

INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE HORMÔNIO VEGETAL (ÁCIDO GIBERÉLICO) UTILIZANDO RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA DO CAFÉ POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

MACHADO, C.M.M. E SOCCOL, C.R.

- Laboratório de Processos Biotecnológicos, Departamento de Engenharia Química, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Jardim das Américas CEP 81531-970 Curitiba - PR; Telefone: (0XX41)361-3183 Fax: (0XX41)266-0222; <cmmm@engquim.ufpr.br>; <soccol@engquim.ufpr.br> -

RESUMO: O ácido giberélico (GA_3) é um importante hormônio regulador do crescimento das plantas, com grande demanda no setor agrícola. Seu custo de produção por fermentação submersa é alto, principalmente pelo baixo rendimento e extração difícil. Estudos têm sido feitos com o objetivo de diminuir custos de produção, seja por seleção de cepas, otimização das condições de cultura, desenvolvimento de diferentes processos fermentativos, minimização dos custos de extração e fermentação no estado sólido (FES). De fato, de acordo com a Patente Industrial n° 525-8, depositada por Soccol et al., a mistura de casca de café e bagaço de mandioca é uma alternativa viável para a produção de GA_3 por FES, levando a maiores conversões do que com fermentação submersa. O objetivo do presente trabalho foi a comparação de dois sistemas fermentativos (frascos erlenmeyer e biorreatores tipo coluna com aeração forçada) para a produção de ácido giberélico utilizando parâmetros semelhantes de fermentação: microrganismo *Gibberella fujikuroi* LPB-06, substrato misto contendo casca de café e bagaço de mandioca (7:3, peso seco), temperatura de 29 °C, pH de 5,0, umidade de 77% e solução salina constituída por 30 mg de $FeSO_4$ e 10 mg de $(NH_4)_2SO_4$ /100 ml H_2O . A extração do ácido giberélico foi feita com tampão fosfato pH 8,0, e sua quantificação foi feita por cromatografia líquida de alta pressão. Foi comprovado que o sistema com aeração mostra-se mais eficiente, chegando a uma produção de 746 mg GA_3 /kg substrato, cerca de 35% maior que o sistema sem aeração.

Palavras-chave: ácido giberélico, fermentação no estado sólido, casca de café.

INFLUENCE OF AERATION IN THE VEGETABLE HORMONE PRODUCTION (GIBBERELIC ACID) USING COFFEE INDUSTRY RESIDUES FOR FERMENTATION IN THE SOLID STATE

ABSTRACT: Gibberellic acid (GA₃) is an important plant growth regulator and due to its demand in agriculture sector is of economic importance for the industries. Although this has been conventionally produced by submerged fermentation, its cost of production is high, mainly due to low yields and extensive downstream processing. Attempts have been made to decrease its production costs using several approaches, such as screening of the fungi, optimization of the nutrients and culture conditions, development of new processes, minimization of the cost of the extraction procedure and solid state fermentation (SSF). Indeed, according to the Brazilian Patent n° 525-8, deposited by Soccol *et al*, a mixed substrate of coffee husk and cassava bagasse is an alternative as substrate to produce gibberellic acid by solid state fermentation, heading higher yields than submerged fermentation. Studies were carried out comparing two different fermentative systems (erlenmeyer flasks and column bioreactor with forced aeration) for gibberellic acid production utilizing similar fermentation parameters: microbial strain of *Gibberella fujikuroi* LPB-06, mixed substrate with coffee husk and cassava bagasse (7:3 dry wt.), supplemented with saline solutions containing (%) 0.03 FeSO₄ and 0.01 (NH₄)₂SO₄, pH of substrate as 5.0, moisture 77% and incubation temperature as 29°C, for 7 days. The GA₃ extraction was done phosphate buffer pH 8.0, and GA₃ quantitation was made by high performance liquid chromatography. The aerated system was shown as more efficient, reaching a production of 746 mg GA₃/kg substrate, almost 35% more than in erlenmeyer flasks.

