UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO E ASSUNTOS ESTUDANTIS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

Isabelle Teixeira Mello

PRODUÇÃO DE HIDROFOBINAS: COMPARAÇÃO ENTRE CEPA SELVAGEM E RECOMBINANTE DE *ASPERGILLUS ORYZAE*

Sorocaba/SP
2025

Isabelle Teixeira Mello

PRODUÇÃO DE HIDROFOBINAS: COMPARAÇÃO ENTRE CEPA SELVAGEM E RECOMBINANTE DE *ASPERGILLUS ORYZAE*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do Diploma de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade de Sorocaba

Orientadora: Profa. Dra. Thais Jardim Oliveira

Sorocaba/SP
2025

Isabelle Teixeira Mello

PRODUÇÃO DE HIDROFOBINAS: COMPARAÇÃO ENTRE CEPA SELVAGEM E RECOMBINANTE DE *ASPERGILLUS ORYZAE*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do Diploma de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade de Sorocaba

Aprovado em: 05 de junho de 2025

BANCA EXAMINADORA:

_____

Profa. Dra. Thais Jardim Oliveira
Universidade de Sorocaba

_____

Prof. Me. Jocimar de Souza
Universidade de Sorocaba

_____

Profa. Ma. Patrícia Lius Melo Alves
Universidade de Sorocaba

Dedico este trabalho a Deus, pela força, sabedoria e bom ânimo concedidas ao longo de toda a caminhada, e à minha família, pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos. Sem vocês, esta conquista não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder força, sabedoria, bom ânimo e perseverança ao longo de toda a minha jornada acadêmica, permitindo finalizar este Trabalho de Conclusão de Curso.

Agradeço com todo o carinho à minha família, pelo apoio em todos os momentos, tanto emocional quanto financeiro. Sem esse suporte, não teria sido possível chegar até aqui.

Expresso também minha sincera gratidão à equipe do Laboratório de Ciências Moleculares (LACIMO) e aos colegas que me acompanharam neste percurso, cuja colaboração foi essencial para a realização deste estudo. Sozinha, certamente não teria sido possível concluí-lo.

Por fim, agradeço aos professores e a toda equipe docente e técnica pelos ensinamentos, incentivo e dedicação ao longo da graduação. Levo comigo os conhecimentos adquiridos com o desejo de contribuir para o avanço e a inovação na área da Biotecnologia.

“*Na verdade, na verdade vos digo que vós chorareis e vos lamentareis, e o mundo se alegrará, e vós estareis tristes; mas a vossa tristeza se converterá em alegria.*” (João 16:20)

“Tenho-vos dito isto, para que em mim tenhais paz; no mundo tereis aflições, mas tende bom ânimo, eu venci o mundo.” (João 16:33)

RESUMO

As hidrofobinas são proteínas anfifílicas produzidas por fungos filamentosos, amplamente exploradas por suas propriedades de autoagregação, adesão a superfícies e funcionalização de materiais. Este trabalho teve como objetivo comparar a produção e a extração de hidrofobinas expressas em *Aspergillus oryzae*, tanto em cepas recombinantes quanto na cepa selvagem RIB40, com foco na recuperação da hidrofobina RolA e da proteína TUB, que possui função semelhante, embora não contenha os resíduos de cisteína conservados típicos das hidrofobinas. As cepas recombinantes foram cultivadas em meio mínimo, com indução da expressão por adição de maltose, enquanto a cepa RIB40 foi utilizada como controle positivo para secreção natural da RolA. A extração da RolA da RIB40 com ácido fórmico foi bem-sucedida, permitindo sua detecção por SDS-PAGE e confirmação por espectrometria de massas. Nas cepas recombinantes, a precipitação com sulfato de amônio não permitiu a visualização clara das proteínas, mas a RolA foi detectada diretamente no sobrenadante da cultura no SDS-PAGE e posteriormente purificada com sucesso por cromatografia de afinidade. A TUB também foi visualizada em SDS-PAGE, com massa compatível com sua forma madura (aprox. 17 kDa). Os resultados indicam que ambas as proteínas foram secretadas pelas cepas recombinantes e recuperadas diretamente do meio, dispensando etapas agressivas de extração. Essa característica representa uma vantagem para aplicações industriais, permitindo a simplificação do processo, redução de custos e menor uso de solventes potencialmente tóxicos.

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*; hidrofobinas; RolA; TUB; proteínas de ligação à superfícies hidrofóbicas; expressão recombinante.

ABSTRACT

Hydrophobins are amphiphilic proteins produced by filamentous fungi, widely explored for their self-aggregation properties, surface adhesion, and material functionalization. This study aimed to compare the production and extraction of hydrophobins expressed by *Aspergillus oryzae*, using both recombinant strains and the wild-type strain RIB40, focusing on the recovery of the hydrophobin RolA and the TUB protein, which has a similar function despite lacking the conserved cysteine residues typical of hydrophobins. The recombinant strains were cultivated in minimal medium with expression induced by maltose addition, while the RIB40 strain was used as a positive control for the natural secretion of RolA. Extraction of RolA from RIB40 using formic acid was successful, allowing its detection by SDS-PAGE and confirmation by mass spectrometry. In the recombinant strains, ammonium sulfate precipitation did not clearly visualize the proteins, but RolA was detected directly in the culture supernatant by SDS-PAGE and was subsequently purified by affinity chromatography. TUB was also visualized by SDS-PAGE, with a molecular weight consistent with its mature form (aprox. 17 kDa). The results indicate that both proteins were secreted by the recombinant strains and recovered directly from the culture medium, eliminating the need for harsh extraction steps. This feature represents an advantage for industrial applications, as it simplifies the process, reduces costs, and minimizes the use of potentially toxic solvents.

Keywords: *Aspergillus oryzae*; hydrophobins; RolA; TUB; hydrophobic surface-binding proteins; recombinant expression.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATPS	Aqueous Two-Phase System (Sistema de Duas Fases Aquosas)
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)
CRISPR-Cas9	*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* com endonuclease associada Cas9
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
EggNog	Ferramenta da predição funcional de proteínas
gRNA	RNA guia
HIS-tag	Histidine Tag (Cauda de histidina)
INTERPRO	Banco de dados de família de proteínas e domínio funcionais
MMG	Minimal Medium with Glucose (Meio Mínimo com Glicose)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Solução Salina Tampão Fosfatada)
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
PFAM	Banco de dados de famílias de proteínas
pfc330	Vetor plasmidial contendo o sistema de expressão Cas9
pUC57	Vetor plasmidial comercial utilizado para clonagem
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SWAI	Enzima de restrição utilizada para digestão de DNA
TFA	Trifluoroacetic Acid (Ácido Trifluoroacético)
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tampão de Tris com ácido clorídrico)
trpC	Terminador do gene da triptofano sintetase de Aspergillus nidulans
UNIPROT	Universal Protein Resource (Recurso Universal de Proteínas)
VinoTaste PRO	Complexo enzimático utilizado para formação de protoplastos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **10**
2 OBJETIVOS **13**
2.1 Objetivo geral 13
2.2 Objetivos específicos 13
3 MATERIAL E MÉTODOS **14**
3.1 Cultivo da cepa RIB40 do fungo A. Oryzae 14
3.2 Extração da hidrofobina RolA na cepa RIB40 14
3.3 Engenheiramento genético para obtenção de cepas recombinantes 15
3.4 Meio de cultura das cepas recombinantes ORY7 16
3.4.1 Meio de crescimento 16
3.4.2 Meio de indução 16
3.5 Extração das proteínas RolA e TUB das cepas recombinantes ORY7 16
3.6 Purificação das proteínas recombinantes da cepa ORY7 17
3.7 Comparação das cepas produzidas 18
3.7.1 Análise da morfologia das colônias das cepas recombinantes 18
3.7.2 Comparação do rendimento da produção das proteínas 18
4 RESULTADOS **19**
4.1 Cultivo da cepa RIB40 de A. oryzae 19
4.2 Extração da hidrofobina RolA da cepa RIB40 19
4.3 Engenheiramento genético para obtenção de cepas recombinantes 21
4.4 Meio de cultura das cepas recombinantes ORY7 24
4.4.1 Meio de crescimento 24
4.4.2 Meio de indução 24
4.5 Extração das proteínas RolA e TUB das cepas recombinantes ORY7 25
4.6 Purificação das proteínas RolA e TUB das cepas recombinantes 27
4.7 Comparação das cepas produzidas 28
4.7.1 Análise da morfologia das colônias das cepas recombinantes 28
4.7.2 Comparação do rendimento da produção das proteínas 29
5 CONCLUSÃO **31**
6 REFERÊNCIAS **32**

1 INTRODUÇÃO

As hidrofobinas são proteínas anfipáticas de baixo peso molecular, produzidas exclusivamente por fungos filamentosos. Essas proteínas desempenham um papel crucial em diversas etapas do ciclo de vida fúngico, como a formação de estruturas aéreas - hifas e esporos - e a proteção contra condições ambientais adversas. Sua estrutura é caracterizada pela presença de oito resíduos de cisteína altamente conservados, que formam quatro pontes dissulfeto, conferindo-lhes uma conformação terciária estável e propriedades anfipáticas únicas (BERGER & SALLADA, 2019).

