UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos proteômicos de *Aspergillus niveus* para avaliar os efeitos de pH, fontes de carbono e nitrogênio em bioprocessos submersos

JULIANA ABIGAIL LEITE

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos proteômicos de *Aspergillus niveus* para avaliar os efeitos de pH, fontes de carbono e nitrogênio em bioprocessos submersos

JULIANA ABIGAIL LEITE

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos proteômicos de *Aspergillus niveus* para avaliar os efeitos de pH, fontes de carbono e nitrogênio em bioprocessos submersos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientada: Juliana Abigail Leite

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP em 18/04/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

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

LEITE, J. A. Estudos proteômicos de *Aspergillus niveus* para avaliar os efeitos de pH, fontes de carbono e nitrogênio em bioprocessos submersos. Ribeirão Preto, 2018.182 p.: il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.
Orientador: Cabral, Hamilton

1. *Aspergillus niveus* 2. Peptidase 3. Proteômica 4. Efeito de pH 5. Efeito de fontes de carbono 6. Efeito de fontes de nitrogênio 7. Bioprocesso submerso

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Abigail Leite

Estudos proteômicos de *Aspergillus niveus* para avaliar os efeitos de pH, fontes de carbono e nitrogênio em bioprocessos submersos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que sempre providenciou, para que pudesse sonhar, lutar, realizar, aprender, compartilhar e evoluir em todos esses momentos.

Aos meus pais Abelardo Leite Filho e Aparecida Jandira de Morais Leite por toda dedicação, amor, palavras de apoio e incentivo durante todos os anos de minha vida.

Ao Vinicius Silvano, meu esposo, por ter me dado total incentivo, auxílio, palavras de motivação e apoio para que eu pudesse realizar o doutorado, e acima de tudo ao amor, respeito, paciência e dedicação durante todos esses anos.

Aos amigos que conheci no laboratório de Tecnologia Enzimática: Ana Cláudia Siqueira, Luciana Coitinho, Nathalia Garzon, Rafael Pedezzi, Ronivaldo Silva, Sandra Gentil, Tatiane Beltrami e Youssef Neto. Agradeço-lhes pelo convívio nesse período e por todo aprendizado pessoal e profissional que tive com todos vocês. Agradeço, especialmente, à Nathalia pela colaboração inestimável na realização desse trabalho e durante todo o período em que estive no laboratório. Ao Youssef e à Nathalia pela colaboração durante o período das correções finais do trabalho, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Hamilton Cabral pela oportunidade de fazer parte da linha de pesquisa em proteômica de fungos que é desenvolvida no Laboratório de Tecnologia Enzimática sob sua responsabilidade e orientação, além da confiança depositada em mim. Também agradeço por fazer parte da minha caminhada na Pós-graduação desde o mestrado como colaborador do projeto, por ter sido meu orientador no Programa de Atualização e no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

Ao Prof. Dr. José César Rosa por disponibilizar as instalações do Centro de Química de Proteínas do Departamento de biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, para realizar as identificações dos *spots* proteicos por MALDI- TOF/TOF-MS/MS. Agradeço a valiosa colaboração do Prof. Dr. José César Rosa e da Dra. Helen Julie Lauri no auxílio

prestado durante essas análises.
Ao Prof. Dr. Loic Quinton e Prof. Dr. Edwin De Pauw do laboratório de espectrometria de massas de Universidade de Liège e, também, à Luciana Coitinho por terem colaborado nas análises das fontes de nitrogênio realizadas na Bélgica.

A todos os funcionários do Serviço de Pós-graduação da FCFRP-USP pela cordialidade, profissionalismo e colaboração durante a execução desse trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP pela disponibilização de suas instalações na execução desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão de bolsa de estudos e, também, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa desenvolvido (Processo n° 2012/24703-8).

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora coralina

RESUMO

LEITE, J. A. **Estudos proteômicos de *Aspergillus niveus* para avaliar os efeitos de pH, fontes de carbono e nitrogênio em bioprocessos submersos**. 2018. 182 f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Os fungos filamentosos acionam mecanismos eficientes para sobrevivência nas diferentes condições ambientais e modulam, por exemplo, a produção de proteínas. A abordagem proteômica tem sido utilizada com sucesso para investigar os mecanismos fisiológicos envolvidos nas adaptações metabólicas desses microrganismos, frente às mudanças de parâmetros físicos e químicos do meio extracelular. No presente trabalho foi avaliado o efeito das variações de pH, fontes de carbono e nitrogênio (aminoácidos e fontes complexas) sobre a produção de peptidases e sobre o proteoma intra- e extracelular do fungo *Aspergillus niveus* em bioprocessos submersos. As atividades proteolíticas foram avaliadas durante 96 h de cultivo e as melhores induções, entre os estudos comparativos, foram observadas em pH 6, xilose, cisteína e farinha de pena. O efeito dessas variações sobre o proteoma de *A. niveus* foi avaliado em 96 h de cultivo submerso e, para isso, foram realizados estudos proteômicos nos quais os conteúdos proteicos foram avaliados por eletroforese bidimensional (2-DE); e os *spots* proteicos selecionados foram identificados por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF-MS/MS). As proteínas apresentadas no estudo demonstram que as variações de pH, fontes de carbono e nitrogênio influenciaram as proteínas intra- e extracelulares de *A. niveus*. Os perfis de proteínas mostram que os parâmetros avaliados foram capazes de influenciar a síntese ou degradação de polímeros biológicos e a resposta aos efeitos químicos e/ou disponibilidade de nutrientes do meio extracelular modularam proteínas envolvidas em diversas rotas metabólicas. Além disso, a suplementação com fontes de nitrogênio orgânicas promoveram a indução de enzimas com potencial biotecnológico para aplicação industrial, o que reforça a importância dos estudos proteômicos para a determinação do comportamento de fungos filamentosos frente às condições ambientais.

Palavras chave: *Aspergillus niveus*, peptidase, proteômica, efeito de pH, efeito de fontes de carbono, efeito de fontes de nitrogênio, bioprocesso submerso

ABSTRACT

LEITE, J. A. **Proteomic studies of *Aspergillus niveus* to evaluate the effects of pH, carbon and nitrogen sources on submerged bioprocesses**. 2018. 182 f. Doctoral Thesis. School of Pharmaceutical of Ribeirão Preto- Universyty of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The filamentous fungi activate efficient mechanisms to survive in different environment conditions and protein production modulation may be a tool of these survival adaptation. Proteomic approach has been used as methodology to investigate physiological processes related to these microorganism adaptation after chemical and physical changes in extracelullar medium. In this study, the influence of pH variation, carbon and nitrogen sources (amino acid and complex sources) was analyzed on protease production and in intra- and extracellular proteomics of filamentous fungus *Aspergillus niveus* during submerged bioprocess. The proteolytic activities were evaluated for 96 hours of incubation and as the best indutors among those studied, there were proteases in pH 6, xylose, cystein and feather meal conditions. The variation effects over *A. niveus* proteome 96 hours submerged bioprocess was analyzed, the protein contents was separated, evaluated and identified by bidimensional electrophoresys followed by mass spectometry (MALDI-TOF/TOF-MS/MS). The identified proteins showed that bioprocess condition variations could influence on intra- and extracelullar proteins of *A. niveus*. The protein profiles presented a modulation on synthesis and degradation of biological polymers, and on proteins from metabolic pathway in response to chemical effects and/or extracellular nutrient available. Moreover, the supplementaiton with nitrogen sources promoted the production of enzymes with biotechnological potential on industrial application, highlighting the importance of proteomics to determine the filamentous fungus behavior under environment changes.

Keywords: *Aspergillus niveus*, peptidase, proteomics, pH effect, carbon source effect, nitrogen source effect, submerged bioprocess

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fungo *A. niveus* após 7 dias de cultivo em ágar batata a 30ºC **15**

Figura 2 – Efeito de pH sobre o fungo *A. niveus* em bioprocesso submerso. (A) Perfil de produção enzimática em meios de cultura com diferentes faixas de pH. (B) Relação entre acumulado das proteínas intracelulares extraídas da massa micelial e atividade proteolítica, após 96 h de cultivo **29**

Figura 3 – Géis representativos do proteoma intracelular de *A. niveus* crescido em meio com pH 5 (A), pH 6 (D), pH 7 (G) e pH 8 (J). Os *spots* marcados são referentes as proteínas intracelulares identificadas que foram extraídas dos micélios em 96 h de bioprocessos submersos. **32**

Figura 4 – Géis representativos do proteoma extracelular de *A. niveus* crescido em meio com pH 5 (A), pH 6 (D), pH 7 (G) e pH 8 (J). Os *spots* marcados são referentes as proteínas extracelulares identificadas que foram obtidas dos extratos proteicos em 96 h de bioprocessos submersos **45**

Figura 5 – Efeito de fontes de carbono sobre o fungo *A. niveus* em bioprocesso submerso. (A) Perfil de produção enzimática em meios de cultura com diferentes fontes de carbono. (B) Relação entre acumulado das proteínas intracelulares extraídas da massa micelial e atividade proteolítica, após 96 h de cultivo **54**

Figura 6 – Géis representativos do proteoma intracelular de *A. niveus* crescido em meio com glicose (A), lactose (D), frutose (G) e xilose (J). Os *spots* marcados são referentes as proteínas intracelulares identificadas que foram extraídas dos micélios obtidos em 96 h de bioprocessos submersos **56**

Figura 7 – Géis representativos do proteoma extracelular de *A. niveus* crescido em meio com 1% (m/v) com as fontes de carbono frutose (A), glicose (D), xilose (G) e lactose (J). Os *spots* marcados são referentes as proteínas extracelulares identificadas obtidas dos extratos proteicos em 96 h de bioprocessos submersos **67**

Figura 8 – Efeito de fontes de nitrogênio sobre o fungo *A. niveus* em bioprocesso submerso. Perfil de produção enzimática em meios de cultura com diferentes fontes de carbono: (A) aminoácidos; (B) complexas. Relação entre acumulado das proteínas intracelulares extraídas da massa micelial e atividade proteolítica, após 96 h de cultivo: (C) aminoácidos; (D) complexas **74**

Figura 9 - Géis representativos do proteoma intracelular de *A. niveus* crescido em meio com farinha de pena (A), caseína (D) e soro de leite (G). Os *spots* marcados são referentes as proteínas intracelulares identificadas que foram extraídas dos micélios obtidos em 96 h de bioprocessos submersos **77**

Figura 10 - Géis representativos do proteoma intracelular de *A. niveus* crescido em meio com 1% (m/v) com as fontes de nitrogênio isoleucina (A), histidina (D), cisteína (G) ácido glutâmico (J). Os *spots* marcados **85**

são referentes as proteínas intracelulares identificadas obtidas dos extratos proteicos em 96 h de bioprocessos submersos

Figura 11 – Géis representativos do proteoma extracelular de *A. niveus* crescido em meio com farinha de pena (A), caseína (D) e soro de leite (G). Os *spots* marcados são referentes as proteínas intracelulares identificadas que foram extraídas dos extratos proteicos obtidos em 96 h de bioprocessos submersos **95**

Figura 12 – Géis representativos do proteoma extracelular de *A. niveus* crescido em meio com 1% (m/v) com as fontes de nitrogênio ácido glutâmico (A), histidina (D) e isoleucina (G). Os *spots* marcados são referentes as proteínas extracelulares identificadas obtidas dos extratos proteicos em 96 h de bioprocessos submersos **102**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–Informações sobre os bancos de dados utilizados na busca das proteínas intra- e extracelulares em cada condição analisada **27**

Tabela 2 – Lista de proteínas intracelulares, identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS, que foram extraídas dos micélios de *A. niveus* crescido em pH 5, 6, 7 e 8 em bioprocessos submersos **34**

Tabela 3 - Lista de proteínas extracelulares precipitadas dos extratos proteicos de *A. niveus* cultivado em bioprocessos submersos em diferentes condições de pH (5, 6, 7 e 8) identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS **47**

Tabela 4 - Lista de proteínas intracelulares, identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS, que foram extraídas dos micélios de *A. niveus* cultivado em bioprocessos submersos em 1% (m/v) de glicose, lactose, frutose e xilose **58**

Tabela 5 - Lista de proteínas extracelulares precipitadas dos extratos proteicos de *A. niveus* cultivado em bioprocessos submersos em 1% (m/v) em lactose, xilose, frutose e glicose, identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS **69**

Tabela 6 - Lista de proteínas intracelulares extraídas dos micélios de *A. niveus* cultivado em bioprocessos submersos com 1% (m/v) soro de leite, farinha de pena e caseína, identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS **79**

Tabela 7 – Lista de proteínas intracelulares, exclusivas ou com maior abundância, extraídas dos micélios de *A. niveus* cultivado em bioprocessos submersos com 1% (m/v) de ácido glutâmico, histidina, cisteína e isoleucina, identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS **87**

Tabela 8 - Lista de proteínas extracelulares precipitadas dos extratos proteicos de *A. niveus* cultivado em bioprocessos submersos com 1% (m/v) de soro de leite, farinha de pena e caseína, identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS **97**

Tabela 9 – Lista de proteínas extracelulares precipitadas dos extratos proteicos de *A. niveus* cultivado em bioprocessos submersos com 1% (m/v) de ácido glutâmico, histidina e isoleucina, identificadas por MALDI-TOF/TOF–MS/MS **104**

Tabela 10 - Análises *in silico* de proteínas extracelulares de *A. niveus* identificadas em cultivos com diferentes condições de pH para a predição de vias secretórias e potenciais efetores de fitopatogenicidade **109**

Tabela 11 - Análises *in silico* de proteínas extracelulares de *A. niveus* identificadas em cultivos com diferentes fontes de carbono para a predição de vias secretórias e potenciais efetores de fitopatogenicidade **110**

Tabela 12 - Análises *in silico* de proteínas extracelulares de *A. niveus* identificadas em cultivos com diferentes fontes complexas de nitrogênio para a predição de vias secretórias e potenciais efetores de fitopatogenicidade **111**

Tabela 13- Análises *in silico* de proteínas extracelulares de *A. niveus* identificadas nos cultivos com aminoácidos como fontes nitrogênio para a predição de vias secretórias e potenciais efetores de fitopatogenicidade **112**

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE TABELAS v
1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Fungos filamentosos - Prospecção de enzimas 1
1.2. Fungos filamentosos - *Aspergillus niveus* 2
1.3. Bioprocesso - Cultivo submerso 4
1.3.1. Condições de cultivo que influenciam a produção de metabólitos em bioprocesso submerso 5
1.3.2. Efeitos de pH 5
1.3.3. Efeitos de fontes de carbono 7
1.3.4. Efeitos de fontes de nitrogênio 9
1.4. Estudos proteômicos 11
2. OBJETIVOS 13
2.1. Objetivo geral 13
2.2. Objetivos específicos 14
3. MATERIAL E MÉTODOS 14
3.1. Microrganismo 14
3.2. Bioprocessos submersos de *A. niveus* para obtenção dos micélios e extratos proteicos 16
3.3. Ensaio de atividade proteolítica para determinação de atividade enzimática – substrato Azo-caseína 17
3.4. Extração, precipitação e quantificação de proteínas intracelulares 18
3.5. Precipitação e quantificação de proteínas extracelulares 19
3.6. Eletroforese bidimensional 20
3.6.1. Primeira dimensão – Focalização isoelétrica 20
3.6.2. Equilíbrio das tiras focalizadas 21
3.6.3. Segunda dimensão – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 22
3.7. Coloração dos géis bidimensionais (2-DE) 22
3.8. Obtenção, análise das imagens dos géis 2-DE, seleção e coleta dos spots proteicos 23
3.9. Digestão tríptica e análises de espectrometria de massas por ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI) 24
3.10. Análises de bioinformática 26
3.11. Predição de propriedades das proteínas extracelulares identificadas, utilizando análises in silico 28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 28
4.1. Efeitos do pH sobre a produção de peptidases pelo fungo *A. niveus* 28
4.2. Efeitos do pH sobre o proteoma intracelular de *A. niveus* 31
4.3. Aspectos biológicos das proteínas intracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado em diferentes condições de pH 38
4.3.1. Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos 38
4.3.2. Proteíns envolvidas no metabolismo de aminoácidos e proteínas 41
4.3.3. Proteína envolvida no metabolismo de nucleotídeos 42

4.3.4. Proteínas envolvidas em mecanismos de resistência ao estresse oxidativo 42
4.3.5. Proteínas envolvidas na parede celular 43
4.3.6. Proteínas envolvidas em outras funções 44
4.4. Efeitos do pH sobre o proteoma extracelular de *A. niveus* 44
4.5. Aspectos biológicos das proteínas extracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado em diferentes condições de pH 49
4.5.1. Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos 50
4.5.2. Proteínas envolvidas no metabolismo de proteínas 51
4.5.3. Proteínas envolvidas no metabolismo de lipídioes 52
4.5.4. Proteínas envolvidas em mecanismos de resistência ao estresse 52
4.5.5. Proteína envolvida em outros processos 53
4.6. Efeitos de fontes de carbono sobre a produção de peptidases por *A. niveus* 53
4.7. Efeitos de fontes de carbono sobre o proteoma intracelular de *A. niveus* 55
4.8. Aspectos biológicos das proteínas intracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado em diferentes 62
4.8.1 Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos 62
4.8.2. Proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e proteínas 63
4.8.3. Proteínas envolvidas em mecanismos de resistência ao estresse 65
4.8.4. Proteínas envolvidas em outras funções 65
4.9. Efeitos das fontes de carbono sobre o proteoma extracelular de *A. niveus* 66
4.10. Aspectos biológicos das proteínas extracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado em diferentes condições de fontes de carbono 71
4.10.1. Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos 71
4.10.2. Proteínas envolvidas no metabolismo de proteínas 71
4.10.3. Proteína envolvida na parede celular 72
4.10.4. Proteínas envolvidas em mecanismos de resistência ao estresse 73
4.11. Efeito de fontes de nitrogênio sobre a produção de peptidases por *A. niveus* 73
4.12. Efeito de fontes de nitrogênio complexas sobre o proteoma intracelular de *A. niveus* 76
4.13. Aspectos biológicos das proteínas intracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado em fontes de nitrogênio complexas 81
4.13.1. Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos 81
4.13.2.Proteínas envolvidas no metabolismo de proteínas e aminoácidos 82
4.13.3. Proteínas envolvidas nos mecanismos de resistência ao estresse 83
4.13.4. Proteína envolvida em outras funções 84
4.14. Efeito de aminoácidos como fontes de nitrogênio sobre o proteoma intracelular de *A. niveus* 84

4.15. Aspectos biológicos das proteínas intracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado em diferentes fontes de aminoácidos 90
4.15.1. Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos 90
4.15.2. Proteínas envolvidas no metabolismo de proteínas e aminoácidos 91
4.15.3. Proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos 92
4.15.4. Proteínas envolvidas em mecanismos de resistência ao estresse 93
4.15.5. Proteínas envolvida em outras funções 94
4.16. Efeito de fontes de nitrogênio complexas sobre o proteoma extracelular de *A. niveus* 94
4.17. Aspectos biológicos das proteínas extracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado em diferentes condições de fontes de nitrogênio complexas 98
4.17.1 Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos 98
4.17.2 Proteínas envolvidas no metabolismo de proteínas 99
4.17.3. Proteínas envolvidas em mecanismos de resistência ao estresse oxidativo 100
4.18. Efeito de aminoácidos como fontes de nitrogênio sobre o proteoma extracelular de *A. niveus* 101
4.19. Aspectos biológicos das proteínas extracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado em aminoácidos como fontes de nitrogênio 105
4.19.1. Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos 105
4.19.2. Proteínas envolvidas no metabolismo de proteínas e em mecanismos de resistência ao estresse 106
5. Predição de propriedades das proteínas extracelulares identificadas no proteoma extracelular utilizando análises *in silico* 106
6. Dificuldades encontradas na realização dos estudos proteômicos com o fungo *A. niveus* 113
7. CONCLUSÃO 114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 116
APÊNDICES 154

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fungos filamentosos – Prospecção de enzimas

Os microrganismos se tornaram a principal fonte de biomoléculas ao serem cultivados em grandes quantidades e em um curto período de tempo, além disso, estratégias de manipulação genética podem ser utilizadas para o aumento da produção destes agentes (ANBU et al., 2017).

Os produtos obtidos através de microrganismos são amplamente utilizados em escalas comerciais e industriais. Por isso, estudos de isolamento, caracterização de propriedades, de extrapolação para produção em grandes escalas e aplicação bioindustrial destas moléculas têm sido de grande interesse. Microrganismos como bactérias e fungos têm sido globalmente estudados com este intuito (NIGAM, 2013).

Dentre os produtos de interesse, estão as enzimas. Atualmente, a busca de novas enzimas compõe um campo de estudo científico com intenção de aplicá-las nas mais diversas áreas comerciais e industriais (EL-ENSHASY, 2007; KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2008; SORENSEN et al., 2014, DA SILVA, 2017; FILHO et al., 2018; RIQUELME et al., 2018).

As enzimas são amplamente aplicadas nos mais diversos setores industriais (YONGHUYUN; NANDAKUMAR, 2007; ARCHER; CONNERTON; MACKENZIE, 2008; RIZWAN et al., 2010; KNIEMEYER, 2011; GUO; WANG, 2014; BIANCO; PERROTA, 2015; CUNHA, 2015; SHI et al., 2016), desde a produção de fármacos (JAHROMI et al., 2014; BRANDI; ANDERSEN, 2015), passando pelo enriquecimento de ração animal (VRIES; VISSER, 2001; BRANCOLI et al., 2018) até a obtenção de biocombustíveis (KARNAOURI et al., 2014; FERREIRA et al., 2016).

Dentre as classes de enzimas, as peptidases se destacam. Estas moléculas são caracterizadas por catalisar a clivagem de ligações peptídicas na presença de água, e apresentam como produto de reação peptídeos e/ou aminoácidos. Em fungos, as peptidases atuam em processos fisiológicos como na germinação de esporos, nutrição, patogênese e na regulação pós-traducional (MANDUJANO-GONZÁLEZ et al., 2016).

Em relação ao comércio mundial de enzimas, as peptidases são 25% das biomoléculas produzidas com aplicação industrial e 60% das presentes no mercado (NOVELLI; BARROS; FLEURI, 2016).

Apresentam destaque em indústrias de detergentes e couro (peptidases alcalinas), de cosméticos, farmacêutica e na biorremediação. Além disso, a versatilidade em atuar em diferentes níveis de pH e temperatura permite a aplicação dessas enzimas na obtenção de produtos alimentícios, como em laticínios, que em sua produção apresentam etapas em pH extremo (RAO et al., 1998; MANDUJANO-GONZÁLEZ et al., 2016).

1.2 Fungos filamentosos – *Aspergillus niveus*

Os fungos são representados por um grande grupo de microrganismos eucarióticos (PAPAGIANNI, 2004; WARD, 2012; SORENSEN et al., 2014, RIQUELME et al., 2018), os quais são distribuídos em diferentes ecossistemas, sendo encontrados e isolados, em sua maioria, do solo.

Dentre esses microrganismos, existem os fungos filamentosos, os quais são caracterizados por crescerem de forma ramificada, com a capacidade de se diferenciarem em estruturas morfológicas mais complexas (PAPAGIANNI, 2004; WARD, 2012; SORENSEN et al., 2014, RIQUELME et al., 2018).

Na natureza, desempenham papéis ecológicos fundamentais na reciclagem da matéria orgânica, decomposição de carbono orgânico e recalcitrante, transformação de nitrogênio e fósforo, além da nutrição mineral de plantas (TEDERSOO et al., 2014; TRESEDER; LENNON, 2015; PELLEGRIN et al., 2015; RIQUELME et al., 2018).

Estes microrganismos são capazes de se adaptarem às condições ambientais extremas de água, oxigênio, compostos orgânicos, inorgânicos, temperatura, pH e salinidade (TEDERSOO et al., 2014; TRESEDER; LENNON, 2015; CHAMBERGO; VALENCIA, 2016). Para isto, utilizam mecanismos de adaptação a estas mudanças extremas em seu habitat, detendo um eficiente sistema de produção e secreção de importantes metabólitos, incluindo peptídeos, enzimas, vitaminas, ácidos orgânicos e antibióticos (WARD, 2012; CHAMBERGO; VALENCIA, 2016).

Estes metabólitos participam auxiliando o fungo na obtenção de energia, a partir de degradação de substratos orgânicos (JIN; VAN LEEUWEN; PATEL, 1999), e de decomposição de biomassa lignocelulósica (RABINOVICH et al., 2004), no crescimento (EL-ENSHASY, 2007), e na manutenção celular, em resposta às mudanças do ambiente extracelular (FERREIRA-OLIVEIRA et al., 2010).

Nos últimos tempos, vários estudos foram direcionados para o isolamento de fungos filamentosos a partir destes ambientes inóspitos, com o objetivo de obter diferentes tipos de biomoléculas (ANBU et al., 2017). A possibilidade de prospecção dessas biomoléculas, a partir de fungos filamentosos, desperta interesse de indústrias biotecnológicas (EL-ENSHASY, 2007; KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2008; SORENSEN et al., 2014, DA SILVA, 2017; FILHO et al., 2018; RIQUELME et al., 2018).

Dentre os fungos filamentosos já utilizados na prospecção de biomoléculas, o gênero *Aspergillus* tem sido bem explorado. Este grupo de microrganismo é constituído por mais de 180 espécies, as quais utilizam em seu metabolismo macroelementos provenientes das fontes de carbono e nitrogênio (DE VRIES, 2003; FLIPPHI et al., 2009; WARD, 2012).

A espécie *Aspergillus niveus* apresenta grande relevância biotecnológica, sendo descrita como produtora de diferentes classes de enzimas, tais como celulases (TAJ-ALDEEN, ALKENANY, 1993), inulinase (SOUZA-MOTTA et al., 2005), β-frutofuranosidase (GUIMARÃES et al., 2009), xilanase (BETINI et al., 2009), amilases (SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2013) e pectinase (MALLER et al., 2013). Entretanto, já foi relatado como patogênico em paciente imunocomprometido (AUBERGER et al., 2008).

Esta espécie foi descrita, primeiramente, em 1929 por Blochwitz, é caracterizada por ser termotolerante, com crescimento sob a forma de filamentos, já tendo sido isolada de solo e plantas, de acordo com outros autores (TAJ-ALDEEN; ALKENANY, 1996, SOUZA-MOTTA et al., 2005, MALLER et al., 2011).

Assim, devido a estas características e à gama de macromoléculas produzidas pelo fungo *A. niveus*, o mesmo tornou-se objeto do presente estudo.

1.3 Bioprocesso – Cultivo submerso

Dentre as alternativas de cultivo em escala laboratorial com intuito de bioprospecção de moléculas com potencial biotecnológico, existem os bioprocessos em meio sólido e submerso, sendo que este último é mais vantajoso por permitir a extrapolação para escala industrial, maior controle de processo, facilitar a recuperação dos metabólitos de interesse, separação de micélios e extratos proteicos (ANTECKA; BIZUKOKC; LEDAKOWICZ, 2016; VOLKE-SEPULVEDA et al., 2016). Além disso, a possibilidade de manipulação dos parâmetros de cultivo que influenciam os mecanismos fisiológicos e a biologia de fungos em geral (HEATH, 1995; BIESEBEKE et al., 2002; PAPAGIANNI, 2004; SOUZA et al., 2015).

Neste bioprocesso, os fungos são inoculados e cultivados em meio líquido, onde é possível monitorar os fatores intrínsecos e extrínsecos com facilidade. Em relação aos substratos utilizados na formulação dos meios, apesar de estarem dispersos em água, é possível selecionar a melhor composição nutricional e controlar a sua disponibilidade (GERVAIS; MARECHAL-MOLIN, 1996; SINHA, 2007).

A manipulação dos parâmetros de cultivo expõe os fungos a alterações físicas, químicas e a meios oligotróficos que podem acionar mecanismos para adaptação e sobrevivência nessas condições, e consequentemente, à produção de metabólitos (PAPAGIANNI, 2004; UNIVERSITY OF SYDINEY, 2004; WARD et al., 2005).

A aplicação bem-sucedida de enzimas para os setores industriais, bem como de metabólitos primários e secundários, oriundos de fungos, envolve o conhecimento e a padronização das condições de cultivo desses microrganismos. Esse processo é uma etapa essencial para delinear as características do desenvolvimento morfológico, fisiológico, biológico e metabolismo desses fungos, os quais serão diretamente influenciados pelos bioprocessos (PAPAGIANNI, 2004; FLORENCIO et al., 2016 b; CUNHA, 2015; CHAMBERGO; VALENCIA, 2016; BENOCCI et al., 2017).

Para conhecer a complexidade do sistema biológico de fungos e manipular o cultivo dessas espécies, primeiramente, é preciso aperfeiçoar cada

etapa do processo produtivo e fermentativo. Sendo assim, deverão ser definidos: pH, fontes de carbono e nitrogênio, concentração do inóculo, aeração, temperatura, frequência de agitação e tempo de incubação. Além de controlar a oferta de nutrientes, assegurando que os mesmos sejam ajustados para cada espécie (PEBERDY, 1994; DURAND, 2003; PANDEY, 2003; UNIVERSITY OF SYDINEY, 2004; WARD et al., 2005; ADAV et al., 2011; ERJAVEC et al., 2012; BIANCO; PERROTA, 2015).

Ao delinear os parâmetros de cultivo, os fatores químicos do meio contribuirão para estabelecer as condições fermentativas adequadas para o crescimento fúngico, produção, transporte e secreção proteica, além de conhecer as condições capazes de ativar os mecanismos de resposta ao estresse oxidativo (KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2007; SZOPINSKA; MORSOMME, 2010; KROLL; PÄHTZ; KNIEMEYER, 2014; CUNHA, 2015).

A complexidade na morfologia e fisiologia observada no ciclo de vida de fungos filamentosos, especialmente, do gênero *Aspergillus,* está diretamente associada aos efeitos dos substratos e das condições de cultivo (KOSSEN, 2000; PAPAGIANNI, 2004; EL-ENSHASY, 2007; KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2008). De acordo com Wards (2012), ao utilizar substratos formulados com resíduos de origem agroindustrial, a expectativa é elevar a produtividade de enzimas secretadas por fungos filamentosos, sobretudo quando esses microrganismos são expostos ao bioprocesso submerso, que é um dos processos fermentativos mais utilizados em cultivos fúngicos (GERVAIS; MARECHAL-MOLIN, 1996; SINHA, 2007; ANTECKA; BIZUKOJC; LEDAKOWICZ, 2016; ASHOK; KUMAR, 2017).

1.3.1. Condições de cultivo que influenciam a produção de metabólitos em bioprocesso submerso

Dentre os parâmetros que influenciam os fungos filamentosos a produzirem novos metabólitos, o presente estudo abordará efeito de pH, fontes de carbono e nitrogênio em bioprocessos submersos.

1.3.2. Efeitos de pH

O pH do meio de cultura é um parâmetro importante para o cultivo de fungos, pois pode influenciar nas características morfológicas do microrganismo (JIN et al., 1999) e no perfil de proteínas e enzimas hidrolíticas secretadas (PEÑALVA; ARTS, 2002; XIONG et al., 2004; SCHMIDT et al., 2008; ADAV et al., 2011).

As alterações de pH do meio impactam na utilização de nutrientes para a sobrevivência de microrganismos e podem provocar danos em sua parede celular (LACHKE et al., 2002; SCHMIDT et al., 2008), sendo assim, padronizar o pH é uma etapa importante em cultivos submersos. As variações desse parâmetro podem gerar um ambiente estressante para o crescimento, fisiologia, viabilidade dos esporos, secreção de metabólitos e, até mesmo, provocar alterações irreversíveis no sítio catalítico de enzimas secretadas, o que causa perda de função (RAIMBAULT, 1998; WUBBEN et al., 2000; ARST; PEÑALVA, 2003, NOZAWA et al., 2003; JUNGBLUT et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011).

Para muitos fungos, a resposta ao pH ambiental desempenha um papel importante na transcrição de genes responsáveis por codificarem enzimas, permeases e proteínas intracelulares. Nesse sentido, diferentes trabalhos têm demonstrado que fungos são capazes de controlar a expressão gênica devido a um eficiente mecanismo homeostático que é mediado por uma via de sinalização integrada de sete genes já bem descritos em *Aspergillus nidulans*: *pacC* (responsável por codificar o fator de transcrição) e *palA, palB, palF, palh* e *pall* (participam na transdução de sinais mediados por pH neutro/alcalino) (CADDICK; BROWNLEE; ARST, 1986; PEÑALVA et al., 2008; SCHMIDT et al., 2008; HAKKINEN et al., 2015).

Em fungos, o fator de transcrição PacC pode ser modulado em resposta ao pH ácido ou alcalino e pela disponibilidade das fontes de carbono e fosfato presentes no meio extracelular. Esse sistema de regulação do pH extracelular contribui para expressão de genes que codificam enzimas envolvidas no crescimento, virulência e biossíntese de metabólitos secundários (PEÑALVA; ARTS, 2002; ARTS; PEÑALVA, 2003; CARACUEL et al., 2003; BIGNELL et al., 2005; PEÑALVA et al., 2008, TREVISAN et al., 2011).

Em leveduras, como *Candida glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae,* as variações de pH atuaram na fisiologia, ao regularem processos celulares

essenciais para a proliferação e sobrevivência dessas leveduras (ORIJ; BRUL; SMITS, 2011; ORIJ et al., 2012; ULLAH et al., 2013).

Em *Candida albicans* o pH do meio influenciou na fase de diferenciação morfológica, sendo o crescimento na forma de levedura favorecido em condições ácidas, à medida que o crescimento filamentoso foi induzido em pH alcalino (GOW; BROWN; ODDS, 2002). Cabe destacar que, alterações bruscas no pH do meio de cultivo de *C. albicans,* poderá ativar a via de transdução de sinal e fatores de patogenicidade (DAVIS, 2003).

No estudo do proteoma de *Penicillium expansum* observou-se que os pH 2 e 8 inibiram a germinação dos esporos, diminuindo a infecção de plantas. Além disso, esses pH afetaram o pH intracelular, a síntese e dobramento de proteínas (LI et al., 2010).

O fungo *Trichoderma reesei*, submetido ao crescimento em pH ácido, favoreceu a secreção da enzima endoglucanase (QIN et al., 2008). Já Xiong e colaboradores (2004) ao cultivarem *T. reesei* Rut C-30 na presença da fonte de carbono lactose em pH 4 e 6, correlacionaram a ação desses parâmetros com a secreção de diferentes tipos de xilanases. Enquanto que no estudo do *T. reesei* cultivado em pH 3, esse parâmetro foi favorável para a secreção da enzima celulase (ADAV et al., 2011).

Para entender as adaptações de vias metabólicas de microrganismos, os quais foram submetidos a alterações de pH, as ferramentas de proteômica auxiliarão no delineamento do global de proteínas envolvidas nesses processos (ADAV et al., 2011; BIANCO; PERROTA, 2015).

1.3.3. Efeitos de fontes de carbono

Na natureza, os fungos se adaptam com facilidade aos ambientes com disponibilidade de diferentes fontes de carbono: orgânico/inorgânico, proteínas, biomassa vegetal, lignina e polissacarídeos. Esses substratos conferem a estes microrganismos a energia suficiente para produzir e secretar enzimas com potencial para degradar os compostos presentes no ambiente, atuarem no ciclo do carbono e auxiliar em sua sobrevivência (RUIJTER; VISSER, 1997;

GANCEDO, 1998; MICHAL; SCHOMBUG, 2012; BORIN et al., 2015; BENOCCI et al., 2017).

Ao expor microrganismos à diferentes fontes de carbono, o mecanismo de repressão catabólica deste átomo será ativado, para impedir o desperdício de energia na produção de enzimas e auxiliar na adaptação ao ambiente extracelular. Além disso, este sistema pode induzir ou reprimir a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas em rotas metabólicas, e pode, também, interferir na resposta ao estresse, respiração, sobrevivência, comunicação celular, produção de metabólitos secundários, na patogenicidade e virulência de alguns fungos (RUIJTER; VISSER, 1997; GANCEDO, 1998; CARLSON, 1999; KANIAK et al.,2004; KAYIKCI; NIELSEN, 2015; BENOCCI et al., 2017; ADNAN et al., 2018; FASOYIN et al., 2018).

No crescimento das leveduras *S. cerevisiae* e *Brettanomyces bruxellensis,* as fontes de carbono ativaram genes responsáveis por induzirem a secreção de enzimas envolvidas no metabolismo do carbono (AHUATZI et al., 2004; CONTERNO et al., 2006). No cultivo de *S. Cerevisiae,* a glicose foi utilizada de forma eficiente e exclusiva, mesmo que na presença de outros substratos. Este efeito dominante da glicose no metabolismo do carbono é regulado por sinalizações e interações metabólicas (GANCEDO, 1998, KAYIKCI; NIELSEN, 2015).

No crescimento de *Aspergillus brasiliensis*, em meios com elevadas concentrações de glicose, ocorreu um aumento na atividade catabólica e baixa produção de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e à proteólise (VOLKE-SEPULVEDA et al., 2016).

Ao analisar o proteoma extracelular de *Botrytis cinerea*, previamente cultivado em meio com pH 4 suplementado com pectina e sacarose, observou-se que as proteínas extracelulares foram expressas em ambas as fontes de carbono e que a maioria dessas proteínas estavam envolvidas no metabolismo de carboidratos (SHAH et al., 2009).

Cepas selvagens de *B. cinerea* submetidas ao cultivo submerso em meio ácido suplementado com sacarose apresentaram proteínas intracelulares envolvidas no metabolismo de carboidratos e obtenção de energia, enquanto as

enzimas mais abundantes no proteoma intracelular foram envolvidas com a degradação da parede celular (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2014).

O fungo filamentoso *Aspergillus niger* foi crescido em meios formulados com sorbitol, maltose e xilose, substratos os quais influenciaram no proteoma fúngico. Os perfis proteicos identificados foram envolvidos com: transporte, secreção de proteínas, função mitocondrial, defesa frente ao estresse oxidativo e biossíntese de lipídios (OLIVEIRA et al., 2011).

As fontes de carbono, glicose, avicel e palha de arroz influenciaram na secreção de enzimas por *Aspergillus fumigatus* Z5, mas a partir do resíduo agroindustrial palha de arroz foi possível identificar enzimas com potencial para degradar celulose, hemicelulose e lignina (LIU et al., 2013).

1.3.4. Efeitos de fontes de nitrogênio

Em microrganismos, o nitrogênio é essencial para a reciclagem dos nutrientes, regulação de genes responsáveis por mudanças morfológicas, crescimento, proliferação e sobrevivência (HAN et al., 2012; TDZYNSKI, 2014; OH et al., 2017). Segundo Betocci e colaboradores (2017), a utilização de biomassa vegetal por fungos também é afetada por fontes de nitrogênio, pH e espécies reativas de oxigênio (EROs).

As fontes orgânicas de nitrogênio são uma das responsáveis por ativarem o metabolismo desse elemento que está correlacionado com a obtenção de energia, para o funcionamento da maquinaria celular (FREESE et al, 2011). Os fungos filamentosos e leveduras ao utilizarem potenciais substratos ricos em nitrogênio, como os aminoácidos, poderão utilizá-los como fontes de nitrogênio, carbono e energia (ARCHER; WOOD, 1995; FREESE et al., 2011).

Os fungos utilizam, preferencialmente, os compostos nitrogenados: amônia, glutamato e glutamina. Em meios de cultivo, com baixa concentração de fontes de nitrogênio, poderá ocorrer maior expressão de genes responsáveis por sintetizarem as fontes primárias de nitrogênio. Além disso, para que o crescimento desses microrganismos não seja limitado ocorre a indução da síntese de permeases, as quais utilizarão aminoácidos e proteínas presentes no meio de cultivo. A prolina, ureia e nitrato, não são fontes preferenciais de

nitrogênio, pois proporcionam um crescimento lento desses microrganismos, mas podem ser utilizadas em condições limitantes de outras fontes (MARZLUF, 1997; MAGASANIK; KAISER, 2002; BARROS-PITA et al., 2013; TUDZYNSKI, 2014; SILVA, 2017).

Em fungos, a repressão do metabolismo do nitrogênio permite a utilização preferencial das fontes de nitrogênio facilmente assimiladas, em relação às fontes alternativas de nitrogênio: nitrato, aminoácidos e proteínas. Este mecanismo participa do crescimento, manutenção celular, e evita o desperdício de energia (STARICH et al., 1998; MAGASANIK; KAISER, 2002; BROACH, 2012; SILVA, 2017; BENOCCI et al., 2017). A regulação eficiente deste sistema, certamente, é fundamental para os fungos explorarem diferentes habitats e cultivos (DONOFRIO et al., 2006). Além de responderem com eficiência às mudanças quantitativas e qualitativas na disponibilidade de nitrogênio (TDZYNSKI, 2014).

Para os fungos *Neurospora crassa, A. nidulans* e *Magnaporthe grisae* foi relatado que nos cultivos em meios deficientes de fontes de nitrogênio, ocorreram a ativação ou indução de fatores de transcrição de genes estruturais, os quais codificam enzimas responsáveis pelo catabolismo do nitrogênio (MARZLUF, 1997; DONOFRIO et al., 2006).

A levedura *Dekkera bruxellensis* foi estudada em conjunto com *S. cerevisiae* para simular um bioprocesso contendo o substrato cana-de açúcar, com um meio rico em fontes de carbono, mas pobre em fontes de nitrogênio. Nesse cultivo, *D. bruxellensis* apresentou maior crescimento, pois conseguiu consumir os compostos nitrogenados amônia e nitrato. Por outro lado, o crescimento de *S. cerevisiae* foi aquém do esperado, mas a glicose foi utilizada em maior proporção para ser convertida em etanol (BARROS-PITA et al., 2011).

Em outro estudo, *D. bruxellensis* foi cultivada em bioprocesso submerso em meio suplementado com diferentes fontes de nitrogênio (sulfato de amônio, glutamato, glutamina e prolina) em conjunto com a glicose. Os resultados obtidos demonstraram que a taxa de crescimento foi elevada porque foram assimiladas em conjunto as fontes de nitrogênio e de carbono disponibilizada.

A regulação metabólica do nitrogênio tem papel significativo na patogenicidade de fungos (MARZLUF, 1997), sendo as condições limitantes responsáveis por aumentar a expressão de genes relacionados com a virulência

(TDZYNSKI, 2014; OH et al., 2017). Neste sentido, os estudos proteômicos têm contribuído para compreender os efeitos de fontes de nitrogênio em fitopatógenos como *M. grisae* (DONOFRIO et al., 2006; OH et al., 2017), além de investigarem os mecanismos moleculares e biológicos de resposta às condições de cultivo (TANG et al., 2016).

Por isso, ao escalonar um bioprocesso para o setor industrial, é importante dominar os aspectos do metabolismo do nitrogênio e do carbono, pois os substratos disponibilizados podem interferir nas condições de crescimento e manutenção celular (BARROS-PITA et al., 2013).

1.4. Estudos proteômicos

O estudo de proteínas, com uma abordagem proteômica, é uma estratégia importante para ampliar o conhecimento sobre a biologia de fungos filamentosos e leveduras (MEDINA et al., 2005; MURAD et al., 2014; GARZON et al., 2017).

A diversidade das proteínas intra- e extracelulares de fungos expostos a diferentes condições de crescimento e/ou a estímulos internos e externos têm sido investigadas, com sucesso, através da proteômica. Com esta ferramenta, é possível demonstrar, através das análises de misturas complexas de proteínas, informações sobre quais macromoléculas estão sendo produzidas em um organismo em particular e, assim, determinar o papel dessas moléculas no funcionamento celular e na sobrevivência desses microrganismos em diferentes habitats (GRIFFIN et al., 2001;KOLKMAN; SLIPER; HECK, 2005; BHADAURIA et al., 2007; GSTAIGER; AEBERSOLD, 2009; OLIVEIRA et al., 2011; LY; WASINGER, 2011; ASLAM et al., 2017).

O proteoma é representado pelo conjunto de proteínas expressas pelo genoma de organismos, células e/ou tecidos em um estado biológico e/ou condição determinada. As subpopulações do proteoma englobam o conjunto de proteínas intracelulares (proteoma intracelular) e de proteínas extracelulares que foram secretadas ou que podem estar presentes no meio extracelular devido à lise celular (proteoma extracelular) (WILKING; GOOLEY, 1997; ABBOTT, 1999; GREENBAUM et al., 2001; CHEN; HARMON, 2006; KIM; NANDAKUMAR;

MARTEN, 2007; JUNGBLUT et al., 2008; ANDERSEN; NIELSEN, 2009; JAMESDANIEL et al., 2009; ARMENGAUD et al., 2012; ASLAM et al., 2017).

Através desta ferramenta, é possível reconhecer os substratos capazes de influenciar a produção e secreção de proteínas e enzimas envolvidas no metabolismo, resposta ao estresse, processos moleculares, manutenção e sobrevivência de fungos (BOUWS; WATTERNBERG; ZORN, 2008; XIAOJUN et al., 2008; GÓMEZ-MENDOZA et al., 2014; RAHMAD et al., 2014; TANG et al., 2016; LI et al., 2017).

Para os microrganismos, ainda pouco estudados, a proteômica contribui para o conhecimento sobre as proteínas envolvidas nos sistemas fisiológico e biológico. Com isso, aumentou-se a compreensão da sistemática dos eventos envolvidos na manutenção celular, molecular, metabolismo e patogênese (MANN; HENDRICKSON; PANDEY, 2001; PATTERSON; AEBERSOLD, 2003; CHEN; HARMON, 2006; BHADAURIA et al., 2007; CRAVATT et al., 2007, FENG et al., 2008; GODOY et al., 2008; KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2008; KNIEMEYER, 2011; NAVARRETE et al., 2012; CHU et al., 2015).

A proteômica conquistou um importante espaço na quantificação absoluta do global de proteínas e na quantificação relativa de uma proteína com a determinação de sua abundância. Assim, é possível compreender as particularidades do efeito das diversas condições de cultivo que foram avaliadas para um determinado organismo no seu perfil global de proteínas (ISHIHAMA et al., 2005; GÓMEZ MENDOZA, 2013; LINDEMANN et al., 2017).

A diversidade de técnicas utilizadas para explorar o proteoma de microrganismos sob condições de crescimento e estresse variados é elevada (KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2008; ZHU et al., 2017), sendo a eletroforese bidimensional (2-DE) uma metodologia analítica já estabelecida no estudo de proteínas (KOLKMAN; SLIPER; HECK, 2005; JUNGBLUT et al., 2008; KNIEMEYER, 2011; CAMBRI et al., 2016).

O primeiro passo, para a análise do proteoma, é a obtenção das proteínas, as quais podem ser extraídas por lise da parede celular, a partir do micélio, por separação do extrato proteico e precipitação proteica (KNIEMEYER et al., 2006; ANDERSEN; NIELSEN, 2009; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; JORRIN-NOVO, 2013).

Apesar da rigidez da parede celular de fungos ser reconhecida, o processamento prévio da massa micelial é essencial para obtenção das proteínas intracelulares (KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2008). Para *Aspergillus oryzae e B. cinerea*, a lise mecânica é um método altamente eficaz para o processamento dos proteomas intracelulares (NANDAKUMAR; MARTEN, 2002; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2014).

O primeiro trabalho envolvendo a análise comparativa de mapas bidimensionais de cultivos de *A. niger* foi em meios suplementados com antibiótico e não suplementados (MELIN; SCHNURER; WAGNER, 2002).

Avaliações quantitativas baseadas em géis bidimensionais também foram utilizadas por Salusjarvi et al. (2003) para comparar a ação da xilose e glicose no perfil de proteínas envolvidas no metabolismo da levedura *S. cerevisiae*.

Os estudos proteômicos de *B. cinerea* realizados por Fernández-Acero e colaboradores (2007), através da análise comparativa de linhagens com menor e maior patogenicidade, contribuíram para elucidar o perfil de proteínas envolvidas nos mecanismos de patogenicidade, alvos terapêuticos e metabolismo desse fungo.

Além do estudo do metabolismo, a identificação de enzimas extracelulares é um campo importante na pesquisa de fungos filamentosos, pois muitos desses fungos evoluíram para secretar quantidades elevadas de enzimas que podem ser aplicadas em vários processos biotecnológicos e industriais (OLIVEIRA; GRAAFF, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade proteolítica nas variações do pH, fontes de carbono, fontes de nitrogênio e o efeito desses parâmentros no proteoma intra- e extracelular de *Aspergillus niveus* crescido em bioprocessos submersos, através de ferramentas proteômicas, a fim de identificar as proteínas intra- e extracelulares que foram moduladas nessas condições.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos das variações de pH, fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de peptidases pelo fungo *A. niveus* durante 96 h de crescimento em bioprocessos submersos;

- Avaliar o efeito dos pH 5, 6, 7 e 8 no proteoma intra e extracelular de *A. niveus* em 96 h de bioprocessos submersos;

- Avaliar o efeito de 1% (m/v) de lactose, xilose, frutose e glicose no proteoma intra e extracelular de *A. niveus* em 96 h de bioprocessos submersos;

- Avaliar o efeito de 1% (m/v) de farinha pena, soro leite, caseína, cisteína, histidina, isoleucina e ácido glutâmico no proteoma intra e extracelular de *A. niveus* em 96 h de bioprocessos submersos;

- Identificar por MALDI-TOF/TOF-MS/MS os perfis de proteínas intra e extracelulares de *A. niveus* que foram obtidas dos micélios e extratos proteicos em 96 h de bioprocessos submersos;

- Determinar os aspectos biológicos das proteínas intra e extracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado em diferentes condições de pH, fontes de carbono e nitrogênio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo

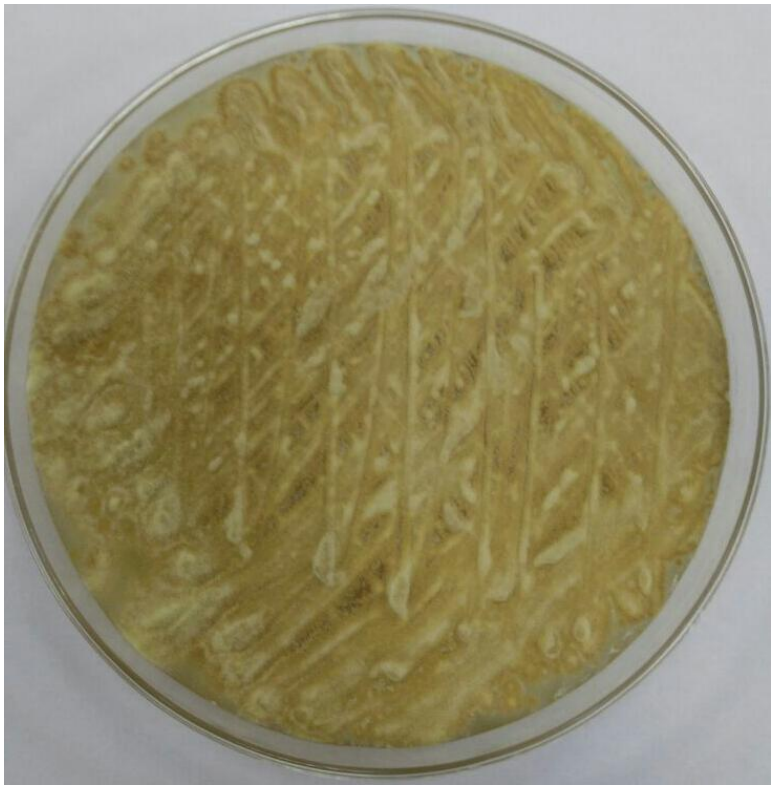
O fungo *A. niveus* foi isolado de uma amostra de solo retirada de uma lagoa de tratamento de água (Guapiaçú, São Paulo, Brasil) e identificado no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pela Profª. Drª. Cristina Maria de Souza Motta.

A cepa do *A. niveus* está depositada na coleção de microrganismos do Laboratório de Tecnologia Enzimática da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Durante o trabalho, a manutenção do isolado fúngico foi realizada com repiques periódicos, a cada 30 dias, em meio ágar batata em tubos de ensaio inclinados que foram incubados em estufa bacteriológica por um período de 7 dias na temperatura de 30ºC. A preservação das culturas foi realizada com óleo mineral e água estéril, que recobriram o micélio no meio de cultivo em tubos de ensaio (CASTELLANI, 1939; SHERF, 1943).

Na Figura 1 está apresentada uma fotografia retirada de *A. niveus* cultivado em placa de Petri contendo o meio de cultura ágar batata, após 7 dias de cultivo a 30ºC.

Figura 1 - Fungo *A. niveus* após 7 dias de cultivo em ágar batata a 30ºC.



Fonte: elaborada pela autora

3.2. Bioprocessos submersos de *A. niveus* para obtenção dos micélios e extratos proteicos

Para a realização dos bioprocessos submersos, o fungo *A. niveus* foi semeado em frasco Erlenmeyer de 50 mL, em meio ágar batata, inclinado, incubados a 30ºC por 7 dias.

Após o período de crescimento do fungo, a superfície do meio de cultura foi raspada com espátula estéril, com o uso de água ultrapura autoclavada. A suspensão de esporos foi filtrada em gaze estéril, para remoção de partículas maiores, e levada para contagem de esporos em câmara de Neubauer. Após a determinação da concentração de esporos da suspensão, foi calculado o volume da suspensão de esporos contendo $5x10^7$ esporos, que ao ser inoculado em 50 mL de meio de cultivo, correspondeu a uma concentração final de $1x10^6$ esporos.mL^{-1} do fungo.

Os bioprocessos submersos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio líquido padrão composto pelos sais inorgânicos: KH_2PO_4 0,7% (m/v); K_2HPO_4 0,2% (m/v); $MgSO_4.7H_2O$ 0,01% (m/v); $CaCl_2.2H_2O$ 0,01% (m/v); $Na_3C_6H_5O_7$. $2H_2O$ 0,05% (m/v), acrescido de 0,1% (m/v) das fontes de nitrogênio extrato de levedura e caseína, modificado do trabalho de Tran; Nagano (2002).

Para avaliar o efeito do pH sobre o proteoma de *A. niveus*, o fungo foi crescido em meio líquido padrão com os pH 5, 6, 7 e 8 que foram ajustados com uma solução de NaOH 6 M ou HCl 6 M em pHmetro de bancada (Digimed DM-22). Cada condição de cultivo foi composta por 18 frascos, para os estudos proteômicos e 4 frascos para os ensaios de atividade enzimática. Após a esterilização em 121ºC por 15 min, os meios foram inoculados com $5x10^7$ esporos para cada 50 mL de meio de cultura, com um volume total de inóculo de até 1 mL. Posteriormente, os frascos foram incubados por 96 h a 30ºC sob agitação orbital de 120 rotações por minuto (rpm).

Para avaliar os efeitos das fontes de carbono sobre o proteoma de *A. niveus,* o meio líquido padrão, descrito anteriormente, foi suplementado com 1% (m/v) de diferentes fontes de carbono (glicose, lactose, frutose e xilose). O pH de cada meio de cultivo foi ajustado para 6, com base no resultado do ensaio de

atividade para peptidase. Cada condição de cultivo foi composta por 12 frascos para os estudos proteômicos e 4 frascos para os ensaios de atividade enzimática. Após a esterilização em 121ºC por 15 min, os meios foram inoculados com $5x10^7$ esporos para cada 50 mL de meio de cultura, com um volume total de inóculo de até 1 mL. Posteriormente, os frascos foram incubados por 96 h a 30ºC sob agitação orbital de 120 rotações por minuto (rpm).

Para avaliar os efeitos das fontes de nitrogênio sobre o proteoma de *A. niveus* o meio líquido padrão, descrito anteriormente, foi suplementado com fontes orgânicas poliméricas (soro de leite, farinha de pena e caseína) e com fontes de aminoácidos (ácido glutâmico, histidina, cisteína e isoleucina). O pH de cada meio de cultivo foi ajustado para 6, com base no resultado do ensaio de atividade para peptidase. Cada condição de cultivo foi composta por 12 frascos para os estudos proteômicos e 4 frascos para os ensaios de atividade enzimática. Após a esterilização em 121ºC por 15 min, os meios foram inoculados com $5x10^7$ esporos para cada 50 mL de meio de cultura, com um volume total de inóculo de até 1 mL. Posteriormente, os frascos foram incubados nas mesmas condições dos estudos anteriores.

Em 96 h de cultivo, os frascos de cada condição de estudo foram coletados em um único frasco que foi denominado de *pool.* Essas amostras foram então filtradas à vácuo em papel de filtro qualitativo (gramatura 80 g/m^2) com diâmetro de 12,5 cm (Unifil) para o fracionamento e obtenção da massa micelial e do extrato proteico. A massa micelial obtida foi lavada por filtração a vácuo em papel de filtro com 100 mL de solução 0,9% (m/v) de cloreto de sódio (NaCl), seguida por duas lavagens com 100 mL de água ultrapura. Os extratos proteicos foram transferidos para tubos cônicos de 50 mL e submetidos à liofilização no liofilizador Alpha 2-4 LDplus (Martin Christ), cujo vácuo equivalente correspondia a - 40 °C. As frações obtidas foram então submetidas à etapa de obtenção das proteínas intra- e extracelulares.

3.3. Ensaio de atividade proteolítica para determinação de atividade enzimática – substrato Azo-caseína

Para a avaliação da atividade proteolítica nas diferentes condições de cultivo, a cada 24 h de bioprocesso submerso, um frasco foi retirado e submetido

à filtração à vácuo em papel de filtro qualitativo (gramatura 80 g/m^2) e diâmetro de 12,5 cm (Unifil).

O extrato proteico obtido foi submetido ao ensaio de atividade enzimática para a determinação da atividade proteolítica durante as 96 h de bioprocesso submerso.

Para o ensaio, foram utilizados 200 µL do substrato azocaseína 1% em tampão acetato (100mM pH 5) acrescidos de 100 µL do extrato bruto. A reação foi incubada à 50ºC por 2 h. A reação foi interrompida com 800 µL TCA (ácido tricloroaético) 10%, os tubos foram centrifugados por 15 min a 10.000 x *g* e 800 µL de sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, no qual se adicionou 933 µL de NaOH 1M. A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro contra seus respectivos brancos a 440nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata juntamente com seus tubos brancos e os resultados foram interpretados de acordo com Gupta; Beg; Lorenz (2002), em unidade de atividade, que é definida como a quantidade de enzima necessária para promover o aumento de 0,001A $_{440\ nm}$ para cada condição de reação, usando a azocaseína como substrato.

3.4. Extração, precipitação e quantificação de proteínas intracelulares

Neste estudo, o conjunto de proteínas intracelulares obtidas do micélio de *A. niveus* foi denominado proteoma intracelular.

Para cada amostra, o volume de massa micelial foi coberto com o mesmo volume de uma solução de inibidores de proteases (complete Ultra - Roche). Então, o material foi colocado em banho de gelo e submetido à lise celular em sonicador (Q125 sonicator - QSonica) com potência de 100% (equivalente a 125 W), durante 15 min em ciclos de sonicação de 30 s e intervalos de 10 s.

O produto da lise micelial foi centrifugado a 10.000 x *g* por 15 min a 4°C e o sobrenadante filtrado em membrana com baixa capacidade de ligação de proteínas com poros de 0,22 µm de diâmetro (GVWP, Millipore). Após estas etapas, o volume de material extraído foi ajustado para 30 mL e uma alíquota foi utilizada para a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford

(BRADFORD, 1976). O objetivo desta análise foi estimar, de modo indireto, a biomassa acumulada após 96 h de bioprocesso.

A seguir, o material filtrado foi submetido à etapa de precipitação das proteínas intracelulares em tubos de 2 mL, na qual foram utilizados uma parte do volume dessa amostra, adicionado ao mesmo volume de solução de ácido tricloroacético (TCA) 30%, previamente solubilizado em acetona 100% (P.A) (LS chemicals). O material foi mantido a -20°C por 2 h e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x *g* por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os precipitados de proteínas foram lavados três vezes com 1 mL de acetona PA, com centrifugações de 10.000 x *g* por 5 min a 4°C. Após essa etapa, a acetona sobrenadante foi descartada e o material precipitado mantido a 20ºC até completa volatilização da acetona residual. Posteriormente, o sedimento proteico obtido foi solubilizado em tampão de reidratação composto por (m/v): 7 M ureia (GE Healthcare Life Sciences); 2 M tioureia (GE Healthcare Life Sciences) e 2% CHAPS (GE Healthcare Life Sciences).