Keywords: gibberellic acid, solid state fermentation, coffee husk.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador mundial de café, segundo dados da Associação Brasileira dos Exportadores de Café (Abecafé). No processo de industrialização dos grãos, cerca de 50% em massa destes são considerados resíduo de fabricação (BRAHAN e BRESSANI, 1978). A riqueza em matéria orgânica de tais resíduos nos faz pensar na utilização de tecnologias para a obtenção de novos produtos a partir deles, visando sua valorização. Por outro lado, seu potencial poluente não pode ser ignorado, justificando, assim, a pesquisa de novas alternativas tecnológicas para as cascas dos grãos de café. Uma das possíveis utilizações destes é como substrato para crescimento de microrganismos, viabilizando a produção de ácidos, solventes orgânicos, hormônios e proteína microbiana em fermentação

submersa ou sólida (MACHADO et al., 2001a.; WOICIECHOWSKI et al., 2001; BRAND, 1999, LEIFA, 1999; SOARES, 1998).

O ácido giberélico (GA_3) é um importante promotor e regulador do crescimento das plantas, sendo utilizado na agricultura, em viveiros, produção de flores, etc., para uma série de efeitos benéficos, como eliminação da dormência e aceleração de germinação em sementes, melhora no rendimento das colheitas, promoção da formação do fruto, indução do florescimento, e outras. Adicionalmente, GA_3 tem sido utilizado em grande variedade de pesquisa para aplicação farmacológica em animais (KUMAR e LONSANE, 1989).

Embora possuindo grande número de aplicações, atualmente a utilização de ácido giberélico ainda é limitada, principalmente por seu alto custo (US\$ 1 a 3/grama, dependendo da pureza e potência), cuja redução levará a diversas aplicações e a uma utilização mais extensa, trazendo ótimos benefícios econômicos à agricultura e indústria (KUMAR e LONSANE, 1987). Uma possibilidade de diminuição dos custos está na pesquisa de novas técnicas de fermentação. Nos últimos anos, esse metabólito tem sido produzido industrialmente por fermentação submersa, com baixo rendimento e extração difícil.

Recentemente, tem aumentado o interesse de cientistas no desenvolvimento de produção de giberelinas por fermentação em estado sólido (FES). Fermentação sobre farelo de trigo é descrita por Kumar e Lonsane (1987), que compararam o rendimento com a técnica submersa. Essa comparação também foi feita por Tomasini et al. (1997), utilizando como substratos farinha de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e poliuretano de baixa densidade. Ambas as equipes obtiveram maior rendimento com a FES, que no caso de Kumar e Lonsane (1987), foi 1,6 vez maior, com custo cerca de 2,5 vezes menor. Segundo Kumar e Lonsane (1987), esse processo confere as seguintes vantagens:

- ⇒ Simplicidade do meio de crescimento, uma vez que um único substrato oferece quase todos os nutrientes necessários.
- ⇒ Maior capacidade do vaso fermentação devida ao uso de menor volume de água, com maior concentração de substrato.
- ⇒ Sistema de controle e equipamentos simples.
- ⇒ Procedimento simplificado na produção de inóculo.
- ⇒ Fácil “scale-up” do processo.
- ⇒ Reduzida quantidade de solvente na recuperação do produto;
- ⇒ Maior rendimento.
- ⇒ Fácil controle de contaminação, devido à baixa umidade do sistema.

O termo fermentação no estado sólido (FES), tradução do inglês "solid state fermentation", pode ser definido como a fermentação na qual o crescimento do microrganismo em substratos sólidos ocorre na ausência de líquido na forma livre. A água livre, indispensável ao crescimento dos microrganismos, é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida. Estudos feitos nos últimos anos deram origem a uma série de novos processos, bem como a muitas publicações científicas, demonstrando as vantagens desse método de fermentação, especialmente quando se trabalha com fungos filamentosos. A técnica de FES é conhecida pela sua produção de metabólitos, na maioria dos casos em níveis muito maiores que a fermentação submersa. Além disso, é caracterizada por processos mais baratos, além da possibilidade de aproveitamento de resíduos agroindustriais, celulósicos ou amiláceos (PANDEY, et al., 2001; PANDEY, 1992). Muitos desses substratos, como batata refugo, bagaços de mandioca, de maçã e de cana-de-açúcar, entre outros, têm sido objeto de estudos no Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR. Recentemente, Soccol et al depositaram a Patente Industrial nº 525-8, demonstrando que a mistura de casca de café e bagaço de mandioca é uma alternativa viável para a produção de GA₃ por FES em frascos erlenmeyer (CARTA, 1999; SOCCOL, 1997a; SOCCOL, 1997b; AYALA, 1996).

