



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E  
INDUSTRIAL.

FABIANA SARMENTO DE ALBUQUERQUE.

Produção e purificação da(s) celulase(s) produzida(s) pelo fungo *Coleosporium plumeriae* em diferentes meios de cultura.

MACEIÓ/AL

2021

FABIANA SARMENTO DE ALBUQUERQUE.

Produção e purificação da(s) celulase(s) produzida(s) pelo fungo *Coleosporium plumeriae* em diferentes meios de cultura.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química Industrial.

Orientadora: Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira.

Coorientador: Profa. Dra. Tatielle da Silva Pereira.

MACEIÓ/AL

2021

FABIANA SARMENTO DE ALBUQUERQUE.

Produção e purificação da(s) celulase(s) produzida(s) pelo fungo *Coleosporium plumeriae* em diferentes meios de cultura.

---

Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira – Orientador  
Universidade Federal de Alagoas – IQB/PPGQB – UFAL

---

Profa. Dra. Tatielle da Silva Pereira. – Coorientadora  
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

BANCA EXAMINADORA:

---

Profa. Dra. Edma Carvalho de Miranda.  
Universidade Federal de Alagoas – IQB – UFAL

---

Profa. Me. Dávida Maria Ribeiro  
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, aos meus pais por me proporcionarem a oportunidade de estudar, a minha avó, tios, primos e amigos que sempre incentivaram meus estudos na universidade. Ao meu namorado que foi grande apoiador durante os períodos difíceis.

Agradeço a todos os colegas e amigos que a graduação pôde me proporcionar, aos professores incríveis que tive durante os anos de curso.

Aos meus gatos Snow e Kyra que alegraram muito os meus dias, trouxeram leveza para a vida.

Ao meu orientador e minha coorientadora por terem me tornado a profissional que sou hoje, sei que devo muito a todos os ensinamentos feitos por eles.

## RESUMO

As inúmeras discussões no que diz respeito à importância da sustentabilidade nas atividades produtivas e as preocupações com os problemas relacionados à geração de resíduos agroindustriais tem merecido destaque, uma vez que, se torna cada vez mais necessária a adoção de alternativas que substituam o uso de combustíveis fósseis. Deste modo os materiais lignocelulósicos, recurso bio-renovável mais abundante na natureza, de baixo custo, compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina se apresentam como alternativa promissora na obtenção de açúcares fermentáveis para produção de biocombustíveis e de macromoléculas, como enzimas hidrolíticas. Nesse contexto o presente estudo teve como objetivo a produção, o isolamento, a identificação das celulasas produzidas por *Coleosporium plumeriae*. Esse fungo filamentosso foi isolado em meio de cultura batata-dextrose-ágar a partir dos esporos. O perfil de produção enzimática de celulasas por fermentação em estado sólido (FES) foi avaliado em diferentes meios de cultura, o bagaço da cana, farelo de trigo e pó de madeira em estufa bacteriológica em temperatura de 27,5°C. A partir do meio farelo de trigo, o meio com maior produção enzimática, 220,76 U/g, se produziu um extrato bruto para se iniciar a purificação da celulase. A enzima foi completamente isolada por uma precipitação utilizando etanol, tendo sua maior recuperação na fração 80-100% de etanol e seguida por uma cromatografia de exclusão molecular. A purificação da celulase foi confirmada através de um gel de poliacrilamida 12% corado com prata, onde se evidencia uma única banda nas frações cromatográficas 18 e 20. O estudo demonstrou a viabilidade na produção de celulase utilizando meios de baixo custo (oriundos de resíduos agroindustriais) e o isolamento inédito de uma celulase produzida pelo *Coleosporium plumeriae*.

**Palavras-chave:** isolamento, enzima, fungo filamentosso.

## ABSTRACT

The countless discussions regarding the importance of sustainability in productive activities and concerns about the problems related to the generation of agro-industrial residues have been highlighted, since it becomes increasingly necessary to adopt alternatives to replace the use of fuel fossils. Thus, lignocellulosic materials, the most abundant bio-renewable resource in nature, with low cost, mainly composed of cellulose, hemicellulose and lignin, present themselves as a promising alternative in obtaining fermentable sugars for the production of biofuels and macromolecules, such as hydrolytic enzymes. In this context, the present study aimed to produce, isolate and identify cellulases produced by *Coleosporium plumeriae*. This filamentous fungus was isolated on potato-dextrose-agar culture medium from the spores. The enzymatic production profile of cellulases by solid state fermentation (FES) was evaluated in different culture media, sugarcane bagasse, wheat bran and wood powder in a bacteriological oven at a temperature of 27.5°C. From the wheat bran medium, the medium with the highest enzyme production, 220.76 U/g, a crude extract was produced to begin cellulase purification. The enzyme was completely isolated by a precipitation using ethanol, having its highest recovery in the 80-100% ethanol fraction and followed by a size exclusion chromatography. The purification of cellulase was confirmed using a 12% silver-stained polyacrylamide gel, which shows a single band in chromatographic fractions 18 and 20. The study demonstrated the feasibility of producing cellulase using low-cost media (from agro-industrial residues) and the unprecedented isolation of a cellulase produced by *Coleosporium plumeriae*..

**Keywords:** isolation, enzyme, filamentous fungus.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular das plantas..... 17
- Figura 2.** Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico..... 22
- Figura 3.** (A) Exemplar de Jasmim-manga planta do gênero *Plumeria*. (B) Folha com esporos e bisturi..... 31
- Figura 4.** Crescimento do fungo em placa de Petri utilizando meio batata dextrose ágar..... 32
- Figura 5.** Esporos de *Coleosporium plumeriae* na lente de aumento de 40x.. 32
- Figura 6.** Curva padrão de glicose plotando absorvância x concentração. Através da regressão linear, é determinada a equação da curva e o coeficiente de correlação, onde  $y=$  é o valor da absorvância obtida.....33
- Figura 7.** Perfil fermentativo para a determinação do tempo ótimo de produção da atividade celulase pelo fungo filamentosso *Coleosporium plumeriae* em meio contendo: (A) bagaço de cana, (B) pó de madeira, e (C) farelo de trigo. Os dados foram processados com o software OriginPro 8.....34
- Figura 8.** Gráfico da média da atividade de celulase pelo fungo *Coleosporium plumeriae* nos diferentes meios de cultura. Os dados foram processados com o software OriginPro 8..... 35
- Figura 9.** Recuperação da atividade de celulase de *Coleosporium plumeriae* produzida em meio contendo farelo de trigo após o fracionamento com álcool etílico. Os dados foram processados com o software OriginPro 8.....
- Figura 10.** Cromatograma de enzimas celulases produzidas pelo fungo *Coleosporium plumeriae*, amostra foi aplicada numa coluna de gel filtração (67x0,9) de Sephacryl S-100. A cromatografia foi desenvolvida à temperatura ambiente com fluxo de 0,1 mL/min., coletou-se frações de 2 mL. O tampão utilizado foi o acetato de sódio 100 mM pH 5 + 0,5M de NaCl. A concentração de proteínas foi estimada por absorvância a 280 nm e a atividade enzimática dos tubos foi determinada pela determinação de açúcares redutores pelo

método de DNS de Miller, no comprimento de onda de 540 nm. Os dados foram processados com o software OriginPro 8.....38

**Figura 11.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) realizada em presença de SDS. Da esquerda para a direita: 1– Extrato enzimático bruto, 2– fração 80-100% da precipitação com etanol, 3– Tubo 17 da cromatografia de gel filtração, 4– Tubo 18 da cromatografia de gel filtração e 5– Tubo 20 da cromatografia de gel filtração..... 39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Taxonomia do Fungo <i>Coleosporium plumeriae</i> .....	20
<b>Tabela 2.</b> Diluições para preparo da curva padrão de glicose.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Abs:** Absorbância

**AR:** Açúcares redutores

**BDA:** Batata dextrose ágar

**CMC:** Carboximetilcelulose

**DNS:** ácido dinitrosalicílico

**FES:** Fermentação em Estado Sólido

**FSm:** Fermentação Submersa

**GP:** Grau de Polimerização

**PEG:** Polietilenoglicol

**IUBMB:** International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

**mg:** Miligrama

**mL:** Mililitros.

**mM:** Milimolar.

**nm:** Nanômetros.

**pH:** Potencial hidrogeniônico

**RPM:** Rotação por minuto.

**SDS:** Dodecil sulfato de sódio.

**TEMED:** Tetrametiletilenodiamina.

**TH:** Tempo de hidrólise

**UV-vis:** Ultravioleta visível.

**VE:** Volume do extrato

**VT:** Volume total

**µg:** Microgramas.

**µL:** Microlitros.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1 Resíduos agroindustriais.....	16
2.2 Fermentação em estado sólido .....	18
2.3 <i>Coleosporium plumeriae</i> e seu hospedeiro .....	20
2.4 Celulases .....	21
2.4.1 Endoglucanases .....	22
2.4.2 Aplicações biotecnológicas das endoglucanases .....	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. Objetivo geral .....	25
3.2. Objetivos específicos .....	25
4. METODOLOGIA .....	26
4.1. Microrganismo.....	26
4.2. Preparo do inóculo .....	26
4.3. Fermentação em estado Sólido e determinação do tempo ótimo de produção de celulase .....	26
4.4. Preparo do Extrato Bruto Proteico.....	26
4.5. Preparo da curva padrão de glicose e cálculos de atividade.....	27
4.6. Dosagem de açúcares redutores .....	29
4.7. Precipitação de proteína utilizando solvente orgânico .....	29
4.8. Sephacryl S-100.....	29
4.9. Espectrofotometria UV - Visível.....	30
4.10. Eletroforese (SDS-PAGE).....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
5.1. Isolamento do fungo e crescimento microbiano .....	31
5.2. Curva Padrão de Glicose. ....	33