As concentrações de proteínas totais, correspondentes às amostras do proteoma intracelular precipitadas, foram estimadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A curva padrão, confeccionada com albumina sérica bovina (BSA) para as quantificações de proteínas totais, apresentou coeficiente de correlação r^2 = 0,97818. As amostras precipitadas e quantificadas foram então armazenadas a -80ºC, até a etapa de focalização isoelétrica.

3.5. Precipitação e quantificação de proteínas extracelulares

Neste estudo, o conjunto de proteínas extracelulares obtidas no extrato proteico de *A. niveus* foi nomeado proteoma extracelular.

As amostras provenientes dos extratos proteicos liofilizados foram reunidas, em um único frasco, suspendidas em 30 mL de água ultrapura e filtradas em membranas de 0,22 µm (GVWP, Millipore). Posteriormente, as amostras foram transferidas para microtubos de 2mL e precipitadas com uma solução de metanol/clorofórmio (v/v), na proporção de 1:1. As amostras foram homogeneizadas por 2 min a 20ºC e centrifugadas a 1.000 x *g*, durante 5 min a 20ºC. Após esse período, as fases aquosa e orgânica solúveis foram

descartadas e a película contendo o material proteico foi transferida para um microtubo de 2 mL. A película foi submetida ao protocolo de precipitação com o sistema comercial 2D- Clean-Up™ (GE Healthcare Life Sciences), de acordo com as instruções do fabricante, para a remoção de compostos interferentes não proteicos presentes no proteoma extracelular. Posteriormente, as amostras obtidas foram solubilizadas em tampão de reidratação (m/v): 7 M ureia; 2 M tioureia; 2% CHAPS.

As concentrações de proteínas totais, correspondentes às amostras dos proteomas extracelulares precipitadas, também foram estimadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

A curva padrão confeccionada com albumina sérica bovina (BSA), para as quantificações de proteínas totais, apresentou coeficiente de correlação r^2 = 0,98107. As amostras precipitadas e quantificadas foram então, armazenadas a -80ºC, até a etapa de focalização isoelétrica.

3.6. Eletroforese bidimensional

3.6.1. Primeira dimensão – Focalização isoelétrica

As amostras do proteoma intra- e extracelular de *A. niveus* foram descongeladas a 20ºC para a realização da focalização isoelétrica.

Para o estudo de comparação do efeito de pH sobre o proteoma intracelular foram utilizados 240 µg das proteínas intracelulares obtidas do micélio de *A. niveus*, crescido em pH 5, 6, 7 e 8. Para comparação do efeito do pH sobre o proteoma extracelular, foram utilizados 125 µg de proteínas extracelulares obtidas dos extratos proteicos nessas condições.

Para o estudo de comparação do efeito de fontes de carbono sobre o proteoma intracelular, foram utilizados 120 µg de proteínas intracelulares obtidas do micélio de *A. niveus* crescido em glicose, lactose, frutose e xilose. Para comparação do efeito das fontes de carbono sobre o proteoma extracelular, foram utilizados 80 µg de proteínas extracelulares obtidas dos extratos proteicos nessas condições.

Para o estudo de comparação do efeito das fontes de nitrogênio sobre o proteoma intracelular, foram utilizados 120 µg de proteínas obtidas do micélio de *A. niveus* crescido em isoleucina, histidina, cisteína e ácido glutâmico. Para comparação do efeito das fontes de nitrogênio sobre o proteoma extracelular, foram utilizados 60 µg de proteínas extracelulares obtidas dos extratos proteicos das condições de isoleucina, histidina e ácido glutâmico.

Para o estudo de comparação do efeito das fontes orgânicas sobre o proteoma intra- e extracelular de *A. niveus*, foram utilizados 120 µg de proteínas extraídas das amostras de soro de leite, farinha de pena e caseína.

Os volumes correspondentes a essas massas de proteínas, quando necessário, foram completados com tampão de reidratação para um volume final de 250 µL, correspondente à capacidade total da tira de 13 cm.

As amostras foram acrescidas de uma suplementação com: 0,002% de azul de bromofenol (GE Healthcare Life Sciences); 0,5% de tampão IPG *buffer* (GE Healthcare Life Sciences) e 2,8 mg. mL^{-1} de 1,4-Dithiothreitol (DTT) (GE Healthcare Life Sciences). Cada amostra foi aplicada em tira de 13 cm com pH 3-10 imobilizado em poliacrilamida (Immobiline Dry Strip - GE Healthcare). Posteriormente, essas tiras foram aplicadas em um suporte adequado, para serem hidratadas passivamente por 16 h a 20ºC. Após esse período, as tiras foram distribuídas em placas de cerâmica, submersas em óleo mineral e submetidas à focalização isoelétrica (IEF) no sistema Ettan IPGphor III (GE Healthcare). Os parâmetros da IEF foram controlados pelo sistema do equipamento, até atingirem um total acumulado de 15500 Volts hora (Vh), por focalização. Após a separação das proteínas pelo ponto isoelétrico (pI), as tiras foram armazenadas em tubos de vidro a -80ºC, por até uma semana, até a realização da etapa de equilíbrio. Todas as condições experimentais dos proteomas, intracelulares e extracelulares, foram realizadas em triplicatas técnicas.

3.6.2. Equilíbrio das tiras focalizadas

As tiras com as proteínas focalizadas foram retiradas do congelamento e reduzidas em solução de equilíbrio contendo 6 M ureia; 75 mM Tris-HCl em pH

8,8; 29,3% glicerol; 2% SDS (GE Healthcare Life Sciences); 0,002% azul de bromofenol, suplementado com 10 mg. mL^{-1} de DTT. As tiras foram então, incubadas sob agitação por 15 min a 20ºC. Após esse período, a solução inicial foi removida e as tiras submetidas à etapa de alquilação durante 15 min a 20ºC, em solução de equilíbrio suplementada com 25 mg. mL^{-1} de iodoacetamida. Logo após esse período, a solução foi removida, iniciando-se a etapa da segunda dimensão.

3.6.3. Segunda dimensão – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para a segunda dimensão, foram preparados géis de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio 12,5% (m/v) (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970).

Cada tira já equilibrada e um papel de filtro, medindo 1x1 centímetro (cm), com um volume de 5 µL do marcador de massa molecular com padrão de bandas de 12 a 225 kDa (Amersham ECL *Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker*, GE, USA), foram posicionados horizontalmente na superfície do gel.

Em seguida, cada gel foi selado com solução de agarose contendo: 25 mM Tris base (GE Healthcare Life Sciences); 192 mM glicina (GE Healthcare Life Sciences); 0,1% SDS (GE Healthcare Life Sciences); 0,5% agarose (GE Healthcare Life Sciences); 0,002% azul de bromofenol.

A eletroforese foi realizada na cuba SE 600 Ruby (GE Healthcare Life Sciences), com os compartimentos superior e inferior preenchidos com tampão Tris-glicina (25 mM Tris base; 192 mM glicina; 0,1% SDS). O sistema foi acoplado ao banho termostático de circulação MultiTemp IV (GE Healthcare Life Sciences) a 10ºC. Cada gel foi submetido durante 15 min a uma corrente elétrica com amperagem de 15 mA/gel e depois desse período a uma corrente elétrica constante de 40 mA/gel até o final da corrida. Ao final da migração das proteínas, o gel bidimensional (2-DE) foi retirado do aparato de eletroforese e submetido à etapa de coloração.

3.7. Coloração dos géis bidimensionais (2-DE)

Os géis 2-DE foram submetidos por 30 min ao tratamento de fixação em solução contendo 10% ácido acético e 40% etanol.

Em seguida, a solução fixadora foi descartada e as proteínas coradas, por 16 h a 20ºC, com solução azul de Coomassie G-250 [8% (m/v) de sulfato de amônio; 0,8% (v/v) de ácido fosfórico; 0,08% (m/v) de azul de Coomassie G-250; 20% (v/v) de metanol. Para a remoção do corante, foram realizadas repetidas lavagens com água ultrapura, a fim de visualizar as proteínas reveladas.

Os géis 2-DE, até o momento da captura e análises das imagens, para sua conservação, foram armazenados em uma solução contendo 5% (v/v) de ácido acético.

3.8. Obtenção, análise das imagens dos géis 2-DE, seleção e coleta dos *spots* proteicos

Os géis 2-DE foram lavados com água ultrapura para remoção da solução de ácido acético, digitalizados com auxílio do densitômetro DS-6000 (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brasil), em modo transparente com resolução de imagem de 300 dpi. As imagens capturadas foram importadas para o formato Tagged Image File (TIF) e analisadas no programa Image Master 2D Platinum v 7.0 (GE Healthcare Life Sciences).

Para o estudo comparativo do efeito de pH 5, 6, 7 e 8, sobre o proteoma intra e extracelular do fungo *A. niveus,* foram utilizados como referências os géis obtidos nas condições de pH 6 e 5, respectivamente.

Para o estudo comparativo do efeito de 1% (m/v) das fontes de carbono lactose, xilose, frutose e glicose, sobre proteoma intra e extracelular do fungo *A. niveus*, foram utilizados como referências os géis obtidos nas condições de glicose e frutose, respectivamente.

Para o estudo comparativo do efeito de 1% (m/v) das fontes orgânicas poliméricas de nitrogênio (soro de leite, farinha de pena e caseína), sobre o proteoma intra e extracelular do fungo *A. niveus,* foram utilizados como referências os géis obtidos nas condições de farinha de pena.

Para o estudo comparativo do efeito de 1% (m/v) dos aminoácidos (isoleucina, histidina, cisteína e ácido glutâmico), como fontes orgânicas de

nitrogênio, sobre o proteoma intracelular do fungo *A. niveus*, foram utilizados como referências os géis obtidos na condição de isoleucina e ácido glutâmico, respectivamente.

Para o pareamento das triplicatas dos géis 2-DE, foram selecionados *spots* comuns para cada uma das condições comparativas do proteoma intracelular e do proteoma extracelular. Os artefatos detectados nas análises foram removidos manualmente.

Na análise, o *software* forneceu as informações de enumeração de cada um dos *spots*, de acordo com o *match ID*, os valores experimentais observados das massas moleculares (kDa), ponto isoelétrico, a abundância relativa entre os *spots* comuns das condições comparativas e os *spots* exclusivos.

Também foram apresentadas as médias dos coeficientes de correlação (r^2) entre os *spots* coincidentes das triplicatas dos géis 2-DE. Esses dados foram mensurados por gráfico de dispersão com auxílio da ferramenta *scatter plots* do programa Image Master 2D Platinum v 7.0.

Para a coleta dos *spots* de interesse, os critérios de seleção adotados foram exclusivos de uma determinada condição ou com maior nível de abundância entre as condições comparadas, mas que apresentassem diferença quantitativa nos níveis de abundância com *fold* > *2* e significância estatística ANOVA com $p < 0,05$ (LI et al., 2010).

As excisões dos *spots* proteicos selecionados foram realizadas manualmente, com auxílio de agulhas hipodérmicas estéreis. Essas amostras foram armazenadas em microtubos e congeladas a -80°C até a etapa de digestão tríptica das proteínas.

3.9. Digestão tríptica e análises de espectrometria de massas por ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI)

Para remoção do corante azul de Coomassie G-250 os *spots* selecionados foram imersos, por até 24 h, em 100 µL de solução composta por 50% (v/v) acetonitrila (ACN) e 0,1% (p/v) e bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3). Essa solução foi descartada e os *spots* desidratados com 100 µL de ACN 100%

durante 10 min. Após esse período, o solvente foi removido e os *spots* submetidos à etapa de digestão trípitica.

Para essa etapa, os *spots* foram reidratados com 5 µL de solução de tripsina (20 µg. mL^{-1}) (*sequencing grade modified trypsin*, Promega, Madison, WI, USA - Sigma) e, em seguida, adicionados 100 µL de solução 100 mM de NH_4HCO_3 (p/v). As reações foram então incubadas em banho-maria a 37ºC por 22 h. Após as digestões, as reações foram interrompidas com acidificação do meio reacional com 5 µL de ácido fórmico (Sigma). Em seguida, as amostras foram armazenadas a 20ºC por 4 h para completa eluição dos peptídeos trípticos do gel para a solução.

Após esse período, os peptídeos trípticos foram submetidos à etapa de purificação que foi realizada em ponteira de 200 µL, contendendo fibra de vidro AP4009000 (Merck Millipore), previamente empacotada com uma resina de fase reversa POROS® R2 (Applied Biosyntems®, Bedford, USA) já ativada em metanol (LS Chemicals) e equilibrada em solução 0,2% de ácido fórmico (v/v). A amostra contendo os peptídeos foi, então, concentrada na resina e dessalinizada por duas lavagens com 200 µL de solução 0,2% de ácido fórmico (v/v). Os peptídeos que interagiram com a resina foram recuperados por eluição com 50 µL de uma solução de 60% metanol e 5% ácido fórmico (v/v). As amostras contendo os peptídeos eluídos da resina foram secas em concentrador a vácuo rotacional 2-18 CDplus (Martin Christ, Osterode am Harz, Germânia) a 1200 rpm a 45ºC por 50 min.

As amostras secas foram homogeneizadas com 6 µL da solução matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (5 mg. mL^{-1}), previamente solubilizada em uma solução de 50% ACN (v/v) e 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) (v/v). Em seguida, foram aplicados 2 µL, de cada amostra, em uma placa de inox de 96 poços (placa MALDI), sendo o ensaio realizado em duplicata. Após completa evaporação das amostras, a placa MALDI foi submetida à técnica analítica de espectrometria de massas (MS), com fonte de ionização do tipo ionização e dessorção à laser, auxiliada por matriz – MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) e analisador de massas do tipo tempo-de-vôo (TOF), para obtenção dos espectros MALDI MS/MS. A determinação dos espectros MS/MS, a partir dos íons detectados de cada amostra, foi baseada no padrão massa-

carga do calibrante externo, que é uma mistura de peptídeos, com propriedades conhecidas, originados de diferentes proteínas (insulina bovina, citocromo C, aldolase de coelho e albumina sérica bovina), que compõem o padrão de calibração (Protein MALDI-MS Calibration Kit; MSCAL-1-1KT, Sigma).

Os resultados de espectrometria de massas dos efeitos de pH (proteoma intra- e extracelular), fontes de carbono (proteoma intra- e extracelular) e fontes de nitrogênio do proteoma intracelular (isoleucina, ácido glutâmico, histidina, cisteína e isoleucina) foram obtidos no equipamento MALDI-TOF/TOF – MS (Axima Performance, Kratos-Shimadzu, Manchester, Reino Unido), localizado no Centro de Química de Proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto, sob supervisão do Prof. Dr. José César Rosa (FMRP).

Os resultados de espectrometria de massas referentes às amostras do proteoma intracelular de *A. niveus* crescido em meio com soro de leite, farinha de pena e caseína e do proteoma extracelular das fontes soro de leite, farinha de pena, caseína, ácido glutâmico, histidina e isoleucina foram obtidos no equipamento MALDI-TOF/TOF-MS (UltrafleXtreme, Bruker, Massachustts, EUA), sob supervisão do Prof. Dr. Loic Quinton e Prof. Dr. Edwin De Pauw do laboratório de espectrometria de massas da Universidade de Liège.

3.10. Análises de bioinformática

Os espectros MS/MS das proteínas analisadas no MALDI-TOF/TOF – MS (Axima Performance, Kratos-Shimadzu, Manchester, Reino Unido), com arquivos compatíveis com o *Mascot Generic Format*, foram analisados com auxílio da ferramenta MS/MS *ions search* do *software on line* Mascot versão 2.6 (Matrix Science, London, UK). (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS)

Para a identificação das proteínas intra- e extracelulares de *A. niveus,* foram utilizados os bancos de dados de proteínas do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBIprot) e do SwissProt.

Os parâmetros de busca adotados foram: restrição taxonômica para fungos, clivagem por tripsina com permissão para até uma perda,

carbamidometilação das cisteínas como modificação fixa, oxidação da metionina como modificação variável, tolerância do peptídeo de 1,2 Dalton (Da), tolerância do fragmento iônico MS/MS de 0,8 Da e massas médias. Os resultados foram considerados significantes para um acerto aleatório individual com $p < 0,05$, que representa identidade ou homologia de acordo com o escore estabelecido pelo MASCOT (Matrix Science, Boston, Massachusetts, EUA).

Na Tabela 1, é possível observar os bancos de dados que foram acessados e o número das sequências depositadas nas análises pelo MASCOT.

Tabela 1 - Informações sobre os bancos de dados utilizados na busca das proteínas intra- e extracelulares em cada condição analisada

Condições	Bancos de dados	Número de sequências
Efeitos de pH: proteoma intra- e extracelular	NCBIprot 20170127	113176206
	SwissProt 2017_01	553474
Efeitos de fontes carbono: proteoma intracelular	NCBIprot 20170521	122709180
	SwissProt 2017_05	554515
Efeitos de fontes carbono: proteoma extracelular	NCBIprot 20170515	1222307828
	SwissProt 2017_05	554515
Efeitos de fontes de nitrogênio (aminoácidos): proteoma intracelular	NCBIprot 20171024	135744157
	SwissProt 2017_11	556196

Os dados de cada proteína de MS/MS, obtidos no MALDI-TOF/TOF-MS (UltrafleXtreme) foram analisados utilizando o *Software* Biotools (Bruker, Massachustts, EUA) e para a identificação das proteínas foram utilizados os bancos de dados UniProtKB e NCBIprot.

Os parâmetros de busca adotados foram: restrição taxonômica para fungos, clivagem por tripsina com permissão para até uma perda, carbamidometilação das cisteínas como modificação fixa, oxidação da metionina como modificação variável, tolerância do peptídeo de 1,2 Dalton (Da), tolerância do fragmento iônico MS/MS de 0,8 Da e massas médias.

Após as identificações das proteínas intra e extracelulares, foram apresentadas as características referentes ao número do *spot,* acesso ao banco de dados, proteína e origem da linhagem do fungo, escore [proteínas identificadas pelo MASCOT que apresentaram peptídeos (íons escore) com nível de significância de homologia extensiva ou identidade ($p < 0,05$) em relação às proteínas de banco de dados, porcentagem de cobertura, MM (massa molecular teórica e experimental), pI (ponto isoelétrico teórico e experimental), anova, nível de abundância / exclusivo, base de dados da identificação e sequência do peptídeo.

3.11. Predição de propriedades das proteínas extracelulares identificadas, utilizando análises *in silico*

As sequências FASTA das proteínas extracelulares identificadas no proteoma extracelular de *A. niveus* foram analisadas quanto à presença de peptídeo sinal, secreção por vias não-clássicas e efetores fúngicos.

A predição de peptídeo sinal foi realizada no *software online* SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) (PETERSEN et al., 2011). A presença de peptídeo sinal indica que aquela proteína pode ser secretada pelas vias clássicas.

Para a predição de proteínas secretadas por vias não clássicas a análise foi realizada no *software online* SecretomeP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/).

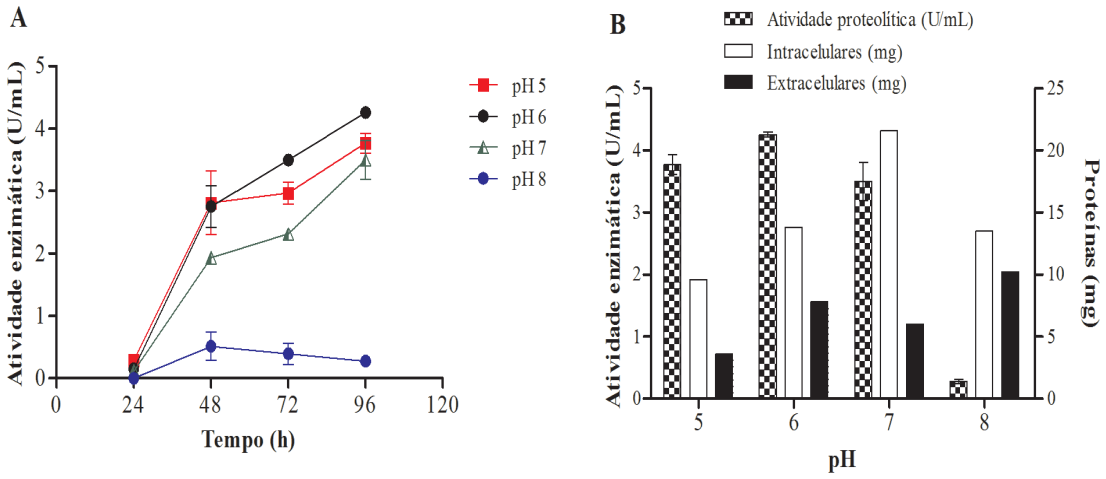
A predição de efetores fúngicos, envolvidos na interação com hospedeiros, foi realizada com auxílio da ferramenta EffectorP. O programa prediz a probabilidade de uma proteína estar envolvida na fitopatogenicidade a partir de análises do tamanho da sequência, massa molecular, carga líquida da proteína e seu conteúdo de cisteína, serina e triptofano (SPERSCHNEIDER et al., 2015).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito do pH sobre a produção de peptidases pelo fungo *A. niveus*

O pH é um dos parâmetros de cultivo que mais influenciam a produção e secreção de proteínas por fungos filamentosos. O extrato proteico foi coletado e analisado em diferentes tempos de bioprocesso submerso para a determinação das atividades de peptidase. A atividade proteolítica e os respectivos perfis de produção nas diferentes condições de pH estão apresentados na Figura 2A. A relação da atividade proteolítica com o acumulado de proteínas intracelulares extraídas da massa micelial e das proteínas extracelulares, após 96 h de bioprocesso submerso, está apresentada na Figura 2B.

Figura 2. Efeito de pH sobre o fungo *A. niveus* em bioprocesso submerso. (A) Perfil de produção enzimática em meios de cultura com diferentes faixas de pH. (B) Relação entre acumulado das proteínas intracelulares extraídas da massa micelial e atividade proteolítica, após 96 h de cultivo.



A produção de peptidases foi avaliada utilizando como substrato azo-caseína 1% em tampão acetato (100mM pH 5,0) a 50°C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as médias foram submetidas a análise *Two way* ANOVA, com pós teste de Bonferroni, utilizando o software Graph Pad Prism.

As proteínas intracelulares foram determinadas pelo método de Bradford (1976).

Após 96 h em cultivo submerso, a melhor produção de peptidase foi obtida em pH 6 e atingiu cerca de aproximadamente 4 U/mL ($p < 0,001$), mas esta produção não está diretamente relacionada ao maior acúmulo de biomassa, nas condições do estudo.

Na Figura 2B é possível observar, que após 96 h de cultivo, o maior acúmulo de biomassa ocorreu em pH 7. Enquanto que em pH 5, o acúmulo de biomassa não foi favorecido e a atividade proteolítica atingiu a segunda melhor

produção. Por outro lado, em pH 8 foi observado um baixo nível de produção de peptidase, embora a biomassa acumulada não indique claramente um prejuízo no crescimento do microrganismo. Além disso, em pH 8 também foi detectada a maior quantidade de proteínas extracelulares, mas que não estão diretamente relacionadas à atividade proteolítica.

O efeito de pH, sobre a produção de peptidases, também foi demonstrado em outros trabalhos, Manteau et al. (2003), ao cultivar o fungo *B. cinerea* em pH 3 e 4 observou maior produção de peptidase; em outro estudo o fungo *B. cinerea* foi submetido ao cultivo submerso em condições de pH que variaram de 5 a 8 e a maior atividade proteolítica foi observada em pH 6.5, após 9 dias de cultivo (ABIDI, LIMAM, NEJIB, 2008).

Para o fungo *A. niger* MS82, as variações de pH também influenciaram na produção de celulases: β-glucosidase e endoglucanase. O microrganismo foi submetido ao cultivo submerso em meios formulados por diferentes substratos: grama, milho e bagaço de cana. Os autores avaliaram as condições de pH 4, 5, 6 e 7 e as maiores produções dessas celulases foram observadas em pH 4, e os perfis de produção foram reduzidos nas condições de pH 5, 6 e 7 (SOHAIL et al., 2009).

O pH foi um dos fatores do meio de cultivo responsável por interferir na secreção de enzimas importantes para o metabolismo de *C. albicans* e pela abundância de enzimas relacionadas com a virulência dessa espécie (DAVIS, 2003).

A adaptação e sobrevivência dos microrganismos, a uma ampla faixa de pH externo, garante a ativação do sistema homeostático, que regula o pH interno, a síntese de enzimas e outros metabólitos (PEÑALVA et al., 2008). Além disso, os fungos filamentosos possuem a capacidade de secretar metabólitos responsáveis pela modificação do pH extracelular para sua sobrevivência, como já demonstrado para os fungos *A. nidulans* e *Fusarium oxysporum* (BI et al., 2016).

O efeito do pH sobre os microrganismos depende de vários fatores como: espécies, meio de cultivo padrão, tempo de cultura, entre outros. As proteínas responsivas a estas condições podem ter importância biotecnológica ou na compreensão de processos patogênicos. Para o *A. niveus* crescido em meio

submerso, observamos que o pH influenciou na produção de peptidase (Figura 2A) e no conteúdo proteico intra- e extracelular (Figura 2B) desse fungo.

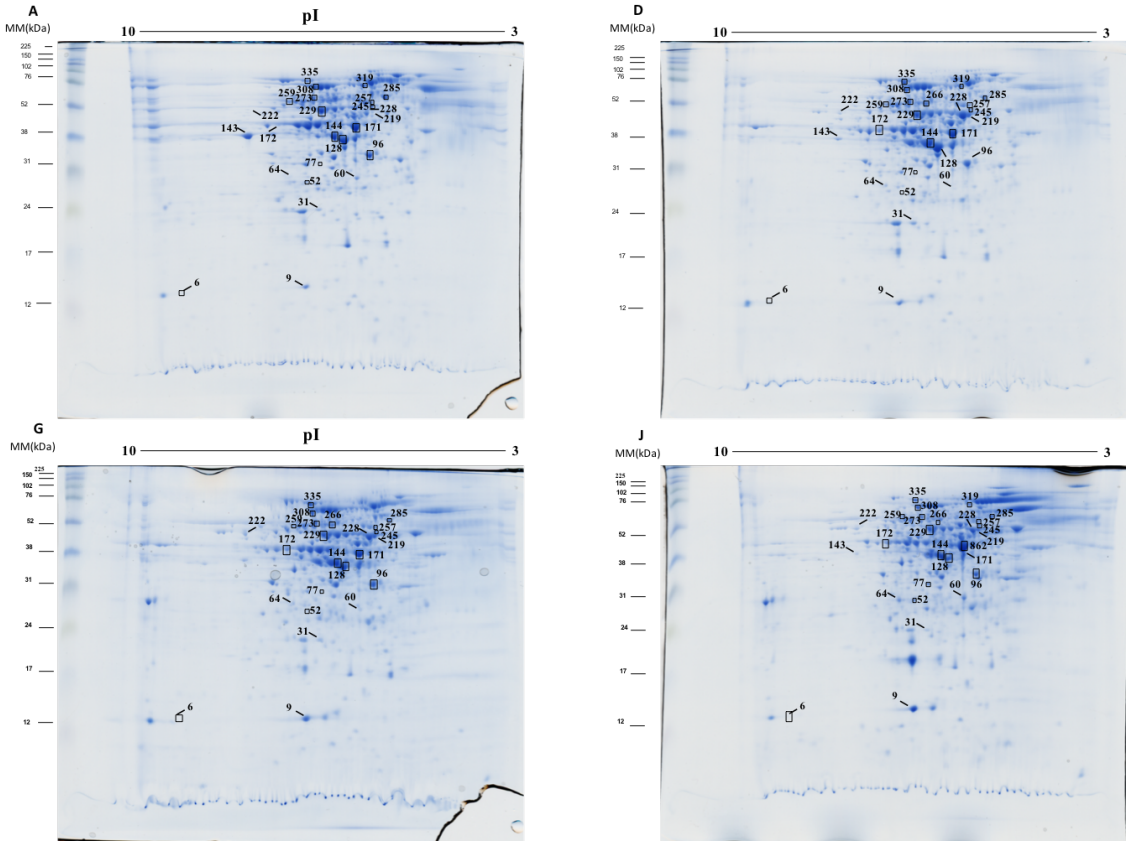
De acordo com os resultados apresentados para a produção de peptidase pelo *A. niveus,* em resposta aos efeitos de pH, nos estudos dos efeitos de fontes de carbono e nitrogênio seguintes, foram fixados o pH inicial do meio de cultivo em 6 e o tempo de cultivo submerso em 96 h.

4.2. Efeitos do pH sobre o proteoma intracelular de *A. niveus*

Para avaliar a influência do pH extracelular do meio de cultivo em pH 5, 6, 7 e 8, as proteínas intracelulares de *A. niveus* foram extraídas dos micélios obtidos em 96 h de bioprocessos submersos.

As triplicatas dos géis bidimensionais do proteoma intracelular dos efeitos do pH, obtidas via 2-DE, foram analisadas no *software* Image Master 2D Platinum v 7.0 e estão representadas no APÊNDICE A. Os perfis das proteínas intracelulares, nas diferentes condições de pH, foram representados nos géis bidimensionais da Figura 3.

Figura 3 – Géis representativos do proteoma intracelular de *A. niveus* crescido em meio com pH 5 (A), pH 6 (D), pH 7 (G) e pH 8 (J). Os *spots* marcados são referentes as proteínas inracelulares identificadas que foram extraídas dos micélios em 96 h de bioprocessos submersos.



O marcador de massa molecular [MM (kDa)] utilizado foi o Amersham ECL Full-Range Rainbow com o padrão de bandas de 225, 150, 02, 76, 52, 38, 31, 24,17 e 12 kDa. As tiras com gradiente linear de pH imobilizado (13 cm, com pH 3-10) foram carregadas com 240 µg de proteínas totais. A segunda dimensão foi realizada em gel SDS/PAGE 12,5%, os géis 2-DE foram corados com azul de Coomassie G-250, digitalizados no densitômetro DS-6000 e analisados no programa Image Master 2D Platinum v 7.0. O gel direcionador foi o pH 6. Fonte:

Elaborado pela autora.

Após análises comparativas das triplicatas dos géis 2-DE, as médias dos coeficientes de correlação (r^2) obtidas entre os *spots* coincidentes do proteoma intracelular de *A. niveus* cultivado em pH 5, 6, 7 e 8 foram 0,92; 0,93; 0,84 e 0,93, respectivamente, ou seja, com uma reprodutibilidade de pelo menos 84% entre os *spots* das condições estudadas.

Nos mapas bidimensionais do proteoma intracelular de *A niveus* cultivado em pH 5, 6, 7 e 8 foram identificados 480 ± 111, 440 ± 96, 261 ± 69 e 336 ± 114 (média ± desvio padrão), respectivamente.

Para análise dos perfis de proteínas intracelulares, foram selecionados os *spots* proteicos exclusivos de uma condição de pH e aqueles que apresentaram

maior abundância relativa entre todas as amostras comparativas com *fold* > *2* e p < 0,05. Com isso, foram coletados: 40 *spots* do pH 5; 40 *spots* do pH 6; 27 *spots* do pH 7 e 33 *spots* do pH 8.

Pelos géis 2-DE é possível observar que as massas moleculares da maioria das proteínas estavam distribuídas na faixa de 17 a 150 kDa e ponto isoelétrico na faixa de pH neutro - ácido.

Na Figura 3, também estão identificados os *spots* referentes às proteínas intracelulres que foram posteriormente identificadas por espectrometria de massas e cujas características estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2- Lista de proteínas intracelulares, identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS, que foram extraídas dos micélios de *A. niveus* crescido em pH 5, 6, 7 e 8 em bioprocessos submersos

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura %	MM(kDa)		pI		Anova	Nível de abundância/ Exclusivo	Peptídeos sequenciados
				Teor.	Obs.	Teor.	Obs.			
pH 5										
143	G3P_ASPNG **	*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [OS=Aspergillus niger* GN =gpdA PE=3 SV=2]	178/ 8	36	38	6.6	7.81	3,85E-05	29.65	VPTSNVSVVDL TCR/LVSWYDN EWGYSR
245	KKK12029 .1 *	*Glucokinase [Aspegillus rambellii]*	67/ 2	55	52	5.6	5.54	1,93E-06	2.52	EFDYPAEEVQR
257	XP_00126 7693.1 *	*Prolidase pepP, putative [Aspergillus clavatus* NRRL 1]	85/ 2	52	55	5.25	5.55	4,70E-04	2.04	NVLIDAGGEYR
259	XP_00121 5804.1 *	*Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial precursor [Aspergillus terreus* NIH2624]	278/ 7	62	56	7.26	7.08	3,44E-08	3.67	SLYGQIAAGVA EGK/STGAVVG QQPFGGAR/DV IQFVPGEAEDV TR
273	XP_00121 3587.1 *	*Glucose-6-phosphate isomerase [A. terreus* NIH2624]	127/ 5	61	58	5.94	6.60	0,0019740	2.40	PGFSQATELSA WK/TFTTAETTT NANTAK
285	XP_00121 8472.1 *	*Heat shock protein 60, mitochondrial precursor [A. terreus* NIH2624]	332/ 9	62	59	5.52	5.30	0,0368127	2.74	NVLIESPYGSPK /GYTSPYFITDP K/SANFDQQLG VSIIK/TIVENAG LEGSVIVGK
319	XP_00181 7522.1 *	*Metallopeptidase MepB [Aspergillus oryzae* RIB40]	168/ 3	82	72	5.53	5.70	6,03E-9	5.06	LSQISIEFQK/TP ETVDTFLGDLR

Continua

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura %	MM(kDa)		pI		Anova	Nível de abundância/ Exclusivo	Peptídeo sequenciado
				Teor.	Obs.	Teor.	Obs.			
pH 6										
31	SODM_NEUCR *	*Superoxide dismutase, mitochondrial precursor [A. terreus* NIH2624]	62/ 4	27	24	6.23	6.51	4,55E-08	4.38	VINWKTAEER
64	EZF17211.1 *	*Glucosamine-6-phosphate-deaminase [Trichophyton rubrum* MR850]	69/ 3	39	28	6.51	7.05	2,45E-06	9.29	YFESIELSGTDAR
96	XP_001208997 *	*Inorganic pyrophosphatase [A. terreus* NIH2624]	130/ 10	33	31	5.30	5.54	3,22E-5	2.04	VIVIDVNDPLASK/ GDISVASATVENAAER
144	XP_001213881.1 *	*Fructose-bisphosphate aldolase [A. terreus* NIH2624]	150/ 9	40	36	5.58	6.232	2,06E-11	16.66	SGVIVGDDVLR/YAIPAINVTSSSTVVASLEAAR
171	OGM51016.1 *	*Class V chitinase ChiB1 [Aspergillus bombycis]*	63/ 3	48	38	5.67	5.81	3,77E-07	8.16	SVAYFVNWAIYGR
219	XP_001210709.1 *	*Mitochondrial processing peptidase beta subunit*	139/ 4	53	45	5.50	6.48	3,54E-07	11.96	TPEFIGSEVR/LCFNVTPAEVER
229	ODM14989.1 *	*Homogentisate 1,2-dioxygenase [Aspergillus cristatus]*	72/ 2	50	46	5.83	6.48	4,93E-11	2.17	LSGTAFTAPR
266	XP_015404949.1 *	*UDP-galactopyranose mutase, partial [Aspergillus nomius NRRL 13137]*	71/ 1	61	51	5.88	6.31	7,70E-10	12.14	LVDGAQAFAK
308	XP_001210638.1 *	*Transketolase 1 [A. terreus* NIH2624]	74/ 1	75	63	5.97	6.67	2,95E-09	15.08	LTTTIGFGSK

Continuação

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura %	MM(kDa)		pI		Anova	Nível de abundância/ Exclusivo	Peptídeos sequenciados
				Teor.	Obs.	Teor.	Obs.			
pH 7										
6	XP_001216687.1 *	*Nucleoside diphosphate Kinase [A. terreus* NIH2624]	158/ 1	17	13	8.52	9.23	2,28E-05	33.65	LAQHAWIYEN/AILGATNPLASAPGTIR
128	KKF95538.1 *	*Transaldolase [Ceratocystis platani]*	63/ 2	35	34	5.26	6.13	0,070076	4.39	LASTWEGIK
172	XP_001214125.1 *	*S-(hydroxymethyl) glutathione dehydrogenase [A. terreus* NIH2624]	79/ 6	33	38	8.64	7.15	4,91E-04	13.61	SCLLGCGITTGYGAVTATAK
222	XP_001216611.1 *	*Citrate synthase [A. terreus* NIH2624]	165/ 5	52	45	8.58	7.90	8,56E-09	15.37	VIGEVTLDQAYGGAR/DLSAEWAAR
228	XP_001212080.1 *	*Enolase [A. terreus* NIH2624]	235/ 7	47	45	5.30	5.67	4,34E-10	11.87	TSDFQIVGDDLTVTNPLR/SGETEDVTIADIAVGLR
335	XP_008710931.1 *	*Aconitate hydratase, mitochondrial [Cyphellophora europaea* CBS 101466]	67/ 1	80	67	5.53	6.74	8,18E-04	3.98	DTYQAPPEDR
pH 8										
9	AAL38991.1*	*Cu,Zn superoxide dismutase SOD1 [Aspergillus fumigatus]*	216/ 15	16	14	6.04	6.76	1,66E-06	2.96	LIGAESVLGR/TLVVHAGTDDLGR
52	XP_001819832.1*	*Proteasome subunit alpha type-6 [A. oryzae* RIB40]	227/ 12	28	28	6.02	5.69	1,97E-08	5.49	LYQVEYAFK/AITSANITSLGVR/ALTEDEIDER
60	XP_001819085.1*	*Proteasome subunit alpha type-4 [A. oryzae* RIB40]	96/ 6	28	29	5.62	5.84	2,00E-04	10.68	YLLTYDEEIPCEQLVR

Continuação

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura %	MM(kDa)		pI		Anova	Nível de abundância/ Exclusivo	Peptídeos sequenciados
				Teor.	Obs.	Teor.	Obs.			
77	XP_00121 5616.1*	*Esterase D [A. terreus* NIH2624]	63/ 4	32	32	6.14	5.92	0,007853	5.19	TVFEAFPQLDSS R
862	EYE94642 .1*	*Endochitinase 1 [Aspergillus ruber* CBS 135680]	268/ 9	44	43	5.27	5.92	0,009135	Exclusivo	SVAYFVNWAIYG R/VLLSIGGWTYS SNFAQPASTEQ GR

MM: massa molecular pI: ponto isoelétrico Teor: teórico Obs: observado
Escore [proteínas identificadas pelo MASCOT que apresentaram peptídeos (íons escore) com nível de significância de homologia extensiva ou identidade ($p < 0,05$), em relação as proteínas de banco de dados].
Peptídeos sequenciados pelo MASCOT.
Na coluna do número de acesso as bases de dados utilizadas estão indicadas a seguir: * NCBIprot; ** Swissprot

4.3. Aspectos biológicos das proteínas intracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado em diferentes condições de pH

Considerando os dados proteômicos apresentados nos géis 2-DE de *A. niveus* para os diferentes pH, as maiores quantidades de *spots* proteicos foram observadas no proteoma intracelular das condições de pH ácidos. De acordo com as identificações dos *spots* proteicos apresentadas na Tabela 2, foram observadas diferenças nos perfis de proteínas intracelulares de *A. niveus,* cultivadas em meio líquido com pH inicial 5, 6, 7 ou 8. Os resultados indicam que o pH extracelular foi um parâmetro químico que influenciou o proteoma intracelular de *A. niveus* e as proteínas identificadas foram agrupadas de acordo com suas propriedades metabólicas.

4.3.1. Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos

No proteoma intracelular de *A. niveus* foram identificadas diversas proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos, de modo direto e indireto. As enzimas que fazem parte do metabolismo de carboidratos exercem um importante papel na geração de energia e na fisiologia de microrganismos (LORENTZEN et al., 2005; RODAKI; YOUNG; BROWN, 2006; RIZWAN et al., 2010; ROUMELIOTI et al., 2010; WEBER et al., 2012; MENDONÇA et al., 2016).

Das vias glicolítica e gliconeogênese foram encontradas as enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*spot* 143), a glicoquinase (*spot* 245), frutose-1,6-bisfosfato aldolase (*spot* 144), glucosamina-6-fosfato (GLcN-6-P), deaminase (*spot* 64) e enolase (*spot* 228). Da via das fosfopentoses foram identificadas a transcetolase (*spot* 308) e a transaldolase (*spot* 128). Já da via dos ácidos tricarboxílicos (TCA) foram identificadas a citrato sintase (*spot* 222) e a aconitato hidratase mitocondrial (*spot* 335).

No proteoma intracelular de *A. niveus,* as enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*spot* 143) e glicoquinase (*spot* 245) foram mais abundantes em pH 5.

Além de seu papel na glicólise e gliconeogênese, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase pode estar envolvida em outros processos celulares, transporte e fusão de membrana (SIROVER, 1999; BARBOSA et al., 2004; RODACKA, 2013). Acerca de outras funções, Delgado et al. (2001) relataram que em *S. cerevisiae* a

gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase que se localiza na parede celular não tem função completamente elucidada.

Barbosa et al. (2006) em estudos com *P. brasiliensis* relacionaram o papel dessa enzima com a adesão e invasão a componentes da matriz extracelular de hospedeiros. Observações similares foram feitas para o fungo *Penicillium marneffei* e sua capacidade de infectar células hospedeiras (KHANTHAWONG; VANITTANAKOM, 2016).

No cultivo da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, os autores relacionaram a glicoquinase, identificada no proteoma intracelular, à degradação da glicose, presente no meio de cultura, pela via glicolítica (MARTINEZ-MOYA et al., 2015). Outros trabalhos também relataram que a glicoquinase, dependendo do pH extracelular, pode estar envolvida na fosforilação da glicose e no crescimento fúngico (PANNEMAN et al., 1996; RUI; HAHN, 2007; FLECK; BROCK, 2010).

No proteoma intracelular de *A. niveus,* a frutose-1,6-bisfosfato aldolase (*spot* 144) e a glucosamina-6-fosfato (GLcN-6-P) deaminase (*spot* 64) foram mais abundantes em pH 6. Em *A. niger*, a GLcN-6-P deaminase foi responsável pelo menor acúmulo de ácido cítrico no meio de cultivo, o que contribuiu para a germinação de esporos e crescimento fúngico (SOLAR; TURSIC; LEGISA, 2008).

No proteoma intracelular de *A. niveus,* a enolase (*spot* 228) foi mais abundante em pH 7 e que na via glicolítica está envolvida na catálise reversível de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato (PEAK et al., BOONE et al., 2016). No cultivo submerso de *F. oxysporum* URM 7401, a produção intracelular de enolase foi favorecida em pH 8 (GARZON et al., 2017). No estudo com *Pseudomonas aeruginosa* essa enzima foi relacionada com a sua virulência (WENG et al., 2016). De modo similar, em outros estudos com *F. Oxysporum,* a enolase foi correlacionada com vantagens na obtenção de energia e com a patogenicidade de linhagens mais virulentas (SUN et al., 2014; LI et al., 2015). Todavia, no trabalho de Macías-Sánchez et al. (2015) não houve correlação entre a presença de enolases e a patogenicidade do fungo *F. oxysporum*.

No proteoma intracelular de *A. niveus,* as enzimas citrato sintase (*spot* 222) e aconitato hidratase mitocondrial (*spot* 335) também foram mais abundantes em pH 7 e estão envolvidas no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). A citrato sintase atua na síntese do citrato a partir de acetil-CoA e oxalacetato (RUIJTER et al., 2000;

ALEKSEEV; DUBINA; KOMOV, 2016) e já foi relatacionada ao crescimento fúngico (KUNZE et al., 2006; MURRAY; HYNES, 2010).

Já a aconitato hidratase mitocondrial catalisa a reação de citrato a isocitrato e também apresenta potencial antioxidante em condições de estresse oxidativo (KIRCHBERG et al., 2012). A abundância das enzimas enolase, citrato sintase e aconitato hidratase mitocondrial e as funções discutidas anteriormente podem corroborar o maior acúmulo de biomassa observado na Figura 2B.

No proteoma intracelular de *A. niveus,* a transcetolase (*spot* 308) e a transaldolase (*spot* 128) foram mais abundantes em pH 7 e 6, respectivamente. Essas enzimas participam da via das fosfopentoses (VATANAVIBOON et al., 2002; IWATA et al., 2017), que está associada ao consumo de EROs e, consequentemente, na redução de seus efeitos deletérios em microrganismos (TANG et al., 2016). Neste sentido, Juhnke et al. (1996) e Vatanaviboon et al. (2002) relataram que a baixa atividade enzimática da transaldolase, em células eucarióticas, ocasionou elevada sensibilidade ao estresse oxidativo.

A maior abundância de enzimas da via das fosfopentoses e a sua relação com uma maior resistência aos efeitos nocivos das EROs podem justificar a maior produção de peptidase em pH 6 e o maior acúmulo de biomassa em pH 7 por *A. niveus,* visto que são funções metabólicas negativamente afetadas pelo estresse oxidativo.

Garzon et al. (2017) ao avaliarem a proteômica do fungo filamentoso *F. oxysporum* URM 7401, em resposta ao efeito de pH em bioprocessos submersos, descreveram que os perfis de proteínas intracelulares e secretadas foram diretamente influenciados pelo pH. Os autores relataram que as condições de pH neutro e alcalino foram as mais favoráveis para a expressão de proteínas intracelulares que estiveram relacionadas ao metabolismo de carboidratos.

Bensen e colaboradores (2004) observaram que o crescimento de *C. albicans* foi prejudicado nas condições de pH 4 e 8, pois afetou a síntese de proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos (BENSEN et al., 2004). Segundo Rahmad e colaboradores (2014), alterações na expressão de proteínas envolvidas na glicólise, gliconeogênese e na função mitocondrial podem beneficiar o crescimento de células fúngicas em ambientes desfavoráveis.

Por isso que neste estudo com *A. niveus,* as proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos foram moduladas com o mesmo propósito, ou seja, favorecer a manutenção do microrganismo cultivado em meio líquido com diferentes condições de pH.

4.3.2. Proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e proteínas

No proteoma intracelular de *A. niveus* foram identificadas proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e proteínas.

A homogentisato de 1,2-dioxigenase (*spot* 229) foi mais abundante em pH 6 e está envolvida no metabolismo da tirosina e fenilalanina (FERNÁNDEZ-CAÑÓN et al., 1996). No proteoma intracelular de *Phanerochaete chrysosporium,* cultivado em meio suplementado com vanilina, os autores relataram que esse substrato promoveu um estresse químico que ativou as vias metabólicas de compostos aromáticos (SHIMIZU et al., 2005). Já no proteoma de *B. cinerea* esta enzima foi relacionada com a desintoxicação de compostos tóxicos provenientes do meio de cultivo (FERNÁNDEZ-ACERO et al., 2007).

A enzima pirofosfatase inorgânica (*spot* 96), mais abundante em pH 6, está envolvida em processos metabólicos de compostos que contêm fosfato e na regulação de fosfoproteínas (SIVULA et al., 1999; PAYTAN MCLAUGHLIN, 2007). Nozawa et al. (2002) correlacionaram a importância do fosfato inorgânico e o do pH do meio de cultivo para a síntese e secreção de fosfatases em *N. crassa* e o pH ácido implicou no aumento da atividade da fosfatase na fase micelial. No trabalho com *A. niveus* a abundância de pirofosfatase inorgânica também foi modulada pelo pH ácido.

A prolidase pepP (*spot* 257) e a metalopeptidase MepB (*spot* 319) foram mais abundantes em pH 5 e estas enzimas estão envolvidas no metabolismo de aminoácidos e proteínas, respectivamente. No cultivo de *A. nidulans*, a prolidase atua na hidrolise de dipeptídeos contendo resíduos de prolina (JALVING et al., 2002).

As enzimas proteolíticas, prolidase e metalopeptidase, desempenham funções importantes na fisiologia e no desenvolvimento fúngico (YIKE, 2011). É possível que, dada as suas relevâncias metabólicas, possam ser identificadas em todas as condições de cultivo, mesmo que com diferenças quanti- e qualitativas.

4.3.3. Proteína envolvida no metabolismo de nucleotídeos

No proteoma intracelular de *A. niveus* foi identificada a enzima nucleosídeo difosfato quinase (NDK) (*spot* 6), de modo mais abundante em pH 7. A NDK é responsável por catalisar a transferência do grupo fosforil do nucleosídeo trifosfato para o nucleosídeo difosfato (HASUNUMA et al., 2003; KOLLI et al., 2008; DAR et al., 2011; QIAN; LIU, 2014). Por esse motivo, em fungos filamentosos, a NDK já foi envolvida na manutenção e controle dos nucleotídeos intracelulares (LIN; MOMANY; MOMANY, 2003; QIAN; LIU, 2014).

Além disso, em *Neurospora crassa* a NDK atuou na fosforilação de proteínas (LEE et al., 2006). Lee, Yoshida e Hasunuma (2009) relataram que, para esse mesmo fungo, a enzima NDK1 regulou a transcrição da catalase em resposta ao estresse oxidativo (WANG; YOSHIDA; HASUNUMA, 2007). Em outro estudo com *N. crassa*, um mecanismo proposto foi a interação entre catalase 1 (CAT-1) e NDK1, que aumentou a sobrevivência de conídios em condições de estresse oxidativo (YOSHIDA, HASUNUMA, 2006).

4.3.4. Proteínas envolvidas em mecanismos de resistência ao estresse oxidativo

Em microrganismos, o radical hidroxila (OH-), ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico, apesar de serem intrínsecos ao metabolismo aeróbico, quando estiverem em concentrações elevadas, poderão causar danos celulares e moleculares, pela alteração ou inativação de macromoléculas, tais como: proteínas, lipídios e DNA (FRIDOVICH, 1995; KREINER; MCNEIL; HARVEY, 2000; MOYE-ROWLEY, 2003; GESSLER; AVER'YANOV; BELOZERSKAYA 2007; KOHÁRYOVÁ; KOLÁROVÁ, 2008; SARKAR; SARAISKUMAR, 2011; WANG et al., 2016).

As SODs podem apresentar funções distintas que dependerão do cofator metálico utilizado (WANG et al., 2016). A metaloenzima SOD1 ao utilizar o cobre e o zinco como seus cofatores terá função em condições de estresse oxidativo (KUMARESAN et al., 2015; YAO et al., 2016). Nas células de eucariotos, essa enzima pode estar presente no citosol, cloroplastos, peroxissomas e mitocôndria (VALENTINE; DOUCETTE; ZITTIN, 2005). No meio intracelular, o papel antioxidante

da SOD1 é catalisar íons superóxido ($O2^-$) em H_2O_2 e oxigênio e, em seguida, a catalase é ativada (KUMARESAN et al., 2015).

No proteoma intracelular de *A. niveus* foram identificadas as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) (*spot* 31) e Cu, Zn superóxido dismutase (SOD1) (*spot* 9) que foram mais abundantes em pH 6 e pH 8, respectivamente. No crescimento de *A. nidulans,* em bioprocesso submerso, o pH ácido induziu enzimas antioxidantes CAT e SOD, que proporcionaram a proteção dos esporos e micélio (ABRASHEV et al., 2005).

Lambou et al. (2010) identificaram no micélio de *A. fumigatus*, a enzima SOD, que está envolvida na resistência ao estresse oxidativo, sendo responsável pela desintoxicação de radicais superóxido, no controle da dormência e germinação dos conídios e na virulência dessa espécie.

O precursor mitocondrial da proteína de choque térmico 60 kDa (*spot* 285) ,da família HSP60, foi identificado no proteoma intracelular de *A. niveus* com maior abundância em pH 5. As HSPs atuam como chaperonas para garantir o dobramento correto das proteínas. Em fungos sob condições de estresse metabólico, térmico ou químico, as proteínas de choque térmico atuam na sobrevivência desses microrganismos (BUZINA et al., 2008; RAGGAM et al., 2011).

O cultivo submerso de *A. niveus* também proporcionou a produção de enzimas envolvidas em mecanismos de resistência ao estresse oxidativo e também proteínas de choque térmico, que podem atuar em diferentes tipos de estresse. Além disso, a maior abundância em pH 6 de proteínas da via das fosfopentoses, nucleosídeo difosfato quinase e superóxido dismutase podem estar correlacionadas no processo de resistência às EROs.

4.3.5. Proteínas envolvidas na parede celular

No proteoma intracelular de *A. niveus* foram identificadas diferentes enzimas envolvidas com a parede celular, tais como: quitinase da classe V (*spot* 171) mais abundante em pH 6 e a endoquitinase (*spot* 862) exclusiva do pH 8.

As quitinases são hidrolases que degradam o polissacarídeo quitina e têm funções nutricionais, na germinação de esporos, crescimento, desenvolvimento de micélios e proteção frente às alterações ambientais. A glucosamina gerada a partir da

degradação da quitina pode ser metabolizada para obtenção de nitrogênio e carbono (GOODAY et al., 1992; DUO-CHUAN, 2006; KARTHIK; AKANKSHA; PANDEY, 2014; TRESEDER; LENNON, 2015; LANGNER; GÖHRE, 2016).

No cultivo com *A. niveus*, a presença de quitinases pode estar associada às funções anteriormente relatadas destas enzimas, principalmente no que tange os aspectos de crescimento e proteção.

4.3.6. Proteínas envolvidas em outras funções

A esterase D (*spot* 77) foi mais abundante no proteoma intracelular de *A. niveus* cultivado em pH 8. Essa enzima lipolítica atua na síntese e hidrólise de ligações ésteres em triglicerídeos e ésteres (BORNSCHEUER, 2002; BUCKER, 2009; BARRIUSO et al., 2013; LIU et al., 2013; LISBOA, 2015). Considerando a função da esterase na degradação de hemicelulose, essa enzima pode ser aplicada para degradar resíduos orgânicos gerados por atividades agroindustriais (LIU et al., 2013; BIELY et al., 2014; SARITHA et al., 2013; SARITHA et al., 2016).

No proteoma intracelular de *A. niveus* cultivado em pH 8 foram identificadas, de modo mais abundante, as subunidades α de proteases multicatalíticas do proteassoma tipo 6 (*spot* 52) e tipo 4 (*spot* 60). Essas enzimas são responsáveis pela degradação de proteínas intracelulares que estejam danificadas ou oxidadas (DEMARTINO; SLAUGHTER, 1999; KHAN; NELSON, 2018). Por esse motivo, é possível que em pH 8 tenha ocorrido um acúmulo de proteínas com dobramento incorreto e não funcionais.

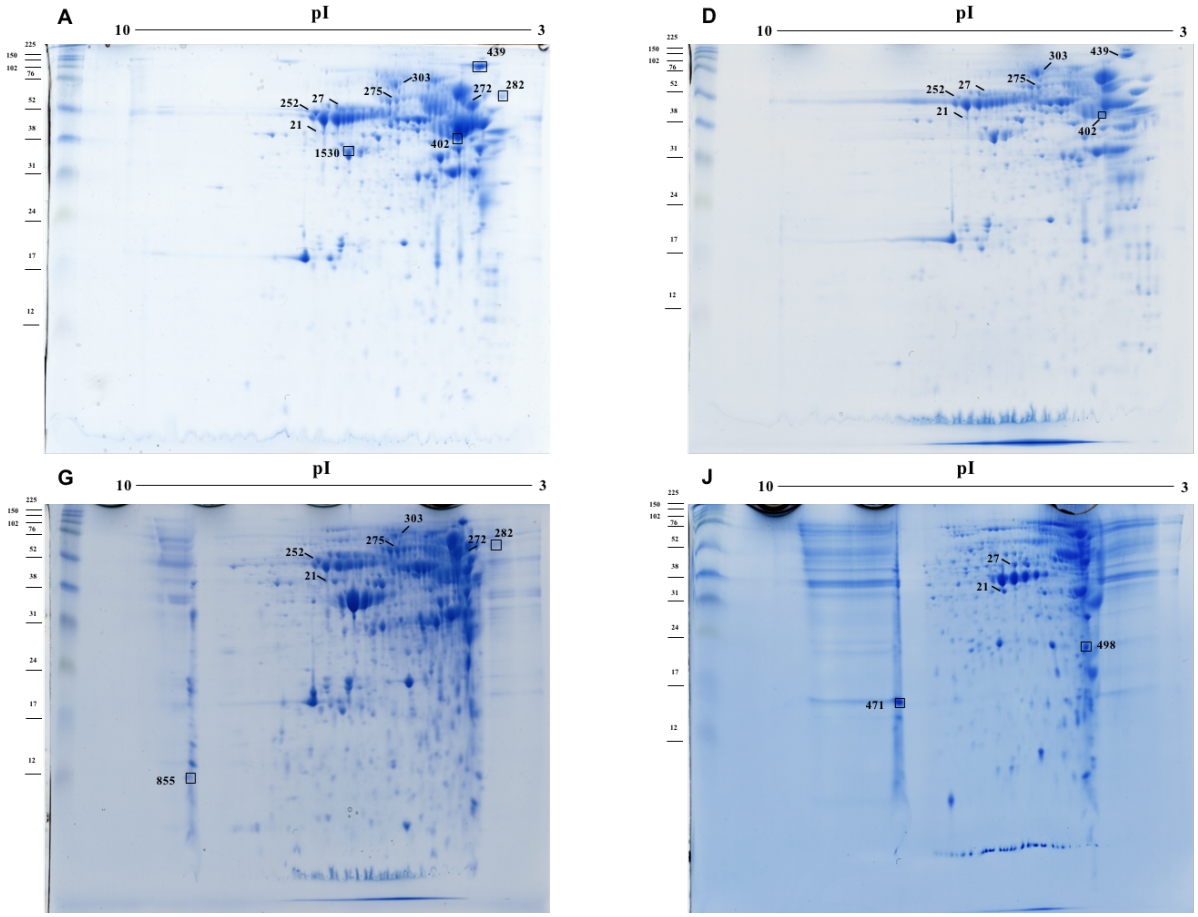
4. 4. Efeitos do pH sobre o proteoma extracelular de *A. niveus*

Para avaliar a influência do pH extracelular sobre o proteoma extracelular de *A. niveus,* as amostras referentes aos cultivos em pH 5, 6, 7 e 8 foram obtidas em 96 h de bioprocessos submersos.

As triplicatas dos géis bidimensionais do proteoma extracelular dos efeitos do pH, obtidas por eletroforese bidimensional, foram analisadas no *software* Image Master 2D Platinum v 7.0 e estão representadas no APÊNDICE B. Enquanto que na

Figura 4 foram apresentados os géis representativos do proteoma extracelular de *A. niveus* crescido em diferentes pH.

Figura 4 – Géis representativos do proteoma extracelular de *A. niveus* crescido em meio com pH 5 (A), pH 6 (D), pH 7 (G) e pH 8 (J). Os *spots* marcados são referentes as proteínas extracelulares identificadas que foram obtidas dos extratos proteicos em 96 h de bioprocessos submersos.



O marcador de massa molecular [MM (kDa)] utilizado foi o Amersham ECL Full-Range Rainbow com padrão de bandas: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24,17 e 12 kDa. As tiras com gradiente linear de pH imobilizado (13 cm, com pH 3-10) foram carregadas com 125 µg de proteínas totais. A segunda dimensão foi realizada em gel SDS/PAGE 12,5%, os géis 2-DE foram corados com Azul de Coomassie G-250, digitalizados no densitômetro DS-6000 e analisados no programa Image Master 2D Platinum v 7.0. O gel direcionador foi o pH 5.

Fonte: Elaborado pela autora

Após as análises comparativas dos géis 2-DE, as médias dos coeficientes de correlação (r^2) obtidas entre os *spots* coincidentes das triplicatas do proteoma extracelular de *A. niveus* cultivado em pH 5, 6, 7 e 8 foram 0,82; 0,88; 0,87 e 0,91, respectivamente, ou seja, com uma reprodutibilidade de pelo menos 82% entre os *spots* das condições estudadas. Nos mapas bidimensionais do proteoma extracelular

de *A niveus* cultivado em pH 5, 6, 7 e 8 foram identificados 507 ± 96, 500 ± 73, 633 ± 98 e 374 ± 35 (média ± desvio padrão), respectivamente.