O objetivo do presente trabalho foi a comparação de dois sistemas fermentativos (frascos erlenmeyer e biorreatores tipo coluna com aeração forçada) para a produção de ácido giberélico, utilizando parâmetros semelhantes de fermentação.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo e substratos

A cepa de *Gibberella fujikuroi* LPB-06, mantida em ágar dextrose-batata (BDA) em tubos inclinados foi inoculada em meio Czapek Dox em *shaker* rotatório a 30 °C por 4 dias, para desenvolvimento da solução semente (BANDELIER et al., 1996). O meio sólido consiste na casca de café pré-tratada (CC) com solução alcalina KOH 0,25% em autoclave a 100 °C por 45 minutos e bagaço de mandioca (BM) na razão 7:3 com pH de 5,0, umidade de 77%, ajustada pela adição de solução salina constituída por 30 mg de FeSO₄ e 10 mg de (NH₄)₂SO₄ /100 ml H₂O. Este meio foi então esterilizado em autoclave a 121 °C, por 20 minutos.

Condições de fermentação, extração do metabólito e análise do metabólito

Inoculou-se 15% volume/massa de solução-semente a 10 g de meio sólido CC/BM em frascos erlenmeyer de 250 ml, ou em 25 g do mesmo meio, posteriormente empacotados em colunas de aeração forçada (RAIMBAULT e ALAZARD, 1980). A fermentação deu-se em estufa para os frascos erlenmeyer e em banho de água para as colunas aeradas a 29 °C, por sete dias. Após a fermentação, foi feita extração do metabólito com tampão fosfato pH 8,0. A fase líquida foi filtrada e purificada em coluna com sílica C-18 (55-105 µm) .

A análise foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando um sistema da marca Varian, utilizando-se como fase móvel uma mistura metanol/água com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico. A determinação de ácido giberélico foi realizada utilizando-se o método de padrões externos e calculando a área dos picos.

Cinética da produção de GA₃

Trabalhos já haviam sido feitos na produção de ácido giberélico em frascos erlenmeyer, comprovando a sua eficiência (SOCCOL, et al. 2000). Sabendo que a via metabólica do ácido giberélico é constituída por sucessivas etapas oxidativas, considerou-se que um sistema com aeração forçada provavelmente levaria a conversões ainda maiores.

Fez-se, então, um estudo de mudança de escala, utilizando-se um biorreator do tipo colunas de aeração forçada, partindo-se das condições otimizadas para os frascos erlenmeyer, chegando-se às condições de aeração adequadas para a produção de GA₃: fluxo de ar saturado nos primeiros três dias de fermentação de 60 ml/min/coluna, e a partir do 4^o dia até o final da fermentação, de 300 ml/min/coluna (MACHADO et al., 2001).

Para verificação mais aprofundada de como ocorre a biossíntese do ácido giberélico em meio misto de casca de café e bagaço de mandioca, especialmente no concernente ao uso de aeração, fez-se uma cinética de sete dias da produção deste, em frascos erlenmeyer e em colunas de aeração forçada. Para isso, retirou-se um frasco erlenmeyer (ou coluna) a cada 24 horas, a partir do 1^o dia. Em cada um deles foram analisados a produção de GA₃, a perda de peso na fermentação, o pH e a umidade final do meio.

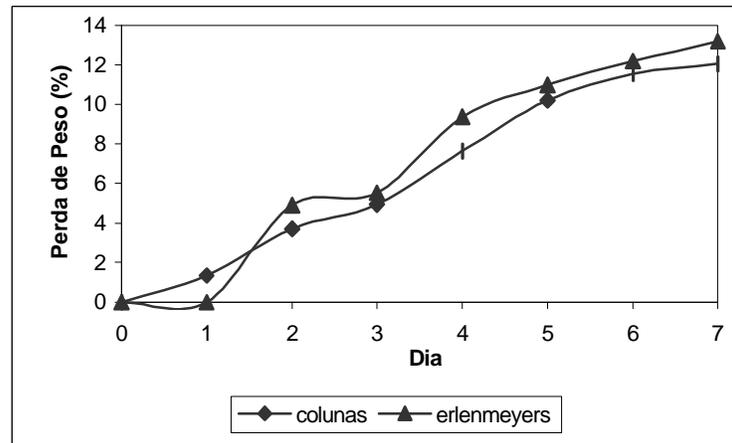
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na cinética da produção de ácido giberélico, foram avaliados a concentração obtida do metabólito, a perda de peso do substrato, o pH e a umidade final do meio final do meio.

