

UTILIZAÇÃO DE CASCA DE CAFÉ COMO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE CELULASE POR *Trichoderma spp*¹

Graziele Santos Lima²; Jonathan Henrique Carvalho Manhães³; Thaís Nascimento Pessoa⁴; Divino Levi Miguel⁵; Maria Lúcia Garcia Simões⁶

¹ Trabalho financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB

² Discente do curso de Agronomia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, limagraziele@hotmail.com

³ Mestrando em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa – UFV, jonathan.manhaes@ufv.br

⁴ Discente do curso de Agronomia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, thaispessoa@live.com

⁵ Docente, DSc, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, divino.dl@gmail.com

⁶ Docente, DSc, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, marialuciags@ig.com.br

RESUMO: Quatro isolados de *Trichoderma* (*T. pseudokoningii* 1052, *T. harzianum* 911, *T. longibrachiatum* 3188 e *T. reesei* 1612) foram analisados para avaliar seus potenciais quanto à produção de celulase, quando cultivados em casca de café arábica da variedade Catuaí Vermelho, através de fermentação submersa. As atividades celulolíticas de *Trichoderma spp* foram determinadas pela expressão da atividade da carboximetilcelulase (CMC), utilizando-se uma equação de reta obtida a partir de uma curva de calibração constituída de padrões de glicose. Os fungos foram diferenciados quanto à atividade enzimática. As melhores atividades de CMC (0,394 e 0,358 U) foram obtidas com os isolados de *Trichoderma pseudokoningii* 1052 e *Trichoderma reesei* 1612 após cultivo de 5 dias a 24 ± 2° C.

PALAVRAS-CHAVE: biomassa, celulase, enzima, fungos, fermentação submersa

USE OF COFFEE HULL AS SUBSTRATE FOR PRODUCTION OF CELLULASE BY *Trichoderma spp*

ABSTRACT: Four isolates of *Trichoderma* (*T. pseudokoningii* 1052, *T. harzianum* 911, *T. reesei* 1612 and *T. longibrachiatum* 3188) were analyzed to assess their potential for the production of cellulase when grown on coffee husk Arabica variety Catuaí through submerged fermentation. The cellulolytic activity of *Trichoderma spp* were determined by expression of carboxymethylcellulase activity (CMC), using an equation of a straight line obtained from a calibration curve made up of glucose standards. The fungi were differentiated for enzymatic activity. The best activities of CMC (0.394 and 0.358 U) were obtained with *Trichoderma pseudokoningii* 1052 and *Trichoderma reesei* 1612 after growing 5 days at 24 ± 2 ° C.

KEY WORDS: biomass, cellulase enzyme, fungi, submerged fermentation

INTRODUÇÃO

O café é uma commodity que gera grande volume de resíduos, tais como casca, polpa e grãos defeituosos. Como 80 % do café produzido no Brasil é proveniente do método de via seca, estima-se que o país produza todos os anos aproximadamente 30 milhões de sacas de casca, muito próximo da produção do grão de café. Este subproduto atualmente não possui utilização, devido sua importante concentração de componentes tóxicos (caféina, polifenóis e taninos). Embora os produtos tóxicos, esta matéria-prima é muito rica em diferentes biomoléculas (carboidratos, proteínas, gordura e pectinas) para utilização como substrato em diferentes bioprocessos (Soccol, 2002).

As matérias-primas lignocelulósicas são fontes renováveis e abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidas, principalmente, pelos materiais agroindustriais, resíduos urbanos e pelas madeiras das espécies arbóreas e arbustivas, sobretudo em condições de clima tropical. Os materiais lignocelulósicos sofrem o ataque das celulases, um grupo de enzimas capazes de promover a hidrólise do complexo lignocelulósico liberando açúcares, onde a glicose desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (Castro & Pereira Júnior, 2010).

