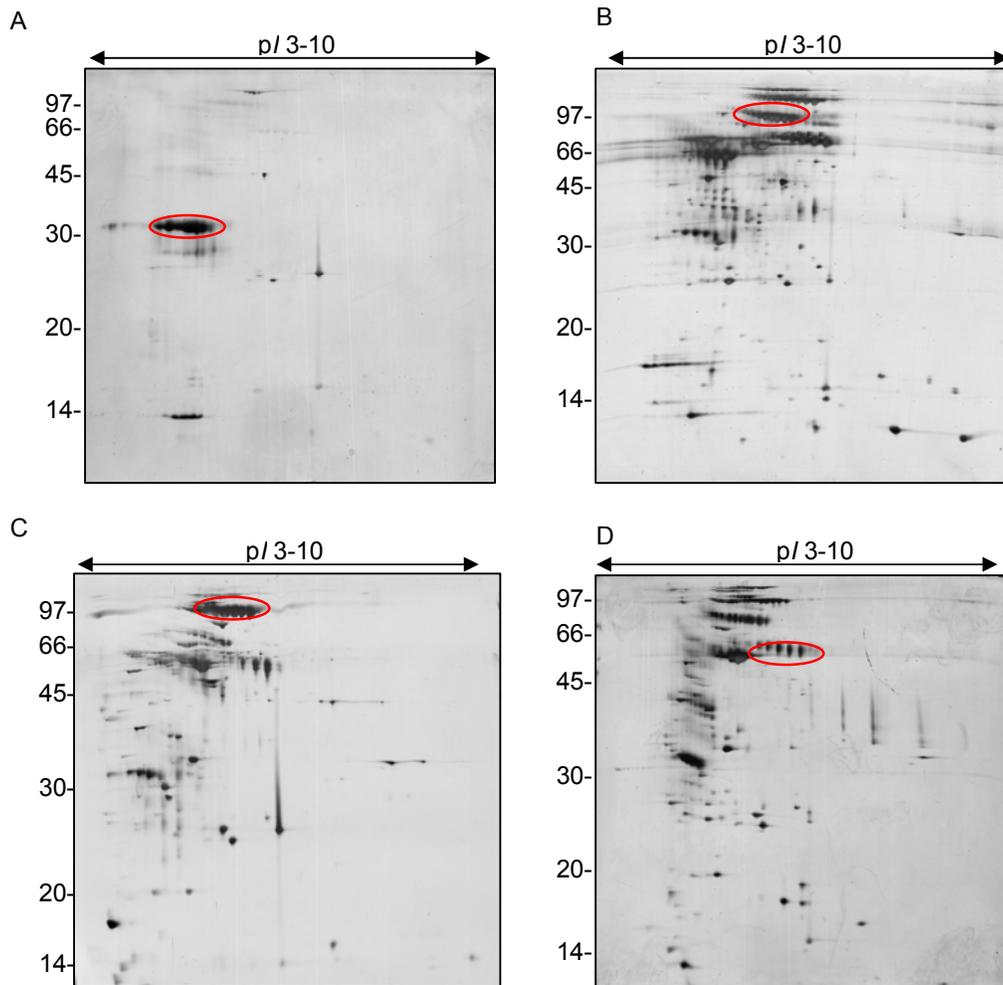


Figura 12 - Perfil bidimensional do secretoma de *T. harzianum* cultivado em (A) glicose 1%, (B) celulose 1%, (C) xilana 1% ou (D) bagaço de cana 1%. Cada gel correu em strips pH 3-10 de 18 cm, na primeira dimensão e SDS-PAGE 12%, na segunda dimensão. Exemplos de conjuntos de spots correspondendo a possíveis isoformas estão circutados

A fim de melhorar a resolução dos *spots* na região ácida dos géis, foram feitas eletroforeses bidimensionais, utilizando uma faixa de pH de 4-7 na etapa de isoeletrofocalização (IEF) e géis de gradiente 8-15% poliacrilamida na segunda dimensão o que proporcionou uma melhoria significativa na resolução dos géis (Figs. 13-16)

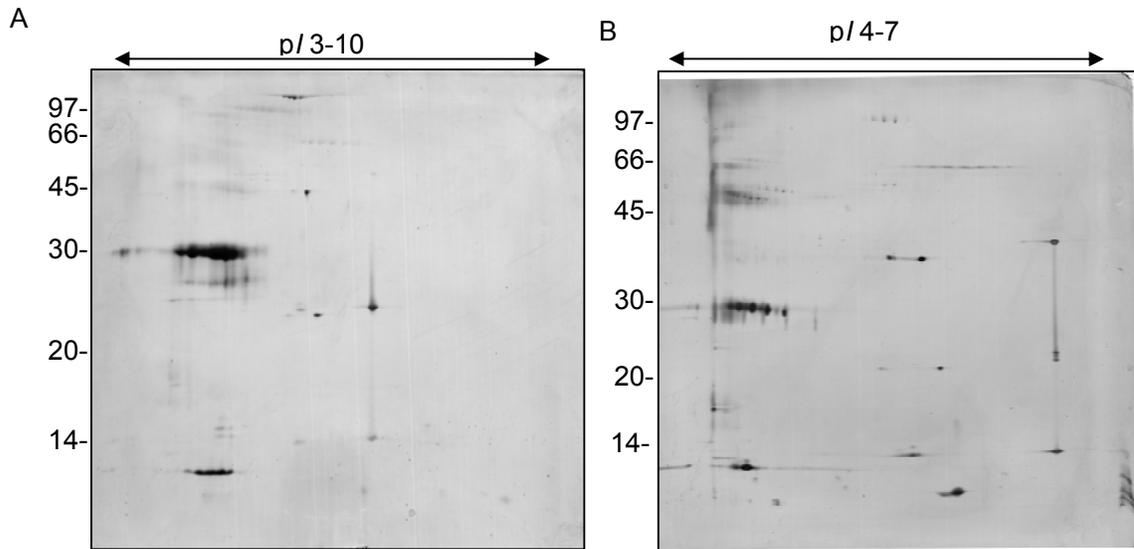


Figura 13- Perfil bidimensional do secretoma de *T. harzianum* cultivado em glicose 1% (A) Este gel correu em strips pH 3-10 de 18 cm, na primeira dimensão e SDS-PAGE 12%, na segunda dimensão. (B) Ampliou-se a região ácida usando strips pH 4-7 na primeira dimensão, e SDS-PAGE 8-15% na segunda dimensão. Amostras correspondem a 110 μ L de filtrados dialisados e liofilizados.

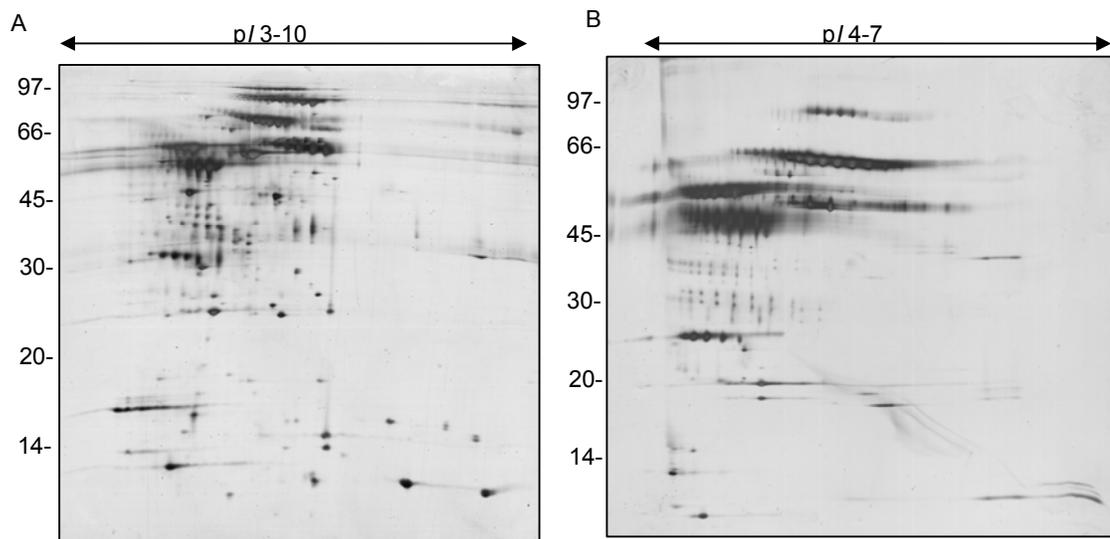


Figura 14 - Perfil bidimensional do secretoma de *T. harzianum* cultivado em celulose 1% (A) Este gel correu em strips pH 3-10 de 18 cm, na primeira dimensão e SDS-PAGE 12%, na segunda dimensão. (B) Ampliou-se a região ácida usando strips pH 4-7 na primeira dimensão, e SDS-PAGE 8-15% na segunda dimensão. Amostras correspondem a 110 μ L de filtrados dialisados e liofilizados.

