

# Produção do complexo celulolítico por *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7080 com entrecasca de mandioca e palma forrageira como substratos

Martival dos Santos Morais<sup>1</sup>, Polyanna Nunes Herculano<sup>2</sup>, Érika Valente de Medeiros<sup>3</sup>,  
Keila Aparecida Moreira<sup>3</sup>, Neiva Tinti de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Departamento de Micologia, R. Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil. <sup>2</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, R. Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois irmãos, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. <sup>3</sup>Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, UFAPE, Departamento de Morfologia E Fisiologia Animal, Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, CEP 55296-901, Garanhuns, PE, Brasil.

Autor para correspondência: Martival dos Santos Morais (martivalcg@hotmail.com)

Data de chegada: 24/05/2021. Aceito para publicação em: 04/10/2021

10.1590/0100-5405/252325

## RESUMO

Morais, M.S.; Herculano, P.N.; Medeiros, E.V.; Moreira, K.A.; Oliveira, N.T. Produção do complexo celulolítico por *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7080 com entrecasca de mandioca e palma forrageira como substratos. *Summa Phytopathologica*, v.47, n.4, p.225-227, 2021.

Objetivou-se com este trabalho otimizar a produção de enzimas celulolíticas por *C. gloeosporioides* URM 7080 isolado de lesões foliares de *Manihot esculenta*, sintomáticas de Antracnose. Utilizou-se farelo de entrecasca de mandioca (MA) e palma forrageira triturada (PA) como substratos para fermentação submersa nas concentrações 0,5, 0,75 e 1%, pH inicial 5,0, 6,0 e 7,0; agitações 80, 110 e 140 rpm e temperaturas de 28, 32 e 36 °C em

experimento fatorial fracionário 2<sup>5</sup> com 32 ensaios + 4 repetições no ponto central. Os melhores parâmetros para produção de cada enzima isolada foram: 1% de MA, 0,5% de PA, 28° C, com o pH inicial 5,0 para FPase (Celulase total) e pH 7,0 para CMCase (Endoglucanase); Para βG (β-glucosidase), pH inicial 5,0 à 36° C, e concentração de 0,5 de PA e agitação de 140 rpm para as três enzimas em conjunto.

**Palavras-chave:** Mamão; PMeV; virose; epidemiologia.

## ABSTRACT

Morais, M.S.; Herculano, P.N.; Medeiros, E.V.; Moreira, K.A.; Oliveira, N.T. Production of cellulolytic complex by *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7080 with cassava peel and forage cactus as substrates. *Summa Phytopathologica*, v.47, n.4, p.225-227, 2021.

The aim of the present study was to optimize the production of cellulolytic enzymes by *C. gloeosporioides* URM 7080 isolated from leaf lesions in *Manihot esculenta* showing symptoms of anthracnose. Cassava bran (MA) and crushed forage cactus (PA) were used as substrates for submerged fermentation at the concentrations of 0.5%, 0.75% and 1%; initial pH of 5.0, 6.0 and 7.0; agitation at 80, 110 and 140 rpm, and temperatures

of 28, 32 and 36°C, in a 2<sup>5</sup> fractional factorial experiment with 32 trials + 4 replicates at the central point. The best parameters for the production of each isolated enzyme were: 1% MA, 0.5% PA, 28°C, and initial pH of 5.0 for FPase (total cellulase) and pH of 7.0 for CMCase (endoglucanase); initial pH of 5.0 at 36°C for βG (β-glucosidase), and concentration of 0.5% PA at 140 rpm for the three enzymes together.

**Keywords:** Cellulases, microorganisms, activities, endoglucanase.

É constatado que fungos fitopatogênicos são eficientes produtores de enzimas hidrolíticas. Esse fenômeno ocorre durante os processos de penetração e colonização do tecido parasitado. Têm sido realizados estudos buscando produzir e caracterizar estas enzimas, bem como avaliar seu potencial catalítico em aplicações biotecnológicas (6).

O gênero *Colletotrichum* é considerado um dos principais agentes etiológicos de fitopatologias, tendo em vista sua ocorrência em diversas espécies hospedeiras, causando podridões em colmos, caules e frutos, seca dos ponteiros, manchas foliares e antracnoses (2). Durante o processo infectivo, estes fungos produzem e liberam um potente arsenal enzimático quando entram em contato com um substrato vegetal insolúvel, visando reduzi-lo a metabólitos solúveis que possam ser absorvidos (8).

