

DETOXIFICAÇÃO BIOLÓGICA DA CASCA DE CAFÉ POR FUNGOS FILAMENTOSOS EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

Debora Brand¹, Fernando Kawata¹, Ashok Pandey¹, Sevastianos Roussos², Maria Carolina Rocha dos Santos¹, e Carlos Ricardo. Soccol¹

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

²Laboratoire de Microbiologie ORSTOM, Université de Provence, 132288 Marseille, France.

INTRODUÇÃO

A transformação tecnológica do café, gera uma grande quantidade de resíduos não aproveitados como: cascas, folhas e borra, que podem ser utilizados como substrato de fermentação por seu grande conteúdo nutricional. 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 melhorar este conteúdo é a utilização da fermentação no estado sólido, empregando microorganismos 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.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção de Microorganismos

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 *Phanerochaete*.

O crescimento radial em ágar extrato de casca de café foi realizado por meio de inoculação dos microorganismos 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.

Preparo do Ágar extrato de casca de café

Pesou-se 100 g de casca de café previamente pulverizada com partículas inferiores a 0,8 mm e adicionou-se 1000 mL de água destilada em um frasco Erlenmeyer de 2000 mL. Cozinhou-se em autoclave à 100° C, durante 1 hora. Filtrou-se e completou-se o volume para 1000 mL.

Adicionou-se então 20 g/L de ágar bacteriológico. Esterilizou-se o meio em autoclave a 121° C durante 15 minutos.

FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

Preparo do substrato

A casca de café inicialmente foi seca em estufa com circulação de ar à 55° C por 48 horas até atingir uma umidade de aproximadamente 8%. O substrato foi conduzido a um processo de moagem em moinho manual e posteriormente foi realizada uma classificação do material por meio de peneiras. Utilizou-se a fração granulométrica compreendida entre 0,8 e 2,0 mm.

Pesou-se 20 g da casca de café previamente moída, em frasco Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 50% de água à partir da umidade calculada e procedeu-se a esterilização do material. As fermentações foram feitas em duplicata, variando-se as condições iniciais de pH e umidade para cada experimento.

Preparo do inóculo

Phanerochaete chrysosporium: O fungo foi inoculado em placas com meio PDA (ágar batata dextrose), que foi então incubado em estufa a 35° C durante 10 dias. Os esporos foram coletados em Câmara de Fluxo Laminar com o auxílio de uma alça de platina e transferidos para um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo água destilada e gotas de tween 80 que foram previamente esterilizados. Faz-se então a contagem do número de esporos em câmara de Neubauer.

Rhizopus arrhizus: Utilizou-se a mesma técnica descrita acima, sendo que a temperatura de incubação é de 32° C.

Análises das Amostras Fermentadas

O grau de detoxificação das amostras foi avaliado pela quantificação de cafeína e taninos remanescentes na casca após fermentação:

Cafeína: método que envolve a digestão da amostra com ácido sulfúrico e extração com clorofórmio e comparação com a curva padrão em espectrofotômetro no comprimento de onda de 276,5 nm.

Taninos: O teor de taninos foi determinado pelo método de Lowenthal, que consiste na titulação da amostra com permanganato de potássio com indicador de índigo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na avaliação do crescimento radial e biomassa produzida para fungos do gênero *Rhizopus* estão demonstrados na tabela 1:

TABELA 1: Seleção de cepas de *Rhizopus* em ágar extrato de Casca de Café (100 g/L)

CEPA	VELOCIDADE DE CRESCIMENTO RADIAL (MM/H)	BIOMASSA (mg/placa)
<i>R. oryzae</i> 28168	2,19 ± 1,12	10,20 ± 0,56
<i>R. oryzae</i> 395	2,05 ± 0,87	8,70 ± 1,20
<i>R. delemar</i> 34612	2,13 ± 2,12	10,80 ± 6,00
<i>R. circicans</i> 1475	2,09 ± 0,83	9,20 ± 0,70
<i>R. arrhizus</i> 16179	2,03 ± 0,34	12,10 ± 2,20
<i>R. arrhizus</i> 28425	1,94 ± 0,76	6,6 ± 0,40
<i>R. oryzae</i> 28627	1,88 ± 1,15	7,90 ± 4,30
<i>R. sp.</i> 25975	1,78 ± 1,32	2,80 ± 0,20
<i>R. oligosporus</i> 3267	1,78 ± 0,87	3,60 ± 0,20
<i>R. arrhizus</i> 2582	1,45 ± 0,97	3,20 ± 0,20
<i>R. formosa</i> 28422	0,94 ± 0,65	2,90 ± 0,80

*TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO 32 C. pH INICIAL: 6,0

OBSERVA-SE PELOS VALORES DEMONSTRADOS NA TABELA ANTERIOR, QUE AS VELOCIDADES DE CRESCIMENTO DE CADA CEPA, VARIARAM ENTRE 0,94 MM/H À 2,19 MM/H. AS CEPAS DE *RHIZOPUS* QUE PRODUZIRAM MAIOR QUANTIDADE DE BIOMASSA CORRESPONDEM ÀQUELAS QUE TEM

MAIOR VELOCIDADE DE CRESCIMENTO. VERIFICA-SE QUE AS CEPAS FORAM CAPAZES DE ASSIMILAR E METABOLIZAR O SUBSTRATO À BASE DE CASCA DE CAFÉ PRODUZINDO BIOMASSA, QUE É CARACTERIZADO PELO CRESCIMENTO RADIAL. PARA ESTUDOS POSTERIORES DE FERMENTAÇÃO FOI ESCOLHIDA A CEPA *RHIZOPUS ARRHIZUS* 16179 POR TER APRESENTADO A MAIOR PRODUÇÃO DE BIOMASSA E UMA DAS MELHORES VELOCIDADES DE CRESCIMENTO.

Na seleção de cepas de fungos do gênero *Phanerochaete*, foi avaliada a velocidade de crescimento radial e a biomassa produzida de duas cepas denominadas de HD e BK, demonstradas na tabela 2:

TABELA 2: Seleção de cepas de *Phanerochaete* em ágar extrato de casca de café

CEPA	Velocidade de crescimento radial (mm/hora)	Biomassa (mg/placa)
<i>P. chrysosporium</i> HD	1,56 ± 0,34	1,83 ± 0,56
<i>P. chrysosporium</i> BK	2,03 ± 0,82	2,21 ± 0,76

*Temperatura de incubação de 37°C, pH inicial: 4,5

Para estudos de fermentação foi escolhida a cepa BK por apresentar uma maior velocidade de crescimento radial e biomassa produzida em 92 horas.

Fermentação no Estado Sólido

Para as fermentações realizadas com a cepa *Rhizopus arrhizus* 16179 foi testado pH inicial entre 5,5 e 6,5 e umidade de 60 à 70%, pode-se observar pelo gráfico 1 que a maior detoxificação ocorreu em pH 6,0, umidade de 60 % a 32°C, demonstrado no experimento 5. O tempo de fermentação foi de 6 dias para todos os experimentos.

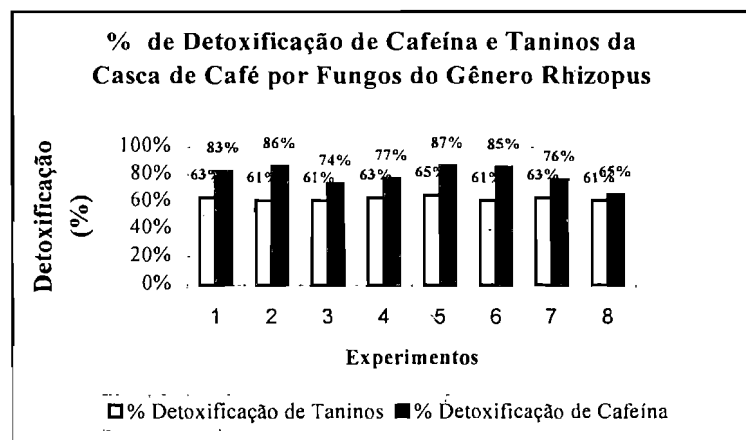


Gráfico 1. Detoxicação da casca de café por *Rhizopus* 16179. Com um tempo de fermentação de 14 dias o fungo *Phanerochaete chrysosporium* foi capaz de degradar a cafeína e 45% de taninos num pH inicial de 5,5, umidade de 65% à 35°C como demonstrado no experimento 5 do gráfico 2. Nos 4,5 à 5,5 e a umidade de 6 à 70%.

