

EXPERIÊNCIA BRASILEIRA NA VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE SUBPRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA DO CAFÉ

Carlos Ricardo Soccol¹, Fan Leifa¹, Adenise L. Woiciechowski¹, Debora Brand¹, Cristina M. M. Machado¹, Marlene Soares¹, Pierre Christen², Ashok Pandey¹.

¹Laboratório de Processos Biotecnológicos- Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), CEP 81531-970 Curitiba- PR- Brazil.

²Laboratoire de Microbiologie, Université de Provence (CESB/ESIL)-13288, Marseille - France

INTRODUÇÃO

O Brasil, maior produtor, consumidor e exportador mundial de café, com uma produção anual de cerca de 30.5 milhões de sacas, das quais 26 milhões de café arábica e 4.5 milhões de café robusta, segundo dados da Associação Brasileira dos Exportadores de Café (Abecafé). Dessa produção, 90% do café produzido atualmente utiliza a técnica de descasque por via seca. O café colhido é lavado, de forma similar à que é feita na via úmida. Depois da lavagem, resultam duas frações: o café chamado "bóia" e o café chamado miúdo. As duas frações serão secas separadamente.

O processo de secagem pode ser natural ou artificial. Na secagem natural, a mais utilizada, os grãos de café são transportados para uma superfície plana de terra, asfalto ou tijolo de argila e são secos até que a umidade dos grãos fiquem com cerca de 11-12%. Pelo processo de secagem artificial, os grãos são secos com convecção forçada, até o mesmo teor de umidade.

Depois da secagem, o café vai à uma etapa de limpeza, na qual os grãos são separados de impurezas (pedras, terra, folhas, restos de galhos, etc.) através de peneiras vibratórias.

O café limpo sofre então o descasque, que separa as cascas para a parte de fora da máquina. O café descascado é selecionado, embalado e enviado para indústrias de torrefação e de fabricação de café solúvel.

Considerando que a casca constitui cerca de 50% do grão seco, grandes volumes são gerados anualmente no país.

Outro problema que deveremos enfrentar em breve em nosso país, trata do destino que deveremos dar aos resíduos líquidos e sólidos gerados no processo por via úmida, que começam a ser implantados no país como forma de atender a demanda internacional crescente por cafés finos de alta qualidade. Isso irá levar a um aumento significativo dos problemas ambientais ocasionado por grandes volumes de H₂O de lavagem e polpa úmida.

A técnica da cultura do café adensado praticada em muitas lavouras no estado do Paraná

como forma de aumentar a produtividade e reduzir as perdas ocasionadas pelas geadas, tem levado a biomassa foliar extremamente importante o que vem dificultando a colheita das cerejas que caem no solo durante a colheita.

Desta forma esse esta palestra busca apresentar algumas alternativas biotecnológicas desenvolvidas pelo Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR para o manejo desses resíduos, pois os mesmos apresentam elevado potencial para uso na alimentação animal ou para uso como substrato na obtenção de produtos e biomoléculas de elevado valor agregado (Soccol & Krieger, 1998). No caso do uso desses resíduos agro-industriais na alimentação animal é de fundamental importância que seja estudado o problema da eliminação dos compostos recalcitrantes tóxicos (CRT) tais como cafeína, taninos e polifenóis. Atualmente os compostos recalcitrantes tóxicos representam uma grande limitação no uso da polpa, casca do café e mesmo folhas na alimentação animal, embora tais resíduos possuam um valor calórico-proteico considerável (11.3 % proteína bruta; 2.0% de matéria graxa; 27.6% de celulose; 20% de matérias pécticas e açúcares redutores, (TANGO, 1971; VASCO, 1989).

Além da eliminação dos fatores anti-nutricionais com vistas a sua utilização na alimentação de ruminantes, aves e peixes estaremos também realizando estudos com objetivo de utilizar esses sub-produtos como substrato de fermentação para produção de fungos comestíveis e biomoléculas de interesse comercial tais como ácidos orgânicos, hormônios vegetais e aromas.