Com base nestas informações, o presente trabalho foi realizado objetivando-se otimizar a produção das enzimas do complexo celulolítico pelo fungo *C. gloeosporioides* URM 7080, utilizando para indução as fontes de carbono palma forrageira triturada e farelo

da entrecasca de mandioca.

O isolado *C. gloeosporioides* foi obtido a partir de caules e folhas de mandioca sintomáticos de antracnose e depositado na coleção da Micoteca/URM, do Departamento de Micologia, da Universidade Federal de Pernambuco/UFPE.

A fermentação submersa foi realizada em frascos de Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio composto de 2,0g: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,4g: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,3 g: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,3 g: CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, 5,0 g: NaNO<sub>3</sub>, 1 mL: Tween: 80 e 1 mL de solução de micronutrientes (2,0 g: CoCl<sub>2</sub>, 1,6 g: MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 1,4 g: ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,5 g: FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/L), pH inicial 5,0 e de carboximetilcelulose (CMC) 1% (p/v) como única fonte de carbono e fator para indução. Suspensões de 10<sup>6</sup> conídios/mL do isolado (culturas com 8 dias de crescimento) foram inoculadas nos frascos, os quais foram acondicionados em agitador orbital, na temperatura de 30 °C e 120 rpm durante 7 dias. O extrato enzimático bruto foi obtido do meio fermentado após filtração e centrifugação a 9.000g, 4 °C durante 15 min., e seu teor de proteínas totais foi determinado empregando-se

o método de Bradford (1).

As atividades FPase (Celulase Total) foram determinadas de acordo com o método de hidrólise de tiras de papel de filtro (Whatman nº 1, 50 mg, 1x6 cm) proposto por Ghose (4). Para determinação da CMCase (endoglucanases), foram adicionados 0,5 mL do extrato enzimático em 0,5 mL de uma solução de CMC a 1% (p/v) em tampão citrato (50 mM, pH 5,0). Esta solução foi incubada a 50 °C por 30 min em banho termostatizado. As hidrólises desses experimentos foram interrompidas com adição de 1 mL de Ácido Dinitrossalicílico (DNSA). A absorbância das soluções contendo os açúcares redutores foi mensurada a 540 nm de comprimento de ondas, por meio de espectrofotômetro e confrontação da leitura óptica com curva de calibração na qual a D-glucose foi utilizada como padrão. Para  $\beta$ G, seguiu-se a metodologia proposta por Deshpande & Eriksson (3). Para todas as enzimas, uma Unidade (U) de atividade foi definida como a atividade enzimática necessária para liberar um mmol de glucose por min.

No processo de otimização foram utilizados como substratos: Farelo da entrecasca de mandioca (MA) e a palma forrageira triturada (PA) seguindo-se um planejamento fatorial 2<sup>5</sup>: Concentrações de substrato 0,5, 0,75 e 1 % p/v; pH inicial: 5, 6 e 7; Agitação: 80, 110 e 140 rpm e temperaturas: 28, 32 e 36 ° C.

Para análise estatística foi empregada a análise multivariada de um planejamento experimental fatorial fracionário 2<sup>5</sup>, com 32 ensaios e quatro repetições no ponto central. Através dos resultados das atividades de cada enzima (U/mL), foi avaliada a resposta de cada tratamento: variáveis e níveis (Tabela 1) após 96 h de fermentação. O processamento dos dados foi realizado utilizando-se o software STATISTICA (Statsoft INC, 2008).

Levando-se em consideração a produção enzimática individual, a atividades mais elevada FPase (3,47 U/mL) foi obtida a partir do ensaio com pH inicial 5,0 e agitação de 140 rpm. O valor do pH observado está dentro da faixa considerada ótima para atividade das celulases da maioria dos fungos mesófilos (4,8-5,5) (5). Observou-se que a concentração de substrato foi a mínima (0,5 %) de palma triturada. Esse valor superou as atividades atingidas por *Aspergillus phoenicis* alcançadas utilizando-se de resíduo de uva como substrato. Nesse caso, Silva *et al.* (7), obtiveram a atividade máxima de 0,11 U/mL, na concentração 1% de resíduo fermentado. Em relação à CMCase, detectou-se como maior valor observado de atividade, 1,21 U/mL para o ensaio 15, que teve como variáveis as concentrações de substratos 0,5% de PA e 1% de MA, agitação de 140 rpm e pH 7,0 à 28 °C. Quanto aos resultados da  $\beta$ G, no ensaio 23 foi obtido o valor mais elevado, 0,015 U/mL. Os níveis e variáveis que influenciaram a atividade da CMCase repetiram-se para este caso, exceto a temperatura (36 ° C) e o pH inicial (5,0).