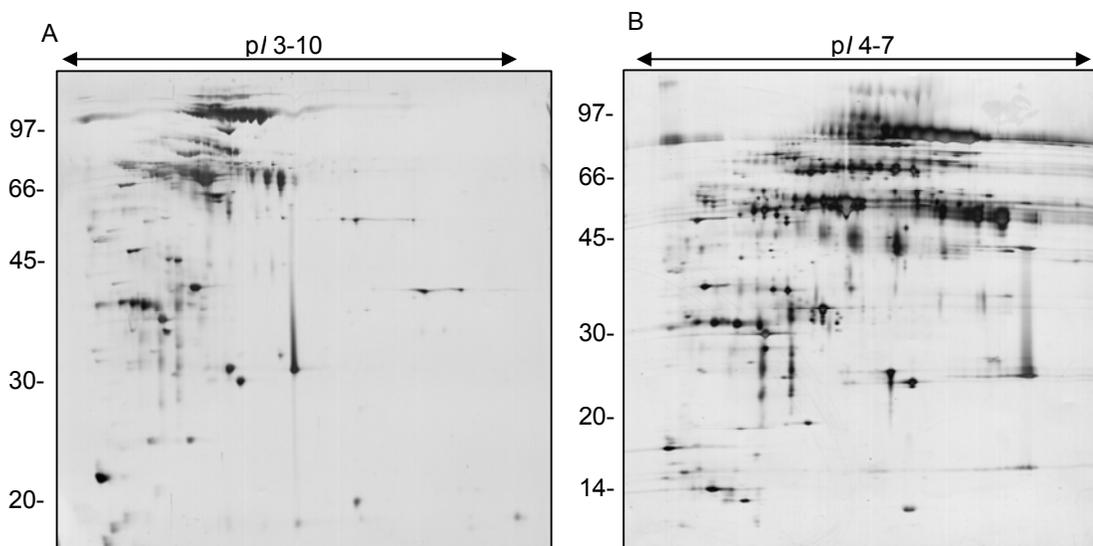


Figura 15 - Perfil bidimensional do secretoma de *T. harzianum* cultivado em xilana 1%. (A) Este gel correu em strips pH 3-10 de 18 cm, na primeira dimensão, e SDS-PAGE 12% na segunda dimensão. (B) Ampliou-se a região ácida usando strips pH 4-7 na primeira dimensão, e SDS-PAGE 8-15% na segunda dimensão. Amostras correspondem a 110 μ L de filtrados dialisados e liofilizados.

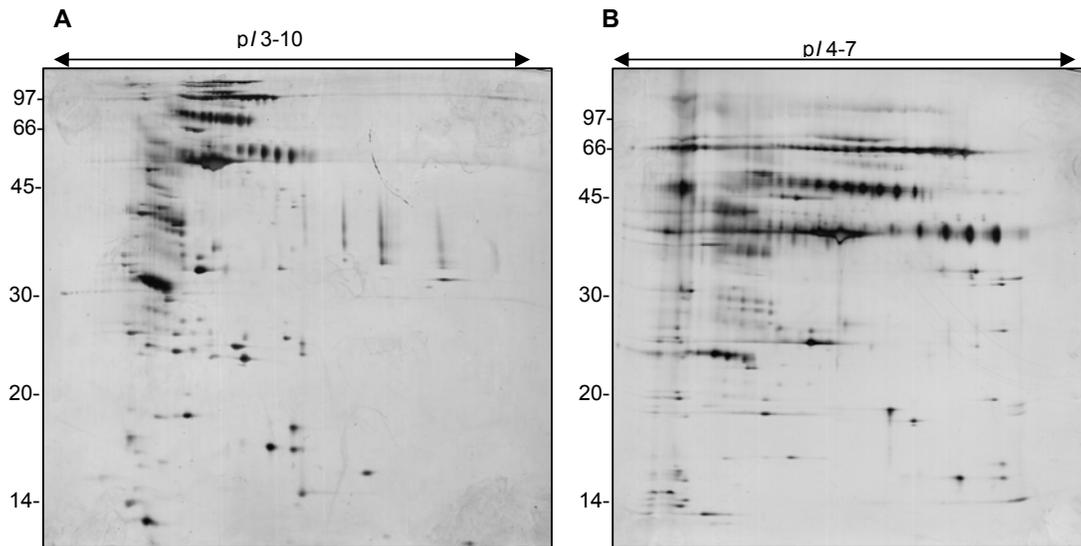


Figura 16 - Perfil bidimensional do secretoma de *T. harzianum* cultivado em bagaço de cana 1%. (A). Este gel correu em strips pH 3-10 de 18 cm, na primeira dimensão, e SDS-PAGE 12% na segunda dimensão. (B) Ampliou-se a região ácida usando strips pH 4-7 na primeira dimensão, e SDS-PAGE 8-15% na segunda dimensão. Amostras correspondem a 110 μ L de filtrados dialisados e liofilizados.

4.7 Análise de Imagens

Utilizando-se o programa *Image Master Platinum v.6* foi possível a detecção de 95 spots na triplicata dos géis do secretoma de *T. harzianum* crescido em glicose 1%(m/v) como fonte de carbono. Dos 95 spots detectados, 32 apareceram exclusivos para esta condição (Tabela 2).

Quando celulose 1%(m/v) foi usada como fonte de carbono, o perfil bidimensional do secretoma de *T. harzianum* mostrou 300 *spots* totais detectados na triplicata dos géis, 229 dos quais se identificaram exclusivos para a condição (Tabela 2).

O perfil bidimensional do secretoma de *T. harzianum* crescido em xilana 1%(m/v) como fonte de carbono, mostrou 565 *spots* comuns as triplicatas dos géis, sendo 470 exclusivos à condição (Tabela 2).

Quando bagaço de cana 1%(m/v) foi usado como fonte de carbono, o secretoma de *T. harzianum* mostrou 379 *spots* totais detectados nos géis correspondentes à triplicata, dos quais 280 indicaram-se exclusivos (Tabela 2).

Quando o perfil 2-DE do secretoma produzido em glicose foi comparado com os demais géis 2-DE, detectaram-se em comum 15 *spots* com o gel do secretoma produzido em celulose (Fig. 17), 33 *spots* com o gel de xilana (Fig. 16) e 21 *spots* com o gel de bagaço de cana (Fig. 19). Na comparação entre o perfil 2-DE do secretoma de celulose com bagaço de cana e xilana foram detectados 36 e 20 *spots* em comum respectivamente. (Fig. 20, Fig. 21). Os perfis bidimensionais dos secretomas obtidos a partir do cultivo em bagaço de cana e xilana mostraram 42 proteínas em comum nas duas fontes de carbono (Fig. 22).

Tabela 2. Determinação de *spots* totais, *spots* exclusivos e diferencialmente expressos nos géis 2-DE dos secretomas de *T. harzianum*. Para a contagem de *spots* e pareamento dos géis utilizou-se o *software* Image Master Platinum v.6. Os *spots* diferencialmente expressos entre cada dupla de géis foram determinados pelo teste T-student ($p < 0,05$).