PRODUÇÃO DE FUNGOS COMESTÍVEIS

a) *Pleurotus*: Estudos foram realizados visando utilizar cascas, folhas e borra de café na produção de fungos comestíveis do gênero *Pleurotus*. Inicialmente 10 diferentes cepas de fungos do gênero *Pleurotus* pertencentes ao Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR foram testadas em um meio de cultivo a base agar extrato de casca de café. Os estudos de seleção de cepas foram realizados em função da velocidade

de crescimento radial e da formação de biomassa de acordo com técnica descrita por Soccol (1994).

A cepa *Pleurotus ostreatus* LPB 09 foi selecionada para estudos posteriores de frutificação por apresentar o melhor crescimento em agar casca de café (9,68 mm/dia e 43,40 mg/placa em 9 dias de cultura a 24 °C).

Quando somente casca de café foi usada como substrato o rendimento de produção foi de 968g/Kg de casca de café seco, sendo que os primeiros corpos de frutificação foram colhidos após 20 de cultura.

Rendimentos elevados na produção de fungos comestíveis foram também obtidos utilizando borra de café como substrato na (903.5g/Kg de casca de café seco). Os resultados demonstraram que o uso de folhas de café isoladamente como único substrato não é recomendável para a produção de fungos comestíveis do gênero *Pleurotus*.

b) *Lentinus edodes*: Trabalho semelhante foi realizado com o fungo comestível *Lentinus edodes* LPB 02 conforme técnica descrita anteriormente. A frutificação foi realizada em saco plástico utilizando 2 Kg de borra de café com 65% de umidade e inoculada com 15% de "spawn" produzido a partir de uma mistura de 80% de serragem de eucalipto e 20% de farelo de trigo. Os primeiros corpos de frutificação apareceram 60 dias após inoculação. A eficiência biológica após a terceira colheita foi de 886g de fungo fresco/Kg de borra de café fresco.

DETOXIFICAÇÃO BIOLÓGICA DA CASCA DO CAFÉ

A casca de café apresenta um baixo valor nutricional, devido a presença de substâncias tóxicas como cafeína (1,2 %), taninos (6,3%) e polifenóis. Uma alternativa para a redução dessas substâncias tóxicas é a utilização da técnica da fermentação no estado sólido, empregando microorganismos selecionados capazes de utilizar a cafeína como fonte de nitrogênio. A fermentação no estado sólido é considerada a mais natural das fermentações, porque seus processos assemelham-se as condições sob as quais a maioria dos microrganismos crescem na natureza. É definida como o crescimento de microorganismos em materiais sólidos na ausência de água livre, mas o substrato deve conter umidade suficiente, presente na forma absorvida dentro da matriz sólida.

O objetivo do presente trabalho foi incrementar o valor biológico da casca de café, pela

detoxificação de seus componentes tóxicos por fungos filamentosos, utilizando a técnica de fermentação no estado sólido.

Os microorganismos foram selecionados com base na sua velocidade de crescimento radial e biomassa produzida em ágar extrato de casca de café (100g/L). Foram utilizadas onze cepas de fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* e duas do gênero *Phanerochaetae*.

O crescimento radial em ágar extrato de casca de café foi realizado por meio de inoculação de uma solução de esporos dos microrganismos estudados no centro de uma placa de Petri. A biomassa foi medida através da dissolução do ágar e separação da biomassa, que foi então pesada em um papel de filtro previamente tarado.

Para o preparo do substrato (casca de café) para a detoxificação. Neste caso a casca de café foi inicialmente seca em estufa com circulação de ar à 55° C por 48 horas até atingir uma umidade de aproximadamente 8 %. Em seguida a casca foi moída e peneirada. Utilizou-se a fração com granulométrica compreendida entre 0,8 e 2,0 mm para os estudos de detoxificação. Os trabalhos de seleção em agar café demonstraram que os fungos do gênero *Rhizopus* são capazes de crescer muito bem neste tipo de substrato, pois a velocidade de crescimento radial das cepas estudadas variaram de 0,94 mm/h à 2,19 mm/h. A cepa *Rhizopus arrhizus* 16179 foi selecionada para os estudos posteriores por apresentar a maior produção de biomassa e velocidade de crescimento radial (2,03 mm/h e 12,10 mg/placa). A cepa *Phanerochaetae chrysosporium* BK foi também selecionada para detoxificação da casca do café.

