

CASCA DE CAFÉ COMO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE ácido giberélico POR FERMENTAÇÃO no estado sólido

Cristina Maria Monteiro MACHADO – UFPR , Carlos Ricardo SOCCOL *
– UFPR (soccol@engquim.ufpr.br), Brás Heleno de OLIVEIRA – UFPR

ABSTRACT: Gibberellic acid (GA₃) is an important plant growth hormone of industrial importance due to its high demand in agricultural sector. Its cost of production using submerged fermentation 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, application of solid state fermentation (SSF) using cheaper substrates such as agro-industrial residues, etc. Studies were carried out on optimization of physical factors such as temperature, pH and using a mixed substrate comprising coffee husk and cassava bagasse (7:3, dry wt) and supplementation of substrate with a saline solutions containing (%) 0.03 FeSO₄ and 0.01 (NH₄)₂SO₄ in solid cultures. The optimal conditions were substrate pH and moisture as 5.3 and 75%, respectively, incubation temperature as 29°C, which resulted GA₃ yields 2.1 times more than the initial results, reaching 492.5 mg GA₃/kg dry substrate.

KEYWORDS: Gibberellic acid, Solid state fermentation, Coffee husk

INTRODUÇÃO

Ácido giberélico (GA₃) é um importante promotor e regulador do crescimento das plantas e é utilizado, para uma série de efeitos benéficos. Porém, atualmente, a utilização de GA₃ ainda é limitada por seu alto custo (US\$ 1 a 3/g). A redução do mesmo levará suas diversas aplicações a uma utilização mais extensa, trazendo ótimos benefícios econômicas à agricultura e indústria. Uma possibilidade de diminuição dos custos está na pesquisa de novas técnicas de fermentação (KUMAR & LONSANE, 1987, 1989).

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 agro-industriais. Diversos resíduos agrícolas ou agro-industriais, celulósicos ou amiláceos têm sido utilizados em fermentação no estado sólido, muitos dos quais tendo sido objeto de estudos no Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR, como batata refugo, bagaços de mandioca, de maçã e de cana-de-açúcar, entre outros.

O Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador mundial de café, tendo produzido cerca de 23 milhões de sacas na safra de 1996/97, segundo dados da Associação Brasileira dos Exportadores de Café (Abecafé). No processo de industrialização dos grãos, cerca de 50% em massa dos mesmos é considerado resíduo de fabricação (BRAHAN & BRESSANI, 1978). Uma das possíveis utilizações dos mesmos é como substrato para crescimento de microrganismos viabilizando a produção de ácidos, solventes orgânicos, hormônios e proteína microbiana em fermentação submersa ou sólida.

O objetivo do presente trabalho foi testar a possibilidade de se obter ácido giberélico, utilizando-se *Gibberella fujikuroi*, num processo de fermentação no estado sólido da casca do café, resíduo de sua industrialização, e otimizar as condições nutricionais e físicas de fermentação em frascos erlenmeyer

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo e Substratos

A cepa de *Gibberella fujikuroi* LPB-06, mantida em ágar dextrose-batata (PDA) em tubos inclinados é 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 e umidade ajustados para as condições determinadas da fermentação. Este meio é então esterilizado em autoclave a 121° C por 30 minutos.

Condições de fermentação e extração do metabólito

Inoculou-se 1,5 ml (15% V/m) de solução-semente a 10 g de meio sólido CC/BM em frascos erlenmeyer de 250 ml. A fermentação deu-se em estufa por 7 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) empacotada em uma pipeta de Pasteur, e solução metanol-água Milli-Q 80% como eluente.

Análise do metabólito

A análise foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se 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 o método de padrões externos e calculando a área dos picos.

Fatores nutricionais – adição de solução salina:

Para avaliar a influência da presença de certos sais, foram utilizados dois planos experimentais. No primeiro os níveis considerados foram apenas “presença” ou “ausência” de determinado sal, num experimento fracionário 2⁽⁷⁻⁴⁾ sem ponto central e com uma repetição. Os sete sais utilizados foram os reportados como influentes na produção do GA₃, nas concentrações médias sugeridas: KH₂PO₄, MgSO₄, ZnSO₄, CuSO₄ e FeSO₄ – 10 g/100 ml H₂O; K₂SO₄ – 20 g/100 ml H₂O e (NH₄)₂SO₄ – 2 g/100 ml H₂O. Na segunda otimização foi feito um experimento completo, utilizando-se os dois sais que tiveram maior influência na produção de GA₃ em três diferentes concentrações: 5, 30 e 55 g/100ml para FeSO₄ e 0,5, 10 e 20 g/100ml, para (NH₄)₂SO₄. As condições de fermentação de ambos os experimentos foram temperatura de 29 °C, umidade e pH iniciais do meio de 65% e 4,5, respectivamente.

