

AVALIAÇÃO DA CASCA DE CAFÉ COMO SUBSTRATO PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

IAUÂNI ZANÃO DE CARVALHO¹; LEONI SILVA BARRETO²; JUSSARA MOREIRA COELHO³;
IARA REBOUÇAS PINHEIRO^{4*}

¹Graduanda em Engenharia Química, UFES, Alegre-ES, iauani@hotmail.com;

²Graduando em Engenharia de Alimentos, UFES, Alegre-ES, leobarreto013@outlook.com;

³Dr^a em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Prof^a CCAE, UFES, Alegre-ES, jmoreiracoelho@yahoo.com.br

⁴Dr^a em Engenharia Química, Prof^a CCAE, UFES, Alegre-ES, iararp.ufes@gmail.com

Apresentado no

Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia – CONTECC'2018
21 a 24 de agosto de 2018 – Maceió-AL, Brasil

RESUMO: As celulases são enzimas aplicadas no processo de hidrólise da celulose, que é o principal componente da parede celular da biomassa vegetal e o biopolímero mais abundante na natureza. Entretanto, a produção de celulases possui alto custo, o que torna inviável a sua utilização em grande escala. Uma alternativa para reduzir os custos de produção dessas enzimas é o cultivo de fungos filamentosos em resíduos agroindustriais por fermentação em estado sólido (FES). Neste trabalho, foram realizados cultivos sólidos para investigar a produção de celulases utilizando casca de café como substrato e os fungos *Trichoderma reesei* da linhagem BTF 0948 e *Trichoderma koningii*. Foram analisadas as atividades enzimáticas FPase e CMCase em função dos tempos de cultivo e da composição do substrato. Os resultados demonstraram a viabilidade desse processo, em que o *T. koningii* apresentou as maiores atividades de CMCase 28,7 U/gms e FPase 4,49 U/gms no quinto dia de cultivo.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação em estado sólido (FES), celulases, *Trichoderma*, casca de café.

EVALUATION OF COFFEE HUSKS AS SUBSTRATE PRODUCTION OF CELLULOSE PRODUCTION BY SOLID STATE FERMENTATION

ABSTRACT: Cellulases are enzymes applied in the hydrolysis process of cellulose, which is the main component of the cell wall of the plant biomass and the most abundant biopolymer in nature. However, the production of cellulases has high cost, which makes it impractical to use on a large scale. An alternative to reduce the production costs of these enzymes is the cultivation of filamentous fungi in agroindustrial residues by solid state fermentation (SSF). In this work, were make solid cultures for to investigate the production of cellulases using coffee husk as substrate and fungi *Trichoderma reesei* strain of BTF 0948 and *Trichoderma koningii*. The enzymatic activities FPase and CMCase were analyzed in function of the culture times and the composition of the substrate. The results demonstrated the viability of this process, in which *T. koningii* presented the highest CMCase activities 28.7 U/gms and FPase 4.49 U/gms on the fifth day of culture.

KEYWORDS: Solid state fermentation (SSF), cellulases, *Trichoderma*, coffee husk.

INTRODUÇÃO

As celulases são enzimas capazes de hidrolisar a molécula de celulose, polímero fibroso, resistente e insolúvel à água e principal constituinte da parede celular dos vegetais. A reação de hidrólise libera as subunidades de glicose constituintes desse polímero, que são muito visadas devido a possível aplicação na produção de biocombustíveis (Castro; Pereira Jr, 2010). Entretanto, este complexo de enzimas representa cerca de 40% do custo total do processo, o que torna necessário novos meios viáveis de obtenção da mesma (Lacerda, 2015; Nunes, 2014).

Uma das estratégias para produção das celulases é a fermentação em estado sólido (FES), em que uma de suas vantagens é a semelhança entre o ambiente fermentativo e o habitat natural dos

fungos filamentosos, sendo que os principais gêneros produtores de celulases são *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* (Pandey, 2003; Salomão, 2017). Nesse processo, é possível reaproveitar resíduos agroindustriais como fonte de nutrientes e suporte para o crescimento microbiano e a produção de celulases. Um destes resíduos que se mostra como matéria-prima promissora é a casca de café.

O Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking mundial da produção cafeeira, liderando um dos mercados mais importantes do mundo. Estima-se que anualmente o país produza cerca de 30 milhões de sacas de casca, que possuem aplicações limitadas. A casca do café é um resíduo fibroso mucilaginoso que contém elevada quantidade de cafeína e taninos, o que o torna tóxico quando depositado no ambiente na forma in natura, resultando em problemas de descarte. Atualmente, ela é utilizada como fertilizantes, ração animal e biocomposto. No entanto, sugere-se o uso deste resíduo como fonte de carbono alternativa para o cultivo de microrganismos, por apresentar altos teores de matéria orgânica e boa quantidade de açúcares fermentescíveis, dando origem assim, a produtos de maior valor agregado (Gusmão et al., 2014).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade de reaproveitar resíduos do café como substrato para a produção de celulases por FES, utilizando fungos filamentosos da espécie *Trichoderma*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os microrganismos utilizados foram os fungos filamentosos *T. reesei*, da linhagem BTF 0948 fornecido pelo laboratório de Biotecnologia da UFES, e o *T. koningii* obtido fornecido pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/ CCFF-RJ). Os mesmos foram reidratados, inoculados em meio PDA (39 g/L) e incubados a 30 °C por 7 dias. O estoque foi obtido pelo cultivo em meio sólido contendo 20% de farelo de trigo (FT) e 80% de bagaço de cana (BC).

O substrato utilizado para o cultivo em meio sólido consistiu em uma mistura composta por casca de café conilon in natura (CC), fornecida por produtores rurais do distrito de Boa Vista (Cachoeiro de Itapemirim-ES) e bagaço de cana-de-açúcar (BC), fornecido pela Usina Paineiras (Itapemirim-ES). Ambos foram submetidos à secagem em estufa a 105 °C, triturados em moinho de facas e peneirados para obtenção da granulometria inferior a 0,425 e 2 mm respectivamente.

As fermentações foram realizadas em frascos (erlenmeyers) de 500 mL com 10 g de substrato, variando a proporção de 20:80 à 80:20 (CC:BC). A umidade inicial foi de 70%, obtida com adição solução salina (Urbánszki, Szakacs e Tengerdy, 2000). Os frascos foram inoculados com 10^7 esporos/g e incubados a 30 °C durante 5 dias, sendo retirada uma amostra a cada 24 horas para realização da extração das enzimas e análises de atividades enzimáticas CMCase e FPase.

As extrações foram realizadas em duplicata em erlenmeyers de 250 mL contendo 4,0 g do sólido fermentado, 40 mL de tampão citrato de sódio (0,05 M e pH 4,8) e 40 mL de água destilada. A mistura foi agitada a 180 rpm e temperatura ambiente durante 60 minutos e posteriormente, filtrada em gaze e centrifugada a 3500 rpm por 30 minutos. A determinação das atividades enzimáticas CMCase e FPase foi baseada em Ghose (1987) e são expressas em U/gms, que corresponde à quantidade de enzima que libera 1 μ mol de glicose por minuto na reação de hidrólise do substrato por grama de massa seca.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As atividade de CMCase com a linhagem BTF 0948 encontram-se apresentadas na Figura 1. Os cultivos realizados para a composição de substrato de 50:50, apresentou as maiores atividades quando comparadas às outras composições de substratos, e a atividade máxima foi obtida no quarto dia de cultivo (12,92 U/gms). A composição de 30:70 também apresentou resultado relevante de atividade, considerando o quinto dia de fermentação, no qual foi obtido 11,16 U/gms

Nos cultivos com *T. koningii* (Figura 2) a maior atividade de CMCase ocorreu no 5º dia com a proporção de substrato de 70:30 (28,7 U/gms) e as demais composições apresentaram comportamento similar entre si. Observa-se que o *T. koningii* apresentou atividade aproximadamente 2,22 vezes maior que a melhor atividade obtida pelo BTF 0948 e em condições que favorecem uso de casca de café, composta por 70% deste substrato.

Figura 1. Atividade CMCCase x Tempo do *T. reesei* BTF0948 em diferentes composições de substratos.