5.3. Fermentação em estado sólido e determinação do tempo ótimo de produção da atividade da celulase nos diferentes meios de cultura. ....	33
5.4. Precipitação com solvente orgânico.....	36
5.5. Cromatografia de gel-filtração. ....	37
5.6. Eletroforese com SDS em gel de poliacrilamida. ....	38
6. CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41

## 1. INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira tem se consolidado como o grande vetor de desenvolvimento do país. Essa grande produção gera conseqüentemente um quantitativo de resíduos que por sua vez são responsáveis por uma parcela da poluição e degradação do meio ambiente. Nos últimos anos, tem crescido o interesse pela utilização de resíduos agrícolas como meios de cultura alternativos e na produção de biocombustíveis. Anualmente 180 bilhões de toneladas de celulose são sintetizadas por plantas vasculares e por isso são responsáveis pelo maior reservatório de carbono orgânico do planeta (FESTUCCI-BUSELLI, 2007).

Basicamente, esses resíduos são constituídos de compostos lignocelulósicos, os quais são os recursos renováveis mais abundantes na natureza, sendo esses constituídos majoritariamente de celulose, hemicelulose e lignina (CASTRO; PEREIRA, 2010). Nesse sentido, as pesquisas com bioprocessos crescem exponencialmente e o foco da maioria delas é a produção compostos com alto valor agregado a partir dos subprodutos agroindustriais (COUTO e SANROMAN, 2006; SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

O alto custo da produção das enzimas limita a utilização das mesmas em escala industrial (AHAMED; VERMETTE, 2008; SOHAIL et al., 2009). A fonte de carbono utilizada no cultivo dos micro-organismos é apontada como um dos fatores que mais influenciam no rendimento e afetam o custo de produção enzimática (BEG et al., 2000, SENTHILKUMAR et al., 2005). Os resíduos agrícolas são ótimas fontes de carbono, ideal para o crescimento fúngico, isso acontece devido a secreção de enzimas lignocelulolíticas pelas hifas que por sua vez hidrolisam o substrato e fornecem os açúcares necessários para a sustentação do crescimento microbiano (ELISASHVILI et al., 2008).

Para que seja ideal o substrato lignocelulósico deve ser barato, de fácil processamento, de grande disponibilidade e, sua composição deve ser adequada tanto para a hidrólise quanto para a produção das enzimas celulolíticas (JUHÁSZ et al., 2005).

Vários estudos evidenciam o uso de resíduos florestais e agrícolas para utilização como meio de cultivo para a obtenção de enzimas que podem ser utilizadas em importantes bioprocessos industriais (ROMERO et al., 1999; WANG; YANG, 2007). Resíduos ou subprodutos agroindustriais como, farelo de trigo, palha, sabugo e talos de milho, polpa de frutas, resíduos de tubérculos, cascas de sementes e farelos residuais da obtenção de óleos, podem ser explorados por meio de fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação submersa (FSm) para produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por serem uma fonte de carbono e de diversos nutrientes essenciais para o crescimento microbiano como fósforo, nitrogênio e potássio (DOGARIS et al., 2009; ÖGEL et al., 2001).

No Brasil a agroindústria de milho, cana de açúcar, arroz, mandioca, trigo, citrus, coco e gramíneas, geram coletivamente 597 milhões de toneladas de resíduos por ano (FERREIRA-LEITAO et al, 2010).

O ideal seria o uso desses recursos renováveis para a produção sustentável via cultivo microbiano de produtos químicos. Caso essa biomassa não seja utilizada na geração de produtos de alto valor agregado, ela permanecerá no fluxo de resíduos, necessitando de tratamentos caros ou eliminada de forma inadequada (WANG; YANG, 2007). Dessa forma, a utilização desses resíduos como substratos para a produção de enzimas através de FES e FSm tem se mostrado uma ótima escolha, uma vez que, se agrega valor aos resíduos e se produz macromoléculas de interesse tecnológico.

Dentre as enzimas produzidas por FES destacam-se os estudos com a celulases, que está classificada com o EC 3.2.1.4, possui como nome sistemático, segundo a IUBMB -International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1,4-  $\beta$ -D-glucana-4-glucano-hidrolase. É a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise de homopolissacarídeos de glicose. São eles: a endoglicanase (1,4-b-D-glucana-4-gucano-hidrolase, EC-3.2.1.4), a celobio-hidrolase (1,4-b-Dglucanacelobio-hidrolase, EC-3.2.1.91) e a b-glicosidase (b-D-glicosídeo glucohidrolase, EC-3.2.1.21).

A celulase hidrolisa as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP)

e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e outro não redutor (ZANDONÁ, 2001). As celulases têm ganhado muito destaque devido sua versatilidade em aplicações na hidrólise de resíduos agrícolas visando à liberação da glicose contida na celulose (OLSSON et al., 2003).

São disponibilizadas na indústria de papel para branqueamento da polpa de celulose, na indústria têxtil produzindo a aparência “lavada” de jeans e tornando tecidos mais lisos e macios, e na indústria de alimentos, na produção de sucos de frutas, liquefazendo o tecido vegetal e permitindo a extração de pigmentos do fruto, entre outros (MUSSATTO et al., 2010).

Atualmente, a principal aplicação dessas enzimas é na desconstrução da celulose para liberar produtos fermentáveis, gerando o etanol de segunda geração (AGONTINHO, 2014; HIMMEL et al., 1999).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Resíduos agroindustriais**

A produção agroindustrial é uma das mais importantes atividades socioeconômicas humanas, uma vez que visa à produção de alimentos, fibras e bioenergia. Mais recentemente a passou também a prover matérias-primas diversas para produção de novos bioprodutos e bioinsumos, naquilo que se convencionou chamar de economia circular ou bioeconomia. Isso somente foi possível pelo constante avanço científico-tecnológico que permitiu o desenvolvimento de novas biomassas assim como de novos processos industriais para aproveitamento de culturas dedicadas e também daquilo que outrora era chamado de resíduo. (VAZ JUNIOR. S. 2020).

Para se ter uma ideia da dimensão de tal atividade, dados recentes estimam que a produção agrícola mundial seja da ordem de 7,26 Gt, e que o volume de resíduos secos de biomassa vegetal atinja o equivalente a 140 Gt (TRIPATHI, N et al. 2019). Essa enorme quantidade de resíduos, pode ser um grave problema ambiental.

A biomassa agrícola (dedicada ou residual) é atualmente aproveitada como matéria-prima para produção de novos produtos como biocombustíveis, bioenergia, biopolímeros, biomateriais, produtos químicos, farmacêuticos, cosméticos e produtos de higiene, além de agroquímicos como biofertilizantes e biopesticidas, sob a ótica da bioeconomia, gerando inúmeros benefícios socioeconômicos e ambientais à nossa sociedade (VAZ JUNIOR. S. 2020).

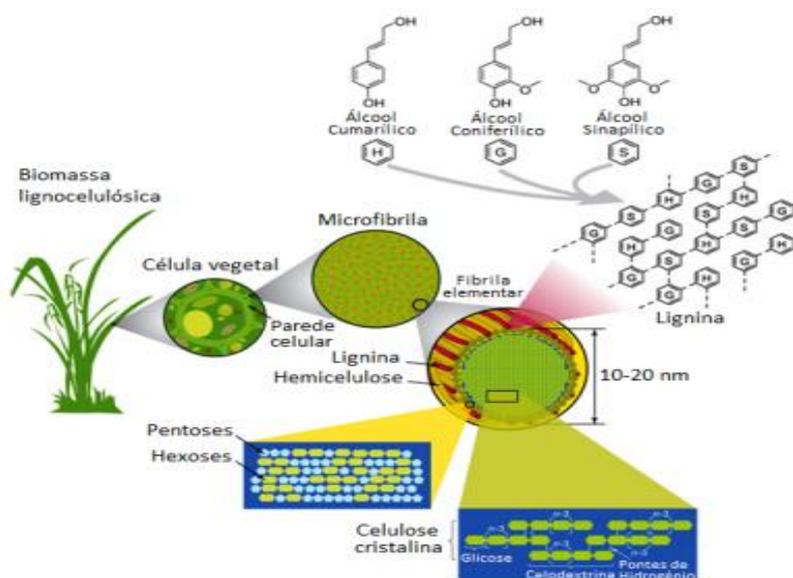
Aproximadamente 60% da biomassa vegetal é composta por materiais lignocelulósicos. Eles podem ser divididos em seis grupos principais: resíduos de colheitas (bagaço de cana, palha de milho etc.), madeira de lei (álamo alpino e álamo), madeira de conífera (pinheiro e abeto), resíduos celulósicos (lodo de papel e papel reciclado, jornais etc.), biomassas herbáceas (feno de alfafa, caniço-malhado etc.) e resíduos sólidos municipais (CARDONA et al. 2010).