As hidrofobinas são tradicionalmente classificadas em duas classes principais (I e II), com base em suas propriedades estruturais e funcionais. Além disso, há evidências de uma possível classe III, que apresenta características ainda não completamente compreendidas. As hidrofobinas de classe I formam estruturas altamente estáveis chamadas "*rodlets*", que são resistentes a solventes comuns e só podem ser dissociadas com o uso de ácidos ou solventes fortes (LINDER et al., 2005). Essas estruturas são encontradas principalmente em esporos e são essenciais para a proteção contra dessecação e outras condições ambientais extremas. A estabilidade das hidrofobinas de classe I é atribuída à presença de *loops* ricos em aminoácidos hidrofóbicos entre os resíduos de cisteína, que interagem com superfícies sólidas e auxiliam na formação dos *rodlets* (BERGER & SALLADA, 2019).

As hidrofobinas de classe II, por outro lado, formam monocamadas auto-organizadas e são mais solúveis em detergentes e solventes orgânicos. Diferentemente das hidrofobinas de classe I, as de classe II não formam *rodlets*, mas agregados maiores, descritos como agulhas ou fibrilas (LINDER et al., 2005). Essas características tornam as hidrofobinas de classe II mais fáceis de extrair, mas também menos estáveis em condições extremas. Um exemplo bem conhecido de hidrofobinas de classe II são as proteínas HFBI e HFBII, produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei* (VEREMAN et al., 2021).

Recentemente, tem sido sugerida a existência de uma classe III de hidrofobinas, que apresenta características intermediárias entre as classes I e II. Essas proteínas não seguem claramente os padrões de solubilidade e hidropatia típicos das duas classes convencionais, o que dificulta sua classificação (JENSEN et al., 2010). Algumas hidrofobinas de *Aspergillus* e *Trichoderma* apresentam estruturas e perfis hidrofóbicos diferenciados, sugerindo que podem pertencer a essa nova subclasse (SEIDL-SEIBOTH et al., 2011). A classe III pode ter funções específicas ainda não completamente elucidadas, mas sua descoberta abre novas possibilidades para aplicações biotecnológicas.

Dentre os fungos filamentosos, o gênero *Aspergillus* se destaca como uma das mais significativas devido à sua capacidade de produzir uma grande variedade de enzimas e metabólitos de interesse comercial (SHAMIM et al., 2016). Entre elas, a espécie *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*) possui uma longa história de uso na fermentação de alimentos tradicionais, como missô e shoyu, e se destaca por sua habilidade de secretar altas concentrações de proteínas no meio de cultura, tornando-se uma excelente plataforma para produção em larga escala de moléculas de valor comercial (DABA et al., 2021) Além disso, seu status de segurança (GRAS) e o sequenciamento completo de seu genoma permitem o desenvolvimento de cepas geneticamente modificadas com maior capacidade produtiva, ampliando ainda mais seu potencial de aplicação industrial (DABA et al, 2021; SHAMIM et al.,2016).

Além das hidrofobinas, o fungo *A. oryzae* produz uma classe de proteínas preditas como *HsbA* (*Hydrophobic Surface Binding Protein*), que apresentam potencial isofuncionalidade com as hidrofobinas, embora atuem em contextos ambientais distintos. Enquanto as hidrofobinas aderem espontaneamente a interfaces hidrofóbicas-hidrofílicas devido às suas propriedades anfipáticas, as proteínas *HsbA* parecem requerer a presença de íons de cálcio para estabelecer ligações estáveis. Entretanto, sua capacidade de se ligar a superfícies hidrofóbicas e modular a hidrofobicidade de materiais a tornam de interesse para aplicações biotecnológicas (OHTAKI et al., 2006).

Devido às suas propriedades únicas de auto-organização e redução de tensão superficial, as hidrofobinas têm sido amplamente estudadas para aplicações biotecnológicas. Na indústria farmacêutica, têm sido utilizadas para modificar a superfície de nanopartículas, melhorando a biodisponibilidade de fármacos (SUN et al., 2020). No campo ambiental, destacam-se pelo uso em processos de degradação de plásticos, como o revestimento de PET com hidrofobinas para aumentar a eficiência da enzima PETase na hidrólise enzimática (PUSPITASARI et al., 2021). Além disso, na indústria alimentícia, podem ser empregadas para estabilizar espumas e emulsões, garantindo maior estabilidade e funcionalidade de produtos aerados (GREEN et al., 2013).

Apesar desse amplo potencial biotecnológico, a obtenção de hidrofobinas ainda é um desafio devido à sua tendência a formar agregados e aderir a interfaces hidrofóbicas-hidrofílicas. Essas propriedades dificultam a utilização de métodos tradicionais de extração e purificação, que muitas vezes não são eficientes para lidar com essas proteínas, limitando o potencial de sua utilização em processos industriais (KHALESI et al., 2015; GREEN et al., 2013).

Atualmente, os métodos de extração de hidrofobinas envolvem o uso de solventes agressivos, como ácido fórmico ou trifluoroacético, que podem comprometer a integridade da proteína e limitar sua aplicação em processos industriais (LINDER et al., 2005). Diante desse desafio, a exploração de métodos alternativos de extração e purificação torna-se essencial para viabilizar a produção em larga escala e ampliar o potencial de aplicação dessas proteínas.

Uma abordagem promissora para a produção de hidrofobinas é o uso de cepas superexpressoras, que liberam essas proteínas diretamente no meio de cultura. Essa característica elimina a necessidade de métodos de extração agressivos, como o uso de ácidos fortes, que muitas vezes podem inviabilizar o processo em escala industrial (Kulkarni et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Explorar métodos alternativos para a produção e extração de hidrofobinas de classe I, especificamente a hidrofobina RoIA, e da proteína de ligação à superfícies hidrofóbicas TUB, comparando a eficiência desses métodos entre a cepa RIB40 e a cepa recombinante ORY7 de *Aspergillus oryzae*.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições de cultivo das cepas RIB40 e recombinantes ORY7 de *A. oryzae* para maximizar a expressão e secreção de hidrofobinas;
- Explorar protocolos de extração de hidrofobinas das cepas RIB40 e ORY7 de *A. oryzae*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo da cepa RIB40 do fungo *A. Oryzae*

A cepa RIB40 de *A. oryzae* foi cultivada em placas de Petri contendo meio MMG com 5 ml de clutterbucks (0,07 M de $NaNO_3$, 0,0065 M de KCl, 0,0021 M de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 0,011 M de KH_2PO_4), 100 uL de elementos traços (7,2 µM de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 17,7 µM de H_3BO_3, 2,52 µM de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 2,72 µM de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,95 µM de $CoCl_2 \cdot 5H_2O$, 0,7 µM de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,21 µM de $Na_2MoO_4 \cdot 4H_2O$ e 17,11 µM de EDTA), 20uL de uridina e uracila a 55 mg/ml, 1g de glicose e 2% agar bacteriano para 94,9 ml de água) pH: 6.5. A inoculação foi realizada posicionando um disco de micélio de aproximadamente 8 mm de diâmetro no centro da placa. As placas foram então incubadas a 30 °C por 5 dias.

3.2 Extração da hidrofobina RolA na cepa RIB40

A extração da RolA baseou-se na metodologia de Hu et al., 2021 para extração de hidrofobinas dos conídios. Primeiro, os conídios foram coletados de placas de cultura através da raspagem do meio com auxílio de uma alça de inoculação e 5 mL de tampão PBS (137 mM NaCl - 8,0 g, 2,7 mM KCl - 0,2 g, 10 mM Na2HPO4 anidro - 1,189 g, 2 mM KH2PO4 - 0,2 g, 1M CaCl2 e água destilada, pH: 7,4). Após a coleta, o líquido foi filtrado para remoção das hifas e centrifugado por 3 minutos a 10.000 rpm. O pellet obtido foi ressuspendido em 500 µL de tampão PBS para remoção de impurezas, repetindo este processo três vezes. Em seguida, os conídios secos foram ressuspendidos em 400 µL de ácido fórmico P.A. e incubados a - 20°C por 1 hora. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos, separando os conídios do sobrenadante. O ácido fórmico foi então evaporado por secagem a vácuo a 40°C por 4 horas. O material resultante foi neutralizado em tampão PBS 10mM pH 7,5 e analisado por SDS-PAGE para confirmar a presença das proteínas de interesse e as respectivas bandas das hidrofobinas foram excisadas para análise por espectrometria de massas.