As cepas *Rhizopus arrhizus* 16179 e *Phanerochaetae chrysosporium* BK foram selecionadas por serem capazes de degradar parcialmente os compostos tóxicos presentes na casca de café. Os testes deste estudo foram realizados sem a adição de nutrientes às cascas de café, o que significa que os microorganismos podem utilizar somente os componentes presentes no substrato para biotransformá-lo. Os resultados demonstraram que a cepa de *Rhizopus arrhizus* 16179 em 6 dias de fermentação foi capaz de reduzir o teor de cafeína presente inicialmente na casca em 87% e em 65% a concentração de tanino. Os melhores resultados alcançados com a cepa de *Phanerochaetae chrysosporium* BK foi uma redução na concentração de cafeína de 71% e tanino de 45% em 16 dias de fermentação.

OBTENÇÃO DE SUBSTRATOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS ATRAVÉS DA HIDRÓLISE DA CASCA DO CAFÉ.

A técnica da hidrólise ácida, alcalina ou enzimática tem sido mundialmente utilizada na obtenção de substratos fermentescíveis ricos em monossacarídeos. As hidrólises ácidas (clorídrica e sulfúrica) e alcalina (NH_4OH , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Uréia e Na_2CO_3) foram realizadas em autoclave utilizando 200 g de cascas de café por litro de solução. Foram testadas temperaturas de 100, 120 e 140 °C por tempos de 5, 10, 15, 30 e 60 minutos. Obtém-se desse tratamento uma fração líquida e uma sólida, as quais foram separadas por filtração. Como os açúcares redutores (simples) são solúveis em água, a fase líquida é rica em açúcares redutores, enquanto a sólida é mais pobre. Os açúcares redutores nas fases líquidas e sólida foram determinados pelos métodos colorimétricos de Somogyi-Nelson e D.N.S. Concentrações de açúcares redutores entre 30 e 50 g/L foram obtidas na fase líquida, sendo que o melhor resultado foi de 49,5 g/L nas frações em que foram utilizadas somente água e casca de café na temperatura de 100 °C por 60 minutos. A auto-hidrólise permitiu obter uma concentração de 247,5 gramas de açúcares redutores em glicose (ARG) por kg de casca de café seca. Esse resultado representa uma recuperação de 98% dos ARG presentes na casca do café, utilizando apenas água, baixa temperatura (96°) e pressão atmosférica.

PRODUÇÃO DE AROMA FRUTAL POR *Ceratocystis fimbriata* EM RESÍDUO SÓLIDO DA AGROINDÚSTRIA DO CAFÉ

Apesar da maioria dos aromatizantes serem atualmente obtidos por síntese química(84%), pesquisas mostram a crescente preferência dos consumidores por alimentos naturais ou que contenham aditivos naturais (Janssens et al. 1992). Plantas continuam sendo importantes fontes de óleos essenciais e aromas, mas há grande dependência em fatores de difícil controle, como clima e doenças. Uma alternativa à síntese de aromas naturais baseia-se nos processos microbiológicos, como fermentações (biosíntese) e bioconversões. O custo de produção de tais aromas pode ser questionado; contudo, o preço de mercado pago por aromas naturais é compensador. Por exemplo, a 4-decalactona sintética (aroma de impacto em pêssegos) custa 150 dólares/ Kg, enquanto seu similar natural

custa 6000 dólares/ Kg(4). Fungos do gênero *Ceratocystis* sintetizam diferentes aromas frutais/florais (pêssego, abacaxi, banana, cítricos e rosa), dependendo da cepa e das condições de cultivo, sendo que *C. fimbriata* é interessante devido ao seu rápido crescimento, habilidade na produção de esporos e à variedade de aromas sintetizados (Senemaud, 1988). Neste trabalho, procedeu-se a fermentação no estado sólido da casca de café com o intuito de avaliar a produção de aromas por *C. fimbriata*, comparando os resultados com outros mencionados para diferentes resíduos agroindustriais. A influência da adição de glicose e o uso de substâncias precursoras de aromas foram estudados. Os compostos biosintetizados presentes no headspace dos cultivos foram caracterizados e quantificados.