Fatores Físicos:

No primeiro experimento, foram avaliadas temperatura da estufa, pH e umidade iniciais do meio, num experimento fracionário 3⁽³⁻¹⁾, tendo como níveis T: 26, 28 e 30 °C; Umidade: 60,65 e 70%; pH: 4,0, 4,5 e 5,0. No segundo planejamento apenas a umidade e o pH iniciais do meio foram reavaliados, num experimento completo 3⁽²⁻⁰⁾ tendo como níveis: Umidade: 70,75 e 78%; pH 5,0, 5,3 e 5,5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Solução salina

Considerando-se que valores negativos no diagrama de Pareto significam que o aumento da variável resposta é inversamente proporcional ao aumento daquele fator, ao observar-se a Figura 1, percebe-se que diversos sais indicados pela literatura como influentes na produção de GA₃ possuem, neste meio tiveram efeito negativo. Esse efeito, muito pronunciado especialmente para o fosfato de potássio monobásico, pode ser explicado pela composição das cinzas presentes na casca de café. Segundo ELÍAS (1978) existem naturalmente 1765 mg% de potássio na polpa de café (Tabela 6, item 3.5.1), além de outros sais. Dessa forma, a adição destes compostos ao meio representou um excesso que inibiu o crescimento e metabolismo do microrganismo. No experimento seguinte, utilizou-se apenas os sais que tiveram maior influência positiva na variável resposta, FeSO₄ e (NH₄)₂SO₄, variando-se suas concentrações.

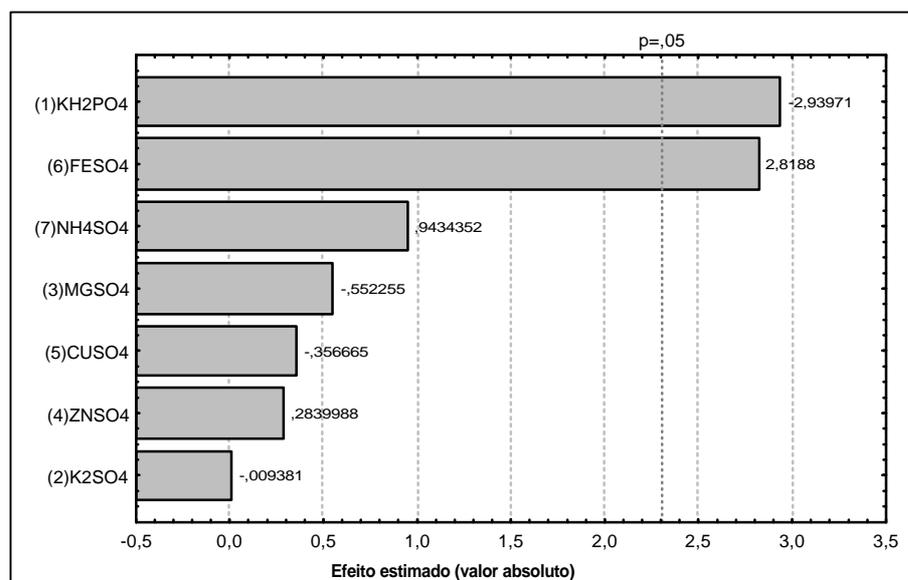


FIGURA 1: Diagrama de Pareto do 1º experimento de otimização de fatores nutricionais, variável resposta: mg GA₃/kg substrato.