3.3 Engenheiramento genético para obtenção de cepas recombinantes

A construção das cepas recombinantes de *Aspergillus oryzae* iniciou-se com a prospecção *in silico* de sequências codificantes de hidrofobinas nos bancos de dados públicos. Foram utilizadas ferramentas de bioinformática, incluindo *EggNog Mapper* (JENSEN et al., 2008) e os bancos de domínios PFAM/INTERPRO (EL-GEBALI et al., 2019), para identificar as hidrofobinas presentes no genoma da cepa RIB40.

A sequência de interesse, correspondente à proteína RolA, foi amplificada a partir do DNA genômico de *A. oryzae* utilizando primers específicos por meio da técnica de *polymerase chain reaction* (PCR). Os produtos amplificados foram clonados no vetor pUC57, que contém um cassete de expressão composto pelo promotor da glucamilase, peptídeo sinal para secreção, uma His-tag para purificação e o terminador trpC. A clonagem foi realizada através da técnica de Gibson Assembly seguindo protocolo descrito no kit (E5510) *DNA Assembly Master Mix da New England Biotechnology*. Após essa etapa, o DNA foi tratado com a enzima DpnI para remoção de DNA plasmidial residual e, em seguida, transformado em *Escherichia coli* DH5α. A confirmação da clonagem foi realizada por eletroforese em gel de agarose e digestão enzimática com a enzima SWAI, seguida de sequenciamento Sanger para validação da inserção correta da sequência da RolA.

Para a transformação do fungo, o cassete de expressão linearizado foi introduzido na cepa ORY7 de *A. oryzae* utilizando a técnica de transformação de protoplastos mediada por CRISPR-Cas9. Os protoplastos foram gerados pela digestão da parede celular com o complexo enzimático VinoTaste PRO (Novozymes). A transformação foi realizada introduzindo o cassete de expressão e o vetor pfc330, responsável pela expressão da Cas9 e do RNA guia (gRNA) específico para o sítio de inserção. A seleção das cepas transformadas foi feita em meio mínimo MMG sem uridina e uracila. A integração das sequências foi confirmada por PCR genômico, utilizando primers flanqueadores da região de interesse (JARCZYNSKA et al., 2021).

Em seguida, as condições do protocolo foram otimizadas aumentando a concentração de protoplastos e de DNA plasmidial durante a transformação.

3.4 Meio de cultura das cepas recombinantes ORY7

3.4.1 Meio de crescimento

O crescimento das cepas recombinantes foi feita através do cultivo em erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio mínimo MMG com 1 g de glicose, 5 mL de 1X Clutterbuck (0,07 M de $NaNO_3$, 0,0065 M de KCl, 0,0021 M de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 0,011 M de KH_2PO_4), 10 µL de 1X elementos traços (7,2 µM de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 17,7 µM de H_3BO_3, 2,52 µM de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 2,72 µM de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,95 µM de $CoCl_2 \cdot 5H_2O$, 0,7 µM de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,21 µM de $Na_2MoO_4 \cdot 4H_2O$ e 17,11 µM de EDTA), 60 µL de uridina e 0,5 g de extrato de levedura, por um período de 5 dias sob agitação de 150 rpm, a 30 ºC.

3.4.2 Meio de indução

O meio de indução consiste no meio mínimo MMG contendo 5 mL de Clutterbucks, 100 µL de elementos traços, 20 µL de uridina e uracila a 55 mg/mL, 8 µg de proteínas, 1 g de glicose e 2 g de maltose, para 94,9 mL de água, com pH 6.5 e agitação de 150 rpm a 30 ºC por 72 horas.

3.5 Extração das proteínas RolA e TUB das cepas recombinantes ORY7

A extração e purificação das hidrofobinas RolA e TUB das cepas recombinantes foi realizada por precipitação com sulfato de amônio, ou método *salting out*, a partir da metodologia de Ohtaki et. al (2006). Inicialmente, a cultura de 20 mL foi submetida à centrifugação a 10.000 × g por 20 minutos a 4 °C, separando o pellet do sobrenadante. O sobrenadante obtido foi então filtrado utilizando filtros de 0,45 µm para remoção de partículas residuais.

A precipitação das proteínas foi conduzida por adição gradativa de sulfato de amônio ao sobrenadante até alcançar 80% de saturação. Para isso, foram adicionados 10 g de sal ao volume total de 20 mL, sob agitação suave contínua em banho de gelo, evitando a formação de espuma. Após a adição completa do sal, a solução foi mantida sob refrigeração a 4 °C por 2 horas, com agitação a cada 15

minutos. Decorrido o tempo de incubação, a amostra foi centrifugada a 12.000 × g por 30 minutos a 4 °C, e o pellet obtido foi separado para ressolubilização em tampões específicos.

A ressolubilização do pellet foi realizada utilizando diferentes tampões, de acordo com as proteínas de interesse. Para RolA, empregou-se uma solução de acetato de sódio 100 mM pH 3,0 contendo 60% de etanol e, para a TUB, foi utilizado tampão Tris pH 7,0. A mistura foi incubada sob agitação suave por 1 hora, seguida de centrifugação a 11.240 rpm por 10 minutos a 4 °C, para remoção de detritos insolúveis, e então armazenada. Uma alíquota foi retirada para confirmar a presença das proteínas no gel de SDS-PAGE.

3.6 Purificação das proteínas recombinantes da cepa ORY7

A purificação da proteína foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de gravidade contendo resina TALON® Superflow™ (Cytiva), com adaptações do protocolo fornecido pela Sigma-Aldrich. A coluna foi previamente equilibrada com duas colunas de água destilada para remoção do etanol a 20%, seguida de uma coluna de tampão de equilíbrio (20 mM Tris-HCl, pH 7,4).

O sobrenadante da cultura fúngica foi aplicado diretamente à coluna, sendo coletada uma alíquota para posterior análise. Em seguida, foi realizada uma etapa de lavagem utilizando 10 mL de tampão 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, contendo 20 mM de NaCl. A eluição da proteína foi conduzida por meio de um gradiente de imidazol, utilizando tampões contendo 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 20 mM NaCl e concentrações crescentes de imidazol (5, 20, 50, 150 e 300 mM), coletando-se separadamente cerca de 6 mL de cada fração eluída.

Após a eluição, a coluna foi lavada com tampão contendo 300 mM de imidazol para remoção de proteínas fortemente ligadas e, em seguida, com duas colunas de água destilada. A coluna foi então armazenada em solução de etanol a 20%. Alíquotas de cada fração coletada durante o processo foram reservadas para análise posterior por eletroforese em gel de SDS-PAGE.

3.7 Comparação das cepas produzidas

Para comparar as características das cepas RIB40 e ORY7, foram avaliados dois parâmetros principais: morfologia das colônias e rendimento na produção das proteínas.

3.7.1 Análise da morfologia das colônias das cepas recombinantes

As cepas de *A. oryzae* RIB40-RolA, ORY7-RolA e ORY7-TUB foram cultivadas em meio MMG sólido, ajustado para pH 6,8 e suplementado com glicose. As placas de Petri foram inoculadas com um disco de micélio de 8 mm de diâmetro e incubadas a 30 °C por 5 dias. Após o cultivo, a análise da morfologia das colônias foi realizada em duas etapas. Primeiro, as colônias foram fotografadas diretamente nas placas para registro visual geral, avaliando características como diâmetro, textura, esporulação e pigmentação. Em seguida, as mesmas placas foram analisadas por microscopia óptica usando o microscópio ZEISS Primo Star 3 com aumento de 10x, focando em regiões de menor densidade micelial para visualização das hifas e estruturas reprodutivas.

3.7.2 Comparação do rendimento da produção das proteínas

Os rendimentos da produção das proteínas pelos diferentes métodos de extração foram avaliados com base na intensidade da banda de gel de SDS-PAGE e quantificação pelo método de Bradford, utilizando albumina bovina (BSA) como padrão. Os resultados da quantificação foram expressos em mg/mL do sobrenadante e comparados entre as diferentes cepas.

4 RESULTADOS

4.1 Cultivo da cepa RIB40 de *A. oryzae*

A cepa RIB40 de *A. oryzae* foi cultivada com o objetivo de servir como referência para a produção natural da hidrofobina RolA. O cultivo foi realizado em meio mínimo suplementado com glicose, a 30°C durante cinco dias. Foi observado um rápido crescimento e grande volume de esporos no período estimado, conforme indica a Figura 1.