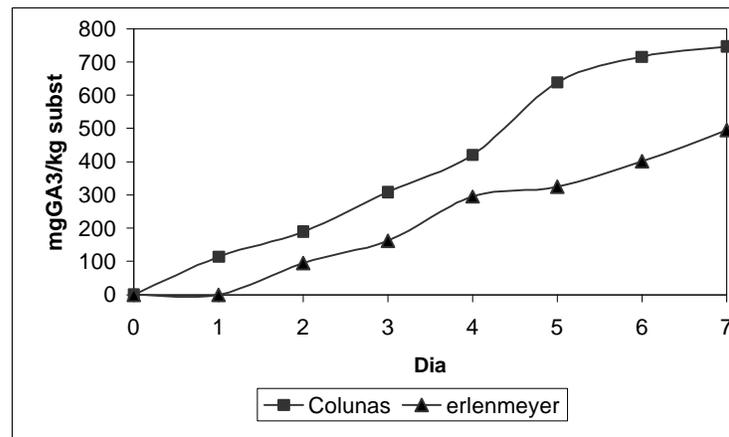
No sistema em frascos erlenmeyer, durante todo o tempo da fermentação, a umidade manteve-se constante a 77%. Já nas colunas aeradas houve aumento progressivo da umidade com o passar do tempo, chegando a 80% no final da fermentação. Esse comportamento era esperado, uma vez que o ar que passa pelas colunas é saturado, havendo, assim, transferência de massa no sistema.

O comportamento do pH foi semelhante nos dois sistemas, havendo pouca variação ao longo das fermentações. É interessante ressaltar que, já no primeiro dia, o pH havia aumentado de 5,0 (pH inicial) para 5,2. A partir de então, ele manteve-se praticamente constante, com pequenas oscilações entre 5,2 e 5,5. Essa variação não é significativa, se for levada em conta a dificuldade existente em se medir o pH na fermentação no estado sólido, principalmente no que concerne à retirada de amostra. Talvez devido a essa dificuldade, o único registro da evolução do pH na produção de ácido giberélico por FES foi feito por TOMASINI, et al. (1997), utilizando como substrato farelo de mandioca, com pH inicial de 6,0. No estudo, os autores demonstraram que o pH baixou para 5,3 já nas primeiras 10 horas de fermentação, mantendo-se praticamente constante até o final da tomada de amostras, 40 horas depois. Em fermentação submersa também não se verifica grande variação no pH, havendo aumentos e diminuições registrados para diferentes fontes de nitrogênio: uréia pH 3,6-3,1; glicina pH 3,5-3,0; acetato de amônio pH 3,1-3,3. No presente estudo, a mudança de pH também ocorreu nas primeiras 15 horas de fermentação, mantendo-se praticamente constante após essa fase (Brückner e Blechschmidt, 1991)

Na Figura 1 observa-se que a perda de peso (em base seca) do substrato também teve comportamento similar nos sistemas com e sem aeração forçada, chegando a 13% em ambos os casos. Considerando que a perda de peso do substrato pode ser relacionada com o crescimento do microrganismo, nota-se que em frascos erlenmeyer existe uma fase de adaptação até o terceiro dia, seguida de uma fase de maior crescimento até o sétimo dia. Já em colunas não existe esta fase de adaptação, havendo aumento linear ao longo de todo o tempo de fermentação, devido, provavelmente, à influência da aeração, que estimulou o crescimento mais rápido dos microrganismos.

Figura 1 - Perda percentual de peso do substrato ao longo da fermentação.

A aeração também influenciou a produção mais rápida de ácido giberélico, como pode ser constatado pela Figura 2. Já no primeiro dia houve produção de cerca de 100 mg GA₃/kg substrato, enquanto no sistema sem aeração foram necessários três dias para essa produção. Observa-se também que em frascos erlenmeyers ainda havia tendência de aumento na produção após o sétimo dia. Em colunas, já no sexto dia havia estabilização na produtividade. Assim, além de maior conversão do metabólito, o sistema com aeração leva a um menor tempo de fermentação, aspecto extremamente vantajoso ao se considerar uma mudança de escala, pela economia de energia e menor probabilidade de contaminações.