Esses materiais são compostos por polissacarídeos, celulose (40%-60%) e hemicelulose (20%-40%), associadas a uma estrutura macromolecular que contém substâncias aromáticas chamada lignina (15%-25%) (PEREIRA Jr. et al., 2008).

O principal componente dos materiais lignocelulósicos é a celulose, polissacarídeo formado por moléculas de glicose unidas através de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. Cadeias de celulose são estabilizadas e ligadas entre si por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, formando as fibrilas elementares, que contêm cerca de 36 cadeias justapostas e apresentam 3 nm a 4 nm de largura. Essas fibrilas são unidas umas às outras através da hemicelulose, o segundo mais abundante componente da lignocelulose, que é um polissacarídeo amorfo, composto por vários açúcares de cinco e seis carbonos, como arabinose, galactose, glicose, manose e xilose, além de desoxiaçúcares e ácidos urônicos. Essas estruturas são cobertas pela lignina, um polímero aromático formado por três estruturas básicas fenólicas, o álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e o álcool sinapílico e seus derivados (DELMER D.P, AMOR Y. 1995).

A **figura 1** apresenta um esquema dos principais constituintes dos materiais lignocelulósicos.

**Figura 1.** Esquema da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular das plantas.



Fonte: ANGARITA MARTÍNEZ, J.D. 2014.

Cada uma das porções dos materiais lignocelulósicos pode ser utilizada com uma finalidade, por exemplo, as porções celulósicas e hemicelulósicas da biomassa podem ser hidrolisadas a vários açúcares e então fermentadas. As ligninas, por sua vez, podem ser degradadas a frações de massas molares menores, sendo utilizadas em vários processos químicos, como na fabricação de espumas de poliuretanos, resinas fenólicas e epóxi, na produção de fenol e etileno, e podem ser convertidas em fibras de carbono (LORA, J.S, GLASSER, W.G. 2002 ; KADLA, J.K et al. 2002.)

## **2.2 Fermentação em estado sólido**

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como o crescimento de micro-organismos em substratos sólidos, na ausência de água livre (RAHARDJO et al., 2006).

A técnica tem se mostrado vantajosa, pois, além de simular o hábitat natural de fungos selvagens (HÖLKER et al., 2005, CASTRO et al., 2015; HANSEN et al., 2015), apresenta maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas às variações de temperatura e pH (SINGHANIA et al., 2010, RODRÍGUEZ ZÚÑIGA et al., 2011).

No entanto, a FES também requer, como qualquer processo biotecnológico, controles sobre o crescimento microbiano e condições de cultivo. Algumas condições biológicas, físico-químicas e ambientais podem afetar diretamente o processo de FES e isso também vai depender do tipo de substrato e micro-organismo utilizados. Tempo de fermentação, temperatura, pH, umidade, atividade de água, substratos e fatores nutricionais são algumas das condições envolvidas nesse processo e determinantes para alcançar uma boa produção de enzimas (KRISHNA, 2005).

Há muito tempo a FES tem sido utilizada para a produção de celulasas e outras enzimas ou bioprodutos (SAQIB et al., 2012). A produção de celulasas foi estudada em muitos fungos filamentosos, particularmente nos grupos *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (CHELLAPANDI, 2008).

O nível das enzimas produzidas por essas culturas é maior do que os obtidos com leveduras e bactérias. Durante a FES os resíduos de origem agro-industrial são utilizados como substratos, os quais se comportam como fonte de carbono, nitrogênio e nutrientes que são importantes para o desenvolvimento dos micro-organismos que realizam a fermentação (LI e ZONG, 2010;KIRAN et al., 2014).

Nos processos biotecnológicos, as matérias-primas naturais, ou resíduos recicláveis como lignina, farelo, farinha de trigo, farinha de arroz, algodão, extrato de levedura, pó de soja, melão de beterraba, amido e celulose são amplamente utilizados como substrato (ALJAMMAS et al., 2017).

### 2.3 *Coleosporium plumeriae* e seu hospedeiro

As ferrugens de plantas são doenças causadas por fungos fitopatogênicos da ordem Pucciniales. É um grupo monofilético, classificado no filo Basidiomycota e classe Pucciniomycetes como descrito na **Tabela 1**. As espécies de ferrugens apresentam os ciclos de vida complexos, podendo apresentar até seis tipos de esporos diferentes (AIME et al. 2006).

São parasitas que apresentam alta especificidade de hospedeiros, sendo capazes de infectar um grande número de plantas vasculares, cultivadas ou silvestres (CUMMINS & HIRATSUKA 2003).

Este grupo de fungos constitui uma das maiores ordens do reino Fungi, com cerca de 8.000 espécies descritas. Para o Brasil são conhecidas cerca de 750 espécies de Pucciniales.(CUMMINS & HIRATSUKA 2003).

**Tabela 1.** Taxonomia do Fungo *Coleosporium plumeriae*.

<b>TAXONOMIA DO <i>Coleosporium plumeriae</i></b>	
<b>Reino</b>	Fungi
<b>Filo</b>	Basidiomycota
<b>Classe</b>	Pucciniomycetes
<b>Ordem</b>	Pucciniales
<b>Família</b>	Coleosporiaceae
<b>Gênero</b>	<i>Coleosporium</i>
<b>Espécie</b>	<i>C. plumeriae</i>
<b>Sub espécie</b>	<i>C. plumeriae</i>

Fonte: Autora, 2021.

A espécie *Coleosporium plumeriae* é conhecida por causar a doença da ferrugem em plantas da espécie *Plumeria* spp, que é mais conhecida como jasmim manga, é um fungo filamentoso. A planta é originária da América

tropical, muito utilizada para ornamentar parques, praças e jardins (LORENZI e MOREIRA, 2008).

As espécies e híbridos variam quanto ao porte da árvore, compacidade, ramificação, formato da folha, deciduidade, tamanho e cor das flores. As folhas são geralmente de cor verde brilhante, comumente ovaladas, variando de 5 a 10 cm de largura e 20 a 30 cm de comprimento. As flores são tubulares, ampliando em um “cata-vento” de cinco pétalas com 5 a 7 cm de diâmetro, podendo ser branca, vermelha, amarela, rosa ou cores variadas. (CRILEY, 2005).

Há poucos relatos da ocorrência de doenças associadas à *Plumeria* spp., no entanto, o fungo *Coleosporium plumeriae* Patoillard é relatado causando ferrugem em plantas desse gênero em vários países. A ferrugem do jasmim-manga foi registrada pela primeira vez em *Plumeria alba* na ilha de Guadalupe em 1902 e mais tarde disseminou-se para a América Central. Pelo menos oito espécies e / ou forma de plumeria são suscetíveis a *C. plumeriae*: *P. alba*, *P. clusioides*, *P. rubra*, *P. obtusa*, *P. pudica*, *P. acuminata*, *P. acutifolia* e *P. variegata*. A maioria das infecções é causada por urediniosporos transportados pelo vento que grudam em folhas úmidas em condições úmidas ou úmidas. Os esporos germinam nas folhas, penetram na superfície e crescem como hifas fúngicas que infectam células dentro da folha. O patógeno sobrevive em folhas infectadas e folhas detritos. (NELSON, 2009)

## **2.4 Celulases**

As enzimas do complexo celulolítico, ou celulases, são hidrolases que clivam ligações O-glicosídicas, sendo classificadas pela *Enzyme Commission* com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a celulase avaliada (HENRISSAT, B. A).

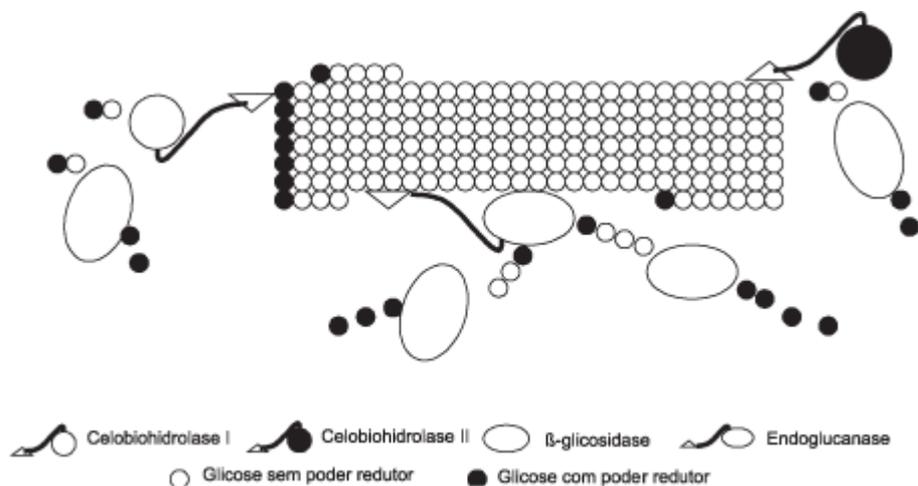
A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e  $\beta$ -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND et al., 2002).

