



CULTIVO DE BASIDIOMICETOS EM CASCA DE CAFÉ PARA A PRODUÇÃO DE XILANASES

JAQUELINE DA SILVA COELHO MOREIRA; GABRIEL KURTEN PEREIRA; LAYS SILVA DALL PRÁ; MAIARA APARECIDA DA SILVA SOUZA; DENIS SANTIAGO DA COSTA

RESUMO

Os fungos basidiomicetos incluem a maioria das espécies decompositoras de madeira. São os únicos micro-organismos capazes de degradar todos os polímeros da madeira por meio da produção de enzimas degradadoras de lignina, bem como de enzimas degradadoras de carboidratos. A produção de enzimas convencional para aplicações industriais requer a utilização de substratos purificados, o que encarece a produção e a aplicação industrial das enzimas. Alternativamente, pode-se utilizar resíduos agroindustriais para esse propósito, tais como a casca de café. Assim, a presente pesquisa visa explorar a produção de enzimas xilanases por basidiomicetos em meios de cultura à base de cascas de café. Foram estudados 15 isolados de fungos basidiomicetos cultivados em meios autoclavados compostos por casca de café e solução mineral por 14 dias à 28°C. As culturas foram interrompidas pela adição de 35 ml de água destilada, obtendo-se os filtrados das culturas, os quais foram analisados quanto à produção de xilanases extracelulares com a utilização de xilano a 1% e reação com o DNS. A liberação de açúcares redutores e redução do DNS foi analisada espectrofotometricamente à 540 nm. Os isolados identificados com os códigos OAB, OPL, SHIMEJI AMARELO, SER, LIV, TAN2, TAN4, PORTOBELO apresentaram-se como os maiores produtores de xilanase, seguidos dos fungos TAN1, SHIMEJI SALMÃO, CPA que tiveram uma produção intermediária e os fungos PDR, PL, SHIMEJI PRETO, SHIMEJI BRANCO apresentaram uma baixa produção desta enzima. Assim, pode-se concluir que a casca de café é um substrato promissor para a produção de xilanases por fungos basidiomicetos.

Palavras-chave: fungos; enzima; resíduo agroindustrial; biotecnologia; impacto ambiental.

1 INTRODUÇÃO

O Reino Fungi compreende um grupo diversificado de organismos eucarióticos, os quais incluem os cogumelos, orelhas de pau, ferrugens, carvões de plantas, mofos, leveduras, e outros menos conhecidos. Há um grande número de espécies de fungos descritas atualmente, mais de 70.000, contudo estima-se que esse número corresponda a apenas 6% do total de espécies fúngicas existentes, o que demonstra a grande diversidade ainda inexplorada nesse reino (Hawksworth, 2001).

Segundo Kango e col. (2019) mais da metade das enzimas conhecidas são oriundas de espécies fúngicas. Os fungos ascomicetos do gênero *Aspergillus* dominam a produção de enzimas industriais, representando em torno de 25% do total. Contudo, os fungos basidiomicetos apresentam uma vantagem para propósitos industriais uma vez que são os únicos capazes de degradar eficientemente todos os polímeros presentes na matéria vegetal.

Os fungos basidiomicetos correspondem a 32% das espécies descritas de fungos e incluem a maioria das espécies decompositoras de madeira. São os únicos micro-organismos capazes de degradar todos os polímeros da madeira por meio da produção de enzimas

degradadoras de lignina, bem como de enzimas degradadoras de carboidratos. Ambos os grupos de enzimas são produzidas e lançadas no meio extracelular durante o crescimento desses fungos sobre materiais vegetais. Uma das vantagens das enzimas fúngicas extracelulares é a não necessidade de rompimento celular durante o processo de purificação enzimática para aplicações industriais (Bentil, 2021).

A produção convencional de enzimas para aplicações industriais requer a utilização de substratos purificados, o que encarece a produção e a aplicação industrial das enzimas. Nesse cenário, a utilização de resíduos agrícolas de baixo custo em substituição aos substratos purificados tem é uma alternativa para a redução dos custos da produção de enzimas fúngicas, bem como a redução dos impactos causados pelo acúmulo desses resíduos no ambiente (Rodríguez-Couto, 2017).

Um dos resíduos mais promissores nesse sentido são os resíduos do processamento do café, os quais são materiais lignocelulósicos, ou seja, são compostos principalmente por biomoléculas de celulose, hemicelulose e lignina, as quais apresentam grande potencial biotecnológico para serem convertidas em produtos de alto valor agregado, como enzimas celulasas, hemicelulasas, ligninases, tanases, etc. Tais resíduos são um dos principais materiais disponíveis em alta quantidade ao redor do mundo, uma vez que o café e o chá, após a água, são as bebidas mais consumidas (Corrêa et al. 2021). O Brasil ocupa posição de destaque na cafeicultura, pois é o maior produtor mundial de café, e o Norte do Paraná compõe o conjunto das principais regiões produtoras do país (Conab, 2023; IDR-Paraná, 2023).