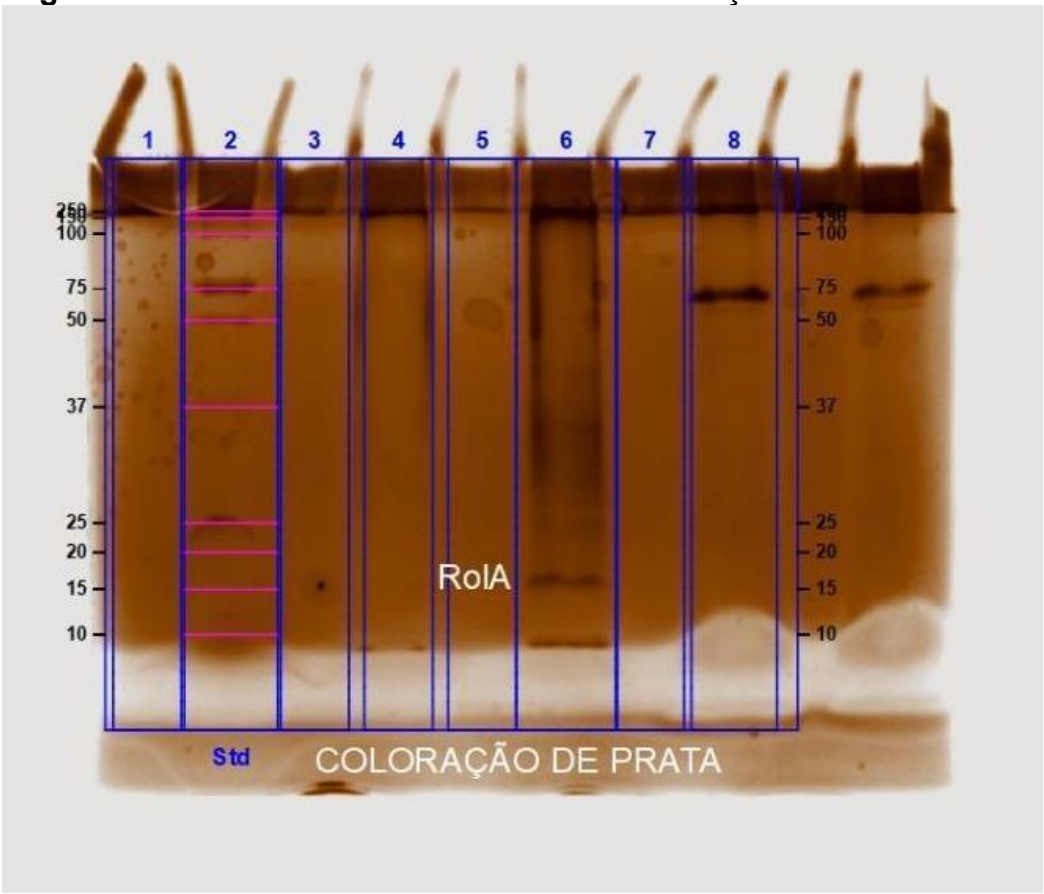
Figura 1 - Registro visual do cultivo da RIB40 após 5 dias.

Fonte: Elaboração própria.

4.2 Extração da hidrofobina RolA da cepa RIB40

As alíquotas obtidas da extração de proteínas dos conídios foram aplicadas em gel de SDS-PAGE e coradas com nitrato de prata para melhor visualização de bandas menos visíveis. Conforme mostra a coluna 6 da Figura 2, foi possível identificar uma banda aproximada em 15 kDa, condizente com o previsto para verificar a presença da hidrofobina RolA.

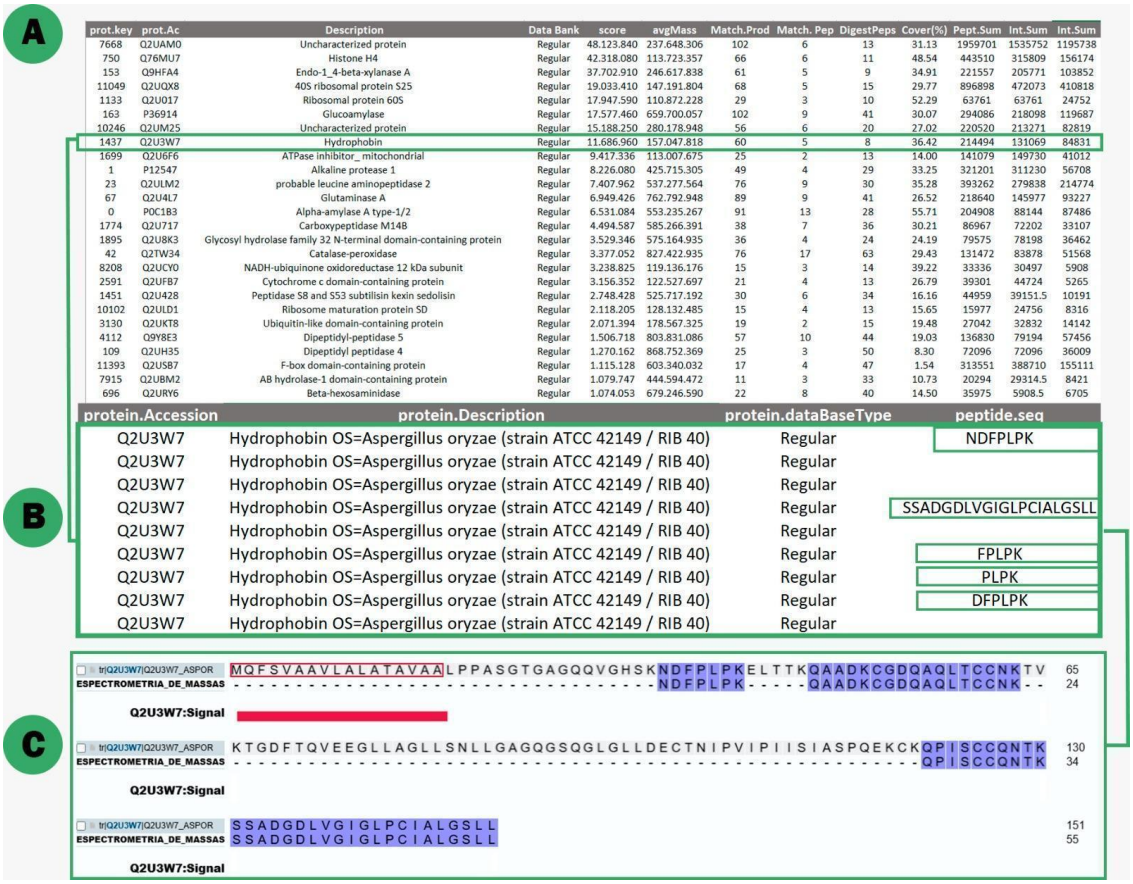
Figura 2 - Gel de SDS-PAGE da amostra da extração dos conídios.



Fonte: Elaboração própria

A partir da confirmação no gel de SDS-PAGE, a banda referida foi excisada e levada para análise em espectrometria de massas. O resultado da análise mostrou a presença de uma série de proteínas, dentre elas a hidrofobina RolA, indicada pelo código Uniprot Q2U3W7, conforme indicado na Figura 3. Essa análise confirma que o método de extração por ácido fórmico extrai efetivamente a hidrofobina de interesse. Esse resultado é consistente com o observado para a proteína RodA na cepa selvagem de *Aspergillus fumigatus*, conforme demonstrado por Hu et al. (2024), os quais relataram o sucesso na extração por ácido fórmico da RodA através da presença das bandas correspondentes no gel de SDS-PAGE. Assim, esse método empregado demonstra que pode ser utilizado como referência para otimizações futuras no isolamento de hidrofobinas.