Observou-se que, em média, os *spots* proteicos estavam em maior quantidade nas condições de cultivo com pH neutro a ácidos. Sendo a condição de pH alcalino a que apresentou menor quantidade de *spots* proteicos. Pelos géis 2-DE é possível observar que as massas moleculares, da maioria das proteínas extracelulares estavam distribuídas na faixa de 17 a 150 kDa e ponto isoelétrico na faixa de pH neutro - ácido.

Para analisar dos perfis de proteínas extracelulares foram selecionados os *spots* exclusivos de uma condição de pH e aqueles que apresentaram maior abundância relativa entre todas as amostras comparativas com *fold* > *2* e $p < 0,05$. Com isso, foram coletados: 40 *spots* do pH 5; 21 *spots* do pH 6; 30 *spots* do pH 7 e 19 *spots* do pH 8.

Na Figura 4 também estão indicados os spots referentes às 13 espécies proteicas que foram posteriormente identificadas, por espectrometria de massas, do secretoma das diferentes condições de pH de cultivo. As características destas proteínas estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Lista de proteínas extracelulares precipitadas dos extratos proteicos de *A. niveus* cultivado em bioprocessos submersos em diferentes condições de pH (5, 6, 7 e 8) identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura%	MM(kDa)		pI		Anova	Nível de abundância/ Exclusivo	Peptídeos sequenciados
				Teor.	Obs.	Teor.	Obs.			
					pH 5					
252	XP_749345.1 *	*Dihydrolipoamide dehydrogenase [Neurospora crassa* ATCC24698	262/ 6	55	50	8.32	6.82	1,87E-05	5.06	LGGTCLNVGCIPSK/LVIDQEYR/VGTFPFSANSR
272	XP_001215904.1 *	*pH-responsive protein 2 precursor [A. terreus* NIH2624]	63/ 1	94	55	4.82	4.13	4,95E-05	156.15	ADPQWNTDLYER
275	XP_001213560.1 *	*Alpha-galactosidase A precursor [A. terreus* NIH2624]	90/ 1	90	58	5.2	5.43	7,90E-04	2.48	TFADWGVEYLK
282	XP_001214505.1 *	*Lysophospholipase precursor [A. terreus* NIH2624]	105/ 2	68	63	4.34	3.65	5,44E-09	6.98	SDAGYQTSITDYWGR
402	XP_001210059.1 *	*Carboxypeptidase S1 [A. terreus* NIH2624]	154/ 5	47	39	4.45	4.40	0,0012340	2.91	TNYQECPNGPYNK/TVDNFSFLR
439	XP_001216097.1 *	*Acid trehalase precursor [A. terreus* NIH2624]	276/ 5	115	114	5.38	5.38	0,0461129	13.31	IGWIPTTDGNMAQCLPVASR/ DAYAPGQFPIAVVDGATSTR/ VVATLTDIAQSKPYR
1530	XP_001212866.1 *	*Arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinosidase A precursor [A. terreus* NIH2624]	66/ 2	36	35	6.1	6.24	7,03E-11	Exclusivo	TDYQFGWNR

Continua

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura%	MM (kDa)		pI		Anova	Nível de abundância/ Exclusivo	Peptídeos sequenciados
				Teor.	Obs.	Teor.	Obs.			
					pH 6					
303	XP_001216098.1 *	*Catalase B precursor* [*A. terreus* NIH2624]	314/ 7	78	70	5.38	5.4	7,36E-05	4.37	ASMVWEEAQQVSGK/GVDFTEDPLLQGR/LFSYLDTQLNR/AVSPTFNDVWSQPR
					pH 7					
855	XP_001216687.1 *	*Nucleoside diphosphate Kinase* [*A. terreus* NIH2624]	69/ 6	17	12	8.52	8.42	3,43E-08	Exclusivo	LAQHAWIYEN
					pH 8					
21	XP_001824820.1 *	*Subtilisin-like serine protease* pepC [*A. oryzae* RIB40]	80/ 2	52	52	5.62	5.62	2,85E-08	4.83	DSLSFGTFNK
27	XP_001209480.1 *	*Heat shock 70 kDa protein* [*A. terreus* NIH2624]	277/ 6	70	55	5.08	6.42	4,54E-07	5.04	TTPSFVAFTDTER/DAGLIAGLNVLR/ATAGDTHLGGEDFDNR
471	XP_001218140.1 *	*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, mitochondrial precursor* [*A. terreus* NIH2624]	409/ 34	19	14	8.54	8.22	4,29E-14	Exclusivo	TAANFAELCK/IIPQFMLQGGDFTR/FADENFQLK/EIEALGSSSGSVR/SAVKPTIVDCGSA
498	XP_001216431.1 *	*Cutinase precursor* [*A. terreus* NIH2624]	280/ 18	23	19	5.22	4.57	2,09E-12	Exclusivo	NGDCQPVTFIFAR/SALDGVACQGVGPK/YQATLAANALPK

MM: massa molecular pI: ponto isoelétrico Teor: teórico Obs: observado.
Escore [proteínas identificadas pelo MASCOT que apresentaram peptídeos (íons escore) com nível de significância de homologia extensiva ou identidade ($p < 0,05$), em relação as proteínas de banco de dados].
Peptídeos sequenciados pelo MASCOT.
Na coluna do número de acesso a base de dados utilizada foi indicada a seguir: * NCBIprot.

Conclusão

4.5. Aspectos biológicos das proteínas extracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado em diferentes condições de pH

Na Figura 4 é possível observar que o pH do meio de cultivo influenciou na concentração de proteínas extracelulares, de modo que nos pH 5 e 7 foram detectadas as menores e maiores quantidades de proteínas, respectivamente.

Ao expor fungos filamentosos a cultivos com alterações no pH, podem ser observadas alterações de rotas metabólicas, no crescimento celular, na absorção de nutrientes e maior secreção de enzima relacionada à resposta ao estresse (EMRI; POCSI; SZENTIRMAI, 1997; LI et al., 2008; LI; McNEIL; HARVEY, 2008).

No presente trabalho, com a utilização de ferramentas proteômicas, observamos que o pH inicial do cultivo afetou o proteoma extracelular de *A. niveus* em 96 h de bioprocesso. De maneira geral, nos pH ácidos (5 e 6) foram identificadas proteínas envolvidas na transdução de sinal, na síntese de proteínas e em mecanismos de resistência ao estresse oxidativo. Por outro lado, nos pH 7 e 8 as proteínas extracelulares estavam relacionadas ao metabolismo de nucleotídeos, manutenção da parede celular e mecanismos de resposta ao estresse.

A alteração do perfil de proteínas extracelulares de microrganismos, cultivados em diferentes condições de pH, já foi anteriormente observada: Schmidt et al. (2008) estudaram o efeito do pH no proteoma de *C. glabrata* e, de acordo com os dados apresentados nos pH 7.4 e 8, foram pouco expressas as proteínas extracelulares envolvidas no metabolismo de carboidratos, respiração e síntese proteica. Por sua vez, as proteínas envolvidas na resposta ao estresse e catabolismo de proteínas foram abundantes nestas condições alcalinas. Os autores sugerem que a levedura sofre influência do pH ácido como menos estressante do que o pH mais elevado. Li e colaboradores (2012) avaliaram a influência dos pH 4 e 6 sobre o proteoma extracelular do fungo fitopatogênico *B. cinerea* em 72 h de crescimento. Em pH 4, a maioria das proteínas participam da proteólise, exemplificando a identificação de peptidase aspártica, carboxipeptidase e metalopeptidase. Já em pH 6, o perfil proteico foi relacionado com a degradação da parede celular. No estudo foi apontada a capacidade de adaptação desse fungo ao ambiente extracelular o que contribui para maior infecção de *B. cinerea* em muitos hospedeiros vegetais.

4.5.1. Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos

No proteoma extracelular de *A. niveus* foram encontradas diferentes proteínas envolvidas com o metabolismo de carboidratos: trealase ácida, e α-galactosidase que foram mais abundantes em pH 5, enquanto que endo-1,5-α-L-arabinosidase foi exclusiva nesse pH. No cultivo com *C. glabrata*, o pH ácido também aumentou proteínas envolvidas com metabolismo de carboidratos (SCHMIDT et al., 2008).

O *spot* 439 representou a enzima precursora da trealase ácida, responsável por catalisar a conversão de trealose em glicose (CHRUNGU; SHARMA; MAHMOOD, 2017). A secreção de trealase ácida (Ath1p) pode ocorrer quando a disponibilidade nutricional do meio de cultivo for baixa. Nessa condição, essa enzima poderá ser ativada e utilizar a trealose como reserva de carbono para regular a via glicolítica (HERDEIRO et al., 2006; ELEUTHERIO et al., 2015).

De acordo com Wilsom et al. (2007), em fungos patogênicos de plantas, a trealase pode regular o metabolismo do carbono. Essa enzima também foi relacionada ao controle do crescimento de leveduras (GARRE et al., 2009) e de *A. niger* e que essa propriedade pode prevenir a deterioração de alimentos e o desenvolvimento de aspergilose (CHRUNGU, SHARMA, MAHMOOD; 2017).

No proteoma extracelular de *A. niveus* foi identifica a enzima precursora de endo-1,5-α-L-arabinosidase (*spot* 1530) que se destaca quanto a sua aplicação na degradação de pectina (THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2017**).**

Uma endo -1,5-α-L - arabinosidase produzida pelos fungos filamentosos *A. niger* e *Aspergillus aculeatus* foi relacionada ao processamento de frutas e vegetais (VORAGEN et al., 1987; BELDMAN et al., 1992; PITSON et al., 1997), facilitando o processamento da polpa de pera com aumento do rendimento da produção de suco (KASHYAP et al., 2001).

A enzima α-galactosidase (*spot* 275), identificada no proteoma extracelular de *A. niveus,* participa da hidrólise de moléculas complexas como oligossacarídeos e polissacarídeos o que a torna propícia para aplicações biotecnológica e industrial (ZEILINGER et al., 1993; WANG et al., 2010; LI et al., 2012; KATROLIA et al., 2014; CHAUHAN et al., 2015). A enzima α-galactosidase já foi relatada para *A. oryzae* (ARCHER, 2008) e para *Lactobacillus fermentum* que também aumentou a produção dessa enzima em condições ácidas (LE BLANC et al., 2004).

As atividades enzimáticas de trealase ácida, endo-1,5-α-L-arabinosidase e α-galactosidase as tornam candidatas a diferentes aplicações industriais.

4.5.2 Proteína envolvida no metabolismo de proteínas

No proteoma extracelular de *A. niveus* cultivado em pH 5 foi identificada a exopeptidase carboxipeptidase S1 (*spot* 402) que catalisa a hidrólise de ligações peptídicas em regiões C-terminais (CHU et al., 2015). Outros trabalhos mostraram a capacidade de fungos filamentosos de secretar essa enzima (DEGAN et al., 1992; VENDREL; QUEROL; AVILÉS, 2000; DEITEREN et al., 2007), como o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (LEGER; BIDOCHKA; ROBERTS, 1994). Blinkovsky et al. (1999) descreveram a produção de uma carboxipeptidase por *A. oryzae*, com estabilidade térmica e em diferentes pH, que são características desejáveis para a aplicação em indústrias.

Outra hidrolase identificada no proteoma extracelular *de A. niveus* foi a serino protease pepC do tipo subtilisina (*spot* 21), mais abundante em pH 8, o que é condizente com a sua conhecida estabilidade em condições alcalinas; além disso, essa enzima tem sido relacionada a processos metabólicos, crescimento e diferenciação celular (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; LYLLOFF et al., 2016).

Neste estudo com *A. niveus*, a maior atividade proteolítica do proteoma extracelular foi identificada em pH 6. Li et al. (2012) identificaram uma metalopeptidase no proteoma extracelular de *B. cinerea* cultivado em pH 4 e os autores sugerem que o pH ácido foi uma condição propícia para a produção dessa enzima. Sendo assim, esses dados revelam a importância do pH na síntese de peptidases.

De acordo com Medina et al. (2005), a secreção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos é essencial para o seu metabolismo e nutrição fúngica. Além disso, Peñalva e colaboradores (2008) indicaram que a síntese de peptidases, em diferentes condições de pH, pode ser controlada pelo sistema PacC.

A peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPI) (*spot* 471) foi mais abundante no proteoma extracelular de *A. niveus* em pH 8. Essa enzima atua no dobramento de proteínas e outros estudos já relataram a importância fisiológica dessa enzima (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2014). Porém, no estudo com *B. cinerea* essa

enzima foi apontada como um fator de virulência, que pode estar envolvida na invasão do hospedeiro e no crescimento do microrganismo (LI et al., 2012). A participação da PPI em diferentes processos biológicos já foi relatada em outros estudos com microrganismos (PEMBERTON, 2006; UNAL; STEINERT, 2014).

4.5.3. Proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios

No proteoma extracelular de *A. niveus,* cultivado em pH 8, foi identificada, de modo exclusivo, a enzima precursora da cutinase (*spot* 498). Em fitopatógenos, a presença da cutinase está envolvida na degradação da cutina, presente em células vegetais (ZHAO et al., 2013). As cutinases são importantes na catálise de ésteres solúveis, nas reações de esterificação e transesterificação. As propriedades dessa hidrolase a tornam passível de aplicação na composição de detergente de roupas, na indústria téxtil (CHEN et al., 2013; NYYSSOLA et al., 2013; AL-TAMMAR et al., 2016).

No proteoma extracelular de *A. niveus*, obtido em pH 5, foi identificada, de modo mais abundante, a enzima precursora da lisofosfolipase (*spot* 282), que atua na regulação de lisofosfolipídios e pode estar relacionada a proliferação celular (MOOLENAAR; MEETEREN; GIEPMANS, 2004; HSU et al., 2010), na homeostase da membrana celular, na obtenção de nutrientes e na geração de moléculas bioativas com potencial industrial na hidrólise de fosfolipídios em óleo de soja, colza e girassol (WINTER; TITZE; MARSCHNER ,1998; KOHLER et al., 2006, HSU et al., 2010).

4.5.4. Proteínas envolvidas em mecanismos de resistência ao estresse

Nas proteínas extracelulares de *A. niveus* foram identificadas as enzimas antioxidantes dihidrolipoamida desidrogenase e a precursora da catalase B (CAT).

A multi-enzima dihidrolipoamida desidrogenase (*spot* 252), mais abundante em pH 5, possui localização na mitocôndria e está envolvida na resposta ao estresse oxidativo (TYAGI et al., 2009; GRIVENNIKOVA; VINOGRADOV, 2013).

A precursora da catalase B (CAT) (*spot* 303) é uma proteína que atua na decomposição de H_2O_2 e o acúmulo dessa substância pode afetar a expressão gênica, taxa de crescimento do microrganismo, a diferenciação e a proliferação celular (WILLIAMS, 1928; TAKASUKA et al., 1999), além da transdução de sinal e o

transporte de íons (AGUIRRE et al., 2005; GESSLER; AVER'YANOV; BELOZERSKAYA 2007; SCOTT; EATON, 2008).

No proteoma extracelular de *A. niveus*, a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP 70) (*spot* 27) foi identificada em maior abundância no pH 8 e devido à sua função de chaperona, está envolvida em diversos mecanismos de resistência ao atuar no dobramento correto de proteínas (FERREIRA et al., 2005). Essa enzima também foi correlacionada a mecanismos de resistência ao estresse em linhagens mais virulentas de *F. oxysporum* (LI et al., 2015).

4.5.5. Proteína envolvida em outros processos

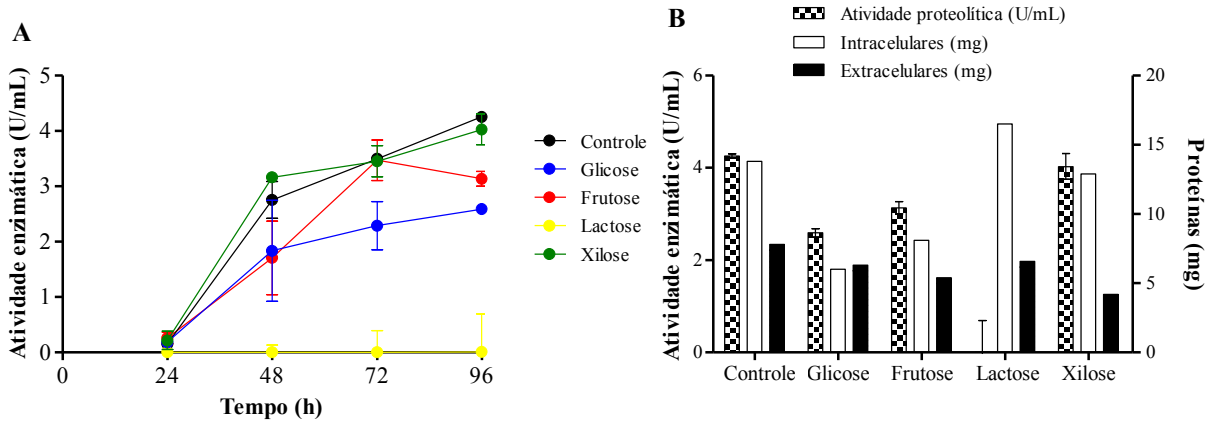
A proteína 2 responsiva ao pH (*spot* 272) foi mais abundante no proteoma extracelular de *A. niveus* em pH 5 e está relacionada a morfogênese e a resposta ao pH. Em fungos, está associada a uma série de funções biológicas, tais como: aquisição de nutrientes, crescimento, homeostase e tolerância ao pH (BUSSINK et al., 2015).

4.6. Efeitos de fontes de carbono sobre a produção de peptidases por *A. niveus*

Após a padronização do pH e tempo de cultivo em 96 h foi avaliado o efeito de 1% (m/v) de fontes de carbono sobre a produção de peptidases por *A. niveus* em bioprocesso submerso. A atividade proteolítica e os respectivos perfis de produção com a suplementação com fontes de carbono estão apresentados na Figura 5A.

A relação da atividade proteolítica com o acumulado de proteínas intracelulares extraídas da massa micelial e das proteínas extracelulares, após 96 h de bioprocesso submerso, está apresentada na Figura 5B.

Figura 5. Efeito de fontes de carbono sobre o fungo *A. niveus* em bioprocesso submerso. (A) Perfil de produção enzimática em meios de cultura com diferentes fontes de carbono. (B) Relação entre acumulado das proteínas intracelulares extraídas da massa micelial e atividade proteolítica, após 96 h de cultivo



Controle: cultivo com meio padrão com pH 6, sem suplementação com fontes de carbono. A produção de peptidases foi avaliada utilizando como substrato azo-caseína 1% em tampão acetato (100mM pH 5,0) a 50°C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as médias foram submetidas a análise *Two way* ANOVA, com pós teste de Bonferroni, utilizando o software Graph Pad Prism.
As proteínas intracelulares foram determinadas pelo método de Bradford (1976).
As atividades foram avaliadas a cada 24 horas por até 96 horas.

Ao acompanhar o perfil de produção, é possível observar que a maior atividade proteolítica foi detectada no cultivo controle (sem adição de fontes de carbono). Entre as fontes de carbono, a maior atividade enzimática foi detectada no cultivo com xilose, enquanto que na suplementação com lactose não foram detectadas peptidases em nenhum tempo de produção avaliado, porém foi a condição que proporcionou o maior acúmulo de biomassa.

Em fungos a glicose e a frutose são uma das principais fontes de carbono que influenciam na produção de proteínas, que podem ser utilizadas no funcionamento e na manutenção celular (LEITE et al., 2006; SAHA; RACINE, 2011; KANG; KORBER; TANAKA, 2013; WU et al., 2014; WU et al., 2016). Em leveduras, a suplementação com diferentes concentrações de glicose (0,01%, 0,1% e 1,0%) influenciou na fisiologia, no crescimento, no desenvolvimento, no metabolismo do carbono, na atividade respiratória e na biogênese de ribossomos (YIN et al., 2003).

No cultivo de *B. cinerea*, a indução do crescimento foi maior na condição suplementada com frutose do que no cultivo em glicose (DOEHLEMANN; MOLITOR; HAHN, 2005).

Silva et al. (2013) observaram o efeito repressivo da glicose, frutose e sacarose na produção de peptidase por *A. fumigatus*, durante 168 h de bioprocesso submerso. Os autores expuseram que as fontes de carbono utilizadas foram facilmente

assimiladas pelo fungo e, por esse motivo, a produção de peptidases foi menor em comparação ao meio de cultivo controle (formulado com sais e 0,5% de caseína).

Para o fungo *B. cinerea* a repressão catabólica também resultou na diminuição de 30 a 50% na síntese de peptidase nos cultivos, em meio líquido, contendo diferentes concentrações de glicose (0,5 a 2%). Por outro lado, diferentemente do que observamos no cultivo com *A. niveus,* a lactose proporcionou um aumento na atividade de peptidases extracelulares (ABIDI; LIMAM; NEJIB, 2008).

Esses dados corroboram com o que foi observado para o presente estudo com *A. niveus* e é possível que a facilidade de assimilação dessas fontes de carbono tenha refletido na baixa produção de enzimas no geral, entre elas, as peptidases, provavelmente devido à repressão catabólica. Além disso, o comportamento discrepante, em relação à suplementação com lactose, mostra que o controle metabólico dos fungos depende da espécie estudada.

Para a continuidade dos estudos proteômicos, acerca do efeito da suplementação com fontes de carbono, foram selecionadas para análise comparativa: glicose, lactose, frutose e xilose, cujo perfil diferenciado de produção de peptidases foi anteriormente apresentado.

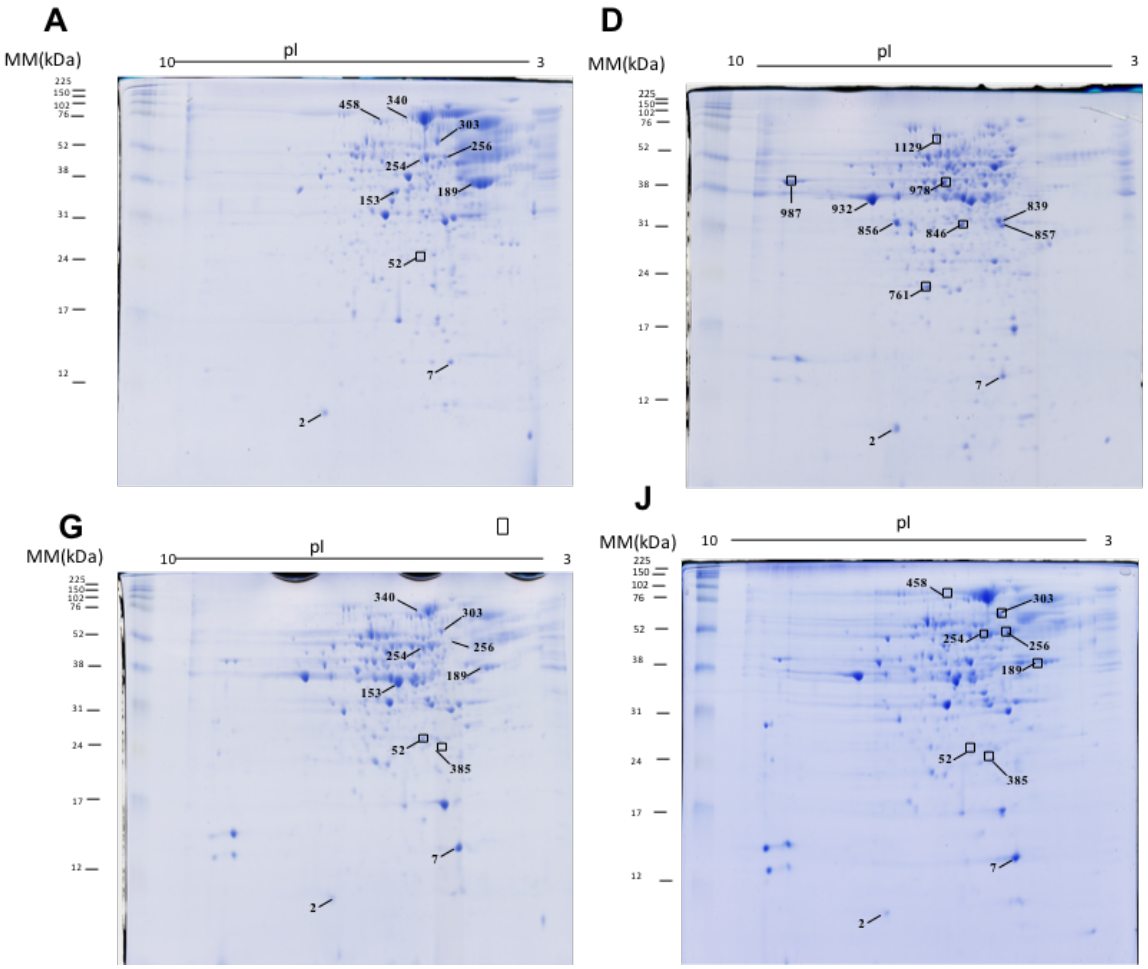
4.7. Efeitos de fontes de carbono sobre o proteoma intracelular de *A. niveus*

Para avaliar a influência de 1% (m/v) das fontes de carbono glicose, lactose, frutose e xilose sobre o proteoma intracelular de *A. niveus,* as proteínas intracelulares foram extraídas dos micélios obtidos em 96 h de bioprocessos submersos.

Os perfis das proteínas intracelulares foram visualizados por eletroforese bidimensional, sendo as triplicatas dos géis 2-DE analisadas no *software* Image Master 2D Platinum v 7.0 representadas no APÊNDICE C.

Na Figura 6 estão representados os géis 2-DE do proteoma intracelular de *A. niveus* nas condições de crescimento de diferentes fontes de carbono.

Figura 6- Géis representativos do proteoma intracelular de *A. niveus* crescido em meio com glicose (A), lactose (D), frutose (G) e xilose (J). Os *spots* marcados são referentes as proteínas intracelulares identificadas que foram extraídas dos micélios obtidos em 96 h de bioprocessos submersos.



O marcador de massa molecular [MM (kDa)] utilizado foi o Amersham ECL Full-Range Rainbow com padrão de bandas: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24,17 e 12 kDa. As tiras com gradiente linear de pH imobilizado (13 cm, com pH 3-10) foram carregadas com 120 µg de proteínas totais. A segunda dimensão foi realizada em gel SDS/PAGE 12,5%, os géis 2-DE foram corados com Azul de Coomassie G-250, digitalizados no densitômetro DS-6000 e analisados no programa Image Master 2D Platinum v 7.0. O gel de referência foi o da glicose.

Fonte: Elaborado pela autora

Após análises comparativas das triplicatas dos géis 2-DE, as médias dos coeficientes de correlação (r^2) obtidas entre os *spots* coincidentes das fontes glicose, lactose, frutose e xilose foram 0,88; 0,91; 0,95; 0,84, respectivamente, ou seja, com uma reprodutibilidade de pelo menos 84% entre os *spots* de cada condição estudada.

Nos mapas bidimensionais do proteoma intracelular de *A niveus* cultivado com 1% (m/v) de glicose, lactose, frutose e xilose foram identificadas 678 ±157; 858±137; 770±138; 919±23 (médias ± desvio padrão), respectivamente. Para análise dos perfis

de proteínas intracelulares, foram selecionados os *spots* proteicos exclusivos de uma condição e aqueles que apresentaram maior abundância relativa entre todas as amostras comparativas com *fold* > *2* e p < 0,05. Para o estudo foram coletados: 33 *spots* para lactose; 30 *spots* para xilose; 34 *spots* para frutose e 17 *spots* para glicose.

Pelos géis 2-DE das fontes de carbono, foi possível observar que as massas moleculares da maioria dos *spots* proteicos estavam distribuídas na faixa de 12 a 102 kDa e os pontos isoelétricos, predominantemente, na faixa de pH neutro-ácido. Na Figura 6 estão indicados os *spots* referentes às 20 espécies proteicas do proteoma intracelular, identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS, com suas respectivas características apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4- Lista de proteínas intracelulares, identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS, que foram extraídas dos micélios de *A. niveus* cultivado em bioprocessos submersos em 1% (m/v) de glicose, lactose, frutose e xilose

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura%	MM (kDa)		pI		Anova	Nível de abundância / Exclusivo	Peptídeos sequenciados
				Teor.	Obs.	Teor.	Obs.			
Glicose 1%										
189	XP_001213854.1	*Vacuolar protease A precursor [A. terreus* NIH2624]	375/ 12	43	37	4.78	4.65	3,56E-06	4.44	FADENFELK
256	XP_001210 7441.1	*Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase precursor [A. terreus NIH2624]*	120/ 2	56	47	5.15	5.17	2,22E-06	8.25	LSD/LTGDDEYAK
303	XP_001218472.1	*Heat shock protein 60, mitochondrial precursor [A. terreus* NIH2624]	489/ 12	62	54	5.52	5.31	3,72E-05	2.10	N/VLIESPYGSP/K/TNELAGD/G TTTATVLAR/GYTSPYFITD/PK/ AA/VEEGILPGGG/TALLK/TIV/E NAGLEGSVI/VGK
340	XP_001216098.1	*Catalase B [A. terreus NIH2624]*	280/ 5	78	65	5.38	7.07	5,87E-06	3.87	G/VDFTEDPLLQ/GRLFSYLDTQ /LNR/AVSPTFN/DVWSQPR
458	XP_001217043.1	*Peroxidase catalase 2 [A. terreus* NIH2624]	89/ 1	81	80	5.99	5.10	3,67E-06	4.28	AIAEVY/GSSDGER

Continua

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura%	MM (kDa)		pI		Anova	Nível de abundância / Exclusivo	Peptídeos sequenciados
				Teor	Obs	Teor	Obs			
Lactose 1%										
2	XP_001208607.1	*Allergen Asp f 15 [A. terreus* NIH2624]	202/ 10	15	10	8.73	7.46	0,0133033	2.53	VQAT/YQEVAKSNCG/Q
761	XP_001210743.1	*Superoxide dismutase, mitochondrial precursor [A. terreus* NIH2624]	252/ 18	23	21	6.43	6.91	1,09E-07	Exclusivo	FTLPAL/PYAYDALEPS/ISK/A/SYANEIWKVI/NWQTAEER
839	KOC12706.1	*Spermidine synthase [Aspergillus flavus* AF70]	191/ 7	34	31	5.42	5.45	7,21E-06	Exclusivo	V/LVIGGGDGGV/LR/AS/FVLPNFAR
846	XP_001215724.1	*Cerevisin precursor [A. terreus* NIH2624]	77/ 2	53	30	5.62	6.30	5,31E-13	Exclusivo	DSLSFG/TFNK
856	XP_001215536.1	*Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor [A. terreus* NIH2624]	713/ 27	36	31	8.82	7.48	6,45E-12	Exclusivo	VS/ELALYDIR/GSEIVLIPA/GVPR/DDLFNTNASI/VR/LFGVT/TLDVVR/IQ/FGGDEVVK/DGAGSATLSM/AMAGAR/DQGVDFF/ASR/ILPVGEI/NEYEQK
857	XP_001208997.1	*Inorganic pyrophosphatase [A. terreus* NIH2624]	102/ 4	33	30	5.3	5.53	5,61E-08	Exclusivo	VIVID/VNDPLASK

Continuação

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura%	MM(kDa)		pI		Anova	Nível de abundância /Exclusivo	Peptídeos sequenciados
				Teor	Obs	Teor	Obs			
Lactose 1%										
978	XP_001214863.1	*Formate dehydrogenase [A. terreus* NIH2624]	255/ 7	46	38	8.14	6.61	1,12E-08	Exclusivo	GSWLINT/AR/GYGGDVWFP/QPAPK/AILESYFS/GR
987	KKK14736.1	*Aspartate aminotransferase [Aspergillus ochraceoroseus]*	101/ 3	47	39	9.11	9.40	8,86E-05	Exclusivo	LVITQS/ISGTGALR
1129	XP_001210638.1	*Trasnketolase 1 [A. terreus* NIH2624]	325/ 8	75	61	6.30	5.19	9,28E-08	Exclusivo	PYSDLDQLA/INTIR/NAVDFQPP/EYGIGDWSGR/VVSVPC/FEVFDAQDK/A/LATIDFYK
Frutose 1%										
7	XP_015402460.1	*Peroxiredoxin pmp20 [A. nomius* NRRL 13137]	138/ 16	19	13	5.42	5.07	1,18E-04	3.90	VIL/FALPGAFTPV/CSAR/SLGWADEEG/R
52	XP_001215341.1	*Triosephosphate isomerase [A. terreus NIH2624]*	95/ 6	27	24	5.42	5.68	0,080078	12.56	WLTETISPE/VSDNTR
153	XP_001389584.1	*Transaldolase [A. terreus* NIH2624]	143/ 8	35	33	6.16	6.18	5,19E-09	2.08	IIPGKV/STEVDAR/FAADAVTL/KDLLK
254	XP_001212080.1	*Enolase [A. terreus NIH2624]*	75/ 3	47	44	5.30	5.71	4,56E-05	2.00	SGET/EDVTIADIAV/GLR
284	XP_002148256.1	*Glucose-6-phosphate isomerase [Talamomyces marneffei* ATCC 18224]	161/ 4	61	47	5.94	6.69	4,29E-09	5.07	N/VTNEPMQVDG/K/TFTT/AETTTNANTA

Continuação

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura%	MM(kDa)		pI		Anova	Nível de abundância /Exclusivo	Peptídeos sequenciados
				Teor	Obs	Teor	Obs			
Xilose 1%										
385	XP_750231.1	*D-xylose reductase (Xyl1) [A. fumigatus* Af293]	72/ 6	36	22	6.09	5.45	1,43E-08	9.18	LFDGACDY/GNEVEAGKGV/AR

MM: massa molecular pI: ponto isoelétrico Teor: teórico Obs: observado
Escore [proteínas identificadas pelo MASCOT que apresentaram peptídeos (íons escore) com nível de significância de homologia extensiva ou identidade ($p < 0,05$), em relação as proteínas de banco de dados].
Peptídeos sequenciados pelo MASCOT.
Todas as proteínas descritas na tabela foram identificadas no banco de dados NCBIprot

Conclusão

4.8. Aspectos biológicos das proteínas intracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado em diferentes condições de fontes de carbono

De acordo com os dados proteômicos de *A. niveus*, referentes às identificações dos *spots* proteicos apresentadas na Tabela 4, foram observadas diferenças nos perfis de proteínas intracelulares cultivado em meio líquido com as diferentes fontes de carbono estudas. Os resultados indicam que a suplementação com as fontes de carbono avaliadas foram capazes de influenciarem o proteoma intracelular de *A. niveus*.

4.8.1. Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos

No proteoma intracelular de *A. niveus* obtido do cultivo com frutose foram identificadas algumas proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos: triosefosfato isomerase (TPI) (*spot* 52), a glicose-6-fosfato isomerase (GPI) (*spot* 284) e a enolase (*spot* 254).

A enzima glicolítica de origem citoplasmática TPI pode estar envolvida na glicólise, gliconeogênese e na via das fosfopentoses (FONSECA et al., 2001; WIERENGA et al., 2010; TRUJILLO et al., 2014; MIRANDA-OZUNA et al., 2016). Para o microrganismo *Lactobacillus panis* PM1, a TPI foi importante no metabolismo da frutose, pois a sua ausência gerou o acúmulo de fosfato de diidroxicetona, que se tornou tóxico para as células, e prejudicou o crescimento bacteriano (KANG; KORBER; TANAKA, 2013).

A enzima GPI atua na interconversão de glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, que possívelmente foi induzida pela frutose presente no meio de cultivo. As enolases podem estar envolvidas tanto no metabolismo intracelular como na interação com células hospedeiras (FUNK et al., 2016). Além disso, são enzimas altamente expressa em muitos organismos, especialmente naqueles com elevada taxa de glicólise (MACÍAS-SÁNCHEZ et al., 2015).

No proteoma intracelular de *A. niveus*, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (*spot* 932) e a enzima precursora mitocondrial malato desidrogenase (*spot* 856) foram mais abundante e exclusiva do cultivo com lactose, respectivamente.

A GAPDH, além de sua função bem descrita na via glicolítica, também tem sido relacionada a outros processos celulares, no transporte e fusão de membrana (SIROVER, 1999; BARBOSA et al., 2004; RODACKA, 2013). No estudo de Barbosa et al. (2006), os autores relacionaram o papel dessa enzima, produzida por *P. brasiliensis*, com a adesão e invasão a componentes da matriz extracelular de hospedeiros. Já a enzima precursora da malato desidrogenase mitocondrial está envolvida no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (HUANG et al., 2017). As fontes de carbono xilose e maltose também incrementaram a abundância da enzima malato desidrogenase, que foi detectada no cultivo líquido com o fungo *A. niger* (LIU et al., 2010).

No proteoma intracelular de *A. niveus* também foram identificadas enzimas da via das pentoses fosfato: a transcetolase (*spot* 1129), exclusiva em lactose, e a transaldolase (*spot* 153), mais abundante em frutose. A principal função dessa via metabólica é a produção do equivalente redutor NADPH e na síntese de nucleósideos e aminoácidos (MICHAL; SCHOMBUG, 2012).

A enzima D-xilose redutase foi identificada no proteoma intracelular de *A. niveus* nos cultivos das fontes de carbono glicose e xilose, com maior abundância em xilose (*spot* 385).

A enzima D-xilose redutase promove a assimilação da D-xilose e a redução reversível de aldeídos e/ou cetonas em seus álcoois correspondentes usando NADPH ou NADH (DASGUPTA et al., 2016). Para o fungo filamentoso *Rhizomucor pusillus*, a enzima D-xilose redutase foi fundamental para a fermentação de biomassa lignocelulósica e que, por isso, apresenta um grande potencial biotecnológico para produção de etanol de segunda geração (KOMEDA et al., 2015).

As funções realizadas pelas enzimas TPI, enolase e GPI indicam a ocorrência de elevada taxa de glicólise no cultivo com frutose. Já enzimas GAPDH esteve aumentada no cultivo com lactose. De modo generalizado, as fontes frutose e lactose aumentaram o metabolismo de carbonos em *A. niveus* e a xilose foi capaz de aumentar a produção de D-xilose redutose, que é fundamental para o processamento de compostos lignocelulósicos.

4.8.2 Proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e proteínas

O cultivo com lactose aumentou algumas proteínas do metabolismo de aminoácidos e proteínas no proteoma intracelular de *A. niveus*: aspartato aminotransferase, pirofosfatase inorgânica e as serino proteases cerevisina e alérgeno Asp f 15.

As enzimas aspartato aminotransferase e pirofosfatase inorgânica, que foram identificadas pelos *spots* exclusivos 987 e 846, estão envolvidas no metabolismo de aminoácidos e na fosforilação reversível de proteínas, respectivamente (THE CONSOTIUM GENE ONTOLOGY, 2017). O processo de fosforilação é um mecanismo que regula muitos processos biológicos, tais como o metabolismo, a transdução de sinal e/ou o ciclo celular em eucariotos (ARIÑO, CASAMAYOR, GONZÁLEZ, 2011).

A enzima precursora da cerevisina (*spot* 846), que foi exclusiva do cultivo com lactose e o alérgeno Asp f 15 (*spot* 2) que foi mais abundante em lactose, são serino proteases. As cerevisinas, pertencentes da família das subtilisinas, podem participarem de funções relacionadas à interrupção do crescimento vegetativo e na potencial virulência de fungos (NAIK; NEBES; JONES, 1997; HE; LI; LI, 2015). Já o alérgeno Asp f 15 é uma glicoproteína biologicamente ativa, produzida por fungos do gênero *Aspergillus* e, assim como a Asp f 13, também é uma serino protease (CHOW et al., 2000; PURKAYASTHA et al., 2000; HAN et al., 2010).

A precursora da protease vacuolar A (*spot* 189) foi mais abundante no cultivo com glicose e é uma hidrolase que está envolvida no metabolismo de proteínas, as quais sofrem modificações pós-traducionais antes que a forma ativa madura seja formada. Entretanto, os mecanismos envolvidos no processamento dessas enzimas maduras, ainda não estão totalmente descritos (CHU et al., 2015). A ativação de proteólise vacuolar, em alguns microrganismos, pode estar associada a condições de pH ácido, estresse nutricional e/ou esporulação (VAN DEN HAZEL; KIELLAND-BRANDT; WINTHER, 1996; KATO et al., 2006). De modo similar, no estudo de Han e colaboradores (2010), a suplementação com glicose e amido também induziram a pordução da protease vacuolar A no proteoma de *A. terreus* NRRL 1960.

O cultivo em lactose e glicose aumentaram proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e proteínas. A lactose também foi capaz de induzir proteínas envolvidas no metabolismo de carbono, além de proteínas regulatórias

também induzirem as serino proteases. Por sua vez, no cultivo com glicose também ocorreu a indução de serino proteases.

4.8.3. Proteínas envolvidas em mecanismos de resistência ao estresse

No proteoma intracelular de *A. niveus*, no cultivo com glicose, foram identificadas catalases de modo mais abundante: precursora da catalase B (*spot* 340) e a catalase/peroxidase 2 (*spot* 458). A indução dessas enzimas pela glicose pode ser justificada porque durante a oxidação catalítica da glicose pode ocorrer a elevação das concentrações de H_2O_2 que precisa ser controlada pelas catalases para evitar danos celulares (YOSHIMOTO; TAKAKI; YAMASAKI, 2010). De acordo com Zamocky, Furtmuller e Obinger (2009) a catalase/peroxidase 2 pode participar da patogenicidade de fungos.

No proteoma intracelular de *A. niveus,* cultivado com lactose, também foi identificada outra enzima antioxidante precursora da superóxido dismutase (*spot* 761).

No proteoma intracelular de *A. niveus,* cultivado com glicose de modo mais abundante, foi identificada a proteína de choque térmico HSP60 (*spot* 303), cuja relevância na síntese e dobramento de proteínas já foi apontada para *Paracoccidiodes lutzii* Pb01 (WEBER et al., 2012). As proteínas de choque térmico podem ser expressas e reguladas em resposta a condições de crescimento desfavoráveis (KAUFMANN, 1990; BURNIE et al., 2006; RAGGAM et al., 2011).

Os cultivos com glicose e lactose aumentaram a produção de enzimas antioxidantes, demonstrando ser reflexo da produção de espécies reativas de oxigênio que foram geradas pelo aumento das proteínas do metabolismo de carboidratos e de proteínas.

4.8.4. Proteína envolvida em outras funções

No proteoma intracelular de *A. niveus*, cultivado com glicose, foi identificada de modo mais abundante, a precursora da manose-oligosacarídeo α-1,2-manosidase (spot 256), uma glicosilhidrolase responsável por catalisar as ligações 1,2-α-manose e N-glicano em proteínas de fungos filamentosos (YOSHIDA; NAKAJIMA; ICHISHIMA, 1998; AKAO et al., 2006). Essa mesma enzima também foi induzida por

glicose no proteoma do fungo *A. terreus* NRRL 1960 (HAN et al., 2010).

No proteoma intracelular de *A. niveus,* cultivado com lactose foram identificadas, de modo exclusivo, a enzima espermidina sintase (*spot* 839) e a formiato desidrogenase (*spot* 978).

A oxidoredutase espermidina sintase pode estar envolvida na biossíntese de poliaminas, na fisiologia e na proteção a danos oxidativos do meio extracelular (LEÓN-RAMÍREZ et al., 2010; PEGG, 2014) e a inativação dessa enzima interferiu no crescimento e desenvolvimento de *Aspergillus flavus* (MAJUMDAR et al., 2018).

Já a formiato desidrogenase que catalisa a oxidação do formiato a CO_2 na presença de NAD^+, e também a redução de CO_2 para formiato, com excesso na concentração de NADH (KIM et al., 2013; THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM**,** 2017**)**. A sacarose, glicose e lactose também induziram a produção de formiato desidrogenase em fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicilium* e os autores exploraram o potencial de aplicação dessa enzima na desintoxicação por formaldeído, em ambientes aquáticos contaminados (YU; RAO; ZHANG, 2014). Segundo Hoelsch et al. (2013), a formiato desidrogenase também apresentou potencial biotecnológico para a regeneração de cofatores em experimentos de biotransformações, nos quais sejam utilizados oxidoredutases dependentes de NADPH (HOELSCH et al., 2013).

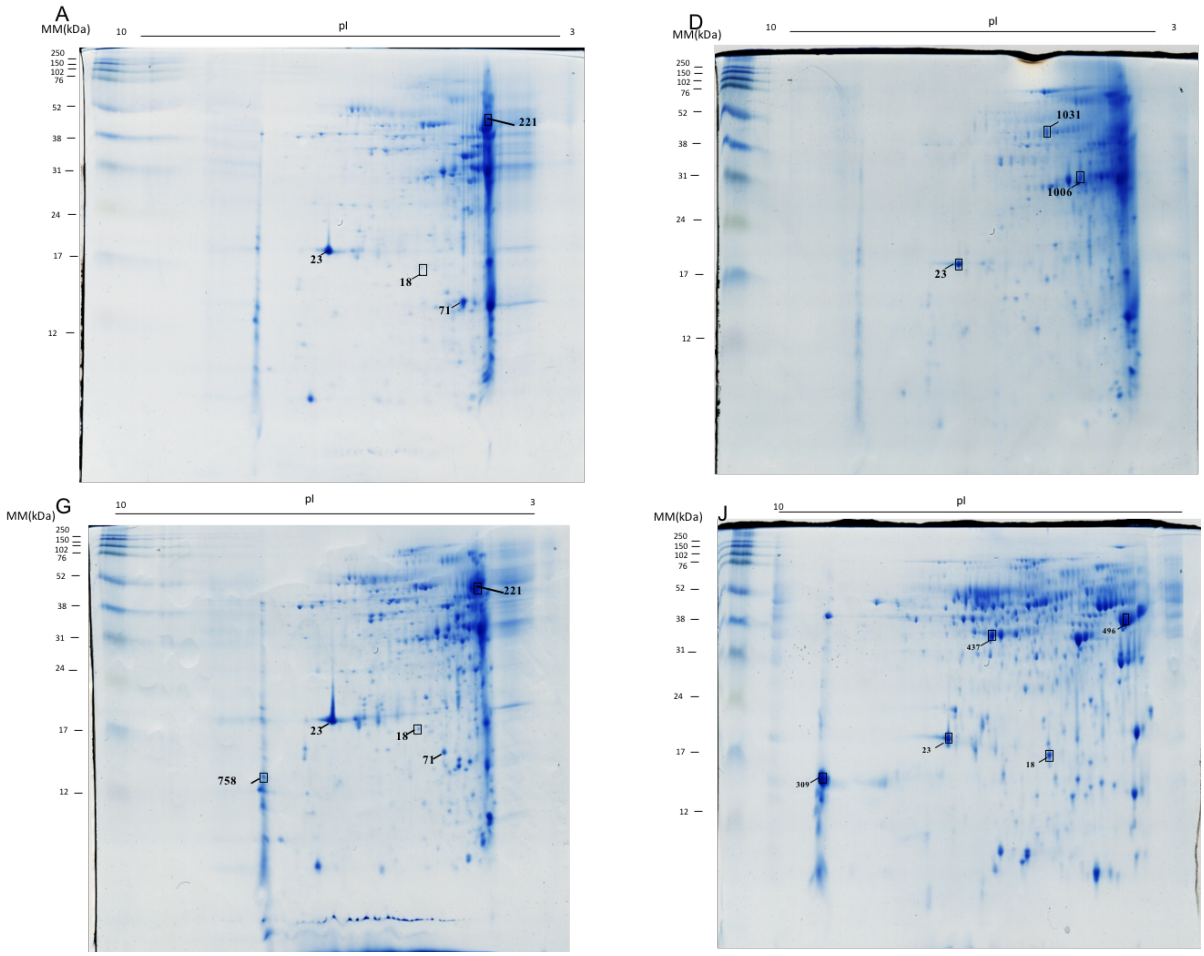
Os cultivos com glicose e lactose também induziram enzimas com potencial biotecnológico, como glicosil-hidrolases e oxidoredutases capazes de remover formaldeídos de ambientes contaminados.

4.9. Efeitos das fontes de carbono sobre proteoma extracelulares de *A. niveus*

Para avaliar a influência de 1% (m/v) das fontes de carbono glicose, lactose, frutose e xilose, sobre o proteoma extracelular de *A. niveus,* foram obtidos os extratos proteicos coletados em 96 h de bioprocessos submersos. Os perfis das proteínas intracelulares foram visualizados por eletroforese bidimensional, sendo as triplicatas dos géis 2-DE analisados no *software* Image Master 2D Platinum v 7.0 representadas no APÊNDICE D.

Na Figura 7 estão identificados os *spots* proteicos referentes às 10 proteínas extracelulares que foram identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS, com suas respectivas características apresentadas na Tabela 5.

Figura 7 – Géis representativos do proteoma extracelular de *A. niveus* crescido em meio com 1% (m/v) com as fontes de carbono frutose (A), glicose (D), xilose (G) e lactose (J). Os *spots* marcados são referentes as proteínas extracelulares identificadas obtidas dos extratos proteicos em 96 h de bioprocessos submersos



O marcador de massa molecular [MM (kDa)] utilizado foi Amersham ECL Full-Range Rainbow com o padrão de bandas 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24,17 e 12 kDa. Foram carregados 80 µg de proteínas totais, em tiras de 13 cm, com pH 3-10, imobilizado em poliacrilamida, a segunda dimensão foi realizada em gel SDS/PAGE 12,5%, os géis 2-DE obtidos foram corados com Azul de Coomassie G-250, digitalizados no densitômetro DS-6000 e analisados no programa Image Master 2D Platinum v 7.0. O gel de referência foi o da frutose.

Fonte: Elaborado pela autora

Após análises comparativas dos géis 2-DE, as médias dos coeficientes de correlação (r^2) obtidas entre os *spots* coincidentes das triplicatas das fontes lactose, xilose, frutose e glicose foram respectivamente: 0,91; 0,76; 0,90 e 0,87. Com esses dados observou-se uma reprodutibilidade de r^2 maior que 76% entre os *spots* de cada condição estudada.

Nos mapas bidimensionais do proteoma extracelular de *A niveus* cultivado com 1% (m/v) de lactose, xilose, frutose e glicose foram identificadas 808 ± 158; 519 ± 46; 395 ± 44 e 328 ± 108 (médias ± desvio padrão), respectivamente. Para análise dos perfis de proteínas extracelulares foram selecionados os *spots* proteicos exclusivos de uma condição e aqueles que apresentaram maior abundância relativa entre todas as amostras comparativas com *fold* > *2* e $p < 0,05$. Para o estudo foram coletados: 27 *spots* para lactose; 11 *spots* para xilose; 11 *spots* para frutose e 12 *spots* para glicose.

Pelos géis 2-DE é possível observar que as massas moleculares da maioria dos *spots* estavam distribuídas na faixa de 12 a 102 kDa e pI na faixa de pH neutro a ácido, enquanto que na Tabela 5 podemos observar que as proteínas identificadas estavam distribuídas entre 10 e 90 kDa com ponto isoelétrico, predominantemente, ácido.

Tabela 5 - Lista de proteínas extracelulares precipitadas dos extratos proteicos de *A. niveus* cultivado em bioprocessos submersos em 1% (m/v) em lactose, xilose, frutose e glicose, identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura%	MM(kDa)		pI		Anova	Nível de abundância/ Exclusivo	Peptídeos sequenciados
				Teor.	Obs.	Teor.	Obs.			
Lactose 1%										
18	XP_015402460.1	*Peroxiredoxin [A. nomius* NRRL 13137]	153/16	18	16	5.42	5.28	1,26E-05	8.95	VIL/FALPGAFTPV/CSAR/SLGWADEEG/R
309	KFH63941.1	*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H [Mortierella verticillata NRRL 6337]*	82/5	19	15	8.62	9.25	1,50E-04	Exclusivo	FADENFELK
437	XP_001213881.1	*Fructose-bisphosphate aldolase [A. terreus* NIH2624]	61/3	40	34	5.58	6.27	4,46E-09	Exclusivo	SGVIVGDDVL/R
496	XP_748964.1	*SUN domain protein (Uth1) [A. fumigatus* Af293*]*	59/2	44	37	5.24	3.96	2,12E-07	Exclusivo	TT/SAQYYVNPK
Xilose 1%										
23	XP_001272225.1	*Deuterolysin metalloprotease (M35) family protein [Aspergillus clavatus* NRRL1]	71/5	17	18	5.86	6.94	0,0011070	2.8	NTVSLANAA/ASAAESGSSS/R
758	CCE29129.1	*Probable nucleoside-diphosphate kinase [Claviceps purpurea 20.1]*	68/6	30	13	7.05	8.15	4,32E-07	Exclusivo	AILGAT/DPLASAPGTI/R

Continua

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura%	MM(kDa)		pI		Anova	Nível de abundância	Peptídeos sequenciados
				Teor.	Obs.	Teor.	Obs.			
Frutose 1%										
71	XP_001210059.1	*Carboxypeptidase S1 [A. terreus* NIH2624]	71/2	17	14	4.45	4.69	7,38E-08	4.04	TVDNFS/FLR
221	KEQ87821.1	*Aorsin [Aureobasidium pullulans EXF-150]*	99/2	72	46	5.89	4.41	6,80E-06	3,63	GWDPVTG/LGTPDYPK
Glicose 1%										
1006	XP_015409892.1	*Oryzin [A. nomius* NRRL 13137]	72/3	42	30	6.02	4.78	1,65E-05	Exclusivo	A/AINMSLGGGY/SK
1031	GAA87300.1	*Dipeptidase [Aspergillus kawachii IFO 4308]*	71/2	49	42	5.03	5.38	1,20E-10	Exclusivo	NVP/DDVLELVK

MM: massa molecular pI: ponto isoelétrico Teor: teórico Obs: observado
Escore [proteínas identificadas pelo MASCOT que apresentaram peptídeos (íons escore) com nível de significância de homologia extensiva ou identidade ($p < 0,05$), em relação as proteínas de banco de dados].
Peptídeos sequenciados pelo MASCOT.
As proteínas representadas nessa tabela foram identificadas no banco de dados NCBIprot.

4.10. Aspectos biológicos das proteínas extracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado em diferentes condições de fontes de carbono

De acordo com as identificações dos *spots,* referentes as proteínas extracelulares de *A. niveus* na Tabela 5, foram observadas diferenças no perfil proteico dos cultivos em meio líquido suplementado com as diferentes fontes de carbono. De acordo com os resultados apresentados, constata-se que as fontes de carbono avaliadas foram parâmetros químicos capazes de influenciarem o proteoma extracelular desse fungo, principalmente, no que diz respeito ao metabolismo de carboidratos, proteínas e mecanismos de resistência ao estresse.

De modo geral, a utilização de fontes de carbono foi uma estratégia interessante para a produção de enzimas com aplicações biotecnológicas, que foram identificadas no proteoma extracelular de *A. niveus.* O que corrobora com o proposto por Cambri e colaboradores (2016), a secreção de enzimas pode ser modulada pela influência de fatores do meio extracelular, tais como, as fontes de carbono e nitrogênio.

4.10.1. Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos

A suplementação com lactose, assim como no proteoma intracelular, também foi capaz de aumentar a produção de proteínas extracelulares envolvidas com o metabolismo de carboidratos, tais como a frutose-bisfosfato aldolase e a proteína de domínio SUN (Uth1) que foram identificada a partir de *spots* exclusivos.

A enzima frutose-bisfosfato aldolase (spot 437), envolvida nas vias da glicólise e gliconeogênese, foi abundante em lactose. Segundo Ziveri et al. (2017), essa enzima foi importante para a multiplicação da bactéria patogênica *Francisella tularensis,* em macrófagos, na presença de substratos gliconeogênicos. Weber et al. (2012) ao cultivarem *P. lutzii* Pb01, em meios formulados com peptídeos e carboidratos, observaram o efeito desses substratos no proteoma extracelular onde foi identificada a enzima frutose bifosfato aldolase, relacionada com a obtenção de energia por esse fungo.

4.10.2. Proteínas envolvidas no metabolismo de proteínas

A suplementação com fontes de carbono também modulou a produção de proteases, que foram identificadas no proteoma extracelular de *A. niveus*: deuterolisina, aorsina, carboxipeptidase S1, oryzin e dipeptidase.

No cultivo com xilose, a deuterolisina (*spot* 23) foi mais abundante e essa metaloendoprotease neutra já foi associada com a proliferação celular de fungos (FUSHIMI et al., 1999; ICHISHISMA, 2000; CHANG; WERB, 2001). Emri et al. (2009) também relataram a presença dessa enzima no proteoma extracelular de *A. nidulans* e que ela também estava envolvida no crescimento desse fungo.

A serino proteinase aorsina (*spot* 221) e a carboxipeptidase S1 (*spot* 71) foram mais abundantes no proteoma extracelular de *A. niveus,* na condição de frutose. A aorsina apresenta atividade semelhante a subtilisina. Lee, Yoshida e Hasunuma (2003) identificaram uma aorsina no cultivo de *A. oryzae,* em culturas sólidas com farelo de trigo e arroz, entretanto, essa enzima não foi essencial para o crescimento fúngico. Já a carboxipeptidase S1 é uma metalocarboxipeptidase que participa da degradação de peptídeos e que já foi relacionada com a patogenicidade de leveduras (SPORMANN; HEIM; WOLF, 1991; HECHT; O`DONNELL; BRODSKY, 2014).

No cultivo com glicose, a serino peptidase alcalina oryzin (*spot* 1006) e a dipeptidase (*spot* 1031) foram mais abundantes. A oryzin já foi descrita em outros fungos do gênero *Aspergillus*, além de apresentar potencial para hidrolisar elastina e colágeno (KOLALLUKUDY; SIRAKOVA, 2013). Han et al. (2010) também observaram a presença dessa enzima no crescimento de *A. terreus* com glicose.

No cultivo com lactose, a peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPI) (*spot* 309) foi mais abundante e atua na regulação e dobramento de proteínas, mas também pode participar da resposta aos fatores de estresse do meio extracelular (HOUTERMAN et al., 2007).

Entre os *spots* identificados, as suplementações com as diferentes fontes de carbono (frutose, glicose e xilose) foram eficientes na indução de diferentes tipos de proteases. Por outro lado, a suplementação com lactose foi eficiente na indução de proteínas envolvidas com o metabolismo de carbono, mas não apresentou proteases em seu proteoma extracelular.

4.10.3. Proteína envolvida na parede celular

No proteoma extracelular de *A. niveus*, abundante em lactose, foi identificada a proteína de domínio SUN (Uth1) referente ao *spot* 496. Em *S. cerevisiae,* a presença da proteína SUN foi relacionada com a biogênese da parede celular. A proteína Sun4p, localizada na parede celular, em conjunto com a proteína Uth1p participaram da morfogênese e septação da parede celular (MOUASSITE et al., 2000).

4.10.4. Proteínas envolvidas em mecanismos de resistência ao estresse

No proteoma intracelular já tinham sido identificadas diversas proteínas envolvidas com mecanismos de resitência ao estresse sendo que no cultivo com lactose foi identificada a enzima antioxidante peroxiredoxina (*spot* 18) que participa da proteção das células contra os efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio, ao catalisar e reduzir os peróxidos (KARPLUS, 2015). As peroxiredoxinas também são importantes na transdução de sinal, proliferação e diferenciação celular (LEDGERWOOD et al., 2017). No cultivo com *A. niger* AB1.13, a suplementação com maltose induziu a produção de catalase (LU et al., 2010). Sendo assim, é possível sugerir que o padrão de indução da produção de enzimas antioxidantes pode ser modificada tanto pela espécie do microrganismo, quanto pela fonte de carbono utilizada.