As celulases quando atuam conjuntamente, apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras.

O efeito é conhecido como sinergia. São conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulases (LYND et al., 2002): sinergia EnG-ExG - a endoglucanase, atuando nas regiões amorfas da fibra, disponibiliza terminais reductores e não reductores para atuação de CBH I e CBH II, respectivamente; sinergia ExG-ExG - as CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais reductores e não reductores liberados por ação da endoglucanase; sinergias ExG-BG e EnG-BG - como seus produtos de hidrólise, a celobiohidrolase e a endoglucanase liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a  $\beta$ -glicosidase BHAT et al., 1997).

A **Figura 2** ilustra a ação sinérgica entre exoglucanases, endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase na hidrólise da fibra celulósica.

**Figura 2.** Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico.



Fonte: CASTRO; PEREIRA, 2010.

### 2.4.1 Endoglucanases

A Endo-1,4- $\beta$ -glucanase, chamada de modo simples endoglucanase, quebra aleatoriamente ligações intermoleculares  $\beta$ -1,4-glicosídica na parte interna da cadeia de celulose. A ação das endoglucanases são normalmente

avaliadas pela redução de viscosidade na solução de carboximetilcelulose (CMC). A Endoglucanase, que está classificada com o EC 3.2.1.4, possui como nome sistemático, segundo a *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB), 1,4- $\beta$ -D-glucana-4-glucanohidrolase. É a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise da molécula de celulose. Tal enzima hidrolisa randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente) (LYND et al., 2002).

#### **2.4.2 Aplicações biotecnológicas das endoglucanases**

As enzimas são usadas para catalisar reações de vários processos em muitos setores industriais, como têxteis, papel, produtos farmacêuticos, alimentos e ração animal. Mais de 500 enzimas diferentes são aplicadas em mais de 50 processos biotecnológicos (ADRIO; DEMAIN, 2014).

A produção de celulases em escala industrial começou em meados da década de 80, visando sua aplicação como um aditivo para ração animal, de forma a aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos. Em seguida, essas enzimas começaram a ser utilizadas como um insumo para a indústria de alimentos, cujo objetivo era de melhorar propriedades sensoriais de massas. Nesse setor, as celulases também começaram a atuar no processamento de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos e a manutenção de uma reologia estável do produto final. Posteriormente, as enzimas celulolíticas começaram a ser utilizadas em larga escala nas seguintes indústrias: têxtil, nos então implementados processos de biopolimento (desfibrilação de tecidos como algodão, linho, lã e viscose) e bioestonagem (amaciamiento e desbotamento do brim); de polpa e papel, para a modificação controlada de propriedades mecânicas da polpa e liberação de tintas da superfície das fibras a ser recicladas; e em lavanderia, de forma a aumentar o brilho, a remoção de sujeiras e a maciez dos tecidos, além de

amenizar o desgaste das peças, notado pela formação de fiapos e pelotas após sucessivas lavagens. (ZHOU et al. 2001; COELHO et al. 2008).

Já na década de 90, as celulasas, juntamente com as hemicelulasas, representavam mais de 20% do mercado mundial de enzimas (BHAT, M. K. 2000).

No cenário nacional, em 2008, apenas considerando-se importações e exportações brasileiras, as celulasas movimentaram um montante de USD 1,35 milhão. Uma das mais emergentes aplicações das enzimas do complexo celulolítico atualmente é a hidrólise de biomassas para a obtenção de uma imensa gama de produtos, que abrange desde biocombustíveis até polímeros, sendo o etanol uma das moléculas de maior interesse. Tais tecnologias se enquadram no conceito de biorrefinarias celulósicas, as quais visam o aproveitamento integral e integrado dos resíduos agroindustriais gerados em uma determinada cadeia produtiva, de modo a agregar valor à mesma. (CASTRO; PEREIRA, 2010).

A sacarificação da celulose pode ser conduzida de duas formas principais: por tratamento químico (utilizando-se ácido diluído ou concentrado) ou por rota enzimática, utilizando-se as celulasas (OLOFSSON et al. 2008).

A utilização de celulasas na hidrólise da celulose ocorre em condições mais brandas de pressão, temperatura e pH do que os processos químicos, e exibe elevada especificidade, eliminando a chance de ocorrência de substâncias tóxicas (furfurais e derivados de lignina) às células microbianas que serão utilizadas para fermentação do meio hidrolisado. Na rota enzimática, embora o custo de produção dos biocatalisadores ainda seja alto, são detectados pontos de economia no processo, tanto do ponto de vista energético, como metalúrgico, visto que os equipamentos podem ser confeccionados com materiais menos nobres (BADGER, P. C., 2002).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Este trabalho tem como objetivo produzir, identificar, e isolar as celulasas produzidas pelo fungo filamentoso *C.plumeriae.*, utilizando-se meios de baixo custo.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Isolar o fungo *Coleosporium plumeriae*;
- Produzir a enzima através de FES utilizando os resíduos agroindustriais: farelo de trigo, bagaço de cana e pó de madeira e o fungo *C. plumeriae*;
- Realizar fracionamento proteico do extrato bruto;
- Isolar a enzima da cromatografia de gel filtração.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Microrganismo**

O micro-organismo utilizado nesse estudo foi isolado do jasmim-manga (*Plumeria spp.*), através da raspagem da folha infectada. Um pó de cor amarelo-alaranjado (característico de plantas infectadas por fungos da ferrugem), foi depositado em uma placa de Petri contendo 20 mL do meio de cultura batata-dextrose-ágar.

O fungo foi isolado e repicado por mais três vezes para obtenção de uma solução de esporos e posterior análise de capacidade de crescimento e produção de celulasas em resíduos agroindustriais

### **4.2. Preparo do inóculo**

Após o preparo da suspensão de esporos foi realizado utilizando-se o microorganismo cultivado em meio BDA, por 10 dias a  $\pm 27,5$  °C. Após o período de incubação, a cultura esporulada foi submetida a uma raspagem com auxílio alças de platina utilizando água destilada, ambos previamente esterilizados em autoclave vertical a 121 °C por 15 minutos. A suspensão foi coletada em frasco de vidro e uma alíquota de 1 mL foi tomada e diluída em tubo de ensaio para a contagem do número de esporos em microscópio binocular utilizando câmara de Neubauer.

### **4.3. Fermentação em estado Sólido e determinação do tempo ótimo de produção de celulase**

O estudo foi conduzido em erlenmeyers de 250 mL, contendo 5 g de resíduos agroindustriais (pó de madeira, bagaço da cana e farelo de trigo) e  $10^7$  esporos/mL de solução de esporos. Os erlenmeyers foram incubados em uma estufa bacteriológica a 27.5°C. A atividade celulase foi aferida a cada 24 horas de cultivo.

### **4.4. Preparo do Extrato Bruto Proteico**

O extrato bruto proteico para cada resíduo foi preparado após o tempo de FES, adicionando 40 mL de tampão acetado de sódio 100 mM pH 5 ao

erlenmeyer contendo o resíduo agroindustrial com o fungo, agitando por 5 minutos, centrifugando por 10 minutos a 15000 xg e coletando o sobrenadante.

#### 4.5. Preparo da curva padrão de glicose e cálculos de atividade

Foi preparada uma solução de glicose 1g/L, pesando-se em um bécker 0,1g de glicose e diluindo em cerca de 60 mL de água destilada. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100 mL, e o volume foi completado com água destilada. Homogeneizou-se o frasco. Utilizando esta solução padrão, realizaram-se diluições, conforme **tabela 2**, para se obter diferentes concentrações da amostra.

**Tabela 2.** Diluições para preparo da curva padrão de glicose.

<b>Tubo</b>	<b>Solução de glicose 1g/L (mL)</b>	<b>Volume de H<sub>2</sub>O (mL)</b>	<b>DNS (mL)</b>
1	0	1	0,5
2	0,001	0,999	0,5
3	0,005	0,995	0,5
4	0,010	0,990	0,5
5	0,020	0,980	0,5
6	0,025	0,975	0,5
7	0,050	0,950	0,5
8	0,100	0,900	0,5
9	0,200	0,800	0,5
10	0,300	0,700	0,5
11	0,400	0,600	0,5
12	0,600	0,400	0,5
13	0,800	0,200	0,5
14	0,900	0,100	0,5
15	1	0	0,5

Fonte: Autora, 2021.

Os tubos contendo a mistura reacional foram aquecidos durante 10 min em banho-maria em água fervente ( $\pm 100$  °C), após este tempo eles foram rapidamente resfriados em água gelada e adicionados de 3,5 mL de água destilada completando um volume final de 5 mL. Após homogeneização, as leituras das respectivas absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 540 nm.