Procedimentos de fermentação: Os experimentos foram conduzidos em Erlenmeyers de 250mL, contendo 15g de matéria seca (MS) e cobertos com 8 camadas de gaze. Em todos os experimentos as condições iniciais foram: temperatura 30°C, pH 6, inóculo 1×10^7 esporos g^{-1} MS e 70% de água (máxima absorção do substrato)(1;3). A influência da adição de glicose (20%, 35% e 46%) e da adição de possíveis precursores (leucina 10 mMol (2), óleo de soja 10%(1) e solução salina(2)) foram estudadas para otimização da produção de voláteis totais (VT).

Procedimentos analíticos: Cada experimento foi realizado em triplicata. O acompanhamento da evolução da produção dos voláteis foi realizada através de avaliações sensoriais paralelamente à análise por Cromatografia de Gases (CG).

Os aromas frutais de banana, abacaxi e maçã foram produzidos durante o cultivo de *Ceratocystis fimbriata* em casca de café. Ficou caracterizado que a biosíntese de ésteres, como: isoamil acetato, etil acetato, isobutil acetato formam aroma de banana), etil isobutirato e etil butirato dão origem aos aromas de maçã e morango.

A análise por Cromatografia de Gases permitiu a identificação de diversos compostos, como indicado na **Tabela 1**, que apresenta os dados integrados para cada composto presente no headspace dos cultivos. A adição de leucina aumenta a produção de ésteres derivados do metabolismo deste aminoácido. Todos os compostos já foram mencionados previamente por outros autores (Bramorski et al., 1998; Christen et al., 1991; Christen et al., 1997).

Tabela 1: Total individual dos voláteis medidos no headspace dos cultivos de *C. fimbriata* (dados integrados).

Compostos	20	35	35.O	35.L
Acetaldeído ^a	47	57	58	50
Etanol ^a	329	428	607	565
Isopropanol ^a	26	5	-	11
Etil acetato ^b	2078	1833	1841	2811
Etil isobutirato ^b	11	10	7	15
Isobutil acetato ^b	19	18	15	35
Etil butirato ^b	9	3	1	21
Propil acetato ^b	4	-	-	-
Isoamil acetato ^b	2	11	-	16
2- heptanona ^b	-	-	-	3
2-octanona ^a	52	67	3	30
Etil 3 hexenoato ^b	-	-	-	3

20: 20% glicose; 35: 35% glicose (controle); 35.L: com leucina; 35.O: com óleo de soja.

^a expresso em equivalente de etanol mol/L gMS;

^b expresso em equivalente de etil acetato mol/L gMS.

O resíduo de casca de café tratada com vapor fluente é considerado um substrato adequado à produção de aromas por *C. fimbriata*. A adição de glicose é necessária à esta proposta e a concentração adequada compreende-se entre 20% e 35%. A adição de leucina aumentou em 58% a produção de compostos voláteis totais. Comparando os resultados com outros da literatura percebe-se que a produção total foi duas vezes superior aos melhores resultados obtidos com bagaço de mandioca, senão que este havia sido adicionado de solução de leucina 15 vezes mais concentrada (3). Contudo, os compostos identificados foram os mesmos em ambos trabalhos.

PRODUÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO (GA₃) A PARTIR DE CASCA DE CAFÉ

Ácido giberélico (GA₃) é um hormônio endógeno de plantas superiores e metabólito secundário de certos fungos. É um importante promotor e regulador do crescimento das plantas sendo utilizado na agricultura, 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. Nos últimos anos, este metabólito tem sido produzido industrialmente por fermentação submersa a um alto custo (US\$ 1 a 3/grama, dependendo da pureza e potência), uma vez que o rendimento é muito baixo e sua extração difícil. 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 e Lonsane, 1987, 1989; Brückner e Blechschmidt, 1991).