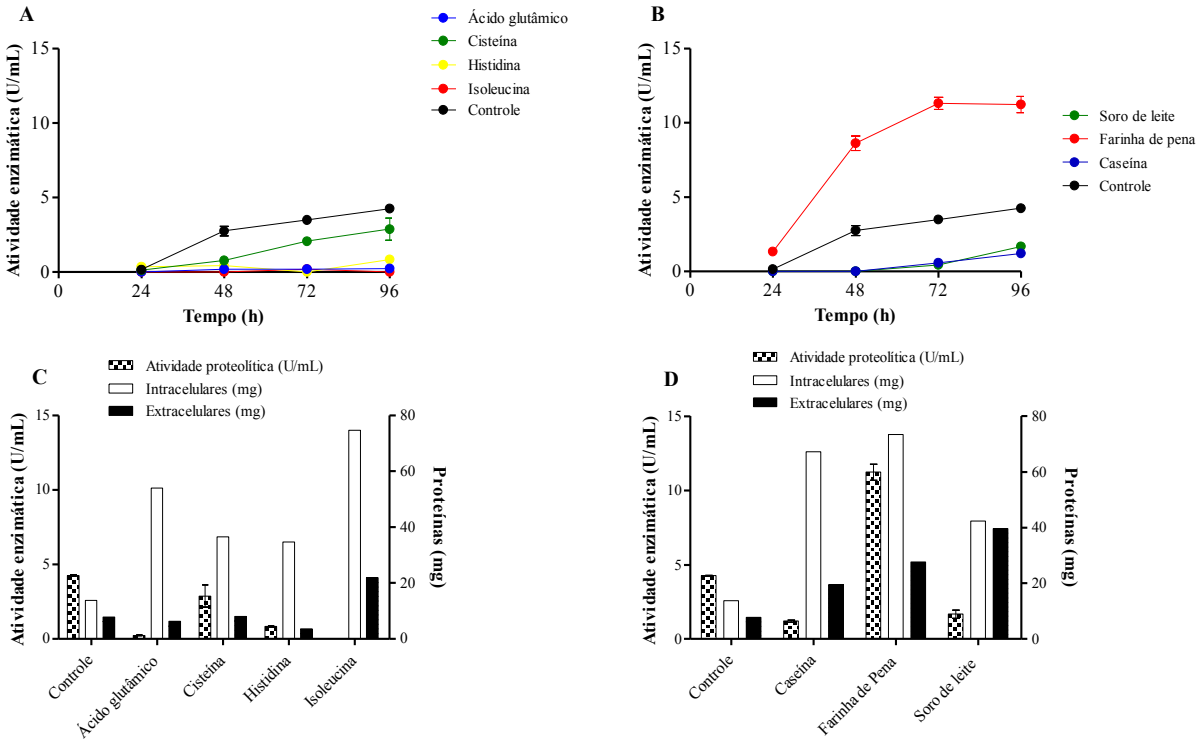
Já no proteoma extracelular de *A. niveus* cultivado com xilose, a nucleosídeo difosfato quinases (NDK) (*spot* 758) foi mais abundante e atua no metabolismo de nucleotídeos, embora também possa exercer papel na resistência a condições adversas do meio extracelular (HOUTERMAN et al., 2007).

4.11 Efeito de fontes de nitrogênio sobre a produção de peptidases por *A. niveus*

Após a padronização do pH e tempo de cultivo em 96 h, foi avaliado o efeito de 1% (m/v) de fontes de nitrogênio (aminoácidos e poliméricas) sobre a produção de peptidases por *A. niveus* em bioprocesso submerso. A atividade proteolítica e os respectivos perfis de produção com a suplementação com fontes de nitrogênio estão apresentados na Figura 8A e Figura 8B. A relação da atividade proteolítica com o

acumulado de proteínas extraídas da massa micelial e das proteínas extracelulares, após 96 h de bioprocesso submerso, está apresentada na Figura 8C e Figura 8D.

Figura 8- Efeito de fontes de nitrogênio sobre o fungo *A. niveus* em bioprocesso submerso. Perfil de produção enzimática em meios de cultura com diferentes fontes de carbono: (A) aminoácidos; (B) complexas. Relação entre acumulado das proteínas intracelulares extraídas da massa micelial e atividade proteolítica, após 96 h de cultivo: (C) aminoácidos; (D) complexas.



Controle: cultivo com meio padrão com pH 6, sem suplementação com fontes de nitrogênio. A produção de peptidases foi avaliada utilizando como substrato azo-caseína 1% em tampão acetato (100mM pH 5,0) a 50°C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as médias foram submetidas à análise *Two way* ANOVA, com pós teste de Bonferroni, utilizando o software Graph Pad Prism.

As proteínas intracelulares foram determinadas pelo método de Bradford (1976).

As atividades foram avaliadas a cada 24 horas por até 96 horas.

Ao acompanhar o perfil de produção, é possível observar que a suplementação com aminoácidos não aumentou a atividade proteolítica, quando comparada com o cultivo controle (sem adição de fontes de carbono) (Figura 8A). Por outro lado, no cultivo com farinha de pena, a produção de peptidase foi 3 vezes maior em relação ao controle (Figura 8B).

Todas as fontes de nitrogênio proporcionaram um acumulado de proteínas intracelulares maiores que o do controle, sendo que nos cultivos com isoleucina (Figura 8C), caseína e farinha de pena (Figura 8D), a quantidade de proteínas da massa micelial foi cerca de 30 vezes maior.

Os fungos filamentosos têm fontes preferenciais de nitrogênio, que variam de espécie para espécie, entretanto, em condições de nitrogênio limitantes, esses microrganismos também podem utilizar fontes alternativas, tais como aminoácidos e proteínas (TER SCHURE; VAN RIEL; VERRIPS, 2000) e para isso ativa genes que codificam enzimas catabólicas específicas, por exemplo, proteases e permeases (BUGEJA; HYNES; ANDRIANOPOULOS, 2012).

A baixa produção de peptidases no cultivo com ácido glutâmico e isoleucina pode sugerir que esses aminoácidos são fontes preferenciais para *A. niveus,* visto que nessa condição o microrganismo foi capaz de acumular proteínas intracelulares (um parâmetro indireto do crescimento microbiano). Por outro lado, na limitação de fontes de nitrogênio, prontamente assimiláveis, a farinha de pena induziu a produção de peptidases para a obtenção de nutrientes, visto que também foi observado o acúmulo de proteínas intracelulares, pois o tipo de fonte de nitrogênio presente no meio de cultivo tem um impacto sobre o crescimento e a produção de metabólitos pelos microrganismos (TUDZYNSKI, 2014).

Foi observado que o melhor perfil de produção de peptidase foi obtido com o substrato farinha de pena, com atividade enzimática de aproximadamente 11 U/mL, enquanto que para as demais fontes de nitrogênio, as atividades não se apresentaram satisfatórias.

A bactéria *Microbacterium* sp. kr10 em 48 h de crescimento em meio de cultivo, suplementado com farinha de pena, apresentou um pico de produção de peptidase de 96,5 U/mL, enquanto que em 96 h, a atividade enzimática foi de 270 U/mL. Além disso, os pH 4,5; 5,5 e 6,5 influenciaram no aumento da produção de peptidase, enquanto que em pH 7,5; 8,5 e 9,5 observou-se uma diminuição. A utilização do substrato farinha de pena é vantajoso por ser encontrado com facilidade e por ser economicamente viável para o investimento industrial (THYS et al., 2006).

Para o *Bacillus licheniformis* a produção de protease foi influenciada pelos parâmetros de 1% (m/v) de glicose e uréia, após 24 h de crescimento, com uma atividade de 141, 46 U/mg. Enquanto isso, a produção inicial sem a suplementação dessas fontes, apresentou uma atividade de 89,87 U/mg (SUGANTHI et al., 2013).

Segundo Allison e Vitousek (2005), a produção de enzimas envolvidas no crescimento e metabolismo de microrganismos será abundante em meios de cultivo onde estão disponíveis fontes de nitrogênio com maior complexidade de substratos.

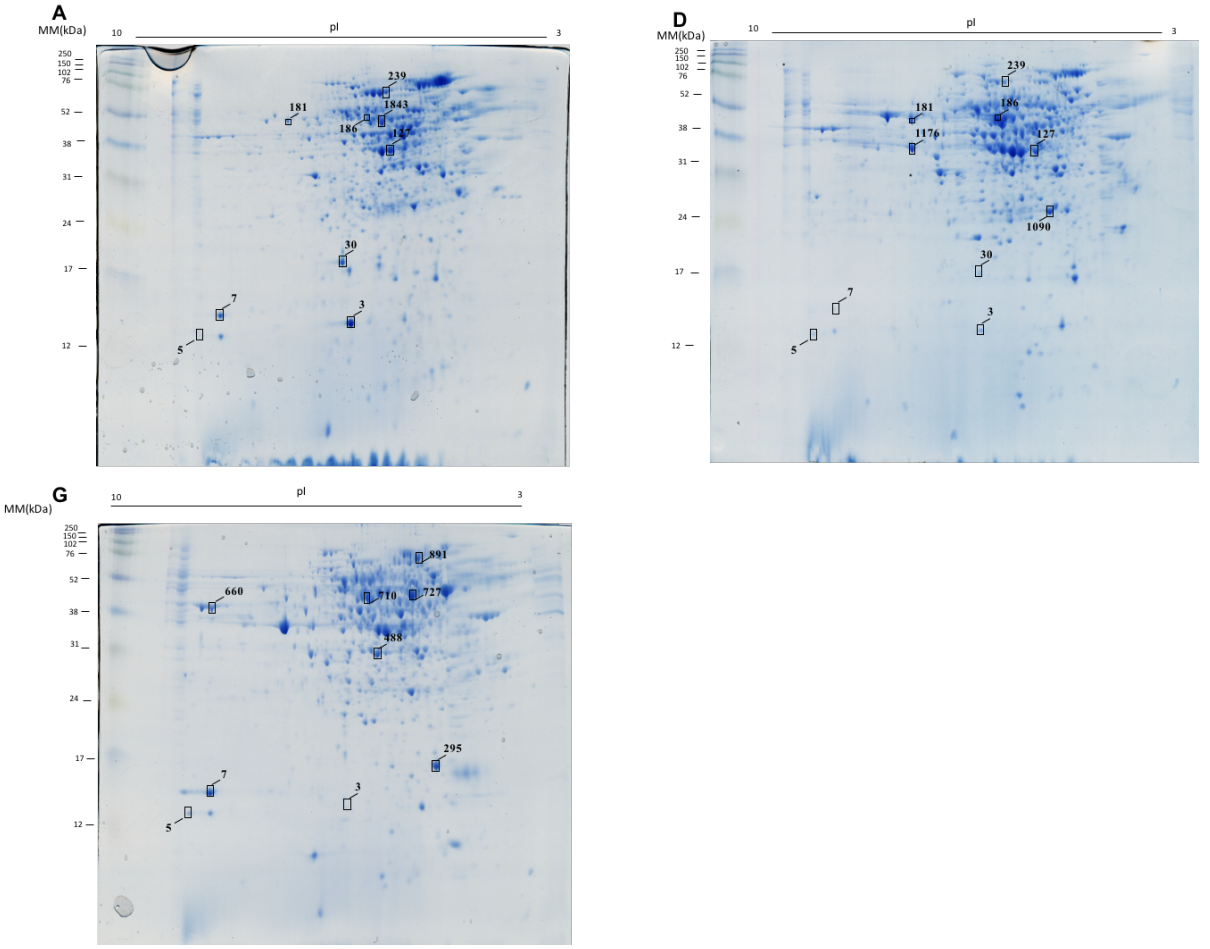
Para a continuidade dos estudos proteômicos, acerca do efeito da suplementação com fontes de nitrogênio, foram definidos dois grupos para análise comparativa: aminoácidos (ácido glutâmico, cisteína, histidina e isoleucina) e fontes complexas (caseína, farinha de pena e soro de leite).

4.12 Efeito de fontes de nitrogênio complexas sobre o proteoma intracelulares de *A. niveus*

Para avaliar a influência de 1% (m/v) das fontes de nitrogênio complexas (soro de leite, farinha de pena e caseína) sobre o proteoma intracelular de *A. niveus,* as proteínas intracelulares foram extraídas dos micélios obtidos em 96 h de bioprocessos submersos.

As proteínas intracelulares submetidas à análise por eletroforese bidimensional foram visualidas em géis 2-DE, os quais foram analisadas no *software* Image Master 2D Platinum v 7.0 com as triplicatas representadas no APÊNDICE E. Na Figura 9 estão representados os *spots* proteicos que foram identificados por espectrometria de massas com suas características apresentadas na Tabela 6.

Figura 9- Géis representativos do proteoma intracelular de *A. niveus* crescido em meio com farinha de pena (A), caseína (D) e soro de leite (G). Os *spots* marcados são referentes as proteínas intracelulares identificadas que foram extraídas dos micélios obtidos em 96 h de bioprocessos submersos.



O marcador de massa molecular [MM (kDa)] utilizado foi o Amersham ECL Full-Range Rainbow com padrão de bandas: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24,17 e 12 kDa. As tiras com gradiente linear de pH imobilizado (13 cm, com pH 3-10) foram carregadas com 120 µg de proteínas totais. A segunda dimensão foi realizada em gel SDS/PAGE 12,5%, os géis 2-DE foram corados com Azul de Coomassie G-250, digitalizados no densitômetro DS-6000 e analisados no programa Image Master 2D Platinum v 7.0. O gel de referência foi a amostra farinha de pena.

Fonte: Elaborado pela autora

Após análise comparativa das triplicatas dos géis 2-DE, as médias dos coeficientes de correlação (r^2) referentes aos *spots* coincidentes das fontes soro de leite, farinha de pena e caseína foram: 0,83; 0,95; 0,88, respectivamente. Com esses dados observou-se uma reprodutibilidade de r^2 maior que 83% entre os *spots* de cada condição avaliada.

Nos mapas bidimensionais do proteoma intracelular de *A. niveus* foram detectados nas condições soro de leite, farinha de pena e caseína, respectivamente: 1037 ± 60; 996 ± 76 e 1136 ± 93 *spots* totais (médias ± o desvio padrão). Pelos géis 2-DE dessas fontes de carbono foi possível observar que as massas moleculares, da maioria dos *spots* proteicos, estavam distribuídas na faixa de 17 a 150 kDa e ponto isoelétrico na faixa de pH neutro-ácido.

Para a análise das fontes orgânicas poliméricas, por MALDI-TOF/TOF-MS, foram selecionados os *spots* exclusivos de uma única condição e/ou com maior nível de abundância entre as condições comparativas (*fold* > *2* e $p < 0,05$) foram coletados: 31 *spots* soro leite; 24 *spots* farinha de pena e 20 *spots* caseína.

Os espectros de íons MS/MS correspondentes de cada proteína foram analisados utilizando o *Software* Biotools (Bruker, Massachustts, EUA) com as identificações das proteínas realizadas nos bancos de dados UniProtKB e NCBIprot (Tabela 6). Na Figura 9 também estão marcados os spots referentes as 18 espécies proteicas do proteoma intracelular.

Tabela 6 - Lista de proteínas intracelulares extraídas dos micélios de *A. niveus* cultivado em bioprocessos submersos com 1% (m/v) soro de leite, farinha de pena e caseína, identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura%	MM(kDa)		pI		Anova	Níveis de abundância/ Exclusivo
				Teor.	Obs.	Teor.	Obs.		
Soro de leite 1%									
5	XP_0012166 87.1 *	*Nucleoside diphosphate kinase [A. terreus* NIH2624*]*	92	17	13	9,3	9,69	2,31E-05	10.61
7	XP_0012181 40.1 *	*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, mitochondrial precursor [A. terreus* NIH2624*]*	289	18	14	9,4	9,31	1,77E-04	7.52
295	XP_0154024 60.1 **	*Peroxiredoxin pmp20* [*A. nomius* NRRL 13137]	90	18	16	5,3	5,06	1,42E-07	Exclusivo
488	CEL63012.1 **	*Alkaline protease 2 [Neosartorya fumigata* CEA10]	58	53	30	5,8	6,17	3,08E-06	Exclusivo
660	XP_0012109 85.1*	*Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor [A. terreus* NIH2624	116	47	38	9,6	9,22	2,94E-06	Exclusivo
727	XP_0012120 80.1	*Enolase [A. terreus NIH262]*	228	47	47	5,3	5,52	4,67E-08	Exclusivo
891	GAO81300.1 *	*Catalase* B [*Aspergillus udagawae*]	100	80	66	5,7	5,42	2,86E-06	Exclusivo

Continua

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura%	MM(kDa)		pI		Anova	Níveis de abundância/ Exclusivo
				Teor.	Obs.	Teor.	Obs.		
Farinha de pena 1%									
3	AAL38992.1 **	Cu, Zn superoxide dismutase [*Aspergillus nidulans*]	212/ 25	16,0	14	5,8	6,86	6,49E-09	259.269
30	Q0CMZ3.1 **	*Neutral protease 2 homolog ATEG_04941 [A. terreus* NIH2624]	169/ 5	37	17	5,2	7,0	3,12E-08	482.38
127	XP_0012157 22.1*	*Transaldolase [A. terreus* NIH2624]	71/ 6	35	33	6,2	6,04	2,63E-06	6.66
239	Q0CD12.1 **	*Catalase-peroxidase [A. terreus* NIH 2624]	128/ 4	81	56	6,0	6,21	4,14E-09	36.37
1843	XP_0012151 02.1 *	Fumarylacetoacetase [*A. terreus* NIH2624*]*	102/ 7	47	41	6,0	6,19	6,44E-06	Exclusivo
Caseína 1%									
181	AIC38366.1 **	*Mitochondrial citrate synthase [A. niger]*	76/ 5	52	41	9,0	7,88	0,018862	21.88
186	XP_0012109 85.1 *	*Homogentisate 1,2-dioxygenase [A. terreus* NIH2624]	145	50	42	5,7	6,44	3,10E-04	11.637
1090	XP_0012153 41.1 *	*Triosephosphate isomerase [A. terreus* NIH2624]	92	27	23	5,3	5,58	8,00E-06	Exclusivo
1176	XP_0012155 36.1 *	*Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor [A. terreus* NIH2624]	194	36	34	9,4	7,88	0,00699005	Exclusivo

MM: massa molecular pI: ponto isoelétrico Teor: teórico Obs: observado

Escore [proteínas identificadas pelo Biotools que apresentaram peptídeos (íons escore) com nível de significância de homologia extensiva ou identidade ($p < 0,05$), em relação as proteínas de banco de dados].

Na coluna do número de acesso as bases de dados utilizadas estão indicadas a seguir: * NCBIprot; ** UniProtKB. Conclusão

4.13 Aspectos biológicos das proteínas intracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado com fontes de nitrogênio complexas

4.13.1. Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos

O cultivo com fontes de nitrogênio orgânicas e complexas modulou proteínas envolvidas na glicólise, gliconeogênese, via das fosfopentoses e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

No proteoma intracelular de *A. niveus*, a enolase e a triosefosfato isomerase (TPI) foram identificadas nos *spots* 727 e 1090, exclusivos dos cultivos com soro leite e caseína, respectivamente. Segundo Vallejo e colaboradores (2012), as enzimas GAPDH, TPI, FBA e enolase, além de participarem dos processos metabólicos de fungos, também podem modular a maquinaria celular de organismos hospedeiros e, assim, garantir a sobrevivência, replicação e disseminação de microrganismos.

No proteoma intracelular de *A. niveus*, também foram identificadas a transaldolase (TAL) (*spot* 127), abundante no cultivo com farinha de pena, e a enzima 6–fosfogluconato desidrogenase (*spot* 710), exclusiva do cultivo com soro de leite. Essas enzimas participam da via das fosfopentoses e são fundamentais para a manutenção do equilíbrio redox em fungos (WYNN; HAMID; RATLEDE, 1999; WANG; LI, 2006; STRIJBIS et al., 2012). Essa é a principal via de obtenção de ribulose 5-fosfato que é necessária para a síntese de nucleotídeos e para a geração de NADPH. O NADPH participa da proteção celular contra o estresse oxidativo e da produção de lipídios (HE et al., 2007).

No proteoma intracelular de *A. niveus* cultivado com caseína também foram identificadas proteínas envolvidas com o ciclo dos ácidos tricarboxílicos: a malato deisdrogenase mitocondrial (MDH), exclusiva no *spot* 1176, e a citrato sintase que foi abundante nesse cultivo (*spot* 181).

A malato desidrogenase, presente na mitocôndria ou no citosol, é uma oxidoredutase dependente de NAD / NADPH, a qual participa do metabolismo de carboidratos e contribui para a remoção de EROs (CHU et al., 2015; THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM**,** 2017)**.** Fernández-Acero e colaboradores (2006) observaram em *B. cinerea* que além de participar da gliconeogênese, essa enzima esteve envolvida na patogenicidade do fungo por catalisar a conversão reversível de

malato a oxaloacetato, que é o precursor do ácido oxálico, considerado um fator primário da patogenicidade de microrganismos (LYON; GOODMAN; WILLIAMSON, 2004). Segundo Amselem e colaboradores (2011), a secreção de ácido oxálico gera uma condição de pH extracelular propício para a secreção de enzimas que podem estar relacionadas a patogenicidade de fungos. Em estudos anteriores, com linhagens mais e menos virulentas de *B. cinerea,* os proteomas intracelulares foram submetidos a análises comparativas de seus géis bidimensionais e, por conseguinte, os *spots* analisados por MALDI-TOF/TOF-MS/MS. Nesse trabalho, as proteoformas de malato desidrogenase identificadas foram relacionadas à morte celular de plantas (FERNÁNDEZ-ACERO et al., 2007).

A citrato sintase é uma transferase que participa do ciclo do TCA (MURRAY; HYNES, 2010). Costa (2011) ao estudar o micélio de *A. niger*, obtido após bioprocesso submerso, observou que as fontes de carbono e nitrogênio, devido a maior oferta de energia, foram essenciais ativar a citrato sintase.

4.13.2. Proteína envolvida no metabolismo de proteínas e aminoácidos

No proteoma intracelular de *A. niveus,* foi identificada uma protease alcalina 2 (*spot* 488), exclusiva em soro de leite, e uma enzima homóloga a protease neutra 2 (*spot* 30) abundante em farinha de pena. Tanto em eucariotos, como procariotos, as proteases fazem parte de um dos mais importantes grupos de enzimas hidrolíticas, as quais podem estar envolvidas no crescimento e na diferenciação celular (SAWANT; NAGENDRAN, 2014; CHATTERJEE, 2015; SOUZA et al., 2015; SHARMA et al., 2017).

As proteases constituem mais de 60% do mercado global de enzimas, sendo que na produção de detergentes, elas respondem por aproximadamente 25% do total em vendas mundiais (ADRIO; DEMAIN, 2014). Na indústria de detergentes, essas enzimas são vantajosas por apresentarem estabilidade em altas temperaturas e em pH alcalino (ABIDI; LIMAM; NEJIB, 2008; BASAVARAJU; KATHERA; JASTI, 2017). As proteases obtidas de microrganismos têm sido aplicadas com sucesso nos setores das indústrias de alimentos, detergentes e farmacêutica (ELLAIAH; SRINIVASULU; ADINARAYANA, 2002; JISHA et al., 2013; LI et al., 2013). Como por exemplo, na

coagulação da proteína leite para fabricação de queijos (SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006).

Nessa pesquisa, a enzima precursora mitocondrial da peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPI) foi abundante no proteoma intracelular nas condições de soro de leite (*spot* 7) e ácido glutâmico (*spot* 25).

A aspartato aminotransferase, mitocondrial foi exclusiva do proteoma intracelular de *A. niveus* cultivado em soro de leite (*spot* 660) e está relacionada ao metabolismo de aminoácidos (JEFFERY et al., 1998). Já no proteoma intracelular obtido do cultivo com farinha de pena, a enzima fumarilacetoacetato foi exclusiva (*spot* 1843) e está relacionada ao metabolismo da tirosina (THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2017). A enzima homogentizato 1,2- dioxigenase (*spot* 186), que faz parte do metabolismo de tirosina e fenilalanina, foi identificada no proteoma intracelular de *A. niveus* de modo mais abundante em caseína.

A identificação de proteases e outras enzimas envolvidas com o metabolismo de proteínas e aminoácidos, no proteoma intracelular de *A. niveus,* sugere que as fontes orgânicas foram as responsáveis por sua modulação, possivelmente, como uma tentativa de obtenção dos nutrientes dessas fontes.

4.13.3. Proteínas envolvidas em mecanismos de resistência ao estresse

No proteoma intracelular de *A. niveus* a peroxiredoxina pmp20 (*spot* 295) e a catalase B (*spot* 891) foram exclusivas da condição em soro de leite. A peroxiredoxina é uma enzima antioxidante (HANSCHMANN et al., 2013) fundamental para a desintoxicação de H_2O_2 (AHN et al., 2012; RAHMAD et al., 2014). Em ambientes onde o estresse oxidativo passa a interferir na sobrevivência e a modular a fisiologia de microrganismos, a produção de enzimas antioxidantes como a catalase é acionada (KOHÁRYOVÁ; KOLÁROVÁ, 2008; POLEK; GODOCÍKOVÁ, 2012).

A enzima de resposta ao estresse oxidativo, Cu, Zn superóxido dismutase (SOD1), foi abundante no proteoma intracelular de *A. niveus* em farinha de pena (*spot* 3). A SOD1 é uma isoforma das SODs que se destaca por sua atividade antioxidante em procariotos e eucariotos (KUMARESAN et al., 2015). O fungo *B. cinerea*, um hospedeiro de plantas, ao ser exposto a elevadas concentrações de H_2O_2 produz a enzima SOD1 como forma de sobrevivência a essa condição hostil (ROLKE et al.,

2004), essa enzima também já foi relacionada a germinação dos conídeos de *Fusarium graminearum* e na produção de micotoxinas e potencial virulência do microrganismo (YA et al., 2016).

4.13.4. Proteína envolvida em outras funções

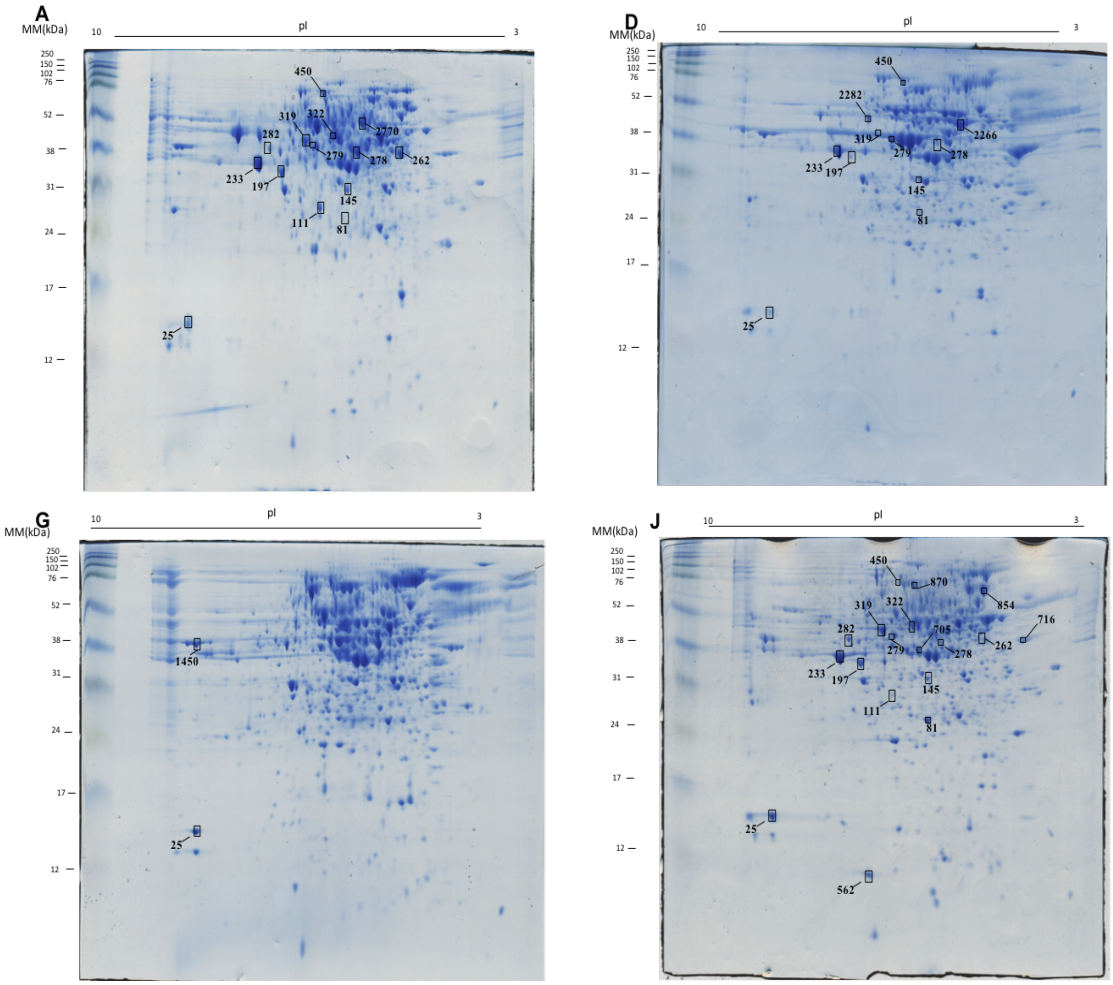
No proteoma intracelular de *A. niveus* a nucleosídeo difosfato quinases (NDK) foi abundante em soro de leite (*spot* 5). A enzima NDK participa da regulação do crescimento, síntese de polissacarídeos da superfície celular e patogenicidade de microrganismos (CHAKRABARTY, 1998).

4.14. Efeito de aminoácidos como fontes de nitrogênio sobre o proteoma intracelulares de *A. niveus*

Para avaliar o efeito das fontes de aminoácidos (ácido glutâmico, histidina, cisteína e isoleucina) sobre o proteoma intracelular de *A. niveus*, as proteínas intracelulares foram extraídas dos micélios coletados em 96 h de bioprocessos submersos.

Em seguida as amostras foram submetidas a eletroforese bidimensional e os géis 2-DE analisados no *software* Image Master 2D Platinum v 7.0 com as triplicatas representadas no APÊNDICE F. Na Figura 10 estão representados os géis 2-DE dos efeitos de diferentes fontes de nitrogênio (aminoácidos) no proteoma intracelular de *A. niveus*.

Figura 10 – Géis representativos do proteoma intracelular de *A. niveus* crescido em meio com 1% (m/v) com as fontes de nitrogênio isoleucina (A), histidina (D), cisteína (G) ácido glutâmico (J). Os *spots* marcados são referentes as proteínas intracelulares identificadas obtidas dos extratos proteicos em 96 h de bioprocessos submersos



O marcador de massa molecular [MM (kDa)] utilizado foi Amersham ECL Full-Range Rainbow com o padrão de bandas 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24,17 e 12 kDa. Foram carregados 120 µg de proteínas totais, em tiras de 13 cm, com pH 3-10, imobilizado em poliacrilamida, a segunda dimensão foi realizada em gel SDS/PAGE 12,5%, os géis 2-DE obtidos foram corados com Azul de Coomassie G-250, digitalizados no densitômetro DS-6000 e analisados no programa Image Master 2D Platinum v 7.0

Fonte: Elaborado pela autora

Após análise comparativa das triplicatas dos géis bidimensionais, as médias dos coeficientes de correlação (r^2) dos *spots* coincidentes de ácido glutâmico, histidina, cisteína e isoleucina foram: 0,92; 0,90; 0,85; 0,94, respectivamente. Com esses dados observou-se uma reprodutibilidade de r^2 maior que 85% entre os *spots* desses das condições estudadas.

O número de *spots* totais identificados nos géis 2-DE do proteoma intracelular de *A niveus* em ácido glutâmico, histidina, cisteína e isoleucina foram, respectivamente, 1153 ± 108; 1185 ± 114; 1443 ± 98 e 1238 ± 41*spots* (médias ± o desvio padrão).

Pelos géis 2-DE é possível observar que as massas moleculares da maioria dos *spots* proteicos estavam distribuídas entre 12 a 150 kDa e ponto isoelétrico na faixa de pH neutro-ácido.

Para análise dos perfis de proteínas intracelulares das fontes de aminoácidos, a quantidade de *spots* proteicos exclusivos e/ou com maior abundância selecionados foram: 27 *spots* de ácido glutâmico; 28 *spots* de histidina, 34 *spots* de cisteína e 20 *spots* de isoleucina.

Na Figura 10, também foram marcados os *spots* referentes às 22 proteínas intracelulares identificadas no proteoma intracelular de *A. niveus,* com suas características descritas na Tabela 7.

Tabela 7- Lista de proteínas intracelulares, exclusivas ou com maior abundância, extraídas dos micélios de *A. niveus* cultivado em bioprocessos submersos com 1% (m/v) de ácido glutâmico, histidina, cisteína e isoleucina, identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura %	MM(kDa)		pI		Anova	Níveis abundância/ Exclusivo	Peptídeos sequenciados
				Teor.	Obs.	Teor.	Obs.			
Ácido glutâmico 1%										
25	XP_001218140.1	*Peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase, mitochondrial precursor [A.terreus* NIH2624]	77/ 7	18	14	8.54	9.30	0,0332045	3.36	S/AVKPTIVDCG/SA
81	XP_001214520.1	*Mitochondrial peroxiredoxin PRX1 [A. terreus* NIH2624]	60/ 4	25	24	5.88	6.15	2,31E-07	11.09	LTF/PIISDPER
282	XP_755298.1	*Aspartate transaminase [A. fumigatus* Af293]	76/ 2	51	38	8.60	7.80	1,66E-06	3.10	S/EISNPPAYGA/R
319	XP_001216098.1	*Phosphoglycerate kinase [A. terreus* NIH2624]	73/ 3	45	42	6.58	7.06	1,62E-05	3.36	ASGGQIILLE/NLR
322	KMK61104.1	*Adenosylhomocysteinase [A. terreus* NIH2624]	85/ 2	48	44	6.02	6.49	2,03E-06	3.22	V/ADISLAAFGR
562	XP_001208607.1	*Allergen Asp f 15 [A. terreus* NIH2624]	63/ 6	15	10	8.73	7.48	5,30E-10	Exclusivo	WPTFGS/VPK
705	EYE94490.1	*GroES-like protein [Aspergillus ruber* CBS 135680]	152/ 6	38	36	5.36	6.48	3,71E-05	Exclusivo	SL/DAGDEYIALS/R/ILEDAINYVR

Continua

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura %	MM(kDa)		pI		Anova	Níveis abundância/ Exclusivo	Peptídeos sequenciados
				Teor.	Obs.	Teor.	Obs.			
Ácido glutâmico 1%										
716	XP_001213854.1	*Vacuolar protease A [A. terreus* NIH2624]	99/ 4	43	38	4.78	4.60	0,0511657	Exclusivo	YGSGSL/SGFVSEDTLK
854	XP_001209480.1	*Heat shock 70 kDa protein [A. terreus* NIH2624]	239/ 5	70	73	5.08	5.18	7,07E-05	Exclusivo	TTPSFV/AFTDTER/DA/GLIAGLNVLR/TADEV/EERPEELD
870	XP_001217043.1	*Peroxidase/catalase 2 [A. terreus* NIH2624]	219/ 5	81	63	5.99	5.99	0,0141473	Exclusivo	FLENP/DQFADAFAR/FVSTAWAAAS/TFR/AIAEVY/GSSDGER
Histidina 1%										
145	XP_001215724.1	*Cerevisin precursor [A. terreus* NIH2624]	70/ 2	52	31	5.58	6.25	7,67E-08	3.05	DSLSFG/TFNK
279	XP_001214863.1	*Formate dehydrogenase [A. terreus* NIH2624]	225/ 18	46	39	8.14	7.00	4,75E-05	22.41	GSWLINT/AR/GYGGDVWFP/QPAPK/AILESYFS/GR
2266	XP_001212080.1	*Enolase [A. terreus* NIH2624]	186/ 7	47	47	5.3	5.66	5,18E-06	Exclusivo	VNQ/IGILTESIQA/AK/SGET/EDVTIADIAV/GLR
2282	XP_016760176.1	*Saccharopine dehydrogenase [Sphaerulina musiva* SO2202]	68/ 2	50	49	6.44	7.48	9,08E-09	Exclusivo	YNIPEAET/LIR
Cisteína										
1450	XP_001210985.1	*Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor [A. terreus* NIH2624]	262 /8	47	38	9.11	9.21	4,86E-05	Exclusivo	LVITQ/SISGTGALRI/DSGLEVDKYR/ISV/AGITTGNVKR

Continuação

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura %	MM(kDa)		pI		Anova	Níveis abundância/ Exclusivo	Peptídeos sequenciados
				Teor.	Obs.	Teor.	Obs.			
Isoleucina 1%										
111	XP_001400672.1	*3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [A. niger* CBS 513.88]	61/ 5	34	28	8.74	5.45	2,45E-06	22.15	IAAAT/TTDPTDLQAP/SR
197	XP_001214831.1	*Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor [A. terreus* NIH2624]	90/ 3	37	36	8.27	8.24	8,96E-06	22.75	LFGVT/TLDVVR
233	XP_001212812.1	*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [A. terreus* NIH2624]	79/ 2	40	34	6.01	7.99	0,00496512	4.65	TVDAPSNKD/WR
262	XP_001210950.1	*acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor [A. terreus* NIH2624]	153/ 4	48	36	7.68	5.20	3,38E-06	30.10	FAQEQI/GPK/YA/INLLNEGRI
278	XP_001215752.1	*Iisovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor [A. terreus* NIH2624]	215/ 9	47	37	7.01	6.04	4,70E-09	62.94	QID/NSASSGVVIR/TQDCA GAILY/AAER/LYEIG/AGTSEIR
450	XP_001212503.1	*Aconitate hydratase, mitochondrial precursor [A. terreus* NIH2624]	157/ 2	85	65	8.11	6.69	1,12E-05	6.44	SLFTVTPGS/EQIR/NTYQ APPQD/R
2770	XP_001212345.1	*Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [A.terreus* NIH2624]	212/ 6	59	46	6.00	5.95	4,70E-13	Exclusivo	VPQST/DEELR/LAASITL/E QGK/TVD/FILDEPAIK

MM: massa molecular pI: ponto isoelétrico Teor: teórico Obs: observado

Escore [proteínas identificadas pelo MASCOT que apresentaram peptídeos (íons escore) com nível de significância de homologia extensiva ou identidade ($p < 0,05$), em relação as proteínas de banco de dados].

Peptídeos sequenciados pelo MASCOT.

As proteínas representadas nessa tabela foram identificadas no banco de dados NCBIprot

4.15. Aspectos biológicos das proteínas intracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado em diferentes fontes de aminoácidos

4.15.1. Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos

No proteoma intracelular de *A. niveus* a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (*spot* 233) e a fosfoglicerato quinase (PGK) foram mais abundantes nos cultivos com isoleucina e ácido glutêmico, respectivamente. Além disso, o *spot* exclusivo 2266, obtido do cultivo com histidina, foi identificado como uma enolase. Essas enzimas são fundamentais para a maquinaria fúngica e por esse motivo são moduladas para garantir a sobrevivência dos microrganismos (VALLEJO et al., 2012).

A GAPDH foi relacionada à patogenicidade de *C. albicans* e *P. brasiliensis* (CROWE et al., 2003; BARBOSA et al., 2006). A enzima PGK participa da produção de ATP na glicólise (DHAR et al., 2010). Segungo Albrecht et al. (2010), para o fungo *A. fumigatus,* a maior abundância de proteínas envolvidas na glicólise pode favorecer o dobramento de proteínas devido a disponibilidade de energia.

O cultivo com isoleucina fez com que no proteoma intracelular de *A. niveus* a enzima precursora malato desidrogenase (MDH) mitocondrial (*spot* 197) e a aconitato hidratase mitocondrial (*spot* 450) fossem identificadas com maior abundância.

A MDH contribui para a redução do estresse oxidativo pela remoção de EROs (CHU et al., 2015; THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM**,** 2017) e seu envolvimento com a patogenicidade de alguns fungos tem sido amplamente discutido (FERNÁNDEZ-ACERO et al., 2006; AMSELEM et al., 2011). Já a aconitato hidratase mitocondrial é vital para a produção de energia dentro da célula (FATEH et al., 2015) e no proteoma de *A. flavus* foi indicada como a proteína mais acetilada responsável por regular o fluxo metabólico para o equilíbrio energético do fungo (YANGYONG, 2017). Essa enzima também é fundamental para a produção de citrato por *A. niger* (ODONI et al., 2017).

Outra enzima fundamental para a produção de ácido cítrico é a citrato sintase (MURRAY; HYNES, 2010) que foi identificada pelo *spot* exclusivo 1081 obtido no cultivo com histidina. Costa (2011) ao estudar o micélio de *A. niger* observou a produção de ácido cítrico foi otimizada com a suplementação com fontes de carbono e nitrogênio, pois essas fontes ativaram a citrato sintase.

4.15.2. Proteína envolvida no metabolismo de proteínas e aminoácidos

A suplementação com aminoácidos modulou uma série de proteínas envolvidas com o metabolismo de aminoácidos, tais como: aspartato transaminase (*spot* 282); aspartato aminotransferase, mitocondrial (*spot* 1450); adenosil-homocisteinase (*spot* 322); sacaropina desidrogenase (*spot* 2282) foi exclusiva do proteoma intracelular em histidina (*spot* 2282).

No proteoma intracelular a aspartato transaminase foi abundante nos cultivos suplementado com os aminoácidos ácido glutâmico e isoleucina (*spot* 282) e está envolvida na formação de aminoácidos e ácidos orgânicos (THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2017). Já a aspartato aminotransferase, mitocondrial foi exclusiva do proteoma intracelular de *A. niveus* cultivado em cisteína (*spot* 1450) e promove a transaminação de aminoácido (JEFFERY et al., 1998). De modo similar, a suplementação com aminoácidos também permitiu a identificação dessa enzima de *Trichomonas vaginalis* (ROWE; LOWE, 1986).

A enzima adenosil-homocisteinase envolvida no metabolismo de metionina (WINTERBERG et al., 2014) foi identificada no proteoma intracelular de *A. niveus* com maior abundância em ácido glutâmico (*spot* 322). Já a sacaropina desidrogenase foi exclusiva do proteoma intracelular em histidina (*spot* 2282) e está envolvida na biossíntese de lisina (Ekanayake et al., 2010; XU, WEST, COOK, 2006).

A protease vacuolar A (*spot* 716) foi exclusiva do proteoma intracelular de *A. niveus* cultivado em ácido glutâmico. Em *S. cerevisiae* e *N. crassa* a protease vacuolar esteve correlacionada com ativação de proteases celulares como, carboxipeptidase e proteinase B (VÁZQUEZ-LASLOP; TENNEY; BOWMAN, 1996). Já no proteoma extracelular de *Verticillium dahliae* essa hidrolase foi abundante no cultivo com deficiência de nitrogênio e esteve relacionada ao metabolismo de proteínas durante a fase de crescimento desse fungo (CHU et al., 2015).

Nesse trabalho a enzima precursora mitocondrial da peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPI) foi abundante no proteoma intracelular do cultivo com ácido glutâmico (*spot* 25). De acordo com Schiene-Fischer (2015), em diferentes organismos as PPIs estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos. Além disso, o estresse abiótico também pode ativar essa enzima (SHARMA et al., 2003).

A proteína GroES denominada chaperonina 10 foi exclusiva do proteoma intracelular de *A. niveus,* cultivado em ácido glutâmico (*spot* 705). Essa chaperona molecular, encontrada em células, procariotos e eucariotos, participa do dobramento correto de proteínas (MOPARTHI et., 2014; THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2017). Nesse sentido, as chaperonas não apenas protegem as proteínas recém-sintetizadas durante o transporte e dobramento, mas também podem manter a integridade celular durante a exposição a condições de estresse (MARTINUS et al., 1995).

4.15.3. Proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos

De modo muito interessante, a suplementação com isoleucina foi capaz de modular uma série de enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos: sendo que a hidroxibutiril-CoA desidrogenase (*spot* 111), a isovaleril-CoA desidrogenase (*spot* 278) e a acil-CoA desidrogenase mitocondrial (*spot* 262) foram mais abundantes, enquanto que a metilmalonato-semialdeído desidrogenase (*spot* 2770) foi exclusiva nessa condição de cultivo.

A hidroxibutiril-CoA desidrogenase (*spot* 111) faz parte da via metabólica de ácidos graxos e está estreitamente ligada aos compostos de acil-CoA (ENGEL; MASSEY, 1971; THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2017). Steele et al. (1992) observaram que a suplementação com isoleucina também induziu enzimas do metabolismo de ácidos graxos em *Pseudomonas aeruginosa*.

Em fungos filamentosos a presença de isovaleril-CoA desidrogenase pode indicar ativação da via catabólica da leucina que libera acetil-CoA (MARTINS et al., 2014b). Já a acil-CoA desidrogenase mitocondrial catalisa a desidrogenação de tioésteres de acil-CoA (KIM; MIURA, 2004) e participa da β-oxidação mitocondrial que já foi descrita para *A. nidulans* (THORPE; KIM, 1995; MAGGIO-HALL et al., 2008). Nessa via metabólica ocorre a produção de moléculas de acetil-coenzima A que serão utilizadas para obtenção de energia (SWIGONOVÁ; MOHSEN; VOCKLEY, 2009). A acetil-coenzima A é um metabólito importante para diferentes vias metabólicas, tais como, ciclo do TCA e biossíntese de ácidos graxos. Na degradação de aminoácidos como a isoleucina ocorre a conversão em acetil-CoA (SPALPING; PRIGGE, 2010). Os níveis adequados desse composto são fundamentais para o crescimento e

desenvolvimento, mas dependerá dos substratos disponíveis no meio extracelular (HYNES; MURRAY, 2010). Quando há disponibilidade de aminoácidos como a isoleucina, por exemplo, esse aminoácido será convertido em acetil-CoA (SPALPING; PRIGGE, 2010).

A isoleucina é um aminoácido cetogênico que pode ser convertido em acetil-CoA (MAGGIO-HALL et al., 2008; HYNES; MURRAY, 2010). Nesse sentido, sugere-se para o efeito de isoleucina nos bioprocessos submersos de *A. niveus* possa ter ocorrido maior degradação desse aminoácido para biossíntese de ácidos graxos e liberação de energia, sendo as proteínas intracelulares identificadas referentes aos *spost* 2770, 111, 262 e 278.

4.15.4. Proteínas envolvidas em mecanismos de resistência ao estresse

No proteoma intracelular de *A. niveus* cultivado com ácido glutâmico foram identificadas proteínas envolvidas com a resistência às condições de estresse: a peroxiredoxina pmp20 (*spot* 81 - mais abundante), peroxidase/catalase 2 (*spot* 870 - exclusivo) e a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP 70) *(spot* 854 - exclusivo).

As peroxiredoxinas são enzimas antioxidantes (HANSCHMANN et al., 2013)que atuam na redução de H_2O_2 presente no meio intracelular (AHN et al., 2012; RAHMAD et al., 2014), na regulação da sinalização celular mediada pelo peróxido (POOLE; HALL; NELSON, 2011) e apresentam participação na transdução de sinal (RADYUK et al., 2010). Porém, os mecanismos envolvidos nesses processos ainda são mal compreendidos como, por exemplo, a inativação da peroxiredoxina em concentrações muito elevadas de H_2O_2 (WATANABE et al., 2014). Nesse caso, ocorre a ativação da catalase para evitar danos celulares (RAHMAD et al., 2014).

As peroxidases também apresentam função lignolítica ao participarem da degradação da lignina e na desintoxicação de solos contaminados com fenóis (HAMID; REHMAN, 2009; CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014). Como é de interesse a decomposição de biomassa vegetal com potencial para produção sustentável de combustíveis, o uso de enzimas como as peroxidases, produzidas e secretadas por fungos filamentosos, é relevante para aplicação nesse setor (EVANS et al., 1994; CONG et al., 2017; DAOU; FAULDS, 2017). Por sua vez, as proteínas de choque

térmico HSPs permitem uma maior tolerância as condições de estresse ambiental, pois previnem o dobramento proteico incorreto (SALEKDEH; KOMATSU, 2007).

A partir dos *spots* identificados, é possível sugerir que a condição de cultivo com ácido glutâmico proporcionou uma maior produção de EROs.

4.15.5. Proteína envolvida em outras funções

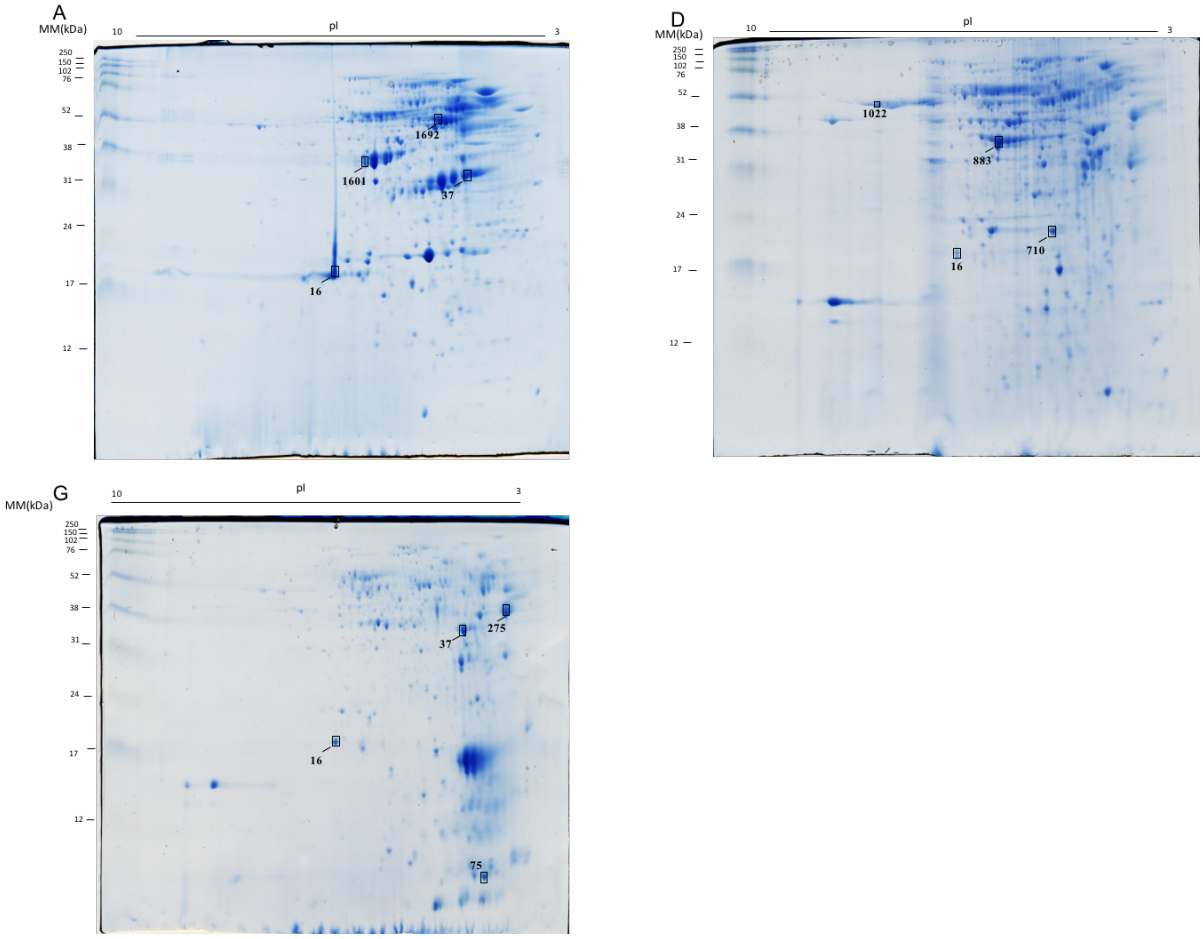
No proteoma intracelular de *A. niveus* as enzimas precursora da cerevisina (*spot* 145) e formiato desidrogenase (*spot* 279) foram mais abundantes no cultivo com histidina. A cerevisina já foi relacionada ao crescimento e desenvolvimento celular de fungos (TANIMIZU; HAYASHI, 1996). Por sua vez, a formiato desidrogenase produzida por *Aspergillus nomius* apresentou potencial elevado para degradar compostos orgânicos presentes no ambiente (KONDO et al., 2002).

4.16. Efeito de fontes de nitrogênio complexas sobre o proteoma extracelular de *A. niveus*

O efeito de 1% (m/v) das fontes complexas de soro de leite, farinha de pena e caseína sobre o proteoma extracelular de *A. niveus*, foi avaliado a partir das proteínas extracelulares que foram extraídas dos extratos proteicos obtidos em 96 h de crecimento fúngico em bioprocessos fermentativos.

Os perfis bidimensionais das proteínas extracelulares foram visualizados via 2-DE e, em seguida, analisados no *software* Image Master 2D Platinum v 7.0, sendo as triplicatas dos géis 2-DE representadas no APÊNDICE G. Na Figura 11 estão marcados os *spots* proteicos que foram identificados por MALDI-TOF/TOF-MS/MS e são referentes as condições de estudo do proteoma extracelular de *A. niveus*.

Figura 11- Géis representativos do proteoma extracelular de *A. niveus* crescido em meio com farinha de pena (A), caseína (D) e soro de leite (G). Os *spots* marcados são referentes as proteínas intracelulares identificadas que foram extraídas dos extratos proteicos obtidos em 96 h de bioprocessos submersos.



O marcador de massa molecular [MM (kDa)] utilizado foi o Amersham ECL Full-Range Rainbow com padrão de bandas: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24,17 e 12 kDa. As tiras com gradiente linear de pH imobilizado (13 cm, com pH 3-10) foram carregadas com 120 µg de proteínas totais. A segunda dimensão foi realizada em gel SDS/PAGE 12,5%, os géis 2-DE foram corados com Azul de Coomassie G-250, digitalizados no densitômetro DS-6000 e analisados no programa Image Master 2D Platinum v 7.0. Gel de referência farinha de pena.

Fonte: Elaborado pela autora

Após análises comparativas das triplicatas dos géis 2-DE, as médias dos coeficientes de correlação (r^2), referentes aos *spots* coincidentes das amostras de soro de leite, farinha de pena e caseína foram, respectivamente: 0,86; 0,93 e 0,87. Com uma reprodutibilidade r^2 maior que 86%.

As médias ± o desvio padrão do número de *spots* totais detectados no secretoma de *A niveus,* cultivado no meio líquido suplementado com soro de leite, farinha de pena e caseína foram respectivamente: 998 ± 45; 681 ± 59 e 1312 ± 315

spots (médias ± o desvio padrão). Pelos géis 2-DE foi possível observar que as massas moleculares dos *spots* proteicos estavam distribuídas entre 17 a 102 kDa e o ponto isoelétrico na faixa de pH ácido.

Para identificação das proteínas extracelulares, por MALDI-TOF/TOF-MS/MS foram coletados dos géis 2-DE os *spots* exclusivos e com maior abundância relativa (*fold* > *2* e $p < 0,05$). No total foram selecionados 19 *spots* para soro leite, 20 *spots* para farinha de pena e 22 *spots* para caseína.

Após análise dos peptídeos trípticos por MALDI-TOF/TOF-MS, os espectros de íons MS/MS correspondentes de cada *spot* foram analisados utilizando o *Software* Biotools (Bruker, Massachustts, EUA) com as identificações das proteínas extracelulares realizadas nos bancos de dados UniProtKB e NCBI.

Na Figura 11, também foram marcados os *spots* proteicos identificados referentes as 9 espécies de proteínas extracelulares com suas características apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Lista de proteínas extracelulares precipitadas dos extratos proteicos de *A. niveus* cultivado em bioprocessos submersos com 1% (m/v) de soro de leite, farinha de pena e caseína, identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura%	MM(kDa)		pI		Anova	Níveis de abundância/exclusivo
				Teor.	Obs.	Teor.	Obs.		
Soro de leite 1%									
75	XP_001216347 .1 *	*Thioredoxin [A.* terreus NIH2624]	88/ 11	12	9,0	4,5	4,25	7,63E-06	Exclusivo
275	OOQ83840.1 **	*Secreted beta-glucosidase sun1 [Penicillium brasilianum]*	79/ 3	44	37	6,7	5,10	2,29E-05	Exclusivo
Farinha de pena 1%									
16	Q0CMZ3.1 **	*Deuterolysin ATEG_04941 [A. terreus]*	212/ 25	16	18	5,8	6,86	5,20E-04	6.38
37	XP_002374291 .1 *	*Alkaline serine protease Alp1 [A. flavus* NRRL3357]	169	37	33	5,2	7,0	0,00269288	3.17
1601	GAO82488.1 **	*Arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinosidase [Aspergillus udagawae]*	71	35	35	6,2	6,04	5,81E-07	Exclusivo
1692	CZT16449.1 **	*Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase [Ramularia collocygni]*	128	81	52	6,0	6,21	1,93E-05	Exclusivo
Caseína 1%									
710	GAO84265.1 **	*Peroxiredoxin pmp20 [Aspergillus udagawae]*	80	18	20	5,3	5,11	1,08E-07	Exclusivo
883	XP_001213881 .1 *	*Fructose-bisphosphate aldolase [A. terreus* NIH2624]	373	39	33	5,5	6,07	0,0090773	Exclusivo
1022	XP_001209805 .1 *	*2-methylcitrate synthase, mitochondrial precursor [A. terreus* NIH2624]	100	51	41	9,5	8,3	0,00707278	Exclusivo

MM: massa molecular pI: ponto isoelétrico Teor: teórico Obs: observado. Na coluna do número de acesso as bases de dados utilizadas estão indicadas a seguir:
* NCBIprot; ** UniProtKB

4.17. Aspectos biológicos das proteínas extracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado em diferentes condições de fontes de nitrogênio complexas

4.17.1. Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos

A suplementação com fontes de nitrogênio poliméricas modularam diferentes enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos: β-glucosidase SUN1, provável arabinan endo-1,5-α-L-arabinosidase, manosil-oligosacarideo α-1,2 manosidase, frutose-bifosfato aldolase (FBA) e o precursor de 2-metilcitrato sintase mitocondrial.

A β-glucosidase SUN1 foi exclusiva do proteoma extracelular de *A. niveus* cultivado com soro de leite (*spot* 275) e é uma enzima capaz de catalisar a clivagem seletiva das ligações glicosídicas (TIWARI; MISRA; SANGWAN, 2013). As β-glucosidases, de origem fúngica têm sido exploradas biotecnologicamente para geração de biocombustíveis (TIWARI; MISRA; SANGWAN, 2013) a partir da degradação da biomassa vegetal num sistema multienzimático composto por endoglucanase, exoglucanase e β-glucosidase para a obtenção de etanol de segunda geração (MOLINA et al., 2016; AHMED et al., 2017).

Já no cultivo com farinha de pena, o proteoma extracelular de *A. niveus* apresentou *spots* exclusivos que foram identificados como provável arabinan endo-1,5-α-L-arabinosidase (*spot* 1601) e provável manosil-oligosacarideo α-1,2 manosidase (*spot* 1692).

A enzima arabinan endo-1,5-α-L-arabinosidase já foi relacionada à hidrólise enzimática de hemicelulose presente na parede celular de plantas, na degradação do polissacarídeo arabinose, para produção de energia (BIELY, 1985; SKJOET et al., 2001; SHALLOM; SHOHAM, 2003; HONG; PARK; OH, 2009; CHEN et al., 2015; CUNHA, 2015; WEFERS et al., 2017). A degradação de L-arabinose por enzimas extracelulares fúngicas de *A. niger* e *T. reesei* tem sido explorada a fim de obter fontes de energia renováveis (SEIBOTH; METZ, 2011). Outros fungos do gênero *Aspergillus* também produziram arabinosidase: no cultivo de *A. nidulans* com polissacarídeos (MARTINS et al., 2014a), em *A. niger* submetido a fermentação em estado sólido (SHI et al., 2016), no bioprocesso submerso de *A. oryzae* cultivado em meio suplementado

com trigo (TE BIESEBEKE et al., 2006) e no cultivo de *A. terreus* em meio ácido suplementado com o amido (HAN et al., 2010).

A provável manosil-oligosacarideo α-1,2 manosidase faz parte do metabolismo de carboidratos e da glicosilação de proteínas (THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2017). A mesma enzima já foi identificada no micélio de *Trametes versicolor* F21a, previamente cultivado em substrato fonte de nitrogênio e essa enzima também apresentou potencial para hidrolisar celulose da parede celular de algas (XUEYAN et al., 2017).