Figura 3 - A seção A apresenta as proteínas identificadas na espectrometria de massas MS/MS, com destaque na identificação da proteína Q2U3W7 correspondente a hidrofobina RolA em *A. oryzae*. Já na seção B estão dispostos os peptídeos finais que permitiram a identificação da hidrofobina na amostra analisada. Por fim, na seção C foi realizado um alinhamento *UniProt* da sequência completa da hidrofobina com os peptídeos destacados na seção B em suas respectivas localizações na sequência completa.



prot.key	prot.Ac	Description	Data Bank	score	avgMass	Match.Prod	Match. Pep	DigestPeps	Cover(%)	Pept.Sum	Int.Sum	Int.Sum
7668	Q2UAM0	Uncharacterized protein	Regular	48.123.840	237.648.306	102	6	13	31.13	1959701	1535752	1195738
750	Q76MU7	Histone H4	Regular	42.318.080	113.723.357	66	6	11	48.54	443510	315809	156174
153	Q9HFA4	Endo-1_4-beta-xylanase A	Regular	37.702.910	246.617.838	61	5	9	34.91	221557	205771	103852
11049	Q2UQX8	40S ribosomal protein S25	Regular	19.033.410	147.191.804	68	5	15	29.77	896898	472073	410818
1133	Q2U017	Ribosomal protein 60S	Regular	17.947.590	110.872.228	29	3	10	52.29	63761	63761	24752
163	P36914	Glucoamylase	Regular	17.577.460	659.700.057	102	9	41	30.07	294086	218098	119687
10246	Q2UM25	Uncharacterized protein	Regular	15.188.250	280.178.948	56	6	20	27.02	220520	213271	82819
1437	Q2U3W7	Hydrophobin	Regular	11.686.960	157.047.818	60	5	8	36.42	214494	131069	84831
1699	Q2U6F6	ATPase inhibitor_ mitochondrial	Regular	9.417.336	113.007.675	25	2	13	14.00	141079	149730	41012
1	P12547	Alkaline protease 1	Regular	8.226.080	425.715.305	49	4	29	33.25	321201	311230	56708
23	Q2ULM2	probable leucine aminopeptidase 2	Regular	7.407.962	537.277.564	76	9	30	35.28	393262	279838	214774
67	Q2U4L7	Glutaminase A	Regular	6.949.426	762.792.948	89	9	41	26.52	218640	145977	93227
0	P0C1B3	Alpha-amylase A type-1/2	Regular	6.531.084	553.235.267	91	13	28	55.71	204908	88144	87486
1774	Q2U717	Carboxypeptidase M14B	Regular	4.494.587	585.266.391	38	7	36	30.21	86967	72202	33107
1895	Q2U8K3	Glycosyl hydrolase family 32 N-terminal domain-containing protein	Regular	3.529.346	575.164.935	36	4	24	24.19	79575	78198	36462
42	Q2TW34	Catalase-peroxidase	Regular	3.377.052	827.422.935	76	17	63	29.43	131472	83878	51568
8208	Q2UCY0	NADH-ubiquinone oxidoreductase 12 kDa subunit	Regular	3.238.825	119.136.176	15	3	14	39.22	33336	30497	5908
2591	Q2UFB7	Cytochrome c domain-containing protein	Regular	3.156.352	122.527.697	21	4	13	26.79	39301	44724	5265
1451	Q2U428	Peptidase S8 and S53 subtilisin kexin sedolisin	Regular	2.748.428	525.717.192	30	6	34	16.16	44959	39151.5	10191
10102	Q2ULD1	Ribosome maturation protein SD	Regular	2.118.205	128.132.485	15	4	13	15.65	15977	24756	8316
3130	Q2UKT8	Ubiquitin-like domain-containing protein	Regular	2.071.394	178.567.325	19	2	15	19.48	27042	32832	14142
4112	Q9Y8E3	Dipeptidyl-peptidase 5	Regular	1.506.718	803.831.086	57	10	44	19.03	136830	79194	57456
109	Q2UH35	Dipeptidyl peptidase 4	Regular	1.270.162	868.752.369	25	3	50	8.30	72096	72096	36009
11393	Q2USB7	F-box domain-containing protein	Regular	1.115.128	603.340.032	17	4	47	1.54	313551	388710	155111
7915	Q2UBM2	AB hydrolase-1 domain-containing protein	Regular	1.079.747	444.594.472	11	3	33	10.73	20294	29314.5	8421
696	Q2URY6	Beta-hexosaminidase	Regular	1.074.053	679.246.590	22	8	40	14.50	35975	5908.5	6705

protein.Accession	protein.Description	protein.dataBaseType	peptide.seq
Q2U3W7	Hydrophobin OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40)	Regular	NDFPLPK
Q2U3W7	Hydrophobin OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40)	Regular	
Q2U3W7	Hydrophobin OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40)	Regular	
Q2U3W7	Hydrophobin OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40)	Regular	SSADGDLVGIGLPCIALGSLL
Q2U3W7	Hydrophobin OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40)	Regular	
Q2U3W7	Hydrophobin OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40)	Regular	FPLPK
Q2U3W7	Hydrophobin OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40)	Regular	PLPK
Q2U3W7	Hydrophobin OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40)	Regular	DFPLPK
Q2U3W7	Hydrophobin OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40)	Regular	

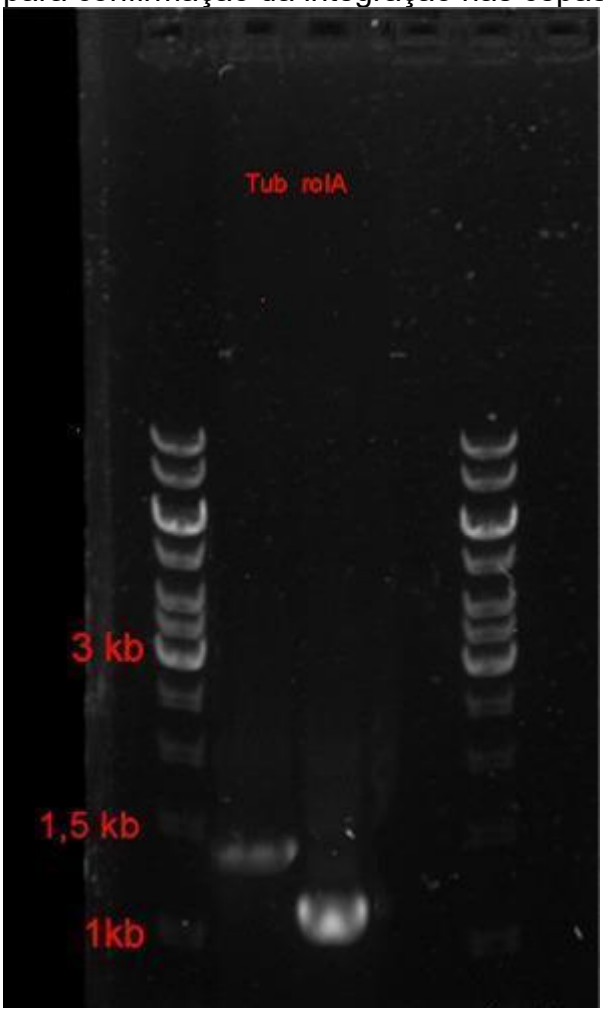
Fonte: Elaboração própria.

4.3 Engenheiramento genético para obtenção de cepas recombinantes

Este trabalho integra um projeto desenvolvido em grupo, no qual diferentes etapas foram atribuídas aos participantes conforme suas áreas de atuação. A parte abordada neste trabalho corresponde aos processos de extração e purificação das proteínas de interesse. Embora a construção das cepas recombinantes de *Aspergillus oryzae* tenha sido realizada por outro integrante do grupo, essa etapa foi fundamental para contextualizar os experimentos descritos neste estudo. Por esse motivo, optou-se por incluir, de forma sucinta, uma descrição da obtenção das cepas superexpressoras de RolA e TUB.

A confirmação da integração das sequências foi realizada por eletroforese em gel de agarose e a presença das bandas em 3kb, 1,5kb e 1kb no gel se encontra de acordo com o esperado para confirmar a presença da TUB e da RolA, respectivamente.

Figura 4 - PCR para confirmação da integração nas cepas transformadas.

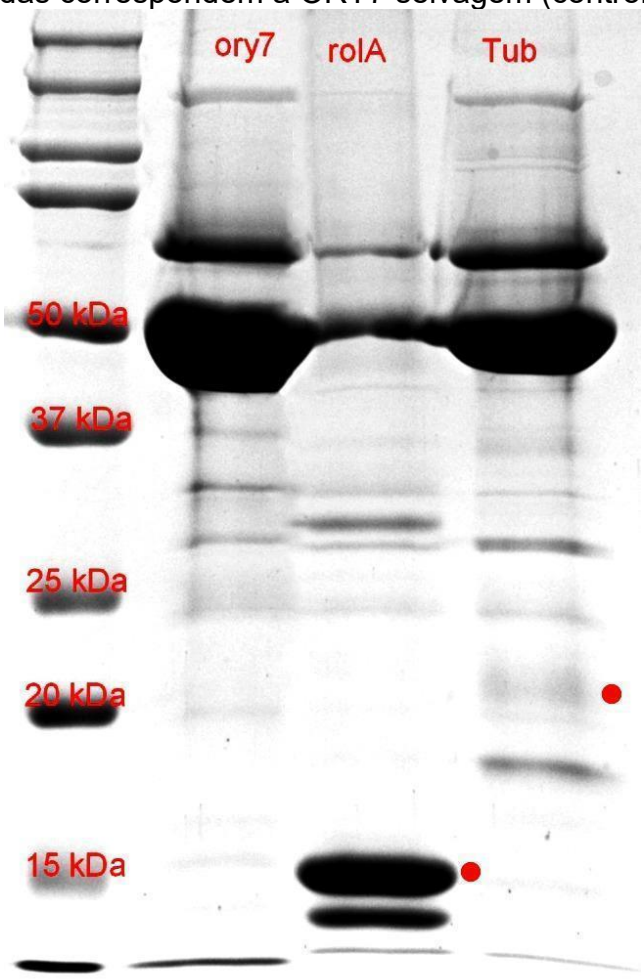


Fonte: Elaboração própria.