A hidrólise biológica para a quebra de celulose faz-se pela ação enzimática de certos fungos e bactérias (Lima, 1987). O complexo celulásico secretado por bactérias e fungos é formado por três componentes enzimáticos majoritários, as endoglucanases, as celobiohidrolases (exoglucanases) e as β-glucosidases. As endoglucanases atuam randomicamente ao longo da molécula de celulose. Por sua vez, as celobiohidrolases atuam nas regiões terminais das moléculas de celulose, promovendo a sua despolimerização gradativa através da remoção de unidades de celobiose terminais. Finalmente, as β- glucosidases hidrolisam celobiose a glicose, reduzindo assim o seu efeito inibidor sobre as endo e exoglucanases. Estas três classes de enzimas, individualmente, acarretam alterações bastante diferenciadas na estrutura supramolecular da celulose, mas por apresentarem propriedades complementares, descreve um alto grau de sinergismo (ou ação cooperativa) durante a hidrólise ou sacarificação da celulose (Ramos, 2000).

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases embora alguns poucos são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural (Ruegger & Tauk-Tornisielo, 2004). Fungos do gênero *Trichoderma* possuem uma distribuição bastante ampla, uma vez que são encontrados no mundo inteiro, em quase todos os tipos de solos bem como outros habitats naturais, especialmente, naqueles onde a matéria orgânica vegetal está presente (Corabi, 2002). A capacidade de *Trichoderma* spp em colonizar materiais celulósicos já foi descrita por Simões (2010) e Asran-Amal & Abdel-Mongy (2007), sendo que Ghose & Grosh (1979) sugerem que o sistema enzimático mais promissor para o processo de sacarificação da celulose cristalina é *Trichoderma*.

Tendo em vista o que foi apresentado, o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de *Trichoderma* spp em produzir a enzima celulase quando cultivado em casca de café.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas quatro espécies de fungos do gênero *Trichoderma* (*T. pseudokoningii* 1052, *T. harzianum* 911, *T. longibrachiatum* 3188 e *T. reesei* 1612) coletadas em diferentes locais (Tabela 1), mantidas em preservação segundo Castellani (1939; 1967).

Tabela 1: Isolados de *Trichoderma* utilizados e locais de origem.

Identificação/Isolado	Substrato	Região/Local de coleta
<i>T. pseudokoningii</i> 1052	Madeira em decomposição	Rondônia - RO
<i>T. harzianum</i> 911	Solo	CEPEC- Ilhéus- BA
<i>T. longibrachiatum</i> 3188	Folha	Jacareci - BA
<i>T. reesei</i> 1612	Madeira em decomposição	Ilhéus - BA

As espécies de *Trichoderma* foram cultivadas através de fermentação submersa em casca de café arábica da variedade Catuaí Vermelho, proveniente do município de Vitória da Conquista – BA. Frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo 10 gramas de casca de café triturada e padronizada em peneira de 2 mm e 10 mL de água destilada, em triplicata, foram esterilizados em autoclave a 120 °C por 30 minutos. Após resfriamento, o substrato foi destorroado com o auxílio de um bastão de vidro estéril de forma a desfazer os agregados resultantes do processo de esterilização procurando homogeneização. A inoculação foi realizada pela adição de 1 mL de suspensão padronizada (1×10^7 mL⁻¹) de esporos de cada isolado, os quais foram incubados à temperatura de 24 (± 2)° C por 5 dias. Após esse período, foi obtido o extrato enzimático através de filtração à vácuo com papel de filtro (Wattman nº1).

A determinação do teor de açúcares redutores foi feita pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), adaptado a partir da descrição de Miller (1959), consistindo na elaboração de uma curva padrão de glicose e obtenção da equação da reta a partir das médias de absorbâncias determinadas a 540 nm, tendo o tubo 0 (zero) como referência. Com base na equação $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$, foram calculadas as concentrações finais (C_f) de glicose em cada tubo, sendo expressa em mg mL⁻¹. A média das absorbâncias e concentrações finais de glicose de cada tubo foram plotadas (eixos y e x, respectivamente) no programa Microsoft Office Excel © 2007 para obtenção da equação da reta ($y = ax + b$) (Figura 1).