No cultivo com caseína, o proteoma extracelular de *A. niveus* apresentou *spots* exclusivos que foram identificados como a frutose-bifosfato aldolase (FBA) (*spot* 883) e 2-metilcitrato sintase mitocondrial (*spot* 1022). A FBA, em *Mycobacterium tuberculosis*, além de participar fisiologicamente do metabolismo dessa bactéria também esteve envolvida no processo de interação hospedeiro e patógeno (PUCKETT et al., 2014). Já a 2-metilcitrato sintase mitocondrial catalisa a síntese 2-metilcitrato a partir de oxaloacetato e propionil-CoA (LIMENITAKIS et al., 2013) e quando identificada no proteoma extracelular de *P. brasiliensis* essa proteína foi secretada por via não clássica, devido a ausência de peptídeo sinal (WEBER et al., 2012). De modo similar, a enzima de *A. niveus* também não apresentou peptídeo sinal e, por isso, é possível que a sua secreção também tenha ocorrido por via não clássica.

Nesse contexto é possível sugerir que o caráter polimérico do soro de leite e da farinha de pena tenha sido capaz de induzir enzimas, envolvidas na degradação de celulose e hemicelulose, com grande apelo biotecnológico na produção de biocombustíveis. Por outro lado, no cultivo com caseína, as proteínas identificadas estão relacionadas a propriedades fisiológicas do microrganismo.

De modo geral, o metabolismo de carboidratos foi modulado pela suplementação com todas as fontes complexas de nitrogênio.

4.17.2. Proteínas envolvidas no metabolismo de proteínas

A suplementação com farinha de pena foi eficiente na indução de proteínas relacionadas ao metabolismo de proteínas: a deuterolisina ATEG_04941 (*spot* 16) e a serino protease alcalina Alp1 (*spot* 37). A deuterolisina, também denominada de protease neutra 2 homóloga ATEG_04941, é uma metalopeptidade, que assim como

as proteases alcalinas, quando secretadas permitem a assimilação de substratos proteicos do meio extracelular (THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2017). Por esse motivo, é possível que a secreção dessas peptidases tenha objetivo de obtenção de nutrientes a partir da degradação da farinha de pena.

De modo similar, Malathi e Chakraborty (1990) observaram que o crescimento de *A. flavus* em fontes orgânicas de nitrogênio também foram condições propícias para obtenção de uma protease. A capacidade de induzir a produção de peptidases também foi observada no cultivo submerso de *A. oryzae* NRRL2217 com resíduos agroindustriais e as fontes orgânicas de nitrogênio e essas proteases possuem um grande apelo industrial (SUMANTHA et al., 2005).

Um dos objetivos do estudo com o fungo *A. niveus* foi a prospecção de peptidase com potencial para aplicação biotecnológica e industrial. Na Figura 8, anteriormente apresentada, é possível observar que a suplementação com farinha de pena foi a que apresentou maior atividade enzimática, o que corrobora o potencial desse substrato na indução da produção e secreção de peptidases, conforme identificado no proteoma extracelular de *A. niveus*.

4.17.3. Proteínas envolvidas em mecanismos de resistência ao estresse oxidativo

A suplementação com fontes complexas de nitrogênio também modulou proteínas envolvidas na resistência ao estresse oxidativo: a tioredoxina e a peroxiredoxina.

A tioredoxina (TRX) (*spot* 75) foi identificada de modo exclusivo no proteoma extracelular de *A. niveus* cultivado em soro de leite. A TRX é reconhecida como uma pequena proteína redox capaz de modular tanto a estrutura quanto a atividade de proteínas, envolvidas na regulação da expressão gênica, apoptose e na resposta ao estresse oxidativo (KUMAR, TABOR; RICHARDON, 2004; MARCHAND et al., 2006). Já a peroxiredoxina pmp20 foi exclusiva do proteoma extracelular da condição caseína (*spot* 710).

Em fungos, os mecanismos de defesa ao estresse oxidativo são acionados quando as concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) excedem a capacidade para remoção e reparação aos danos em biomoléculas (SQUIER, 2001).

No cultivo com *V. dahliae,* a baixa disponibilidade de fontes de nitrogênio foi considerada uma condição de estresse que proporcionou o aumento de EROs e diferentes enzimas foram secretadas em resposta ao meio hostil (CHU et al., 2015).

De modo geral, as proteínas de resistência ao estresse oxidativo foram produzidas nos cultivos com soro de leite e caseína.

4.18. Efeito de aminoácidos como fontes de nitrogênio sobre o proteoma extracelular de *A. niveus*

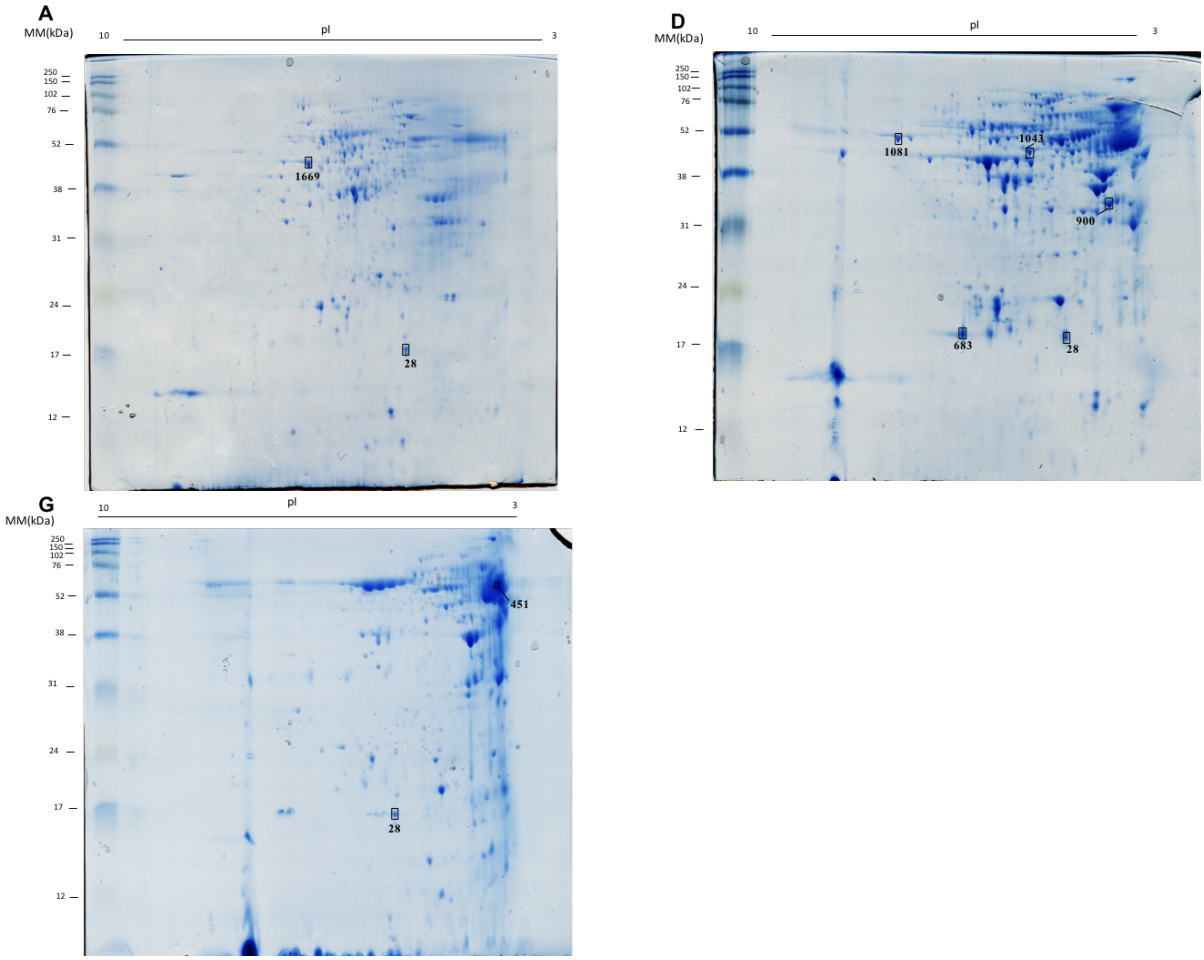
Os efeitos de 1% (m/v) das fontes de aminoácidos cisteína, isoleucina, histidina e ácido glutâmico sobre o proteoma extracelulares de *A. niveus* foram avaliados em 96 h de bioprocessos submersos, com as proteínas extracelulares coletadas a partir dos extratos proteicos.

Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese bidimensional, mas durante essa etapa, para a amostra referente a fonte de aminoácido cisteína, não foi possível acumular 15500 Vh no sistema Ettan IPGphor III (GE Healthcare) necessários para separar as proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico.

A seguir, para as amostras isoleucina, histidina e ácido glutâmico os géis 2-DE foram analisados no *software* Image Master 2D Platinum v 7.0 com as triplicatas dos géis representadas no APÊNDICE H.

Na Figura 12 foram marcados os *spots* referentes às proteínas exracelulares previamente identificadas por espectrometria de massas com suas características apresentadas na Tabela 9.

Figura 12- Géis representativos do proteoma extracelular de *A. niveus* crescido em meio com 1% (m/v) com as fontes de nitrogênio ácido glutâmico (A), histidina (D) e isoleucina (G). Os *spots* marcados são referentes as proteínas extracelulares identificadas obtidas dos extratos proteicos em 96 h de bioprocessos submersos.



O marcador de massa molecular [MM (kDa)] utilizado foi o Amersham ECL Full-Range Rainbow com padrão de bandas: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24,17 e 12 kDa. As tiras com gradiente linear de pH imobilizado (13 cm, com pH 3-10) foram carregadas com 120 µg de proteínas totais. A segunda dimensão foi realizada em gel SDS/PAGE 12,5%, os géis 2-DE foram corados com Azul de Coomassie G-250, digitalizados no densitômetro DS-6000 e analisados no programa Image Master 2D Platinum v 7.0. Gel de referência ácido glutâmico. Fonte: Elaborado pela autora.

Pela análise comparativa das triplicatas dos géis 2-DE, as médias dos coeficientes de correlação (r^2) dos *spots* coincidentes de isoleucina, histidina e ácido glutâmico foram, respectivamente: 0,85; 0,94 e 0,79. Com esses dados observou-se uma reprodutibilidade de r^2 maior que 79% entre os *spots* dessas condições.

O número de *spots* totais identificados nos géis 2-DE do proteoma extracelular de *A niveus* em isoleucina, histidina e ácido glutâmico foram, respectivamente: 1035 ± 91; 1317 ± 288 e 1283 ± 151 *spots* (médias ± o desvio padrão).

Pelos géis 2-DE é possível observar que as massas moleculares, da maioria das proteínas secretadas estavam distribuídas entre 17 a 102 kDa e ponto isoelétrico na faixa de pH neutro-ácido.

Para analisar os perfis de proteínas extracelulares das fontes de aminoácidos sobre o proteoma extracelular de *A. niveus* foram selecionados os *spots* exclusivos e/ou com maior abundância relativa sendo selecionados 8 *spots* para ácido glutâmico, 23 *spots* para histidina e 17 *spots* para isoleucina.

Na Figura 12, também foram marcados os 7 *spots* proteicos referentes as proteínas extracelulares identificadas por MALDI-TOF/TOF-MS/MS com suas características apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Lista de proteínas extracelulares precipitadas dos extratos proteicos de *A. niveus* cultivado em bioprocessos submersos com 1% (m/v) de ácido glutâmico, histidina e isoleucina, identificadas por MALDI-TOF/TOF–MS/MS

Spot	Número de acesso	Proteína [espécie]	Escore/ Cobertura%	MM(kDa)		pI		Anova	Níveis de abundância/ exclusivo
				Teor.	Obs.	Teor.	Obs.		
Ácido glutâmico 1%									
1669	XP_001210310 .1 *	*Phosphoglycerate kinase* [*A. terreus* NIH2624]	122/ 17	44	44	6,7	6,99	1,19E-07	Exclusivo
Histidina 1%									
683	XP_001214119 .1 *	24 kDa *metalloproteinase precursor* [*A. terreus* NIH2624]	212/ 25	16,0	18	5,8	6,86	2,30E-05	Exclusivo
900	KOC09698.1 *	*Endo-arabinase* [*A. flavus* AF70]	169/ 5	37	35	5,2	7,0	2,16E-09	Exclusivo
1043	XP_015403315 .1 *	*Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase* [*A. nomius* NRRL 13137]	128/ 4	81	49	6,0	6,21	5,28E-08	Exclusivo
1081	CEL51815.1 **	*Citrate synthase* [*Rhizoctonia solani* AG-1 IB]	102/ 7	47	50	6,0	6,19	8,13E-12	Exclusivo
Isoleucina 1%									
28	GAA87714.1 *	*Allergen Asp F3* *[Aspergillus kawachii* IFO 4308]	155/ 17	19	17	5.1	5.03	7,77E-06	3.61
451	GAQ05807.1 *	*Secreted beta-glucosidase sun1* *[Aspergillus lentulus]*	86/ 2	44	58	5.1	3.61	0,0138027	Exclusivo

MM: massa molecular pI: ponto isoelétrico Teor: teórico Obs: observado. Na coluna do número de acesso as bases de dados utilizadas estão indicadas a seguir:
* NCBIprot; ** UniProtKB

4.19. Aspectos biológicos das proteínas extracelulares identificadas de *A. niveus* cultivado em aminoácidos como fontes de nitrogênio

4.19.1. Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos

O cultivo com ácido glutâmico apresentou o *spot* 1669 exclusivo que foi identificado como uma fosfoglicerato quinase, uma enzima reversível no processo de glicólise e gliconeogênese (THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2017).

A citrato sintase (*spot* 1081) foi identificada, de modo exclusivo, no cultivo com histidina e essa enzima atua no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, uma etapa fundamental para a obtenção de energia pela célula (THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2017). No proteoma extracelular de *A. niveus,* cultivado com histidina, também foram identificados os *spots* exclusivos oxidoredutase manitol-1-fosfato 5-desidrogenase (*spot* 1043) e endo-arabinase (*spot* 900). A manitol-1-fosfato 5-desidrogenase foi identificada no proteoma intracelular de *B. cinerea* (FERNÁNDEZ-ACERO et al., 2007) e já foi relacionada à germinação de conidiósporos utilizando o manitol como fonte de carbono (WITTEVEEN; VISSER, 1995). O manitol também foi utilizado como fonte de carbono por outros fungos filamentosos em condições de estresse, possivelmente envolvendo a participação da manitol-1-fosfato 5-desidrogenase (SOLOMON; WATERS; OLIVER, 2007; KARAHULEC et al., 2008). Já a endo-arabinase (*spot* 900) é uma glicosil-hidrolase envolvida na degradação da L-arabinose da parede celular de plantas (SHI et al., 2014). Segundo Karnaouri e colaboradores (2014), a L-arabinose da biomassa lignocelulósica foram degradadas pela endo-arabinase do fungo *Myceliophthora thermophila* e que apresentou potencial para ser aplicada nos setores de biocombustíveis e energia (KARNAOURI et al., 2014).

A β-glucosidase SUN1 foi exclusiva do proteoma extracelular de *A. niveus* em Isoleucina (*spot* 451) e que devido a sua capacidade de catalisar a clivagem seletiva de ligações glicosídicas (TIWARI; MISRA; SANGWAN, 2013) tem ganhado destaque no processo de produção de biocombustíveis (TIWARI; MISRA; SANGWAN, 2013) a partir da degradação dos materiais lignocelulósicos (MOLINA et al., 2016; AHMED et al., 2017). De modo geral, o metabolismo de carboidratos foi modulado pela suplementação com aminoácidos.

4.19.2. Proteínas envolvidas no metabolismo de proteínas e em mecanismos de resistência ao estresse

No proteoma extracelular de *A. niveus* cultivado com isoleucina foi identificada, de modo exclusivo, o alérgeno Asp F3 (*spot* 28) que pertence à família das tioredoxinas e que atuam na resposta ao estresse oxidativo. Essa proteína já foi identificada no proteoma de *A. fumigatus* após indução por H_2O_2 (DOYLE, 2011).

No proteoma extracelular de *A. niveus,* cultivado com histidina ,foi identificada, de modo exclusivo, a enzima precursora da metaloproteinase de 24 kDa (*spot* 683). Em outras espécies do gênero de *Aspergillus* (*A. flavus* e *A. fumigatus*) essa serino protease já foi relacionada à virulência desses microrganismos (RAMESH; SIRAKOVA; KOLATTUKUDY, 1995). Além disso, de acordo com Latgé (1999), essa enzima também pode atuar na morfogênese e sobrevivência de *Aspergillus*.

Segundo Rementeria e colaboradores (2005), os mecanismos de adaptação dos fungos aos efeitos químicos e/ou físicos do meio extracelular favorecem a produção e secreção de alérgenos e enzimas. Por esse motivo, é possível que, nas condições de cultivo com os aminoácidos, o fungo *A. niveus* tenha produzido essas proteínas para possibilitar a própria sobrevivência.

5. Predição de propriedades das proteínas extracelulares identificadas no proteoma extracelular utilizando análises *in silico*

Na literatura pesquisada, algumas vezes, o enfoque encontrado para algumas das proteínas intracelulares e extracelulares de *A. niveus* estiveram relacionadas com a patogenicidade de diferentes gêneros de fungos. Por isso, para o fungo *A. niveus*, foi realizada a predição da presença de potenciais efetores que pudessem estar envolvidos na interação com hospedeiros. Mas é reconhecido, que as proteínas expressas por fungos, não necessariamente estão relacionadas a patogenicidade. Visto que podem atuar em processos fisiológicos necessários para o desenvolvimento e sobrevivência desses microrganismos (REMENTERIA et al., 2005).

Durante a discussão das proteínas identificadas no proteoma de *A. niveus,* notou-se que algumas proteínas já haviam sido descritas por sua participação em processos patogênicos. Por isso, foi realizada a análise *in silico* utilizando o *software*

EffectorP para a predição de proteínas extracelulares que apresentassem potencial como efetoras na fitopatogenicidade. As análises para identificar as proteínas secretadas por vias clássica (presença de peptídeo sinal), ou não clássica, foram realizadas utilizando os *softwares* SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) e SecretomeP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/), respectivamente.

Nesse trabalho, observou-se que a cutinase, identificada em pH 8, apresentou peptídeo sinal e foi predita como efetora. A nucleosídeo difosfato quinase (pH 7) também foi predita como efetora, mas não é uma proteína secretada, embora estivesse no proteoma extracelular (Tabela 10).

Entre as fontes de carbono (Tabela 11), a peroxiredoxin é uma proteína secretada por vias não clássicas que pode atuar como uma efetora de fitopatogenicidade. Essa proteína também está presente na Tabela 12, no cultivo com caseína. A peptidil-prolil cis-trans isomerase (*spots* 309 e 471, das tabelas 11 e 10, respectivamente) também foi predita como efetora, mas não é uma proteína secretada.

Outras proteínas preditas como efetoras foram alergen (*spot* 28 – Tabela 13) e tioredoxina (*spot* 75 – Tabela 12). A proteína *allergen Asp F3* é uma serino protease reconhecida pelo seu papel na patogenicidade de fungos do gênero *Aspergillus* (CHOW et al., 2000; PURKAYASTHA et al., 2000; HAN et al., 2010) e a análise por SecretomeP indica que ela é secretada por vias não clássicas. A tioredoxina embora seja predita como efetora, não é secretada.

A predição de proteínas efetoras de fungos, as quais participam da infecção de células hospedeiras e manipulam a resposta do hospedeiro, está diretamente envolvida com a presença de um sinal de secreção (SPERSCHNEIDER et al., 2015; SONAH; DESHMUKH; BÉLANGER, 2016). A identificação de efetores de fitopatogenicidade tem contribuído para estudar a biologia de fungos patogênicos e evitar dano em plantações, reconhecer os mecanismos envolvidos na resistência a antifúngicos e produtos químicos (DESHMUKH; BÉLANGER, 2016). Segundo Caracuel et al. (2003), os efetores de fitopatogenicidade estão relacionados ao potencial para degradar parede celular e invadir a célula hospedeira.

Em relação às proteínas identificadas no proteoma extracelular de *A. niveus,* frente aos efeitos de pH, fontes de carbono e nitrogênio, no total a porcentagem de proteínas que apresentaram peptídeo sinal foi de 44% (Tabelas 10, 11, 12 e 13). Os microrganismos ao se comunicarem com o meio extracelular secretam proteínas

secretadas apresentam um sinal de secreção peptídeo sinal que, posteriormente, será separado da proteína madura (NAKAI, 2000; ZHANG; HENZEL, 2004), enquanto que as proteínas transmembrana atuam no direcionamento da proteína sintetizada à sua função biológica (REYNOLDS et al., 2008; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2012).

A ausência de peptídeo sinal nas demais proteínas presentes no meio extracelular pode estar relacionado ao transporte proteico por uma via não-clássica (independente de peptídeo sinal) (WEBER et al., 2012). Além disso, também poder ter ocorrido morte celular e o extravasamento do conteúdo intracelular provocado por cultivos em condições estressoras (CLEVES, 1997; NICKEL, 2003).

Tabela 10. Análises *in silico* de proteínas extracelulares de *A. niveus* identificadas em cultivos com diferentes condições de pH para a predição de vias secretórias e potenciais efetores de fitopatogenicidade

Spot	Acesso	Proteína	Secreção clássica *	Secreção não clássica (NN-score)**	Efetor de fitopatogenicidade***
		pH 5			
252	XP_749345.1	*Dihydrolipoamide dehydrogenase*	Não	Não	Não
272	XP_001215904.1	*pH-responsive protein 2*	Não	Sim (0,655)	Não
275	XP_001213560.1	*Alpha-galactosidase A precursor*	Sim	Não	Não
282	XP_001214505.1	*Lysophospholipase precursor*	Sim	Não	Não
402	XP_001210059.1	*Carboxypeptidase S1*	Não	Sim (0,794)	Não
439	XP_001216097.1	*Acid trehalase precursor*	Sim	Não	Não
1530	XP_001212866.1	*Arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinosidase A precursor*	Sim	Não	Sim (0,669)
		pH 6			
303	XP_001216098.1	*Catalase B precursor*	Sim	Não	Não
		pH 7			
855	XP_001216687.1	Nucleoside diphosphate Kinase	Não	Não	Sim (0,869)
		pH 8			
21	XP_001824820.1	*Subtilisin-like serine protease pepC*	Sim	Não	Não
27	XP_001209480.1	*Heat shock 70 kDa protein*	Não	Não	Não
471	XP_001218140.1	*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, mitochondrial precursor*	Não	Não	Sim (0,874)
498	XP_001216431.1	*Cutinase precursor*	Sim	Não	Sim (0,685)

* A predição de proteínas secretadas por vias clássicas foi realizada utilizando o *software on line* SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/). As entradas das sequências de proteínas estavam na extensão FASTA e a opção *Eukaryotes* foi indicada.
** A predição de proteínas secretadas por vias não clássicas foi realizada utilizando o *software on line* SecretomeP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/). NN-score > 0,6 e ausência de peptídeo sinal indicam que a proteína pode ser secretada por via não clássica. As entradas das sequências de proteínas estavam na extensão FASTA e a opção *Mammalian* foi indicada.
*** A predição de proteínas com potencial de efetores na fitopatogenicidade foi realizada utilizando o *software on line* EffectorP (http://effectorp.csiro.au/)

Tabela 11- Análises *in silico* de proteínas extracelulares de *A. niveus* identificadas em cultivos com diferentes fontes de carbono para a predição de vias secretórias e potenciais efetores de fitopatogenicidade

Spot	Número de acesso	Proteína	Secreção clássica *	Secreção não clássica (NN-score)**	Efetor de fitopatogenicidade***
Lactose					
18	XP_015402460.1	*Peroxiredoxin*	Não	Sim (0,824)	Sim (0,915)
309	KFH63941.1	*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*	Não	Não	Sim (0,993)
437	XP_001213881.1	*Fructose-biphosphate aldolase*	Não	Não	Não
496	XP_748964.1	*SUN domain protein (uth1)*	Sim	Não	Não
Xilose					
23	XP_001272225.1	*Deuterolysin metalloprotease (M35)*	Sim	Não	Não
758	CCE29129.1	*Probable nucleoside-diphosphate kinase*	Não	Não	Não
Frutose					
71	XP_001210059.1	*Carboxypeptidase S1*	Não	Sim (0,794)	Não
221	KEQ87821.1	*Aorsin*	Sim	Não	Não
Glicose					
1006	XP_015409892.1	*Oryzin*	Sim	Não	Não
1031	GAA87300.1	*Dipeptidase*	Não	Sim (0,666)	Não

* A predição de proteínas secretadas por vias clássicas foi realizada utilizando o *software on line* SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/). As entradas das sequências de proteínas estavam na extensão FASTA e a opção *Eukaryotes* foi indicada.
** A predição de proteínas secretadas por vias não clássicas foi realizada utilizando o *software on line* SecretomeP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/). NN-score > 0,6 e ausência de peptídeo sinal indicam que a proteína pode ser secretada por via não clássica. As entradas das sequências de proteínas estavam na extensão FASTA e a opção *Mammalian* foi indicada.
*** A predição de proteínas com potencial de efetores na fitopatogenicidade foi realizada utilizando o *software on line* EffectorP (http://effectorp.csiro.au/)

Tabela 12- Análises *in silico* de proteínas extracelulares de *A. niveus* identificadas em cultivos com diferentes fontes complexas de nitrogênio para a predição de vias secretórias e potenciais efetores de fitopatogenicidade

Spot	Número de acesso	Proteína	Secreção clássica *	Secreção não clássica (NN-score)**	Efetor de fitopatogenicidade***
Soro de leite					
75	XP_001216347.1	*Thioredoxin*	Não	Não	Sim (0,977)
275	OOQ83840.1	*Secreted beta glucosidase Sun1*	Não	Sim (0,862)	Não
Farinha de pena					
16	QOCMZ3.1	*Deuterolysin*	Sim	Não	Não
37	XP_002374291.1	*Alkaline serine protease*	Sim	Não	Não
1601	GAO82488.1	*Arabina endo-1,5-alpha-L-arabinosidase*	Não	Sim (0,823)	Não
1692	CZT16449.1	*Probable Mannosyl oligoccharide alpha-1,2-mannosidase*	Sim	Não	Não
Caseína					
710	GAO84265.1	*Putative peroxiredoxin pmp20*	Não	Sim (0,888)	Sim (0,873)
883	XP_001213881.1	*Fructose-biphosphate aldolase*	Não	Não	Não
1022	XP_001209805.1	*2-methylcitrate synthase mitochondrial precursor*	Não	Não	Não

* A predição de proteínas secretadas por vias clássicas foi realizada utilizando o *software on line* SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/). As entradas das sequências de proteínas estavam na extensão FASTA e a opção *Eukaryotes* foi indicada.
** A predição de proteínas secretadas por vias não clássicas foi realizada utilizando o *software on line* SecretomeP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/). NN-score > 0,6 e ausência de peptídeo sinal indicam que a proteína pode ser secretada por via não clássica. As entradas das sequências de proteínas estavam na extensão FASTA e a opção *Mammalian* foi indicada.
*** A predição de proteínas com potencial de efetores na fitopatogenicidade foi realizada utilizando o *software on line* EffectorP (http://effectorp.csiro.au/)

Tabela 13- Análises *in silico* de proteínas extracelulares de *A. niveus* identificadas nos cultivos com aminoácidos como fontes nitrogênio para a predição de vias secretórias e potenciais efetores de fitopatogenicidade

Spot	Número de acesso	Proteína	Secreção clássica *	Secreção não clássica (NN-score)**	Efetor de fitopatogenicidade ***
Ácido glutâmico					
1669	XP_001210310.1	*Phosphoglycerate kinase*	Não	Não	Não
Histidina					
273	XP_001214119.1	*24 kDa metalloproteinase precursor*	Não	Não	Não
900	KOC09698.1	*Endo-arabinase*	Sim	Não	Não
1043	XP_015403315.1	*Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase*	Não	Sim (0,622)	Não
1081	CEL51815.1	*Citrate synthase*	Não	Não	Não
Isoleucina					
28	GAA87714.1	*Allergen Asp F3*	Não	Sim (0,616)	Sim (0,807)
451	GAQ05807.1	*Secreted beta-glucosidase Sun1*	Sim	Não	Não

* A predição de proteínas secretadas por vias clássicas foi realizada utilizando o *software on line* SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/). As entradas das sequências de proteínas estavam na extensão FASTA e a opção *Eukaryotes* foi indicada.
** A predição de proteínas secretadas por vias não clássicas foi realizada utilizando o *software on line* SecretomeP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/). NN-score > 0,6 e ausência de peptídeo sinal indicam que a proteína pode ser secretada por via não clássica. As entradas das sequências de proteínas estavam na extensão FASTA e a opção *Mammalian* foi indicada.
*** A predição de proteínas com potencial de efetores na fitopatogenicidade foi realizada utilizando o *software on line* EffectorP (http://effectorp.csiro.au/)

6. Dificuldades encontradas na realização dos estudos proteômicos com o fungo *A. niveus*

Os resultados anteriormente apresentados mostraram que os perfis de proteínas intra- e extracelulares de *A. niveus*, após 96 h de cultivos em diferentes pH 5, 6, 7 e 8, modularam uma série de processos biológicos. Entre as proteínas identificadas, estiveram presentes algumas enzimas que, para outros microrganismos, foram relacionadas à fitopatogenicidade. É interessante notar também que foram identificadas enzimas com potencial para aplicação biotecnológica e industrial.

Na literatura, é evidente o interesse em enriquecer os estudos proteômicos de espécies de fungos filamentosos, devido ao potencial biotecnológico de muitas enzimas. Essas pesquisas podem ser realizadas a partir do estudo das variações das condições de cultivo sobre o proteoma de fungos (KNIEMEYER, 2011; GARZON et al., 2017; COLOGNA et al., 2018).

Neste sentido, diante do potencial enzimático já descrito para *A. niveus*, foi proposto realizar o primeiro estudo proteômico para esse fungo para ampliar o conhecimento dos efeitos de pH, fontes de carbono e nitrogênio sobre o seu proteoma (TAJ-ALDEEN, ALKENANY, 1993; SOUZA-MOTTA et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2009; BETINI et al., 2009; SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2013; MALLER et al., 2013).

Nos estudos proteômicos, de fungos em geral, a anotação do genoma contribui para a compreensão dos padrões de expressão de proteínas, caracterização de um elevado número de proteínas em uma única análise e determinação de modificações pós-traducionais (PANDEY, MANN 2000; HAN et al., 2010). Para Adav, Chao e Sze (2012), um fator relevante na identificação das proteínas de *T. reesei* foi a anotação prévia do seu genoma. Como o *A. niveus* não possui sequência genômica e dados proteômicos, descritos na literatura, essa condição pode ter dificultado as identificações dos peptídeos trípticos obtidos nessa pesquisa e a classificação funcional de suas proteínas.

Ao realizar as buscas das proteínas, expressas por *A. niveus*, nos bancos de dados de proteínas, um dos parâmetros adotados foi a restrição taxonômica para fungos. Por conseguinte, os resultados obtidos demonstraram que a maioria das proteínas intracelulares e secretadas estavam relacionadas ao gênero *Aspergillus.* Ao

realizar a busca por proteomas no catálogo online de informações sobre proteínas do *Universal Protein Resource* (Uniprot - http://www.uniprot.org/proteomes) foram identificados 38 proteomas descritos para diferentes espécies desse gênero.

Nas Tabelas 2 até 9 é possível observar que grande parte das indentificações dos proteomas intra- e extracelular de *A. niveus* foram correspondentes com as proteínas de *A. terreus*. Enquanto isso, não foram identificadas proteínas nos bancos de dados pesquisados que estivessem correlacionadas ao *A. niveus*. Esses dados podem ser reforçados pelo apresentado por Varga et al. (2005) e Samson et al. (2011) que ao realizarem a análise filogenética dos fungos *A. niveus* e *A. terreus* demonstraram uma relação de semelhança evolutiva entre essas duas espécies. Além disso, Flipphi e colaboradores (2009) relataram que o metabolismo básico entre espécies de um mesmo gênero apresenta poucas variações em seus perfis proteicos.

Outro desafio para a proteômica envolve a análise de *spots* proteicos pouco abundantes por espectrometria de massas, o que pode refletir também no sucesso das análises por bioinformática (KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2008; MURAD et al., 2014; ZHAO et al., 2014). Segundo Shah e colaboradores (2009), quando as proteínas secretadas por fungos possuem apenas uma sequência de peptídeos ou, então, apresentam alguma modificação na tradução, a cobertura da sequência de aminoácidos da proteína pode ser incerta na análise por espectrometria de massas.

Nas identificações das proteínas representadas no proteoma de *A. niveus* observa-se que algumas proteínas foram identificadas com localização predita. De acordo com Nombela; Gil; Chaffin (2006), essas proteínas poderão executar mais de uma função celular, dependendo da sua localização.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho, pioneiro nos estudos dos efeitos de diferentes condições de pH, fontes de carbono e nitrogênio sobre o proteoma intra e extracelular de *A. niveus* cultivado em bioprocessos submersos. De acordo com os perfis de proteínas intra e extracelulares observou-se que estas foram as responsáveis por influenciarem na síntese ou degradação de polímeros biológicos como carboidratos, lipídios, proteínas e / ou ácidos nucleicos.

O conhecimento sobre o proteoma intra- e extracelular de *A. niveus* destacou a importância do enriquecimento acerca da resposta aos efeitos químicos do meio extracelular e a alteração da disponibilidade de nutrientes que, a princípio, foram condições responsáveis pela produção de proteínas envolvidas em diversas rotas metabólicas. Além disso, a suplementação com fontes de nitrogênio orgânicas influenciaram no proteoma de *A. niveus* e promoveram a indução de enzimas com potencial para aplicação biotecnológica e industrial. Com destaque para a condição de farinha de pena, propícia para a obtenção de peptidase. Os resultados apresentados nesse trabalho podem auxiliar na elucidação de rotas metabólicas utilizadas por *A. niveus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDI, F.; LIMAM, F.; NEJIB, M. M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: assay as biodetergent. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1202-1208, 2008.

ABRASHEV, R.; DOLASHA, P.; CHRISTOVA, R.; STEFANOVA, L.; ANGELOVA, M. Role of antioxidant enzymes in survival of conidiospores of *Aspergillus niger* 26 under conditions of temperature stress. **Journal Applied Microbiological**, v. 99, p. 902-909, 2005.

ADNAN, M.; ZHENG, W.; ISLAM, W.; ARIF, M.; ABUBAKAR, Y. S. Carbon Catabolite Repression in Filamentous Fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 2-23, 2018.

ADAV, S. S.; CHAO, L. T.; SZE, S.K. Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. **Molecular Cell Proteomics**, v. 11, p. M111.012419, 2012.

ADAV, S. S.; RAVINDRAN, A.; CHAO, L. T.; TAN, L.; SINGH, S.; SZE, S. K. Proteomic Analysis of pH and Strains Dependent Protein Secretion of *Trichoderma reesei*. **Journal of proteome research**, v. 10, p. 4579-4596, 2011.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbianl Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, v. 4, p. 117-139, 2014.

AGUIRRE, J.; RIOS-MOMBERG, M.; HEWITT, D.; HANSBERG, W.; Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. **Trends in Microbiology**, v. 13, p. 111-118, 2005.

AHMED, A.; NASIM, F. U. H.; BATOOL, K.; BIBI, A. Microbial β-glucosidase: soruces, production and applications. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 31-46, 2017.

AHN, H. M.; LEE, K. S.; LEE, D. S.; YU, K. JNK/FOXO mediated Peroxiredoxin V expression regulates redox homeostais during *Drosophila melanogaster* gut infection. **Develompmental & Comparative Immunology**, v. 38, p. 466-473, 2012.

AHUATZI D.; HERRERO P.; DE LA C.T.; MORENO F. The glucose regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. **Journal Biological Chemistry**, v.279, p.14440-14446, 2004.

AKAO, T.; YAMAGUCHI, M.; YAHARA, A.; YOSHIUCHI, K.; FUJITA, H.; YAMADA, O.; AKITA, O.; OHMACHI, T.; ASADA, Y.; YOSHIDA, T. Cloning and expression of 1,2-alpha-mannosidase gene (fmanIB) from filamentous fungus *Aspergillus oryzae*: in

vivo visualization of the FmanIBp-GFP fusion protein. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, p. 471-479, 2006.

ALBRECHT, D.; GUTHKE, R.; BRAKHAGE, A. A.; KNIEMEYER, O. Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. **BMC Genomics**, v. 11, n. 31, p. 1-17, 2010.

ALEKSEEV, K. V.; DUBINA, M. V.; KOMOV, V. P. Molecular Genetic and biochemical characteristics of citrate synthase from the citric-acid producing fungus *Aspergillus niger*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 52, p. 810-817, 2016.

ALLISON, S. D.; VITOUSEK, P. M. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 937– 944, 2005.

AL-TAMMAR, K. A.; OMAR, O.; MURAD, A. M.; ABU BAKAR, F. D. Expression and characterization of a cutinase (AnCUT2) from *Aspergillus niger*. **Open Life Sciences**, v. 11, p. 29-38, 2016.

ANTECKA, A.; BIZUKOJC, M.; LEDAKOWICZ, S. Modern morphological engineering techniques for improving productivity of filamentous fungi in submerged cultures. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 32, p. 193, 2016.

ANBU, P.; GOPINATH, S. C. B.; CHAULAGAIN, B. P.; LAKSHMIPRIYA, T. Microbial Enzymes and their applications in industries and medicine 2016. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-3, 2016.

AMSELEM, J.; CUOMO, C.A; VAN KAN, J.A.L; VIAUD, M.; BENITO5, E.P.; et al. Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **PLoS Genetics**, v.7, p.1-27, 2011.

ANDERSEN, M. R.; NIELSEN, J. Current status of systems biology in Aspergilli. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 180-190, 2009.

ARCHER, D. B.; CONNERTON, I. F.; MACKENZIE, D. A. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. **Advanced Biochemestry Engineering Biotechnology**, v. 111, p. 99–147, 2008.

ARCHER, D.B.; WOOD, D.A. Fungal exoenzymes. In: GOW, N.A.R.; GAAD, G.M. (Ed.) **The growing fungus**. London: Chapman & Hall, 1995. cap. 7, p. 138-162.

ARIÑO, J.; CASAMAYOR, A.; GONZÁLEZ, A. Type 2C protein phosphatases in fungi. **Eucaryotic Cell**, v. 10, p. 21-33, 2011.

ARMENGAUD, J.; CHRISTIE-OLEZA, J. A.; CLAIR, G.; MALARD, V.; DUPORT, C. Exoproteomics: exploring the world around biological systems. **Expert Review of**

Proteomics, v. 9, p. 561-575, 2012.

ARST, JR. H. N.; PEÑALVA, M. A.; pH regulation in *Aspegillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. **Trends in Genetics**, v. 19, p. 224-231, 2003.

ASHOK, A.; KUMAR, D. S. Different methodologies for sustainability of optimization techniques used in submerged an solid state fermentation. **3 Biotech**, v. 7, p. 301, 2017.

ASLAM, B.; BASIT, M.; NISAR, M. A.; KHURSHID, M.; RASOOL, M. H. Proteomics: Technologies and their applications. **Journal of Chromatographic Science**. V. 55, p. 182-196, 2017.

AUBERGER, J.; LASS-FLORL, C.; CLAUSEN, J.; BELLMANN, R.; BUZINA, W.; GASTL, G.; NACHBAUR, D. First case of breakthrough pulmonary *Aspergillus niveus* infection in a patient after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 62, p. 336–339, 2008.

BARBOSA, M. S.; BÁO, S. N.; ANDREOTTI, P. F.; FARIA, F. P.; FELIPE, M. S. S.; FEITOSA, L. S.; GIANNINI-MENDES, M. J. S.; SOARES, C. M. A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracelular matrix protein and interaction with cells. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 382-389, 2006.

BARBOSA, M. S.; PASSOS, D. A. C.; FELIPE, M. S. S.; JESUÍNO, R. S. A.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. A. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologue is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular and phylogenetic analysis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 667-675, 2004.

BARRIUSO, J.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ, M. J. Fungal genomes mining to discover novel sterol esterases and lipases as catalysts. **BCM Genomics**, v. 14, p. 712, 2013.

BARROS-PITA, W.; LEITE, F. C. B.; LIBERAL, A. T. S.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS JR, M. A. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie van Leuuuwenhoek**, v. 100, p. 99-107, 2011.

BARROS-PITA, W.; SILVA, D. C.; SIMÕES, D. A.; PASSOTH, V.; DE MORAIS JR, M. A. Physiology and gene expression profiles of *Dekkera bruxellensis* in response to carbon and nitrogen availability. **Antonie van Leuuuwenhoek**, v. 104, p. 855-868, 2013.

BASAVARAJU, S.; KATHERA, C.; JASTI, P. K. Purification, characterization and application of novel alkaline protease from new *Bacillus cereus* UV-15 mutant. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 7, p. 1-12, 2017.

BELDMAN, G.; SEARLE-VAN LEEUWEN, M. J. F.; DE RUITER, G. A.; SILIHA, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Degradation of arabinans by arabinanases from *Aspergillus aculeatus* and *Aspergillus niger*. **Carboydrate Polymers**, v. 20, p. 159-168, 1993.

BENSEN, E. S.; MARTIN, S. J.; LI, M.; BERMAN, J.; DAVIS, D. A. Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. **Molecular Microbiology**, v. 54, p. 1335-1351, 2004.

BENOCCI, T.; AGUILAR-PONTES, M. V.; ZHOU, M.; BERNHARD, S.; VRIES, R. P. Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, p. 1-25, 2017.

BETINI, J. H.; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; JORGE, J. A.; TERENZI, H. F.; POLIZELI, M. L. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ocharaceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 32, p. 819-824, 2009.

BHADAURIA, V.; ZHAO, W. S.; WANG, L. X.; ZHANG, Y.; LIU, J. H.; KONG, L.A.; PENG, Y. L. Advances in fungal proteomics. **Microbiological Research**, v. 162, p. 193-200, 2007.

BI, F.; BARAD, S.; MENT, D.; LURIA, N.; DUBEY, A.; CASADO, V.; GLAM, N.; MÍNGUEZ, J. D.; ESPESO, E. A.; FLUHR, R.; PRUSKY, D.; Carbon regulation of environmental pH by secreted small molecular that modulate pathogenicity in phytopathogenic fungi. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, p. 1178-1195, 2016.

BIANCO, L.; PERROTA, G. Methodologies and Perspectives of Proteomics Applied to Filamentous Fungi: from Sample Preparation to Secretome Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 5803-5829, 2015.

BIELY, P. Microbial xylanolytic system. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p. 286-290, 1985.

BIELY, P.; CZISZÁROVÁ, M.; AGGER, J. W.; LI, X. L.; PUCHART, V.; VRSANSKÁ, M.; EIJSINK, V. G.; WESTERENG, B. *Trichoderma reesei* CE16 acetyl esterase and its role in enzymatic degradation of acetylated hemicellulose. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1840, 516-525, 2014.

BIGNELL, E.; NEGRETE-URTASUN, S.; CALCAGNO, A. M.; HAYNES, K.; ARTS, H.; ROGERS, T. The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. **Molecular Microbiology**, v. 55, p. 1072-1084, 2005.

BLINKOVSKY, A. M.; BYUN, T.; BROWN, K. M.; GOLIGHTLY. E. J. Purification, Characterization, and Heterologous Expression in *Fusarium venenatum* of a Novel

Serine Carboxypeptidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3298-3303, 1999.

BORIN, G. P.; SANCHEZ, C. C.; DE SOUZA, A. P.; DE SANTANA, E. S.; PAES LEME, A. F.; SQUINA, F. M.; BUCKERIDGE, M.; GOLDMAN, G. H.; OLIVEIRA, J. V. Comparative Secretome Analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during Growth on Sugarcane Biomass. **PLoS One**, v. 8, p. 1-20, 2015.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 73-81, 2002.

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANCOLI, P.; FERREIRA, J. A.; BOLTON, K.; TAHERZADEH, M. J. Changes in carbon footprint when integrating production of filamentous fungi in 1st generation ethanol plants. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 1069-1073, 2018.

BRANDI, J.; ANDERSEN, M. R. Current state of genome-scale modeling in filamentous fungi. **Biotechnology Letters**, v. 37, p. 1131-1139, 2015.

BRAUC, S.; DE VOOGHT, E.; CLAEYS, M.; HOFTE, M.; ANGENON, G. Influence of over-expression of cytosolic aspartate aminotransferase on amino acid metabolism and defence responses against *Botrytis cinerea* infection in *Arabidopsis thaliana.* **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 1813-1819, 2011.

BROACH, J. R. Nutritional control of growth and development in yeast. **Genetics**, v. 192, n. 1, p. 73–105, 2012.

BUCKER, F. **Biodeterioração de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com biocidas**. Porto Alegre: UFRGS, 2009, 147p. (Dissertação de Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

BUGEJA, H. E.; HYNES, M. J.; ANDRIANOPOULOS, A. AreA controls nitrogen source utilisation during both growth programs of the dimorphic fungus *Penicillium marneffei*. **Fungal Biology**, c. 116, p. 145-154, 2012.

BURNIE, J. P.; CARTER, T. L.; HODGETTS, S. J.; MATTHEWS, R. C. Fungal heat-shock proteins in human disease. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 53-88, 2006.

BUSSINK, H. J.; BIGNELL, E. M.; MÚNERA-HUERTAS, T.; LUCENA-AGELL, D.; SCAZZOCCHIO, C.; RUDNICKA, J.; NEGRETE-URTASUN, S.; PEÑAS-PARILLA, M.

M.; RAINBOW, L.; PEÑALVA, M. A.; JR, H. N. A.; TILBURN, J. Refining the pH response in *Aspegillus nidulans*: a modulatory triad involving PacX, a novel zinc binuclear cluster protein. **Molecular Microbiology**, v. 98, p. 1051-1072, 2015.

BUZINA, W.; RAGGAM, R. B.; PAULITSCH, A.; HEILING, B. Characterization and temperature-dependent quantification of heat shock protein 60 of the immunogenic fungus *Alternaria alternata*. **Medical Mycology**, v. 46, p. 627-630, 2008.

CADDICK, M. X.; BROWNLEE, A. G.; ARST, H. N. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 203, p. 346-353, 1986.

CAMBRI, G.; DE SOUSA, M. M.; FONSECA, D. M.; MARCHINI, F.; SILVEIRA, J. L.; PABA, J. Analysis of the Biotechnological potential of a *Lentinus crinitus* isolate in the light of its secretome. **Journal Proteome Research**, v. 15, p. 4557-4568, 2016.

CARACUEL, Z.; RONCERO, M.I.G; ESPESO, E.A.; GONZÁLEZ-VERDEJO, C.I.; GARCÍA-MACEIRA, F.I.; DI PIETRO, A. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. **Molecular Microbiology**, v. 48, p.765–779, 2003.

CARLSON, M. Glucose represion in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 202-207, 1999.

CASTELLANI A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.

CHAKRABARTY, A. M. Nucleoside diphosphate kinase: role in bacterial growth, virulence, cell signalling and polysaccharide synthesis. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 875-882, 1998.

CHAMBERGO, F.S.; VALENCIA, E.Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied Microbiological Biotechnology.**, v. 100, p. 2567-2577, 2016.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends in cell biology**, v. 11, n. 11, p. S37–43, nov. 2001.

CHATTERJEE, S. Production and estimation of alkaline protease by immobilized *Bacillus licheniformis* isolated from poultry farm soil of 24 Parganas and its reusability. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 6, p. 2-6, 2015.

CHAUHAN, A. S.; KUMAR, A.; SIDDIQI, N. J.; SHARMA, B. Extracellular α-Galactosidase from *Trichoderma* sp. (WF-3): Optimization of Enzyme Production and Biochemical Characterization. **Biotechnology Research International**, v. 2015, p. 1-6, 2015.

CHEN, S.; HARMON, A. C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, p. 5504-5516, 2006.

CHEN, S.; SU, L.; CHEN, J.; WU, J. Cutinase: characteristics, preparation and application. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1754-1767, 2013.

CHEN, Z.; LIU, Y.; YAN, Q.; YANG, S.; JIANG, Z. Biochemical characterization of a novel endo-1,5-alfa-L-arabinanase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 1226-1233, 2015.

CHOW, L. P.; LIU, S. L. L.; LIAO, H. K.; TSAI, J. J.; TANG, T. K. Identification and expression of an allergen Asp f 13 from *Aspergillus fumigatus* and epitope mapping using human IgE antibodies and rabbit polyclonal antibodies. **Biochemical Journal**, v. 346, -. 423-431, 2000.

CHRISTOPHER, L. P.; YAO, B.; YUN, J. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. **Frontiers in Energy Research**, v. 2. p. 1-13, 2014.

CHRUNGU, D.; SHARMA, S. C.; MAHMOOD, A. Biochemical study of trehalase activity in Aspergillus niger conidia. **World Scientific News**, v. 86, p. 349-356, 2017.

CHU, J.; WEI-FANG, LI.; CHENG, W.; LU, M.; ZHOU, K. H.; ZHU, H. Q.; LI, F. G.; ZHOU, C. Z. Comparative analyses of secreted proteins from the phytopathogenic fungus *Verticillium dahliae* in response to nitrogen starvation. **Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics**, v. 1854, p. 437-448, 2015.

CLEVES, A. Protein transport: the nonclassical ins and outs. **Current Biology**, p. 318-320, 1997.

COLOGNA, N. M. D.; GÓMEZ-MENDOZA, D. P.; ZANOELO, F. F.; GIANNESI, G. C.; GUIMARÃES, N. C. A.; MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F.; RICART, C. A. O. Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus* secretomes: proteomics approaches for the indentification of enzymes of biotechnological interest. **Enzyme Microbial Technology**, v. 109, p. 1-10, 2018.

CONG, B.; WANG, N.; LIU, S.; LIU, F.; YIN, X.; SHEN, J. Isolation, characterization and transcriptome analysis of a novel Antartic Aspergillus sydowii strain MS-19 as a potential lignocellulosic enzyme source. **BMC Microbiology**, v. 12, P. 1-14, 2017.

CONTERNO, L.; JOSEPH, C.; ARVIK, T. J.; HENICK-KLING, T.; BISSON, L. F. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **American journal of enology and viticulture**, v. 57, n. 2, p. 139, 2006.

COSTA, L. M. A. S. **Caracterização de isolados de *Aspergillus niger* quanto à produção de ácido cítrico e à expressão de genes da citrato sintase**. 2011. 92. f.

Tese (Doutorado) Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CROWE, J. D.; SIVWRIGHT, I. K.; AULD, G. C.; MOORE, N. R.; GROW, N. A.; BOOTHE, N. A. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Molecular Microbiology*, v. 6, p. 1637-1651, 2003.

CUNHA, F. M. **Estratégias de melhoria do bioprocesso de produção de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger* a partir de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2015. 120 F. TESE (Doutorado em Engenharia Química) - Área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

DAOU, M.; FAULDS, C.B. Glyoxal oxidases: their nature and properties. **World Jounal Microbiological Biotechnological**, v. 33, p. 87, 2017.

DAR, H. H.; PRASAD, D.; VARSHNEY, G. C.; CHAKRABORTI, P. K. Secretory nucleoside diphosphate kinase from both intra- and extracellular pathogenic bacteria are functionally indistinguishable. **Microbiology**, v. 157, p. 3024-3035, 2011.

DASGUPTA, D.; GHOSH, D.; BANDHU, S.; AGRAWAL, D.; SUMAN, S. K.; ADHIKARI, D. K. Purification, characterization and molecular docking study of NADPH dependent xylose reductase from thermotolerant *Kluyveromyces* sp. IIPE453. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 124-133, 2016.

DA SILVA, R. R. Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: production, catalysis and potential applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, p. 1-19, 2017.

DAVIS, D. Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. **Current Genetics**, v. 44, p. 1-7, 2003.

DEITEREN, K.; SURPATEANU, G.; GILANY, K.; WILLEMSE, J.; HENDRIKS, D. F.; AUGUSTYNS, K.; LAROCHE, Y.; SCHARPE, S.; LAMBEIR, A. M. The role of the S1 binding site of carboxypeptidase M in substrate specificity and turn-over. **Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1774, p. 267-277, 2007.

DELGADO, M. L.; O' CONNOR, J. E.; AZORIN, I.; RENAU-PIQUERAS, J.; GIL, M. L.; GOZALBO, D. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins. **Microbiology**, v. 147, p. 411–417, 2001.

DEMARTINO, G. N.; SLAUGHTER, C. A. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 32, p. 22123-22126, 1999.

DE VRIES, R. P. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide degrading enzymes; relevance for industrial production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 61, p. 10-20, 2003.

DE VREIS, R. P.; VAN DEN BROECK, H. C.; DEKKERS, E.; MANZERES, P.; GRAAFF, L. H.; VISSER, J. Differential expression of three alpha- galactosidase genes and a single beta-galactosidase gene from *Aspergillus niger*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2453-2460, 1999.

DHAR, A.; SAMIOTAKIS, A.; EBBINGHAUS, S.; NIENHAUS, L.; HOMOUZ, D.; GRUEBELE, M.; CHEUNG, M. S. Structure, function, and folding of phosphoglycerate kinase are strongly perturbed by macromolecular crowding. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.107, n. 41, p. 17586-17591, 2010.

DOEHLEMANN, G.; MOLITOR, F.; HAHN, M. Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. **Fungal Genetics and Biology,** v. 42, p. 601-610, 2005.

DONOFRIO, N. M.; OH, Y.; LUNDY, R.; PAN, H.; BROWN, D. E.; JEONG, J. S.; COUGHALAN, S.; MITCHELL, T. K.; DEAN, R. A. Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Fungal genetics and Biology**, v. 43, p. 605-617, 2006.

DUO-CHUAN, LI. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**, v. 161, p. 345-360, 2006.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.113-125, 2003.

EKANAYAKE, D. K.; ANDI, B.; BOBYK, K. D.; WEST, A. H.; COOK, P. F. Glutamates 78 and 122 in the Active Site of Saccharopine Dehydrogenase Contribute to Reactant Binding and Modulate the Basicity of the Acid-Base Catalysts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 20756-20768, 2010.

ELLAIAH, P.; SRINIVASULU, B.; ADINARAYANA, K. A review on microbial alkaline proteases. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 61, p. 690-704, 2002.

EL-ENSHASY, H. A. **Filamentous fungal cultures – process characteristics, products and applications**. Bioprocessing for value-added products from renewable ressources new technologies and applications, Chapter 9. Amsterdam: Elsevier, 2007, p. 225-261.

ELEUTHERIO, E.; PANEK, A.; DE MESQUITA, J. F.; TREVISOL, E.; MAGALHÃES, R. Revisiting yeast trehalose metabolism. **Current Genetics**, v. 61, p. 263-274, 2015.

EMRI, T.; POCSI, A.; SZENTIRMAI, A. Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum***. Free Radical Biology & Medicine,** v. 23, p. 809-814, 1997.

EMRI, T.; SZILÁGYI, M.; LÁSZLO, K.; M-HAMVAS, M.; PÓCSI, I. PepJ is a new extracellular proteinase of *Aspergillus nidulans*. **Folia Microbiological**, v. 54, p. 105-109, 2009.

ENGEL, P. C.; MASSEY, V. Green butyryl-coenzyme A dehydrogenase. An enzyme acyl coenzyme A complex. **Biochemical Journal**, v. 125, p. 889-902, 1971.

ERJAVEC, J.; KOS, J.; RAVNIKAR, M.; DREO, T.; SABOTIC, J. Protein of higher fungi-from Forest to application. **Trends in Biotechnology**, v. 30, p. 259-273, 2012.

EVANS, C. S.; DUTTON, M. V.; GUILLÉN, F.; VENESS, R. G. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 235-239, 1994.

FASOYIN, O. E.; WANG, B.; QIU, M.; HAN, X.; CHUNG, K. R.; WANG, S. Carbon catabolite repression gene creA regulates morphology, aflatoxin biosynthesis and virulence in *Aspergillus flavus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 115, p. 41-51, 2018.

FATEH, R.; ZAINI, F.; KORDBACHEH, P.; FALAHATI, M.; REZAIE, S.; GHAZVINI, R. D.; BORHANI, N.; SAFARA, M.; FATTAHI, A.; KANANI, A.; FARAHYAR, S.; BOLHASSANI, M.; HEIDARI, M. Identification and Sequencing of *Candida krusei* Aconitate Hydratase Gene Using Rapid Amplification of cDNA Ends Method and Phylogenetic Analysis. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 11, e25218, 1-11, 2015.

FENG, X.; LIU, X.; LUO, Q.; LIU, B. F. Mass spectrometry in systems biology: an overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 27, p. 635-660, 2008.

FERNÁNDEZ-ACERO, F. J.; JORGE, I.; CALVO, E.; VALLEJO, I.; CARBÚ, M.; CAMAFEITA, E.; GARRIDO, C.; LÓPEZ, J. A.; CANTORAL, J. M.; JORRIN, J. Two-dimensional electrophoresis protein profiles of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Proteomics,** v. 6, p. S88-S96, 2006.

FERNÁNDEZ-ACERO, F. J.; JORGE, I.; CALVO, E.; VALLEJO, I.; CARBÚ, M.; CAMAFEITA, E.; GARRIDO, C.; LÓPEZ, J. A.; JORRIN, J.; CANTORAL, J. M. Proteomic analysis of phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* as a potential tool for identifying pathogenicity factors, therapeutic targets and for basic research. **Archives of Microbiology**, v. 187, p. 207-215, 2007.

FERNÁNDEZ-CAÑON, J. M.; GRANADINO, B.; BELTRÁN-VALERO DE BERNABÉ, D.; RENEDO, M.; FERNÁNDEZ-RUIZ, E.; PEÑALVA, M. A.; RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, S. The molecular basis of alkaptonuria. **Nature genetics**, v. 14, p. 19-24, 1996.

FERREIRA, J. A.; MAHBOUBI, A.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 334-345, 2016.

FERREIRA, A. S.; TÓTOLA, M. R.; KASUYA, M. C. M.; ARAÚJO, E. F.; BORGES, A. C. Small heat shock proteins in the development of thermotolerance in *Pisolithus* sp. **Journal of Thermal Biology**, v. 30, p. 595-602, 2005.

FILHO, P. F. S.; NAIR, R. B.; ANDERSSON, D.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Vegan-mycoprotein concentrate from pea-processing industry byproduct using edicle filamentous fungi. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 5, p. 1-10, 2018.

FLECK, C. B.; BROCK, M. *Aspergillus fumigatus* Catalytic Glucokinase and Hexokinase: Expression Analysis and Importance for Germination, Growth and Conidiation**. Eukaryot Cell**, v. 9, p. 1120-1135, 2010.

FLORENCIO, C.; CUNHA, F. M.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S.; XIMENES, E.; LADISCH, M. R. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 80, p. 53-60, 2016 a.

FLORENCIO, C.; CUNHA, F. M.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S.; XIMENES, E.; LADISCH, M. R. Secretome data from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated in submerged and sequential fermentation methods. **Data in Brief**, v. 8, p. 588-598, 2016.

FREESE, S.; VOGTS, T.; SPEER, F.; SCHÄFER, B.; PASSOTH, V.; KLINNER, U. C- and N-catabolic utilization of tricarboxylic acid cycle-related amino acids by *Scheffersomyces stipitis* and other yeasts. **Yeast**, v.28, p.375–390, 2011.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutase. **Annual Review Biochemistry**, v. 64, p. 97-112, 1995.

FUNK, J.; SCHAARSCHMIDT, B.; SLESIONA, S.; HALLSTROM, T.; HORN, U.; BROCK, M. The glycolytic enzyme enolase represents a plasminogen-binding protein on the surface of a wide variety of medically important fungal species. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, p. 59-68, 2016.

FUSHIMI, N.; EE, C. E.; NAKAJIMA, T.; ICHISHIMA, E. Aspzincin, a Family of Metalloendopeptidases with a New Zinc-binding Motif identification of new zinc-binding sites (His^{128}, His^{132}, and Asp^{164}) and three catalytically crucial residues RESIDUES (Glu^{129}, Asp^{143}, and Tyr^{106}) of deuterolysin from Aspergillus oryzae by site-directed mutagenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 24195-24201, 1999.

GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KAPANTAI, M.; KALANTZI, O. Growth conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM-3482 for polygalacturonase production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 47, p. 425-439, 1997.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 334-361, 1998.

GARRE, E.; PEREZ-TORRADO, R.; GIMENO-ALCANIZ, J. V.; MATALLANA, E. Acid trehalase is involved in intracellular trehalose mobilization during postdiauxic growth and severe saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 52–62, 2009.