A partir da curva padrão de glicose foi possível determinar a quantidade de açúcar redutor (AR) glicose, para cada valor de absorvância obtido. O cálculo de atividade em U/mL foi feito através da equação 1:

$$\frac{U}{mL} = AR \times \left( \frac{VT}{0,18 \times VE \times TH} \right)$$

Onde:

AR= Açúcares redutores (glicose) produzidos na hidrólise (mg/mL);

VT= Volume total utilizado na hidrólise (mL);

VE= Volume apenas do extrato enzimático (mL);

TH= Tempo de hidrólise (minutos);

0,18 =  $1\mu\text{mol}$  de glicose (mg).

O cálculo para converter atividade em U/mL para atividade em U/g foi realizado através da equação 2:

$$\frac{U}{g} = \frac{\frac{U}{mL} \times V_{ex}}{P}$$

Onde:

V<sub>ex</sub>= Volume de tampão utilizado na extração da FES (mL);

P = Peso do resíduo utilizado na FES (g)

#### **4.6. Dosagem de açúcares redutores**

A atividade da enzima celulase foi determinada por meio da dosagem dos açúcares redutores produzidos na degradação enzimática da carboximetilcelulose a 2% p/v diluído em solução tampão de acetato de sódio 100 mM pH 5, a mistura contendo enzima, substrato e tampão foi incubada a 50°C por 60 minutos, posteriormente foi adicionada a mistura o reagente dinitrosalicílico. Essa mistura foi levada a um banho fervente a 100°C por 10 minutos. Após sair do banho a 100°C a mistura reacional foi resfriada e foi adicionado água destilada. Sua quantificação foi feita por meio do método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

#### **4.7. Precipitação de proteína utilizando solvente orgânico**

Foi feito um fracionamento do extrato bruto proteico (EBP) utilizando etanol como solvente orgânico. Foram feitos cinco ciclos de precipitação proteica, 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100% de etanol em solução tampão de acetato de sódio 100mM pH 5. Após cada adição de etanol para a faixa desejada houve uma centrifugação por 15 minutos a 4°C em velocidades de 15000  $xg$ . Antes dos ciclos de centrifugação, a solução permaneceu em repouso na geladeira por uma hora para proceder com a retirada do sobrenadante. O precipitado ao fundo dos tubos no fim de cada ciclo foi coletado e ressuspensionado em 1 mL de tampão de acetato de sódio 100 mM pH 5. Depois da ressuspensão, foi realizado o outro ciclo de precipitação.

#### **4.8. Sephacryl S-100**

A Cromatografia de gel filtração da fração etanólica foi realizada por um aparelho ÄKTA Pure M1(GE). A resina utilizada para o empacotamento da coluna foi Sephacryl S-100 (67x0,9). A cromatografia foi desenvolvida à temperatura ambiente ( $28\pm 3^{\circ}C$ ) com fluxo de 0,1 mL/min com coleta de frações de 2 mL. O tampão utilizado foi o acetato de sódio (100 mM pH 5 + 0,5M de NaCl).

#### **4.9. Espectrofotometria UV - Visível.**

Ao final da corrida e coleta das frações, de cada tubo foi retirada uma alíquota de 1 mL para ser submetida à leitura no comprimento de onda de 280 nanômetros (nm) em espectrofotometria para identificar nas frações coletadas, a presença de proteínas. Também por espectrofotometria foi realizada a quantificação de açúcares redutores conforme descrito no item 4.6.

#### **4.10. Eletroforese (SDS-PAGE)**

A eletroforese com gel de poliacrilamida como é descrito em LAEMMLI (1970) foi utilizada para avaliação da pureza dos tubos com atividade de celulase da cromatografia em gel. O gel de separação contém 937,5 µL de solução tampão Tris-HCl pH=8,8 a 2 Mol/L, 1500 µL de acrilamida, 500 µL de SDS e 1562,5 µL de água deionizada, 250 µL de persulfato de amônio e 250 µL de TEMED (Tetrametiletilenodiamina). Uma hora depois da aplicação do gel na placa de eletroforese, fez-se o gel de empilhamento contendo 1000 µL de solução tampão Tris-HCl pH=6,8 a 0,5 Mol/L, 600 µL de acrilamida, 400 µL de SDS, 1000 µL de água deionizada, 200 µL persulfato de amônio e 200 µL de TEMED. O gel superior foi aplicado na placa após breve homogeneização, colocando os pentes para a formação das canaletas enquanto o gel polimerizava. O processo de polimerização do gel superior durou mais uma hora. O gel de empilhamento foi feito a 4% (w/v) e gel de separação a 12% (w/v). A eletroforese ocorreu em voltagem constante de 90 Volts. Em ambos os géis, as soluções usadas foram de acrilamida 30%, SDS 1% (w/v), persulfato de amônio 0,15 Mol/mL e TEMED em proporção de 1:100 (10 µL de TEMED em 990 µL de água deionizada).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Isolamento do fungo e crescimento microbiano

Foram coletadas folhas do Jasmin-Manga (figura 3-A) apresentando sintomas da ferrugem. Os esporos (de cor amarelada) foram raspados da folha com auxílio de um bisturi (figura 3-B) e adicionados a um eppendorf contendo água destilada esterilizada. O conteúdo do eppendorf foi agitado e aplicado a uma placa de petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar.

**Figura 3.** (A) Exemplar de Jasmim-manga planta do gênero *Plumeria*. (B) Folha com esporos e bisturi.

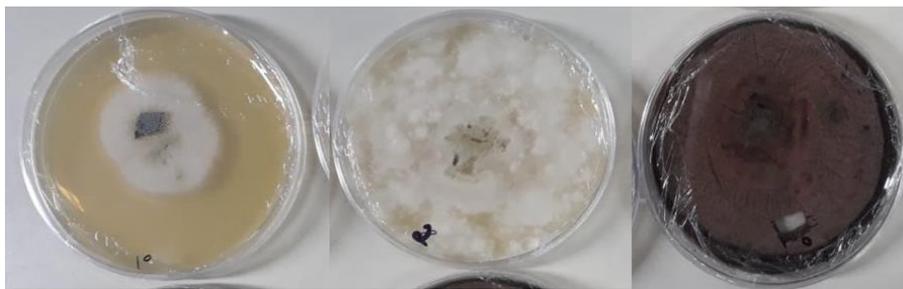


Fonte: Autora, 2021.

As placas inoculadas foram incubadas em câmara de germinação BOD, com temperatura controlada de  $\pm 27,5^{\circ}\text{C}$  e durante 10 dias foi observado o crescimento micelial nas placas, então o fungo *C. plumeriae* foi isolado dos outros, e repicado por mais 3 vezes.

A partir do fungo isolado, foram feitos mais repiques e durante mais 10 dias foi observado o seu crescimento na placa de Petri, como podemos observar na **Figura 4**, o fungo se apresentou primeiramente com a cor branca e após a primeira semana o fungo apresentou coloração escura, um indício de esporulação.

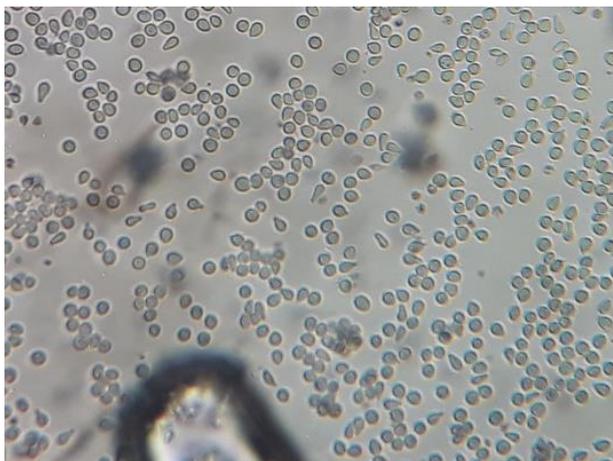
**Figura 4.** Crescimento do fungo em placa de Petri utilizando meio batata dextrose ágar.



Fonte: Autora, 2021.

A partir daí foi feita uma solução de esporos (**Figura 5**) com uma concentração fixa de  $10^7$  esporos/mL, que foi contada com auxílio de um microscópio óptico em uma câmara de Neubauer, utilizando uma lente objetiva com aumento de 40x.

**Figura 5.** Esporos de *Coleosporium plumeriae* na lente de aumento de 40x.

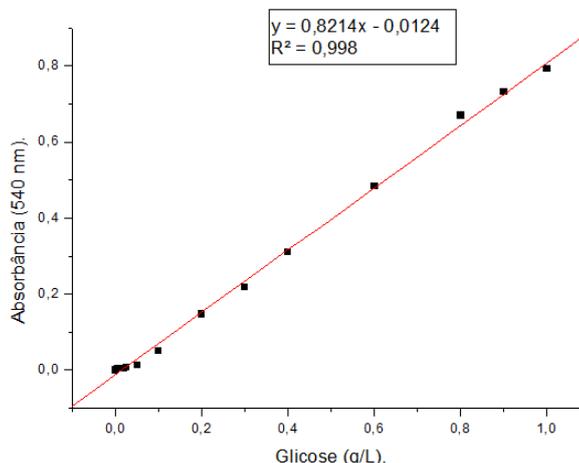


Fonte: Autora, 2021.