Além da verificação de que as sequências foram efetivamente integradas, fez-se necessário confirmar que a via metabólica para a secreção das hidrofobinas com a indução de maltose está funcionando. Então, as cepas foram cultivadas e uma alíquota de meio foi corrida em gel de SDS-PAGE para confirmar a presença da proteína de interesse. Na figura 5 é observado a presença de duas bandas nas alturas de 15 kDa e 20 kDa, que correspondem com as bandas previstas para a RolA e a TUB, respectivamente.

Dessa forma é possível confirmar que a integração da sequência foi correta e a via está de fato funcionando, permitindo prosseguir para a aplicação das hidrofobinas, que é o objetivo deste trabalho.

Figura 5 - Gel de confirmação da secreção das proteínas alvo pelas cepas ORY7 transformadas. As bandas correspondem a ORY7 selvagem (controle), RolA e TUB.



Fonte: Elaboração própria.

4.4 Meio de cultura das cepas recombinantes ORY7

4.4.1 Meio de crescimento

O meio de cultivo das cepas recombinantes ORY7-RolA e ORY7-TUB, inicialmente em meio mínimo MMG rico em glicose, teve como objetivo promover crescimento fúngico robusto, para então induzir a secreção das hidrofobinas.

Durante o período de crescimento em meio rico, as cepas demonstraram diferenças notáveis no padrão de crescimento. A cepa ORY7-RolA apresentou crescimento mais acelerado, com formação micelial densa e esporulação em 5 dias. Por outro lado, a cepa ORY7-TUB mostrou crescimento mais lento, com menor densidade de micélio e coloração mais clara nas colônias. Essa diferença pode ser atribuída à natureza da proteína TUB, que se trata de uma proteína de superfície com propriedades de ligação a superfícies hidrofóbicas, conforme descrito por Ohtaki et al. (2006). A superexpressão dessa proteína pode comprometer a fisiologia da cepa hospedeira, interferindo na integridade da membrana ou na regulação do metabolismo de secreção.

4.4.2 Meio de indução

O meio de indução foi elaborado com base na redução da concentração de glicose no meio mínimo MMG, complementado com a adição de maltose. Essa formulação teve como objetivo ativar a via de secreção das hidrofobinas, tendo em vista que a presença de glicose em altas concentrações pode inibir promotores que são induzidos por maltose, como é o caso da glucamilase, utilizado no vetor de expressão construído para as cepas recombinantes. Por outro lado, não foi possível retirar totalmente a glicose do meio, visto que observou-se que o fungo não sobreviveu à sua ausência. Isso demonstra que, apesar da glicose ser um inibidor da via de secreção induzida por maltose, uma pequena quantidade ainda é necessária para manter a viabilidade celular.

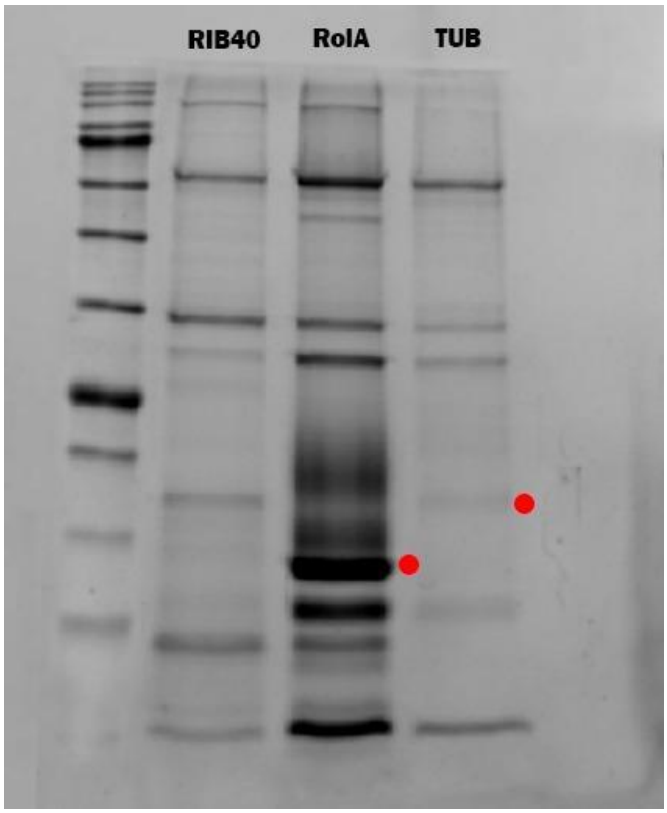
4.5 Extração das proteínas RolA e TUB das cepas recombinantes ORY7

Após a tentativa de extração da RolA e TUB por precipitação com sulfato de amônio, não foram observadas bandas nítidas no SDS-PAGE compatíveis com os pesos moleculares esperados das proteínas de interesse. No entanto, ao aplicar no gel uma alíquota de 0,5 mL dos sobrenadantes das culturas após concentrá-las, foi possível detectar uma banda intensa na altura de aproximadamente 15 kDa na amostra da RolA, compatível com o seu peso molecular, além de outras bandas

arrastadas abaixo dessa região, conforme indicado pela Figura 6. A presença dessas bandas arrastadas pode ser explicada por relatos na literatura que apontam limitações no processo de desnaturação realizado antes da eletroforese em proteínas com alta estabilidade estrutural. Algumas proteínas, mesmo após o tratamento com SDS e agentes redutores como o β-mercaptoetanol, podem manter parcialmente sua conformação tridimensional, o que afeta sua migração no gel e resulta em padrões atípicos de bandas no gel. Esse comportamento já foi observado em proteínas de membrana e extremófilas, como HomA e HomB de *Helicobacter pylori* e a protease S66 de *Pyrococcus furiosus*, que demonstraram resistência à desnaturação mesmo após aquecimento com β-mercaptoetanol, e resultaram em uma migração anômala no gel (Tamrakar et al., 2021; Blumentals et al., 1990). Esse tipo de resistência pode explicar as múltiplas bandas observadas para a RolA, sugerindo que parte da proteína manteve-se parcialmente enovelada, afetando sua mobilidade durante a eletroforese.

À primeiro momento, não foi observado uma banda expressiva na altura de 20 kDa, predita para a TUB pela ferramenta UNIPROT. Entretanto, após predição comparando com uma proteína semelhante que tem peptídeo sinal e refazendo a análise desconsiderando a porção referente ao peptídeo sinal, prevê-se sua massa com aproximadamente 17 kDa. A ferramental signal peptide 6.0 não prevê um peptídeo sinal para a sequência específica da TUB, porém as proteínas semelhantes da mesma família presentes em outras espécies apresentam o peptídeo sinal para as *HsbA*. Sendo assim, considera-se que pode haver uma imprecisão na predição do peptídeo sinal. Isso porque a banda presente no gel após a indução surgiu na altura de 17 kDa, o que converge para o resultado esperado quando se desconsidera o peptídeo sinal da TUB.

Figura 6 – Gel de SDS-PAGE das alíquotas concentradas de 0,5 mL do meio de cultivo.



Fonte: Elaboração própria.

Alguns estudos que relataram sucesso na extração utilizaram ácido ou um solvente orgânico para tal. Ahn et al. (2021), por exemplo, ao expressarem a hidrofobina DewA em *Escherichia coli*, relataram a formação de agregados insolúveis, sendo necessário o uso de extração com solventes como isopropanol em sistemas de duas fases aquosas (ATPS), além da remoção do peptídeo sinal e fusão a uma ramp tag para aumentar a solubilidade da proteína. Schmoll et al. (2010) relataram sucesso na expressão da hidrofobina DewA em *Trichoderma reesei*, seguida de precipitação com metanol e clorofórmio, e posterior solubilização com ácido trifluoroacético (TFA). De forma semelhante, Ohtaki et al. (2006) descreveram a extração da proteína *HsbA*, de natureza hidrofóbica, produzida por *Aspergillus oryzae*, por meio de precipitação com sulfato de amônio seguida de purificação em coluna de interação hidrofóbica, eluindo com um gradiente de sulfato de amônio.