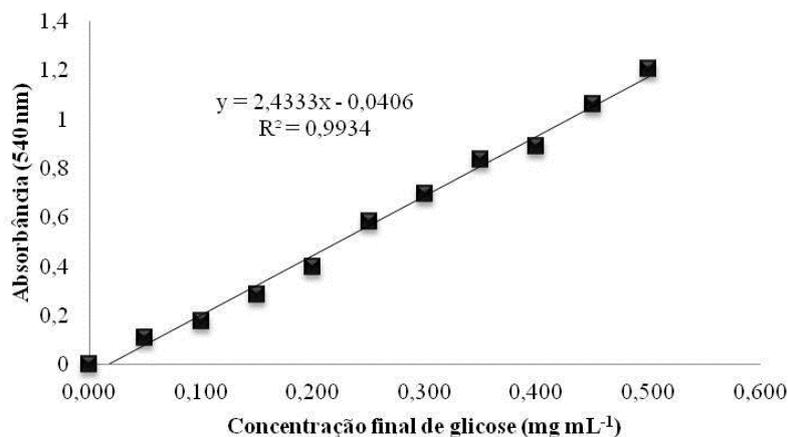


Figura 1: Curva padrão de glicose

As atividades celulolíticas de *Trichoderma* spp foram determinadas pela expressão da atividade da carboximetilcelulase (CMC). Para tal, alíquotas de 0,6 mL de CMC de média viscosidade a 0,1% em tampão acetato (50 mmol L⁻¹, pH 5,0) foram adicionadas aos tubos de ensaio e “branco” (triplicata), que foram mantidos em banho-maria a 50°C por 5 minutos, para estabilização da temperatura. Posteriormente, foram adicionados aos tubos de reação 0,3 mL de extrato enzimático bruto e aos tubos do “branco” 0,3 mL de tampão acetato. Após o período de incubação, a reação foi

interrompida com a adição de 1,5 mL da solução de ADNS, sendo os tubos transferidos imediatamente para banho de água fervente por exatamente 5 minutos e em seguida, resfriados em banho de água à temperatura ambiente. Após, foram adicionados 3 mL de água destilada, sendo o meio homogeneizado mediante inversão dos tubos e a absorbância das amostras foram determinadas em 540 nm. Para quantificação dos açúcares redutores (AR) formados, utilizou-se a equação de reta obtida da curva de calibração constituída de padrões de glicose. Uma unidade de atividade enzimática (UCMC) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de glicose por mL por minuto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A casca de café demonstrou ser um bom substrato para a produção de celulase através de fermentação submersa quando cultivada por *Trichoderma* spp, apresentando resultados satisfatórios de atividades de CMCCase.

A análise estatística demonstrou que houve diferenças entre os índices enzimáticos dos isolados de *Trichoderma* analisados. Os isolados de *Trichoderma pseudokoningii* 1052 e *Trichoderma reesei* 1612 demonstraram ser as espécies analisadas com maior potencial de produção enzimática, com atividade de CMCCase de 0,394 $\text{U mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ e 0,358 $\text{U mL}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente, e o isolado com menor potencial foi o de *Trichoderma harzianum* 911, com atividade de CMCCase de 0,019 $\text{U mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ (Tabela 2).

Tabela 2: Valores da atividade enzimática de *Trichoderma* spp ($\text{U mL}^{-1} \text{min}^{-1}$)

Espécie/isolado	CMCase ($\text{U mL}^{-1} \text{min}^{-1}$) *
<i>T. pseudokoningii</i> 1052	0,394 a
<i>T. harzianum</i> 911	0,019 c
<i>T. longibrachiatum</i> 3188	0,286 b
<i>T. reesei</i> 1612	0,358 a

* Letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Essa diferença de potencial provavelmente se dá devido à diferença de capacidade que algumas linhagens fúngicas possuem de secretar todas as enzimas do complexo celulolítico. O sistema celulolítico de *Trichoderma reesei*, por exemplo, é composto de até 80% de exoglucanase, 20 a 36% de endoglucanases e é deficiente em β -glucosidases com produção de apenas 1%. Enquanto o fungo *T. reesei* sintetiza níveis baixos de β -glucosidases, fungos do gênero *Aspergillus* possuem níveis limitados de endoglucanase, segundo Muthuvelayudham & Viruthagiri (2006), e Zaltivar et al. (2001), *apud* Fahenia Junior (2012).