Recentemente, tem aumentado o interesse de cientistas no desenvolvimento de produção de giberelinas por fermentação no estado sólido (FES). Fermentação sobre farelo de trigo é descrita por Kumar e Lonsane (1987), que compararam o rendimento com a técnica submersa. Tal comparação também foi feita por Tomasini *et al.* (1997), utilizando-se como substratos farinha de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e poliuretano de baixa densidade. Ambos grupos obtiveram maior rendimento com a FES, no caso de Kumar e Lonsane de 1,6 vezes, e custo cerca de 2,5 vezes menor.

Este trabalho teve por objetivo determinar a possibilidade da utilização da casca do café como substrato de fermentação para produção de ácido giberélico. Para tanto foram utilizadas seis cepas de microrganismos produtoras de GA₃ em fermentação no estado sólido e submersa, comparando-se dessa forma, o rendimento dos métodos.

A **Tabela 2** mostra os resultados da seleção de cepas em casca de café tratada de 3 diferentes maneiras. O melhor resultado foi obtido com o resíduo sólido da extração da casca do café. Isso se dá, provavelmente, por existirem substâncias inibidoras do metabolismo de produção das giberelinas nos resíduos de café (casca e extrato), que com o pré-tratamento (hidrólise) são eliminadas.

O microrganismo que apresentou melhor produção foi a cepa LPB-06, para os três sistemas de fermentação. Dessa forma, a quantificação por HPLC foi feita para os fermentados por este microrganismo. Para os sistemas em FES, a cepa LPB-01 e LPB-03 também apresentaram bons resultados; já para FSm, a cepa

TABELA 2: Resultados da presença de GA₃ produzido por fermentação em cromatografia em camada delgada.

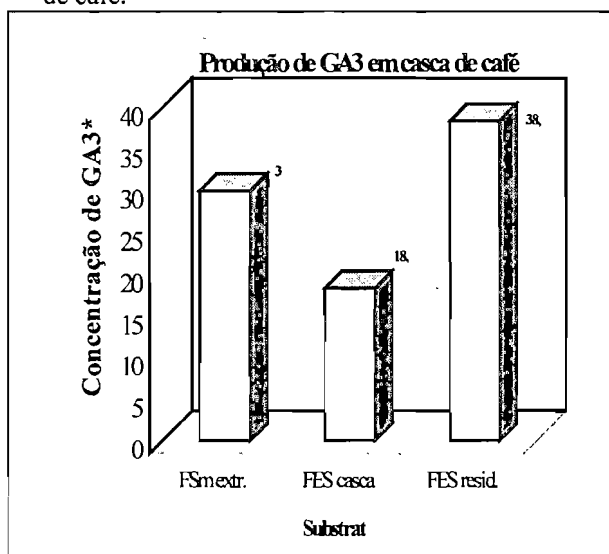
CEPA	FSm extrato De casca	FES casca de café	FES resíduo após extração
LPB-1	+++	++++	++++
LPB-2	++++	++	+++
LPB-3	++	+++	+++
LPB-4	+	+	++
LPB-5	+	+	++
LPB-6	++++	++++	++++

Onde: Maior número de "+" significa melhor fluorescência.

LPB-02 teve uma maior produção. As cepas LPB-04 e LPB-05 apresentaram uma baixa produção de GA_3 para todos os substratos.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) Os resultados da quantificação do GA_3 produzido por fermentação da cepa LPB-06, obtidos por HPLC estão apresentados na **Figura 1**, a seguir: Os valores de concentração são dados em $mg GA_3/L$ substrato para FSm e em $mg GA_3/kg$ substrato para FES.

FIGURA 1: Produção de GA_3 pela cepa LPB-06, em diferentes sistemas de fermentação com casca de café.