Através da visualização dos esporos, pode-se confirmar através dos aspectos morfológicos que o fungo isolado se tratava do *C. plumeriae*, fungo conhecido por causar doenças da ferrugem em *Plumeria* spp. (O jasmim-manga.)

## 5.2. Curva Padrão de Glicose.

**Figura 6.** Curva padrão de glicose plotando absorvância x concentração. Através da regressão linear, é determinada a equação da curva e o coeficiente de correlação, onde  $y$  = é o valor da absorvância obtida.



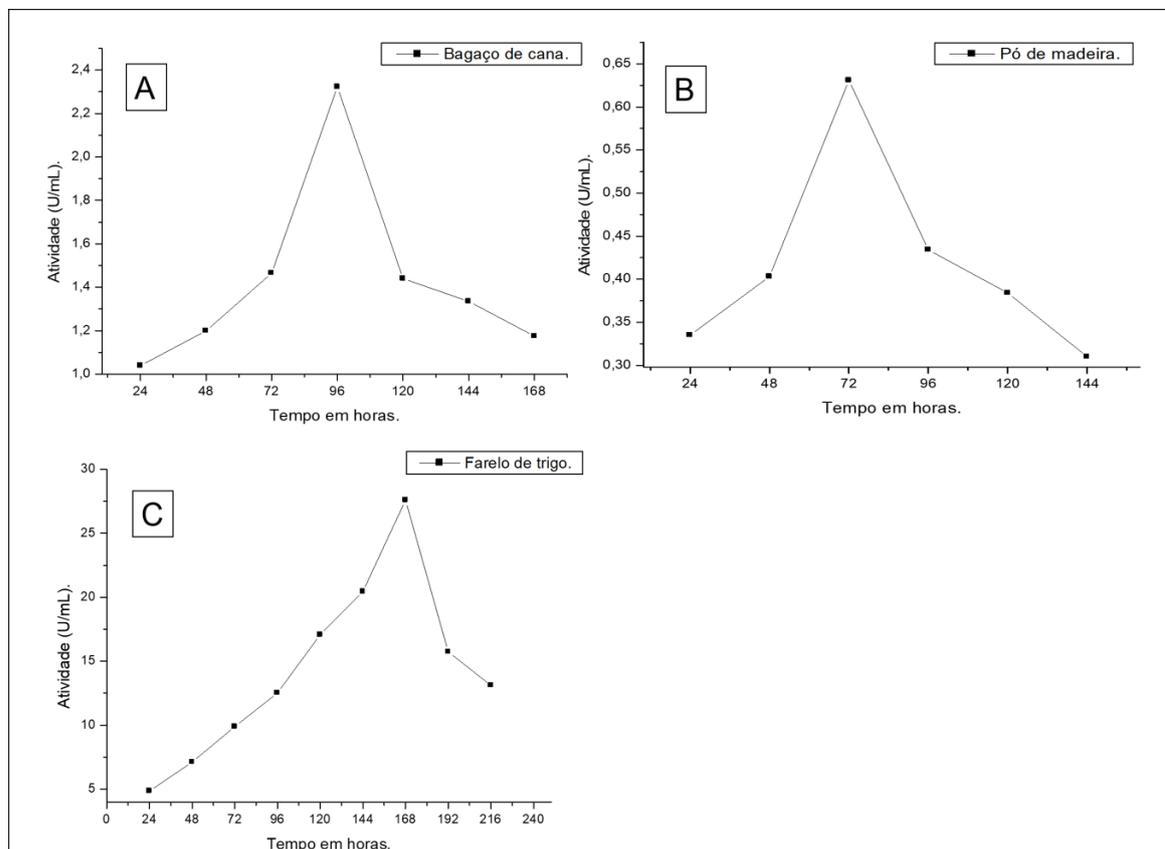
Fonte: Autora, 2021.

## 5.3. Fermentação em estado sólido e determinação do tempo ótimo de produção da atividade da celulase nos diferentes meios de cultura.

Após o preparo da solução de esporos, foi realizada uma FES. As fermentações foram realizadas em incubadora BOD com temperatura controlada utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL como biorreator e os resíduos (bagaço de cana, pó de madeira e farelo de trigo) como o único substrato. Cada frasco contendo 5g de resíduo foi submetido à esterilização em autoclave vertical a 121°C por 15 min. Em seguida, o material foi disposto em cabine de segurança biológica sob incidência de luz ultravioleta até seu resfriamento. Foi inoculado ao meio a quantidade de  $10^7$  esporos por grama de substrato e água destilada esterilizada foi adicionada até atingir umidade desejada. Sendo assim foi observado o crescimento micelial, como também feita a dosagem da atividade de celulase de 24 em 24 horas.

A determinação do perfil fermentativo foi realizada a fim de se obter um tempo ótimo para a produção de celulase nos resíduos agroindustriais. A **figura 7** mostra os gráficos de perfil fermentativo para determinação do tempo ótimo de produção da atividade de celulase do *C. plumeriae*.

**Figura 7.** Perfil fermentativo para a determinação do tempo ótimo de produção da atividade celulase pelo fungo filamentoso *Coleosporium plumeriae* em meio contendo: (A) bagaço de cana, (B) pó de madeira, e (C) farelo de trigo. Os dados foram processados com o software OriginPro 8.



Fonte: Autora, 2021.

*C. plumeriae* demonstrou capacidade de se desenvolver sobre todos resíduos sem que houvesse um pré-tratamento químico, o qual quando utilizado tem finalidade de remover lignina, auxiliando na exposição da celulose (SILVA-DERNANDES et al. 2017).

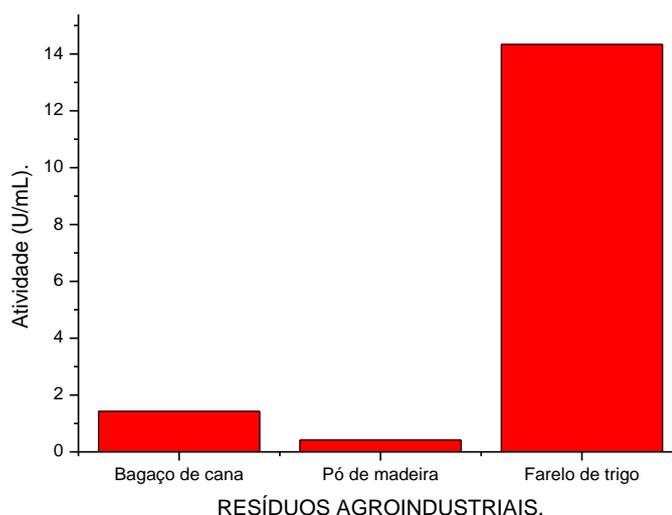
Com teste de detecção de atividade da celulase foi notado que existe a presença da enzima celulase nos extratos preparados com os resíduos após a solução de esporos ser adicionada. No ensaio realizado, a enzima presente no extrato ao entrar em contato com seu substrato específico, a Carboximetilcelulose (CMC), libera unidades de glicose no meio através da clivagem enzimática. A glicose foi detectada através do método de DNS que é um método utilizado na dosagem de açúcares redutores onde ocorre a oxidação do grupo carbonila. No método do DNS a seguinte reação de

oxidação ocorre: redução do ácido 3,5-di-nitrosalicílico (de cor amarelo forte) e a oxidação do monossacarídeo, formando o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de cor laranja-marrom forte), na proporção estequiométrica. Portanto, pela determinação da luz absorvida a 540 nm pelo 3-amino-5nitrosalicilato, pode se determinar a concentração de açúcar redutor presente na solução.

Na figura 7, podemos observar que o meio onde houve a maior obtenção de enzima foi o contendo apenas farelo de trigo com atividade de 220,76 U/g (27,59 U/mL) em 168h seguido pelo meio com bagaço de cana 18,58 U/g (2,32 U/mL) em 96h e por último, com pouca atividade enzimática o meio contendo pó de madeira 5,05 U/g (0,631 U/mL) em 72h, o decréscimo a partir do dia com maior atividade leva a conclusão de que está havendo uma redução de nutrientes, que em consequência leva ao decréscimo no crescimento microbiano e em consequência excreção de enzimas.

Na **figura 8** é possível notar a diferença entre a produção média de enzimas utilizando cada resíduo agrícola.

**Figura 8.** Gráfico da média da atividade de celulase pelo fungo *Coleosporium plumeriae* nos diferentes meios de cultura. Os dados foram processados com o software OriginPro 8.



Fonte: Autora, 2021.

Comparando com outros fungos produtores de celulases, notamos que Silva et al. (2005) obteve uma atividade um pouco maior, 3 U/mL utilizando o fungo *Thermoascus aurantiacus* em bagaço da cana.