**Figura 2** - Produção de ácido giberélico.

CONCLUSÃO

Com este trabalho pode-se constatar a influência da aeração na produção de ácido giberélico por fermentação no estado sólido usando casca de café e bagaço de cana como substrato. Além de levar a maiores conversões (746 mg GA₃/kg substrato contra 494 mg GA₃/kg substrato em frascos erlenmeyer), o biorreator do tipo colunas com aeração forçada leva a uma redução significativa da fase de adaptação do microrganismo, diminuindo, assim, o tempo de fermentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYALA, L. *Aproveitamento biotecnológico de batata refugos (Solanum tuberosum sp.) para produção de conídios do fungo entomopatogênico Beauveria bassiana (Bals) will para fermentação em estado sólido*. Curitiba, 1996. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

BANDELIER, S. et al. "Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor", *Process Biochem.*, 1997, **32**, 141-145.

BRAHAN, J. E.; BRESSANI, R. *Pulpa de Café – composición, tecnología y utilización*. Bogota: Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, INCAP, 1978.

BRAND, D. *Detoxificação biológica da casca de café por fungos filamentosos em fermentação no estado sólido*. Curitiba, 1999. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

BRÜCKNER B. & BLECHSCHMIDT, D. The gibberellin fermentation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1991, **11**, 163 – 192.

CARTA, F. S. *Hidrólise enzimática dos resíduos de feculares e produção de ácido fumárico por fermentação de fungos do gênero Rhizopus*. Curitiba, 1999. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

KUMAR, P. K. R. & LONSANE, B. K. Gibberellic Acid by solid state fermentation: consistent and improvement yields. *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, **30**, 267-271.

KUMAR, P. K. R. & LONSANE, B. K. Microbial Production of Gibberellins: state of the art. *Advances in Applied Microbiology*, 1989, **34**, 29-139.

LEIFA, F. Curitiba, 1999. *Produção de fungo comestível do gênero Pleorotus em bio-resíduos da agro-indústria do café*. Curitiba, 1999. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

MACHADO, C. M. M.; SOCCOL, C. R. WOICIECHOWSKI, A. L. *Production of gibberellic acid using agroindustrial wastes by solid state fermentation in aerated columns bioreactor*. In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu, 2001 (Trabalho aceito).

MACHADO, Cristina Maria Monteiro, OLIVEIRA, Brás Heleno de, PANDEY, Ashok, SOCCOL, Carlos Ricardo. Coffee husk as substrate for the production of gibberellic acid by fermentation. Chapter 37. In: SERA, T., SOCCOL, C. R., PANDEY, A., ROUSSOS, S. *Book on Coffee Biotechnology and Quality*, Kluwer Academic Publishers, 2001.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGRAM, P. *Solid State Fermentation in Biotechnology – Fundamentals and Applications*, Asistech Publishers Inc., 2001.

PANDEY, A., Recent developments in solid state fermentation, *Process Biochemistry*, 1992, **27**, 109-117.

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture Method to Study Fungal Growth in Solid Fermentation, *Critical Reviews in Biotechnology*, 1980, **10**, 199-209.

SEAB/DERAL. *Informe ao Secretário – café*. 16 p., 1999

SOCCOL, C. R., MACHADO, C. M. M., OLIVEIRA, . H. *Produção de ácido giberélico por fermentação no estado sólido em substrato misto*. Brasil, **Patente Industrial** nº 525-8 , Brasil, 2000.

SOCCOL, C. R. Some experiments for the valorization of agroindustrial residues by SSF: Part I., Biotransformation of by products and agroindustrial wastes. In: *International Training Course – Solid State Fermentation*. Curitiba, 1997a.

SOCCOL, C. R. Some experiments for the valorization of agroindustrial residues by SSF: Part II., Production of industrial metabolites. In: *International Training Course – Solid State Fermentation*. Curitiba, 1997b.

SOARES, M. *Biossíntese de metabólitos voláteis frutais por Pachysolen tannophylus e Ceratocystis fimbriata pela fermentação no estado sólido sobre casca de café*. Curitiba, 1998. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

TOMASINI, A.; FAJARDO, C.; BARRIOS-GONZÁLES, J. Gibberellic acid production using different solid-state fermentation systems. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1997, **13**, 203-206.

WOICIECHOWSKI, A. L., PANDEY, A., MACHADO, C. M. M., CARDOSO, E. B., SOCCOL, C. R. Hydrolysis of coffee husk: process optimization to recover fermentable sugar. Chapter 38: In: SERA, T., SOCCOL, C. R., PANDEY, A., ROUSSOS, S. *Book on Coffee Biotechnology and Quality*, Kluwer Academic Publishers, 2001.