Em relação à ação conjunta das enzimas, o componente principal 1 (Fator 1) respondeu pela explicação de 63,86% da variação dos resultados, enquanto o componente principal 2 (Fator 2) respondeu 33,67%. Ambos apresentaram 97,53% de explicação da variação dos resultados totais (Figura 1A). Em conformidade com isso, os dois componentes principais resumem efetivamente a variância amostral total, podendo ser utilizados para o estudo do conjunto de dados.

De acordo com o componente principal 1 (fator 1), em todas as variáveis observou-se peso positivo, havendo maiores correlações entre as atividades FPase e CMCase em contraste com as da  $\beta$ G (já próximo ao eixo de intersecção), pois quanto menor for o ângulo entre os vetores, maior é a correlação entre as variáveis. Esse parâmetro implica que as duas primeiras enzimas respondem mais efetivamente às condições de cultivo que a última e confirma sua complementação ou ação sinérgica.

**Tabela 1.** Planejamento fatorial 2<sup>5</sup> para estudo dos efeitos de variáveis e interações sobre a produção de celulases em 96h de fermentação submersa por *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7080.

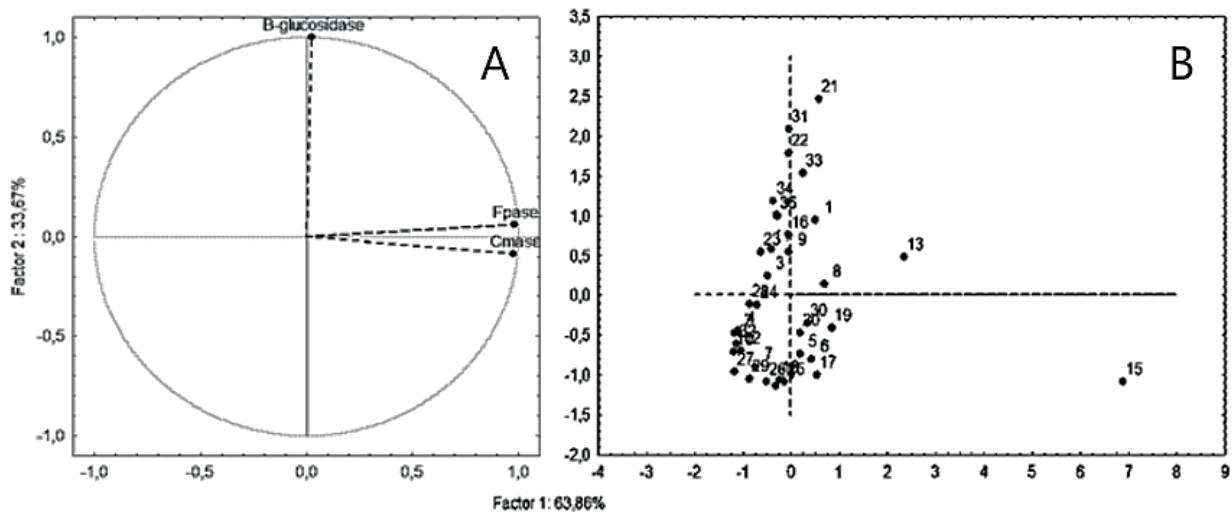
Ensaio	PA (%)	MA (%)	A (rpm)	pH	T (°C)	Atividades U/mL		
						FPase	CMCase	$\beta$ G
1	0,5	0,5	80	5	28	0,77	0,27	0,005
2	1	0,5	80	5	28	0,35	0,13	0,008
3	0,5	1	80	5	28	0,72	0,21	0,006
4	1	1	80	5	28	0,37	0,13	0,006
5	0,5	0,5	140	5	28	3,47	0,57	0,004
6	1	0,5	140	5	28	3,33	0,59	0,003
7	0,5	1	140	5	28	1,24	0,59	0,005
8	1	1	140	5	28	2,55	0,43	0,007
9	0,5	0,5	80	7	28	1,05	0,23	0,006
10	1	0,5	80	7	28	0,42	0,13	0,007
11	0,5	1	80	7	28	1,16	0,25	0,010
12	1	1	80	7	28	0,48	0,15	0,004
13	0,5	0,5	140	7	28	1,88	0,54	0,004
14	1	0,5	140	7	28	2,62	1,15	0,002
15	0,5	1	140	7	28	2,64	1,21	0,001
16	1	1	140	7	28	0,97	0,24	0,007
17	0,5	0,5	80	5	36	3,18	0,68	0,002
18	1	0,5	80	5	36	2,23	0,66	0,002
19	0,5	1	80	5	36	1,15	0,42	0,002
20	1	1	80	5	36	0,67	0,26	0,002
21	0,5	0,5	140	5	36	1,43	0,28	0,011
22	1	0,5	140	5	36	1,04	0,30	0,012
23	0,5	1	140	5	36	1,28	0,35	0,015
24	1	1	140	5	36	1,42	0,32	0,011
25	0,5	0,5	80	7	36	2,36	0,96	0,002
26	1	0,5	80	7	36	1,70	0,84	0,003
27	0,5	1	80	7	36	0,83	0,05	0,004
28	1	1	80	7	36	0,90	0,26	0,010
29	0,5	0,5	140	7	36	0,86	0,43	0,003
30	1	0,5	140	7	36	1,84	0,90	0,006
31	0,5	1	140	7	36	1,60	0,19	0,014
32	1	1	140	7	36	0,64	0,26	0,011
33	0,75	0,75	110	6	32	1,07	0,32	0,009
34	0,75	0,75	110	6	32	0,76	0,26	0,001
35	0,75	0,75	110	6	32	0,57	0,25	0,007
36	0,75	0,75	110	6	32	0,70	0,33	0,009