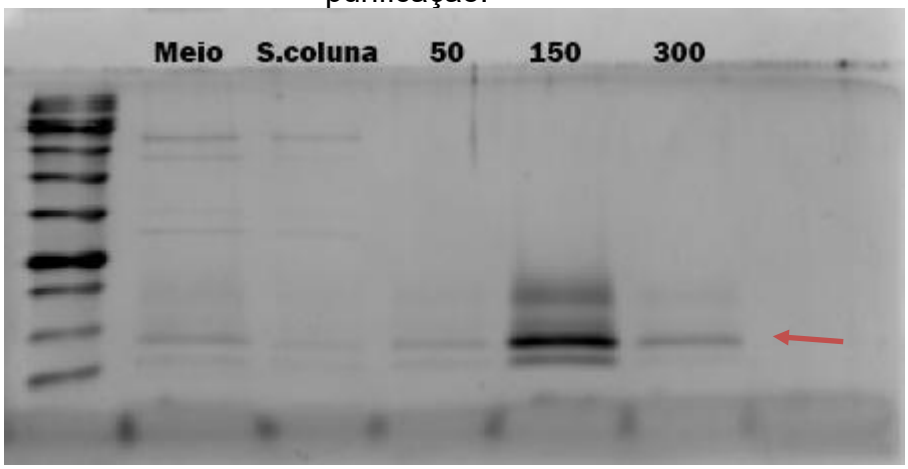
Os resultados obtidos com a cepa ORY7 são promissores, pois demonstram que a cepa recombinante utilizada foi capaz de secretar as proteínas diretamente no

meio de cultivo, e dispensa a necessidade de etapas agressivas de extração. Esse achado representa uma vantagem significativa em relação aos métodos descritos na literatura, os quais frequentemente dependem de solventes orgânicos ou ácidos fortes para a solubilização das hidrofobinas. Em contextos de produção em larga escala, essa característica pode reduzir custos e riscos ambientais, além de simplificar o processo de purificação, favorecendo a aplicação industrial destas proteínas.

4.6 Purificação das proteínas RolA e TUB das cepas recombinantes

Até o momento da escrita deste trabalho, a purificação por cromatografia por afinidade foi conduzida apenas com a cepa recombinante expressora da RolA. Durante a eluição por gradiente de imidazol, foi possível observar o aparecimento da RolA mais expressivamente na fração de 150 mM de imidazol, conforme evidenciado pelas bandas visíveis no gel de SDS-PAGE (Figura 7). A presença de uma banda definida na altura correspondente ao peso molecular estimado da RolA pode indicar que a proteína foi efetivamente recuperada.

Figura 7 - Gel de SDS-PAGE das frações coletadas durante a eluição na purificação.



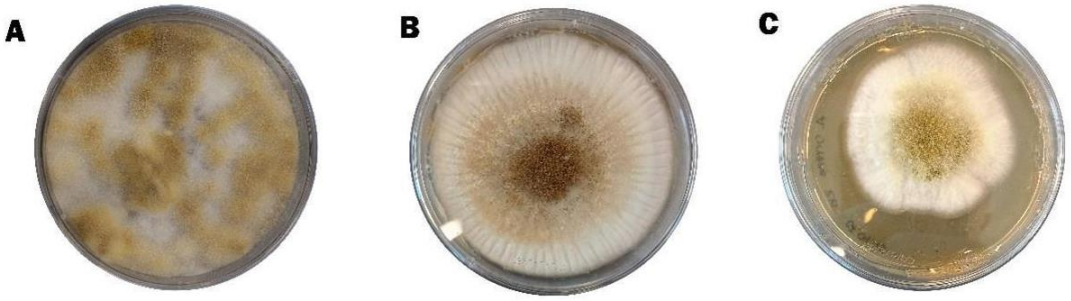
Fonte: Elaboração própria.

4.7 Comparação das cepas produzidas

4.7.1 Análise da morfologia das colônias das cepas recombinantes

As cepas apresentaram padrões de crescimento distintos quando cultivadas em meio MMG. Na placa A, correspondente à cepa RIB40, observou-se que a colônia cobriu toda a superfície da placa após o período de incubação, com intensa esporulação, conforme mostrado na Figura 8. Na placa B, com a cepa ORY7, o crescimento também foi rápido, mas a colônia exibiu maior densidade de micélio e a esporulação concentrou-se principalmente na região central da placa. Comparando as duas cepas produtoras da RolA (RIB40 e ORY7), ambas apresentaram crescimento acelerado. No entanto, a maior concentração de conídios observada na placa A sugere que a cepa RIB40 atingiu o pico de crescimento e esporulação em menor tempo quando comparado a ORY7. Por outro lado, a cepa ORY7-TUB, representada na placa C, mostrou um crescimento mais lento, com uma circunferência de esporulação mais ampla e coloração mais clara em comparação com as demais cepas.

Figura 8 - As placas mostram as diferenças na morfologia da colônia das cepas transformadas após 5 dias de cultivo em meio mínimo com glicose a pH: 6.5. A placa **A** recebeu o *A. oryzae* RIB40, como controle, sem superexpressão de proteínas alvo, apenas com a deleção do *pyrGΔ*. A placa **B** apresenta a cepa RolA. A placa **C** apresenta cepa **TUB.**

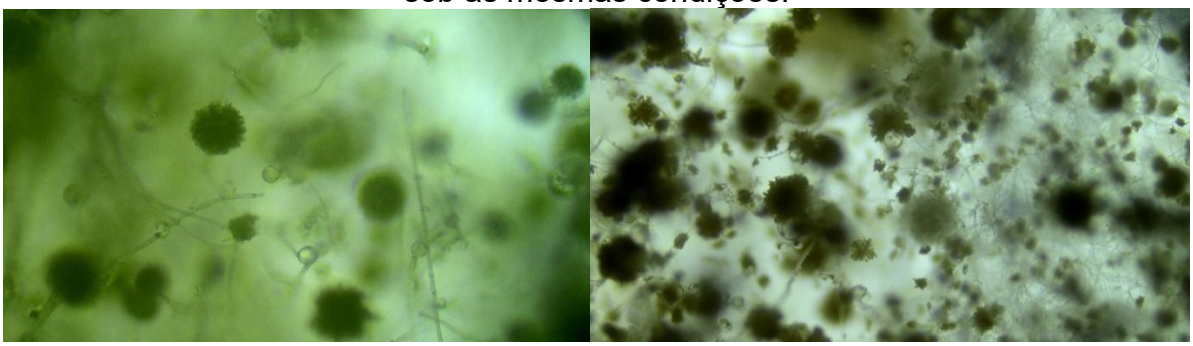


Fonte: Elaboração própria.

A análise das cepas recombinantes ORY7, cultivadas em meio mínimo MMG por microscopia óptica mostra a diferença no estágio de vida do fungo ao final do período de 5 dias. Como a cepa que expressa a RolA tem um crescimento mais rápido do que a cepa que expressa a TUB, é possível notar a presença de uma quantidade

significativa de esporos na lâmina. Já na Figura 9-A, é observado nitidamente as hifas e esporângios, sem presença de esporos liberados.

Figura 9 - A figura A traz uma microscopia óptica feita usando o ZEISS Primo Star 3, com aumento de 10X da placa de cultivo da cepa TUB. A figura B traz a cepa RolA, sob as mesmas condições.



Fonte: Elaboração própria

4.7.2 Comparação do rendimento da produção das proteínas

O rendimento da hidrofobina RolA na cepa RIB40 foi avaliada apenas pela presença e intensidade no gel. Para isso, foram coletados esporos de uma placa inteira da cepa RIB40, o que, ao final do processo, resultou em apenas 20 µL de amostra, volume suficiente apenas para a aplicação em gel. Além disso, devido à baixa concentração proteica esperada, optou-se pela coloração com nitrato de prata, possibilitando a visualização da banda correspondente à RolA.

A quantificação direta da proteína não foi realizada devido a limitações técnicas associadas ao método de extração utilizado. A presença de ácido fórmico interfere em ensaios como o método de Bradford, sendo necessário evaporar o ácido, eluí-la em outra solução e neutralizar o pH. Contudo, esse processo pode levar à renaturação da hidrofobina, favorecendo a formação de agregados e adesão às paredes do tubo, o que compromete a precisão da quantificação. Diante disso, optou-se por utilizar exclusivamente a análise em gel como estimativa de rendimento da extração.

Embora a quantidade extraída tenha sido limitada, foi suficiente para a identificação da proteína, demonstrando que o método é eficaz para extrair hidrofobinas naturalmente expressas e organizadas na superfície celular. Uma alternativa para obter maior produção de hidrofobinas poderia ser adotando o método de Takahashi et al. (2005), que relataram que a expressão da RolA em *A. oryzae* foi

significativamente aumentada quando o fungo foi cultivado sobre superfícies hidrofóbicas sólidas, como o polímero PBSA.