	Spots Totais	Spots Exclusivos	Spots Diferencialmente expressos / Spots Pareados			
			Glicose 1%	Celulose 1%	Xilana 1%	Bagaço de cana 1%
Glicose 1%	95	32	*	3/15	6/33	4/21
Celulose 1%	300	229	3/15	*	4/20	7/36
Xilana 1%	565	470	6/33	4/20	*	8/42
Bagaço de cana 1%	379	280	4/21	7/36	8/42	*

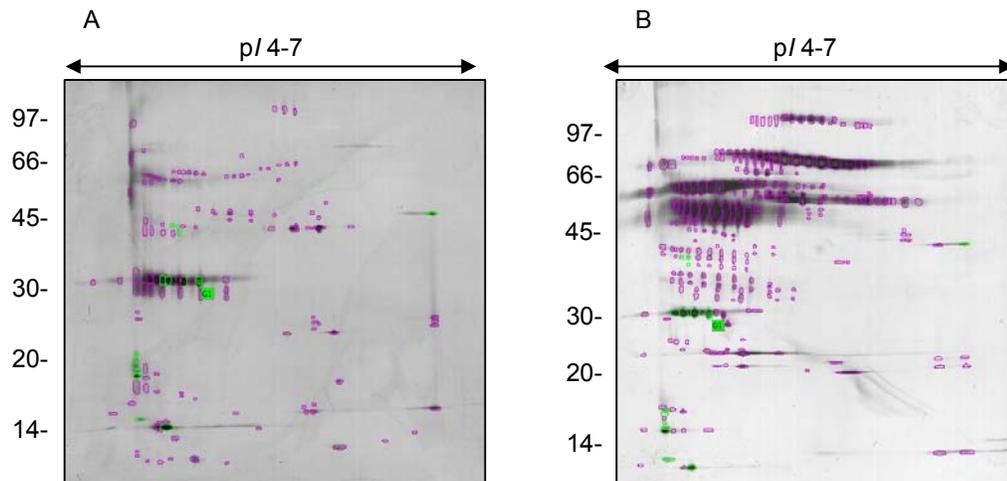


Figura 17 - *Spots* exclusivos (roxo) e pareados (verde) nos perfis bidimensionais do secretoma de *T. harzianum* cultivado em (A) glicose 1% e (B) celulose 1% como fonte de carbono.

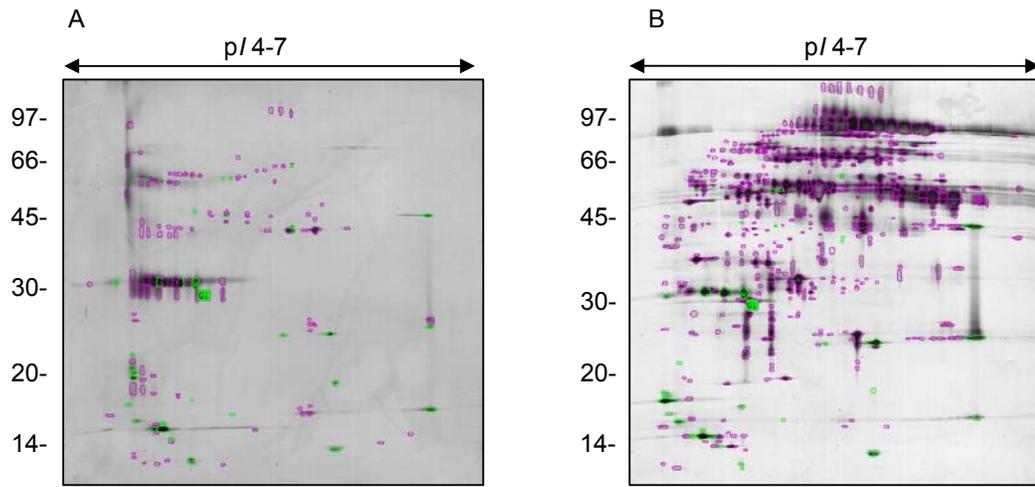


Figura 18 - Spots exclusivos (roxo) e pareados (verde) nos perfis bidimensionais do secretoma de *T. harzianum* cultivado em (A) glicose 1% e (B) xilana 1% como fonte de carbono.

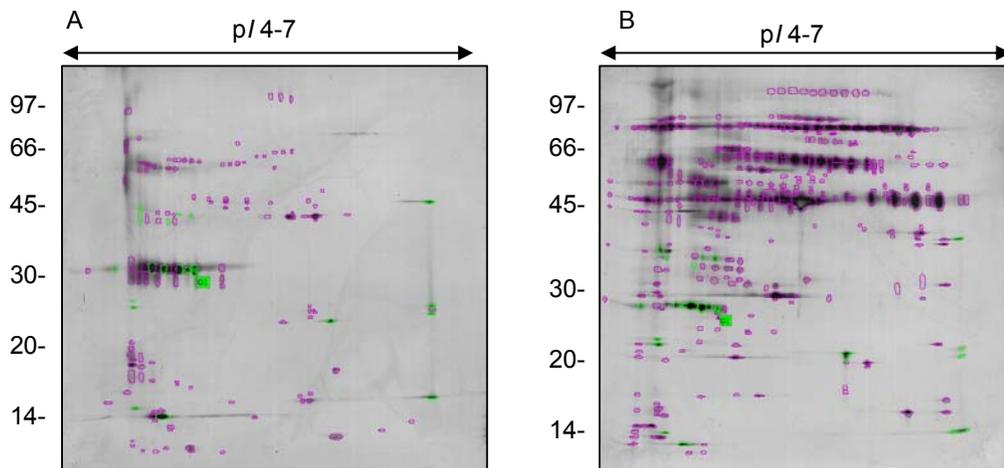


Figura 19 - Spots exclusivos (roxo) e pareados (verde) nos perfis bidimensionais do secretoma de *T. harzianum* cultivado em (A) glicose 1% e (B) bagaço de cana 1% como fonte de carbono.

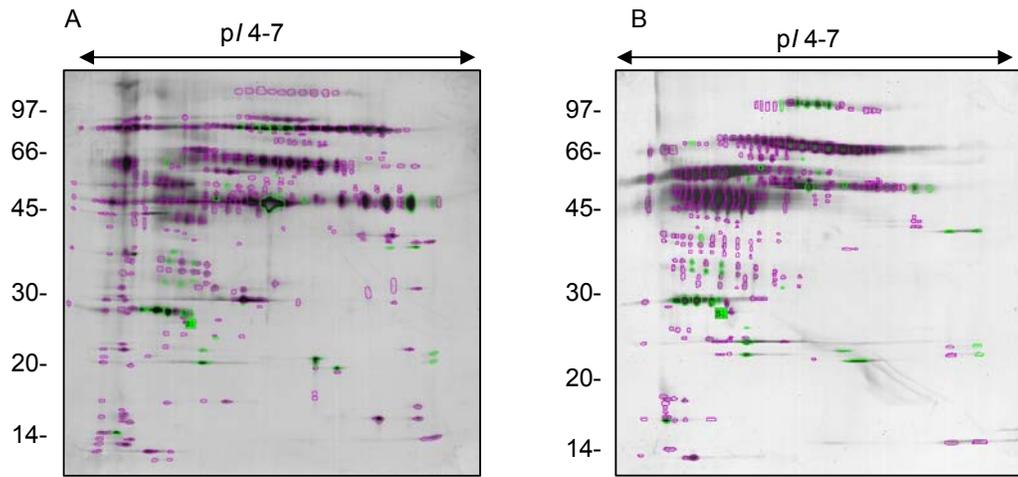


Figura 20 - Spots exclusivos (roxo) e pareados (verde) nos perfis bidimensionais do secretoma de *T. harzianum* cultivado em (A) bagaço de cana 1% e (B) celulose 1% como fonte de carbono.

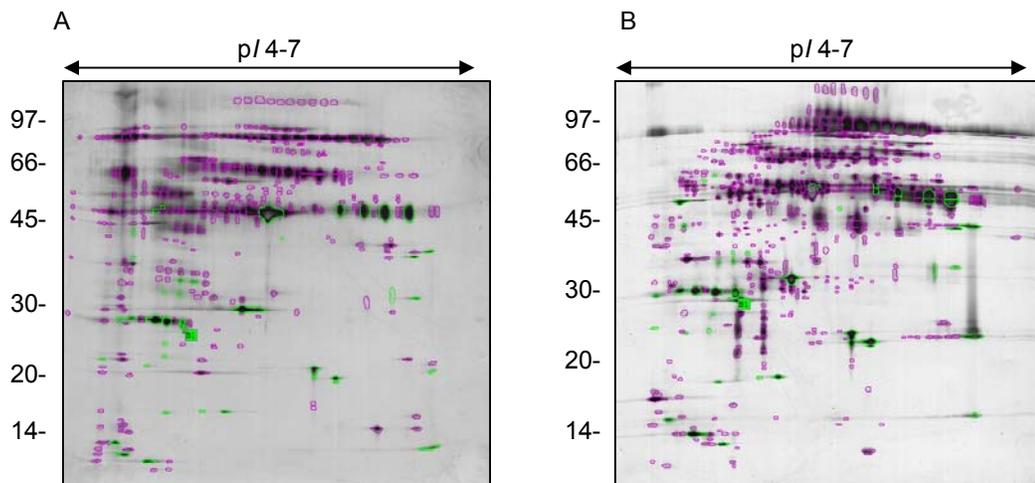


Figura 21 - Spots exclusivos (roxo) e pareados (verde) nos perfis bidimensionais do secretoma de *T. harzianum* cultivado em (A) bagaço de cana 1% e (B) xilana 1% como fonte de carbono.