PA: Concentração de Palma forrageira (% p/v); MA: concentração de farelo da entrecasca da mandioca (% p/v); A: Agitação (rpm); T: Temperatura (°C); U: Unidade de atividade enzimática ( $\mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$ ).

Analisando a Figura 1B, que ilustra a projeção plana multivariada dos ensaios, observa-se a localização dos ensaios 15 e 13 em pontos mais distantes do eixo de intersecção dos dois componentes (fatores) no gráfico de scores. Essa posição explica sua significância estatística e o alcance de maiores taxas de atividades obtidas pela ação conjunta das três enzimas.

Os dados deste trabalho corroboram que há correlações entre as atividades da FPase e CMCase em contraste às da  $\beta$ G. As condições de agitação (140 rpm) em conjunto com a menor concentração de PA (0,5%) como substrato, menor temperatura (28 ° C) e maior pH (7,0) foram necessárias para indução dessas atividades em conjunto.

Em vista dos resultados obtidos, considera-se promissor o potencial biotecnológico do fungo e as condições de produção avaliadas, para produção do complexo celulolítico.



**Figura 1.** A: Projeção plana multivariada das variáveis em relação às atividades totais (U/mL) de FPase (celulases totais), CMCCase (endoglucanases) e  $\beta$ G. Carregamento das variáveis dos Fatores principais 1 e 2 B: Projeção plana multivariada dos ensaios para dados da atividade total de FPase, CMCCase e  $\beta$ G por *Colletotrichum gloeosporioides* URM 7080 em fermentação submersa.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, n. 72, p.248-254, 1976.
- Cannon, P.F.; Damm, U.; Johnston, P.R.; Weir, B.S. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, Amsterdam, v.1, n. 73, p.181-213, 2012.
- Deshpande, V.; Eriksson, K.E. 1,4- $\beta$ -D-glucosidases of *Sporotrichum pulverulentum*. In: Wood, W.A.; Kellogg, S.T. (Eds). **Methods in Enzymology**. San Diego: Academic Press. 1988, p.415-424.
- Ghose, T. K. Measurement of Cellulase Activities. **Pure and Applied Chemistry**, Carolina do Norte, n. 59, p.257-268, 1987
- Jung, Y.R.; Park, J.M.; Heo, S.; Hong, W.; Lee, S.; Oh, B.; Park, S.; Seo, J.; Kim, C.H. Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. **Renewable Energy**, Amsterdã, n. 76, p.66-71, 2015.
- Morais, M.S.; Oliveira, N.T.; Herculano, P.N.; Moreira, K.A. Complexo celulolítico produzido por duas espécies de fungos fitopatogênicos isolados de mandioca. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.42, n.3, p.249-253, 2016.
- Silva, L.D.; Lopes, F.C.; Silveira, S.T.; Brandelli, A. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus phoenicis* in grape waste using response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlim, v.152, p.295-305, 2009
- Zahid, N.; Maqbool, M.; Ali, A.; Siddiqui, Y.; Qaiser, A.B. Inhibition in production of cellulolytic and pectinolytic enzymes of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from dragon fruit plants in response to sub-micron chitosan dispersions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdã, v.3, p.314-319, 2019.