Como pode ser observado na Figura 2 a seguir, chegou-se às condições ótimas dos fatores nutricionais, sendo esta constituída de 30 mg de FeSO₄ e 10 mg de (NH₄)₂SO₄ /100 ml H₂O atingindo uma produção de 389 mg GA₃/ kg substrato

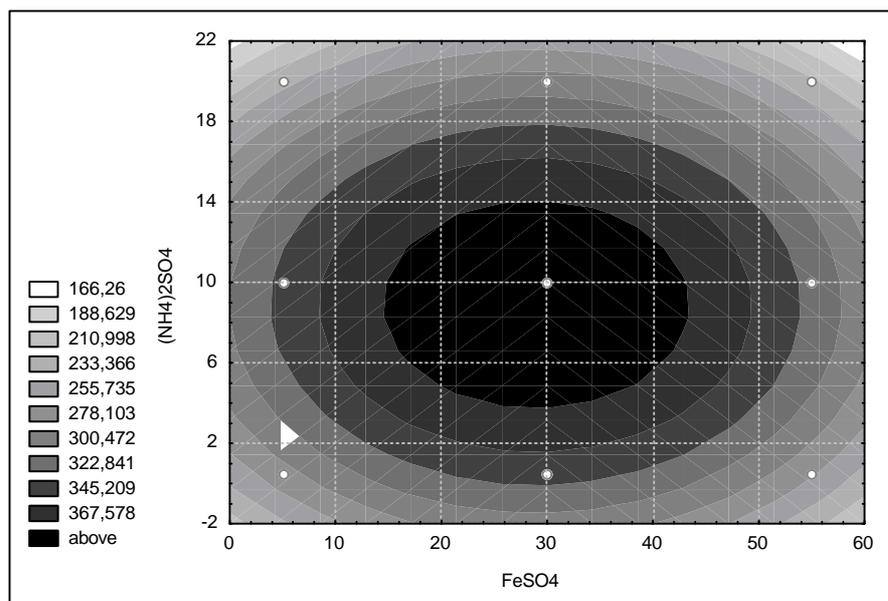


FIGURA 2: Contorno de resposta 2º experimento de otimização do pré-tratamento do substrato (níveis dados pela variável resposta mg GA₃/kg substrato).

Fatores Físicos

Observando-se o Diagrama de Pareto (Figura 3), nota-se que a variável de maior influência na produção de GA₃ é o pH, seguido da umidade inicial do meio, ambos sugerindo que valores maiores levariam à um aumento da variável resposta. Segundo KUMAR & LONSANE (1989), o pH é realmente, um dos fatores mais importantes na produção de giberelinas, principalmente na definição da giberelina. Dentro dos níveis utilizados, a temperatura não teve um efeito significativo. Segundo JEFFERYS, 1970, apesar de a temperatura estar relacionada à cepa empregada, pode-se considerar que a temperatura ótima de reprodução está entre 31 e 32 °C, enquanto que para a produção de GA₃ utilizam-se temperaturas inferiores a 30 °C.

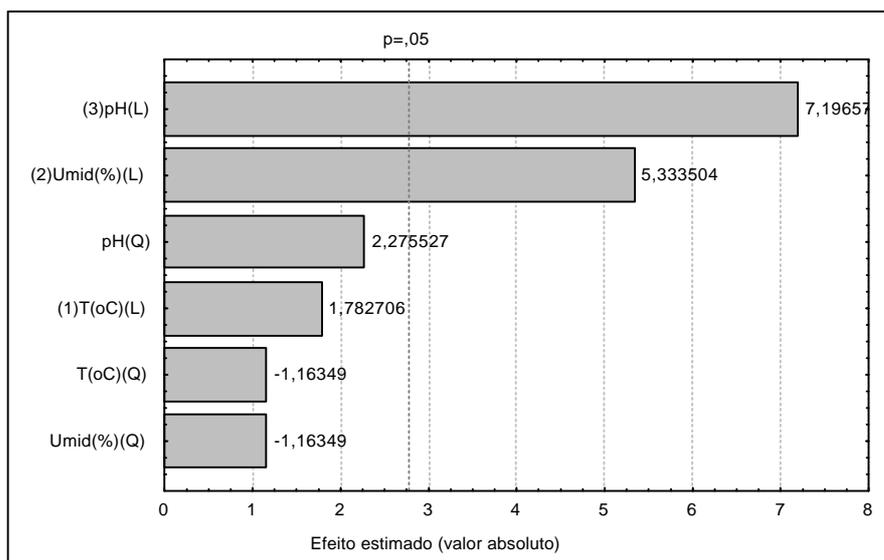


FIGURA 3: Diagrama de Pareto do 1º experimento de otimização de fatores físicos, variável resposta: mg GA₃/kg substrato.