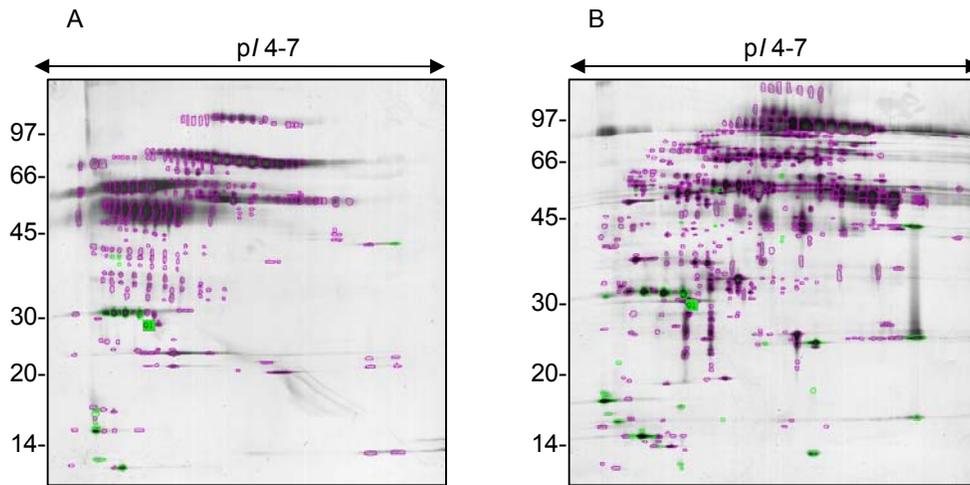


Figura 22- Spots exclusivos (roxo) e pareados (verde) nos perfis bidimensionais do secretoma de *T. harzianum* cultivado em (A) celulose 1% e (B) xilana 1% como fonte de carbono.

4.8 Espectrometria de Massas MALDI TOF/TOF

Um total de 14 spots foram excisados manualmente a partir do gel bidimensional do secretoma de *T. harzianum* cultivado em bagaço de cana 1%(m/v), e analisados por MALDI-TOF/TOF, conseguindo-se a identificação de apenas duas proteínas (Fig. 20). Uma delas correspondeu à enzima alfa-arabinofuranosidase do fungo *Aureobasidium pullulans*, (Fig. 23) e a outra à N-acetil- β -D-glucosaminidase de *T. harzianum* (Fig. 24) (Tabela 3). As proteínas identificadas foram sinalizadas no gel bidimensional correspondente.

Tabela 3. Proteínas identificadas a partir do perfil bidimensional do secretoma de *T. harzianum* cultivado em bagaço de cana 1% como fonte de carbono

Proteína	(Mr)	pI	Z score	Número de acessos NCBI	Organismo	Peptídeos Pareados (%)
Alfa arabinofuranosidase	52410	5,35	45	AAR87863	<i>A. pullulans</i>	20/118(16,94%)
N-acetil-β-D-glucosaminidase	64990	5,58	37	AAB50829	<i>T. harzianum</i>	14/91(15,38%)

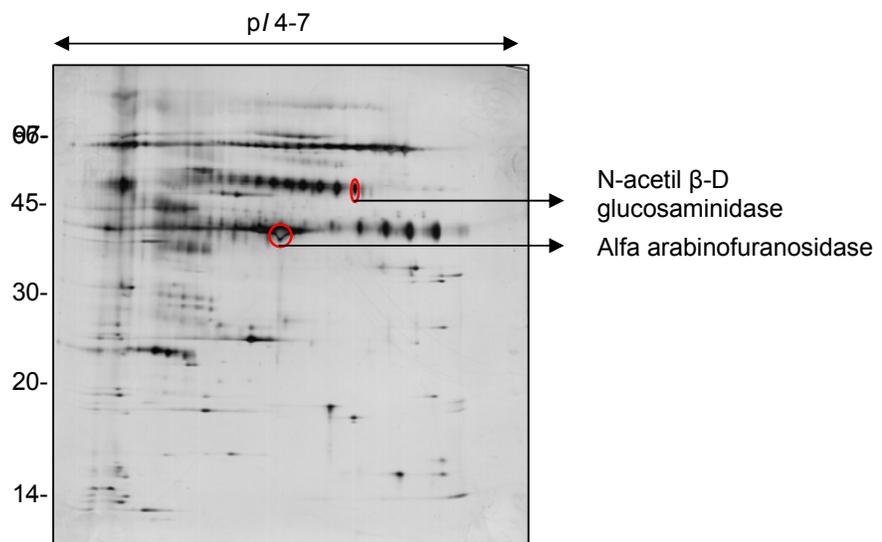


Figura 23 - Proteínas identificadas no perfil bidimensional de *T. harzianum* em bagaço de cana

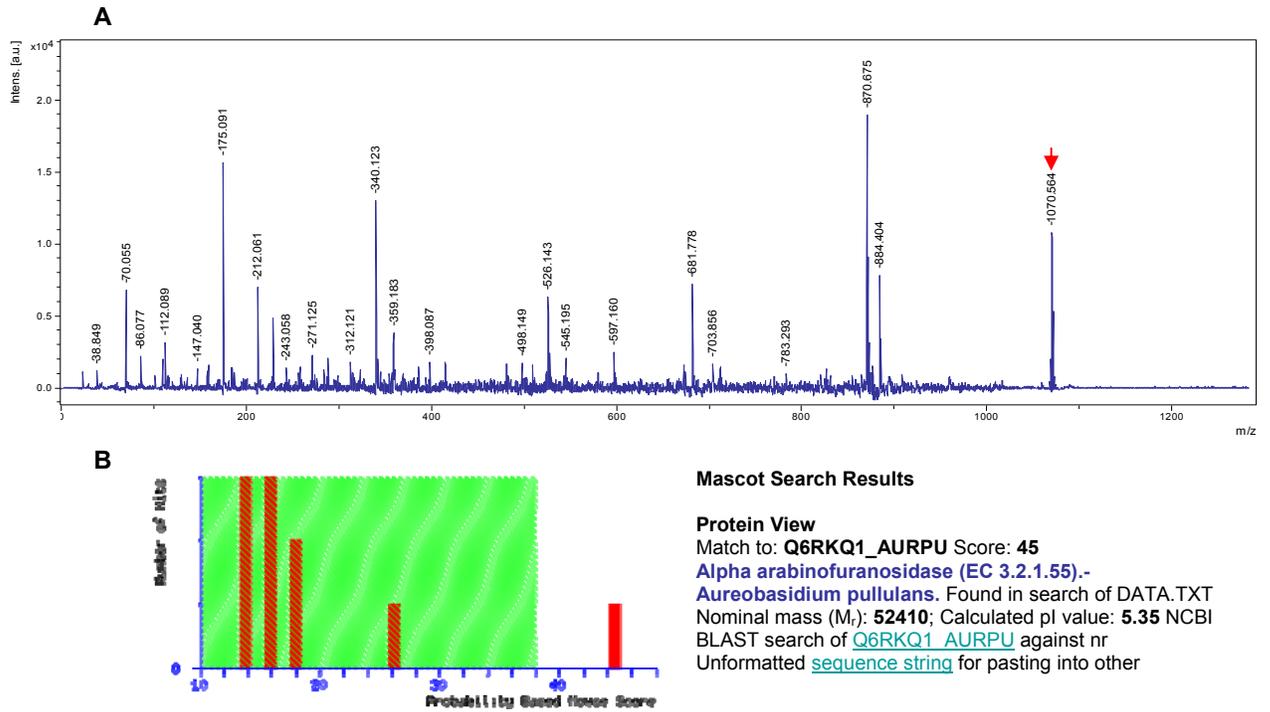


Figura 24- Identificação da alfa-arabinofuranosidase. (A) Espectro MS/MS de um dos peptídios da proteína. Seta vermelha mostra *parent ion* e (B) Resultado da busca no programa MASCOT