GARZON, N. G. R; LAURE, H. J.; SOUZA-MOTTA, C. M.; ROSA, J. C.; CABRAL, H. Medium pH in submerged cultivation modulates differences in the intracellular protein profile of *Fusarium oxysporum*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, p. 664-672, 2017.

GERVAIS, P. A.; MARECHAL-MOLIN, P. Water relation to solid state fermentation. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 55, p. 343-357, 1996.

GESSLER, N. N.; AVER'YANOV, A. A.; BELOZERSKAYA, T. A. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. **Biochemistry**, v. 72, p. 1091-1109, 2007.

GÓMEZ-MENDOZA, Diana Paola. **Proteômica aplicada à caracterização do secretoma de *Trichoderma harzianum***. 2013. 117 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular), Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

GÓMEZ-MENDOZA, D. P.; JUNQUEIRA, M.; VALE, L. H. F.; DOMONT, G. B.; FILLHO, E. X. F.; SOUSA, M. V. RICART, C. A. O. Secretomic survey of *Trichoderma harzianum* grown on plant biomass substrates, **Journal of Proteome Research**, v. 13, p. 1810-1822, 2014.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; ALORIA, K.; VALERO-GALVÁN, J.; REDONDO, I.; ARIZMEDNDI, J. M.; JORRÍN-NOVO, J. V. Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains. **Journal of Proteomics**, v. 31, p. 195-221, 2014.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; JORRÍN-NOVO, J. V. **Proteomic protocols for the study of filamentous fungi.** V.K. Gupta, M.G. Tuohy, M. Ayyachamy, K.M. Turner, A. O'Donovan (Eds.), Laboratory protocols in fungal biology: current methods in fungal biology, Springer, New York, Heidelberg, Dordrecht, London, p. 299–308, 2013.

GOODAY, G. W. Aggressive and defensive roles for chitinase. **EXS**, v. 87, p. 157-169, 1998.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A novel strategy for classifying the output from an in silico vaccine discovery pipeline for eukaryotic pathogens using machine learning algorithms. **BMC Bioinformatics**, v. 14, p. 315, 2013.

GOW, N. A. R.; BROWN, A. J. P.; ODDS, F. C. Fungal morphogenesis and host invasion. **Current Opinion Microbiological**, v. 5, p. 366-371, 2002.

GRIVENNIKOVA, V. G.; VINOGRADOV, A. D. Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species. **Biochemistry**, v. 78, p. 1490-1511, 2013.

GUIMARÃES, L. H.; SOMERA, A. F.; TERENZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A. Production of B-fructofuranosidades by *Aspergillus niveus* using agroindustrial residues an carbon sources: characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. **Process Biochemistry**, v. 4, p. 237-241, 2009.

GUO, C, J.; WANG, C. C. C. Recent advances in genome mining of secondary metabolites in *Aspergillus terreus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 717, 2014.

GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 15-32, 2002.

HAMID, M.; REHMAN, K. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1177-1186, 2009.

HAN, M. J.; KIM, N. J.; LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Extracellular proteome of *Aspegillus terreus* grown on different carbono sources. **Current Genetics**, v. 56, p. 369-382, 2010.

HAN, S.; AUGER, C.; APPANNA, V. P.; LEMIRE, J.; CASTONGUAY, Z.; AKBAROV, E.; APPANNA, V. D. A blue native polyacrylamide gel eletrophoretic technology top robe the functional proteomics mediating nitrogen homeostasis in *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Microbiology Methods**, v. 90, p. 206-210, 2012.

HANSCHMANN, E. M.; GODOY, J. R.; BERNDT, C.; HUDEMANN, C.; LILLIG, C. H. Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins—Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, p. 1539-1605, 2013.

HANSEN, G. H.; LUBECK, M.; FRISVAD, J. C.; LUBECK, P. S.; ANDERSEN, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation, v. 50, p. 1327-1341, 2015.

HASUNUMA, K.; YABE, N.; YOSHIDA, Y.; OGURA, Y.; HAMADA, T. Putative functions of nucleoside diphosphate kinase in plants and fungi. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 35, p. 57-65, 2003.

HE, X. J.; LI, X. L.; LI, Y, Z. Disruption of *Cerevisin* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation affects microsclerotia formation and virulence of *Verticillium dahliae*. **Plant Pathology**, v. 64, p. 1157-1167, 2015.

HE, W.; WANG, Y.; LIU, W.; ZHOU, C. Z. Crystal structure of Saccharomyces cerevisiae 6-phosphogluconate dehydrogenase Gnd1. **BMC Structural Biology**, v. 7, p. 1-9, 2007.

HEATH, I, B. Integration and regulation of hyphal tip growth. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 131-139, 1995.

HECHT, K.; O`DONNELL, A. F.; BRODSKY, J. L. The proteolytic landscape of the yeast vacuole. **Cellular Logistics**, v. 4, p. 1-11, 2014.

HSU, K. H.; WANG, S. Y.; CHU, F. H.; SHAW, J. F. Characterization and heterologous expression of a novel lysophospholipase gene from *Antrodia cinnamomea*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 1712-1722, 2010.

HOELSCH, K.; SUHRER, I.; HEUSEL, M.; WEUSTER-BOTZ, D. Engineering of formate dehydrogenase: synergistic effect of mutations affecting cofactor specificity and chemical stability. **Applied Microbiology and Biotecnology**, v. 97, p. 2473-2481, 2013.

HONG, M. R.; PARK, C. S.; OH, D. K. Characterizatin of a thermostable endo-1,5-alfa-L-arabinanase from *Caldicellulorsiruptor saccharolyticus*. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1439-1443, 2009.

HOUTERMAN, P. M.; SPEIJER, D.; DEKKER, H. L.; DE KOSTER, C. G.; CORNELISSEN, B. J. C.; The mixed xylem Sap proteome of *Fusarium oxysporum* infected tomato plantas. **Molecular Plant and Pathology**, v. 8, p. 215-221, 2007.

HUANG, Y. M.; HUBER, G. A.; WANG, N.; MINTEER, S. D.; MCCAMMON, J. A. Brownian dynamic study of an enzyme metabolon in the TCA cycle: substrate kinetics and channeling. **Protein Science**, p. 1-35, 2017.

HYNES, M.J.; MURRAY, S.L. ATP-Citrate Lyase Is Required for Production of Cytosolic Acetyl Coenzyme A and Development in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryot Cell.**, v. 9, p. 1039–1048, 2010.

IBRAHIM-GRANET, O.; D´ENFERT, C. The *Aspergillus fumigatus* mepB gene encondes an 82 kDa intracellular metalloproteinase structurally related to mammalian thimet oligopeptidases. **Microbiology**, v. 143, p. 2247-2253, 1997.

ICHISHIMA, E. nique catalytic and molecular properties of hydrolases from *Aspergillus* used in Japanese bioindustries. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 675-688, 2000.

ISHIHAMA, Y.; ODA, Y.; TABATA, T.; SATO, T.; NAGASU, T.; RAPPSILBER, J.; MANN, M. Exponentially Modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. **Molecular & cellular Proteomics**, v. 4, p. 1265-1272, 2005.

IWATA, H.; KOBAYASHI, Y.; MIZUSHIMA, D.; WATANABE, T.; OGIHARA, J.; KASUMI, T. Complementary functions of two transketolase isoforms from *Moniliella megachiliensis* in relation to stress response. **AMB Express**, v. 7, p. 1-10, 2017.

JAHROMI, M. F.; LIANG, J. B.; HO, Y. W.; MOHANMAD, R.; GOH, Y. M. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* using agro-biomass as substrate in solid stare fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

JALVING, R.; BRON, P.; KESTER, H. C. M.; VISSER, J.; SCHAAP, P. J. Cloning of a prolidase gene from *Aspergillus nidulans* and characterization of its product. **Molecular Genetics Genomics**, v. 267, p. 218-222, 2002.

JEFFERY, C. J.; BARRY, T.; DOONAN, S.; PETSKO, G.; RINGE, D. Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* cytosolic aspartate aminotransferase. **Protein Science**, v. 7, p. 1380-1387, 1998.

JIN, B.; VAN LEEUWEN, J. H.; PATEL, B. Mycelial morphology and fungal protein production from starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 335-340, 1999.

JISHA, V. N.; SMITHA, R. B.; PRADEEP, S.; SREEDEVI, S.; UNNI, K. N.; SAJITH, S.; PRIJI, P.; JOSH, M. S.; BENJAMIN, S. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 1, n. 3, p. 39-51, 2013.

JUHNKE, H.; KREMS, B; KOTTER, P.; ENTIAN, K. D. Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose-phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress**. Molecular Genetics and Genomics**, v. 252, p. 456-464, 1996.

JUNGBLUT, P. R.; HOLZHUTTER, H. G.; APWEILER, R.; SCHLUTER, H. The speciation of the proteome. **Chemistry Central Journal**, v. 2, p. 1-10, 2008.

KANG, T. S.; KORBER, D. R.; TANAKA, T. Regulation fo dual glycolytic pathways for fructose metabolism in heterofermentative *Lactobacillus panis* PM1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 7818-7826, 2013.

KANIAK, A.; XUE, Z.; MACOOL, D.; KIM, J. H.; JOHNSTON, M. Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, p. 221-231, 2004.

KARNAOURI, A.; TOPAKAS, E.; ANTONOPOULOU, I.; CHRISTAKOPOULOS, P. Genomics insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophile*. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-22, 2014.

KARPLUS, P. A. A primer on peroxiredoxin biochemistry. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 183-190, 2015.

KARTHIK, N.; AKANKSHA, K.; PANDEY, A. Production, purification and properties of fungal chitinases a review. **Indian Journal Exp. Biol**, v. 52, p. 1025-1035, 2014.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KATROLIA, P.; RAJASHEKHARA, E.; YAN, Q.; JIANG, Z. Biotechnological potential of microbial α-galactosidases. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, p. 307-317, 2014.

KATO, M.; KUZUHARA, Y.; MAEDA, H.; SHIRAGA, S.; UEDA, M. Analysis of a processing system for proteases using yeast cell surface engineering: conversion of precursor of proteinase A to active proteinase A. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 72, p. 1229-1237, 2006.

KAUFMANN, S. H. Heat shock protein and the immune response. **Immunology Today**, v. 11, p. 129-136, 1990.

KAYIKCI, O.; NIELSEN, J. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 15, p. 1-8, 2015.

KHAN, T. K.; NELSON, T. J. Protein kinase C activator bryostatin-1 modulates proteasome function. **Journal of Cell Biochemistry**, p. 1-10, 2018. doi: 10.1002/jcb.26887

KHANTHAWONG, S.; VANITTANAKOM, N. Production of *Talamomyces* (*Penicillium*) *marneffei* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase recombinante protein expressed by *Pichia pastoris*. **Chiang Mai Journal Science**, v. 43, p. 469-475, 2016.

KIM, Y.; NANDAKUMAR, M.; MARTEN, M. Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, p. 886-895, 2007.

KIM, J. J.; MIURA, R. Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases. Structural basis for mechanistic similarities and differences. **Europen Journal Biochemistry**, v. 271, p. 483-493, 2004.

KIM, M. H.; PARK, S.; KIM, Y, H.; WON, K.; LEE, S. H. Immobilization of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* through cross-linked enzyme aggregates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 209-214, 2013.

KIRCHBERG, J.; BÜTTNER, D.; THIEMER, B.; SAWERS, R. G. Aconitase B is Required for Optimal Growth of *Xanthomonas campestris* pv. Vesicatoria in Pepper Plants. **PloS One**, v. 7, p. e34941, 2012.

KNIEMEYER, O. Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. **Proteomics**, v. 11, p. 3232–

3243, 2011.

KNIEMEYER, O.; LESSING, F.; SCHEIBNER, O.; HERTWECK, C.; BRAKHAGE, A. Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus.* **Current Genetics**, v. 49, p. 178-189, 2006.

KOHÁRYOVÁ, M.; KOLÁROVÁ, M. Oxidative stress and thioredoxin system. **General Physiology and Biophysics**, v. 27, p. 71-84, 2008.

KOHLER, G. A.; BRENOT, A.; HAAS-STAPLETON, E.; AGABIAN, N.; DEVA, R.; NIGAM, S. Phospholipase A2 and phospholipase B activities in fungi. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, p. 1391–1399, 2006.

KOLALLUKUDY, P. E.; SIRAKOVA, T. D. Oryzin. In: RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G. S. **Handbook of proteolytic enzymes**. London UK, Elsevier, 2013. 3765 p.

KOLLI, B. K.; KOSTAL, J.; ZABORINA, O.; CHAKRABARTY, A. M.; CHANG, K. P. *Leishmania*-released nucleoside diphosphate kinase prevents ATP-mediated cytolysis of macrophages. **Molecular Biochemistry and Parasitology**, v. 158, p. 163–175, 2008.

KOLKMAN, A.; SLIPER, M.; HECK, A. J. Development and application of proteomics technologies in *Saccharomyces cerevisiae*. **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 598-604, 2005.

KOMEDA, H.; YAMASAKI-YASHIKI, S.; HOSHINO, K.; ASANO, Y. Identification and characterization of d-xylose reductase involved in pentose catabolism of the zygomycetous fungus *Rhizomucor pusillus.* Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 119, p. 57-64, 2015.

KONDO, T.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, N.; KITAMOTO, N.; Purification and characterization of formate oxidase from a formaldehyde-resistant fungus. **FEMS Microbiology Letters**, v. 214, p. 137-142, 2002.

KOSSEN, N. W. F. The morphology of filamentous fungi. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 70, p. 1-33, 2000.

KOHÁRYOVÁ, M.; KOLÁROVÁ, M. Oxidative stress and thioredoxin system. **General Physiology and Biophysics**, v. 27, p. 71-84, 2008.

KRAHULEC, S.; ARMAO, G. C.; WEBER, H.; KLIMACEK, M.; NIDETZKY, B. Characterization of recombinant *Aspergillus fumigatus* mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase and its application for the stereoselective synthesis of *protio* and *deuterio* forms of d-mannitol 1-phosphate. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 1414-1423, 2008.

KREINER, M.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Oxidative stress response in submerged cultures of a recombinant *Aspergillus niger* (B1-D). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 70, p. 662-229, 2000.

KROLL, K.; PÄHTZ, V.; KNIEMEYER, O. Elucidating the fungal stress response by proteomic. **Journal of Proteomics**, v. 97, p. 151-163, 2014.

KUMAR, J. K.; TABOR, S.; RICHARDSON, C. C. Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in *Escherichia coli*. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 3759-3764, 2004.

KUMARESAN, V.; GNANAM, A. J.; PASUPULETI, M.; ARASU, M. V.; AL-DHABI, N. A.; HARIKRISHNAN, R.; AROCKIARAJ, J. Comparative analysis of CsCu/Zn SOD defense role by molecular characterization: gene expression enzyme activity-protein level. **Gene**, v. 564, p. 53-62, 2015.

KUNZE, M.; PRACHAROENWATTANA, I.; SMITH, S.; HARTING, A. A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research**, v. 1763, p. 1441-1452, 2006.

LACHKE, S. A.; JOLY, S.; DANIELS, K.; SOLL, D. R. Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. **Microbiology**, v. 148, p. 2661-2674, 2002.

LAMBOU, K.; LAMARRE, C.; BEAU, R.; DUFOUR, N.; LATGE, J. P. Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. **Molecular microbiology**, v. 75, p. 910-923, 2010.

LANGNER, T.; GÖHRE, V. Fungal chitinase: function, regulation and potential roles in plant/pathogen interactions, **Current Genetics**, v. 62, p. 243-254, 2016.

LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 310-350, 1999.

LE BLANC, J. G.; GARRO, M. S.; SAVOY DE GIORI, G. Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal, α-galactosidase activity and fermentation products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 119-123, 2004.

LEDGERWOOD, E. C.; MARSHALL, J. W. A.; WEIJMAN, J. F. The role of peroxiredoxin 1 in redox sensing and transducing. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 617, p. 60-67, 2017.

LEE, B. R.; FURUKAWA, M.; YAMASHITA, K.; KANASUGI, Y.; KAWABATA, C.; KENICHI, H.; ANDO, K.; ICHISHIMA, E. Aorsin, a novel serine proteinase with trypsin-like specificity at acid pH. **Biochemistry Journal**, v. 371, p. 541-548, 2003.

LEE, B.; YOSHIDA, Y.; HASUNUMA, K. Photomorphogenetic characteristics are severely affected in nucleoside diphosphate kinase-1 (*ndk-1*)-disrupted mutants in *Neurospora crassa,* ***Molecular Genetics and Genomics****, v. 275, p. 9-17, 2006.*

LEE, B.; YOSHIDA, Y.; HASUNUMA, K. Nucleoside diphosphate kinase-1 regulates hyphal development via the transcriptional regulation of catalase in *Neurospora crassa*. **FEBS Letters**, v. 583, p. 3291-3295, 2009.

LEGER, R. J. S.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Characterization of a Novel Carboxypeptidase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 314, n. 2, p. 392-398, 1994.

LEITE, C. L.; GROPOSO, C.; DRESCHLER-SANTOS, E. R.; FIGUEIREDO, N. F.; GODINHO, P. S.; ABRAÃO, R. L. A particularidade de ser um fungo – Constituintes celulares. **Biotemas**, v. 19, p. 17-27, 2006.

LEÓN-RAMÍREZ, C. G.; VALDÉS-SANTIAGO, L.; CAMPOS-GÓNGORA, E.; ORTIZ-CASTELLANOS, L.; ARÉCHIAGA-CARVAJAL, E. T.; RUIZ-HERRERA, J. A molecular probe for *Basidiomycota*: the spermidine synthase-saccharopine dehydrogenase chimeric gene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 312, p. 77-83, 2010.

LI, B.; LAI, T.; QIN, G.; TIAN, S. Ambient pH Stress Inhibits Spore Germination of *Penicillium expansum* by Impairing Protein Synthesis and Folding: a Proteomic-Based Study. **Journal of proteome research**, v. 9, p. 298-307, 2010.

LI, B.; WANG, W.; ZONG, Y.; QIN, G.; TIAN, S. Exploring pathogenic mechanisms of *Botrytis cinerea* secretome under different ambient pH based on comparative proteomic analysis. **Journal of proteome research**, v. 11, p. 4249-4260, 2012.

LI, E.; LING, J.; WANG, G.; XIAO, J.; YANG, Y.; MAO, Z.; WANG, X.; XIE, B. Comparative Proteomics Analyses of Two Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* that Differ in Pathogenicity. **Scientific Reports**, v.5, p.1-21, 2015.

LI, Q.; ABRASHEV, R.; HARVEY, L. M.; McNEIL, B. Oxidative stress-associated impairment of glucose and ammonia metabolism in the filamentous fungus, *Aspergillus niger* B1-D. **Mycological Research**, v. 112, p. 1049-1055, 2008.

LI, Q.; McNEIL, B.; HARVEY, L. M. Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, p. 394–402, 2008.

LI, Q.; YI, L.; MAREK, P.; IVERSON, B. L. Comercial proteases: present and future. **FBS Letters**, v. 587, p. 1155-1163, 2013.

LIMENITAKIS, J.; OPPENHEIM, R. D.; CREEK, D. J.; FORTH, B.; BARRET, M. P.; SOLDATI-FAVRE, D. The 2-methylcitrate cycle is implicated in the detoxification of propionate in *Toxoplasma gondii*. **Molecular Microbiology**, v. 87, p. 894-908, 2013.

LIN, X.; MOMANY, C.; MOMANY, M. SwoHp, a nucleoside diphosphate kinase, is essential in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, p. 1169-1177, 2003.

LINDEMANN, C.; THOMANEK, N.; HUNDT, F.; LERARI, T.; MEYER, H. E.; WOLTERS, D.; MARCUS, K. Strategies in relative and absolute quantitative mass spectrometry based proteomics. **Biological Chemistry**, v. 398, p. 687-699, 2017.

LISBOA, Helen Cristina Fávero. **Fungos endofíticos: prospecção de atividade biocatalítica e aplicação biotecnológica**. 2015. 222 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Quimica, 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/136030>.

LIU, D. Y.; LI, J.; ZHAO, S.; ZHANG, R. F.; WANG, M. M.; MIAO, Y. Z.; SHEN, Y. F.; SHEN, Q. R. Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of diferente carbono sources. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 2-16, 2013.

LORENTZEN, E.; SIEBERS, B.; HENSEL, R.; POHL, E. Mechanism of the Schiff Base Forming Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase: Structural Analysis of Reaction Intermediates. **Biochemistry**, v. 44, p. 4222-4229, 2005.

LY, L.; WASINGER, V. C. Protein and peptide fractionation, enrichment and depletion: tools for the complex proteome. **Proteomics**, v. 11, p. 513-534, 2011.

LYLLOFF, J. E.; HANSEN, L. B. S.; JEPSEN, M.; SANGGAARD, K. W.; VESTER, J. K.; ENGLHILD, J. J.; SORENSEN, S. J.; STOUGAARD, P.; GLARING, M. Genomic and exoproteomic analyses of cold and alkaline-adapted bacteria reveal an abundance of secreted subtilisin-like proteases. **Microbial biotechnology**, v. 9, p. 245-256, 2016.

LYON, G. D.; GOODMAN, B. A.; WILLIAMSON, B. ***Botrytis cinerea* perturbs redox processes as an attack strategy in plants**. In: ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P.; DELEN, N. Botrytis: biology, pathology and control. Kluwer, Dordrecht, 2004.

MACÍAS-SÁNCHEZ, K.L.; GARCÍA-SOTO, J.; RONCERO, M. I. G.; HERNÁNDEZ-MONJARAZ, W.; CAUDILLO-PÉREZ, M. G. Isolation and Expression of Enolase Gene in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Applied Biochemistry of Biotechnology**, v. 175, p. 902-908, 2015.

MANDUJANO-GONZÁLEZ, V.; VILLA-TANACA, L.; ANDUCHO-REYES, M. A.; MERCADO-FLORES, Y. Secreted fungal aspartic proteases: a review. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, p. 76-82, 2016.

MAGASANIK, B.; KAISER, C. A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 15, p. 1-18, 2002.

MAGGIO-HALL, L. A.; KELLER, N. P. Mitochondrial β-oxidation in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, v. 54, p. 1173-1185, 2004.

MAGGIO-HALL, L. A.; LYNE, P.; WOLFF, J. A.; KELLER, N. A single Acyl-CoA dehydrogenase is required for catabolism of isoleucine, valine and short-chain fatty acids in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics Biology**, v. 45, p. 180-189, 2008.

MALATHI, S.; CHAKRABORTY, R. Production of alkaline protease a new *Aspergillus flavus* isolated under solid substrate fermentation conditions for use as a Depilation agent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 712-716, 1991.

MALLER, A.; DA SILVA, T. M.; DAMASIO, A. R. D.; HIRATA, I. Y.; JORGE, J. A.; TERENZI, H. F.; POLIZELI, M. D. T. D. Functional properties of a manganese activated exo-polygalacturonase produced by a thermotolerant fungus *Aspergillus niveus*. **Folia Microbiologica**, v. 58, p. 615-621, 2013.

MAJUMDAR, R.; LEBAR, M.; MACK, B.; MINOCHA, R.; MINOCHA, S.; CARTER-WIENTJES, C.; SICKLER, C.; RAJASEKARAN, K.; CARY, J. W. The *Aspergillus flavus* spermidine synthase (*spds*) Gene, is required for normal development, aflatoxin production, and pathogenesis during infection of maize kernels. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 317, 2018.

MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry. **Annual Review Biochemistry**, v. 70, p. 437-473, 2001.

MANTEAU, S.; ABOUNA, S.; LAMBERT, B.; LEGENDRE, L. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43, p. 359-366, 2003.

MARCHAND, C.; MARÉCHAL, P. L.; MEYER, Y.; DECOTTIGNIES, P. Comparative proteomic approaches for the isolation of proteins interacting with thioredoxin. **Proteomics**, v. 6, p. 6528-6537, 2006.

MARTINEZ-MOYA, P.; NIEHAUS, K.; ALCAÍNO, J.; BAEZA, M.; CIFUENTES, V. Proteomic and metabolomic analysis of the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* using different carbon sources. **BMC Genomics**, v. 16, p. 1-18, 2015.

MARTINS, I.; FARCIA, H.; VARELA, A.; NUNEZ, O.; PLANCHON, S.; GALCERAN, M. T.; RENAUT, J.; REBELO, L. P. N.; PEREIRA, C. S. Investigating *Aspergillus nidulans* secretome during colonisation of cork cell walls. **Journal of Proteomics**, v. 98, p. 175-188, 2014a.

MARTINS, I.; HARTMANN, D. O.; ALVES, P. C. A.; GARCIA, H.; LECLERCQ, C. C.; FERREIRA, R.; HE, J.; RENAULT, J.; BECKER, J. D.; PEREIRA, C. S. Elucidating

how the saprophytic fungus *Aspergillus nidulans* uses the plant polyester suberin as carbon source. **BMC Genomics**, v. 15, p. 2-19, 2014b.

MARTINUS, R. D.; RYAN, M. T.; NAYLOR, D. J.; HERD, S. M.; HOOGENRAAD, N. J.; HOJ, P. B. Role of chaperones in the biogenesis and maintenance of the mitochondrion. **The Faseb Journal**, v. 9, n. 5, p. 371-378, 1995.

MARZLUF, G. A. Genetic regulation of nitrogen metabolismo in the fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 17-32, 1997.

MEDINA, M. L.; HAYNES, P. A.; BRECI, L.; FRANCISCO, W. A. Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. **Proteomics**, v. 12, p. 3153-3161, 2005.

MELIN, P.; SCHNURER, J.; WAGNER, E. Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* reveals proteins associated with the response to the antibiotic concanamycin A, produced by *Streptomyces* species. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 267, p. 695-702, 2002.

MENDONÇA, M.; MOREIRA, G. M. S. G.; CONCEIÇÃO, F. R.; HUST, M.; MENDONÇA, K. S.; MOREIRA, A. N.; FRANÇA, R. C.; SILVA, W. P.; BHUNIA, A. K.; ALEIXO, J. A. G. Fructose 1,6-biphosphate aldolase, a novel Immunogenic surface protein on Listeria species. **PLoS One**, v. 11, p. 1-20, 2016.

MICHAL, G.; SCHOMBUG, D. **Biochemical Pathways**. Jhon Wiley Sons Inc., Hoboken, New jersey, 2nd edition, 2012.

MIRANDA-OZUNA, J. F. T.; HERNANDEZ-GARCÍA, M. S.; BRIEBA, L. G.; BENÍTEZ-CARDOZA, C. G.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; ARROYO, R. The Glycolytic Enzyme Triosephosphate Isomerase of *Trichomonas vaginalis* Is a Surface-Associated Protein Induced by Glucose That Functions as a Laminin- and Fibronectin-Binding Protein, **Infection and Immunity**, v. 84, p. 2878-2894, 2016.

MOLINA, G.; CONSTESINI, F. J.; MELO, R. R.; SATO, H. H.; PASTORE, G. M. **New and Future Developments in Microbial Biotechonology and Bioengineering**. β-Glucosidase from *Aspergillus*, Chapter 11. Amsterdam: Elsevier, 2016, p. 155-169.

MOOLENAAR, W. H.; MEETEREN, V.; GIEPMANS, B. N. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. **Bioessays**, v. 26, p. 870-881, 2004.

MOPARTHI, S. B.; SJOLANDER, D.; VILLEBECK, L.; JONSSON, B. H.; HAMMARSTROM, P.; CARLSSON, U. Transient conformational remodeling of folding proteins by GroES – individually and in concert with GroEL. **Journal of Chemical Biology**, v. 7, p. 1-15, 2014.

MOUASSITE, M.; CAMOUGRANDE, M.; SCHWOB, E.; DEMAISON, G.; LACLAU, M.; GUÉRIN, M. The SUN family: yeast SUN4/SCW3 is involved in cell septation. **Yeast**, v. 16, p. 905-919, 2000.

MOYE-ROWLEY, W. S. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. **Eukaryotic Cell**, v. 2, p. 381-389, 2003.

MURAD, A. M.; MOLINARI, H. B. C.; MAGALHÃES, B. S.; FRANCO, A. C.; TAKAHASHI, F. S. C.; OLIVEIRA-JUNIOR, N. G.; FRANCO, O. L.; QUIRINO, B. F. Physiological and proteomic Analyses of *Saccharum* spp. Grown under salt stress. **PLoS One**, v. 9, p. e98463-e98463, 2014.

MURRAY, S. L.; HYNES, M. J. Metabolic and developmental effects resulting from deletion of the citA gene encoding citrate synthase in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, p. 656-666, 2010.

NAIK, R. R.; NEBES, V.; JONES, E. W. Regulation of the proteinase B structural gene *PRB1* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. **179**, p. 1469–74, 1997.

NAKAI, K. Protein sorting signals and prediction of subcellular localization. **Advances in Protein Chemistry**, v. 54, p. 277–344, 2000.

NANDAKUMAR, M. P.; MARTEN, M. R. Comparison of lysis methods and preparation protocols for 1-D and 2-D electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins. **Electrophoresis**, v. 23, p. 2216–2222, 2002.

NICKEL, W. The mystery of nonclassical protein secretion. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 10, p. 2109-2119, 2003.

NIGAN, P. S. Microbial Enzymes with special characteristics for biotechnological. applications biomolecules. **Biomolecules**, v. 3, p. 597-611, 2013.

NITSCHE, B. M.; JORGENSEN, T. R.; AKEROYD, M.; MEYER, V.; RAM, A. F. J. The carbon starvation response of *Aspergillus niger* during submerged cultivation: Insights from the transcriptome and secretome. **BMC Genomics**, v. 13, p. 380- 403, 2012.

NOMBELA, C.; GIL, C.; CHAFFIN, W. L. Non-conventional protein secretion in yeast. **Trends in microbiology**, v. 14, n. 1, p. 15–21, 2006.

NOGUEIRA, S. V.; FONSECA, F. L.; RODRIGUES, M. L.; MUNDODI, V.; ABI-CHACRA, E. A.; WINTERS, M. S.; ALDERETE, J. F.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 4040-4050, 2010.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v. 198, p. 119-124, 2016.

NOZAWA, S.R.; THEDEI, Jr. G.; CIACAGLINI, P.; ROSSI, A. The adaptive response to ambient pH in *Neurospora crassa.* **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 30, p. 192-195, 2002.

NYYSSOLA, A.; PIHLAJANIEMI, V.; JARVINEN, R.; MIKANDER, S.; KONTKANEN, H.; KRUUS, K.; KALLIO, H.; BUCHERT, J. Screening of microbes for novel acidic cutinases and cloning and expression of an acidic cutinase from *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p. 272-278, 2013.

ODONI, D. I.; GAAL, M. P. V.; SXHONEWILLE, T.; TAMAYO-RAMOS, J. A.; SANTOS, V. A. P. M.; SUAREZ-DIEZ, M.; SCHAAP, P. J. *Aspergillus niger* secretes citrate to increase iron bioavailability. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1-13, 2017.

OH, Y.; ROBERTSON, S. L.; PARKER, J.; MUDDIMAN, D.; DEAN, R. A. Comparative proteomic analysis between nitrogen supplemented and starved conditions in Magnaporthe oryzae. **Proteome Science**, v. 15, p. 1-12, 2017.

OLIVEIRA, J. M. P. F.; GRAAFF, L. H. Proteomics of industrial fungi: trends and insights for biotechnology. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 89, p. 225–237, 2011.

OLIVEIRA, J. M. F.; VAN PASSEL, M. W. J.; SCHAAP, P. J.; GRAAFF, L. H. Proteomic analysis of the secretory response of *Aspergillus niger* to D-maltose and D-xylose. **PLoS One**, v. 6, p. e20865, 2011.

ORIJ, R.; BRUL, S.; SMITS, G. J. Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. **Biochimistry Biophysical Acta**, v. 1810, p, 933–944, 2011.

ORIJ, R.; URBANUS, M. L.; VIZEACOUMAR, F. J.; GIAEVER, G.; BOONE, C.; NISLOW, C.; BRUL, S.; SMITS, G. J. Genome-wide analysis of intracellular pH reveals quantitative control of cell division rate by pH in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome Biologycal**, v. 13, p. R80, 2012.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-846, 2000.

PANNEMAN, H.; RUIJTER, G. J. G.; VAN DER BROEK, H. C.; VISSER, J. Cloning and biochemical characterization of an *Aspergillus niger* glucokinase – evidence for the presence of separate glucokinase and hexokinase enzymes. **European Journal of Biochemistry**, v. 240, p. 518-525, 1996.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnological Advanced**, v. 22, p. 189-259, 2004.

PASSARDI, F.; THEILER, G.; ZAMOCKY, M.; COSIO, C.; ROUHIER, N.; TEIXEIRA, F.; MARGIS-PINHEIRO, M.; LOANNIDIS, V.; PENEL, C.; FALQUET, L.; DUNAND, C. PeroxiBase: the peroxidase database. **Phytochemistry**, v. 68, n. 12, p. 1605-1611, 2007.

PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature genetics**, v. 33, p. 311-323, 2003.

PETERSEN, T.N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, p. 785-786, 2011. doi: 10.1038/nmeth.1701.

PLASSARD, C.; FRANSSON, P. Regulation of low- molecular weight organic acid production in fungi, **Fungal Biology Review**. v. 23, p. 30–39, 2009.

PAYTAN, A; MCLAUGHLIN, K. The oceanic phosphorus cycle. **Chemistry Review**, v. 107, p. 563-576, 2007.

PEAK, M. J.; PEAK, J. G.; STEVENS, F. J.; BLAMEY, J.; MAI, X.; ZHOU, Z. H.; ADAMS, M. W. W. The hyperthermophilic glicolitic enzyme enolase in the archaeon, *Pyrococcus furiousus*: Comparison with mesophilic enolase. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 313, p. 280-286,1994.

PEBERDY, J. F. Protein secretion in filamentous fungi trying to understand a highly productive black box. **Trends Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 50-7, 1994.

PEGG, A. E. The function of spermine. **IUBMB Life**, v. 66, p. 8-18, 2014.

PELLEGRIN, C.; MORIN, E.; MARTIN, F. M.; VENEAULT-FOURREY, C. Comparative Analysis of Secretomes from Ectomycorrhizal Fungi with an Emphasis on Small-Secreted Proteins**. Frontiers Microbiology**, v. 18, p. 1-15, 2015.

PEMBERTON, T. J. Identification and comparative analysis of sixteen fungal peptidyl-prolil cis/trans isomerase repertories. **BMC Genomics**, v. 7, p. 244-270, 2006.

PEÑALVA, M. A; ARST, JR. H. N. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews,** v. 66, p. 2426-446, 2002.

PEÑALVA, M. A.; TILBURN, J.; BIGNELL, E.; ARST, H. J. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. **Trends Microbiology**, v. 16, p. 291-300, 2008.

PETERSEN, T.N.; BRUNAK, S.; COM HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0 disciminating signal peptides from transmenbrane regions. **Nature Methods**, v. 8, p. 785-786, 2011.

PITSON, S. M.; VORAGEN, A. G. J.; VINCKEN, J. P.; BELDMAN, G. Action patterns and mapping of the substrate-binding regions of endo- 1,5-alfa-L-arabinanases from *Aspergillus niger* and *Aspergillus aculeatus*. **Carbohydrate Research**, v. 303, p. 207-218, 1997.

POLEK, B.; GODOçÍKOVÁ, J. Responses and Resistence of Microbial Isolates Against Toxic Oxidative Stress. **Current Microbiology**, v. 65, p. 345-349, 2012.

POOLE; L. B.; HALL, A.; NELSON, K. J. Overview of peroxiredoxins in oxidant defense and redox regulation. **Current Protocols in Toxicology**, v. 7.9, p. 1-20, 2011.

PUCKETT, S.; TRUJILLO, C.; EOH, H.; MARRERO, J.; SPENCER, J.; JACKSON, M.; SCHNAPPINGER, D.; RHEE, K.; EHRT, S. Inactivation of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase Prevents Optimal Co-catabolism of Glycolytic and Gluconeogenic Carbon Substrates in *Mycobacterium tuberculosis*. **Plos Pathogens**, v. 10, p. e1004144, 2014.

PURKAYASTHA, S.; MADAN, T.; SHAH, A.; KRISHNAMURTHY, H. G.; SARMA, P. U. Multifunctional antigens of *Aspergillus fumigatus* and specific antibodies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 83, p. 271-283, 2000.

QIAN, L.; LIU, X. Purification, characterization and structure of nucleoside diphosphate kinase from *Drosophila melanogaster*. **Protein Expression and Purification**, v. 103, -. 48-55, 2014.

QIN, Y.; WEI, Y.; SONG, X.; QU, Y. Engineering endoglucanase II from *Trichoderma reesei* to improve the catalytic efficiency at a higher pH optimum. **Journal of Biotechnology**, v. 135, p. 190–195, 2008.

RABINOVICH, M. L.; BOLOBOVA, A. V.; VASIL`CHENKO, L. G. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, p. 1-17, 2004.

RADYUK, S. N.; MICHALAK, K.; KLICHKO, V.; BENES, J.; ORR, W. C. Peroxiredoxin 5 modulates immune response in *Drosophila*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1800, p. 1153-1163, 2010.

RAGGAM, R. B.; SALZER, H. J.; MARTH, E.; HEILING, B.; PAULISTSCH, A. H.; BUZINA, W. Molecular detection and characterization of fungal heat shock protein 60. **Mycoses**, v. 54, p. 394-399, 2011.

RAHMAD, N.; AL-OBAIDI. J. R.; RASHID, N. M. N.; ZEAN, N. B.; YUSOFF, M. H. Y. M.; SHAHARUDDIN, N. S. S.; JAMIL, N. A. M.; SALEH, N. M. Comparative proteomic analysis of different developmental stages of the edible mushroom *Termitomyces heimmi*. **Biological research**, v. 47, p. 2-8, 2014.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation.

Electronic Journal of Biotechnology, v. 1, n. 3, p. 114-140, 1998.

RAMESH, M.; SIRAKOVA, T. D.; KOLATTUKUDY, P. E. Cloning and characterization of the cDNAs and genes (*mep*20) encoding homologous metalloproteinases from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus*. **Gene**, v. 165, p. 121-125, 1995.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological aspects of microbial protease. **Microbiology and Molecular Biological Reviews,** v. 62, p. 597-635, 1998.

REMENTERIA, A.; LÓPEZ-MOLINA, N.; LUDWING, A.; VIVANCO, A. B.; BIKANDI, J.; PONTÓN, J.; GARAIZAR, J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 22, p. 1-23, 2005.

REYNOLDS, S. M.; KA'LL, L.; RIFFLE, M. E.; BILMES, J. A.; NOBLE, W. S. Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Using Dynamic Bayesian Networks. **PLoS Computational Biology**, v. 4, p. e1000213, 2008.

RIQUELME, M.; AGUIRRE, J.; BARTNICKI-GARCIA, S.; BRAUS, G. H.; FELDERUGGE, M.; FLEIG, U.; HANSBERG, W.; HERRERA-ESTRELLA, A.; KAMPER, J.; KUCK, U.; MOURIÑO-PEREZ, R. R.; TAKESHITA, N.; FISCHER, R. Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 82, p. e00068-17, 2018.

RIZWAN, M.; MILLER, I.; TASNEEM, F.; BOHM, J.; GEMEINER, M.; RAZZAZI-FAZELI, E. Proteome analysis of *Aspergillus ocharaceus*. **Mycotoxin Research**, v. 26, p. 171-180, 2010.

RODACKA, A. Properties and functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 67, p. 775-789, 2013.

RODAKI, A.; YOUNG, T.; BROWN, A. J. P. Effects of depleting the essential central metabolic enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase on the growth and viability of *Candida albicans*: implications for antifungal drug target discovery. **Eukaryotic Cell**, v. 5, p. 1371-1377, 2006.

RODRIGUES-POUSADA, C.; MENEZES, R. A.; PIMENTEL, C. The Yap family and its role in stress response. **Yeast**, v. 27, p. 245-258, 2010.

ROLKE, Y.; LIU, S.; QUIDDE, T.; WILLIAMSON, B.; SCHOUTEN, S.; WELTRING, K. M.; SIEWERS, V.; TENBERGE, K. L.; TDZYNSKI, B.; TDZYNSKI, P. Functional analysis of H_2O_2-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 17-27, 2004.

ROUMELIOTI, K.; VANGELATOS, L.; SOPHIANOPOULOU, V. A cryptic role of a glycolytic-gluconeogenic enzyme (aldolase) in amino acid transporter turnover in *Aspegillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, p. 254-267, 2010.

ROWE, A. F.; LOWE, P. N. Modulation of amino acid and 2-oxo acid pools in *Trichomonas vaginalis* by aspartate aminotransferase inhibitors. **Molecular Biochemistry Parasitological**, v. 21, p. 17–24, 1986.

RUIJTER, G. J. G.; PANNEMAN, H.; XU, D. B.; VISSER, J. Properties of *Aspergillus niger* citrate synthase and effects of citA overexpression on citric acid production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 184, p. 35-40, 2000.

RUIJTER, G. J.; VISSER, J. Carbon repression in aspergilli. **FEMS Microbiology Letters**, v. 151, p. 103-114, 1997.

SAHA, B. C.; RACINE, F. M. Biotechonological production of mannitol and its applications. **Applied Microbiological Biotechnological,** v. 89, p. 879-891, 2011.

SHARMIN, D.; SASANO, Y.; SUGIYAMA, M.; HARASHIMA, S. Effects of deletion of different PP2C protein phosphatase genes on stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast.**, v. 31, p. 393-409, 2014.

SALEKDEH, G.H.; KOMATSU, S. Crop proteomics: Aim at sustainable agriculture of tomorrow. **Proteomics**, v. 7, p. 2976–2996, 2007.

SALUSJARVI, L.; POUTANEN, M.; PITKANEN, J. P.; KOIVISTOINEN, H.; ARISTIDOU, A.; KALKKINEN, N.; RUOHONEN, L.; PENTTILA, M. Proteome analysis of recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 20, p. 295-314, 2003.

SAMSON, R. A.; PETERSON, S. W.; FRISVAD, J. C.; VARGAS, J. New species in *Aspergillus* section *Terrei.* **Studies in Mycology**, v. 69, p. 39-55, 2011.

SARITHA, M.; SINGH, S.; TIWARI, R.; GOEL, R.; NAIN, L. Do cultural conditions induce differential protein expression: profiling of extracellular proteome of *Aspergillus terreus* CM20, **Microbiological Research**, v. 192, p. 73-83, 2016.

SARKAR, P.; SURAISHKUMAR, G. K. pH and temperature stresses in bioreactor cultures: intracellular superoxide levels. **Industrial & Enginnering Chemistry Research**, v. 50; p. 13129-13136, 2011.

SAWANT, R.; NAGENDRAN, S. Protease: an enzyme with multiple industrial applications. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 568-579, 2014.

SCHIENE, C. Multidomain Peptidyl Prolyl cis/trans isomerase. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1850, p. 2005-2016, 2015.

SCHMIDT, P.; WALKER, J.; SELWAY, L.; STEAD, D.; YIN, Z.; ENJALBERT, B.; WEIG, M.; BROWN, A. J. P. Proteomic analysis of the pH response in the fungal pathogen *Candida glabrata*. **Proteomics**, v. 8, p. 534–544, 2008.

SCOTT, B.; EATON, C. J. Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 488-493, 2008.

SEIBOTH, B.; METZ, B. Fungal arabinan and L-arabinose metabolism. **Applied and Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1665-1673, 2011.

SHAH, P.; GUTIERREZ-SANCHEZ, G.; ORLANDO, R.; BERGMANN, C. A proteomic study of pectin degradation enzymes secreted by *Botrytis cinerea* grown in liquid culture. **Proteomics**, v. 9, p. 3126-3135, 2009.

SHALLOM, S.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellusases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 219-228, 2003.

SHARMA, A. D.; WAJAPEYEE, N.; YADAV, V.; SINGH, P. Stress induced changes in peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity of *Sorghum bicolor* seedelings. **Biologia Plantarum**, v. 47, p. 367-371, 2003.

SHARMA, K. M.; KUMAR, R.; PANWAR, S.; KUMAR, A. Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, p. 115-126, 2017.

SHERF, A. F. A method for maintaining Phytomonas sepedonica in culture for long periods without transfer. **Phytopathology**, v. 33, p. 330-332, 1943.

SHI, C.; HE, J.; YU, B.; MAO, X.; ZHENG, P.; HUANG, Z.; CHEN, D. Physicochemical Porperties analysis and secretome of *Aspergillus niger* in fermented rapeseed meal. **PLoS One**, v. 11, p. 1-16, 2016.

SHI, H.; DING, H.; HUANG, Y.; WANG, L.; ZHANG, Y.; LI, X.; WANG, F. Expression and characterization of a GH43 endo-arabinanase from *Thermotoga thermarum*. **BMC biotechnology**, v. 14, p. 14-35, 2014.

SHIMIZU, M.; YUDA, N.; NAKAMURA, T.; TANAKA, H.; WARIISHI, H. Metabolic regulation at the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles of the lignin-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium against exogenous addition of vanillin. **Proteomics**, v. 5, p. 3919-3931, 2005.

SILVA, L. O. S. **Análise de moléculas envolvidas no metabolismo de nitrogênio no fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis***. 2017. 73 f. (Dissertação Mestrado) – Programa de Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2017.

SINGH, G.; VERMA, A. K.; KUMAR, V. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β-glucosidases. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-14, 2016.

SINHA, S.; SINHA, S. Studies on the Production of Acid Protease by Submerged Fermentation. **International Journal of Food Engineering**, v. 5, 2009.

SIROVER, M. A. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1432, p. 159-184, 1999.

SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD, A.; KHAN, S. A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, v. 25, p. 437-441, 2009.

SONAH, H.; DESHMUKH, R. K.; BÉLANGER, R. R. Computational Prediction of Effector Proteins in Fungi: opportunities and challenger. **Fronties in Plant Science**, v. 7, p. 1-14, 2016.

SOUZA, P. M.; BITTENCOURT, M. L. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M.; ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 337-346, 2015.

SPERSCHNEIDER, J.; GARDINER, D.M.; DODDS, P.N.; TINI, F.; COVARELLI, L.; SINGH, K.B.; MANNERS, J.M.; TAYLOR, J.M. EffectorP: Predicting Fungal Effector Proteins from Secretomes Using Machine Learning. **New Phytologist**, v. 210, p. 743-761, 2015.

STEELE, M. I.; LORENZ, D.; HATTER, K.; PARK, A.; SOKATCH, J. R. Characterization of the mmsAB Operon of *Pseudomonas aeruginosa* PAP encoding methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase and 3-hidroxyisobutyrato dehydrogenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 19, p. 13585-13592, 1992.

SIVULA, T.; SALMINEN, A.; PARGENYEV, A. N.; POHJANJOKI, P.; GOLDMAN, A.; COOPERMAN, B. S.; BAYKOV, A. A.; LAHTI, R. Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase. **FEBS Letters**, v. 454, p. 75-80, 1999.

SKJOET, M.; KAUPPINEM, S.; KOFOD, L. V.; FUGLSANG, C. C.; PAULY, M.; DALBOEGE, H.; ANDERSEN, L. N. Functional cloning of an endo-arabinanase from *Aspergillus aculeatus* and its heterologous expression in *A. oryzae* and tobacco. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 265, p. 913-921, 2001.

SOLAR, T.; TURSIC, J.; LEGISA, M. The role of glucosamine-6-phosphate deaminase at the early stages of *Aspergillus niger* growth in a high-citric-acid-yielding medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 613-619, 2008.

SOLOMON, P. S.; WATERS, O. D. C.; OLIVER, R. P. Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 257-262, 2007.

SORENSEN, A.; ANDERSEN, J. J.; AHRING, B. K.; TELLER, P. J.; LUBECK, M. Screening of carbon sources for beta-glucosidase production by *Aspergillus saccharolyticus*. **International Biodeteriotation & Biodegradation**, v. 93, p. 78-83, 2014.

SOUZA-MOTTA, C. M.; CAVALCANTI, M. A. Q.; PORTO, A. L. F.; MOREIRA, K. A.; FILHO, J. L. L. *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: new source for inulinase production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 3, p. 343-350, 2005.

SOUZA, P. M.; BITTENCOURT, M, L. A.; CAPRANA, C. C.; FREITAS, M.; ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FEREIRA FILHO, E. X.; PESSOA JUNIOR, A.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 46, p. 337-346, 2015.

SPALDING, M.D.; PRIGGE, S.T. Lipoic Acid Metabolism in Microbial Pathogens. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.74, p.200–228, 2010.

SPORMANN, D. O.; HEIM, J.; WOLF, D. H. Carboxypeptidase yscS: gene structure and function of the vacuolar enzyme. **European Journal Biochemistry**, v. 197, p. 399-405, 1991.

SQUIER, T. C. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. **Experimental Gerontology**, v. 36, p. 1539-1550, 2001.

STARICH, M. R.; WIKSTRÖM, M.; ARST, H. N.; CLORE, G. M.; GRONENBORN, A. M. The solution structure of a fungal AREA protein-DNA complex: an alternative binding mode for the basic carboxyl tail of GATA factors. **Journal of molecular biology**, v. 277, n. 3, p. 605–20, 1998.

STRIJBIS, K.; BURG, J. V. D.; VISSER, W. F.; BERG, M. V. D.; DISTEL, B.; Alternative splicing directs dual localization of *Candida albicans* 6-phosphogluconate dehydrogenase to cytosol and peroxisomes. **FEMS Yeast Research**, v. 12, p. 61-68, 2012.

SUGANTHI, C.; MAGESWARI, A.; KARTHIKEYAN, S.; ANBALAGAN, M.; SIVAKUMAR, A.; GOTHANDAM, K. M. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 11, p. 47-52, 2013.

SUMANTHA, A.; SANDHYA, C.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal Mixed Substrate Fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 4, p. 313-319, 2005.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 211-220, 2006.

SUN, Y.; YI, X.; PENG, M.; ZENG, H.; WANG, D.; LI, B.; TONG, Z.; CHANG, L.; JIN, X.; WANG, X. Proteomics of Fusarium oxysporum Race 1 and Race 4 reveals enzymes involved in carbohydrate metabolism and ion transport that might play important roles in banana *Fusarium Wilt*. **Plos One**, v. 9, p. 1-20, 2014.

SZOPINSKA, A.; MORSOMME, P. Quantitative proteomic approaches and their application in the study of yeast stress responses. **OMICS**, v. 14, p. 639-649, 2010.

SWIGONOVÁ, A.; MOHSEN, A. W.; VOCKLEY, J. Acyl-CoA dehidrogenases: dynamic history of protein family evolution. **Journal of Molecular Evolutin**, v. 69, p. 176-193, 2009.

TAJ-ALDEEN, S. J.; ALKENANY, K. I. Separation and partial purification of beta-glucosidase and two endoglucanases in *Aspergillus niveus*. **Microbiología**, v. 12, p. 91-98, 1996.

TAKASUKA, T.; SAYERS, N. M.; ANDERSON, M. J.; BENBOW, E. W.; DENNING, D. W. *Aspergillus fumigatus* catalases: cloning of an *Aspergillus nidulans* catalase B homologue and evidence for at least three catalases. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 23, p. 125-133, 1999.

TANG, X.; ZAN, X.; ZHAO, L.; CHEN, H.; CHEN, Y. Q.; CHEN, W.; SONG, Y.; RATLEDGE, C. Proteomics analysis of high lipid-producing strain *Mucor circinelloides* WJ11: an explanation for the mechanism of lipid accumulation at the proteomic level. **Microbial Cell Factories**, v. 15, 2-16, 2016.

TANIMIZU, N.; HAYASHI, R. Changes in vacuolar protease activities during synchronous culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, p. 1526-1527, 1996.

TDZYNSKI, B. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 656-671, 2014.

TE BIESEBEKE, R.; BOUSSIER, A.; VAN BIEZEN, N.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J.; PUNT, P.J. Identification of secreted proteins of *Aspergillus oryzae* associated with growth on solid cereal substrates. **Journal of Biotechnology**, v.121, p.482–485, 2006.

TEDERSOO, L.; BAHRAM, M.; PÕLME, S.; KÕLJALG, U.; YOROU, N.; WIJESUNDERA, R. et al., Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, v. 346, p. 1256688, 2014.

TER SCHURE, E. G.; VAN RIEL, N. A.; VERRIPS, C. T. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 67-83, 2000.

THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. **Nucleic Acids Research**, v.**45**, p. D331–D338, 2017.

THYS, R. C. S.; GUZZON, S. O.; CLADERA-OLIVEIRA, F.; BRANDELLI, A. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. In feather meal using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 67-73, 2006.

THORPE, C.; KIM, J. J. Structure and mechanism of action of the acyl-CoA dehydrogenases. **FASEB Journal**, v. 9, n. 9, p. 718-725, 1995.

TIWARI, P.; MISRA, B. N.; SANGWAN, N. S. β-glucosidases from the fungus *Trichoderma*: an efficient cellulase Machinery in Biotechnological Applications. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

TODA, T.; SANO, M.; HONDA, M.; RIMOLDI, O. J.; YANG, Y.; YAMAMOTO, M.; TAKASE, K.; HIROZUMI, K. Deletion analysis of the enolsase gene (*eno*A) promoter from the filamentous fungus *Aspegillus oryzae*. **Current Genetics**, v. 40, p. 260-267, 2001.

TRAN, L. H.; NAGANO, H. Isolation and characteristics of Bacillus subtilis CN2 and its colagenase production. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 3, p. 1184-1187, 2002.

TREVISAN, G. L.; OLIVEIRA, E. H.; PERES, N. T.; CRUZ, A. H.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; ROSSI, A. Transcription of Aspergillus nidulans pacC is modulated by alternative RNA splicing of palB. **FEBS Letters**, v. 21, p. 3442-3445, 2011.

TRUJILLO, C.; BLUMENTHAL, A.; MARRERO, J.; RHEE, K.; SCHNAPPINGER, D.; EHRT, S. Triosephosphate Isomerase is dispensable in vitro yet essential for *Mycobacterium tuberculosis* to establish infection. **mBio**, v. 5, p. 85-14, 2014.

TUDZYNSKI, B. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–16, 2014.

TYAGI, T. K.; PONNAN, P.; SINGH, P.; BANSAL, S.; BATRA, A.; COLLIN, F.; GUILLONNEAU, F.; JORE, D.; PATKAR, S. A.; SAXENA, R. K.; PARMAR, V. S.; RASTOGI, R. C.; RAJ, H. G. Moonlighting protein in *Starkeyomyces koorchalomoides*: Characterization of dihydrolipoamide dehydrogenase as a protein acetyltransferase utilizing acetoxycoumarin as the acetyl group donor. **Biochimie**, v. 91, p. 868-875, 2009.

ULLAH, A.; LOPES, M. I.; BRUL, S.; SMITS, G. Intracellular pH homeostasis in *Candida glabrata* in infection-associated conditions. **Microbiology**, v. 159, p. 803-813, 2013.

UNAL, C. M.; STEINERT, M. Microbial Peptidyl-Prolyl cis/trans isomerase (PPIases): virulence factors and potential alternative drugs targets. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, p. 544-571, 2014.

UNIVERSITY OF SYDNEY. Fungal biology. Introduction to fungal ecology, 2004 Disponível em: < http://bugs.bio.usyd.edu.au/learning/resources/Mycology/Ecology/introduction.shtml> Acesso em: 20 de outubro de 2017.

VAHIDI, H.; MOJAB, F.; TAGHAVI, N. Effects of carbon sources on growth and production of antifungal agents by *Gymnopilus spectabilis*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 219-222, 2006.

VAN DEN HAZEL, H. B.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; WINTHER, J. R. Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. **Yeast**, v. 12, p. 1-16, 1996.

VALENCIA, E.; CHAMERGO, F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 9-18, 2013.

VALLEJO, M. C.; NAKAYASU, E. S.; MATSUO, A. L.; SOBREIRA, T. J.; LONGO, L. V.; GANIKO, L.; ALMEIDA, I. C.; PUCCIA, R. Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis with other pathogenic fungi. **Journal Proteome Research**, v. 11, p. 1676-1685, 2012.

VALENTINE, J. S.; DOUCETTE, P. A.; ZITTIN, P. S. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. **Annual Review Biochemistry**, v. 74, p. 563-593, 2005.

VATANAVIBOON, P.; VARALUKSIT, T.; SEEANUKUN, C.; MONGKOLSUK. Transaldolase exhibits a protective role against menadione toxicity in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 297, p. 968-973, 2002.

VÁZQUEZ-LASLOP, N.; TENNEY, K.; BOWMAN, B. J. Characterization of a Vacuolar Protease in *Neurospora crassa* and the Use of Gene RIPing to Generate Protease-deficient Strains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 21944-21949, 1996.

VENDREL, J.; QUEROL, E.; AVILÉS, E. Metallocarboxypeptidases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1477, p. 284–298, 2000.

VOLKE-SEPULVEDA, T.; SALGADO-BAUTISTA, D.; BERGAMANN, C.; WELLS, L.; GUTIERREZ-SANCHEZ, G.; FAVELA-TORRES, E. Secretomic insight into glucose metabolism of *Aspergillus brasiliensis* in solid-state fementation. **Journal of proteome research**, v. 15, p. 3856-3871, 2016.

VORAGEN, A. G. J.; ROMBOUTS, F. M.; SEARLE-VAN LEUUWEN, M. F.; SCHOLS, H. A.; PILNIK, W. The degradation of arabinans by endo-arabinanase and arabinofuranodidases purified from *Aspergillus niger*. **Food Hydrocolloids**, v. 1, n. 5, p. 423-437, 1987.

VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, I. 4, p. 497-522, 2001.

XIAOJUN, F.; LIU, X.; LUO, Q.; LIU, B. F. Mass spectrometry in systems biology: an overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 27, p. 635-660, 2008.

XIONG, H.; VON WEYMARN, N.; LEISOLA, M.; TURUNEN, O. Influence of pH on the production of xylanase by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 729–733, 2004.

XU, H.; WEST, A. H.; COOK, P. F. Overall kinetic mechanism of saccharopine dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, v. 45, p. 12156-12166, 2006.

XUEYAN, G., WANG, C., DAI, W., REN, S., TAO, F., HE, X., HAN, G., WANG, W. Proteomic analysis reveals large amounts of decomposition enzymes and major metabolic pathways involved in algicidal processo of *Trametes versicolor* F21a. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-10, 2017.

YANGYONG, L. Proteoma-wide profiling of protein lysine acetylation in *Aspergillus flavus*. **PLoS One**, v. 12, p. e0178603, 1-21, 2017.

YAO, S. H.; GUO, Y.; WANG, Y. Z.; ZHANG, D.; XU, L.; TANG, W. H. A cytoplasmic Cu-Zn superoxide dismutase SOD1 contributes to hyphal growth and virulence of *Fusarium graminearum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 91, p. 32-42, 2016.

YIKE, I. Fungal proteases and their pathophysiological effects. **Mycopathologia**, v. 171, p. 299-323, 2011.

YIN, Z.; WILSON, S.; HAUSER, N.; TOURNU, H.; HOHEISEL, J. D.; BROWN, A. J. P. Glucose triggers different global responses in yeast, depending on the strength of the signal, and transiently stabilizes ribosomal protein mRNAs. **Molecular Microbiology**, v. 48, p. 713-724, 2003.

YOSHIDA, Y.; HASUNUMA, K. Light-dependent subcellular localization of nucleoside diphosphate kinase-1 in *Neurospora crassa*. **FEMS Microbiological Letters**, v. 261, p. 64-68, 2006.

YOSHIDA, T.; NAKAJIMA, T.; ICHISHIMA, E. Overproduction of 1,2-alpha-mannosidase, a glycochain processing enzyme, by *Aspergillus oryzae*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 62, p. 309-315, 1998.

YOSHIMOTO, M.; TAKAKI, N.; YAMASAKI, M. Catalase-conjugated liposomes encapsulating glucose oxidase for controlled oxidation of glucose with decomposition of hydrogen peroxide produced. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 403-408, 2010.

YU, D.; SONG, L.; WANG, W.; GUO, C. Isolation and characterization of formaldehyde-degrading fungi and its formaldehyde metabolismo. **Environmental Science Pollution Research**, v. 21, p. 6016-6024, 2014.

YU, H.; RAO, X.; ZHANG, K. Nucleoside diphosphate kinase (Ndk): A pleiotropic effector manipulating bacterial virulence and adaptive responses. **Microbiological Research**, v. 205, p. 125-134, 2017.