Comparando-se na literatura os valores encontrados com os de outros substratos os índices enzimáticos obtidos foram semelhantes aos encontrados por Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004), quando diferentes espécies de *Trichoderma* foram cultivadas em meio de farelo de trigo por 4 dias a 25°C, para verificar atividade de CMCCase. Os autores obtiveram sessenta e seis linhagens com atividade inferior e quatorze linhagens com atividade igual ou superior a uma unidade de atividade de CMCCase $\text{mL}^{-1} \text{min}^{-1}$, sendo que *Trichoderma harzianum* apresentou melhor resultado (1,64 U).

CONCLUSÕES

1. A casca de café demonstrou ser eficiente ao ser utilizada como substrato para cultivo de *Trichoderma* spp para produção de celulase;
2. O isolado de *Trichoderma pseudokoningii* 1052 demonstrou maior potencial celulolítico que os demais isolados ao ser inoculado na casca de café;
3. A atividade de produção de celulase depende da linhagem do microrganismo, do substrato, do meio de cultura, assim como das técnicas utilizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASRAN-AMAL & ABDEL-MONGY. Effect of *Trichoderma* isolates delivery systems and host genotype on biological control of cotton seedlings disease. *Journal of Plant Protection Research*, v. 47, n. 3, 2007.
- CASTELLANI, A. - Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *Journal tropical Medicine and Hygiene*, v.70, p.181-184,1967.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal tropical Medicine and Hygiene*, v. 70; p.225-226,1939.
- CASTRO, A.M.; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Revista Química Nova*, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010.
- CORABI-ADELL, C. M. M; LUCON, C. M. M. & KOIKE, C. M. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de SÃO PAULO – Aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.69, p.188-191, 2002.

- FAHENIA JUNIOR, G.S. Produção de celulases por fermentação submersa utilizando microrganismos prospectados em coleções de culturas nacionais. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). 75 f. 2012. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE.
- GHOSE, T.K.; GHOSH, P. Cellulose production and cellulose hydrolysis. *Process Biochemistry*, London, v. 1 , p. 14, 1979.
- LIMA, W. P. O reflorestamento com eucalipto e seus impactos ambientais. São Paulo: Artpress, 1987. 114 p.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426 - 428, 1959.
- RAMOS, L. P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro-industriais. In: Seminário Nacional sobre Reuso/Reciclagem de Resíduos Sólidos Industriais. São Paulo, 2000. Disponível em: <[http://www.cca.ufscar.br/lamam/disciplinas_arquivos/res/artigo_pretratamento.p df](http://www.cca.ufscar.br/lamam/disciplinas_arquivos/res/artigo_pretratamento.pdf)>. Acesso em 18 jan. 2011.
- RUEGGER, M.J.S; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica.*, V.27, n.2, p.205-211, abr.-jun. 2004.
- SIMÕES, M. L. G. Controle biológico de *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura de bruxa do cacaueteiro, por diferentes espécies e linhagens de *Trichoderma* spp. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). 220 f. 2010. Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho, Rio Claro- SP.
- SOCOL, C.R. Resíduo de café: um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado. In: I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2002. Disponível em: <<http://www.sbicafe.ufrj.br/handle/10820/19>> Acesso em 25 ago. 2013.
- RUEGGER, M.J.S; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica.*, V.27, n.2, p.205-211, abr.-jun. 2004.