Os resultados acima mostram a possibilidade da utilização da casca de café como substrato para produção de GA_3 por fermentação no estado sólido, desde que feito um pré-tratamento do substrato.

Estudos complementares estão realizados com vistas a otimização das condições de tratamento do substrato e de fermentação quanto a parâmetros físicos e nutricionais, utilizando-se planejamento experimental com análise por superfície de resposta. Com estas otimizações espera-se aumentar a produção de ácido giberélico.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram as potencialidades para com o desenvolvimento de novas pesquisas que visam o aproveitamento dos resíduos sólidos (casca, borra, polpa e fôlhas) da agroindústria do café. Esses sub-produtos são ricos em moléculas orgânicas que poderão ser transformadas em produtos de valor comercial importante. Ressaltamos também que a valorização dos sub-produtos sólidos e líquidos da

agro-indústria do café é uma forma recomendável e moderna de proteção do meio ambiente, podendo propiciar ao produtor recursos financeiros complementares expressivos, sobretudo em períodos de baixa no preço do café.

AGRADECIMENTO

Carlos Ricardo Soccol agradece ao CNPq (bolsa produtividade em pesquisa) e a União Européia (projeto INCO DC: N°CT970185) pelo apoio financeiro recebido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bramorski, A. *Caracterização do crescimento e produção de metabólitos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agroindustriais*. Curitiba, 1997. Dissertação (MSc Tecnologia Química), UFPR.
- Brahan, J. E.; Bressani, R. *Pulpa de Café – composición, tecnología y utilización*. Bogota: Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, INCAP, 1978.
- Brückne, B.; Blechschmidt, D. The Gibberellin Fermentation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1991, 11(2), 163-192.
- Christen, P et al. *Biotechnology Letters*, 1991, 20(4) : 359-362.
- Christen, P et al. *Biotechnology Letters*, 1997, 101(8) : 911-919.
- Kumar, P. K. R. & Lonsane, B. K. Gibberellic Acid by solid state fermentation: consistent and improvement yields. *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, 30, 267-271.
- Janseens, L et al., *Process Biochemistry*, 27:195-215, 1992.
- Kumar, P. K. R. & Lonsane, B. K. Microbial Production of Gibberellins: state of the art. *Advances in Applied Microbiology*, 1989, 34, 29-139.
- Hesseltine, C. W. Solid State Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 1972, 14, 517-532.
- Pandey, A. Recent process development in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 1992, 7, 109-117.
- Senemaud, C. PhD Thesis, France, 1998.
- Soccol, C. R. *Contribuição ao estudo de fermentação no estado sólido em relação à produção do ácido fumárico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e basidiomicetos do gênero *Pleurotus**. Curitiba, 1994. Tese (Professor titular em Biotecnologia e Tecnologia de Alimentos) – UFPR.

Soccol, C. R. & Krieger, N. *Advances in Biotechnology*, Edited by Educational Publishers & Distributors, New Delhi, June-July, 1998, pag.25-40.

Sturza, R. *Aproveitamento biotecnológico dos resíduos da extração do suco da maçã por* 3, 203-206.

fermentação no estado sólido. Curitiba, 1995. Dissertação (MSc Tecnologia Química), UFPr .
Tomasini, A.; Fajardo, C.; Barrios-González, J. Gibberellic acid production using different solid-state fermentation systems. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1997,1

Soccol C.R., Leifa F., Woiciechowski A.L., Brand D., Machado C.M.M., Soares M., Christen Pierre, Pandey A. (2000).

Experiencia brasileira na valorizacao biotecnologica de subprodutos da agroindustria do cafe.

In : Riede C.R. (ed.), Sera T. (ed.), Roussos Sevastianos (ed.). Anais do 3 Seminario internacional sobre biotecnologia na agroindustria cafeeira = Proceedings of the 3rd international seminar on biotechnology in the coffee agroindustry.

Londrina, PR (BRA) ; Montpellier : IAPAR ; IRD, p. 323-328.

SIBAC : International Seminar, 3., Londrina, PR (BRA), 1999/05/24-28.