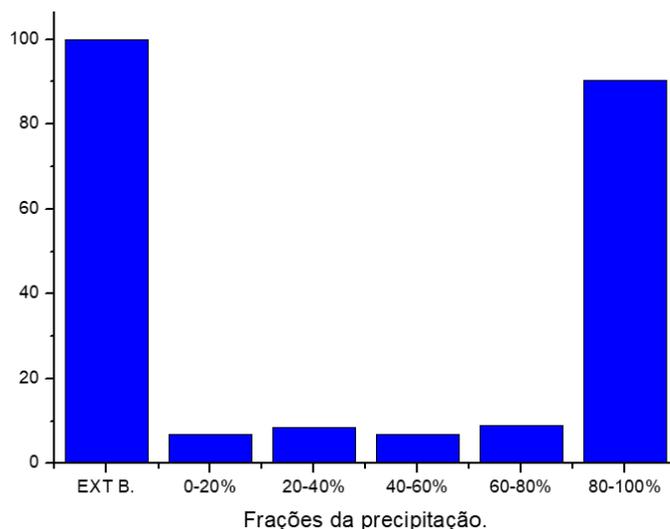
Quando utilizando o farelo de trigo como meio de fermentação em estado sólido, Sukumaran et al. (2009) produziu celulase através do fungo *Aspergillus niger* MTCC7956 e obteve atividade de 135,4 U/g. Zanchetta, (2012) também obteve atividade celulásica de 62,4 U/g utilizando farelo de trigo. Além disso utilizou um blend de resíduos agrícolas para a fermentação em estado sólido, utilizando assim bagaço de cana e farelo de trigo (1:1), para produzir celulase a partir do fungo filamentoso *Chaetomium sp.* N13 tendo atividade de 192,0 U/g em 192hrs. Uma atividade relativamente menor do que a celulase produzida pelo fungo do presente estudo, o *Coleosporium plumeriae* que com farelo como única fonte de carbono, produziu 220,76 U/g.

O farelo de trigo sendo o meio com maior atividade enzimática pode ser explicado pela diferença da composição da fonte de carbono, ou seja, a fonte de carbono que é mais facilmente hidrolisada é utilizada pelo microrganismo para sintetizar mais enzima. Sendo assim extrato bruto obtido através de FES utilizando o farelo de trigo é um meio promissor para a produção de celulase, sendo utilizado para a purificação da enzima.

#### 5.4. Precipitação com solvente orgânico

Após a escolha do melhor meio de cultura para a produção de celulase, deu-se início as etapas de purificação da enzima. O primeiro passo da purificação foi realizar um fracionamento com etanol, sendo utilizado para retirar as proteínas e contaminantes que precipitam em concentrações diferentes da enzima de interesse. A **figura 9** mostra um gráfico da atividade enzimática proporcional, referente ao extrato bruto antes de ser submetido ao fracionamento com solvente orgânico e posteriormente as frações obtidas após a adição do etanol.

**Figura 9.** Recuperação da atividade de celulase de *Coleosporium plumeriae* produzida em meio contendo farelo de trigo após o fracionamento com álcool etílico. Os dados foram processados com o software OriginPro 8.



Fonte: Autora, 2021.

O extrato representa 100% da atividade enzimática, e como pode ser notado o fracionamento concentrou a atividade enzimática em sua maior parte no sobrenadante final, a fração que é denominada de 80-100%. Tendo uma recuperação total de 92,91% apenas nesta fração.

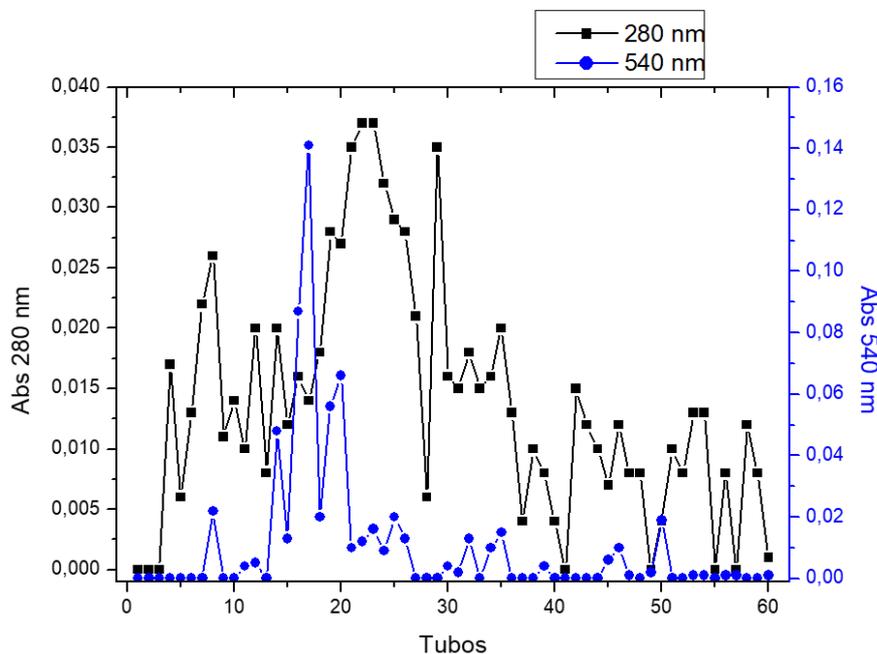
Após esta etapa, o sobrenadante contendo a maior atividade enzimática foi concentrado utilizando polietilenoglicol (PEG), e posteriormente aplicado em uma cromatografia de gel filtração sephacryl S-100.

### 5.5. Cromatografia de gel-filtração.

O sobrenadante concentrado da precipitação com etanol, denominada fração 80-100% foi aplicado na coluna de gel filtração. Foram coletados 60 tubos contendo 2 mL. O cromatograma (**Figura 10**) mostra as absorbâncias em 280 nm e a absorbância do teste de atividade enzimática, feito a 540 nm.

**Figura 10.** Cromatograma de enzimas celulasas produzidas pelo fungo *Coleosporium plumeriae*, amostra foi aplicada numa coluna de gel filtração (67x0,9) de Sephacryl S-100. A cromatografia foi desenvolvida à temperatura ambiente com fluxo de 0,1 mL/min., coletou-se frações de 2 mL. O tampão utilizado foi o acetato de sódio 100 mM pH 5 + 0,5M de NaCl. A concentração de proteínas foi estimada por absorbância a 280 nm e a atividade enzimática dos tubos foi determinada pela determinação de açúcares redutores pelo

método de DNS de Miller, no comprimento de onda de 540 nm. Os dados foram processados com o software OriginPro 8.



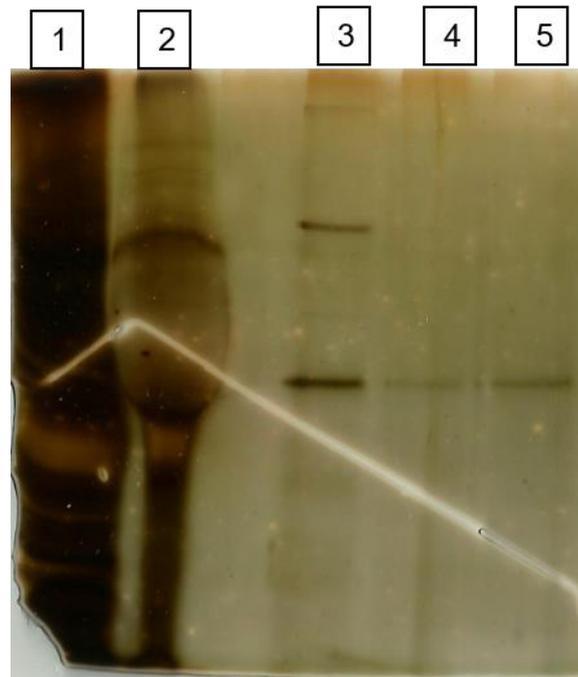
Fonte: Autora, 2021.

### 5.6. Eletroforese com SDS em gel de poliacrilamida.

Posterior à etapa cromatográfica, foi feita a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e em seguida, a coloração com prata para evidenciar no gel as bandas dos tubos que obtiveram maior leitura no comprimento de onda 540 nm.

A **figura 11** mostra o gel após a coloração com prata, com cada uma das canaletas identificadas, exibindo o perfil proteico de cada uma delas

**Figura 11:** Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) realizada em presença de SDS. Da esquerda para a direita: 1– Extrato enzimático bruto, 2– fração 80-100% da precipitação com etanol, 3– Tubo 17 da cromatografia de gel filtração, 4– Tubo 18 da cromatografia de gel filtração e 5– Tubo 20 da cromatografia de gel filtração.



Fonte: Autora, 2021.

Através do gel podemos observar que a cada passo de purificação a complexidade proteica da amostra diminui, sendo a canaleta 1 o extrato bruto, uma amostra complexa com muitas bandas de proteínas, e ao final do processo da purificação, dada pela cromatografia de gel filtração foi evidenciada a purificação da enzima. Sendo possível notar apenas uma banda proteica no gel nas canaletas 4 e 5.