Diante desse cenário, a presente pesquisa visa explorar a produção de enzimas xilanases por basidiomicetos em meios de cultura à base de cascas de café. A integração de metodologias de caracterização, produção e quantificação de enzimas, juntamente com a exploração de substratos econômicos e sustentáveis, destaca a importância de uma abordagem multifacetada para a produção enzimática eficiente e sustentável.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para os meios de cultura, foram preparados Erlenmeyers de 250 mL, cada um contendo 10 g de resíduo seco e 40 mL de uma solução mineral composta por fosfato de potássio (5,3 g. L⁻¹), fosfato de potássio monobásico (2,7 g. L⁻¹), sulfato de amônia (2 g. L⁻¹), cloreto de cálcio (0,05. L⁻¹), sulfato de potássio (5,3 g. L⁻¹) cloreto de sódio (0,2 g. L⁻¹) e água destilada. Esses frascos foram vedados com buchas de algodão e autoclavados a 121°C por 20 minutos. Após a autoclavagem, cada frasco foi inoculado com três discos miceliais de 13 mm de diâmetro, provenientes de isolados fúngicos cultivados anteriormente em placas de Petri contendo o meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Os cultivos foram realizados em triplicata, e frascos não inoculados serviram como controles abióticos. Os frascos inoculados foram incubados em estufa bacteriológica a 28°C por 14 dias. Após esse período, as culturas foram interrompidas com a adição de 35 mL de água destilada, homogeneizadas e agitadas a cada 10 minutos por 1 hora à 4°C para facilitar a extração das enzimas extracelulares. As culturas foram então filtradas através de gaze e os filtrados foram congelados para análises subsequentes.

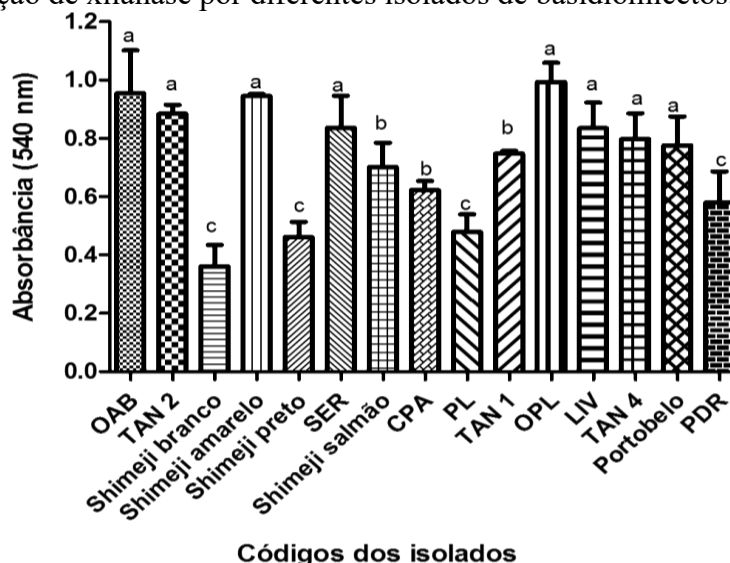
A produção de xilanases foi identificada pela medida da liberação de açúcares redutores, utilizando o xilano como substrato. A reação foi realizada utilizando DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) em meio alcalino e quente na presença de açúcares redutores liberados pela ação da enzima sobre o xilano (Miller, 1959). Nessas condições, o reagente DNS (amarelo) pode passar para a sua forma reduzida (alaranjada), a depender da quantidade de xilanases e, logo, de açúcares redutores liberados no meio de reação. Para o preparo do substrato enzimático, xilano (1% p/v) foi dissolvido em tampão acetato de pH 5,0 (0,1 M) e a solução foi mantida sob agitação constante por 8 horas a 60°C. Após essa etapa, a solução foi centrifugada a 10.000 g por 10 minutos para obter um filtrado límpido. A reação enzimática foi realizada adicionando

100 µL do filtrado enzimático a 900 µL da solução de xilano. A mistura foi incubada a 50°C por 5 minutos e a reação foi interrompida com a adição de 1,5 mL de DNS. Em seguida, a mistura foi aquecida a 100°C por 5 minutos e, após o aquecimento, 3 mL de água destilada foram adicionados. A liberação de açúcares redutores foi medida por espectrofotometria a 540 nm contra um branco contendo todos os componentes da reação, exceto o filtrado enzimático, que foi substituído por água destilada. Os resultados foram expressos como a média da absorbância de cada amostra, sendo que, valores maiores de absorbância, indicam mais açúcares redutores foram liberados pela ação do filtrado enzimático sobre o xilano, indicando cepas fúngicas com maior potencial de produção de xilanases no meio de cultura testado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao todo, 15 isolados de basidiomicetos foram estudados, os quais se encontram armazenados no Laboratório de Microbiologia do IFPR Campus Ivaiporã com os seguintes códigos: OAB, OPL, Shimeji Amarelo, SER, LIV, TAN2, TAN4, Portobelo, TAN1, Shimeji Salmão, CPA, PDR, PL, Shimeji Preto, e Shimeji Branco. Os dados obtidos no estudo demonstraram a produção de xilanase por todos os isolados de basidiomicetos utilizando cascas de café como substrato (gráfico 1). Dentre esses, 8 isolados foram identificados como os melhores produtores de xilanases após 14 dias de cultivo, sendo eles: OAB, OPL, Shimeji Amarelo, SER, LIV, TAN2, TAN4 e Portobelo. Os isolados TAN1, Shimeji Salmão e CPA tiveram produção intermediária, enquanto que PDR, PL, Shimeji Preto e Shimeji Branco demonstraram uma baixa produção dessa enzima.