ZÁMOCKY, M.; GASSELHUBER, B.; FURTMULLER, P. G.; OBINGER, C. Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, p. 131-144, 2012.

ZÁMOCKY, M.; GASSELHUBER, B.; FURTMULLER, P. G.; OBINGER, C. Turning points in the evolution of peroxidase-catalase superfamily: molecular phylogeny of hybrid heme peroxidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 23, p. 4681-4696, 2014.

ZAMOCKY, M.; FURTMULLER, P. G.; OBINGER, C. Two distinct groups of fungal catalase/peroxidases. **Biochemical Society transactions**, v. 37, p. 772-777, 2009.

ZEILINGER, S.; KRISTUFEK, D.; ARISAN-ATAC, I.; HODITS, R.; KUBICEK, C. P. Conditions of formation, purification, and characterization of na alpha-galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1347-1353, 1993.

ZHANG, Z.; HENZEL, W. Signal peptide prediction based on analysis of experimental of experimentally verified cleavage sites. **Protein Science**, v. 10, p. 2819-2824, 2004.

ZHAO, Z.; LIU, H.; WANG, C.; XU, J. R. Comparative analysis of fungal genomes reveals diferent plant cell wall degrading capacity in fungi. **BMC genomics**, v. 14, p. 1-15, 2013.

ZHAO, S.; ZHAO, X.; ZOU, H.; FU, J.; ZHOU, J.; CHEN, J. Comparative proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under different nitrogen sources. **Journal Proteomics**, v. 14, p. 102-112, 2014.

ZHU, Y.; LIANG, X.; ZHANG, H.; FENG, W.; LIU, Y.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. A comparative secretome analysis of industrial *Aspergillus oryzae* and its spontaneous mutant ZJGS-LZ-21. **International Journal of Food Microbiology**, v. 249, p. 1-9, 2017.

ZIVERI, J.; TROS, F.; GUERRERA, I. C.; CHHUON, C.; AUDRY, M.; DUPUIS, M.; KORNIOTIS, S.; FILLATREAU, S.; GALES, L.; CAHOREAU, E.; CHARBIT, A. The

metabolic enzyme fructose-1,6-biphosphate aldolase acts as a transcriptional regulator in pathogenic *Francisella*. **Nature Communications**, v. 8, p. 835, 2017.

WANG, G.; YU, X.; CUI, J.; GU, Z.; SONG, Y.; CHEN, Y. Q.; CHEN, H.; ZHANG, H.; CHEN, W. The roles of moonlighting proteins in bacteria. **Current Issues Molecular Biology**, v. 16, p. 15-22, 2013.

WANG, H.; LUO, H.; LI, L.; BAI, Y.; HUANG, H.; SHI, P.; FAN, Y.; YAO, B. An a-galactosidase from an acidophilic *Bispora* sp. MEY-1 strain acts synergistically with b-mannanase. **Bioresource technology journal**, v. 101, p. 8376–8382, 2010.

WANG, J.; LI, S. Catalytica mechanism of 6-phosphogluconate dehydrogenase: a theoretical investigation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 7029-7035, 2006.

WANG, N.; YOSHIDA, Y.; HASUNUMA, K. Catalase-1 (CAT-1) and nucleoside diphosphate kinase-1 (NDK-1) play an important role in protecting conidial viability under light stress in *Neurospora crassa*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 278, p. 235-242, 2007.

WANG, X.; WANG, L.; REN, Q.; YN, S.; LIANG, F.; JIA, Y. Two superoxide dismutases (SODs) respond to bacterial challenge identified in the marbled eel *Anguilla marmorata*. **Aquaculture**, v. 451, p. 316-325, 2016.

WARD, O. P.; QIN, W. M.; DHANJOON, J.; YE, J.; SINGH, A. Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 58, p. 1-75, 2005.

WARD, O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1119-1139, 2012.

WATANABE, T.; IROKAWA, H.; OGASAWARA, A.; IWAI, K.; KUGE, S. Requirement of peroxiredoxin on the stationary phase of yeast cell growth. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 39, p. 51-58, 2014.

WEBER, S. S.; PARENTE, A. F. A.; BORGES, C. L.; PARENTE, J. A.; BAILÃO, A. M.; SOARES, C. M. A. Analysis of the Secretomes of *Paracoccidioides* Mycelia and Yeast Cells. **PLOS One**, v. 7, p. 1-19, 2012.

WEFERS, D.; DONG, J.; ABDEL-HAMID, A. M.; PAUL, H. M.; PEREIRA, G. V.; HAN, Y.; DODD, D.; BASKARAN, R.; MAYER, B.; MACKIE, R. I.; CANN, I. Enzymatic Mechanism for Arabinan Degradation and Transport in the Thermophilic Bacterium *Caldanaerobius polysaccharolyticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, p. 1-18, 2017.

WIERENGA, R. K.; KAPETANIOU, E. G.; VENKATESAN, R. Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. **Cellullar and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 3961-3982, 2010.

WILKINS, M. R.; GOOLEY, A. A. **Protein Identification in Proteome Projects.** Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag. 1997.

WILLIAMS, J. The decomposition of hydrogen peroxide by liver catalase. **Journal General Physiology**, v. 20, p. 309-337, 1928.

WILSON, R. A.; JENKINSON, J. M.; GIBSON, R. P.; LITTLECHILD, J. A.; WANG, Z. Y.; TALBOT, N. J. Tps1 regulates the pentoses phosphate pathway, nitrogen metabolism and fungal virulence. **The EMBO Journal**, v. 15, p. 3673-3685, 2007.

WINTER, B.H.; TITZE, K.; MARSCHNER, V. Application of phospholipases in the edible oil industry. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 100, p.152–156, 1998.

WINTERBERG, B.; FALL, L.A.D.; SONG, X.; PASCOVICI, D.; CARE, N.; MOLLOY, M.; OHMS, S.; SOLOMON, P.S. The necrotrophic effector protein SnTox3 re-programs metabolism and elicits a strong defence response in susceptible wheat leaves. **BMC Plant Biology**, v.14, 215, 2014.

WITTEVEEN, C. F.; VISSER, J. Polyol pools in *Aspergillus niger*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 134, p. 57-62, 1995.

WRIGHT, J. C.; SUDGEN, D.; FRANCIS-MCLNTYRE, S.; RIBA-GRACIA, I.; GASKELL, S. J.; GRIGORIEV, I. V.; BEYNON, R. J.; HUBBARD, S. J. Exploiting proteomic data for genome annotation and gene model validation in *Aspergillus niger*. **BMC Genomics**, v. 10, p. 1-14, 2009.

WU, C. W.; WU, X.; WEN, C.; PENG, B.; PENG, X. X.; CHEN, X.; HUI, L. Fructose promotes growth and antifungal activity of *Penicillium citrinum*. **Protein Cell**, v. 7, p. 527-532, 2016.

WU, Z.; YANG, Z.; GAN, D.; FAN, J.; DAI, Z.; WANG, X.; HU, B.; YE, H.; MUHAMMAD, A.; XIAOXIONG, Z. Influences of carbon sources on the biomass, production and compositions of exopolysaccharides from *Paecilomyces hepiali* HN1. **Biomass Bioenergy**, v. 67, p. 260-269, 2014.

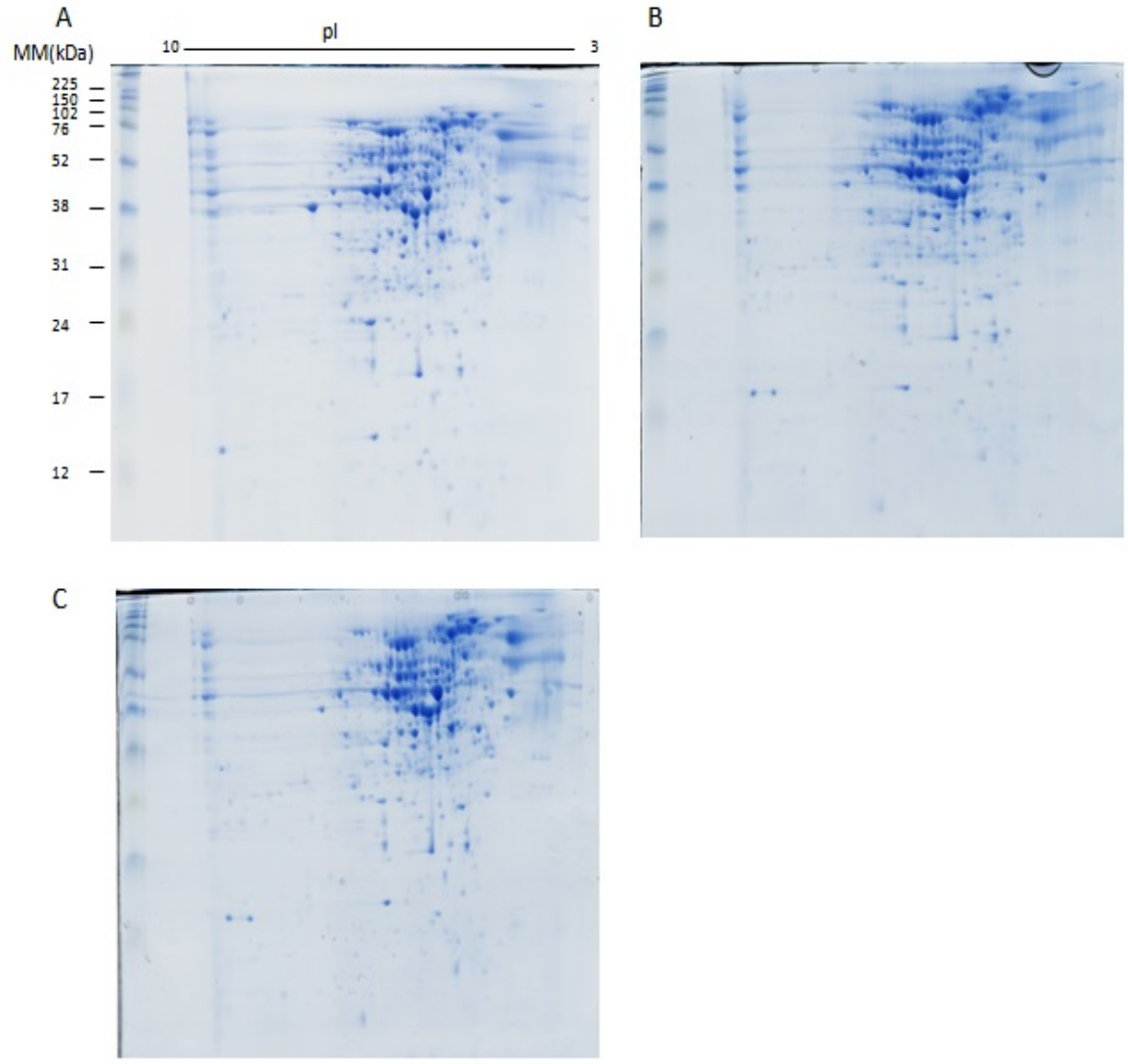
WUBBEN, J. P.; TEN HAVEN, A.; VAN KAN, J. A.; VISSER, J. Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by glacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. **Current Genetics**, v. 37, p. 152-157, 2000.

WYNN, J. P.; HAMID, A. B. A.; RATLEDE, C. The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi. **Microbiology,** v. 145, p. 1911-1917, 1999.

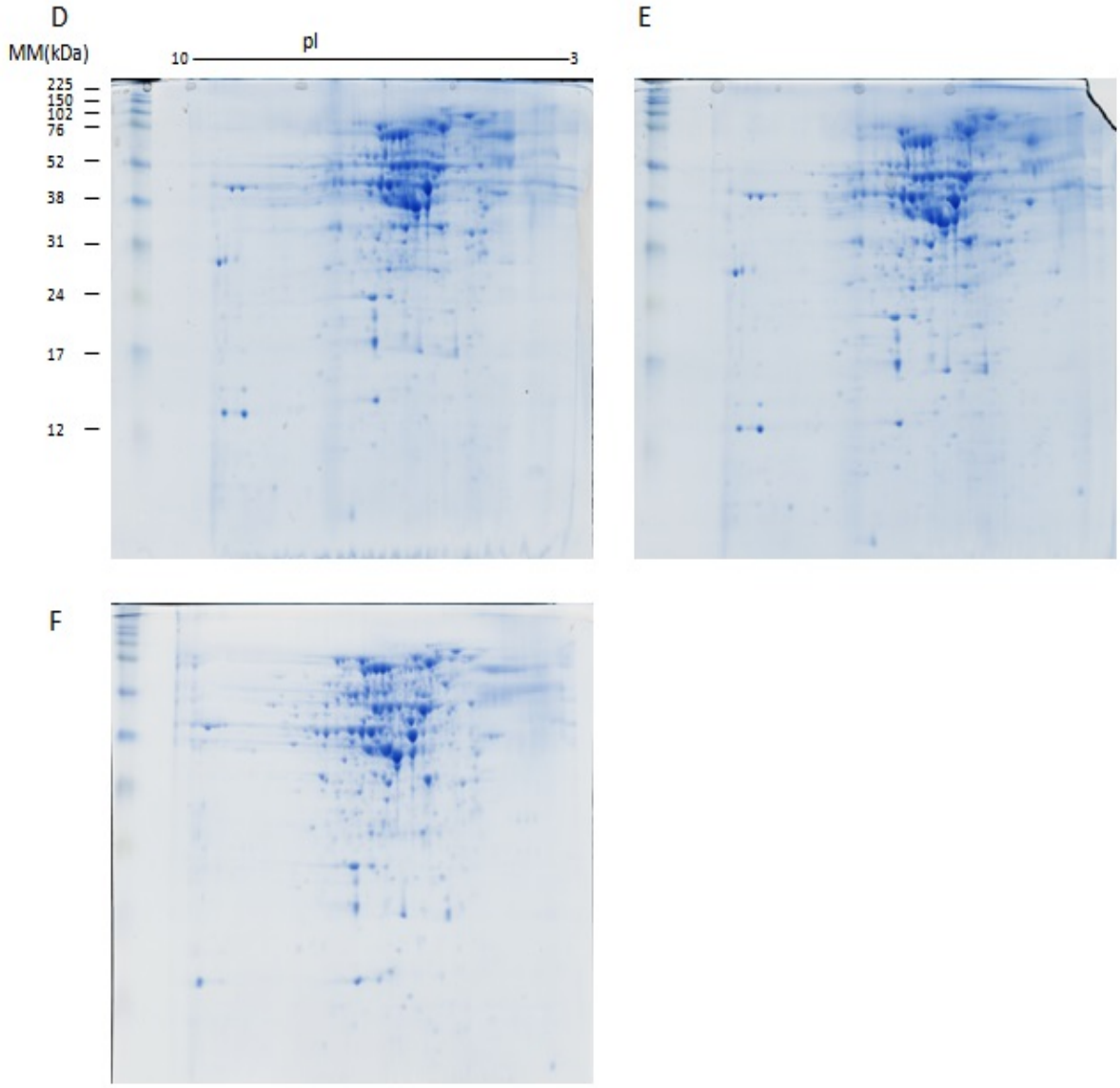
APÊNDICES

APÊNDICE A

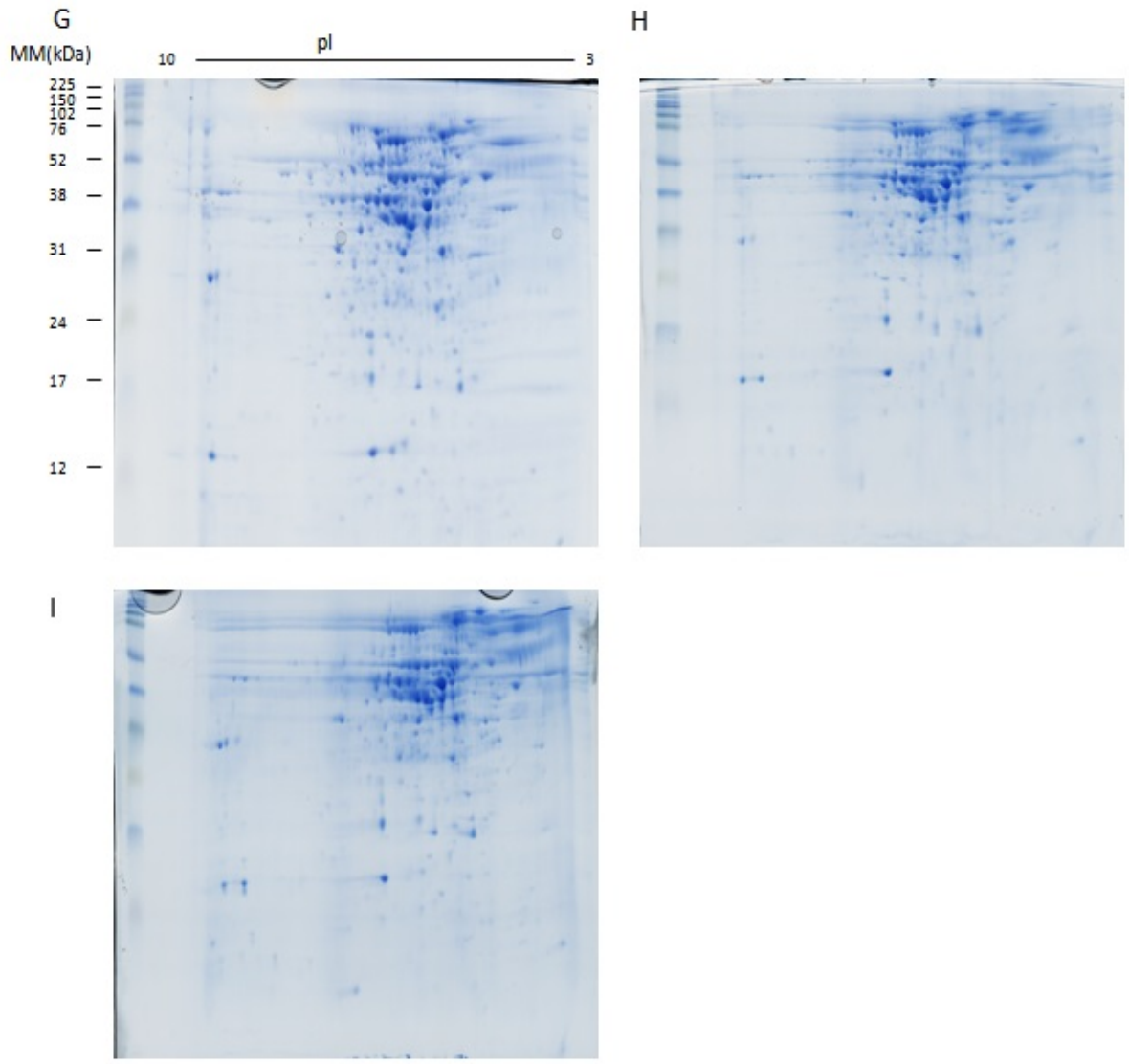
Representação das triplicatas dos géis 2-DE (A, B e C) do efeito do pH 5 correspondentes as proteínas extraídas do micélio de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h



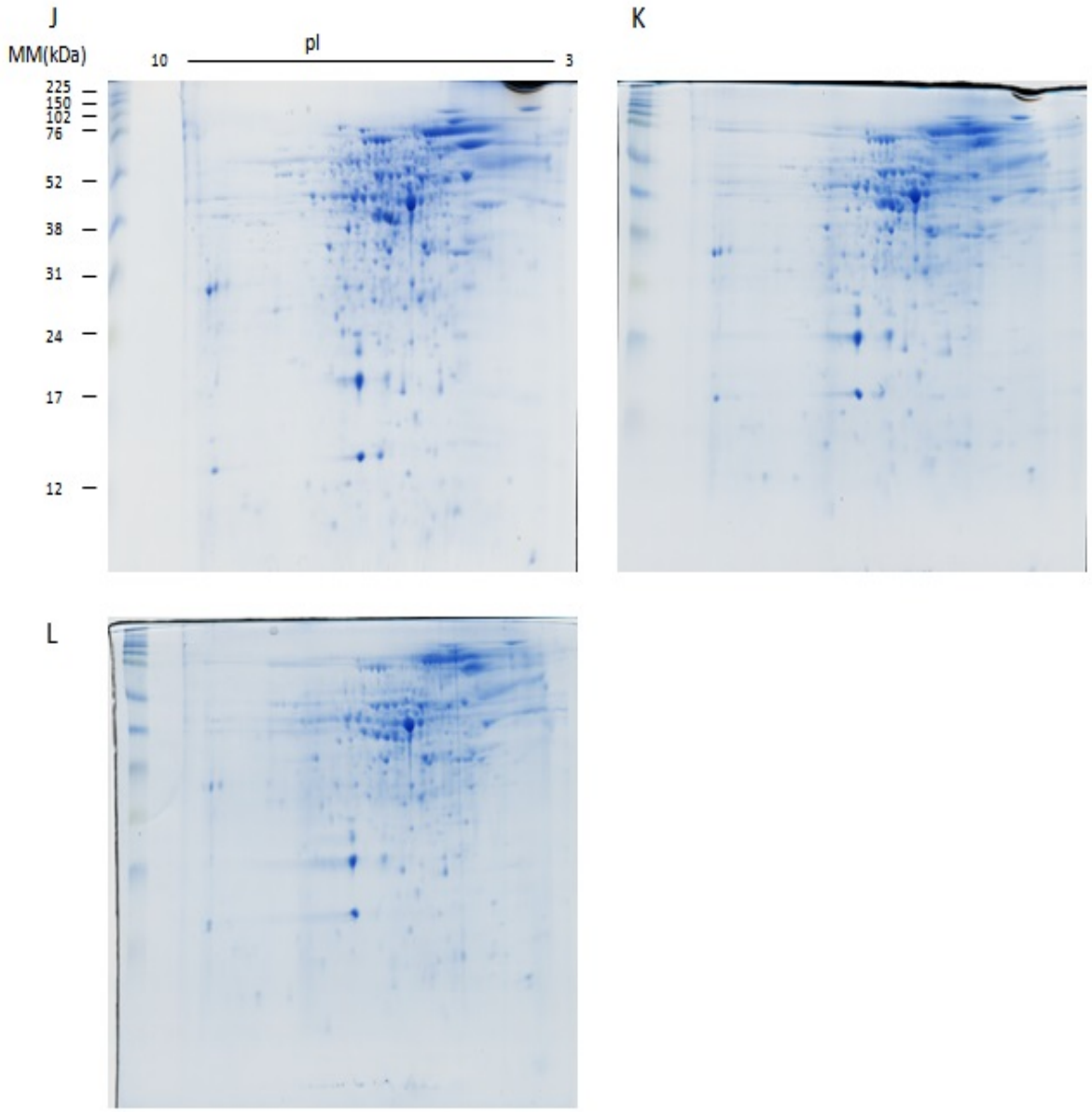
Representação das triplicatas dos géis 2-DE (D, E e F) do efeito do pH 6 correspondentes as proteínas extraídas do micélio de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h



Representação das triplicatas dos géis 2-DE (G, H e I) do efeito do pH 7 correspondentes as proteínas extraídas do micélio de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h

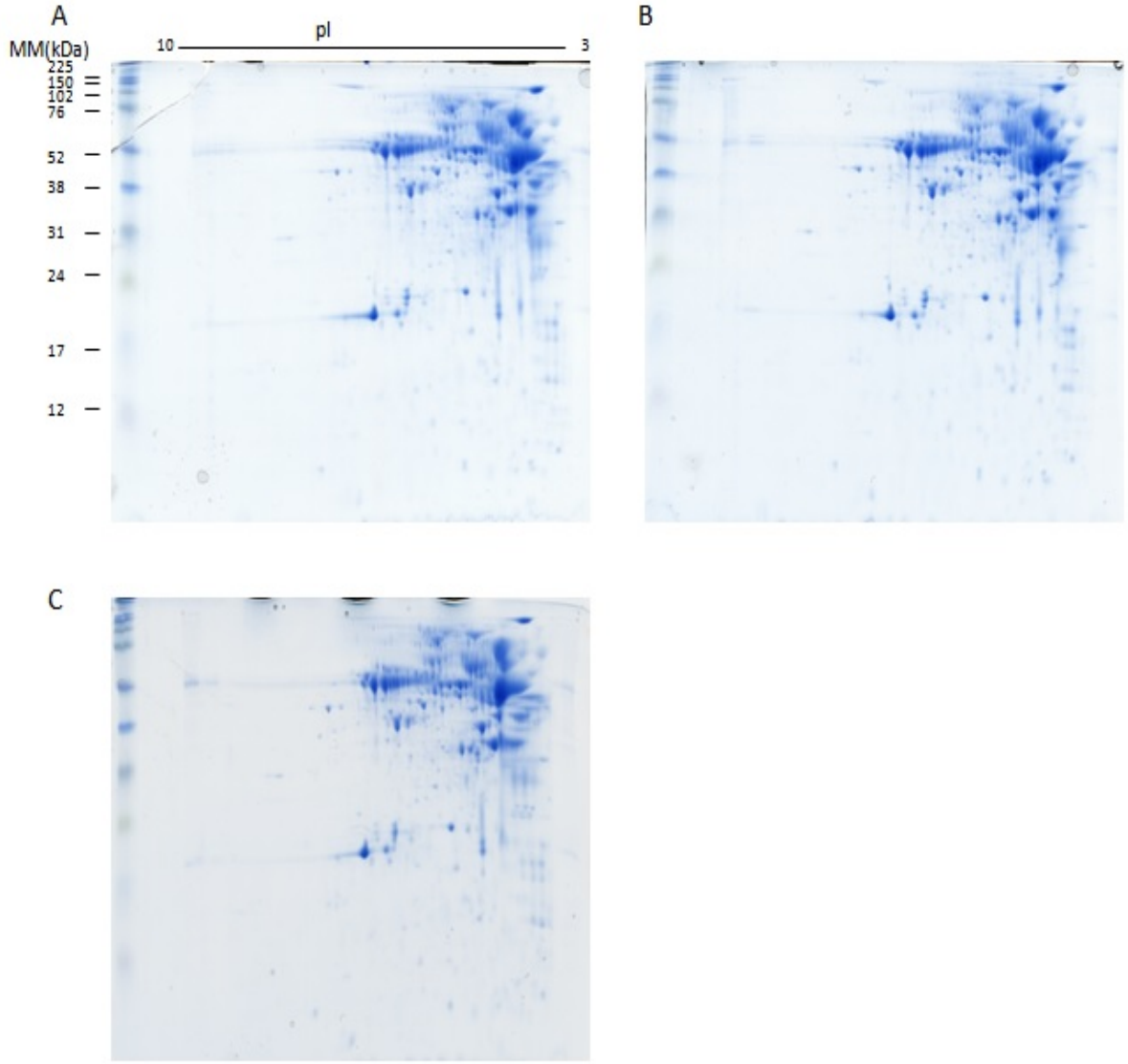


Representação das triplicatas dos géis 2-DE (J, K e L) do efeito do pH 8 correspondentes as proteínas extraídas do micélio de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h

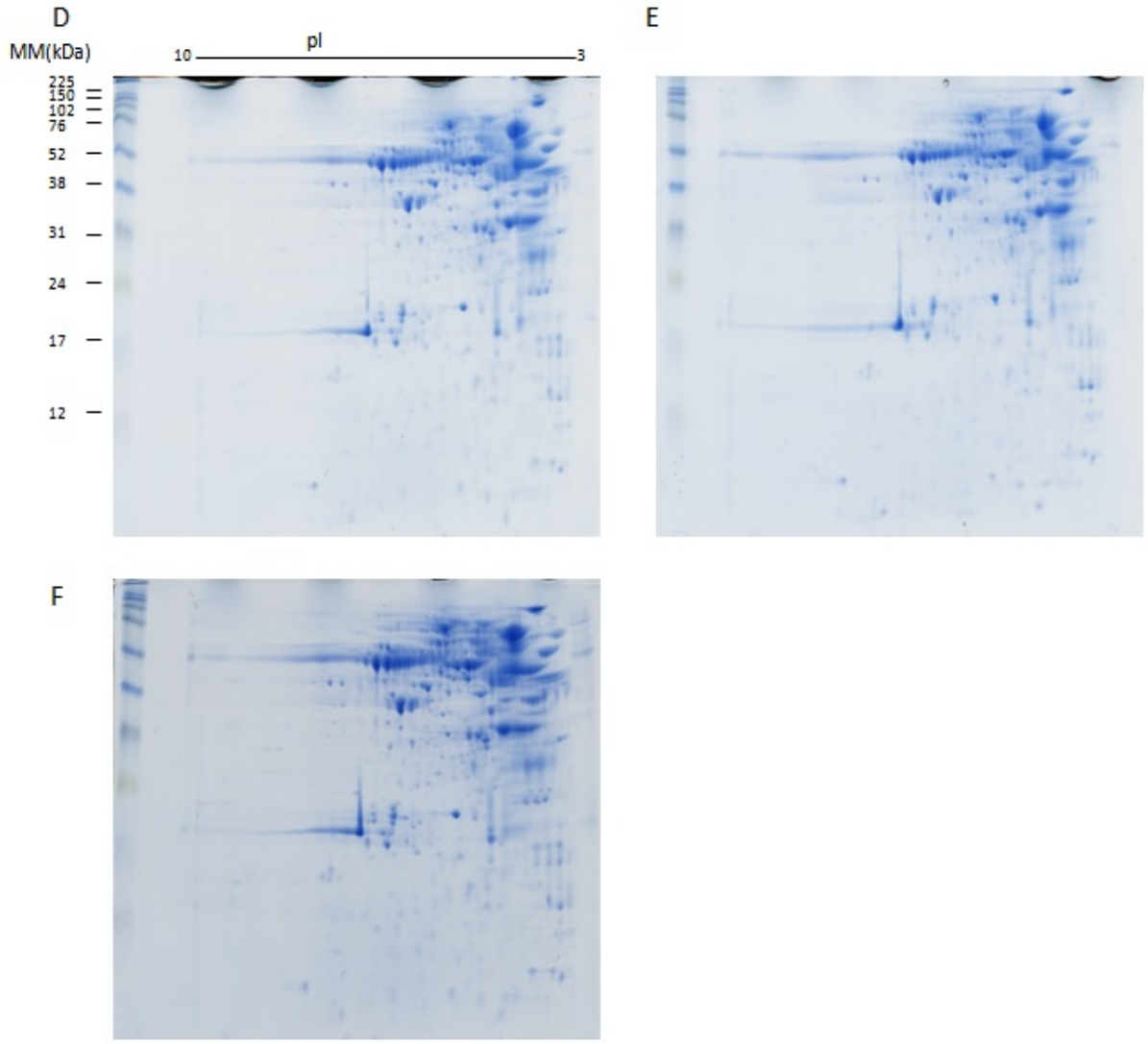


APÊNDICE B

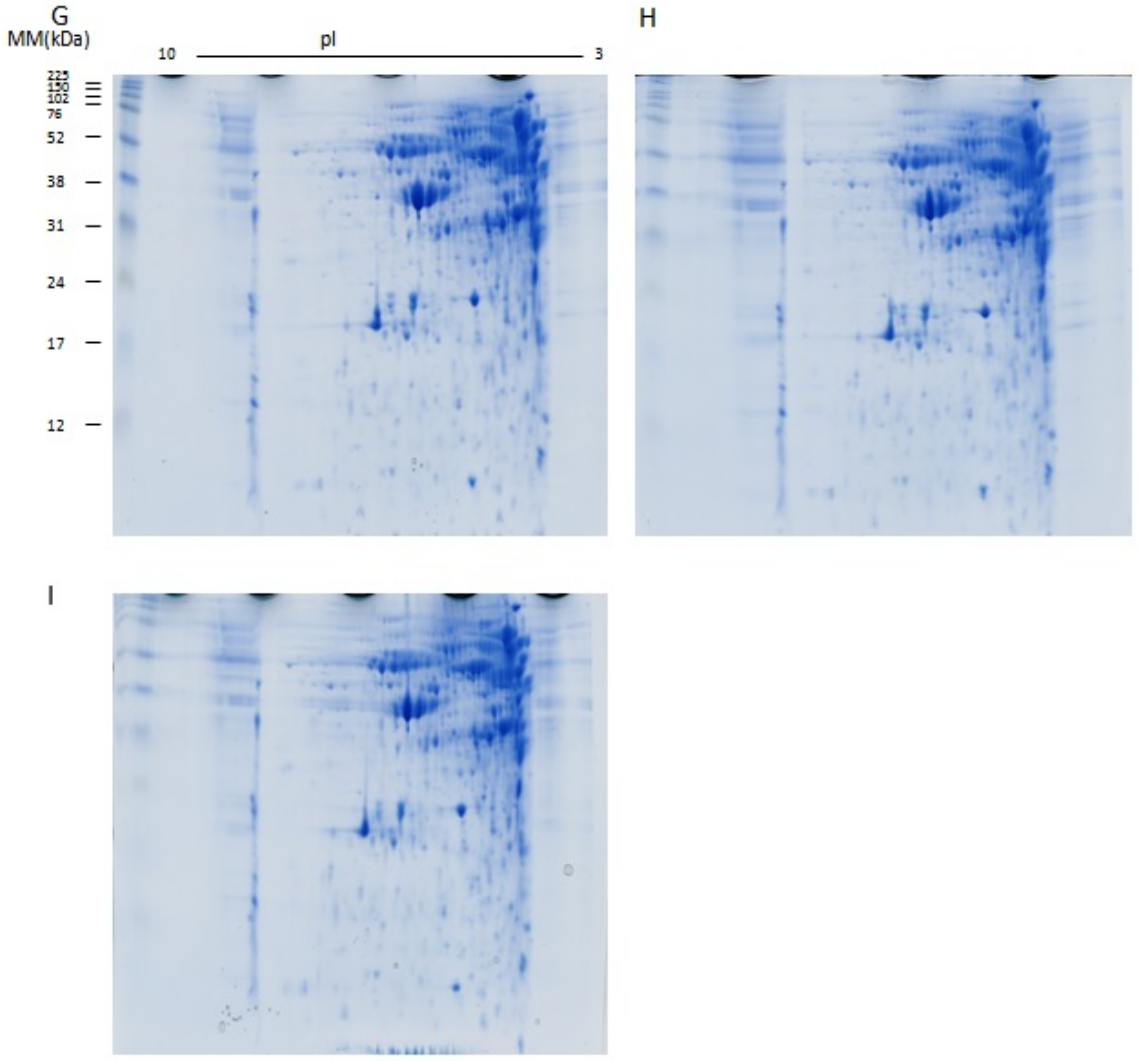
Representação das triplicatas dos géis 2-DE (D, E e F) do efeito do pH 5 correspondentes as proteínas do extrato proteico de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h



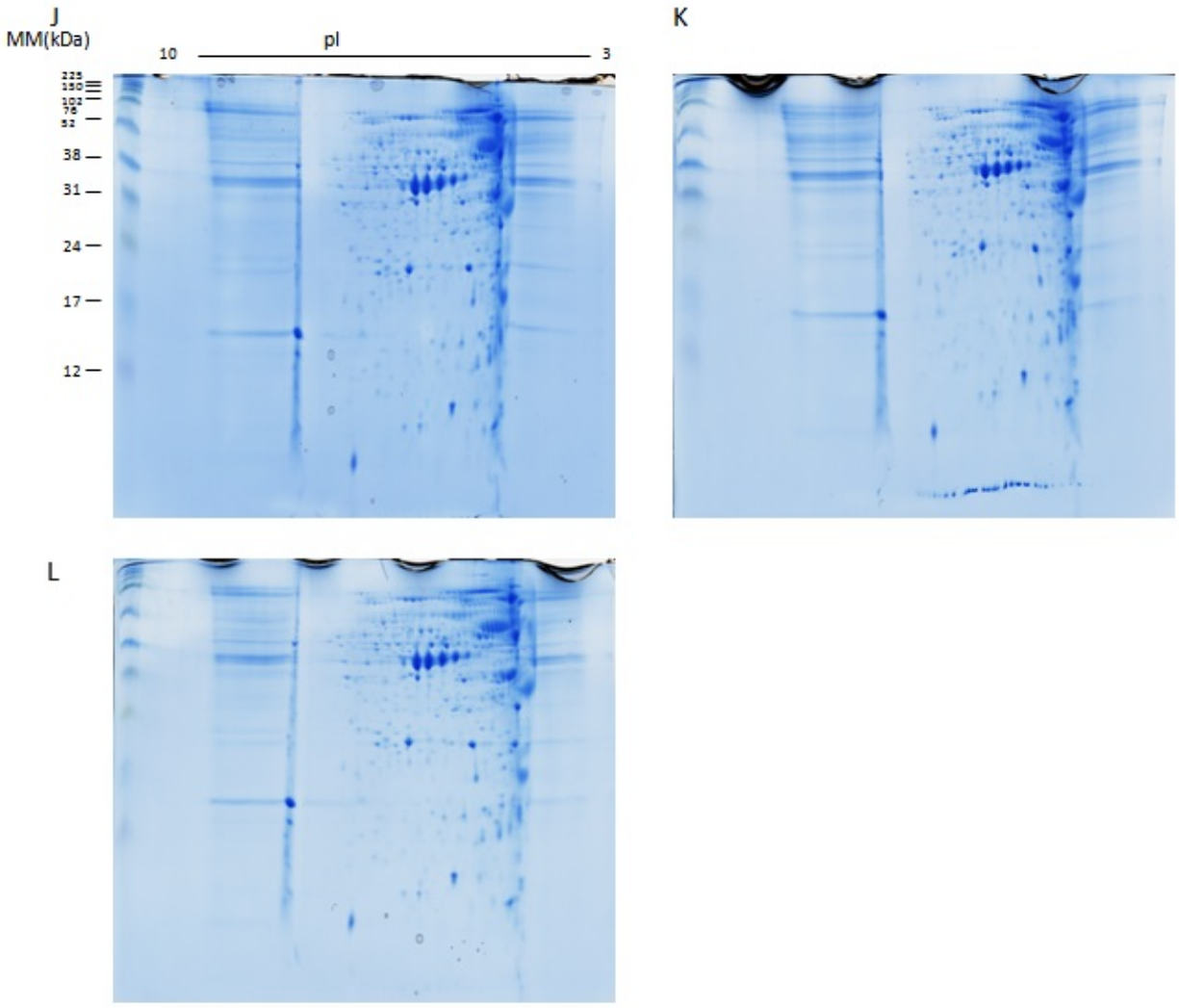
Representação das triplicatas dos géis 2-DE (D, E e F) do efeito do pH 6 correspondentes as proteínas do extrato proteico de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h



Representação das triplicatas dos géis 2-DE (G, H e I) do efeito do pH 7 correspondentes as proteínas do extrato proteico de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h

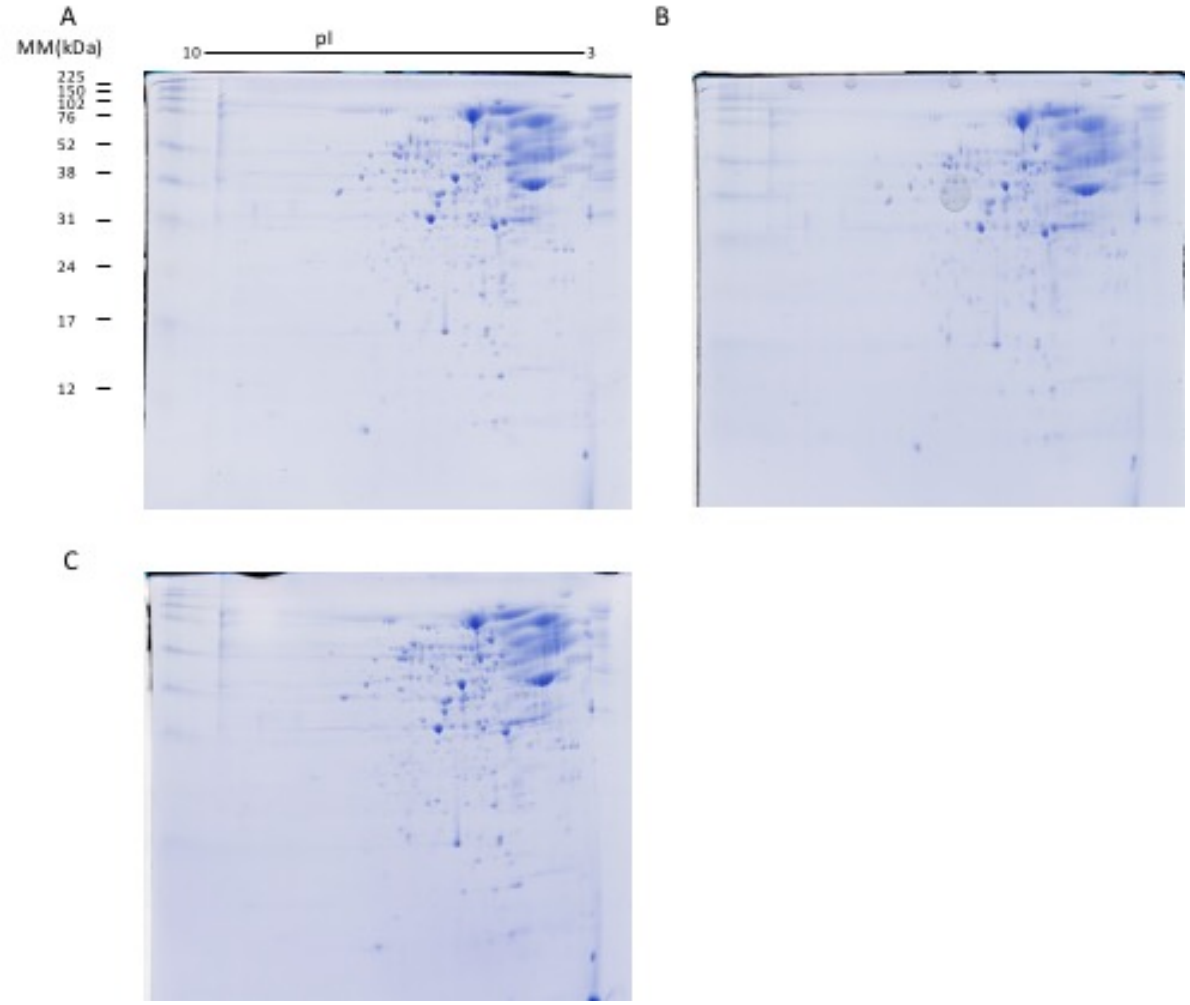


Representação das triplicatas dos géis 2-DE (J, K e L) do efeito do pH 8 correspondentes as proteínas do extrato proteico de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h

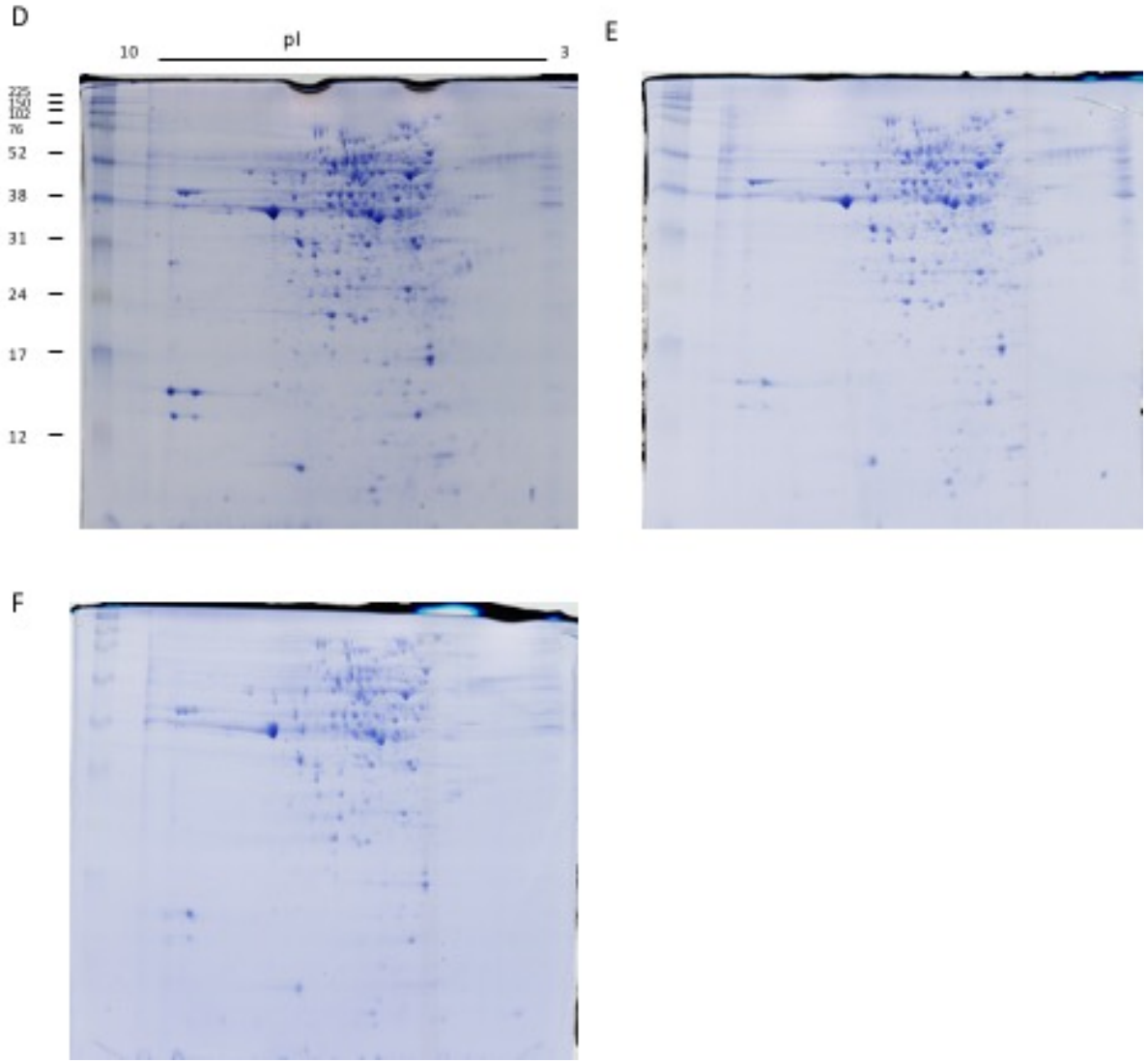


APÊNDICE C

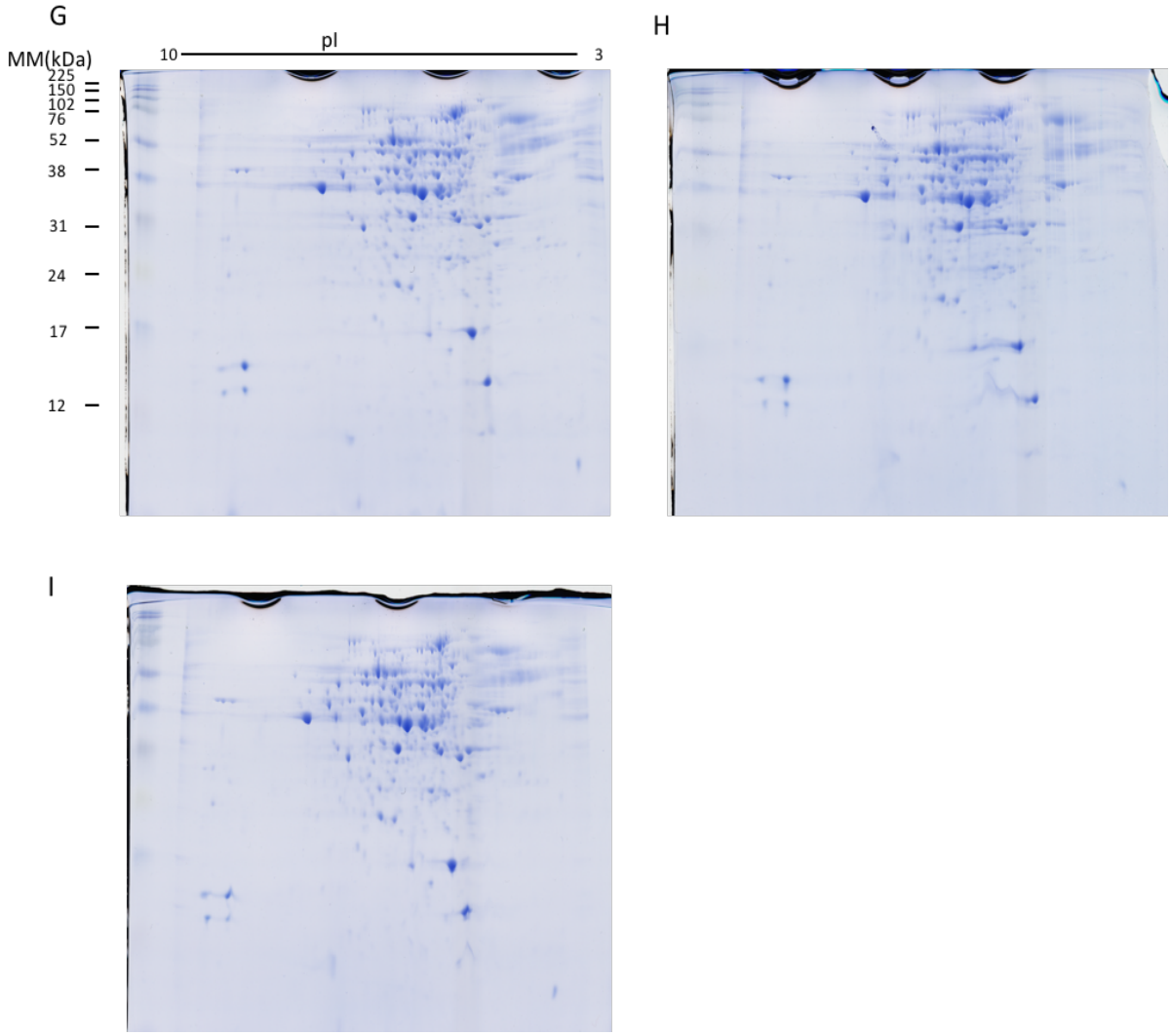
Representação das triplicatas dos géis 2-DE (A, B e C) do efeito de glicose correspondentes as proteínas extraídas do micélio de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h



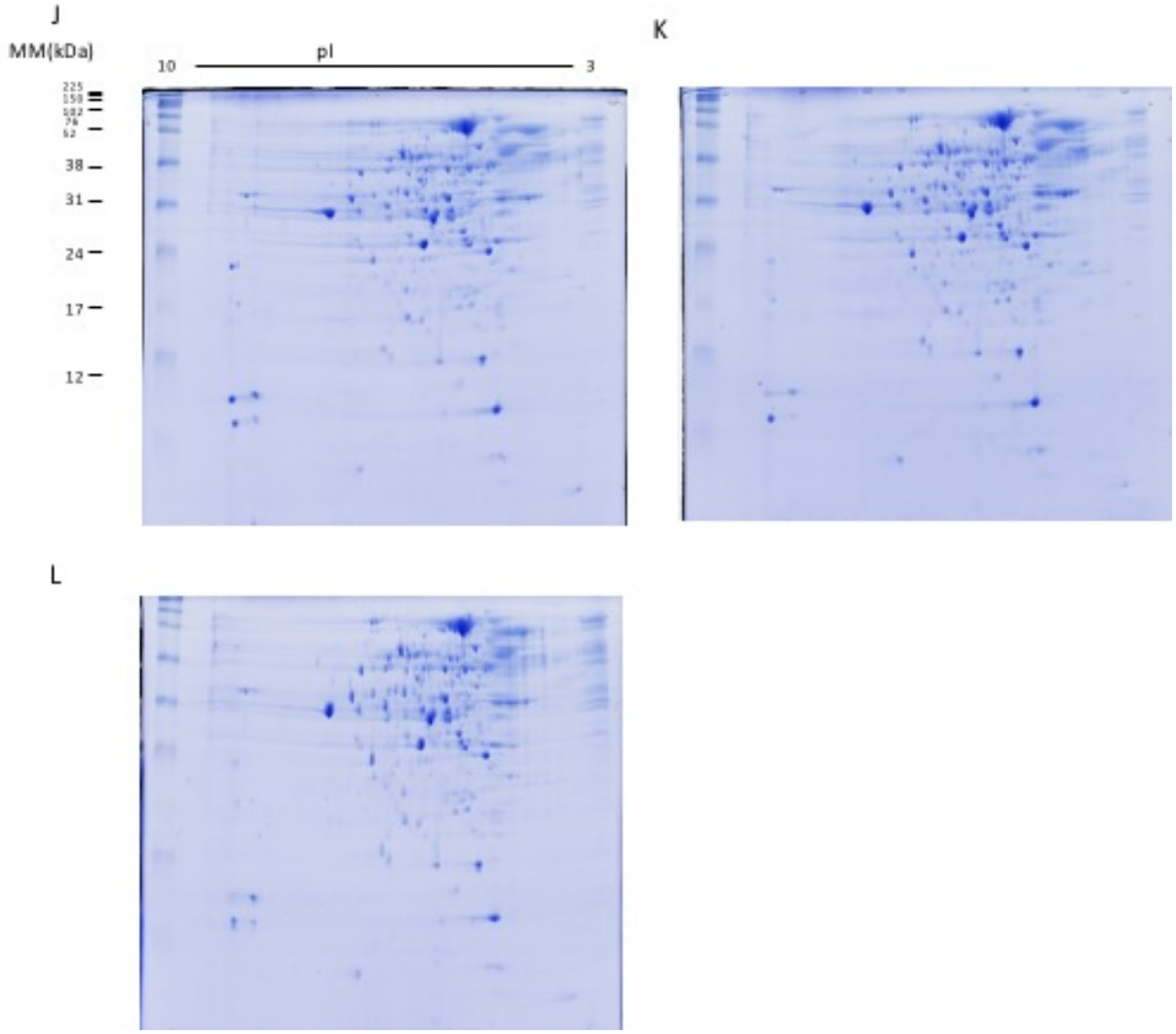
Representação das triplicatas dos géis 2-DE (D, E e F) do efeito de lactose correspondentes as proteínas extraídas do micélio de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h



Representação das triplicatas dos géis 2-DE (G, H e I) do efeito de frutose correspondentes as proteínas extraídas do micélio de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h

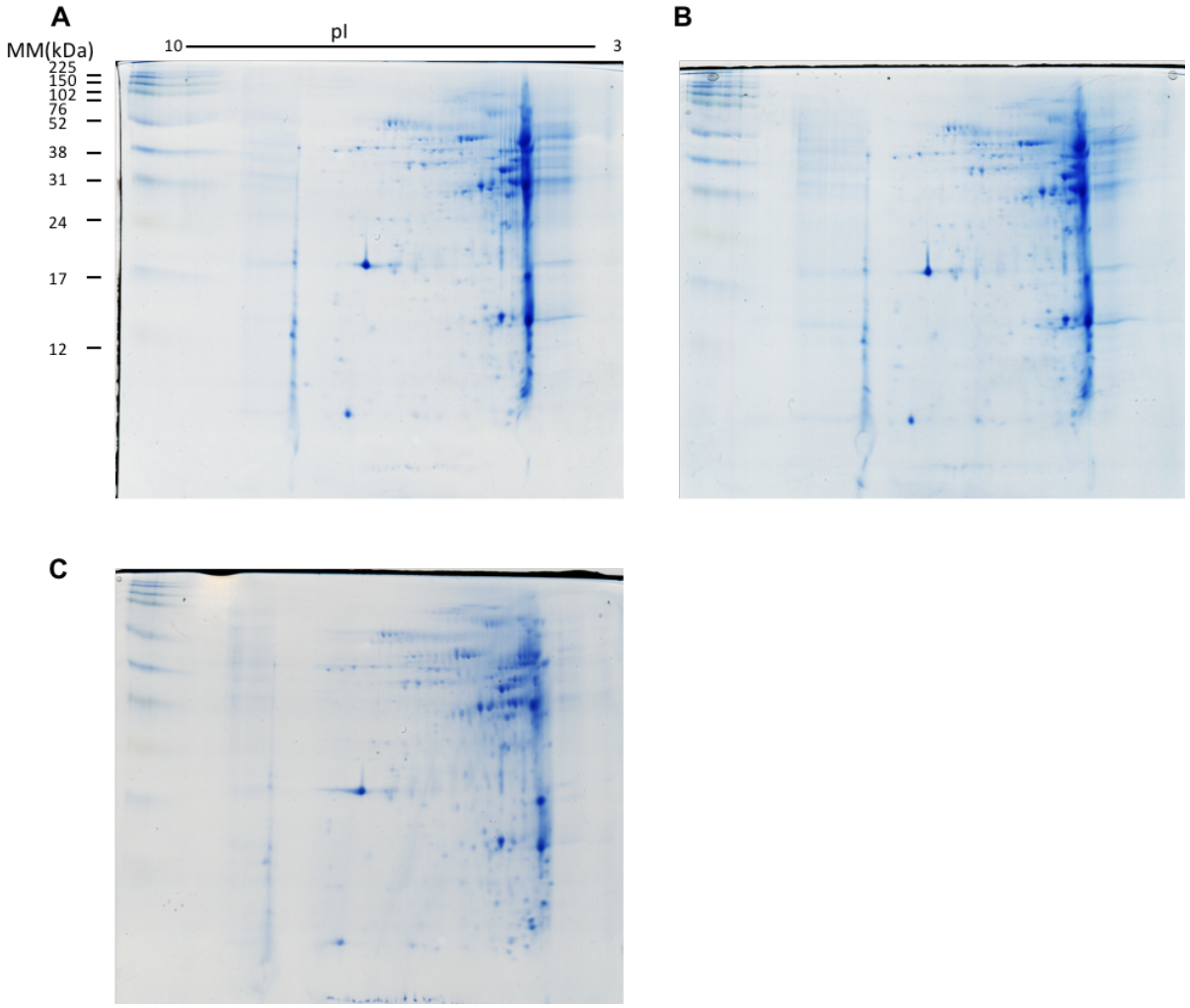


Representação das triplicatas dos géis 2-DE (J, K e L) do efeito de xilose correspondentes as proteínas extraídas do micélio de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h