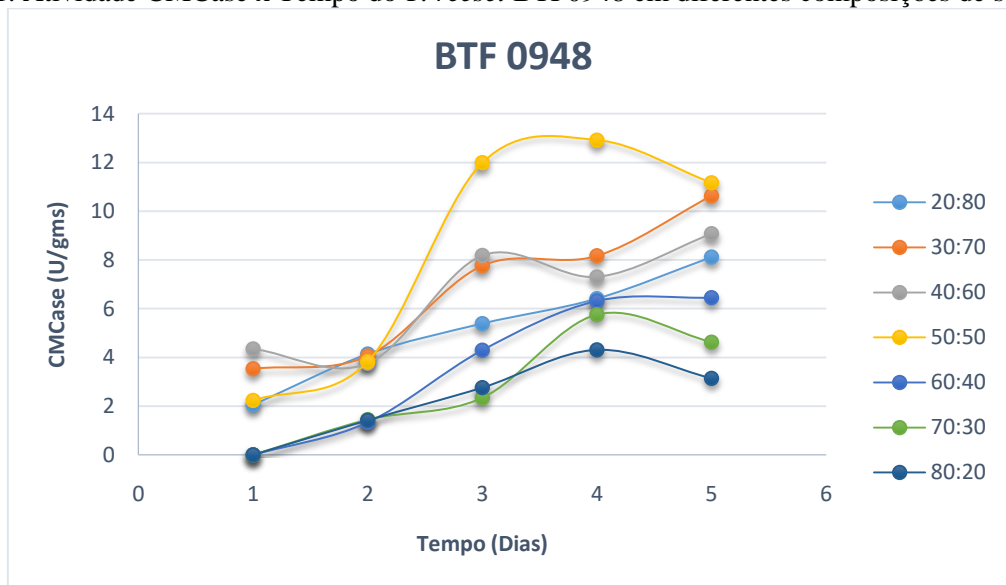
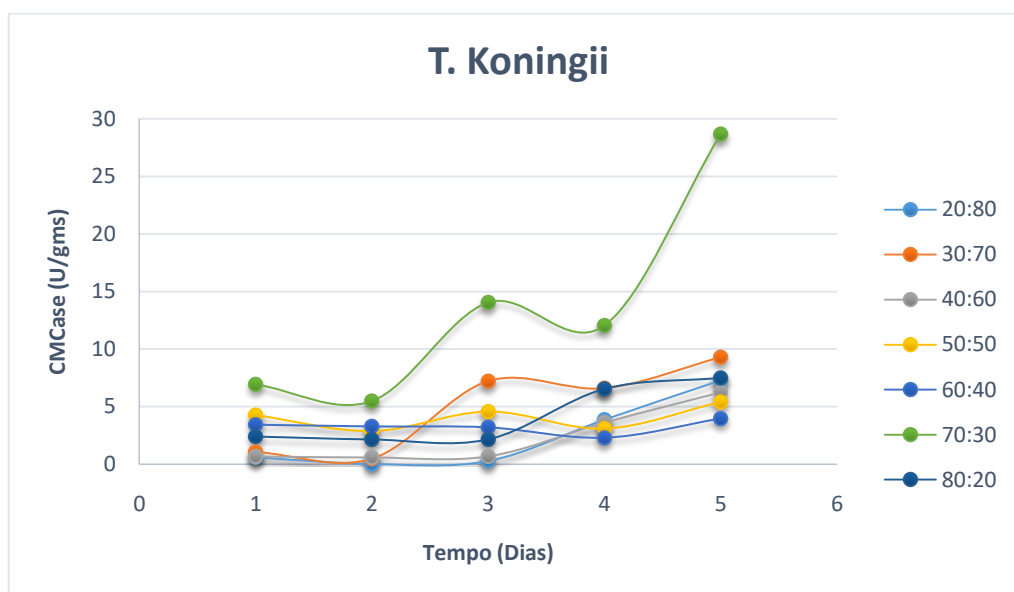


Figura 2. Atividade CMCCase x Tempo do *T. koningii* em diferentes composições de substratos.



Para a atividade FPase a linhagem BTF 0948 (Figura 3) apresentou aumento linear de atividade enzimática de FPase, nas proporções de 20:80, 30:70 e 50:50, sendo o maior valor obtido com 30:70 no quinto dia de cultivo (4,05 U/ gms).

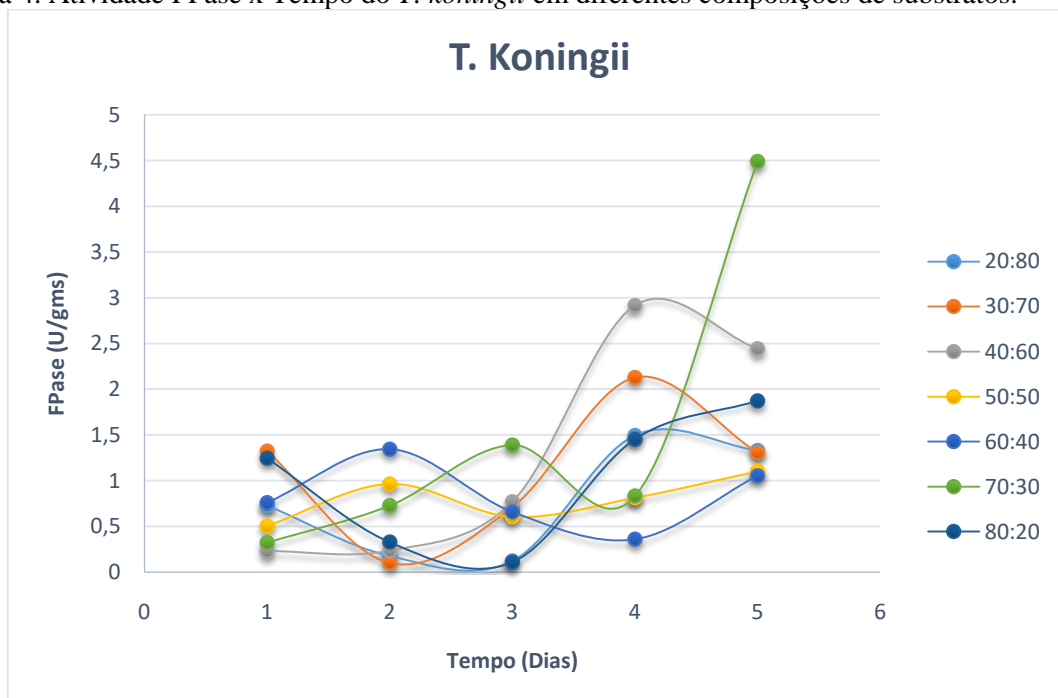
Já os cultivos com *T. koningii* (Figura 4) apresentaram maiores valores de produção de enzima, comparado ao *T. reesei* BTF 0948. A maior atividade de FPase foi obtida no quinto dia de cultivo, com composição 70:30, 4,49 U/gms, sendo seguida pela composição 40:60 no quarto dia de cultivo (2,92 U/gms).