Gráfico 1: Produção de xilanase por diferentes isolados de basidiomicetos. Fonte: os autores.



Esses resultados estão em consonância com estudos anteriores que indicam a capacidade de fungos de podridão branca e outros basidiomicetos de produzir enzimas hidrolíticas em altos níveis. Além disso, Murthy et al. (2010) demonstraram a viabilidade de usar subprodutos de café para a produção de xilanase por *Penicillium* sp., o que se alinha com resultados obtidos neste trabalho. Os resíduos do processamento do café são de fácil acesso, econômicos e a sua utilização promove uma gestão sustentável de resíduos agroindustriais. A alta produção de xilanase por alguns fungos indica um grande potencial para aplicação industrial, visto que a bioconversão da hemicelulose é um processo promissor com aplicações em vários setores industriais, como na indústria de papel, sucos, cervejas, pães, tecidos, alimentos, rações, óleos vegetais e de biocombustíveis (Moura et al. 2021).

A produção de xilanase a partir de fungos basidiomicetos utilizando resíduos

agroindustriais como substrato é uma abordagem sustentável e econômica. A alta produção de xilanase pelos isolados OAB, OPL e outros sugere que esses micro-organismos podem ser explorados em larga escala para produção industrial de xilanases. No entanto, alguns fungos, apesar de apresentarem baixa produção neste estudo, podem ser estudados em outros substratos e em outras condições de cultivo, pois a variação nos níveis de produção pode ser influenciada por fatores como a composição do meio de cultura, temperatura de cultivo, pH do meio, tempo, etc, os quais que devem ser otimizadas para cada fungo.

4 CONCLUSÃO

Dentre os 15 isolados estudados, 8 apresentaram maior capacidade de produzir xilanases extracelulares. Esses resultados corroboram a literatura existente, que destaca a capacidade de fungos de podridão branca e outros basidiomicetos em produzir enzimas hidrolíticas em altos níveis. A utilização de resíduos agroindustriais, como cascas de café, demonstrou ser uma abordagem sustentável e econômica para a produção de xilanase.

REFERÊNCIAS

- BENTIL, J. A. Biocatalytic potential of basidiomycetes: Relevance, challenges and research interventions in industrial processes. **Scientific African**, vol 11, 2021.
- BISWAS, S. R.; LAHIRI, S.; MAITI, B. R.; CHOWDHURY, S. Isolation and characterization of xylanase from a local fungal isolate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 1, p. 105-111, 1999.
- CONAB. Conab: Primeiro levantamento da safra 2023 de café indica uma produção de 54,94 milhões de sacas. Disponível em: <https://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/cafe/338971-primeiro-levantamento-da-safra-2023-de-cafe-indica-uma-producao-de-54-94-milhoes-desacas>.
- CORRÊA, C. L.; PENHA, E. M.; FREITAS-SILVA, O.; LUNA, A.; GOTTSCHALK, L. M. F. Enzymatic Technology Application on Coffee Co-products: A Review. **Waste and Biomass Valorization**, 12, 3521–3540, 2021.
- HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 8th ed. **CAB International**, Londres, England, 1995.
- IDR-PARANÁ (INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO RURAL DO PARANÁ - IAPAR/EMATER). Café, 2023. Disponível em: <https://www.idrparana.pr.gov.br/Pagina/Cafe>. Acesso em 05 de março de 2023.
- KANGO, N.; JAIN, S. C.; BARNABAS, J. Production of xylanase by *Emericella nidulans* NK-62 on low-value lignocellulosic. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 691-694, 2003.
- MILLER, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, 31, 426–428, 1959.
- MOURA, S. C.; ARAÚJO, A. R. B.; SALES, R. M. M.; BARBOSA, M. F.; SOUTO, B. M.; QUIRINO, B. F. Xilanases microbianas e suas aplicações industriais – Brasília, DF: **Embrapa Agroenergia**, 2021.

MURTHY, P. S.; MADHAVA NAIK, P. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 2, p. 185-190, 2010.

RAJ, A.; CHANDRA, R. Isolation and screening of thermophilic fungi for production of xylanase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 7, p. 678-682, 1995.

RANI, D. S.; DAS, M.; PANDAY, R.; RAMTEKE, P. W. Screening of xylanases from indigenously isolated white rot fungal. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 65, p. 14453-14462, 2011.

RODRÍGUEZ-COUTO, S. Industrial and environmental applications of white rot fungi. **Mycosphere** 8(3), 2017.