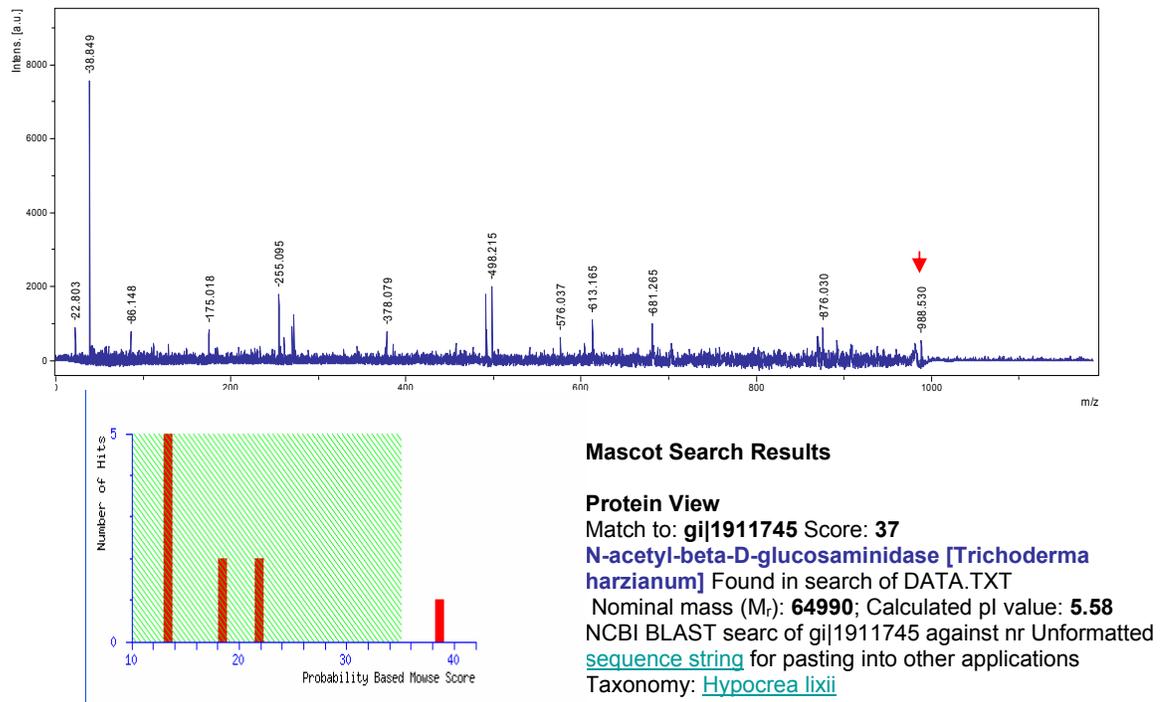


Figura 25- Identificação da N-Acetil- β -D-glucosaminidase. (A) Espectro MS/MS de um dos peptídios da proteína. Seta vermelha mostra *parent ion* e (B) Resultado da busca no programa MASCOT

5. DISCUSSÃO

O secretoma do fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* é um conjunto dinâmico de complexos protéicos que apresenta variações como conseqüência às alterações ambientais, por exemplo em relação à fonte de carbono. Tais mudanças no tipo de enzimas e mecanismos de controle na produção das mesmas pode ser melhor caracterizado por estratégias proteômicas.

Com o intuito de incrementar o nosso conhecimento sobre os mecanismos que regulam a expressão de proteínas em *T. harzianum*, estudamos com ajuda de técnicas enzimológicas e proteômicas, a resposta que aparece no secretoma de *T. harzianum*, como conseqüência do crescimento tanto em fontes de carbono quimicamente definidas quanto em materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana, abundante resíduo agrícola e de interesse na produção de etanol de segunda geração.

Portanto neste projeto foi desenvolvida uma metodologia para analisar como a síntese de proteínas e especificamente de enzimas extracelulares do tipo celulasas e xilanases no fungo filamentoso *T. harzianum*, estava relacionada à fonte de carbono adicionada a um meio de cultura baseado em sais e microelementos, a partir do qual foram avaliados aspectos como desenvolvimento macroscópico e microscópico do fungo em meio sólido, comportamento na produção de proteínas ao longo do tempo, atividade enzimática e perfis bidimensionais do secretoma de *T. harzianum* em relação à presença de glicose, celulose, xilana e bagaço de cana.

A produção de esporos por *T. harzianum* que ocorre durante a conidiogênese é uma etapa fisiológica importante na reprodução assexual do fungo. No presente trabalho, quando glicose foi usada como fonte de carbono, houve produção de esporos amarelos, no caso da celulose a distribuição do crescimento caracterizou-se por ser irregular e escassa em contraste com os

meios adicionados com xilana e bagaço de cana, onde maior quantidade de esporos foram recolhidos. Nossos resultados corroboram observações anteriores de que diversos fatores físico-químicos, ambientais e nutricionais, como a fonte de carbono, relação carbono/nitrogênio, temperatura, luz, pH, humidade, aeração e presença de sais, influenciam a cinética de esporulação do fungo (Roussos *et al.* 1989).

Em este estudo, a produção enzimática de *T. harzianum* sobre bagaço de cana, foi avaliada durante 15 dias, tendo como finalidade padronizar as condições de cultura, perfil de produção protéica e tempo de coleta do secretoma, evidenciando que ao decorrer do tempo, pouca variação ocorria em relação à concentração e produção de proteínas e que entre os dias 7 e 9 se detectava a máxima atividade enzimática. Pesquisas feitas por, Rezende *et al.* (2002) também indicaram a máxima produção de xilanases e β -xilosidases ao sétimo dia de cultivo em culturas de *T. harzianum* sobre diferentes concentrações de bagaço de cana, indicando 20% do substrato como a concentração que mais favoreceria a produção enzimática.

Nos fungos filamentosos a disponibilidade de fontes de carbono mais facilmente metabolizáveis também regula a produção de enzimas hidrolíticas e, portanto a utilização de substratos poliméricos. Este mecanismo conhecido como repressão catabólica garante que não ocorra produção de enzimas hidrolíticas em presença de substratos simples (Mach *et al.* 1996).

No presente trabalho, atividades xilanolítica e celulolítica foram detectadas, mesmo no meio suplementado com glicose como fonte de carbono, resultado semelhante ao indicado por Seyis *et al.* (2005), no fungo *T. viride*, indicando uma possível produção constitutiva da xilanase. Outras pesquisas associadas a atividades xilanolíticas constitutivas em *Trichoderma* sp, (Mach *et al.* 2003; Mach *et al.* 1996) comprovaram que níveis basais de atividade xilanolítica, corresponderiam à atividade da xilanase Xyn 2, cuja transcrição não estaria afetada pela presença de glicose no meio de cultura, mas que teria seus níveis de

expressão aumentados na presença de xilana, xilobiose e sofrorose, em parte devido à presença de proteínas reguladoras da xilanase como a Xyr1/Xyl1, responsáveis pela ativação de mais de 10 genes envolvidos na degradação da xilana e da celulose (Royer *et al.* 1990). Por outro lado, a expressão da xilanase Xyn 1 está submetida a repressão total quando só glicose estiver presente no meio como fonte de carbono.

A provável produção celulolítica constitutiva em *Trichoderma* sp, poderia estar associada à presença de celobiohidrolases I e II na superfície dos conídios do fungo, segundo testes imunológicos feitos por Messner *et al.* (1991). Assim, tais enzimas unidas aos conídios realizariam a degradação inicial da celulose, gerando indutores para a biossíntese de celulases, o que poderia explicar a detecção de atividade celulolítica no meio contendo glicose 1%(m/v). Essa expressão constitutiva tem sido igualmente indicada por diversos autores mediante uso de anticorpos e análise da expressão de genes associados às celulases (Henrique-Silva *et al.* 1996; El-Gogary *et al.* 1989).

Como esperado também foi detectada atividade celulolítica no meio contendo celulose, evidente mediante a técnica de zimografia, aparecendo principalmente uma banda de atividade, abaixo dos 30kDa. Este teste também permitiu a detecção de três bandas de atividade na amostra proveniente do crescimento em bagaço de cana.

Também observamos que a atividade xilanolítica em meio contendo apenas celulose foi maior do que aquela encontrada em meio de glicose. Estudos recentes com o fungo *T. reesei*, mostraram que há atividade xilanolítica mesmo quando o fungo é crescido em celulose ou misturas de polímeros vegetais (Stricker *et al.* 2008). A cultura de *T. reesei* sobre celulose ou xilana, originou a formação de duas endoxilanasas (Xyn 1 e Xyn 2) e uma única endoglucanase (Egl 1). Aplicando sofrorose, considerado indutor natural na formação de celulases, só uma das xilanasas (Xyn 2) e a endoglucanases foram detectadas,

enquanto a xilobiase induziu a formação dos dois tipos de endoxilanasas e β -xilosidase, mas não de endoglucanases.