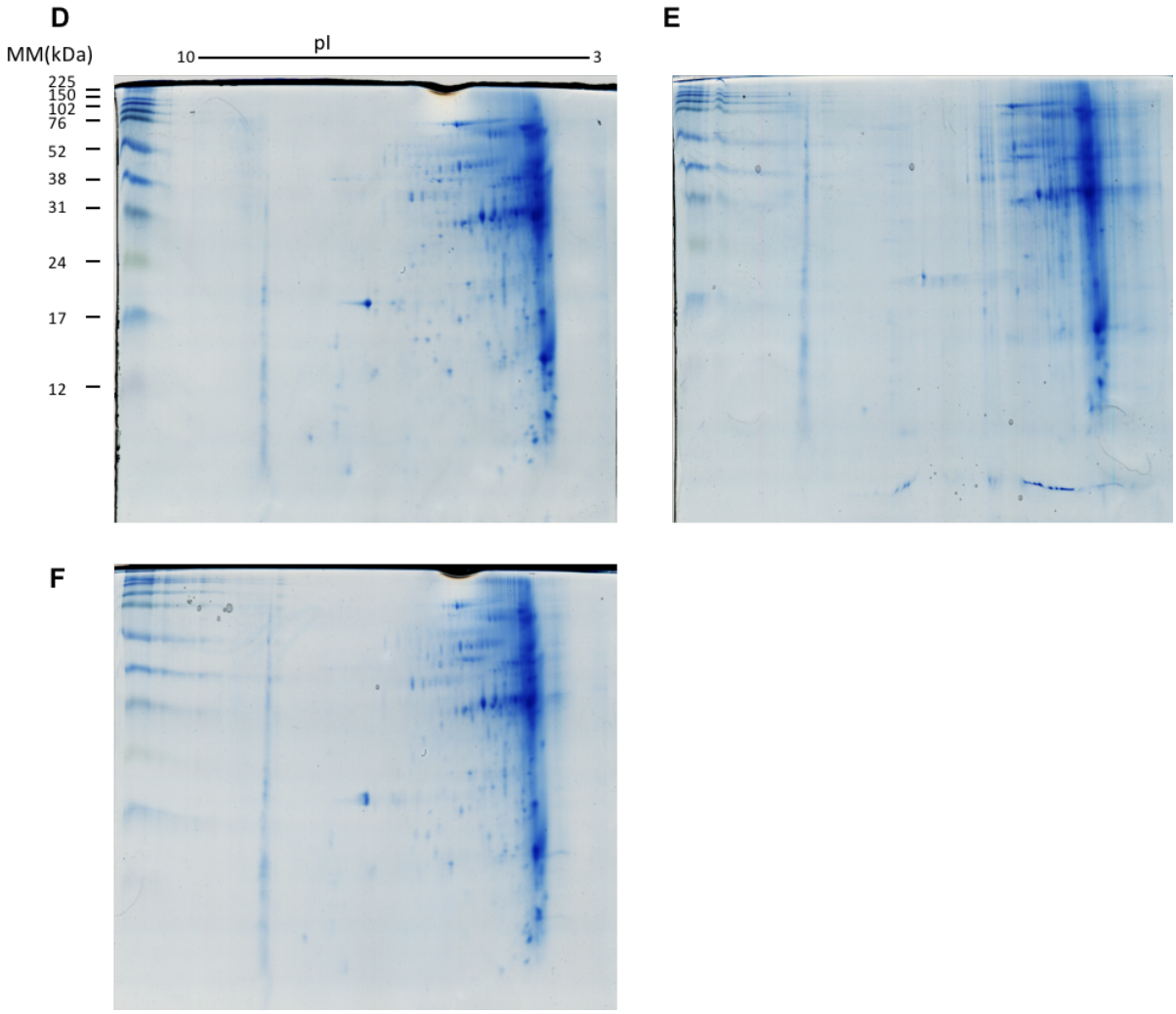


APÊNDICE D

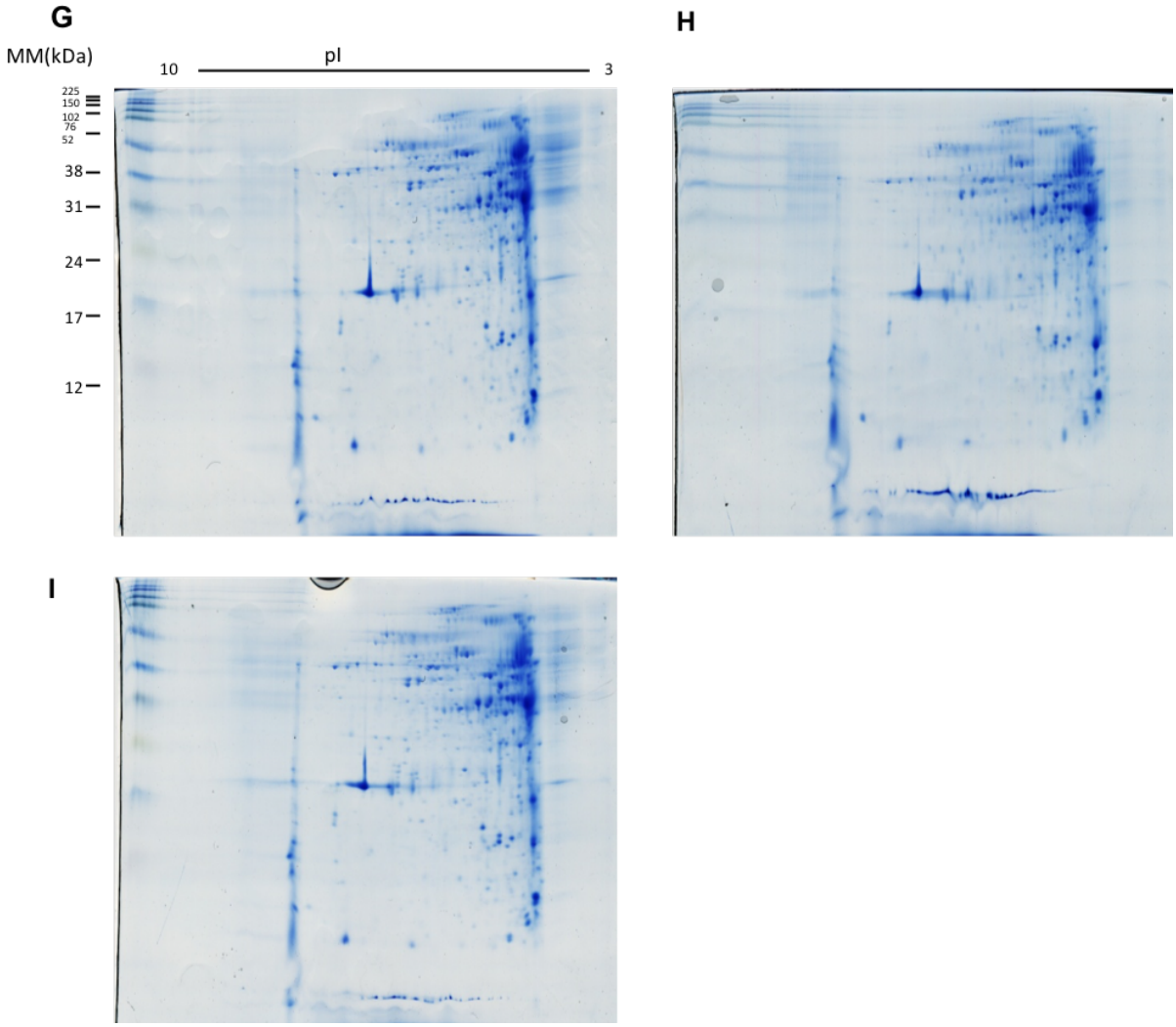
Representação das triplicatas dos géis 2-DE (A, B e C) do efeito de frutose correspondentes as proteínas do extrato proteico de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h



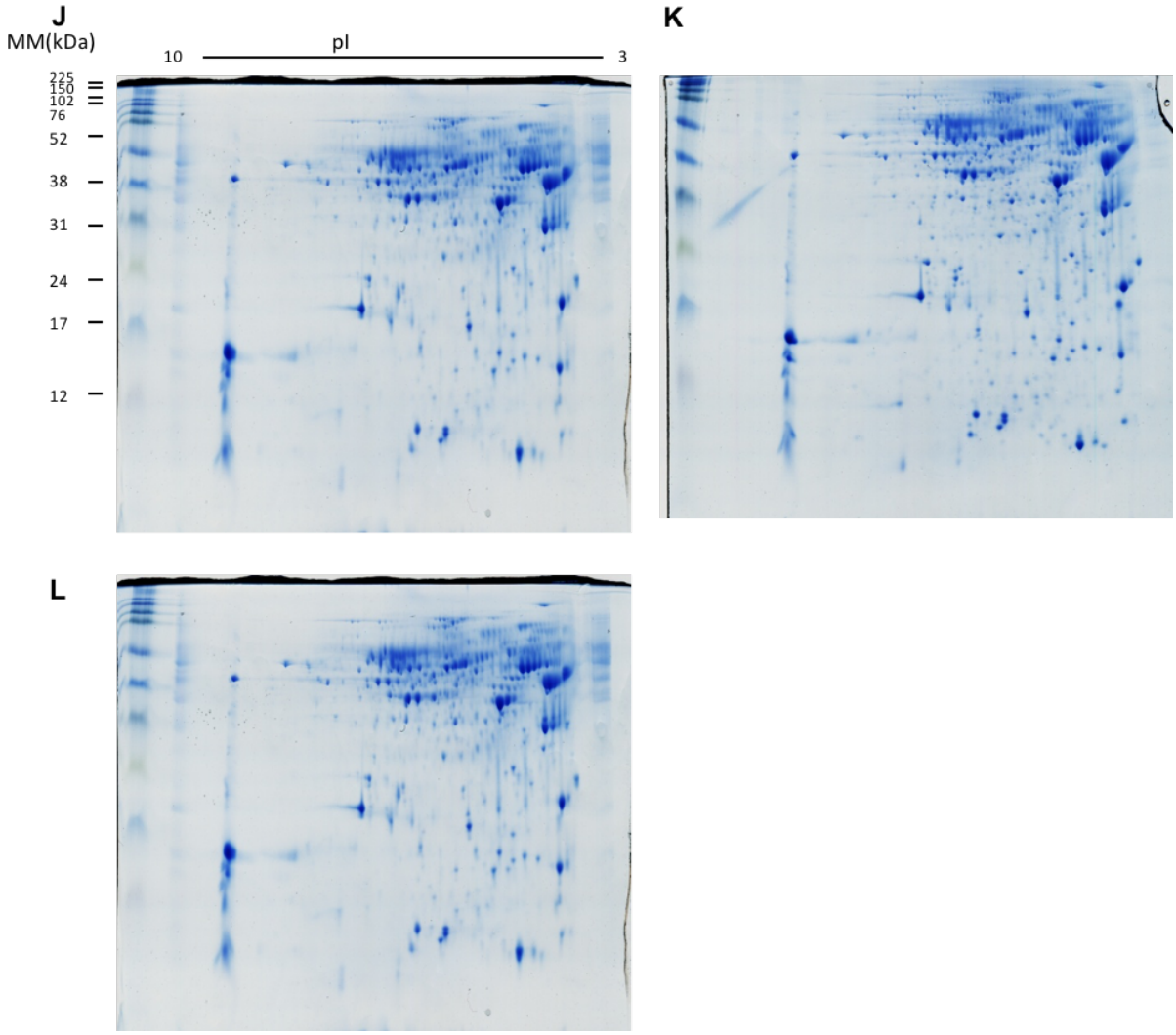
Representação das triplicatas dos géis 2-DE (D, E e F) do efeito de glicose correspondentes as proteínas do extrato proteico de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h



Representação das triplicatas dos géis 2-DE (G, H e I) do efeito de xilose correspondentes as proteínas do extrato proteico de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h

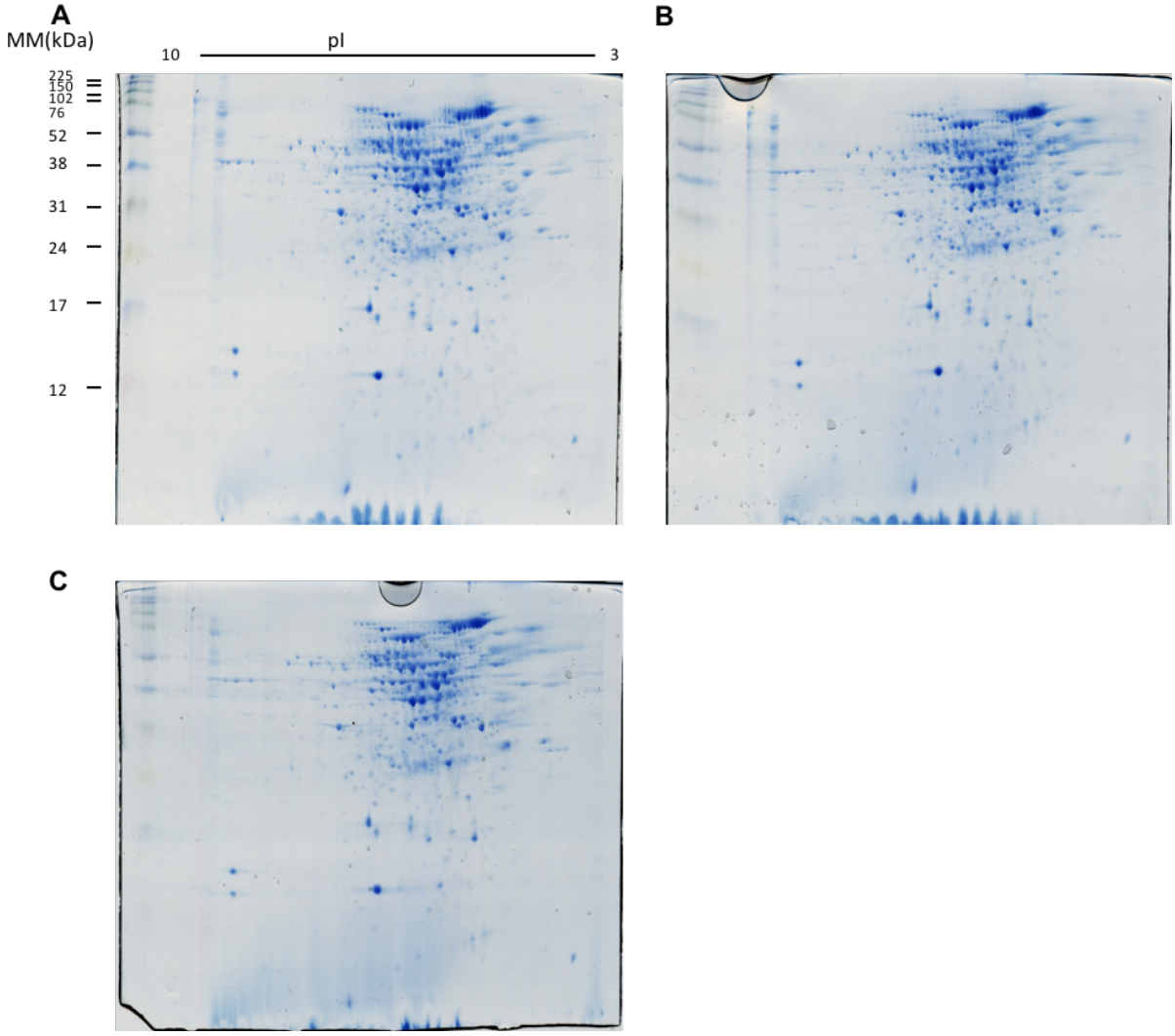


Representação das triplicatas dos géis 2-DE (J, K e L) do efeito de lactose correspondentes as proteínas do extrato proteico de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h

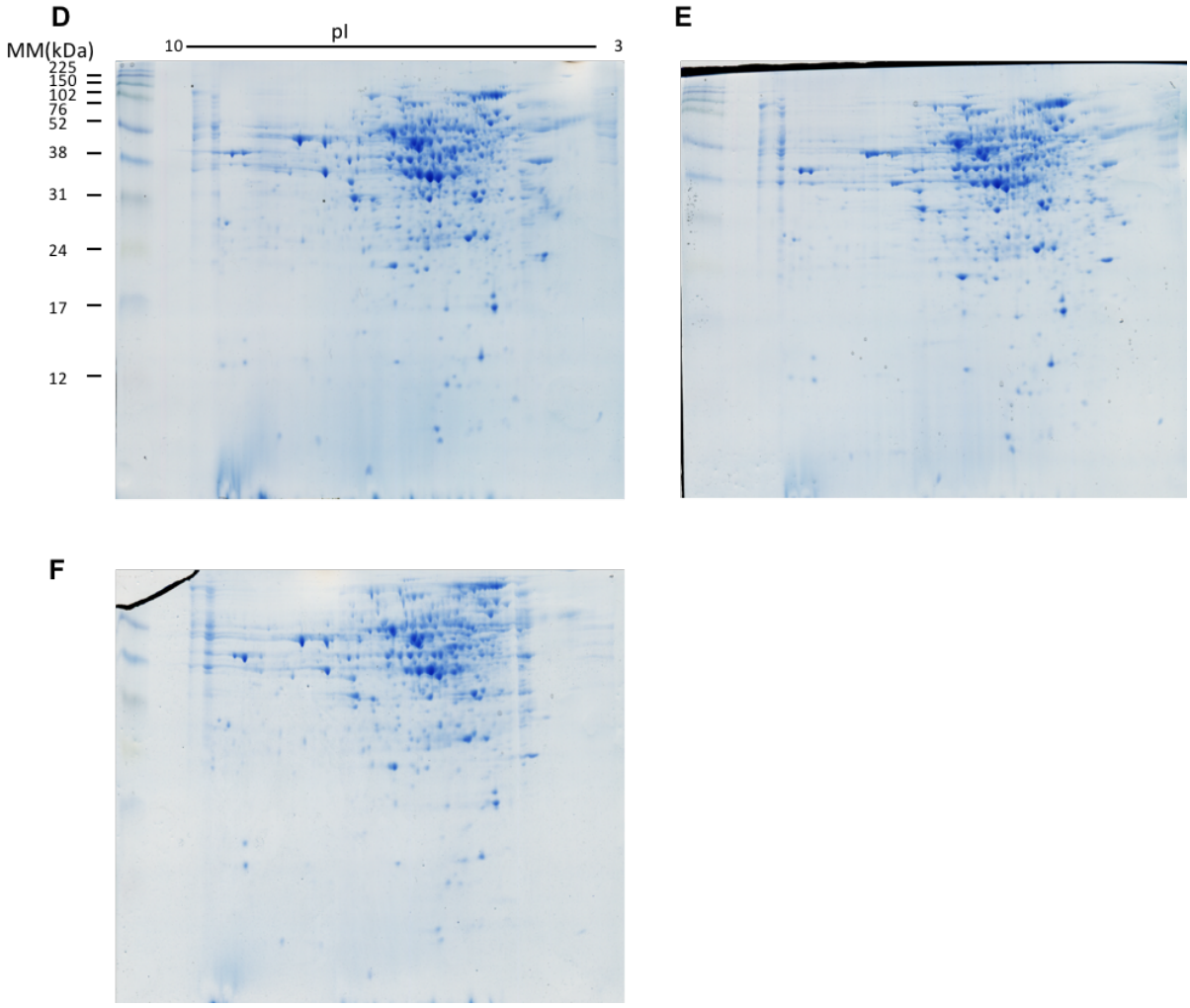


APÊNDICE E

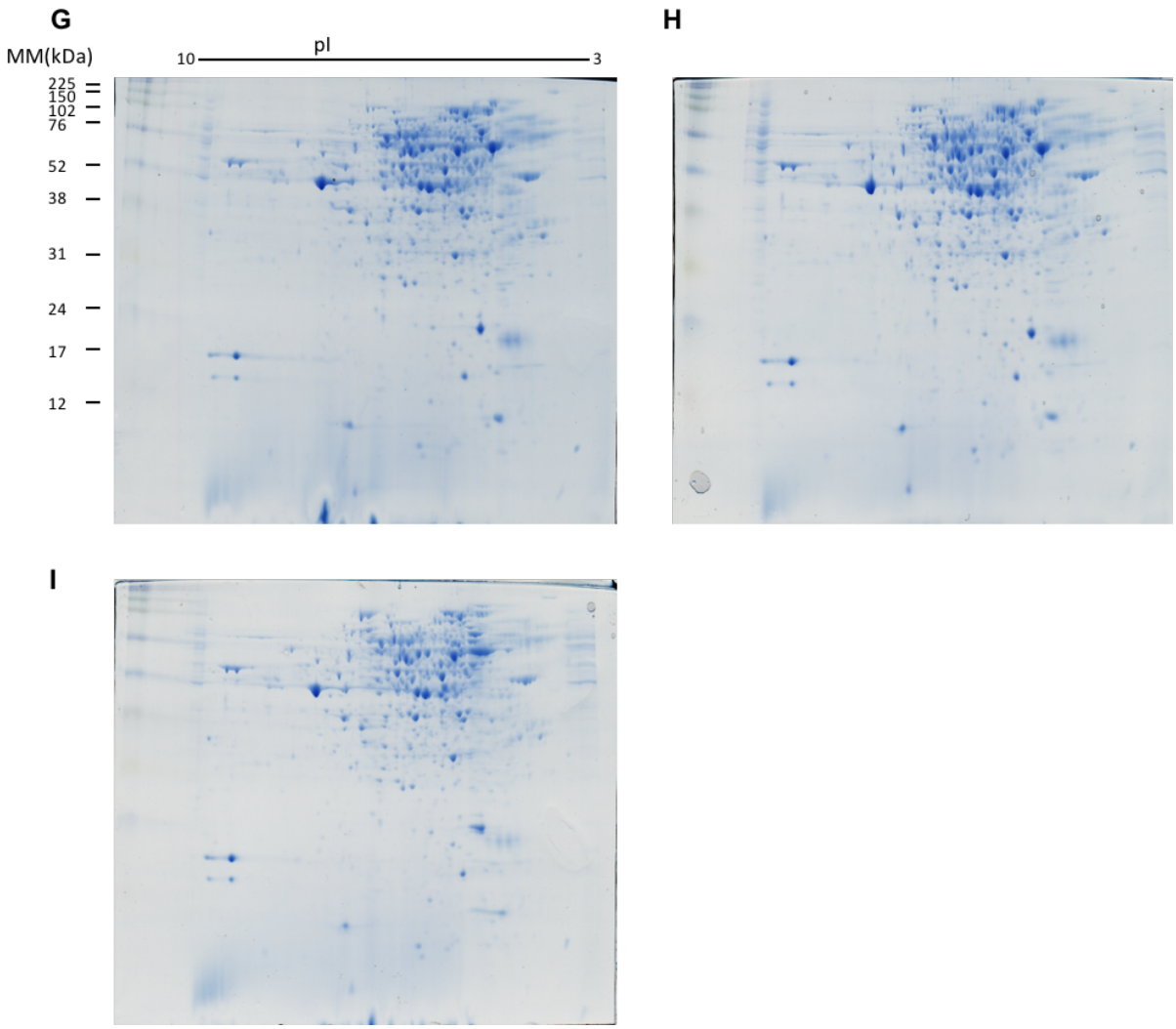
Representação das triplicatas dos géis 2-DE (A, B e C) do efeito de farinha de pena correspondentes as proteínas extraídas do micélio de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h



Representação das triplicatas dos géis 2-DE (D, E e F) do efeito de caseína correspondentes as proteínas extraídas do micélio de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h

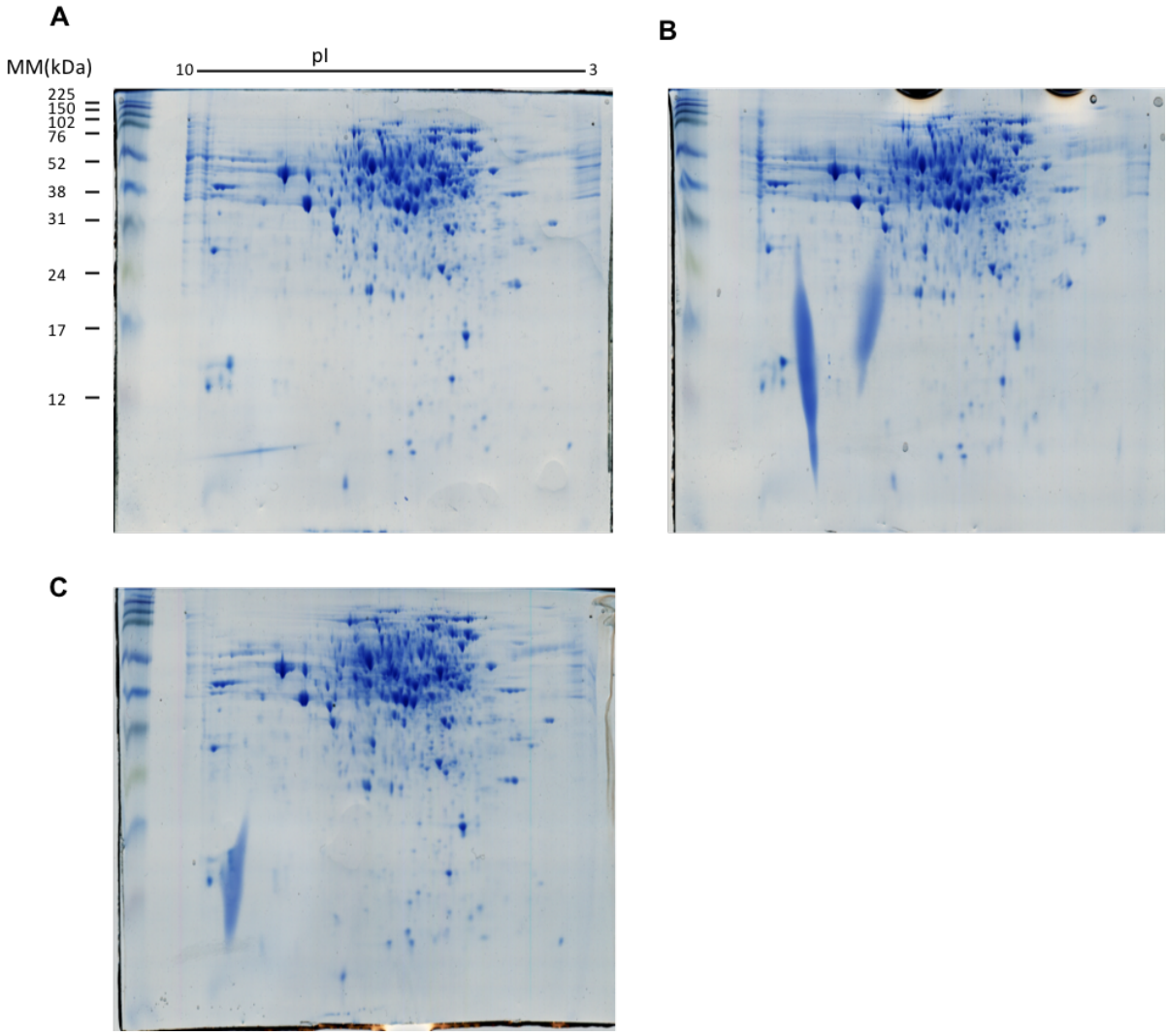


Representação das triplicatas dos géis 2-DE (G, H e I) do efeito de soro de leite correspondentes as proteínas extraídas do micélio de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h

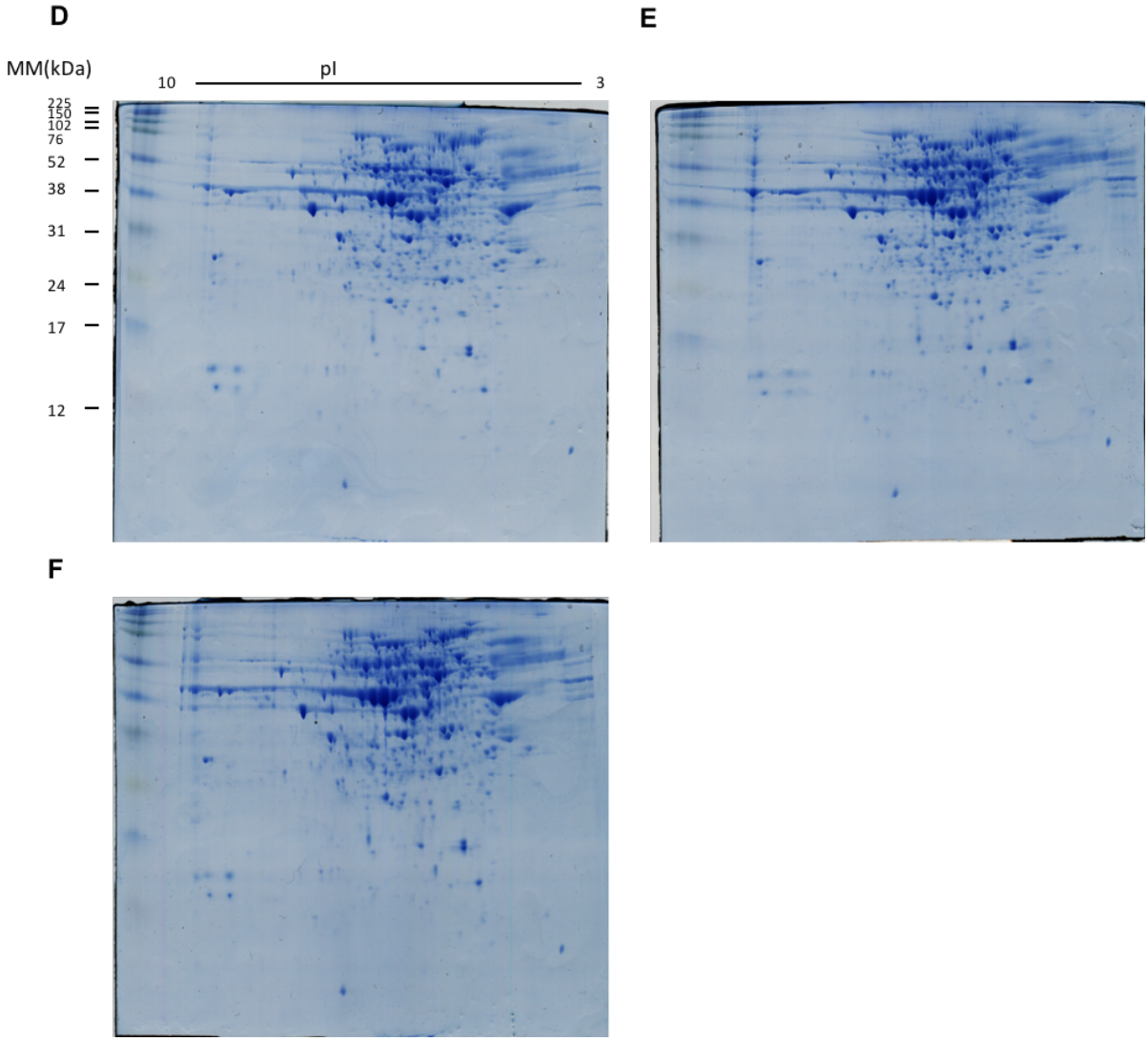


APÊNDICE F

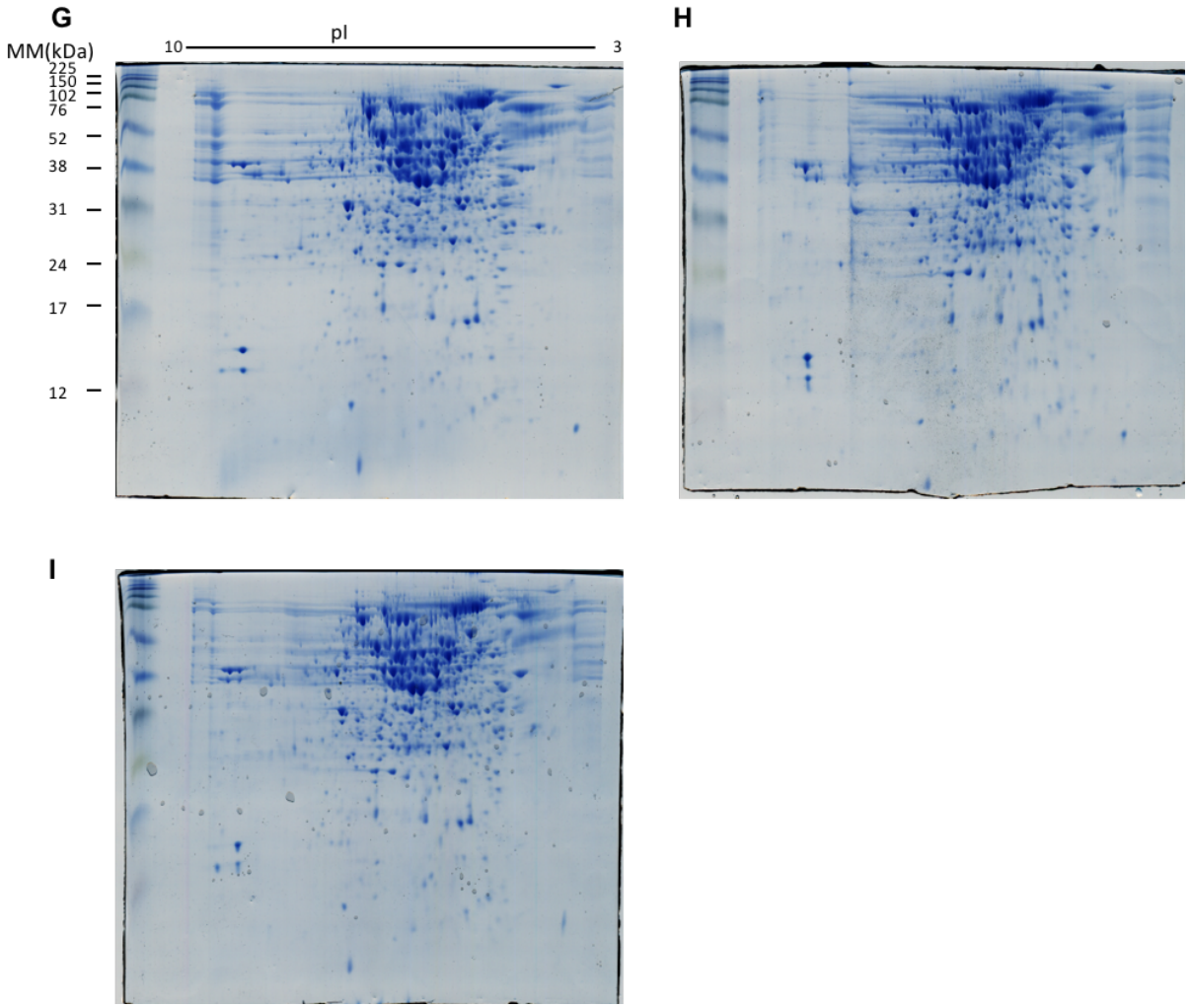
Representação das triplicatas dos géis 2-DE (A, B e C) do efeito de isoleucina correspondentes as proteínas extraídas do micélio de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h



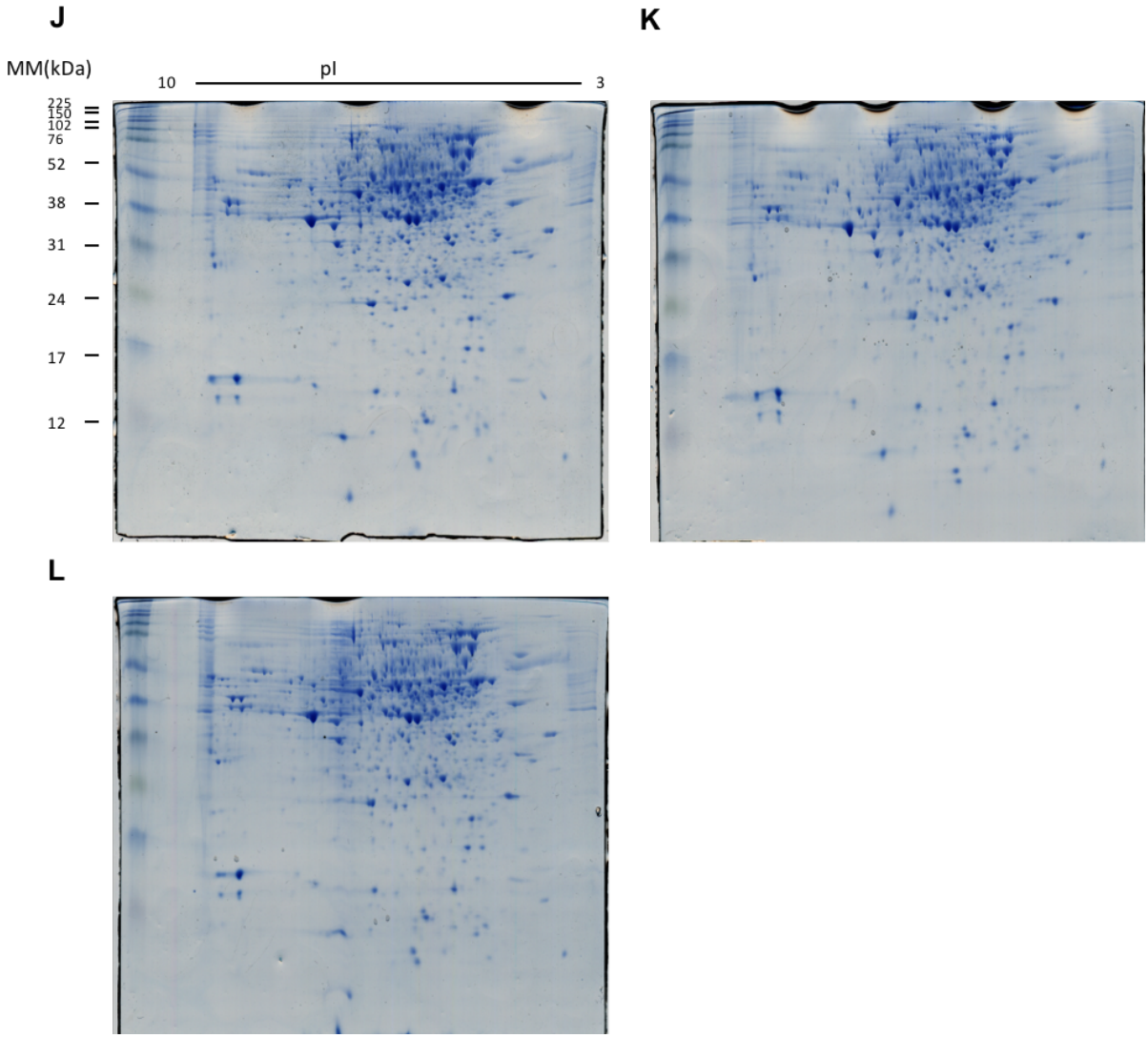
Representação das triplicatas dos géis 2-DE (D, E e F) do efeito de histidina correspondentes as proteínas extraídas do micélio de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h



Representação das triplicatas dos géis 2-DE (G, H e I) do efeito de cisteína correspondentes as proteínas extraídas do micélio de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h

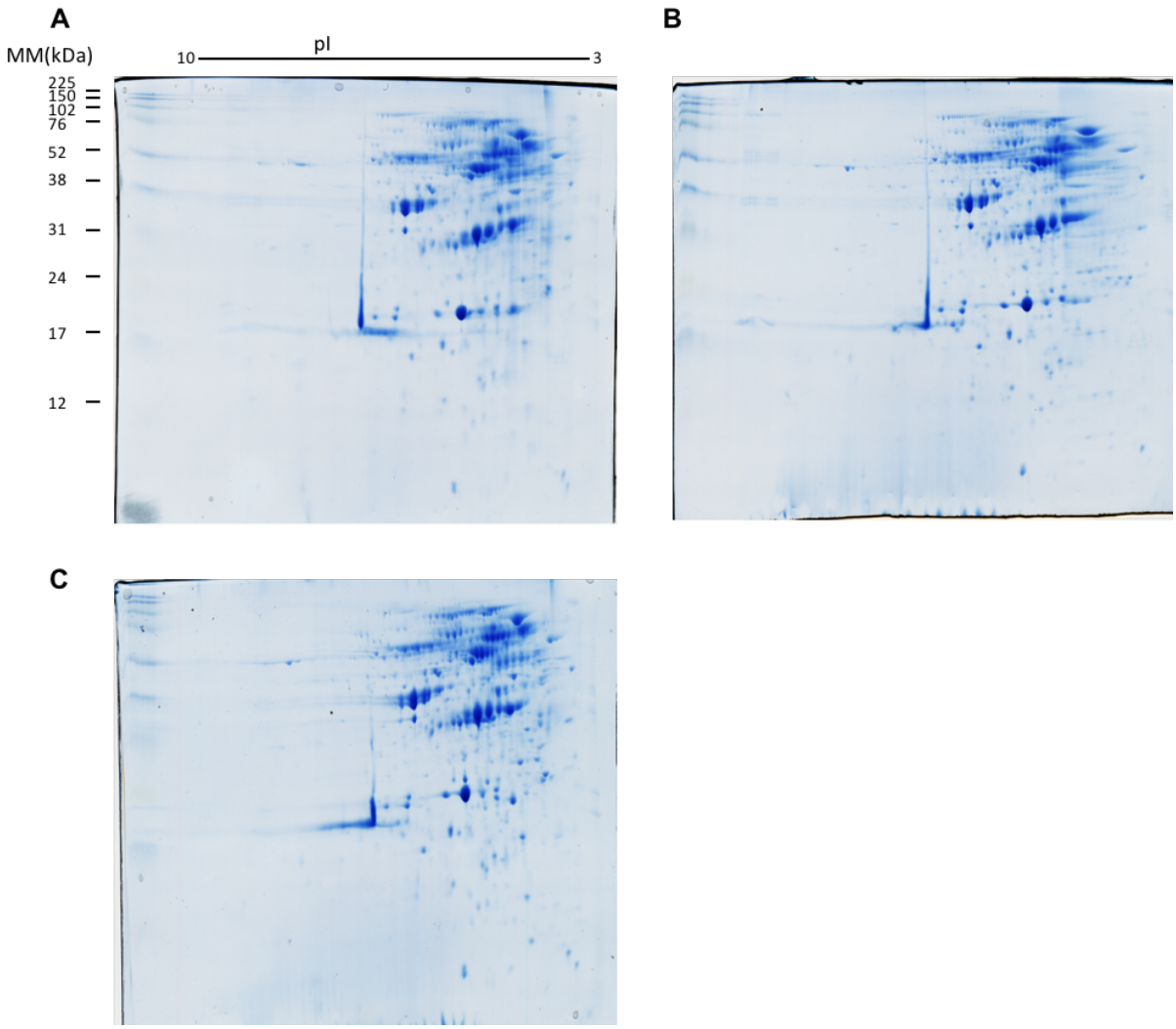


Representação das triplicatas dos géis 2-DE (J, K e L) do efeito de ácido glutâmico correspondentes as proteínas extraídas do micélio de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h

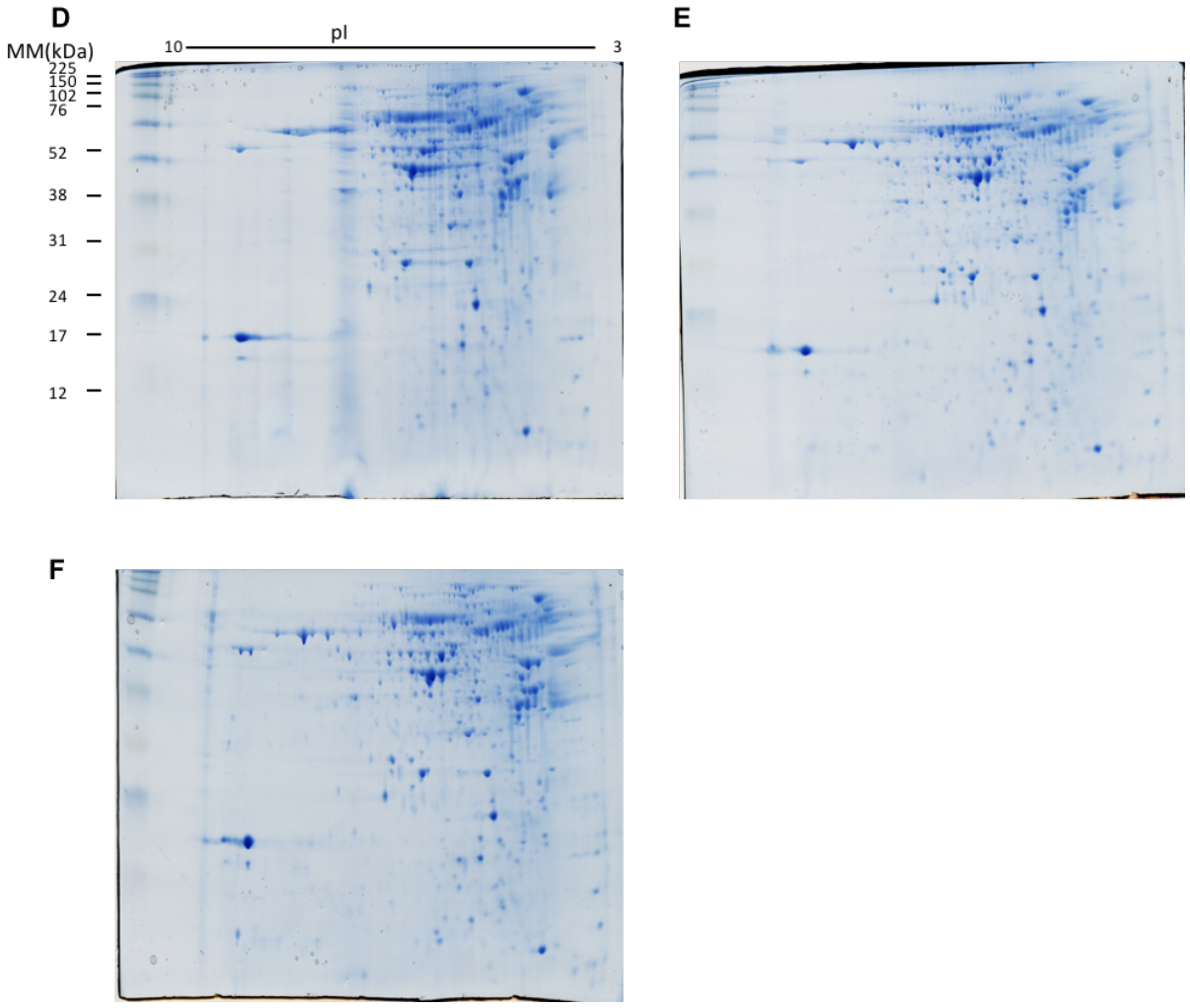


APÊNDICE G

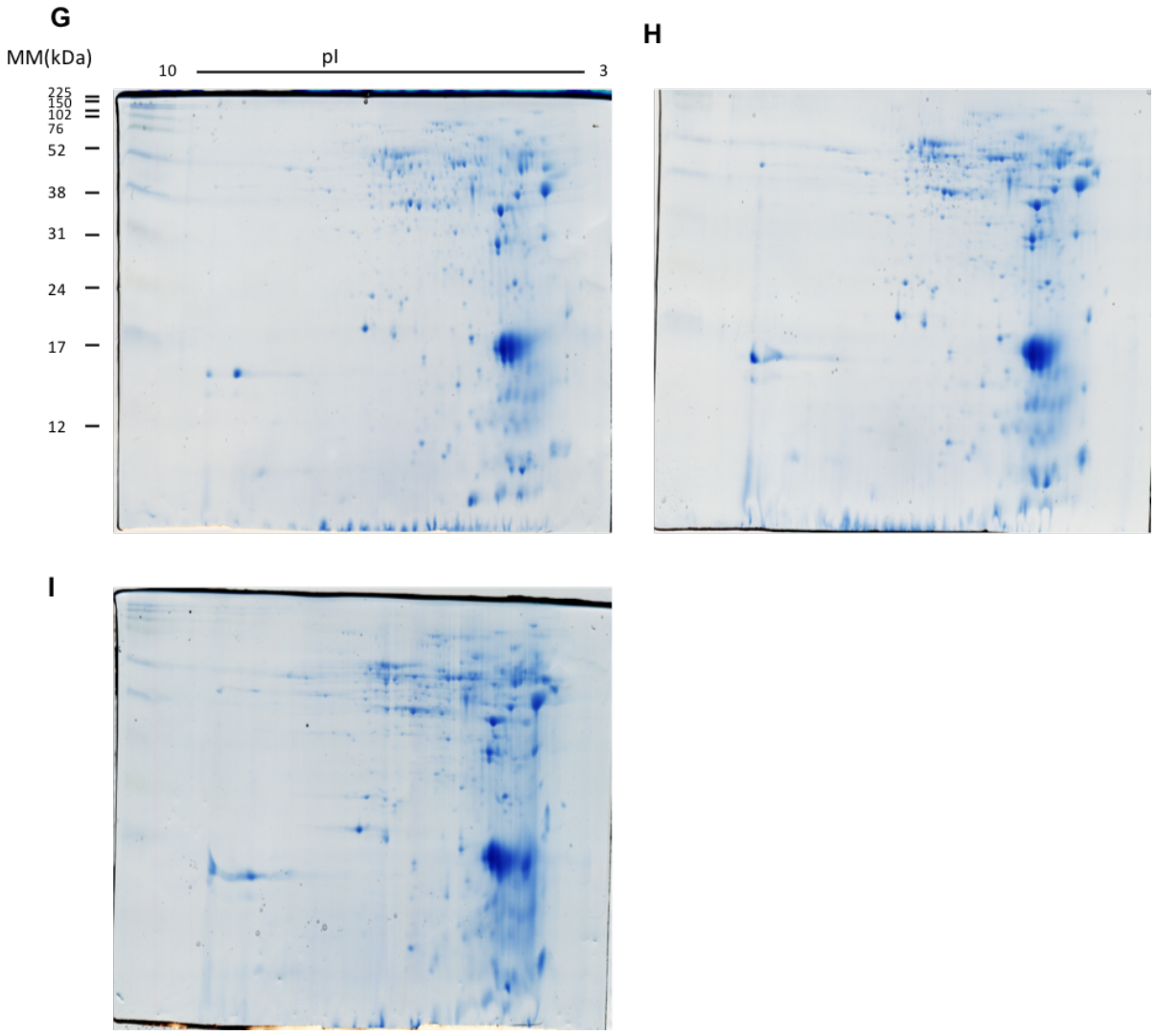
Representação das triplicatas dos géis 2-DE (A, B e C) do efeito de farinha de pena correspondentes as proteínas do extrato proteico de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h



Representação das triplicatas dos géis 2-DE (D, E e F) do efeito de caseína correspondentes as proteínas do extrato proteico de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h

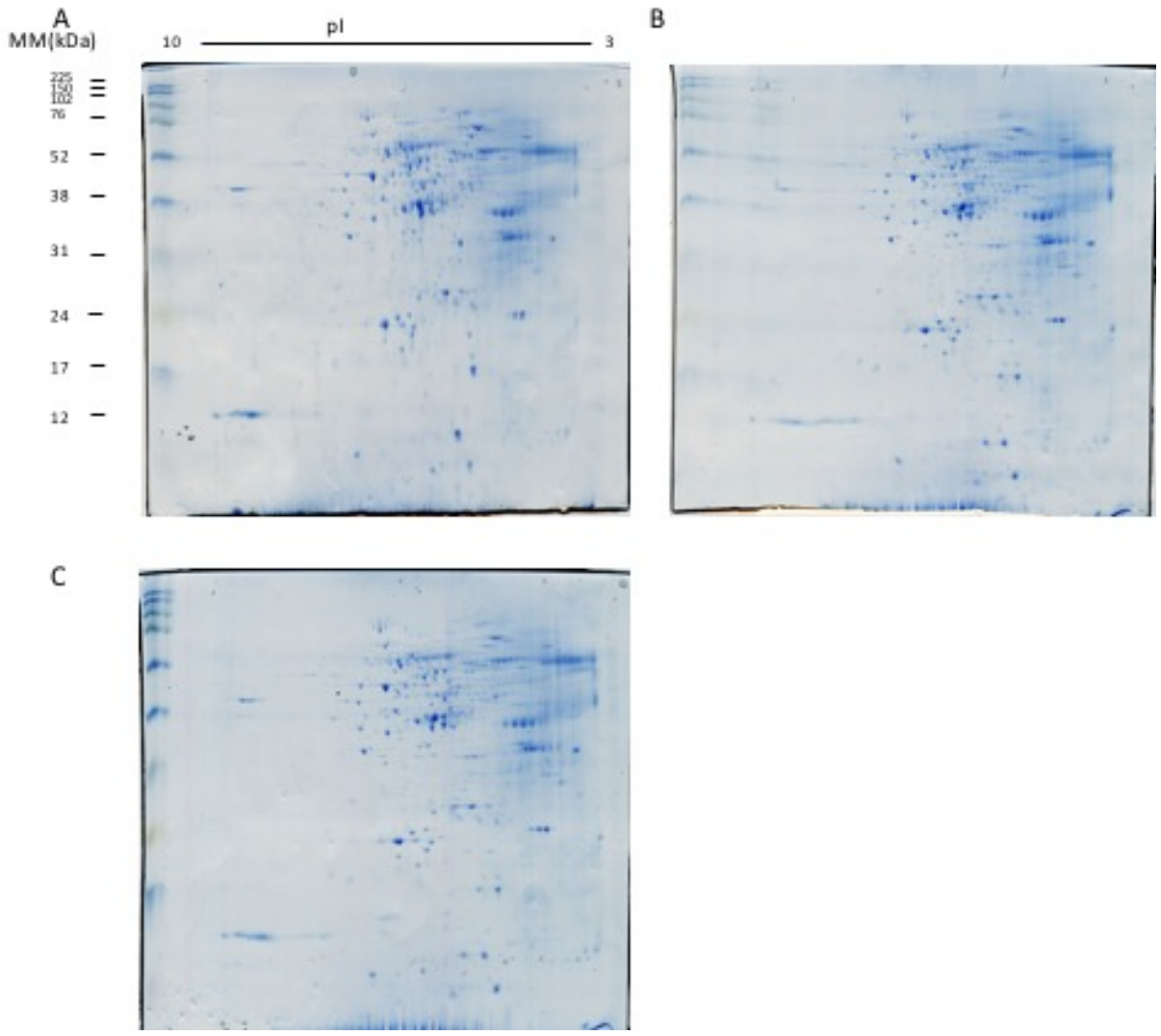


Representação das triplicatas dos géis 2-DE (G, H e I) do efeito de soro de leite correspondentes as proteínas do extrato proteico de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h

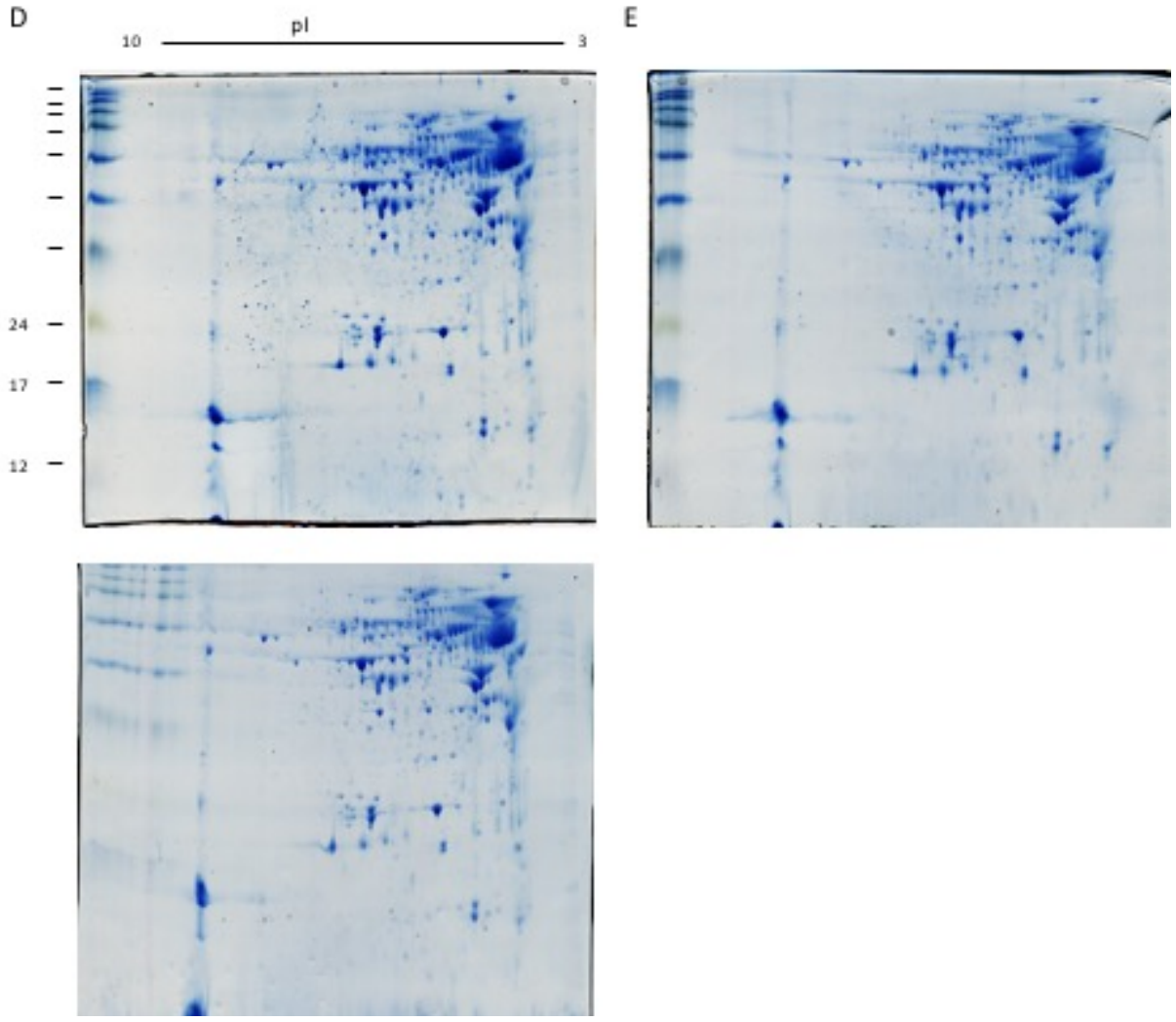


APÊNDICE H

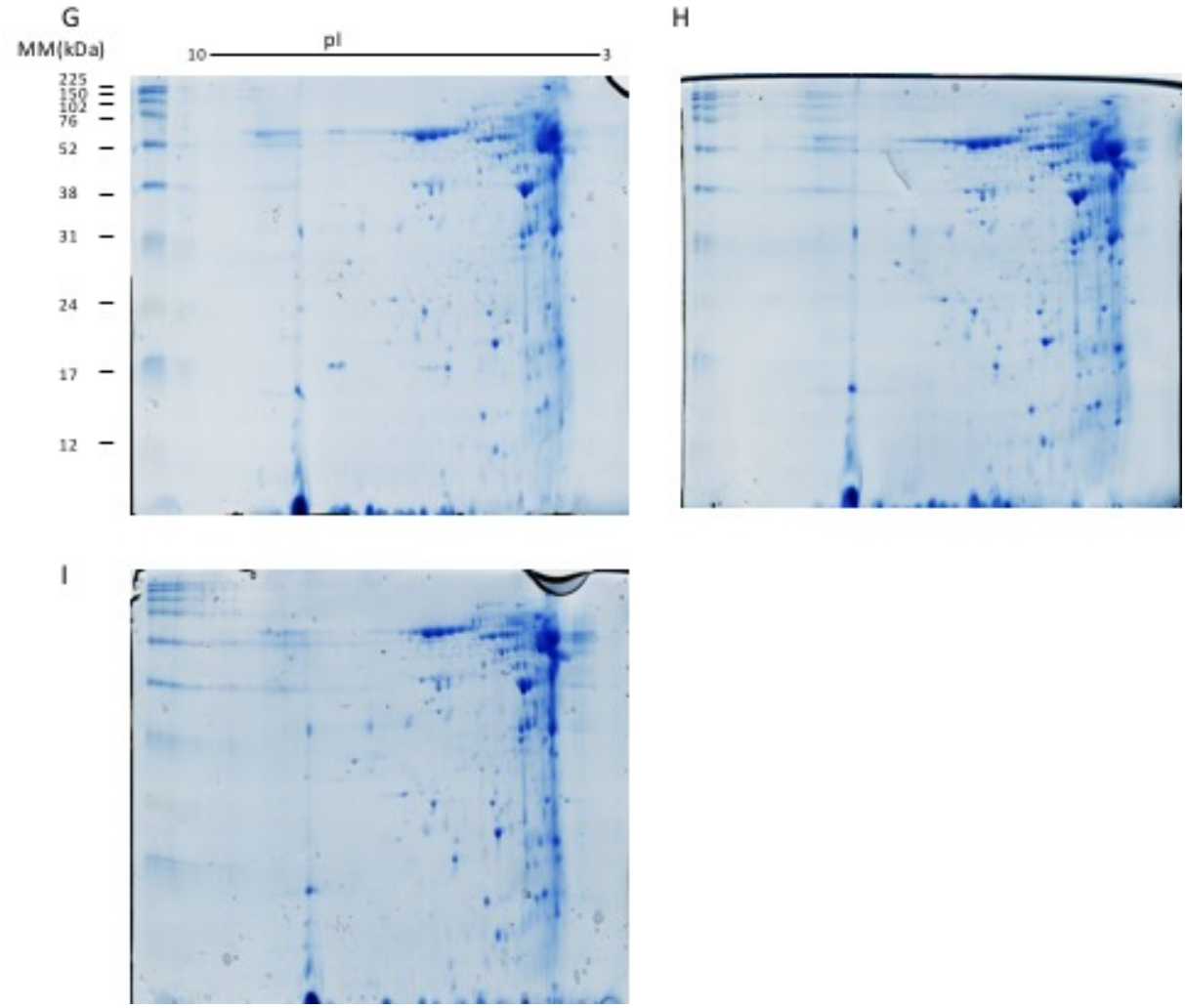
Representação das triplicatas dos géis 2-DE (A, B e C) do efeito de ácido glutâmico correspondentes as proteínas do extrato proteico de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h



Representação das triplicatas dos géis 2-DE (D, E e F) do efeito de histidina correspondentes as proteínas do extrato proteico de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h



Representação das triplicatas dos géis 2-DE (G, H e I) do efeito de isoleucina correspondentes as proteínas do extrato proteico de *A. niveus* submetido ao bioprocesso submerso por 96 h



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SCIENTIA VINCES