A cinética de produção para composição 70:30 se apresentou bem distinta em ambas atividades, CMCCase e FPase, quando comparada às demais composições de substrato, além de indicar que o aumento no tempo de cultivo pode promover um aumento de atividade enzimática.

Figura 3. Atividade FPase x Tempo do *T. reesei* BTF0948 em diferentes composições de substratos.



Figura 4. Atividade FPase x Tempo do *T. koningii* em diferentes composições de substratos.



Wang et al. (2014) utilizou farelo de trigo com suplementação de celulose e lactose para produção de celulasas utilizando *Trichoderma koningii* D-64 e obteve 1,3 U/mL de atividade CMCase. Nunes (2014) estudou o *Trichoderma reesei* BTF 0948 para produção de celulasas via FES utilizando bagaço de cana in natura e farelo de trigo como substratos e obteve atividades de CMCase e FPase de 30,3 e 9,8 U/gms, respectivamente. Lima et al. (2013) estudou os isolados de *Trichoderma pseudokoningii* 1052 e *Trichoderma reesei* 1612 utilizando a casca de café como substrato e obteve 0,394 U/mL e 0,358 U/mL, respectivamente, para atividade de CMCase.

Embora o presente estudo tenha obtido atividades enzimáticas inferiores às encontradas na literatura, vale ressaltar que o uso de resíduos de café para a produção de celulases apresenta-se promissor, uma vez que um dos aspectos relevantes dos resultados apresentados neste estudo consiste na escassez de publicações com este substrato, inclusive no que se trata de resultados de ampliação de escala do processo. Dessa forma o presente trabalho propõe a continuidade deste estudo de forma a otimizar a produção de celulases por FES utilizando os resíduos da agroindústria cafeeira em colunas de leito fixo com aeração.

CONCLUSÃO

Os cultivos sólidos para a produção de celulases apresentaram resultados satisfatórios, o que torna a casca de café um resíduo em potencial para o uso em FES. Os fungos *T. reesei* BTF 0948 e o *T. koningii* se mostraram capazes de produzir as enzimas, sendo que os melhores resultados foram os do *T. koningii*: CMCase 28,7U/gms e FPase 4,49 FPU/gms.

REFERÊNCIAS

- Castro, A. M. de; Pereira Jr N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova*, v. 33, n. 1. 2010.
- Ghose, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure App. Chem.*, v. 59, n. 2, 1987.
- Gusmão, R. O. et al. Produção de Enzimas por *Aspergillus spp.* Sob Fermentação em Estado Sólido em Casca de Café. *Scientia Plena*, v. 10, n. 11, 116202. 2014.
- Lacerda, J. X; Pinotti, L. M. Produção de Celulases por *Penicillium sp.* In: XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Universidade de Campinas, Campinas, SP, 2015.
- Lima, G. S. et al. Utilização de Casca de Café como Substrato para Produção de Celulase por *Trichoderma spp.* In: VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Salvador, BA, nov. 2013.
- Nunes, J. M. N. Produção de Enzimas Celulolíticas por Linhagens do Fungo *Trichoderma*. 2014. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Departamento da Engenharia Rural, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2014.
- Pandey, A. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* v. 13, n. 2–3. 2003.
- Salomão, G. S. B. Análise da Produção de Celulases por Fungos Utilizando Bagaço de Cana como Substrato. 2017. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Energia, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2017.
- Urbánszki, K.; Szakacs, G.; Tengerdy, R. P. Standardization of the filter paper activity assay for solid substrate fermentation. *Biotechnol. Lett.* 22. 2000.
- Wang, Z.; Bay, H.; Chew, K.; Geng, A. High-loading oil palm empty fruit bunch saccharification using cellulases from *Trichoderma koningii* MF6. *Process Biochemistry*, v.49, p.673–680, 2014.