As maiores atividades xilanolíticas e celulolíticas que incluíram resultados positivos na detecção *in gel* de CMCases, como mostrado mediante a técnica de zimografia, foram observadas quando o *T. harzianum* foi cultivado em meio com bagaço de cana. Se considerarmos a proximidade dos polímeros de celulose e hemicelulose na parede celular vegetal não são surpreendente que atividade xilanolítica e celulolítica de *T. harzianum* estejam relacionadas. Na natureza estas hidrolases trabalham sinergisticamente a fim de conseguir a completa degradação dos biopolímeros presentes nos substratos. Segundo pesquisas realizadas em diferentes espécies do gênero *Trichoderma* sp, estes mostram alta atividade enzimática em presença de materiais heterogêneos lignocelulósicos como a polpa de madeira (Stricker *et al.* 2006), o que está de acordo com nossos resultados.

Análises por SDS-PAGE e 2-DE, mostraram as mudanças que ocorrem na secreção de proteínas por *T. harzianum* como consequência do cultivo em cada fonte de carbono, observando-se que o maior número de spots detectados pelo programa *Image Master*, apareceram no secretoma obtido em xilana. A amostra do meio contendo glicose produziu um perfil unidimensional menos complexo assim como poucos *spots* no perfil 2-DE, evidenciando claramente o efeito da repressão catabólica por glicose ao qual o fungo estaria submetido em esta condição. Os géis para cada fonte de carbono mostraram tanto *spots* exclusivos, quanto *spots* comuns entre as diferentes condições, encontrando-se que grande maioria dos spots detectados no gel de glicose correspondiam a *spots* que achavam-se igualmente nas outras fontes de carbono assim como semelhante número de *spots* comuns entre os géis de celulose, xilana e bagaço de cana.

Nos géis 2-DE os *spots* achavam-se concentrados principalmente na região ácida do gel, onde isoformas também foram evidentes. Pesquisas feitas

por Suarez *et al.* (2005) em relação ao proteoma extracelular de *T. harzianum*, também demonstraram a influência que tem o substrato na secreção de proteínas, achando diferenças significativas nos géis bidimensionais obtidos após o crescimento do fungo em presença de diferentes paredes celulares fúngicas e quitina. Estes resultados igualmente mostraram grande concentração das proteínas secretadas na região de pH de 4-7, assim como a aparição de isoformas de alta massa molecular.

Outras pesquisas em secretômica de fungos filamentosos também demonstraram a influência que diferentes substratos exercem sobre a secreção de proteínas, como o observado por Medina (2004), no fungo *Aspergillus flavus* a partir do cultivo em glicose, BDA e rutina, revelando por 2-DE a produção de proteínas extracelulares exclusivas e comuns para cada fonte de carbono que apareciam mais abundantemente na faixa de pH 4-7.

A espectrometria de massas em Tandem (MS/MS) permitiu a identificação de duas proteínas a partir do perfil bidimensional de *T. harzianum* quando cultivado em bagaço de cana 1%(m/v), a primeira **alfa-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)** identificada a partir do fungo *Aureobasidium pullulans*, pertence à família das hidrolases, participa no metabolismo de açúcares agindo sobre o extremidade não redutora dos alfa-L-arabinofuranosidos, alfa-L-arabinanas, arabinoxilanas e arabinogalactanas, liberando alfa-L-arabinanos e L-arabinose (Fig. 20).

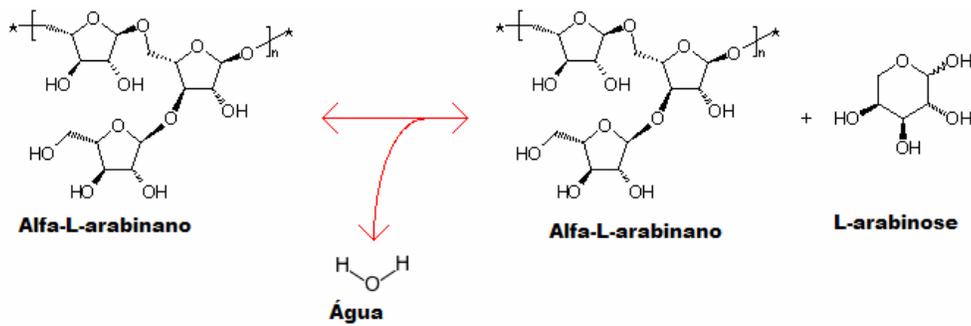


Figura 26 - Reação catalisada pela enzima alfa-L-arabinofuranosidase

Recentemente a enzima alfa-L-arabinofuranosidase tem recebido atenção a nível industrial, principalmente pelo papel que desempenha como enzima acessória, clivando na extremidade não redutora das ligações arabinofuranósicas de diferentes polissacarídeos como arabinanas ramificadas e não ramificadas, e heteropolissacarídeos como arabinogalactanas, arabinoxilanas, arabinoxiloglucanes e glucoarabinoxilanes, agindo sinergisticamente e facilitando a ação de outras hemicelulases e pectinases durante o pré tratamento da lignocelulose para a produção de bioetanol (Numan *et al.* 2006)

A segunda enzima correspondeu à **N-acetil-β-D-glucosaminidase (E.C. 3.2.1.30)** de *T. harzianum*, enzima do complexo quitinolítico que participa da degradação da quitina, homopolímero linear, insolúvel, formado por unidades monoméricas de N-acetil glicosamina, unidas por ligações β 1-4 e que encontra-se como componente estrutural do exoesqueleto de insetos e parede celular de fungos. A N-acetil-β-D-glucosaminidase é produzida pelos fungos filamentosos durante a formação de hifas e septos e esta associada à patogenicidade e ação biocontroladora do fungo (Ulhoa *et al.* 1993)

A identificação das proteínas visualizadas nos géis bidimensionais, foi dificultada pela não disponibilidade do genoma seqüenciado de *T. harzianum* nas bases de dados, e provavelmente pela presença de glicosilações

encontradas em grande parte das proteínas secretadas por fungos filamentosos (Denier *et al.* 2003; Desphande *et al.* 2008, Kruszewska *et al.* 2008).

A glicosilação proporciona às proteínas secretadas, estabilidade e resistência a condições ambientais como temperaturas elevadas, pH e ataques proteolíticos (Valkonen, 2003), porém esta proteção necessária para a supervivência das proteínas representa vários obstáculos na identificação por 2-DE e MALDI-TOF MS.

Nas proteínas secretadas por fungos filamentosos 50% da massa molecular total da proteína pode corresponder a carboidratos (Iwashita, 2002). Esta glicosilação pode ocasionar que boa parte das proteínas glicosiladas não consiga entrar ao IPG strip e portanto ocorra uma perda na qualidade do espectro de massas devido à baixa quantidade de proteína presente (Medina, 2004). Além disso, em alguns casos a glicosilação protege a proteína contra a proteólise, fazendo com que digestão previa à MS seja ineficiente. A glicosilação de uma proteína também pode explicar parcialmente a heterogeneidade no pI da proteína, com a formação de múltiplas isoformas, (Pakula *et al.* 2000) como observado nos perfis bidimensionais do secretoma de *T. harzianum* na nossa pesquisa. Finalmente os N-oligossacarídeos podem dificultar a análise dos peptídios por MALDI -TOF MS devido ao grande incremento na massa molecular dos glico peptídios (Medina, 2004).

6. CONCLUSÕES

- A constância na produção de celulases e xilanases, assim como no perfil eletroforético, foram evidenciadas a partir do crescimento contínuo e monitorado de *T. harzianum* em bagaço de cana 1%(m/v) como fonte de carbono durante 15 dias
- Glicose, celulose, xilana e bagaço de cana, quando usadas como fonte de carbono em cultivo submerso em concentração de 1%, geraram diferenças notáveis na colonização do substrato, atividade enzimática do fungo *T. harzianum* e nos perfis 2-DE dos secretoma.
- A atividade xilanolítica foi a maior atividade enzimática detectada em amostras de filtrados de *T. harzianum* após o crescimento nas diversas fontes de carbono
- Atividades constitutivas de xilanases e celulases foram observadas nos filtrados obtidos a partir do crescimento de *T. harzianum* em glicose como fonte de carbono.
- As maiores atividades enzimáticas foram detectadas nas amostras provenientes de crescimento em meio contendo bagaço de cana.
- Espectrometria de Massas MALDI TOF/TOF permitiu a identificação de duas proteínas Alfa arabinofuranosidase e N-acetil-β-D-glucosaminidase associadas ao metabolismo de carboidratos e glicoproteínas em fungos filamentosos.
- A análise proteômica iniciada neste trabalho contribuiu para uma melhor compreensão da complexidade do secretoma de *T. harzianum* e de suas variações em resposta a diferentes substratos lignocelulósicos.