Detoxificação da casca de café pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*

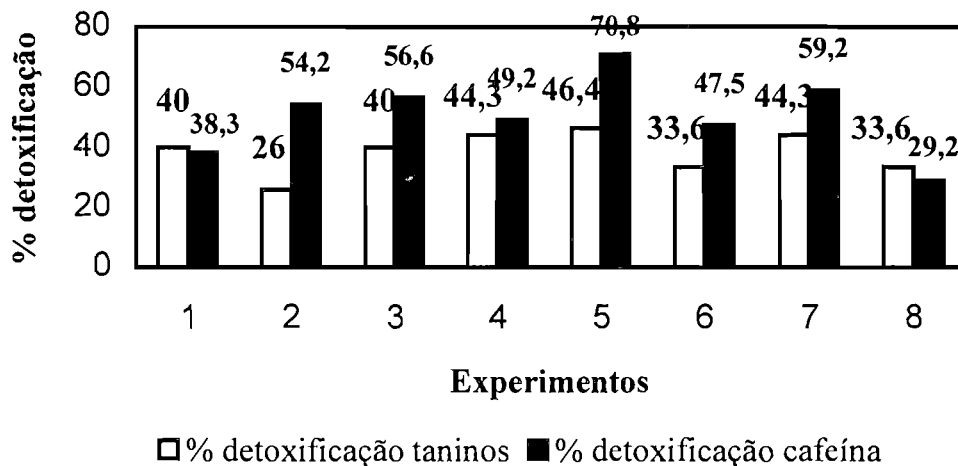


Gráfico 2: Detoxificação da casca de café por *Phanerochaete BK*.

CONCLUSÃO

As cepas selecionadas são 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. Um grau de detoxificação de cafeína de aproximadamente 90 %, deixa apenas 0,2 % de cafeína no material o que já o torna apto para utilização como ração animal. Este estudo demonstra as potencialidades do uso das cepas selecionadas de fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* e *Phanerochaete* para detoxificação da casca de café com vistas a seu uso na alimentação animal.

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

GAIME PERRAUD, I. Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons

filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. These de Doctoract – Université Montpellier II, France, 1996. 210p.

HESSELTINE, C.W.. Solid State Fermentation - An overview. *International biodeterioration*, v.23, p. 79-89, 1987.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 1985. 523 p.

PANDEY, A.. Recent Process Developments in Solid-State Fermentation. *Process Biochemistry*, v. 27, n. 2, p. 109- 117, 1992.

ROUSSOS, S.; HANNIBAL, L.; AQUIAHUATL, M.A.; TREJO HERNANDEZ, M.R.; MARAKIS, S. Caffeine degradation by *Penicillium verrucosum* in Solid State Fermentation of Coffee Pulp: Critical Effect of Additional Inorganic and Organic Nitrogen Sources. *Journal of Food Science Technology*. Vol. 31, No. 4, 316- 319, 1994.

SOCOL, C. R. . Contribuição ao Estudo da Fermentação no Estado sólido em Relação a produção de Ácido Fumárico, Biotransformação de Resíduo Sólido de Mandioca por *Rhizopus* e basidiomacromicetos do Gênero *Pleurotus*. Tese para o Concurso Público de Professor Titular em Biotecnologia e Tecnologia de Alimentos - Curitiba, 1994. 228p.

Brand D., Kawata F., Pandey A., Roussos Sevastianos, Santos M.C. Rochados, Soccol C.R. (2000).

Detoxificacao biologica da casca de cafe por fungos filamentosos em fermentacao no estado solido.

In : Riede C.R. (ed.), Sera T. (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. 401-403.

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