## 6. CONCLUSÕES

Este é o primeiro trabalho a descrever uma atividade enzimática no microrganismo *Coleosporium plumeriae* e concluir seu isolamento. Os resultados experimentais confirmaram a viabilidade da produção da celulase a partir da inoculação do *C. plumeriae*, em meios de baixo custo (resíduos agroindustriais). Sendo o farelo de trigo o meio mais promissor para a obtenção da celulase. É importante ressaltar que o fungo excretou a enzima tendo como indutor unicamente o resíduo agroindustrial desprovido de pré-tratamento químico, sendo assim um método com menos custos, menos etapas de execução. A celulase produzida foi isolada em apenas dois passos do processo de purificação a precipitação com etanol e sendo apenas utilizado um processo cromatográfico. Como perspectiva temos a caracterização bioquímica e aplicação biotecnológica da celulase produzida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIO, J. L. and DEMAIN, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**. v. 4, n. 1, p. 117–139, 2014.

AGONTINHO F. et al., Influence of enzyme production on the energetic environmental performance of lignocellulosic ethanol. **Ecological Modelling**, 315, p 46-56, 2014.

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 399-407, 2008.

AIME M.C., MATHENY P.B., HENK D.A., FRIEDERS E.M., NILSSON R.H., PIEPENBRING M., MCLAUGHLIN D.J., SZABO L.J., BEGEROW D., SAMPAIO J.P., BAUER R., WEIß M., OBERWINKLER F. & HIBBETT D. An overview of the higher level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. **Mycologia** 98: 896-905, 2006.

ALJAMMAS, H.A., FATHI, H.A., ALKHALAF, W. Study the influence of culture conditions on rennin production by *Rhizomucor miehei* using solid-state fermentations. **Journal of genetic engineering and biotechnology**. 2017.

ANGARITA MARTÍNEZ, J.D. Modelagem Cinética da Hidrólise Enzimática da Palha de Cana-de-Açúcar Pré-tratada Hidrotermicamente/ Javier David Angarita Martínez. -Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2014.

BADGER, P. C., Trends in New Crops and New Uses. In: J. Janick and A. Whipkey, (Ed.) ASHS Press, Alexandria, 2002.

BEG, Q.K., B. BHUSHAN, M. KAPOO, G.S. HOONDAL. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. **Enzyme Microbial and Technology**, 27, pp. 459-466, 2000.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications; **Biotechnology. Advances**, 15, p 583, 1997.

BHAT, M. K.; **Biotechnology Advances 2000**, 18, 355.

CARDONA C.A.; QUINTERO J.A.; PAZ I.C. Production of bioethanol from the sugar cane bagasse: Status and Perspectives. **Bioresource Technology**. 2010 101:4754-60.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181- 188, 2010.

CASTRO, A.M.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Performance of a fixed-bed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration for the production of hydrolases by *Aspergillus awamori*. **Biochemical Engineering Journal**, v.93, p.303-308, 2015.

CHELLAPANDI P.; HIMANSHU M. J. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.39, n.1, p. 122-127, 2008.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D.; Tecnologia Enzimática, 1ª ed., EPUB: Rio de Janeiro, 2008.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates for valorization in biorefineries. **Bioresource Technology**. 243, 384–392.

CRILEY, R.A. Plumeria in Hawai'i. **Department of Tropical Plant and Soil Sciences**. Disponível em:<<https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/OF-31.pdf>>. Acesso em: 20/12/2020.

CUMMINS G.B & HIRATSUKA Y. Illustrated genera of rust fungi. 3<sup>rd</sup> ed. **APS Press**, St Paul. 225p, 2003.

DELMER D.P, AMOR Y. Cellulose biosynthesis. **The Plant cell**. 1995;7:987-1000.

DOGARIS, I.; VAKONTIOS, G.; KALOGERIS, E.; MAMMA, D.; KEKOS, D. Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 404-411, 2009.

ELISASHVILI, V.; PENNINGCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; KVESITADZE, G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of 80 lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 457- 462, 2008.

FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C.; BON, E. P. S. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste Biomass Valorization**, v. 1, p. 65-76, 2010.

FESTUCCI-BUSELLI, R.A., OTONI, W.C., JOSHI, C.P. Structure, Organization, and Functions of Cellulose Synthase Complexes in Higher Plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 19(1);2007.

HANSEN, G.H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J.C.; LÜBECK, P.S.; ANDERSEN, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v.50, n.9, p.1327- 1341, 2015.

HENRISSAT, B. A. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemistry Journal** 1991, 280, 309-316.

HIMMEL, M.E., RUTH, M.F., WYMANS, C.E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Current Opinion in Biotechnology**. 1999, 10, 358-364.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v.8, n.3, p.301-306, 2005.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma*

reesei on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3519–3525, 2005.

KADLA J.K, KUBO S., VENDITTI R.A., GILBERT R.D., COMPERE A.L., GRIFFITH W. Lignin-based carbon fibers for composite fiber applications. **Carbon**. 2002;40:2913-20.

KIRAN, E. U.; TRZCINSKI, A. P.; NG, W. J.; LIU, Y. Enzyme production from food wastes using a biorefinery concept. **Waste Biomass Valorization**, v. 5, n. 6, p. 903-917, 2014.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems - an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.25, n.1-2, p.1-30, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LI, N.; ZONG, M. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 43–54, 2010.

LORA J.S, GLASSER W.G. Recent Industrial applications of lignin: A sustainable alternative to Nonrenewable materials. **Journal of Polymers Environment**. 2002;10:39-48

LORENZI, H., MOREIRA, S.H. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 4.ed. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2008. 1088p.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H van; PRETORIUS, I.S.. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 66, n. 3, p. 506-577. 2002.

LYND, L.R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 77, n. 4, p. 467-475. 2002.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global Market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology advances**, v. 28, p. 817-830, 2010.

NELSON, S. Plumeria Rust. **Department of Plant and Environmental Protection Sciences**. Disponível em: <<https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/pd-61.pdf>>. Acesso em: 12/01/2021.

ÖGEL, Z. B.; YARANGÜMELI, K.; DÜNDAR, H.; IFRIJ, I. Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanases production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 689-695, 2001.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A Short Review on SSF—An Interesting Process Option for Ethanol Production from Lignocellulosic Feedstocks; **Biotechnology Biofuels**. 2008, 1, 7.

OLSSON, L. et al., Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, p.612-619, 2003.

PEREIRA Jr., N., COUTO, M. A., MELO, L. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. 1ed. Rio de Janeiro. **Escola de Química/UFRJ**. 2008.

RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v.24, p.161-179, 2006.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U.F.; FARINAS, C.S.; NETO, V.B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.912-919, 2011.

ROMERO, M. D.; AGUADO, J.; GONZÁLEZ, L.; LADERO, M. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 244-250, 1999.

SAQIB, A.A, FAROOQ, A., IQBAL, M., HASSAN, J.U., HAYAT, U., BAIG, S. A. Thermostable crude endoglucanase produced by *aspergillus fumigatus* in a novel solid state fermentation process using isolated free water. **Enzyme Research** v. 2012, n. 2012, p. 6, 2012.

SENTHILKUMAR, S.R; ASHOKKUMAR, B.; RAJ, K.C.; GUNASEKARAN, P. Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design **Bioresource Technology**., 96 (2005), pp. 1380-1386

SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.235 - 241, 2005

SILVA-DERNANDES T., SANTOS J.C., HASMANN F., RODRIGUES R.C.L.B., FILHO I.H.J., FELIPE M.G.A. 2017. Biodegradable alternative for removing toxic compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates for valorization in biorefineries. **Bioresource Technology** 243, 384–392..

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.541-549, 2010.

SOCCOL, C. R.; PRADO, F. C.; VANDENBERGHE, L. P. S. AND PANDEY, A. (2003), General aspects in citric acid production by submerged and solid-state fermentation. In: **Concise Encyclopedia of Bioresource Technology**. New York : The Haworth Press. pp. 652-664.

SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD, A.; KHAN, S. A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, v. 25, n. 06, 2009

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulose production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 32, p. 421-424, 2009.

TRIPATHI, N.; HILLS, C. D.; SINGH, R. S.; ATKINSON, C. J. Biomass waste utilization in low-carbon products: harnessing a major potential resource. **Nature NPJ / Climate and Atmospheric Science**, n. 35, 2019.

VAZ JUNIOR. S. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: uma abordagem sustentável Brasília, DF: **Embrapa Agroenergia**, 2020. 26 p. - (Embrapa Agroenergia / Documentos, 31)

WANG, L.; YANG, S-T. Chapter 18. Solid state fermentation and its applications. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**, p. 465-471, 2007.

ZANCHETTA, Ariane. Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido e submersa utilizando biomassa lignocelulósica. Dissertação (Mestrado) - **Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista**. São José do Rio Preto. 2012.

ZANDONA FILHO, A. Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas. Curitiba, 2001. 193 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), **Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Parana**. Curitiba, PR. 2001.

ZHOU, S.; DAVIS, F. C.; INGRAM, I. O.; **Applied and Environmental Microbiology**. 2001, 67, 6.