7. PERSPECTIVAS

Com o intuito de complementar e dar continuidade aos resultados mostrados anteriormente, se propõem as seguintes perspectivas:

- Finalizar a construção dos mapas secretômicos de *T. harzianum* otimizando a identificação de proteínas por espectrometria de massas através do uso de novos protocolos de preparação de amostra, incluindo de-glicosilação e purificação de peptídios em matrizes especiais.
- Caracterizar as isoformas protéicas observadas nos mapas secretômicos
- Analisar o secretoma de *T. harzianum* após o cultivo do fungo em meios sólidos.
- Verificar a expressão diferencial de genes codificantes para enzimas hidrolíticas secretadas, utilizando técnicas transcriptômicas e confrontar os resultados com aqueles obtidos através da proteômica.

8. BIBLIOGRAFIA

Adrio, J., & Demain, A. 2003. Fungal Biotechnology. **International Microbiology.** 6: 191-199

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. Introductory Micology, 4th Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York

Asif, A.R., Oellerich, M., Armstrong .V,W., Riemenschneider, B., Monod M., & Reichard, U. 2007. Proteome of Conidial Surface Associated Proteins of *Aspergillus fumigatus* Reflecting Potential Vaccine Candidates and Allergens. **Journal of Proteome Research.** 4:954–962

Báo. S.N. Curso de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Laboratório de Microscopia Eletrônica-Instituto de Ciências Biológicas, UnB. Agosto, 2007.

Bhadauria, V., Popescu, L., Zhao, W., & Peng, Y. 2007. Fungal Transcriptomics. **Microbiological Research.** 162: 285-298

Bhat, M.K. 2000. Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology. **Biotechnology Advances.** 18: 355-383

Blum, H., Beier, H., & Gross, H. Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. 1987. **Electrophoresis.** 8: 93-99

Bouws, H., Wattenberg, A., & Zorn, H. 2008. Fungal secretomes—Nature’s Toolbox for White Biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 80: 381-388

Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. 72: 248-254.

Bruneau, J.M., Magnin, T., Tagat, E., Legrand, R., Bernard, M., Diaquin, M., Fudali, C., & Latge, J.P. 2001. Proteome Analysis of *Aspergillus fumigatus* Identifies Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins Associated to the Cell Wall Biosynthesis. **Electrophoresis**. 13:2812–2823

Cacais, A., Silveira, F., Filho, E. 2001. Production of Xylan-Degrading Enzymes by a *Trichoderma harzianum* Strain. **Brazilian Journal of Microbiology**. 32: 141-143.

Carberry, S., Neville, C.M., Kavanagh, K.A., & Doyle, S. 2006. Analysis of Major Intracellular proteins of *Aspergillus fumigatus* by MALDI Mass Spectrometry: Identification and Characterization of an Elongation Factor 1B Protein With Glutathione Transferase Activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 341: 1096-1104

Carberry, S., & Doyle, E. 2007. Proteomic Studies in Biomedically and Industrially Relevant Fungi. **Cytotechnology**. 53: 95-10

Chaverri, P., & Samuels, G. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota Hypocreales, Hypocreaceae): Species with Green Ascospores. **Mycologia**. 95(6): 1100-1140

Chaverri, P., & Samuels, G. 2002. *Hypocrea lixii*, the Telomorph of *Trichoderma harzianum*. **Mycological Progress**. 3: 283-286

Deshpande, N., Wilkins, M.R., Packer, N., & Nevalainen, H. 2008. Protein Glycosylation Pathways in Filamentous Fungi. **Glycobiology**. 18(8): 626-637.

Diener, S.E., Dunn-Coleman, N., Foreman, P., Houfek, T.D., Teunissen, P.J.M., van Solingen, P., Dankmeyer, L., Mitchell, T.K., Ward, M., &

El-Gogary, S., Leite, A., Crivellaro, O., Eveleigh, E., & El-Dorry H. 1989. Mechanism by Which Cellulose Triggers Cellobiohydrolase I Gene Expression in *Trichoderma reesei*. **Proc Natl Acad Sci USA**. 86:6138–6141

Fernández-Acero, F.J. 2007. Proteomic Analysis of Phytopathogenic Fungus *Botrytis cinerea* as a Potential Tool for Identifying Pathogenicity Factors, Therapeutic Targets and for Basic Research. **Arch. Microbiol**. 187: 207–215

Ferreira, H., & Filho, E. 2004. Purification and characterization of a β -Mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. **Carbohydr. Polym**. 57: 23-29

Gohl, M., Srinivas, R., Dammertz, W., Udupa, M.R., & Panda, T. 1998. Localization of β -1,3-glucanase in *Trichoderma harzianum*. **Bioprocess Engineering**. 19: 237-241

Grinyer, J., McKay, M., Nevalainen, H., & Herbert, N. 2004-a. Fungal Proteomics: Initial Mapping of Biological Control Strain *Trichoderma harzianum*. **Current Genetics**. 45: 163-169

Grinyer, J., McKay, M., Nevalainen, H., & Herbert, N. 2004-b. Fungal Proteomics: Mapping the Mitochondrial Proteins of a *Trichoderma harzianum* Strain Applied for Biological Control. **Current Genetics**. 45: 170-175

Grinyer, J., Kautto, L., Traini, M., Willows, R.D., Te'o, J., Bergquist, P., & Nevalainen, H. 2007. Proteome Mapping of the *Trichoderma reesei* 20S Proteasome. **Current Genetics**. 51: 79-88.

Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M., Mateos, P., Bridge, P., Monte, E., & Garcia-Acha, I. 1997. Physiological and Biochemical Characterization of *Trichoderma harzianum*, a Biological Control Agent Against Soilborne Fungal Plant Pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**. 63(8): 3189-3198

Hamelinck, C., van Hooijdonk, G., Faaij, A. 2005. Ethanol From Lignocellulosic Biomass: Techno-Economic Performance in Short-, Middle- and Long-Term. **Biomass and Bioenergy**. 384-410

Henrique-Silva, F., El-Gogary, S., Carle-Urioste, J.C., Matheucci, E., Crivellaro, O., El-Dorry, H. 1996. Two Regulatory Regions Controlling Basal and Cellulose Induced Expression of the Gene Encoding Cellobiohydrolase I of *Trichoderma reesei* are Adjacent to its TATA box. **Biochem Biophys Res Commun**. 228:229-237

Hernández-Macedo, M.L. 2002. Iron-Regulated Proteins in *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*: Differential Analysis by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis Profiles. **Electrophoresis**. 23: 655-661

Kim, Y., Nandakumar, M.P., & Marten, M.R. 2007. Proteomics of Filamentous Fungi. **Trends in Biotechnology**. 25(9): 395-400

Kruszewską, J.S., Perlińska-Lenart, U., Górka-Nieć, W., Orłowski, J., Zembek, P., & Palamarczyk, G. 2008. Alterations in Protein Secretion Caused by Metabolic Engineering of Glycosylation Pathways in Fungi. *Acta Biochimica Polonica*. 55(3): 1-10

Kuçuk, C., Kivanc, M., Kinaci, E., & Kinaci, G. 2007. Biological Efficacy of *Trichoderma harzianum* Isolate to Control Some Fungal Pathogens of Wheat (*Triticum aestivum*) in Turkey. **Biologia, Bratislava.** 3: 283-286

Lin, W.Y., Chang J.Y., Hish, C.H., & Pan, T.M. Profiling the *Monascus pilosus* Proteome during Nitrogen Limitation. 2008. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 56: 433-441.