Em relação aos rendimentos, observou-se uma expressão consideravelmente maior das proteínas recombinantes nas cepas ORY7 em comparação à cepa selvagem RIB40, conforme evidenciado pela intensidade das bandas nos respectivos géis de SDS-PAGE. A maior intensidade das bandas associadas às hidrofobinas recombinantes indicam um rendimento superior nessas cepas, mesmo sem a realização de quantificação.

A quantificação pelo método de Bradford resultou em uma concentração de proteínas de 0,7 µg/mL em um cultivo de 100 mL. Essa concentração é significativamente baixa quando comparada à intensidade da banda no gel de SDS-PAGE. Essa discrepância pode ser atribuída à baixa eficiência do corante na detecção de hidrofobinas, que, além de apresentarem limitações relacionadas à estrutura compacta e à tendência à agregação, o baixo peso molecular da RolA também pode ter contribuído para a concentração indicada pelo ensaio de Bradford. Segundo Noble et al. (2009), esse método apresenta um peso molecular mínimo necessário para o desenvolvimento completo da cor, sendo menos responsivo a proteínas pequenas ou peptídeos. Essa limitação, somada ao uso da albumina bovina (BSA) como padrão, uma proteína de maior massa e com mais resíduos aromáticos que interagem com o corante, pode ter levado à obtenção de um valor significativamente inferior ao real.

Logo, a comparação do rendimento entre as cepas foi feita com base apenas na intensidade das bandas observadas no gel de SDS-PAGE. Embora essa abordagem não forneça valores numéricos exatos, ela permitiu avaliar visualmente a quantidade relativa de proteína produzida. As bandas mais intensas nas amostras das cepas recombinantes indicam uma produção maior da proteína RolA em comparação à cepa RIB40. Isso confirma que a RolA foi expressa e secretada de forma eficiente pelas cepas modificadas, sendo detectável mesmo sem a realização de quantificação precisa por métodos colorimétricos.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho investigou a produção e extração das proteínas RolA e TUB em *Aspergillus oryzae*, comparando a cepa RIB40 com cepas recombinantes construídas para superexpressar essas proteínas. A extração da RolA da cepa RIB40 com ácido fórmico foi bem-sucedida, com detecção da proteína no SDS-PAGE e confirmação por espectrometria de massas.

Nas cepas recombinantes, a precipitação com sulfato de amônio não resultou na recuperação eficiente das proteínas. No entanto, a aplicação de uma alíquota do sobrenadante no gel revelou uma banda compatível com a RolA, e a purificação por cromatografia de afinidade confirmou sua presença em frações eluídas com imidazol, evidenciando secreção ativa. A TUB também foi visualizada no gel com aproximadamente 17 kDa, peso compatível com sua forma madura sem o peptídeo sinal, corrigindo a expectativa inicial de 20 kDa baseada em sua forma completa.

Esses resultados evidenciam que a secreção direta das proteínas no meio de cultivo pelas cepas recombinantes permite sua recuperação sem a necessidade de métodos agressivos de extração. Em cenários de produção em larga escala, essa característica pode reduzir custos operacionais, minimizar impactos ambientais e simplificar as etapas de purificação, contribuindo para a viabilidade industrial dessas proteínas.

6 REFERÊNCIAS

AHN, S.-O. et al. Soluble Expression and Efficient Purification of Recombinant Class I Hydrophobin DewA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 7843, 22 jul. 2021.

ARMENANTE, A. et al. The Pleurotus ostreatus hydrophobin Vmh2 and its interaction with glucans. **Glycobiology**, v. 20, n. 5, p. 594–602, 1 maio 2010.

BERGER, B. W.; SALLADA, N. D. Hydrophobins: multifunctional biosurfactants for interface engineering. **Journal of Biological Engineering**, v. 13, n. 1, p. 10, 23 dez. 2019.

BLUMENTALS, I. I.; ROBINSON, A. S.; KELLY, R. M. Characterization of sodium dodecyl sulfate-resistant proteolytic activity in the hyperthermophilic archaebacterium *Pyrococcus furiosus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 1992–1998, 1 jul. 1990.

DABA, G. M.; MOSTAFA, F. A.; ELKHATEEB, W. A. The ancient koji mold (*Aspergillus oryzae*) as a modern biotechnological tool. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 1, p. 52, 22 jun. 2021.

EL-GEBALI, S. et al. The Pfam protein families database in 2019. ***Nucleic Acids Research***, v. 47, n. D1, p. D427–D432, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1093/nar/gky995. Acesso em: 24 abr. 2025.

GREEN, A. J. et al. Formation and stability of food foams and aerated emulsions: Hydrophobins as novel functional ingredients. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 18, n. 4, p. 292–301, ago. 2013.

HU, X. et al. Protein disulfide isomerase 1 is required for RodA assembling-based conidial hydrophobicity of *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 90, n. 4, 17 abr. 2024.

JARCZYNSKA, Z. D. et al. DIVERSIFY: A Fungal Multispecies Gene Expression Platform. **ACS Synthetic Biology**, v. 10, n. 3, p. 579–588, 19 mar. 2021.

JENSEN, B. G. et al. Hydrophobins from *Aspergillus species* cannot be clearly divided into two classes. **BMC Research Notes**, v. 3, n. 1, p. 344, 23 dez. 2010.

JENSEN, L. J. et al. eggNOG: automated construction and annotation of orthologous groups of genes. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Database, p. D250–D254, 23 dez. 2007.

KHALESI, M.; GEBRUERS, K.; DERDELINCKX, G. Recent Advances in Fungal Hydrophobin Towards Using in Industry. **The Protein Journal**, v. 34, n. 4, p. 243–255, 25 ago. 2015.

KIRKLAND, B. H.; KEYHANI, N. O. Expression and purification of a functionally active class I fungal hydrophobin from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in *E. coli*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 327–335, 17 fev. 2011.

KULKARNI, S.; NENE, S.; JOSHI, K. Production of Hydrophobins from fungi. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 1–11, out. 2017.

LINDER, M. B. et al. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. FEMS **Microbiology Reviews**, v. 29, n. 5, p. 877–896, nov. 2005.

LINDER, M. B. Hydrophobins: Proteins that self-assemble at interfaces. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, n. 5, p. 356–363, out. 2009.
NOBLE, J. E.; BAILEY, M. J. A. Quantitation of protein. **Methods in enzymology**, v. 463, n. 463, p. 73–95, 2009.

OHTAKI, S. et al. Novel Hydrophobic Surface Binding Protein, HsbA, Produced by *Aspergillus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2407–2413, abr. 2006.

PUSPITASARI, N.; TSAI, S. L.; LEE, C. K. Fungal Hydrophobin RolA Enhanced PETase Hydrolysis of Polyethylene Terephthalate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 5, 2021.

SCHMOLL, M. et al. Recombinant production of an *Aspergillus nidulans* class I hydrophobin (DewA) in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) is promoter-dependent. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 95–103, 22 set. 2010.

SEIDL-SEIBOTH, V. et al. Novel Hydrophobins from *Trichoderma* Define a New Hydrophobin Subclass: Protein Properties, Evolution, Regulation and Processing. **Journal of Molecular Evolution**, v. 72, n. 4, p. 339–351, 22 abr. 2011.

SHAMIM, M. et al. Understanding the Diversity of *Aspergillus* by Next-Generation Sequencing. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus System Properties and Applications.** [s.l.] Elsevier Inc., 2016. p. 29–40.

SUN, L. et al. Enhanced Antitumor Efficacy of Curcumin-Loaded PLGA Nanoparticles Coated with Unique Fungal Hydrophobin. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 5, p. 171, 11 jul. 2020.

TAKAHASHI, T. et al. The fungal hydrophobin RolA recruits polyesterase and laterally moves on hydrophobic surfaces. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1780–1796, 17 set. 2005.

TAMRAKAR, A. et al. Biophysical characterization of the homodimers of HomA and HomB, outer membrane proteins of *Helicobacter pylori*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 24471, 28 dez. 2021.

TANAKA, T. et al. *Aspergillus* Hydrophobins: Physicochemical Properties, Biochemical Properties, and Functions in Solid Polymer Degradation. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1498, 25 jul. 2022.

VALSECCHI, I. et al. Role of Hydrophobins in *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 2, 24 dez. 2017.

VEREMAN, J. et al. Improved extraction and purification of the hydrophobin HFBI. **Biotechnology Journal**, v. 16, n. 11, 2 nov. 2021.

VIGUERAS, G. et al. Toluene gas phase biofiltration by *Paecilomyces lilacinus* and isolation and identification of a hydrophobin protein produced thereof. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 147, 1 ago. 2008.

WÖSTEN, H. A. B.; SCHOLTMEIJER, K. Applications of hydrophobins: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 4, p. 1587–1597, 8 fev. 2015.