Assim, no experimento seguinte utilizou-se temperatura da estufa em 29 °C e variaram-se novamente os valores de pH e umidade iniciais do meio de cultivo, uma vez que estes revelaram-se altamente significativos na primeira otimização. Foram escolhidos níveis maiores que os anteriores, com a umidade chegando a 78% e o pH a 5,5. Observando-se o contorno de resposta (Figura 4) abaixo, percebe-se que se chegou a um modelo centralizado, isto é, o nível ótimo da produção de ácido giberélico está aparecendo inteiro no centro do gráfico. Nessa otimização atingiu-se uma produção máxima de 492,5 mg GA₃/kg substrato, ou seja, um

aumento de 27% em relação à fermentação sem otimização dos fatores físicos. Com isso, obteve-se as condições ideais de fermentação: temperatura de 29 °C, pH de 5,3 e umidade de 77%.

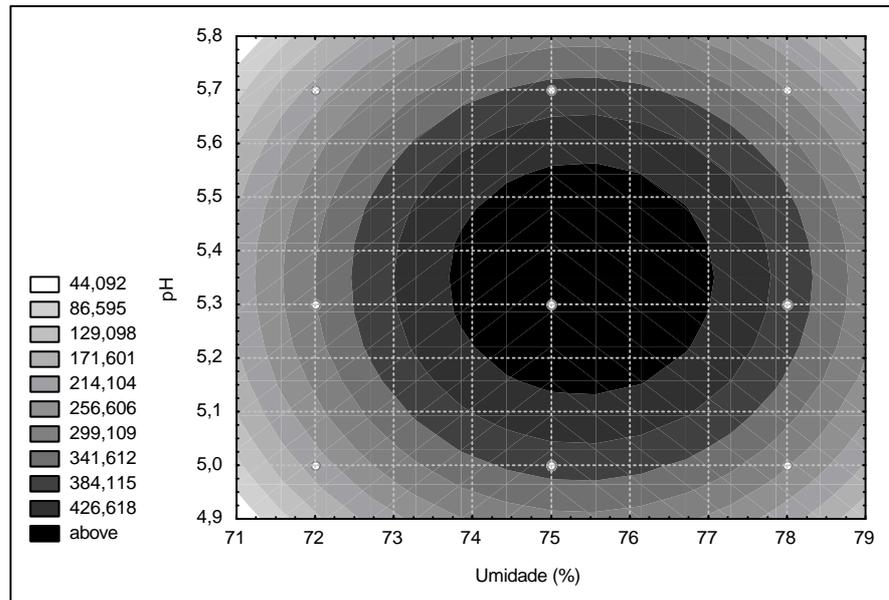


FIGURA 4: Contorno de resposta 2º experimento de otimização dos fatores físicos (níveis dados pela variável resposta mg GA₃/kg substrato).

CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu avaliar o efeito de diferentes fatores que influenciam a produção de ácido giberélico na casca de café. A partir destes resultados puderam-se determinar as condições ótimas que possibilitam o alcance de concentrações elevadas na produção do metabólito. A escolha judiciosa das condições nutricionais e físicas do sistema aumentaram em mais de duas vezes a produtividade do metabólito.

Esta produção ótima de 492,5 mg GA₃/kg substrato é a maior encontrada na literatura com FES em frascos erlenmeyer. Dessa forma comprova-se a eficiência do substrato estudado, além de uma diminuição nos custos do processo, uma vez que a casca de café e o bagaço de mandioca são resíduos agro-industriais abundantes no Estado.

Estudos complementares estão sendo feitos, como fermentação em colunas aeradas e escalonamento para reator piloto. Espera-se, com estes trabalhos aumentar-se, ainda mais a produção alcançada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 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.
- KUMAR, P. K. R. & LONSANE, B. K. Gibberellic Acid by solid state fermentation: consistent and improved 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.
- JEFFERYS E. G. "The Gibberellin Fermentation", *Adv. Appl. Microbiol.*, 1970, **13**, 283-316

AVISO

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS
SEGUINTE ENDEREÇOS:

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV
Viçosa - MG
Cep: 36571-000
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485
Fax : (31) 3891-3911

EMBRAPA CAFÉ

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)
Edifício Sede da Embrapa - sala 321
Brasília - DF
Cep: 70770-901
Tel: (61) 448-4378
Fax: (61) 448-4425