Lynd, L., Weimer, P., vann Zyl, W., & Pretorius, I. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** 66(3): 506-577

Mach,R,L., Strauss, J., Zeilinger, S., Schindler, M & Kubicek, C.P. 1996. Carbon Catabolite Repression of Xylanase I (*xynI*) Gene Expression in *Trichoderma reesei*. **Molecular Microbiology.** 21(6): 1273-1281

Mach, R.L., & Zeilinger, S. 2003. Regulation of Gene Expression in Industrial Fungi: *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 60: 515-522

Marra, R., Ambrosino, P., Carbone, V., Vinale, F., Woo, S., Ruocco, M., Ciliento, R., Lanzuise, S., Ferraioli, S., Soriente, I., Gigante, S., Turrá, D., Fogliano, V., Scala, F., & Lorito M. 2006. Study of Three -Way Interaction Between *Trichoderma atroviride*, Plant and Fungal Pathogens by Using a Proteomic Approach. **Curr. Genet.** 50: 307-321

Medeiros, R., da Silva Jr, F., Bão, S., Hanada, R., & Filho, E. 2007. Application of Xylanases from Amazon Forest Fungal Species in Bleaching of Eucalyptus Kraft Pulps. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** 25(2): 221-228.

Medina, M. 2004. Proteomic Analysis of Differentially Expressed Secreted Proteins from *Aspergillus flavus*. Dissertation for Doctor of Philosophy. Arizona State University.

Mendels, M., Andreotti, R., & Roche, C. 1976. Measurement of Saccharifying Cellulase. **Biotechnology Bioengineering Symposium**. 6: 21-33

Messner, R., & Kubicek, C.P. 1991. Carbon Source Control of Cellobiohydrolase I and II Formation by *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology**. 57(3):630-635

Mineki, R., Taka, H., Fujimura, T., Kikkawa, M., Shindo, N., & Murayama, K. 2002. In Situ, Alkylation with Acrylamide for Identification of Cysteinyll Residues in Proteins During One-and Two-Dimensional Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Proteomics**. 2(12): 1672-1681

Miller, G. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**. 31: 426-428

Murad, A.M., Laumann, R.A., Lima, T., Sarmento, S., Noronha, E.F., Rocha, T.L., Valadares-Inglis, M.C., Franco, O.L. 2006. Screening of Entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* Isolates and Proteomic Analysis of Secretion synthesized in Response to Cowpea Weevil (*Callosobruchus maculatus*) Exoskeleton. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 142: 365-370

Numan, M.Th., & Bhosle, N.B. 2006. α -L-Arabinofuranosidases: The Potential Applications in Biotechnology . **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**. 33:247-260

Oda, K., Kakizono, D., Yamada, O., Iefuji, H., Akita, O., & Iwashita, K. 2006. Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from *Aspergillus oryzae* Grown under Submerged and Solid-State Culture Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**. 72(5): 3448-3457

Papavizas, G. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. **Annual Reviews Phytopathology**. 23: 23-54

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., & Martínez, J. 2002. Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: an Overview. **International Microbiology**. 5 : 53-63

Pereira, J.L., Noronha, E.F., Miller, R.N.G., & Franco, O.L. 2007. Novel Insights in the Use of Hydrolytic Enzymes Secreted by Fungi with Biotechnological Potential. **Letters in Applied Microbiology**. 44: 573-581

Phalip, V., Delalande, F., Carapito, C., Goubet, F., Hatsch., D., Leize-Wagner, E., Dupree, P., Van Dorsselaer, A., & Jeltsch, J. 2005. Diversity of the Exoproteome of *Fusarium graminearum* Grown on Plant Cell Wall. **Current Genetics**. 48: 366-379

Polizeli, M., Rizzatti, A., Monti, R., Terenzi, H., Jorge, J., & Amorim, D. 2005. Xylanases From Fungi: Properties and Industrial Applications. **Applied Microbiology Biotechnology**. 67: 577-591

Rabinovich, M., Melnik, M., & Bolova, A. 2002. Microbial Cellulases (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**. 38(4): 305-321

Ratanakhanokchai, K., Kyu, K., & Tanticharoen, M. 1999. Purification and Properties of Xylan-Binding Endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-1. **Applied Environmental Microbiology**. 65(2): 694-697

Rezende, M., Barbosa, A., Vasconcelos, A., & Endo, A. 2002. Xylanase Production by *Trichoderma harzianum* Rifai by Solid State Fermentation on Sugarcane Bagasse. **Brazilian Journal of Microbiology.** 33: 67-72

Rifai, M. 1969. A Revision of the Genus *Trichoderma*. Mycological Papers. 116: 1-56.

Roussos, S., Aquiahuatl, M. A., Brizuela, M. Olmos, A., Rodriguez, R & Viniegra, G. 1989. Produccion, Conservacion Y Viabilidad De Inoculo de Hongos Filamentosos para las Fermentaciones Solidas. **Micol. Neotrop- Apl.** 2: 3-17.

Royer, J., & Nakas, J. 1990. Interrelationship of Xylanase Induction and Cellulase Induction of *Trichoderma longibrachiatum*. **Applied and Environmental Microbiology.** 56(8): 2535-2539

Rugger, M., & Tornisielo-Tauk, S. 2004. Atividade da Celulase de Fungos Isolados da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica.** 27(2): 205-211

Saddler, J.N., Hogan, C.M., & Louis-Seize, G. 1985. A Comparison between the Cellulase Systems of *Trichoderma harzianum* E58 and *Trichoderma reesei* C30. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 22: 139-145

Samuels, J.G. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the Sexual State and Ecology. **Phytopathology.** 96(2): 195-206

Sanjust, E. Salis, A., Rescigno, A., Curreli, & Rinaldi, A. Note. Xylose Production from Durum Wheat Bran: Enzymic versus Chemical Methods. 2004. **Food Sci Tech Int.** 10(1): 11-14

Sato, S., Liu, F., Koc, H., & Tien, M. 2007. Expression Analysis of Extracellular Proteins from *Phanerochaete chrysosporium* Grown on Different Liquid and Solid Substrates. **Microbiology**. 153: 3023-3033

Sanchez, J., Rouge, V., Pisteur, M., Ravier, F., Tonella, L., Moosmayer, M., Wilkins, M., & Hochstrasser, D. 1997. Improved and Simplified in-Gel Sample Application Using Reswelling of Dry Immobilized pH Gradients. 1997. **Electrophoresis**. 18: 324-327

Schmitt, S., Prokisch, H., Schlunck, T. 2006. Proteome Analysis of Mitochondrial Outer Membrane from *Neurospora crassa*. **Proteomics**. 6:72–80

Selvaraj, V., Rajendran, A., & Thangavelu, V. 2000. Production, Properties and Industrial Applications of Microbial Xylanase.

Seyis, I., & Aksoz, N. 2004. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Xylanase Production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3. **International Biotederioration and Biodegradation**. 55: 115-119

Stevneson, D., & Weimer, P. 2002. Isolation and Characterization of a *Trichoderma* Strain Capable of Fermenting Cellulose to Ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 59: 721-726

Stricker, A.R., Grosstessner-Hain, K., Wurleitner, E., & Mach, R.L. 2006. Xyr1 (Xylanase Regulator 1) Regulates both the Hydrolytic Enzyme System and D-Xylose Metabolism in *Hypocrea jecorina*. **Eukaryotc. Cell**. 5(12): 2128-2137

Stricker, A. R., Mach, R.L., & de Graaff, L.H. 2008. Regulation of Transcription of Cellulases- and Hemicellulases Encoding Genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Applied Microbiology and Biotechnology**. 78:211-220

Suárez, M., Sans, L., Chamorro, M., Rey, M., Gonzáles, F., Llobell, A., & Monte, E. 2005. Proteomic Analysis of Secreted Proteins from *Trichoderma harzianum* Identification of Fungal Cell Wall-Induced Aspartic Protease. **Fungal Genetics and Biology**. 42: 924-934

Tilburg, A., & Thomas, M. 1993. Production of Extracellular Proteins by the Fungus *Gliocladium virens*. **Applied and Environmental Microbiology**. 59(1): 236-242

Tjalsma, H., Bolhuis, Jongbloed, J.D.H., Bron, S., & Van Dijk, J. 2000. Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 64(3): 515-547

Ulhoa, C. J., & Peberdy, J. F. 1993. Effect of carbon sources on chitobiose production by *Trichoderma harzianum*. **Mycol Research**. 97: 45-48

Valkonen, M. 2003. Functional Studies of Secretory Pathway in Filamentous Fungi: The Effect of Unfolded Protein Response on Protein Production. **Espoo 2003. VTT Publications 505**: 114p

Yajina, W., & Kav, N.N.V. 2006. The proteome of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotium*. **Proteomics**. 6:5995–6007

Yan, J., Sanchez, J., Rouge, V., Williams, K., & Hochstrasser, D. Modified Immobilized pH Gradient Gel Strip Equilibration Procedure in SWISS-2D-PAGE Protocols. 1999. **Electrophoresis**. 20(4-5): 723-726